

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

**IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE
Cucumber mosaic virus E TRIAGEM DE GENÓTIPOS DE
PIMENTÃO PARA RESISTÊNCIA**

DESIRÉ SPADA DOS SANTOS FRANGIONI

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

BOTUCATU - SP
Dezembro - 2001

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

**IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE
Cucumber mosaic virus E TRIAGEM DE GENÓTIPOS DE
PIMENTÃO PARA RESISTÊNCIA**

DESIRÉ SPADA DOS SANTOS FRANGIONI

Orientador: **Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan**
Co-orientador: **Dra. Addolorata Colariccio**

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

BOTUCATU - SP
Dezembro - 2001

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

F827i Frangioni, Desiré Spada dos Santos, 1968-
Identificação e purificação de isolados de *Cucumber
mosaic virus* e triagem de genótipos de pimentão para
resistência / Desiré Spada dos Santos Frangioni. -- Bo-
tucatu, [s.n.], 2001
x, 98 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Estadual Pau-
lista, Faculdade de Ciências Agrônômicas
Orientador: Marcelo Agenor Pavan
Co-orientador: Addolorata Colariccio
Inclui bibliografia

1. Virus do mosaico do pepino 2. Virus - Identifi-
cação 3. Virus - Purificação 4. Pimentão - Resistên-
cia a doenças e pragas I. Pavan, Marcelo Agenor II.
Colariccio, Addolorata III. Universidade Estadual Pau-
lista Júlio de Mesquita Filho (Campus de Botucatu). Fa-
culdade de Ciências Agrônômicas IV. Título

Palavras-chave: Cucumber mosaic virus; CMV; Pimentão; Capsicum
annuum; ELISA; RT-PCR; RFLP; Resistência a vi-
rus; Produção de antissoro

Dedico este trabalho

Ao meu pai Heitor (*in memoriam*), por ter despertado em mim o amor pelo conhecimento e pela Verdade,

A minha mãe, Aracy, pela coragem, segurança e apoio,

Ao Renato, por seu amor imenso, sua alegria constante e apoio irrestrito.

À minha tia Gledy, por seu carinho e auxílio silencioso, sempre presente quando precisei.

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente todas as pessoas que direta ou indiretamente auxiliaram e possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. **Marcelo Agenor Pavan**, pela oportunidade de aperfeiçoamento, pela orientação paciente e incentivo, pelo apoio e compreensão durante as etapas deste trabalho e, acima de tudo, por sua amizade e confiança.

À Pesquisadora Científica do Instituto Biológico de São Paulo, Dra. **Addolorata Colariccio**, por ter me iniciado no universo da virologia, com dedicação e confiança, por todas as oportunidades que me proporcionou, pela co-orientação deste trabalho e, principalmente, pelo apoio constante e preciosa amizade.

À Dra. Marly Vicente, Pesquisadora Científica, pelos ensinamentos, amizade e apoio, durante meu período de estágio no Instituto Biológico.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação, em especial aos Professores Dr. **Antonio C. Maringoni**, Dr. **Chukichi Kurozawa**, Dr. **Edson Luis Furtado**, Dra. **Eiko Kuramae-Izioka**, Dr. **João Roberto S. Lopes**, Dr. **Marcelo A. Pavan**, Dra. **Marli Teixeira A. Minhoni** e Dr. **Nilton Luiz de Souza** pelos ensinamentos, apoio e dedicação durante o desenvolvimento do curso.

Ao Pesquisador Científico **Alexandre Levi R. Chaves**, pela grande amizade, sugestões durante a elaboração deste trabalho e colaboração durante a imunização das galinhas.

À Pesquisadora Científica **Eliana Borges Rivas**, pela amizade e colaboração.

Aos Pesquisadores Científicos **César M. Chagas, Fernando J. S. Salas, Lígia Maria L. Duarte, Marcelo Eiras e Maria Amélia Vaz Alexandre**, pela amizade, apoio e sugestões durante a realização deste trabalho.

À Pesquisadora Científica Dra. **Arlete M. T. Melo**, por ceder as sementes de pimentão para a triagem, por sua atenção e esclarecimentos.

Ao Dr. **Rômulo F. Kobori**, pelo envio de material para estudo e para os testes de triagem.

Ao Assistente Técnico **Sérgio Vianna**, pela execução do material fotográfico e por sua amizade.

Aos estagiários **Marina e Jansen**, pelo auxílio durante a imunização das galinhas.

À Pesquisadora Científica **Edna Clara T. M. Silva** e ao Sr. **Manuel Andrade**, pela manutenção das aves utilizadas para obtenção do antissoro.

Às estagiárias **Silvia e Patrícia**, pela amizade.

Aos colegas **Adriana, Alexandre, Ana Paula, César, Christiane, Gustavo, Jesus, Mariléia, Maurício, Minoru, Sérgio e Simone**, do curso de pós-graduação, pelos momentos divertidos de convívio e amizade.

Aos funcionários da Pós- Graduação, da Biblioteca e do Departamento de Proteção de Plantas, pela colaboração e auxílio sempre que necessários.

Aos funcionários do Instituto Biológico de São Paulo, em especial à **Sônia, Solange**, Sr. **Jair** e Sr. **Oswaldo**, pelo auxílio constante em vários momentos.

À **Nice**, por sua imensa boa vontade e ajuda inestimável durante a realização dos experimentos de triagem.

À minha prima **Iani**, por sua amizade tão especial e apoio durante essa etapa da minha vida.

Aos queridos amigos, **Anna Maria** e **Rafael**, pela preciosa amizade e constante auxílio durante as etapas desse trabalho.

À Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, pela oportunidade de aperfeiçoamento e aprimoramento científico.

Ao Instituto Biológico-SP, em nome de seus diretores, pela oportunidade de estágio e realização de parte do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
1. RESUMO	01
2. SUMMARY	03
3. INTRODUÇÃO	05
4. REVISÃO DE LITERATURA	08
4.1. Taxonomia e aspectos gerais da partícula viral (vírion)	08
4.2. Organização do genoma.....	09
4.3. Subgrupos.....	11
4.4. Transmissão.....	14
4.5. <i>Capsicum annuum</i> L. e a resistência a isolados do CMV.....	17
4.6. Ocorrência no Brasil.....	21
5. MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1. Fonte, coleta, armazenamento e isolamento do vírus.....	26
5.2. Testes para identificação dos isolados.....	28
5.2.1 Teste biológico.....	28
5.2.1.1 Círculo de hospedeiras.....	29
5.2.2. Teste sorológico DAS-ELISA.....	30
5.2.3. Extração de RNA total.....	31
5.2.3.1. RT-PCR.....	33
5.2.3.2. Isolamento e purificação de cDNA do gel de agarose.....	35
5.2.3.3. RFLP.....	36
5.3. Purificação do vírus.....	36
5.3.1. Monitoramento da infectividade do vírus.....	39
5.3.2. Espectro de absorção (ultravioleta).....	39
5.3.3. Determinação da concentração viral	40
5.4. Produção de antissoro para a proteína capsidial	40

5.4.1 Teste de microprecipitina.....	42
5.4.2. Teste de ELISA-indireto para titulação do antissoro.....	43
5.5. Triagem de genótipos de pimentão para a resistência ao CMV.....	44
6. RESULTADOS.....	47
6.1. Hospedeiras e sintomatologia.....	47
6.2. Identificação do subgrupo através do teste sorológico DAS-ELISA.....	54
6.3. Identificação do CMV através de RT-PCR e digestão enzimática para determinação do subgrupo.....	54
6.4. Vírus purificado.....	57
6.5. Produção de antissoro policlonal.....	60
6.6. Triagem para resistência.....	60
7. DISCUSSÃO.....	63
8. CONCLUSÕES.....	75
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

LISTA DE QUADROS

	Páginas
QUADRO 1 - Lista dos isolados de CMV obtidos em plantas da cultivar Magali-R.....	27
QUADRO 2 - Lista de genótipos de pimentão testados para avaliação de resistência.....	46
QUADRO 3 - Sintomas induzidos pelos isolados do <i>Cucumber mosaic virus</i> nas plantas indicadoras inoculadas.....	48
QUADRO 4 - Reação de resistência de genótipos de pimentão (fornecidos pelo IAC) ao <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV), expressa pela ausência de sintomas.....	61
QUADRO 5 - Reação dos genótipos de pimentão (fornecidos pela Sakata-Agroflora) ao <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV), expressa pela ausência de sintomas.....	65

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
FIGURA 1 –A) <i>Gomphrena globosa</i> → anéis necróticos; B) <i>Cucurbita pepo</i> → lesões cloróticas.....	50
FIGURA 2 – A) <i>Nicotiana glutinosa</i> → ‘line patterns’; B) <i>Nicotiana glutinosa</i> → mosaico.....	51
FIGURA 3 - A) <i>N. debneyi</i> →mosaico B) <i>N. tabacum</i> ‘Xanthi’.....	52
FIGURA 4 - A) <i>Solanum gilo</i> →clareamento de nervura B) <i>Solanum melongena</i> → mosaico e bolhosidade.....	53
FIGURA 5 - Análise em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados por RT-PCR.....	55
FIGURA 6 - Análise em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados por RT-PCR digeridos pela endonuclease de restrição <i>MspI</i>	56
FIGURA 7 - Espectro de absorbância em luz ultravioleta do CMV purificado.....	58
FIGURA 8 - <i>Chenopodium amaranticolor</i> →lesão clorótica local (avaliação da infectividade da preparação purificada).....	59

1. RESUMO

No período de 1998 à 2001, 17 amostras de pimentão ‘Magali-R’ (*Capsicum annuum* L.) com sintomas de mosaico sistêmico, nanismo, deformação foliar e dos frutos, causando severos danos e perdas econômicas, foram coletadas nas regiões produtoras de Paulínia, Lins, Jacareí, Guaiçara e Lucianópolis, municípios do Estado de São Paulo. Essas amostras foram caracterizadas através de círculo de hospedeiras, DAS-ELISA com o emprego de anticorpo monoclonal contra o CMV-I e CMV-II. Um isolado de cada região foi caracterizado molecularmente, quanto ao subgrupo através da RT-PCR e RFLP com a endonuclease de restrição *Msp*I. As amostras foram inoculadas em plantas indicadoras que reagiram com sintomas típicos do *Cucumber mosaic virus* (CMV), entre estas, *Nicotiana glutinosa* demonstrando mosaico sistêmico e ausência de necrose, indicou que os isolados do CMV, em estudo, pertenciam ao subgrupo I. *N. glutinosa* foi utilizada para manter os isolados, para os testes de ELISA, extração de RNA total e como multiplicadora do vírus para a

purificação. Todos os isolados testados no DAS-ELISA reagiram positivamente ao anticorpo monoclonal específico para o CMV-I e negativamente para o CMV-II. Os isolados 1, 3, 4, 15 e 17 foram amplificados com sucesso através da RT-PCR, e produziram um fragmento de 486 pb, tamanho esperado para o subgrupo I. Fragmento que ao ser digerido pela *MspI*, resultou em duas bandas de 150 e 336 pb, padrão esperado para o CMV-I. O método utilizado na purificação foi eficiente, resultando em uma preparação do CMV purificado, cujo rendimento foi de 40 mg/kg de tecido infectado, permitindo a imunização de galinhas e a produção de um antissoro policlonal específico à partir das gemas dos ovos. O antissoro apresentou alto título em ELISA indireto. A triagem de genótipos de pimentão para a resistência ao CMV demonstrou que o genótipo AF-97A reagiu com imunidade e os genótipos AF-188, AF-1178, AF-98 A, AF-99 A e AF-136 A mostraram-se tolerantes ao patógeno. As progênies dos híbridos Lamuyo, Reinger, Mayata, Mônica, Magali, Mikalor, Esterel, Melody e a variedade 'All Big' apresentaram plantas com imunidade. Os resultados obtidos são promissores para o desenvolvimento de programas de melhoramento de pimentões resistentes ao CMV.

IDENTIFICATION AND PURIFICATION OF *Cucumber mosaic virus* ISOLATES AND SCREENING OF SWEET PEPPERS GENOTYPES FOR RESISTANCE. Botucatu, 2001. 98p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: DESIRÉ SPADA DOS SANTOS FRANGIONI

Adviser: MARCELO AGENOR PAVAN

Co-adviser: ADDOLORATA COLARICCIO

2. SUMMARY

During the years 1998 to 2001, 17 samples of sweet peppers ‘Magali-R’ (*Capsicum annuum* L.) showing systemic mosaic, stunt, leaf and fruit distortion, causing severe damage and economic losses, were collected from Paulínia, Lins, Jacareí, Guaíçara and Lucianópolis, regions of São Paulo State. These samples were characterized by host range and DAS-ELISA with monoclonal antibodies against CMV I and CMV II. One isolate from each region was also characterized by RT-PCR and RFLP with restriction enzyme *MspI*. The plants host range revealed the presence of the *Cucumber mosaic virus* (CMV) in all samples. The symptom reaction in *Nicotiana glutinosa* was systemic mosaic without necrosis, indicating that all CMV isolates belongs to subgroup I. The CMV isolates were also propagated and maintained in this host for the ELISA test and total RNA extraction. All isolates tested by DAS-ELISA reacted positively with CMV I specific monoclonal antibodies and negatively with CMV II. The isolates 1, 3, 4, 15 e 17 were successfully amplified by the RT-PCR and produced a fragment of 486 pb, the expected size for CMV subgroup I. These fragments when digested by *MspI* produced two bands of 150 and 336 pb, restriction pattern

expected for the CMV subgroup I. Purified CMV yielding was 40mg/kg of infected leaves. The method used was efficient to produce a good purified preparation utilized to immunize chickens that produced specific antiserum with high titer. Screening of sweet peppers resistance to CMV showed immunity of AF-97A and tolerance of AF-188, AF-1178, AF-98 A, AF-99 A and AF-136 A. The hybrid progenies Lamuyo, Reinger, Mayata, Mônica, Magali, Mikalor, Esterel, Melody and “All Big” cultivar showed immune plants. These results are promising to sweet pepper breeding for resistance to CMV.

Keywords: *Cucumber mosaic virus*, sweet pepper, *Capsicum annuum*, ELISA, RT-PCR, RFLP, virus resistance.

3.INTRODUÇÃO

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) pertence à família botânica *Solanaceae*. Sua produção ocorre tanto em cultivo protegido quanto convencional (campo aberto) (Siviero *et al.*, 1992), sendo o último a principal forma de produção no Brasil. É uma das hortaliças de consumo significativo no país, sendo amplamente cultivada nos estados de São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro e estados da região Nordeste. Pode-se dizer que o cultivo do pimentão ocorre em todo território nacional, embora os Estados acima destacados sejam responsáveis pela maior parcela da produção (Maldonado, 2001). No Estado de São Paulo, segundo dados do Instituto de Economia Agrícola (IEA-2001), no ano de 1999 a produção do pimentão foi de 82116 toneladas, em uma área de 3616 hectares. Esses dados demonstram a importância dessa cultura indicando uma estimativa do capital envolvido na mesma e sua relevância social, espelhada na oferta de empregos gerada pelas diferentes atividades englobadas pela cadeia produtiva.

As hortaliças estão sujeitas a numerosas doenças devido, principalmente, às práticas agrícolas que criam condições favoráveis ao desenvolvimento dos patógenos. A parte comestível do pimentão são os frutos, portanto qualquer dano causado aos mesmos por doença deprecia o produto tornando-o indesejável ao mercado consumidor.

Em 1998, foi detectada uma alta incidência de mosaico, causada pelo vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus* - CMV) em plantações de pimentão híbrido 'Magali-R' na região de Lins (Kobori *et al.*, 2000), que se alastrou para as demais regiões produtoras do Estado de São Paulo. Os sintomas observados nesse híbrido, que é resistente ao vírus Y da batata – *Potato virus Y* (PVY), foram mosaico sistêmico, nanismo, deformação foliar e dos frutos.

O CMV é a espécie tipo do gênero *Cucumovirus* pertencente à família *Bromoviridae* (van Regenmortel *et al.*, 2000). Dentre os fitovírus, é um dos que possui o maior círculo de hospedeiras (Palukaitis *et al.* 1992), superando 800 espécies, dentro de 365 gêneros em 85 famílias botânicas. As primeiras descrições de sua incidência foram feitas por Doolittle (1916) e Jagger (1916), que demonstraram a natureza virótica da doença quando relataram sua incidência em pepino. Desde então, sua disseminação tem sido ampla, alcançando praticamente todas as regiões do mundo ao atingir indiscriminadamente o cultivo de frutíferas, olerícolas e ornamentais (Varveri & Boutsika, 1999). Nos últimos 84 anos o CMV tem sido identificado como o agente causal de mais de 100 doenças de plantas, que causam desde um mosaico discreto até necrose severa e morte.

No Brasil, até recentemente, a maior preocupação com viroses em pimentão, estava relacionada com o PVY, devido à alta incidência e constantes prejuízos. Não havia no Brasil registro de infecções severas causadas por CMV em pimentão, exceto algumas

ocorrências esporádicas, ao contrário das regiões temperadas onde é uma doença muito comum (Nagai, 1984; Siviero *et al.*, 1992). Nagai (1984) salientou a importância de haver uma vigilância severa em relação a sua ocorrência nas culturas de solanáceas. Previu que a disseminação do CMV seria muito rápida devido à atividade do afídeo vetor que o transmite de forma não persistente (estiletar). Além disso, apontou o fato de não existir cultivares de pimentão resistentes a este vírus.

As estirpes do CMV apresentam grande variabilidade e são classificadas em dois subgrupos, CMV-I e CMV-II (Owen & Palukaitis, 1988). A identificação do subgrupo a que pertence um isolado é de suma importância para a realização de estudos que culminem em medidas de controle. A variabilidade das estirpes é um fator que interfere na eficiência da transmissão pelo afídeo (Gera *et al.*, 1979). Influencia na resposta das plantas à infecção, determinando seu comportamento junto às plantas cultivadas e da vegetação espontânea, que são reservatórios naturais dos vírus (Edwards & Gonsalves, 1983; Lapidot *et al.*, 1997). Outro fator relevante é que estudos de triagem de cultivares resistentes devem ser realizados com os isolados do vírus de ocorrência local, pois envolvem as complexas relações no trinômio planta-ambiente-patógeno e quanto mais criteriosa for sua caracterização, maiores serão as possibilidades de êxito (Sudarsono *et al.*, 1998).

Os objetivos do presente trabalho foram a identificação biológica, sorológica e molecular de isolados do CMV, purificação, produção de antissoro e a triagem de genótipos de pimentão resistentes ao CMV.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Taxonomia e aspectos gerais da partícula viral (vírion)

A família *Bromoviridae* possui 5 gêneros, dentre eles o *Cucumovirus* ao qual pertence o CMV, considerado a espécie tipo desse gênero, as outras duas espécies são *Peanut stunt virus* (PSV) e *Tomato aspermy virus* (TAV) (van Regenmortel *et al.*, 2000). As três espécies são similares quanto à morfologia da partícula, transmissão pelo vetor e organização do genoma, embora a sequência do ácido nucléico, critérios sorológicos e gama de espécies hospedeiras sejam fatores que as distingue (Kaper & Waterworth, 1981). As partículas do CMV são isométricas com diâmetro em torno de 28 a 30 nm, como foi demonstrado através de contrastação negativa com acetato de uranila pH 4,5 (Francki & Hata, 1980), sua estrutura compreende uma capa protéica que envolve o RNA fita simples de polaridade positiva (Palukaitis *et al.*, 1992). Geralmente, a partícula do CMV contém 18 % de

RNA , o capsídeo é formado por 180 subunidades protéicas iguais e sua massa molecular é de cerca de 24.500 Da (Gibbs & Harrison, 1970; van Regenmortel *et al.*, 2000).

As partículas purificadas do CMV migram, durante eletroforese em gel de poliacrilamida, como um único componente e seu coeficiente de extinção a 260 nm é 5.0. A estabilidade da partícula é garantida basicamente por interações eletrostáticas entre o RNA e a proteína, evidências sugerem que essa interação ocorre entre cargas positivas de resíduos de lisil na capa protéica e a carga negativa dos grupos fosfato dos RNAs (Kaper & Waterworth, 1981). Partículas do CMV, TAV e PSV não são distinguíveis morfológicamente (Palukaitis *et al.*, 1992).

4.2 Organização do genoma

O genoma do CMV está dividido em três segmentos de RNAs genômicos (RNA 1, RNA 2 e RNA 3) e um quarto RNA subgenômico (RNA 4), derivado do RNA 3. O RNA 4 não é necessário para a infecção, mas é imprescindível para a formação da proteína capsidial (Kaplan *et al.*, 1997). Os quatro RNAs possuem polaridade positiva e são constituídos por fita simples, atuando como RNAs mensageiros e possuem cerca de 200 nucleotídeos, na região terminal 3' não traduzível (Palukaitis *et al.*, 1992). O RNA 1 e o RNA 2 são encapsidados em partículas separadas, enquanto que os RNAs 3 e 4 fazem parte de uma terceira partícula (Kaplan *et al.*, 1997). É necessária a inoculação das três partículas para que haja infecção, portanto, o afídeo vetor deverá transmiti-las, o mesmo ocorrendo quando a transmissão for feita mecanicamente (Palukaitis, *et al.*, 1992).

O RNA 1, com aproximadamente 3357 nucleotídeos, possui uma única cadeia aberta de leitura ('open reading frame' - ORF) que codifica uma proteína denominada 1a ou 111K, cuja massa molecular é de cerca de 111000 Da (Palukaitis *et al.*, 1992). Sabe-se que essa proteína está associada principalmente com a replicação viral, no entanto, há estudos que sugerem sua associação com as proteínas de movimento, interferindo na disseminação do vírus na planta hospedeira, como foi demonstrado por Gal-On *et al.*(1994).

O RNA 2 do CMV possui cerca de 3050 nucleotídeos e uma ORF que codifica uma proteína de massa molecular entre 94000 e 97000 Da, chamada de proteína 2a, envolvida na replicação do vírus (Palukaitis *et al.*, 1992; Gal-On *et al.*, 1994). O RNA 2 possui ainda um segundo gene, denominado 2b, responsável pela codificação da proteína 2b, com massa molecular de 11300 Da. A seqüência codificadora dessa proteína no RNA 2 se sobrepõe aos 69 códons terminais da ORF do gene 2a. A proteína 2b atua na disseminação sistêmica do vírus na planta hospedeira, além de ser um fator que pode estar envolvido em uma interação de especificidade entre o vírus e a planta hospedeira, como supressor do silenciamento gênico (Kaplan *et al.*, 1997).

O terceiro RNA genômico do CMV possui cerca de 2116 nucleotídeos e duas ORFs. A ORF próxima a extremidade 5' é responsável por codificar a proteína 30K ou 3a, que é um produto da tradução do RNA 3. A ORF terminal 3' codifica a proteína 24K, que é resultante da tradução do RNA 4 subgenômico, com função de proteína do capsídeo (Palukaitis *et al.*, 1992). O RNA 4 possui aproximadamente 1031 nucleotídeos, é considerado subgenômico porque é sintetizado a partir do RNA 3 e carrega o gene da capa protéica (Haq *et al.*, 1996). No caso do CMV, a proteína 3a (30K) e a proteína do capsídeo (24K) são

necessárias para que ocorra movimento em todos os hospedeiros (Suzuki *et al.*, 1991; Canto *et al.*, 1997).

O CMV pode apresentar, ainda, associado às suas partículas um pequeno segmento de RNA, com aproximadamente 335 nucleotídeos, denominado RNA satélite. Ele não é necessário para a infecção ou a replicação do CMV, porém é absolutamente dependente do CMV para sua replicação e encapsidação (Montasser *et al.*, 1991). A presença do RNA satélite pode afetar o nível de replicação do CMV e, conseqüentemente, sua patogenicidade (Palukaitis *et al.*, 1992). A primeira incidência desse RNA, também chamado de RNA 5 foi relatada na França em 1974, como agente causal de necrose em tomate (Gallitelli *et al.*, 1991). Embora tenham sido detectados como causadores de sintomas drásticos, alguns RNAs satélites do CMV têm sido apontados como responsáveis pela redução do acúmulo do vírus principal e denominados de vírus auxiliar, e por atenuarem os sintomas de alguns isolados (Wu *et al.*, 1989). A competitividade, durante a replicação, entre o RNA satélite e os RNAs do CMV tem sido a base para a utilização dos RNAs satélites no controle biológico de infecções causadas pelo CMV (Wu *et al.*, 1989).

4.3 Subgrupos

Vários isolados do CMV têm sido descritos desde a primeira ocorrência. Desde então, o que vem sendo observado nos diferentes trabalhos é que muitos isolados diferem quanto ao círculo de hospedeiras e patogenicidade (Varveri & Boutsika, 1999). Entretanto, todos esses isolados, via de regra, podem ser classificados nos dois subgrupos sorológicos do CMV, DTL e ToRS, também denominados I e II (Owen &

Palukaitis, 1988). Essa divisão foi feita com base em sua reação no teste de imunodifusão (Devergne & Cardin, 1973). O subgrupo I, cujo isolado tipo é o DTL, ocorre predominantemente nas regiões tropicais e sub-tropicais, geralmente causando sintomas severos e grandes epidemias, enquanto o subgrupo II, que possui como isolado tipo o ToRS, prevalece nas regiões temperadas, em geral, com sintomatologia mais branda que os isolados pertencentes ao subgrupo I (Haase *et al.*, 1989). Em muitos casos, a classificação sorológica parece estar bem relacionada com o grupo definido por reações de plantas hospedeiras, que diferencia os isolados pela sintomatologia (Devergne & Cardin, 1973; Palukaitis *et al.* 1992). No entanto, Wahyuni *et al.* (1992) ressaltam que devido à extrema variabilidade do círculo de hospedeiras e sintomatologia, não são todas as estirpes que podem ser designadas como pertencentes a um dos subgrupos, baseando-se em critérios puramente biológicos. Outro fator de relevante interferência é que a identificação baseada em propriedades biológicas, como círculo de hospedeiras e sintomatologia, é insatisfatória devido a sua grande variabilidade, pois são determinados por interações do genoma viral e do genoma da planta hospedeira que sofrem grande interferência de fatores externos, como por exemplo as condições ambientais (Francki & Hatta, 1980).

Muitos métodos têm sido utilizados para diferenciar esses grupos, além do sorológico citado acima, como a hibridização do ácido nucléico (Owen & Palukaitis, 1988; Piazzola *et al.*, 1979), mapeamento peptídico da capa protéica (Edwards & Gonsalves, 1983) e mais recentemente a RT-PCR (transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase) combinada com a análise da restrição do produto amplificado (Rizos *et al.*, 1992; Wylie *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1995; Varveri & Boutsika, 1999).

A semelhança entre as estirpes do CMV dentro de cada subgrupo é grande, diminuindo entre os dois subgrupos (Palukaitis *et al.*, 1992). A sequência de aminoácidos da capa protéica de estirpes do mesmo subgrupo apresenta 94-99 % de homologia e, entre os subgrupos a homologia é de 80-83 % (Quemada *et al.*, 1989).

A análise das seqüências de aminoácidos da capa protéica do CMV, obtida após o seqüenciamento do RNA 3, demonstrou que a capa protéica das estirpes que pertencem ao mesmo subgrupo é altamente conservada (Quemada *et al.*, 1989; Owen *et al.*, 1990). A comparação entre sete capas protéicas do subgrupo I, realizada por Owen *et al.* (1990), evidenciou que elas diferiam de 2 a 13 aminoácidos, e que a maioria das trocas eram substituições de aminoácidos com propriedades químicas similares. A sequência de nucleotídeos da ORF do gene da capa protéica é uma região bastante conservada. No entanto, apresenta uma variação específica entre os subgrupos, possibilitando a utilização do método de RT-PCR ('Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction'), seguido de RFLP ('Restriction Fragment Length Polymorphism'). Os produtos amplificados, ao sofrer digestão com enzimas de restrição, originam padrões diversos que permitem a identificação dos isolados. Portanto, é uma alternativa para a classificação dos isolados de CMV nos subgrupos I ou II (Singh *et al.*, 1995).

Nas seqüências dos demais RNAs há, aproximadamente, 71-76 % de homologia entre os subgrupos I e II, embora a distribuição da homologia não seja uniforme ao longo dos três RNAs (Palukaitis *et al.*, 1992).

Os testes sorológicos mais utilizados para diagnosticar o CMV têm sido a imunodifusão e o ELISA ('Enzyme Linked Immunosorbent Assays') (Francki & Hatta, 1980). Em imunodifusão, os melhores resultados são obtidos com preparações purificadas do

vírus (Francki & Hatta, 1980), enquanto que o teste de ELISA é altamente eficiente mesmo com extrato bruto da planta infectada (Palukaitis *et al.*, 1992). O teste de ELISA direto (DAS-ELISA) com o emprego de anticorpos monoclonais para os subgrupos I e II, proporciona a identificação de estirpes bastante relacionadas em ambos os subgrupos (Wahyuni *et al.*, 1992). Os anticorpos monoclonais aumentam a sensibilidade e a especificidade do ELISA direto (Haase *et al.*, 1989).

4.4 Transmissão

O CMV em condições naturais, geralmente é transmitido por afídeos (pulgões) de maneira não-circulativa (não persistente), ou seja, o afídeo-vetor adquire o vírus da planta fonte em um período de tempo inferior a um minuto. O processo também é chamado de picada de prova, e o vírus é transmitido para outras plantas logo a seguir, nas picadas subsequêntes sem período latente. A perda da capacidade de transmissão é rápida, pois o período de retenção do vírus é extremamente curto (Ng *et al.*, 2000).

As espécies mais comuns de afídeos responsáveis pela disseminação do CMV são *Aphis gossypii* e o *Myzus persicae*. Além dessas duas espécies, já foram relatadas 86 outras como vetoras do CMV, entre elas, *A. spiraecola* (*A. citricola*), *A. craccivora*, *Lipaphis erysimi*, *Rhopalosiphum padi*, *R. maidis*, *Schizaphis graminum* (Hobbs *et al.*, 2000).

Apesar de ser transmitido por várias espécies de afídeos, para diversas espécies de plantas de gêneros e famílias botânicas diferentes, aparentemente com ausência de especificidade, há diferenças na capacidade de transmissão das estirpes do CMV. Essa capacidade não está associada à planta hospedeira e à concentração do vírus no tecido vegetal,

mas com propriedades intrínsecas da capa protéica do vírus. Tais propriedades, provavelmente, proporcionam a aderência da partícula viral ao estomodéu do inseto. Experimentos de transencapsidação realizados entre diferentes isolados fundamentam essa hipótese (Gera *et al.*, 1979). Recentemente Perry *et al.* (1998), identificaram a presença de aminoácidos na capa protéica do vírus que interferem na transmissão do mesmo pelos afídeos *A. gossypii* e *M. persicae*.

O CMV pode ser também transmitido por sementes de algumas espécies de plantas. A porcentagem de transmissão pela semente é bastante variável, inclusive dentro de uma mesma espécie. Além disso, aspectos como cultivar, condições ambientais e a ação de diferentes estirpes, aumentam essa variabilidade (Palukaitis *et al.*, 1992). Em abóbora (*Cucurbita pepo*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), pepino selvagem (*Echinocystis lobata*) e espinafre (*Spinacia oleracea*) as porcentagens de transmissão foram de 0.7, 7.0, 55 e 15 %, respectivamente. Em muitos sistemas vírus-planta, a transmissão de vírus através das sementes, apesar da proporção baixa, é imprescindível para a sua perpetuação e disseminação na natureza, garantindo a fonte primária do inóculo, que devido ao impacto que causa nas plantas cultivadas, deve ser considerada (Yang *et al.*, 1997).

Na Austrália, a principal fonte de infecção por CMV, nas produções de tremçoço (*Lupinus angustifolius*), são as sementes, causando perdas consideráveis e ruptura nos programas de triagem e melhoramento, constituindo um obstáculo para a produção de sementes certificadas (Wylie *et al.*, 1992).

A ocorrência de transmissão do vírus pela semente em algumas espécies da vegetação espontânea possui um impacto epidemiológico considerável, e varia de acordo com as condições ambientais (Yang *et al.*, 1997).

Não há relatos da ocorrência de transmissão do CMV pela semente em pimentão (Siviero *et al.*, 1992).

Plantas infectadas com CMV, cuja propagação ocorre por meio de órgãos vegetativos, como por exemplo a batata, merecem uma atenção especial para que não sejam fonte primária de infecção. Isso pode ocorrer se plantas com sintomas, ou mesmo indivíduos tolerantes assintomáticos não forem descartados como produtores de 'semente' (Somerville *et al.*, 1987).

Pares & Gunn (1989) relataram a transmissão do CMV por meio do solo contaminado por restos de plantas infectadas, como fonte primária de infecção, sem a participação de vetor, em cultivo protegido de pimentão na Austrália. Os autores alertaram que foi o primeiro relato desse tipo de transmissão, devendo ser considerado como um importante fator na ecologia da infecção em plantas de pimentão que crescem em cultivo protegido. Sugeriram ainda, que parte da disseminação pode ocorrer pela irrigação e o contato entre raízes, o que é bastante inusitado para o CMV, merecendo mais estudos.

Um estudo interessante foi feito por Piazzola *et al.* (1989), sobre a infectividade do CMV tratado com montmorilonita. Esse material argiloso é o principal componente dos sedimentos das águas dos rios, onde o CMV foi encontrado, ainda infectivo. Baseados nessa observação, realizaram testes de infectividade com suspensões do vírus contendo esse material argiloso, verificando que a montmorilonita adsorve a maioria dos vírus infectivos e garante sua infectividade. O mesmo não foi verificado para partículas virais não adsorvidas em montmorilonita e submetidas às mesmas condições. Se a adsorção a esse material argiloso e o efeito protetor que ele confere às partículas virais for um fenômeno generalizado para os fitovírus isolados de sedimentos e águas no ambiente, então a irrigação

pode estar relacionada com aspectos epidemiológicos de viroses, favorecendo sua disseminação (Piazzola *et al.*, 1989).

4.5 *Capsicum annuum* L. e a resistência a isolados do CMV

Os mecanismos de resistência das plantas aos patógenos são bastante complexos e envolvem vários fatores. De acordo com Matthews (1991), os indivíduos podem ser classificados em imune e sujeitos à infecção.

Imunes são todos os indivíduos nos quais o vírus não se replica no protoplasma das suas células, ou em quaisquer células da planta intacta. Pode haver desencapsidação do vírus mas não há produção da progênie viral. Não são considerados hospedeiros. Os indivíduos sujeitos à infecção, são aqueles considerados hospedeiros, pois o vírus se replica em seu protoplasma e nas células da planta intacta quando inoculados mecanicamente ou transmitidos naturalmente. Esses indivíduos podem ser divididos em suscetíveis e resistentes. Quando o indivíduo é suscetível, além de ocorrer replicação, há o movimento sistêmico do vírus pela planta. São considerados dois padrões para a suscetibilidade, um é aquele representado pelo indivíduo sensível, onde a planta reage à infecção com um quadro patológico, podendo ser severo ou moderado. O outro padrão de suscetibilidade é a tolerância, em que o efeito visível da infecção na planta é muito discreto ou inexistente. Embora interessante por ser, geralmente, assintomática, deve ser utilizada com cautela nos programas de melhoramento, onde esteja claro que as vantagens de sua utilização compensem os danos que acarreta. Plantas tolerantes tornam-se fonte de inóculo para outras culturas e podem também contribuir para a seleção de estirpes mais severas do vírus.

Os indivíduos resistentes não apresentam um quadro de infecção sistêmica. Matthews (1991), os divide em resistentes de extrema hipersensibilidade e resistentes de hipersensibilidade, de acordo com o fator que impede a disseminação sistêmica do vírus pela planta. A resistência de extrema hipersensibilidade ocorre quando o vírus se multiplica mas fica limitado às células inicialmente infectadas, porque codifica uma proteína de movimento ineficiente que impede o movimento para as outras células. A infecção torna-se sublimada e as plantas são consideradas resistentes. Na resistência por hipersensibilidade, a infecção é limitada por uma reação das células do hospedeiro ao redor das células inicialmente infectadas, formando geralmente lesão local necrótica. Plantas com esse tipo de reação também apresentam resistência.

Segundo Russel (1978), a imunidade pode ser classificada dentro dos seis tipos de resistência a vírus, assim como a tolerância, diferentemente do apontado por Matthews (1991), onde a imunidade e a tolerância não são consideradas como padrões de resistência. Os outros quatro tipos de resistência classificados por Russel (1978) são: resistência diferencial à infecção pelo vírus, onde há uma resposta diferente das variedades ao serem inoculadas; resistência por hipersensibilidade, que engloba a resistência propriamente dita, considerada por Matthews (1991), onde a infecção é apenas local; resistência à multiplicação e translocação do vírus no hospedeiro, em que a planta infectada pode apresentar reação sistêmica mas em menor proporção do que nas suscetíveis; resistência a vetores, considerada uma resistência indireta que evita a inoculação do vírus pelo vetor.

Para Russel (1978) e Nono-Wondim *et al.* (1993b), os mecanismos de resistência nos diferentes estágios das infecções causadas por vírus transmitidos por afídeos são: resistência à transmissão do vírus pelo vetor, tendência a escapar da infecção (fuga ao

vetor), resistência à translocação do vírus dentro da planta, resistência à multiplicação do vírus e resistência à aquisição do vírus pelo vetor. Grande parte dos mecanismos de resistência ao CMV é resultado de herança poligênica, tendo sido observados em pimentão e utilizados em programas de melhoramento (Nono-Wondim *et al.*, 1993b).

Apesar dos constantes estudos e esforços de melhoristas e virologistas, ainda não há cultivares de pimentão ou pimenta, efetivamente resistentes ao CMV (Pasko *et al.*, 1982; Shifriss & Cohen, 1990; Nono-Womdim *et al.*, 1991, 1993a, 1993b; Dogimont *et al.*, 1994; Yazawa *et al.*, 1996; Monma & Sakata, 1997). No entanto, esse parece não ser um privilégio do gênero *Capsicum*. Nas poucas espécies em que se encontrou resistência genética ao CMV, quase todas responderam às infecções com tolerância e não com imunidade. Além disso, a estabilidade da resistência é frequentemente ameaçada por novas estirpes capazes de superá-las (Palukaitis *et al.*, 1992).

Segundo Monma & Sakata (1997), apesar das constantes tentativas de obtenção de cultivares resistentes ao CMV, não foram encontradas progênies satisfatoriamente resistentes. As pesquisas foram realizadas por mais de 15 anos, no 'National Research Institute of Vegetables, Ornamentals and Tea' (NIVOT-Japão). Foram utilizados como parentais, acessos resistentes ao CMV como 'Antibois' e 'LPI' *C. annuum*, e 'LS 340' *C. baccatum*, cedidos pelo Dr. E. Pochard (INRA-França). Posteriormente, numa triagem realizada com 83 acessos de pimentões e pimentas não foi detectada resistência, embora um pequeno número de plantas tenha se mostrado assintomático. Para os autores, a não obtenção de cultivar de pimentão resistente ao CMV não foi possível ainda, devido à alta variabilidade das estirpes que superam a resistência com facilidade.

Existem acessos resistentes ao CMV, como 'PI286419' (Cuevas & Nicklow, 1985), 'Pant C-1', 'S-118-2', 'Lorai', 'Loungi' e 'Perennial' (Sharma & Singh, 1985), 'MRCH' (Shifriss & Cohen, 1986), 'Delhi Local' (Tewari & Viswanath, 1986). Entretanto, quando testados com isolados de diferentes regiões, a maioria não responde com o padrão de resistência ou suscetibilidade inicialmente observado. Essas reações variam de acordo com os isolados, comprometendo os programas de melhoramento. Palukaitis *et al.* (1992), atribuíram essa discrepância ao fato das estirpes do CMV diferirem em sua patogenicidade. Esse aspecto é apontado como preponderante por Sudarsono *et al.* (1998), ao relatar a necessidade de se encontrar uma fonte de resistência específica para um isolado do CMV que estava ocorrendo na Indonésia.

A progênie 'MRCH', que apresentou alta resistência, não pode ser utilizada como fonte de resistência em pimentão porque a resistência ao CMV está associada com o tamanho pequeno do fruto (Shifriss & Cohen, 1986). Essa é uma das dificuldades dos programas de melhoramento: quando uma fonte de resistência é encontrada, conseguir incorporá-la sem perder as características agronômicas desejáveis.

Triagens de *C. annuum* L. na Índia, para resistência ao CMV e ao PVY, resultaram na obtenção de oito genótipos com alta resistência e dois com múltipla resistência a doenças e boas características agronômicas (Dhawan *et al.*, 1996).

Em Israel, segundo Shifriss & Cohen (1990), não foi encontrada fonte de resistência em várias linhagens testadas de *C. annuum* L.. No entanto, foram observadas diferenças significativas na resposta à infecção viral entre as diferentes linhagens, que responderam com suscetibilidade ou segregação para tolerância. Nesse país, materiais

tolerantes que desenvolvem mosaicos discretos e tendência à recuperação sem afetar o crescimento, são utilizados nos programas de melhoramento.

A resistência natural ao vírus em ramos laterais jovens de *C. frutescens* L. e *C. annuum* L. após anos de infecção pelo CMV, mostrou que ela não ocorre devido à obstrução da migração do CMV mas, provavelmente, por alteração dos tecidos da planta infectada, que desenvolve uma via de resistência. Pode ser a produção de alguma substância inibidora ou mutação dos tecidos que compõem o broto. Entretanto, a hereditariedade da resistência das plantas cultivadas a partir dos brotos laterais não está clara. Esse fenômeno poderia ser um caminho para a introdução de resistência, aliado aos tradicionais métodos de melhoramento de plantas (Uemachi *et al.*, 1995; Yazawa *et al.*, 1996).

Plantas transgênicas que expressam o gene da capa protéica do CMV, têm sido desenvolvidas em tomate através da técnica de transformação mediada pela *Agrobacterium*, e as plantas demonstraram alta resistência (Xue *et al.*, 1994). Segundo Monma & Sakata (1997), plantas transgênicas podem ser usadas como um promissor material para o melhoramento de tomate. No entanto, parece inviável para pimentão, devido ao fato da regeneração dessa espécie, a partir da cultura de tecido, não ter sido viabilizada.

4.6 Ocorrência de CMV no Brasil

O primeiro relato da ocorrência de CMV foi no Estado de São Paulo, causando mosaico e necrose em bananeiras, que muitas vezes evoluíam, resultando na morte da planta (Silberschmidt & Nóbrega, 1941). Em 1947, também no Estado de São Paulo, a orquídea (*Dendrobium nobile* Lindl.) foi apontada como hospedeira natural do CMV e a

sintomatologia descrita referia-se a clorose, encurtamento dos entrenós, redução do limbo foliar, nanismo, mosaico e manchas cloróticas (Nóbrega, 1947). Silberschmidt (1955), através de plantas indicadoras, relatou que o CMV era responsável pelas bandas cloróticas anelares observadas em *Asclepias curassavica* L., portanto, mais uma hospedeira natural do vírus. *Euphorbia splendens* Bojer aparece como outra hospedeira natural do vírus no trabalho de Silberschmidt & Flores (1962).

Outros relatos da ocorrência de CMV foram surgindo com o passar dos anos: feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), no Paraná, banana em Pernambuco, pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), no Pará e São Paulo, baunilha (*Vanilla phanifolia* Andreuws), no Rio de Janeiro (Silberschmidt, 1963, Medeiros 1963, Caner, 1969, Costa *et al.* 1970, Caner & Ikeda, 1972, Costa & Robbs, 1971)

Costa *et al.*(1972) identificaram o CMV em pepino (*Cucumis sativus* L.), em um levantamento das viroses que atingiam essa cultura em São Paulo. Nesse mesmo ano, o vírus do mosaico do pepino foi responsável pela infecção em milho (*Zea mays* L.), no Estado de São Paulo, provocando mosaico, estrias cloróticas alongadas e nanismo (Costa & Kitajima, 1972). Ribeiro *et al.*(1975) relataram a incidência severa do CMV nos bananais do Rio de Janeiro. Sintomas como mosaico e deformação foliar em melão (*Cucumis melo* L.) e maxixe (*Cucumis anguria* L.) em São Paulo, foram atribuídos à infecção causada pelo CMV (Lin *et al.*, 1980). Plantas de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) com mosaico no Estado do Pará, foram relatadas como hospedeiras do CMV (Kitajima *et al.*, 1980).

Kudamatsu *et al.* (1981) relataram a ocorrência do CMV em sálvia (*Salvia splendens*), causando deformação foliar, mosaico e nanismo. O caupi (*Vigna unguiculata* Walp.), com clareamento de nervura, mosqueado e nanismo marca mais uma

ocorrência, dessa vez em Goiás (Lin *et al.*, 1981). As plantações de pimenta-do-reino do Estado do Espírito Santo também foram atingidas pelo vírus, de acordo com Maciel-Zambolim *et al.* (1981).

O CMV atingiu plantações de pepino do Paraná, em 1983 (Lima-Neto *et al.*, 1983). Costa (1983) relatou a ocorrência do vírus em tomate, causando ‘cordão de sapato’, e em alface apresentando mosaico. Nesse trabalho ele salientou que a incidência estava se tornando esporádica, devido ao abandono do hábito de cultivar alface em áreas intercaladas com o cultivo de ornamentais, que seriam os reservatórios do vírus, de onde posteriormente passariam às plantas de alface através da ação dos afídeos vetores. Ainda nesse trabalho ele cita as seguintes ornamentais infectadas pelo CMV, no Estado de São Paulo: *Alstroemeria* sp., *Gladiolus* sp. e *Vinca rosea* L.

Colariccio *et al.* (1984) constataram a ocorrência do CMV no maracujá (*Passiflora edulis* f. Deg.) em São Paulo e Chagas *et al.* (1984) na Bahia. Em Brasília, alamanda (*Alamanda cathartica* L.) ‘Nobilis’ apresentou anéis nas folhas, cujo agente causal era o CMV (Rodrigues *et al.*, 1984).

Nagai (1984) relatou que a primeira ocorrência do vírus do mosaico do pepino nas plantações de pimentão no Brasil, foi um surto inesperado que destruiu a cultura da cultivar Agrônômico 10G, no ano de 1974, em Águas de Santa Bárbara, no Estado de São Paulo.

Lima & Santos (1985) assinalaram a infecção de uma estirpe do CMV em fava (*Phaseolus lunatos*), no Ceará. Cupertino *et al.* (1988) relataram a incidência do CMV na cultura de pimentão no Estado de Goiás. O isolado do CMV de pimenta-do-reino do Espírito Santo, que apresentava clorose, mosaico, mosqueado, espessamento e

subdesenvolvimento, foi parcialmente caracterizado por Maciel-Zambolim *et al.* (1990), resultando em informações sobre as peculiaridades dessa estirpe.

No ano de 1992, houve o relato da incidência do CMV em plantas de ervilha (*Pisum sativum*), no Estado do Mato Grosso do Sul (Dusi *et al.*, 1992).

Provenientes do Horto Florestal de Fortaleza, plantas vulgarmente conhecidas como ‘anador’ (*Justicia* sp.), devido a sua ação como analgésico e antipirético, resultante provavelmente de sua alta concentração de cumarina, apresentando manchas e anéis concêntricos amarelo-esbranquiçado nas folhas foram submetidas a teste sorológico de dupla difusão em ágar que indicou tratar-se de infecção causada pelo CMV (Araripe & Lima, 1993).

Duarte *et al.* (1994) identificaram 5 diferentes isolados de CMV em *Commelina benghalensis*, *Commelina erecta* e *Tradescantia elongata* no Estado de São Paulo. Baseados no círculo de hospedeiros e propriedades ‘in vitro’, concluíram que os isolados apresentavam características biológicas diversas, fator relevante a ser considerado do ponto de vista epidemiológico, pois as três espécies em questão são reservatórios naturais do vírus e estão freqüentemente presentes ao redor das áreas de cultivo.

A primeira descrição do CMV em bananeira cultivar ‘Prata’ no Estado de Minas Gerais, causando clorose e ondulações nas bordas foi feita por Maciel-Zambolim *et al.* (1994). Colariccio *et al.* (1996) relataram a incidência do CMV em bananeiras (*Musa* sp.) ‘Nanicão’ no Vale do Ribeira, São Paulo, causando mosaico em listras cloróticas e necróticas (paralelas às nervuras secundárias), deformação e redução do limbo foliar. Essa foi a primeira identificação sorológica do CMV nesse cultivar, sendo possível detectá-lo diretamente das folhas de bananeiras infectadas, inclusive com o emprego do antissor obtido de gemas de

ovos de galinhas, produzidos contra esse isolado. Recentemente Eiras *et al.* (2001) caracterizaram esse isolado como pertencente ao subgrupo Ia.

A infecção natural do CMV em *Catharantus roseus* foi relatada por Espinha & Gaspar (1997), provocando mosaico e distorção foliar, em São José do Rio Preto-SP, e posteriormente caracterizado como isolado pertencente ao subgrupo I, por Espinha (1999).

Plantas de lisianthus (*Eustoma grandiflora* (Raf.) Shinn.) com sintomas de superbrotamento, bolhosidades e riscas necróticas nas folhas foram relatadas como espécie ornamental naturalmente infectada pelo CMV, pela primeira vez no Brasil em 1997 (Borsari *et al.*, 1997).

A verificação da ocorrência natural de RNA satélite no Brasil, foi realizada em 30 isolados do CMV, previamente caracterizados como pertencentes ao subgrupo I. Constatou-se a sua presença em um isolado de tabaco (*Nicotiana tabacum*), em três isolados de pimentão e em um isolado de pimenta-do-reino (Boari *et al.*, 1997).

Foi relatada, por meio de hospedeiras diferenciais, a incidência de isolados do CMV, subgrupo-I b, infectando pimentão 'Magali-R', na região de Lins, Estado de São Paulo (Kobori *et al.*, 2000).

Boari *et al.* (2000) relataram a ocorrência de isolados do CMV pertencentes ao subgrupo I, em plantas de *C. annuum*, *Peperomia caperata*, *Impatiens balsamiana* L., *Musa* sp., no Estado de Minas Gerais, *Commelina* sp., *Cucurbita maxima* Dushesne, *Piper nigrum*, no Estado do Espírito Santo e *Licopersicum esculentum*, nos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Departamento de Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP – Botucatu e no Centro de Sanidade Vegetal, Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico de São Paulo, SP, no período de 1999 até 2001.

5.1 Fonte, coleta, armazenamento e isolamento do vírus

O '*Cucumber mosaic virus*' (CMV), foi isolado de plantas de pimentão, cultivar Magali-R, que apresentavam sintomas de mosaico sistêmico, nanismo, deformação foliar e dos frutos.

Os isolados naturalmente infectados foram coletados no período de 1998 a 2001, nos seguintes municípios do Estado de São Paulo: Guaiçara, Jacareí, Lins, Lucianópolis e Paulínia.

Quadro 1. Lista dos isolados de CMV obtidos em plantas da cultivar Magali-R.

MUNICÍPIO	NÚMERO DO ISOLADO	ANO DA COLETA
Paulínia	1	1998
Lins	2	1998
Jacareí	3	1999
Lins – propriedade A	4	2000
Lins – propriedade A	5	2000
Lins – propriedade A	6	2000
Lins – propriedade B	7	2000
Lins – propriedade B	8	2000
Lins – propriedade B	9	2000
Lins – propriedade B	10	2000
Guaiçara	11	2000
Guaiçara	12	2000
Guaiçara	13	2000
Guaiçara	14	2000
Guaiçara	15	2000
Guaiçara	16	2000
Lucianópolis	17	2001

Botucatu, SP, 2001.

Todos os isolados foram obtidos de folhas de pimentão com sintoma de mosaico e deformação foliar, exceto os isolados 12, 14 e 15, obtidos a partir do fruto. O isolado 12 apresentava lesões necróticas e os isolados 14 e 15 mostravam lesões esbranquiçadas, semelhantes a nódulos.

A manutenção dos isolados do vírus foi feita através de sucessivas inoculações em plantas indicadoras de *Nicotiana glutinosa* e *Nicotiana tabacum* 'Xanthi'. Todos os materiais originais de 'Magali-R', naturalmente infectados foram armazenados utilizando-se a técnica de desidratação em cloreto de cálcio, em que as folhas com sintoma foram fragmentadas, desidratadas em cloreto de cálcio e congeladas à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Barradas, 1978). Fragmentos dos órgãos vegetais (folhas ou frutos) com sintomas também foram congelados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. O mesmo procedimento foi adotado para as plantas de *N. glutinosa* e *N. tabacum* 'Xanthi' após a primeira inoculação.

5.2 Testes para identificação dos isolados

5.2.1 Teste biológico

Os ensaios de transmissão mecânica foram realizados a partir do extrato obtido de *N. glutinosa*, infectadas experimentalmente com material de pimentão original, proveniente do campo. O inóculo foi preparado através da maceração direta das folhas infectadas em tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,0 adicionando-se sulfito de sódio 0,01M ou em solução de sulfito de sódio 0,5 %, pH 6,0 (Yarwood, 1969). Nas inoculações com os frutos, o procedimento envolveu o congelamento e a pulverização em nitrogênio líquido e a esse extrato macerado, adicionou-se o tampão supra descrito.

A proporção seguida na preparação do inóculo foi de 1:5 (1g de folha infectada para 5 mL de tampão). O inóculo foi friccionado sobre as folhas das plantas indicadoras, previamente pulverizadas com abrasivo (carbureto de silício – 400 mesh), com o auxílio de um pistilo. Em todas as inoculações, utilizaram-se plantas da mesma espécie como controle, desse modo, as folhas foram friccionadas apenas com tampão e abrasivo. Após as inoculações, as folhas foram lavadas com água para retirada do excesso de inóculo e abrasivo. Para monitoramento dos sintomas as plantas foram mantidas em casa de vegetação.

5.2.1.1 Círculo de hospedeiras

As inoculações foram realizadas em espécies de plantas das seguintes famílias botânicas:

Amaranthaceae → *Gomphrena globosa*

Balsaminaceae → *Impatiens* sp.

Chenopodiaceae → *Chenopodium amaranticolor*, *C. murale*, *C. quinoa*

Cucurbitaceae → *Cucumis sativus* e *Cucurbita pepo*

Plantaginaceae → *Plantago* sp.

Portulacaceae → *Portulaca* sp.

Solanaceae → *C. annuum*, *Datura metel*, *Datura stramonium*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana benthamiana*, *N. debneyi*, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. sylvestris*, *N. tabacum*, ('Samsun', 'Samsun NN', 'TNN', 'Xanthii'), *Petunia hybrida*, *Physalis floridana*, *Solanum gilo*, *Solanum melongena*.

As plantas inoculadas permaneceram em casa de vegetação sob observação, durante 45 dias, para avaliação periódica dos sintomas. Plantas inoculadas que não apresentaram sintomas foram submetidas a teste de recuperação do vírus em plantas sadias de *C. amaranticolor* e *N. glutinosa* para verificação da ocorrência de infecção latente ou imunidade ao vírus.

As sementes das plantas indicadoras utilizadas nos testes foram provenientes de plantas sadias que permaneceram em estufa telada.

5.2.2 Teste sorológico DAS –ELISA

Foi utilizado para a identificação sorológica dos isolados o teste de ELISA-direto tipo sanduíche duplo, segundo Converse & Martin (1990) com algumas modificações recomendadas pelo fabricante (*Agdia 1000 reagent*), com o emprego dos anticorpos monoclonais comerciais específicos para os subgrupos I e II do CMV. O antissoro (IgG) foi diluído na proporção 1:200, em tampão carbonato (cobertura) pH 9,6. A seguir, depositaram-se, em cada orifício da placa de poliestireno, 100 :L do IgG diluído e incubou-se por 4 horas sob temperatura ambiente. Após a incubação, procedeu-se à lavagem da placa por três vezes com o tampão de lavagem PBS-T, pH 7,4. As amostras consistiram em folhas de *N. glutinosa* previamente inoculadas com cada um dos isolados, apresentando sintomas sistêmicos e folhas de *N. glutinosa* sadias para o controle negativo, preparadas na proporção de 1:10 (0,5 g de tecido foliar para 5 mL de tampão), com o tampão geral de extração pH 7,4 recomendado pela AGDIA. Na seqüência depositaram-se, nos orifícios, 100:L dos antígenos diluídos e incubou-se por 2 horas à temperatura ambiente. Prepararam-se os conjugados A e B

no tampão ECI, pH 7,4, na diluição 1:200. Finalizando o segundo período de incubação, procedeu-se à lavagem da placa e adicionaram-se, aos pocinhos da placa, 100:µL da enzima conjugada a IgG (CMV-1 e CMV-2), incubou-se por 2 horas sob temperatura ambiente. Procedeu-se à lavagem da placa e à adição do substrato p-nitrofenil fosfato (Sigma), preparado na concentração de 1 mg/mL no tampão dietanolamina pH 9,8. Observou-se a reação colorimétrica e efetuou-se a leitura das placas a 405 nm, em leitor de ELISA Bio Rad, modelo 3550. Todas as amostras foram testadas em triplicata. Foram considerados positivos aqueles isolados que obtiveram resultados, da média das triplicatas, igual ou superior a três vezes o valor da triplicata do sadio.

5.2.3 Extração de RNA total

A extração do RNA total (RNA_T) foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Chomczynski & Sacchi (1987), empregando como amostras folhas de *N. glutinosa* com sintomas sistêmicos de mosaico e deformação, previamente inoculadas com os isolados 1 (Paulínia), 3 (Jacareí), 4 (Lins-2000), 15 (Guaíçara) e 17 (Lucianópolis). Amostras de RNAs totais de folhas de *N. glutinosa* sadias também foram extraídas para controle negativo. O procedimento realizou-se da seguinte maneira:

Macerou-se 1 g de folhas de *N. glutinosa* em nitrogênio líquido e acrescentou-se 10 mL de isotiocianato de guanidina com sarcosyl 10% (N-lauril sarcosina), transferiu-se rapidamente para um tubo de centrífuga



Agitou-se por 1 minuto

Adicionou-se 1 mL de acetato de sódio 2 M, pH 4,0



Agitou-se por 1 minuto



Adicionou-se 10 mL de fenol na temperatura ambiente



Agitou-se por 1 minuto



Acrescentou-se 2 mL de SEVAG (clorofórmio : álcool isoamílico - 29:1)



Agitou-se vigorosamente por 1 minuto



Centrifugou-se essa mistura a 15000 g por 40 minutos, à temperatura de 0° C

(Centrífuga Sorval RC2-B rotor SS-34)



Coletou-se a fase aquosa e adicionou-se 1 volume igual de isopropanol mantido à temperatura de -20 °C



Agitou-se por inversão, deixou-se em repouso por 16 horas, sob temperatura de -20°C



Centrifugou-se a 15000 g por 35 minutos a 0 °C

(Centrífuga Sorval RC2-B rotor SS-34)



Descartou-se o sobrenadante e manteve-se os tubos abertos sob baixa temperatura para completa evaporação do isopropanol, em seguida ressuspendeu-se o ‘pellet’ em 1 mL de água previamente tratada com 0,1 % de dietil pirocarbonato de sódio (DEPC)

5.2.3.1 Amplificação por transcriptase reversa/reação em cadeia pela polimerase ‘Reverse transcription and polymerase chain reaction’ (RT-PCR)

A RT-PCR foi realizada a partir de 3 :L de RNAs totais extraídos e procedeu-se segundo Wylie *at al.* (1993), utilizando-se dois oligonucleotídeos (“primers”) denominados CMV 1 e CMV 2. O ‘primer’ CMV 1 (5’ GCCGTAAGCTGGATGGACAA 3’) foi desenhado para anelar na região não traduzida do terminal 3’ do RNA 3, a partir do nucleotídeo 2019 até o 2038 (senso complementar). O ‘primer’ CMV 2 (5’ TATGATAAGAAGCTTGTTCGCG 3’) foi desenhado para anelar no gene que codifica para a proteína da capa, abrangendo os nucleotídeos 1551 ao 1573 (senso viral). O primeiro passo das reações foi a formação do DNA complementar (cDNA), onde os reagentes utilizados foram os do Kit Gibco BRL. O volume total por amostra foi de 25 :L constituído de: Tampão 5X (5X “First Strand Buffer”) → 4 :L; RT(transcriptase reversa- “Super Script RT”) → 1 :L; DNTPs (desoxinucleotídeos trifosfatados dGTP, dATP, dCTP, dTTP) → 1 :L; DTT (ditiotretitol) → 1 :L; H₂O estéril → 14 :L; RNA_T → 3 :L; “primer” CMV-1 → 1 :L. O RNA viral, juntamente com 1 :L de água milliQ estéril e com o ‘primer’, foram desnaturados

a 70°C por 5 minutos antes dos demais componentes serem acrescentados. A seguir, incubou-se por 1 hora e 30 minutos a 37°C.

Após o período de incubação, procedeu-se à realização da reação da polimerase em cadeia (PCR) com os cDNAs de cada isolado. Para tanto, utilizou-se os reagentes do 'kit' para PCR 'Taq DNA Polymerase, recombinant' (Gibco BRL) e o termociclador utilizado para a PCR foi o 'Programmable Thermal Controller'-PTC 100 (MJ Research). Foram adicionados em um tubo de microcentrífuga de 0,5 mL: 10 :L de cDNA, 4 :L de tampão 10X da enzima Taq polimerase (10X Taq Reaction Buffer, BRL), 1 :L de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 1 :L de "primer" CMV 1, 1 :L de 'primer' CMV 2, 0,5 :L da enzima Taq polimerase (BRL), 1,2 :L de cloreto de magnésio (MgCl₂) 50 mM (BRL) e água milliQ estéril para completar 50 :L por amostra. Para a realização da PCR submeteu-se as amostras às seguintes condições: desnaturação inicial a 92 °C por 3 minutos, 35 ciclos de amplificação a 95 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 1,5 minutos, proporcionando, respectivamente, desnaturação, anelamento dos 'primers' e a extensão, seguida da extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Os fragmentos de DNA amplificados, juntamente com o marcador de 100 pb (100 pares de base DNA Ladder, Gibco-BRL) foram visualizados em gel de agarose 1% em tampão TAE (Tris 0,04 M, acetato de sódio 0,02 M e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,0001 M, pH 8,3), corado com 5 :L de brometo de etídeo. O gel foi submetido a 80 V por, aproximadamente, 60 minutos, observado sob luz ultra-violeta e fotografado. O tamanho esperado do fragmento de DNA amplificado é de aproximadamente 486 pares de bases (pb) para isolados do CMV subgrupo I e de 502 pb para isolados do subgrupo II.

5.2.3.2 Isolamento e purificação de cDNA do gel de agarose

As bandas do gel, correspondentes aos fragmentos de DNA amplificados, foram cortadas com o auxílio de uma lâmina e colocadas em tubos eppendorf, onde procedeu-se à purificação com os reagentes do kit 'Concert Gel Extractions Systems' Gibco-BRL, de acordo com as recomendações do fabricante. Os fragmentos, após cortados, foram pesados, e adicionou-se 30 :L do tampão L1, para cada 10 mg do gel. A seguir, incubou-se a 50 °C por 15 minutos. Durante esse período agitou-se os eppendorfs por inversão, a cada 3 minutos, e após a completa dissolução da agarose, incubou-se por mais 5 minutos. A mistura foi pipetada para um tubo de 'spin eppendorf' (coluna), encaixado em um tubo de lavagem, e centrifugou-se a 12000 g por 1 minuto, em microcentrífuga. Descartou-se, então, o filtrado e adicionou-se 700 :L de tampão L 2 e incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos. Na seqüência, centrifugou-se por um minuto a 12000 g e descartou-se o filtrado. Para remover eventuais resíduos do tampão centrifugou-se por mais 1 minuto a 12000 g. A etapa final foi a eluição do DNA, onde o tubo de 'spin eppendorf' foi colocado em outro eppendorf 'recovery' e adicionou-se 50 :L de água milliQ estéril. Incubou-se à temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugou-se a 12000 g por 2 minutos. O DNA foi precipitado 'overnight' a -20°C, pela adição de 2,5 V (125 :L) de etanol absoluto e 0,1 V (5 :L) de acetato de sódio 3 M. A seguir, foi centrifugado a 13000 g em microcentrífuga, por 40 minutos, depois descartou-se cuidadosamente o sobrenadante e adicionou-se 200 :L de álcool

70, centrifugou-se a 13000 g por 5 minutos, para retirada do excesso de sal. Após completa secagem do álcool ressuspendeu-se o sedimento com 25 :L de água milliQ estéril.

5.2.3.3 Digestão dos produtos do PCR por enzimas de restrição (RFLP –‘Restriction fragment length polymorphism’)

Os produtos do PCR amplificados foram digeridos pela endonuclease de restrição Msp I (Gibco-BRL). Utilizou-se 17 :L de fragmentos amplificados, 2 :L de tampão 10X (Gibco-BRL) e 1 :L da enzima, efetuou-se as digestões a 37°C durante 2 horas, procedimento baseado em Singh *et al.* (1995). Analisaram-se os produtos da digestão em gel de agarose 1,5 % e o tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o marcador de 100 pb (100pb DNA Ladder, Gibco-BRL).

A eletroforese, em gel de agarose 1,5 %, em tampão TAE (Tris 0,04 M, acetato de sódio 0,02 M e ácido etilenodiaminotetracético(EDTA) 0,0001 M, pH 8,3), corado com 5 :L de brometo de etídeo, transcorreu a 80 V por, aproximadamente, 60 minutos, onde os ácidos nucleicos foram fracionados, visualizados através de transluminador de luz ultra- violeta e fotografados.

5.3 Purificação do vírus

A purificação foi realizada de acordo com Lot *et al.* (1972), com algumas modificações. Plantas de *N. glutinosa* foram coletadas após 14 dias da inoculação com o isolado 1 do CMV, previamente identificado. Procedeu-se da seguinte maneira:

Trituraram-se as folhas de *N. glutinosa* com sintomas sistêmicos, na proporção 1:2 (p/v) em tampão citrato de sódio pH 6,5, 0,5 M + 5 mM de etileno diamino tetracetato de sódio (EDTA) + 0,5 % de ácido tioglicólico.



Filtrou-se o homogeneizado com gaze e acrescentou-se clorofórmio, na proporção 1:1 (v/v)



Agitou-se a frio (4 °C) por 10 minutos



Centrifugou-se a 5500 g por 10 minutos sob temperatura de 4 °C (Centrífuga Sorval RC2-B rotor GSA)



Desprezou-se o 'pellet' e recolheu-se cuidadosamente o sobrenadante e acrescentou-se, sobre o seu volume, 10 % de polyetilenoglicol (PEG)



Agitou-se a frio (4 °C) por 50 minutos



Centrifugou-se a 7000 g por 20 minutos (Centrífuga Sorval RC2-B rotor SS-34)



Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o 'pellet' em tampão borato de sódio 0,005 M, pH 9,0 + 0,5 mM de EDTA. Após a ressuspensão acrescentou-se 2 % de Triton X-100 na proporção de 0,5 mL/g da fração inicial de tecido



Agitou-se a frio (4 °C) por ± 30 minutos



Centrifugou-se a 15000 g por 20 minutos
(Centrífuga Sorval RC2-B rotor SS-34)



Coletou-se o sobrenadante e procedeu-se à ultracentrifugação do mesmo por 2 horas a

78000 g (4 °C)

(Ultracentrífuga Sorval Pro 80 rotor TH-641)



Ressuspendeu-se o 'pellet' em 8 mL de tampão borato de sódio 0,005 M, pH 9,0 + 0,5mM de EDTA, por 12 horas, a 4 °C



Colocou-se a suspensão obtida em gradiente linear de sacarose nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 %, preparado em tampão borato de sódio 0,005 M, pH 9,0 + 0,5 mM de EDTA. Submeteu-se os gradientes a uma ultracentrifugação de 50000 g a 4 °C por 1 hora.

(Ultracentrífuga Sorval Pro 80 rotor AH-629)



Coletou-se a banda opalascete submetendo-a a um ciclo de ultracentrifugação 80000 g

a 4 °C por 2 horas.

(Ultracentrífuga Sorval Pro 80 rotor TH-641)



Ressuspendeu-se o 'pellet' em 1 mL de tampão borato de sódio 0,005 M pH 9,0 +

0,5mM de EDTA.

5.3.1 Monitoramento da infectividade do vírus

Durante o processo de purificação, a infectividade do vírus, em cada etapa do processo, foi monitorada através da inoculação mecânica de alíquotas de 100 :L da preparação em plantas de *C. amaranticolor*. Essas plantas permaneceram em casa-de-vegetação para observação dos sintomas.

5.3.2 Espectro de absorção (ultravioleta)

Uma alíquota da preparação purificada, diluída na proporção 1:10, foi analisada no espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV-160 A) nos comprimentos de onda de 200 a 300 nm. O valor de absobância a 260 nm possibilitou a determinação da concentração do vírus e a relação 260/280 permitiu estimar a porcentagem de ácido nucléico presente nas partículas de vírus.

5.3.3 Determinação da concentração viral e estimativa da porcentagem do ácido nucléico do vírus

A concentração da preparação purificada foi determinada pela seguinte equação:

$$C = A_{260} \cdot d / E, \text{ onde:}$$

C = concentração da preparação

A₂₆₀ = absorvância a 260 nm

d = diluição empregada

E = Coeficiente de extinção: valor da absorvância a 260 nm de uma preparação purificada, cuja concentração é igual a 1 mg/ mL em 1 cm de passo óptico.

O coeficiente de extinção, considerado para o CMV, a 260 nm, foi o 5.

A porcentagem do ácido nucléico do vírus foi calculada segundo a fórmula de Gibbs & Harrison (1976), utilizada para vírus de diferentes grupos:

$$A_{260} / A_{280} = 0,9320 + 0,0454 (\% \text{ RNA}) - 0,0006 (\% \text{ RNA})^2$$

5.4 Produção de antissoro para a proteína capsidial

A produção de antissoro realizou-se através da utilização de duas galinhas poedeiras, imunizadas na região superior da coxa, com a aplicação de três injeções intramusculares. Foram aplicadas alíquotas de 500 :1 da preparação do vírus purificada, cuja concentração, para a imunização foi de 0,3 mg/mL, emulsificada em igual volume de adjuvante de Freund, que foi completo na primeira preparação e incompleto nas demais. Entre

a primeira e a segunda aplicação, o intervalo foi de sete dias, e a terceira aplicação efetuou-se nove dias após a segunda injeção. Antes da imunização, coletou-se um ovo de cada uma das poedeiras para a produção do soro normal. Os ovos foram coletados diariamente, após a segunda aplicação e as extrações dos anticorpos, efetuadas a partir das gemas dos ovos coletados no nono dia após a terceira injeção. A extração dos anticorpos contra o vírus (IgY), da gema do ovo das galinhas imunizadas, foi realizada de acordo com o método da precipitação com polietilenoglicol (PEG), descrito por Polson *et al.* (1980), que consiste em:

Separar a gema da clara e lavá-la em água corrente



Retirar a película que envolve a gema e depositá-la em uma proveta graduada para obter seu volume, diluí-la em tampão fosfato salino 0,01 M, pH 7,5 + NaCl 0,1 M (TFS), na proporção de 4 vezes o seu volume.



Acrescentar à gema diluída PEG (PM=6000) na concentração de 3,5 % (p/v)



Agitar por 10 minutos



Centrifugar a 14000 g durante 10 minutos

(Centrífuga Sorval RC2-B rotor SS-34)



Decantar o sobrenadante fluído da fase amarela (SNF), cuidadosamente, em um funil contendo papel filtro, verificar o volume do filtrado e acrescentar 12 % de PEG 6000

(p/v)



Agitar por 10 minutos



Centrifugar a 14000 g por 10 minutos



Dissolver o precipitado em 10 mL de tampão fosfato salino (TFS) + igual volume de

etanol 50 %



Agitar em banho de gelo por 20 minutos



Centrifugar a 14000 g por 10 minutos



Ressuspender o precipitado em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,5 sem NaCl, com 0,01 % de azida de sódio, em volume correspondente a 1/4 do volume inicial da gema.

5.4.1 Teste de microprecipitina

Após a produção do antissoro, contra o CMV em galinhas pela extração dos anticorpos a partir dos ovos, realizou-se o teste de microprecipitina (Ball, 1990) para verificar se havia ou não reação com o antígeno. Para cumprir essa finalidade colocou-se

uma gota de aproximadamente 15 μ L sobre uma placa de Petri plástica, previamente demarcada, o antissoro diluído na proporção 1:2 (v/v) em solução salina (NaCl 0,85%). A seguir, foi adicionado o mesmo volume do antígeno diluído (folhas de *N. glutinosa* infectadas com CMV) na proporção 1:10 (p/v) em tampão fosfato 0,001 M, pH 7,0. Foi adicionado, ainda, o mesmo volume de planta sadia, diluídos da mesma maneira, para controle negativo. Antígeno e antissoro foram homogeneizados e mantidos em câmara úmida à temperatura ambiente por 16 horas, para observação de precipitados e/ou floculações no interior da gota.

5.4.2 Teste de ELISA-indireto, para titulação do antissoro

O teste de ELISA-indireto (Converse & Martin, 1990) foi realizado para titulação do antissoro produzido contra o CMV. Amostras de tecidos infectados e sadios foram diluídas nas proporções de 1:10 e 1:100 (p/v) em tampão de carbonato pH 9,6 'coating buffer'. Colocou-se 100 μ L em cada orifício da placa de poliestireno e incubou-se a 37°C por 2 horas. O antissoro foi diluído em tampão PBS pH 7,2 nas proporções de 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000, 1/32000, 1/64000, 1/128000, 1/256000, 1/512000 e 1/1024000. Em seguida após 3 lavagens sucessivas com PBS-T, foram colocados nos orifícios da placa e incubados por 2 horas a 37°C. Após esse período, lavou-se a placa e adicionou-se 'anti-chicken- IgG- fosfatase alcalina (Sigma)' na diluição de 1:5000 em tampão PBS pH 7,2. Repetiu-se os procedimentos de incubação e lavagem. No último passo, acrescentou-se o substrato p-nitrofenil fosfato (Sigma), dissolvido na concentração 1 mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8. Após a

reação colorimétrica, a leitura da placa realizou-se a 405 nm no leitor de ELISA Bio-Rad, modelo 3550.

5.5 Triagem de genótipos de pimentão para a resistência ao CMV

O ensaio de triagem foi realizado nos meses de dezembro/2000, janeiro, fevereiro, março e abril de 2001.

Para avaliação da resistência ao CMV, foram testados 27 genótipos de pimentão, provenientes dos programas de melhoramento da empresa Sakata-Agroflora e do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) (Quadro 2). A coleção cedida pelo IAC constou de oito progênies F_3 segregantes derivadas de híbridos triplos e uma cultivar comercial. O método utilizado baseou-se no trabalho de Monma & Sakata (1997). A semeadura foi feita em solo esterilizado e após quatro semanas, as mudas foram transplantadas para vasos de plástico.

A inoculação foi realizada em 15 plantas de cada genótipo fornecido pelo IAC e em 10 plantas de cada genótipo fornecido pela Sakata-Agroflora, 40 dias após a semeadura, quando as plantas apresentavam o terceiro par de folhas. O inóculo foi preparado a partir das folhas de *N. glutinosa* infectadas com o isolado 1 (Quadro 1). O inóculo foi preparado através da maceração direta das folhas infectadas em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0 com sulfito de sódio 0,01 M, na proporção de 1 g de folhas para 5 mL de tampão. A inoculação foi feita após a pulverização das folhas com abrasivo (carbureto de silício - 400 mesh), com o auxílio de um pistilo. Em seguida, as folhas foram lavadas com água. Para controle positivo do inóculo, utilizou-se plantas de *N. glutinosa* e *C. amaranticolor*. O controle negativo foi realizado em duas plantas de cada genótipo do IAC e uma planta de cada

genótipo da Sakata-Agroflora, friccionando-se as folhas apenas com o tampão contendo o abrasivo. Todas as plantas foram mantidas em casa de vegetação onde observou-se o aparecimento dos sintomas, semanalmente, durante 45 dias. A avaliação foi feita com base na ausência de sintomas.

As plantas que não apresentaram sintomas foram submetidas à retrainoculação em plantas de *N. glutinosa* e *C. amaranticolor* que reagem com sintomas entre 2 a 5 dias. A reação das plantas foi classificada como imunidade ou tolerância, de acordo com Matthews (1991).

Quadro 2. Genótipos de pimentão testados para avaliação de resistência ao CMV.

Genótipos cedidos pelo IAC	Genótipos cedidos pela Sakata-Agroflora
	AF-690
F ₃ Mônica	AF-3781
	AF-220.01
F ₃ Lamuyo	AF-808
	AF-34.04
F ₃ Reinger	AF-813
	AF-188
F ₃ Magali	AF-193
	AF-1178
F ₃ Mikalor	AF-932
	AF-33A
F ₃ Mayata	AF-34A
	AF-97A
F ₃ Esterel	AF-98A
	AF-99A
F ₃ Melody	AF-136A
	AF-596
'ALL BIG' Hortivale	AF-597

6. RESULTADOS

6.1 Hospedeiras e sintomatologia

Os 17 isolados responderam com um perfil não diferenciado de sintomas nas espécies hospedeiras testadas (Quadro 3). Alguns isolados responderam com maior agressividade em relação ao período entre a inoculação e o aparecimento dos sintomas, como os isolados 1, 10, 12 e 16, que após 3 dias da inoculação já apresentavam sintomas sistêmicos, enquanto que os demais isolados demoraram 4 a 5 dias para manifestá-los. Após 10 dias, os sintomas provocados pelos quatro isolados estavam comparativamente mais severos que os dos demais, ou seja, os sintomas embora do mesmo tipo, estavam mais intensos. Nas figuras 1, 2, 3 e 4 pode-se observar as reações em *G. globosa* e *C. pepo* L., em *N. glutinosa*, *N. debneyi* e *N. tabacum* 'Xanthii', *S. gilo* e *S. melongena*, respectivamente.

Quadro 3. Sintomas induzidos pelos isolados do *Cucumber mosaic virus* nas plantas indicadoras inoculadas:

Família e espécie indicadora	Sintoma: (L) → local (S) → sistêmico
<i>Amaranthaceae</i>	Anéis necróticos (L)
<i>Gomphrena globosa</i>	Clorose e deformação foliar(L)
<i>Balsaminaceae</i>	
<i>Impatiens</i> sp.	Sem sintoma
<i>Chenopodiaceae</i>	
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Lesões cloróticas e necróticas (L)
<i>C. murale</i>	Lesões necróticas (L)
<i>C. quinoa</i>	Lesões clorótica (L)
<i>Cucurbitaceae</i>	
<i>Cucumis sativus</i> L.	Lesões cloróticas (L), mosqueado discreto (S)
<i>Cucurbita pepo</i> L.	Lesões cloróticas (L e S), clareamento de nervura e mosaico discreto (S)
<i>Plantaginaceae</i>	
<i>Plantago</i> sp.	Sem sintoma
<i>Portulacaceae</i>	
<i>Portulaca</i> sp.	Sem sintoma
<i>Solanaceae</i>	
<i>Capsicum annuum</i> L. ‘Magali-R’	Mosaico, nanismo, deformação foliar e dos frutos

QUADRO 3. Sintomas induzidos pelos isolados de *Cucumber mosaic virus* em plantas indicadoras (continuação):

Família e espécie indicadora	Sintoma: (L) → local (S) → sistêmico
<i>Datura metel</i>	Lesão clorótica e anéis cloróticos (L)
<i>D. stramonium</i>	Sem sintoma
<i>Lycopersicum esculentum</i>	Mosaico discreto (S)
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Mosaico (L) e (S), deformação foliar e bolhosidade
<i>N. debneyi</i>	Mosaico e bolhosidade (S)
<i>N. glutinosa</i>	Mosaico, deformação foliar, 'line patterns'(S)
<i>N. sylvestris</i>	Clareamento de nervura e mosaico (S)
<i>N. tabacum</i> 'Samsun'	Mosaico, deformação foliar, 'line patterns'(S)
'Samsun NN'	Mosaico e bolhosidade (S)
'TNN'	Mosaico (S)
'Xanthii'	Mosaico e 'line patterns' (S)
<i>Petunia hybrida</i>	Clareamento de nervura (L), mosaico, bolhosidade, deformação foliar e necrose de nervura (S)
<i>Physalis floridana</i>	Sem sintoma
<i>Solanum gilo</i>	Clareamento de nervura (S)
<i>S. melongena</i>	Mosaico e bolhosidade (S)

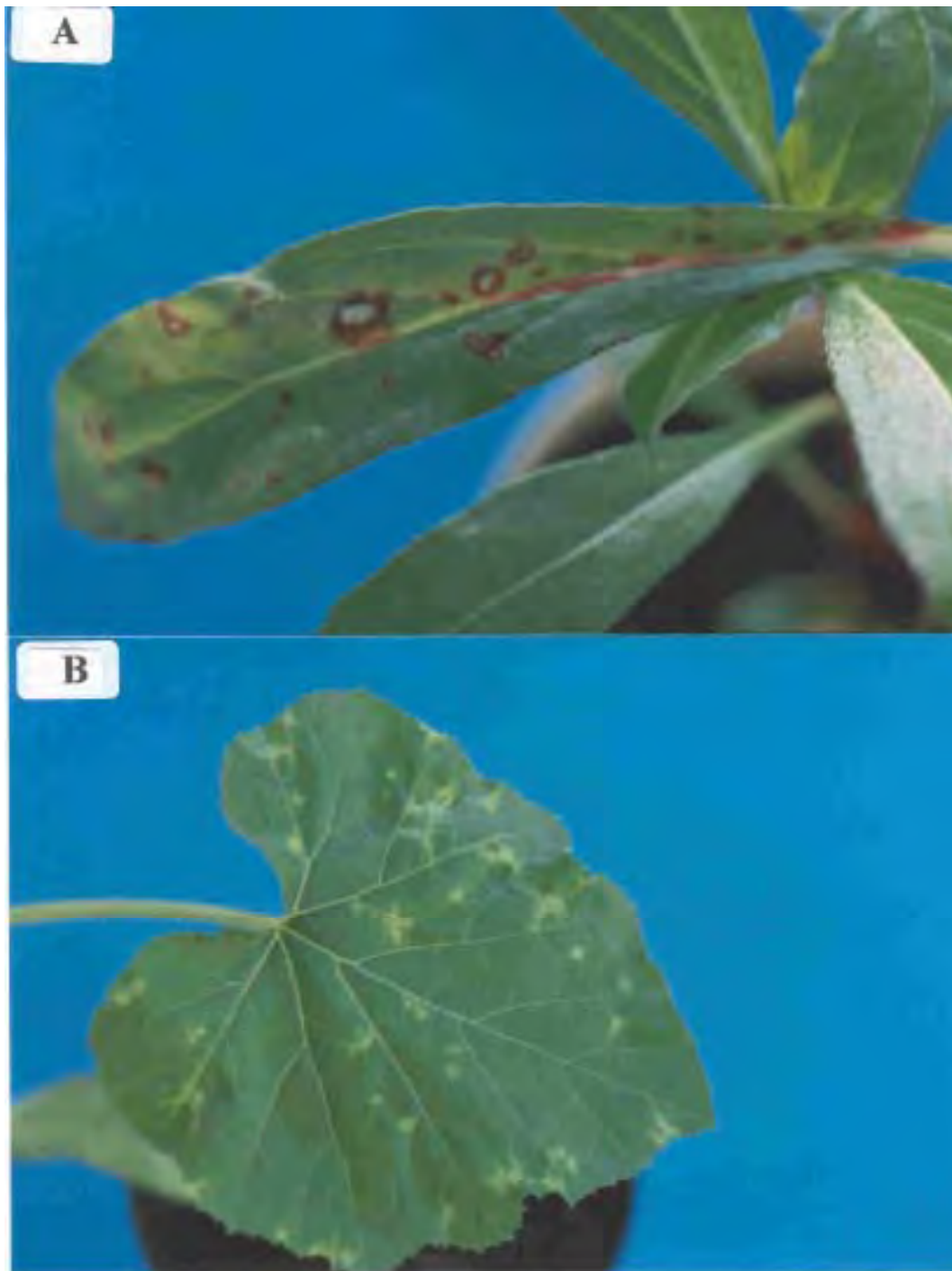


Figura 1. A) Isolado 1 - *Gomphrena globosa* → anéis necróticos; B) Isolado 1 - *Cucurbita pepo* L. → lesões cloróticas

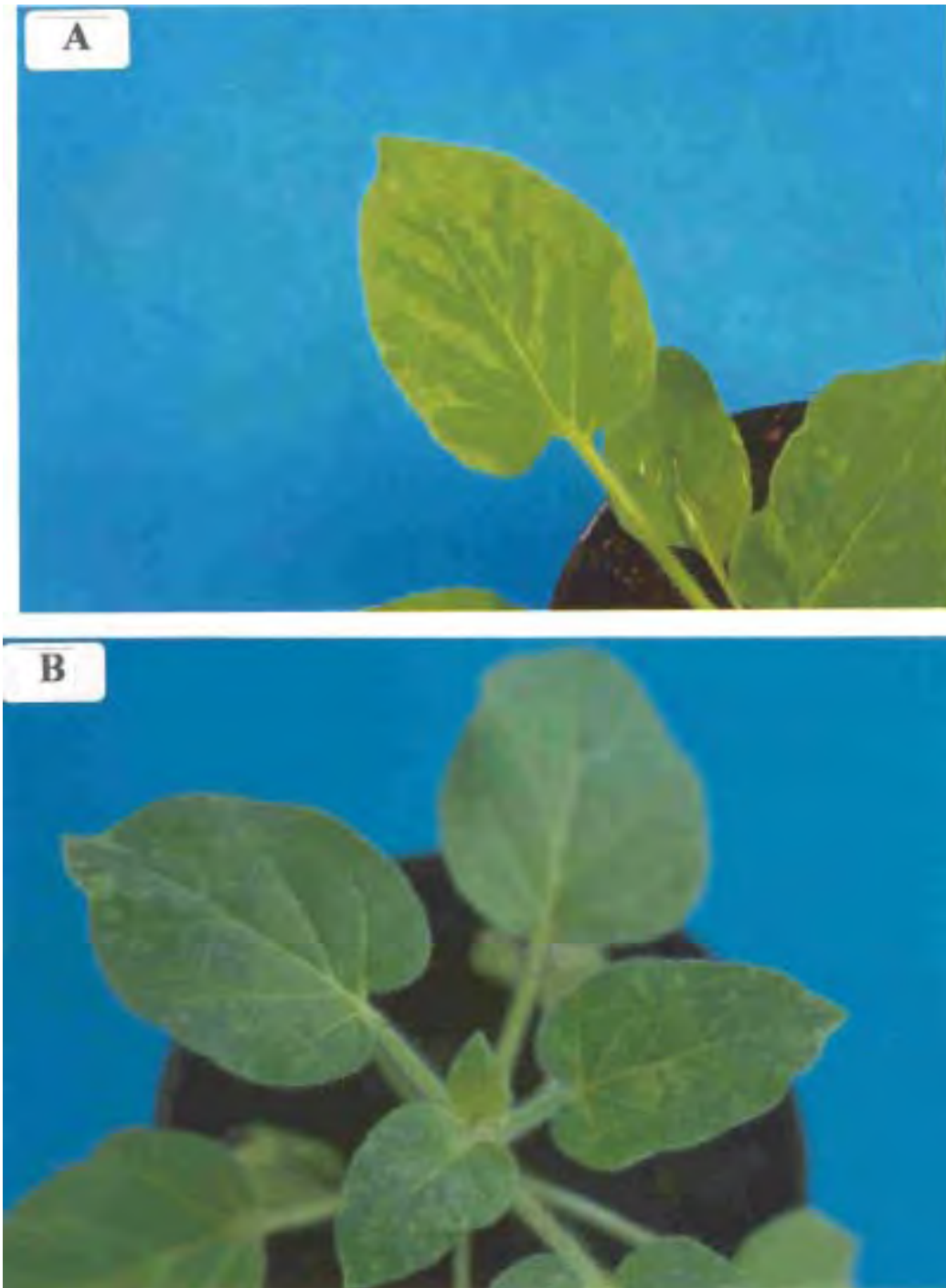


Figura 2. A) Isolado 2 - *Nicotiana glutinosa* → 'line-patterns'; B) Isolado 2 - *N. glutinosa* → mosaico

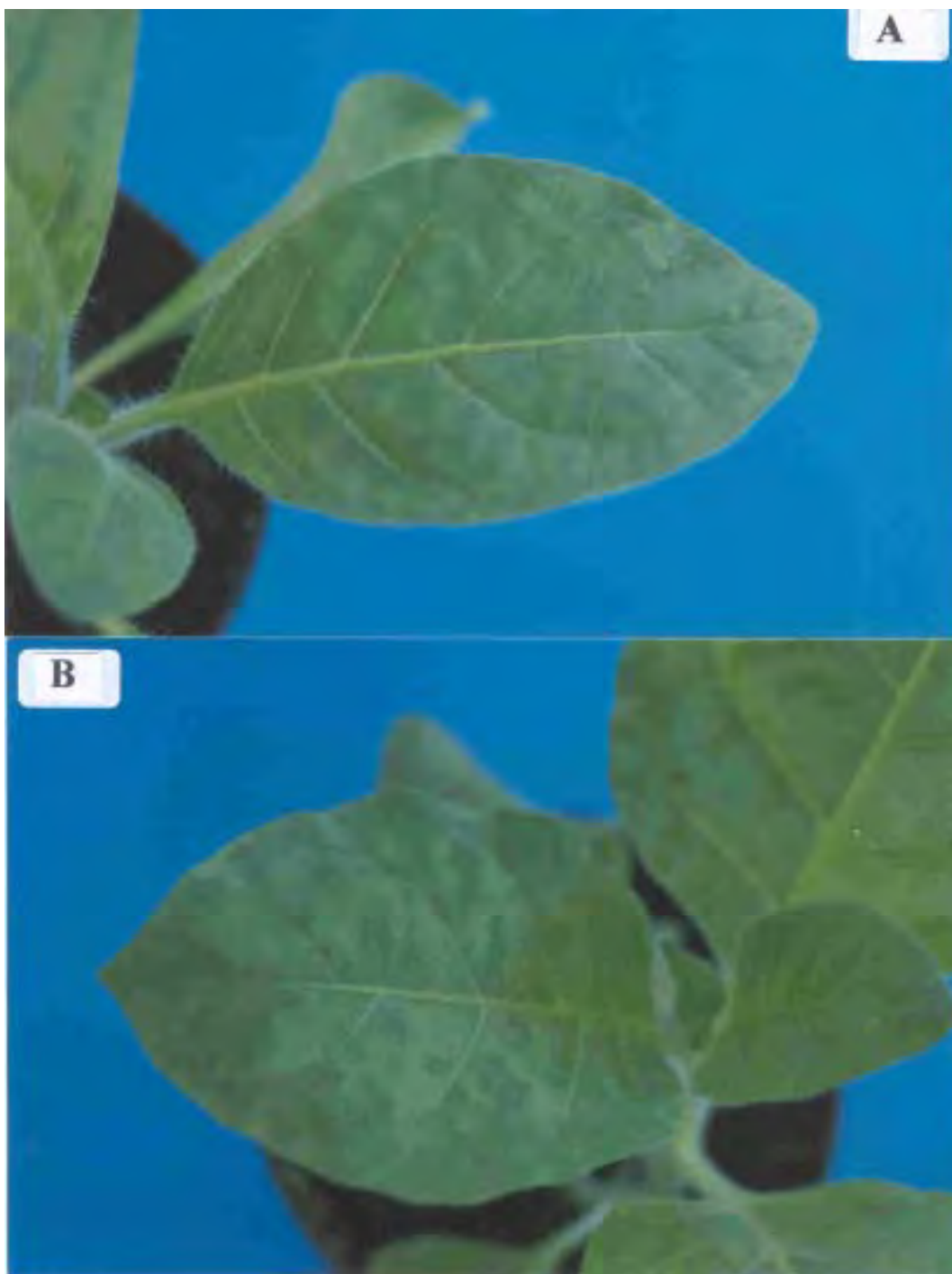


Figura 3. A) Isolado 1 - *N. debneyi* → mosaico B) Isolado 1 - *N. tabacum* 'Xanthii' → mosaico e 'line patterns'

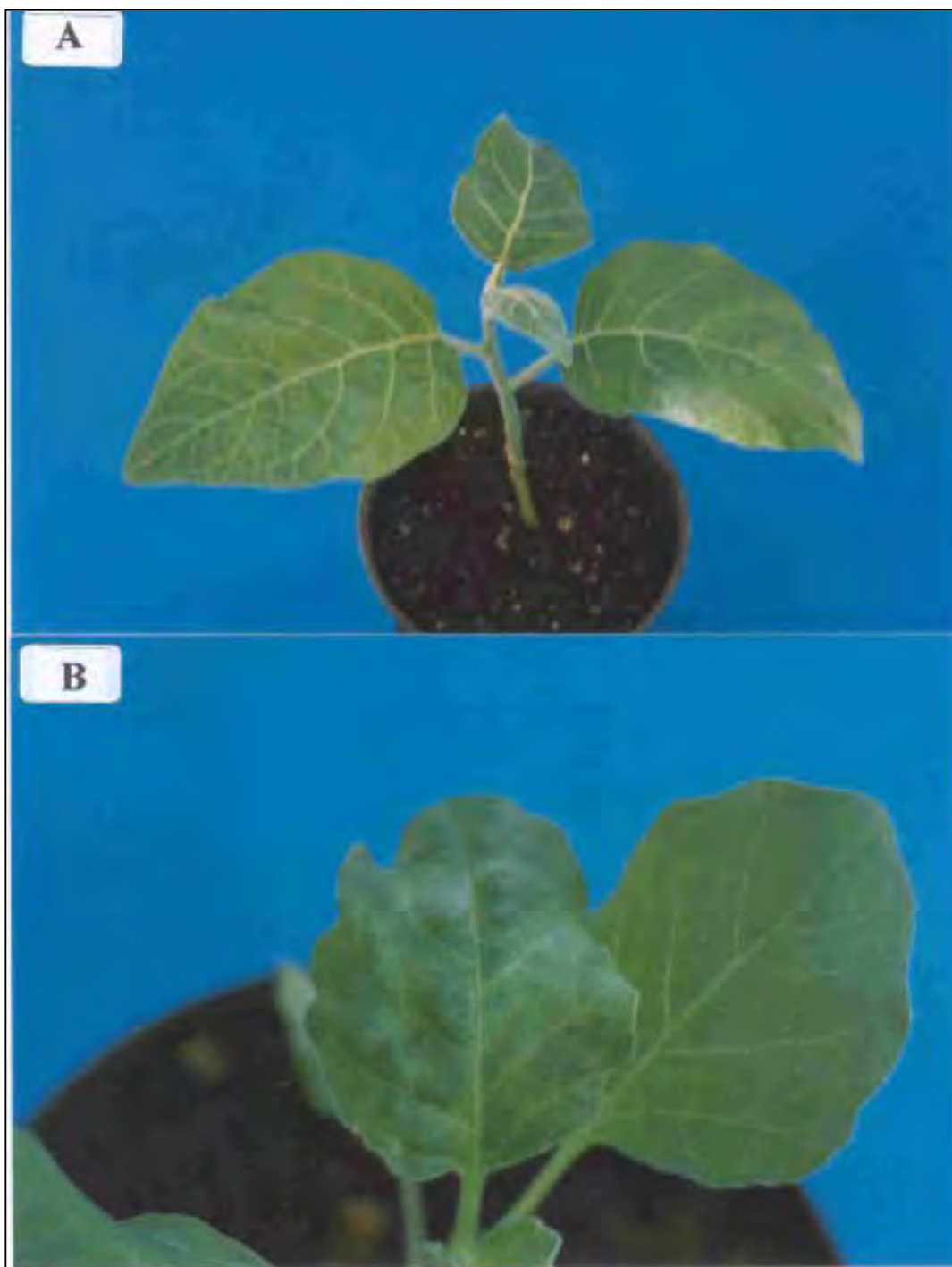


Figura 4. A) Isolado 1 - *Solanum gilo* → clareamento de nervura; B) Isolado 1 - *S. melongena* → mosaico e bolhosidade.

6.2 Identificação do subgrupo do CMV através do teste sorológico (DAS-ELISA)

Os isolados estudados, quando submetidos ao teste de ELISA direto, foram identificados como pertencentes ao CMV subgrupo I. Os valores obtidos de absorvância a 405 nm, nos extratos de *N. glutinosa* de todos os isolados foram positivos para o anticorpo monoclonal AS-CMV I e negativos para o anticorpo monoclonal AS-CMV II . Extratos de *N. glutinosa* sadia apresentaram resultados negativos para os dois anticorpos.

6.3 Identificação do CMV através de RT-PCR e digestão enzimática para determinação do subgrupo

A eletroforese dos produtos da RT-PCR das amostras 1, 3, 4, 15 e 17 demonstrou, para cada isolado, a amplificação de um fragmento de DNA com aproximadamente 486 pares de bases (Figura 5).

Os produtos da RT-PCR, submetidos à digestão com a endonuclease *MspI*, originaram dois fragmentos de DNA com aproximadamente 150 e 336 pares de base, correspondendo ao padrão esperado para isolados do CMV subgrupo I (Figura 6).

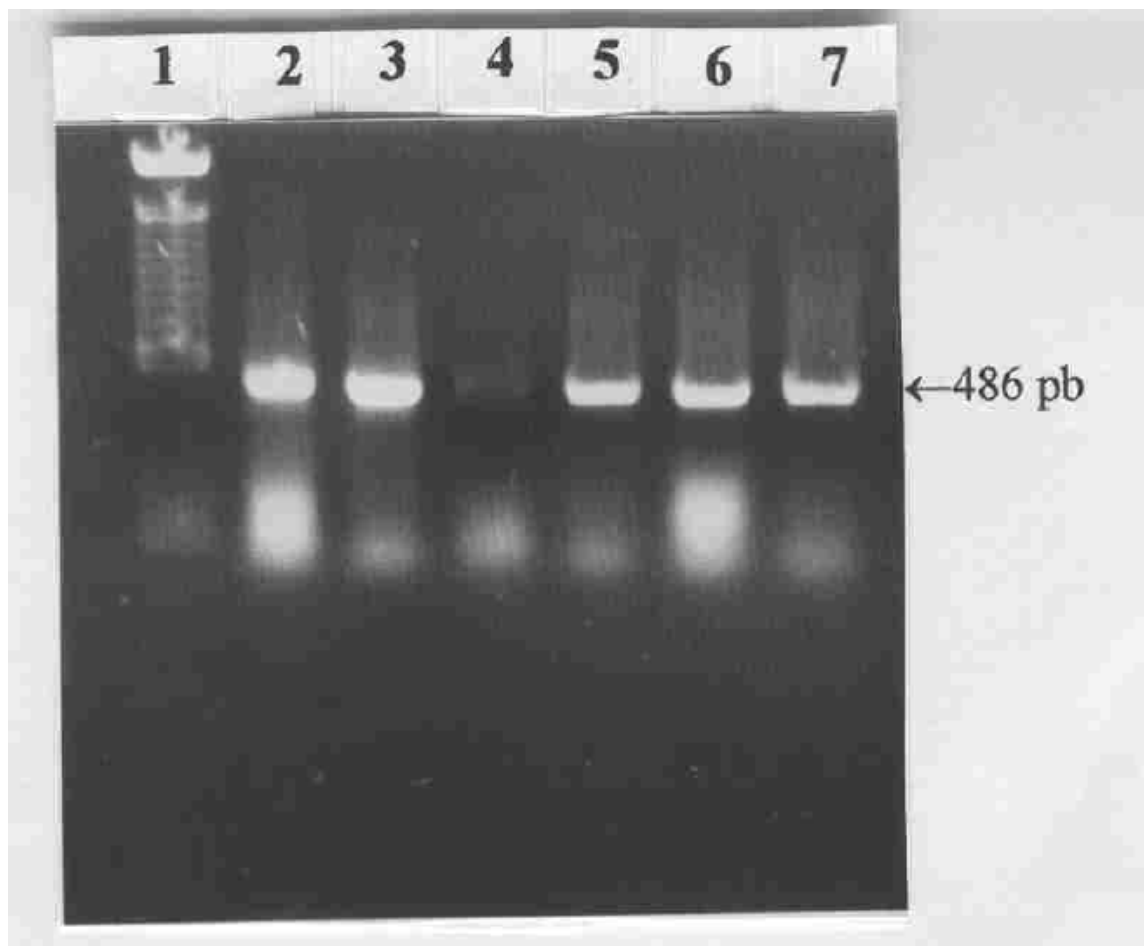


Figura 5. Análise em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados por RT-PCR. 1. Marcador molecular 100 pb (Gibco-BRL); 2. CMV (Paulínia - 1); 3. CMV (Lucianópolis - 17); 4. CMV (Lins - 2); 5. CMV (Guaíçara - 15); 6. CMV (Jacareí - 3); 7. CMV (Lins - 4). As linhas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 são fragmentos amplificados de aproximadamente 486 pb.

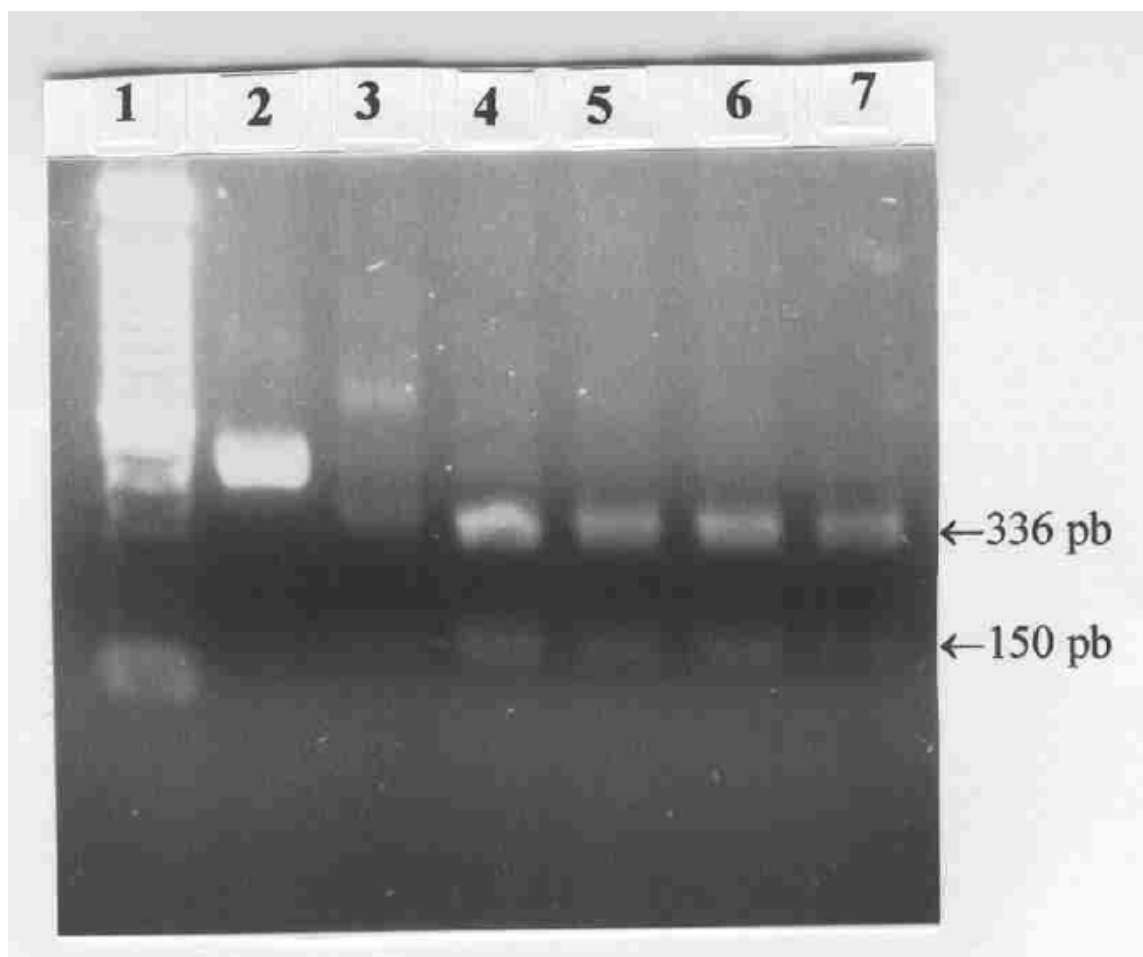


Figura 6. Análise em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados por RT-PCR digeridos pela endonuclease de restrição *MspI*. 1. Marcador molecular 100 pb (Gibco – BRL); 2. CMV (Lucianópolis – 17, amostra não submetida a *MspI*); 3. CMV (Paulínia – 1); 4. CMV (Lucianópolis – 17); 5. CMV (Guaiçara – 15); 6. CMV (Jacareí – 3); 7. CMV (Lins – 4). As linhas 3, 4, 5, 6 e 7 representam o resultado da digestão do fragmento de 486 pb, originando os fragmentos de 150 e 336 pb. A linha 2 representa um fragmento de 486 pb que não sofreu a ação da *MspI*, portanto, não foi digerido.

6.4 Vírus purificado

O espectro de absorvância à luz ultra-violeta (200-300 nm) da preparação purificada do CMV subgrupo I (Figura 7), apresentou picos máximo e mínimo à 260 e 242 nm, respectivamente, produzindo uma curva típica de nucleoproteína. A relação A_{260}/A_{280} foi 1,65 e o rendimento do vírus purificado foi de, aproximadamente, 40mg/kg de folhas. A infectividade do vírus purificado foi verificada através da inoculação de *C. amaranticolor*, que apresentou várias lesões locais cloróticas (Figura 8).

O teor de ácido nucléico calculado para a preparação do vírus purificado foi equivalente a 22,5 %.

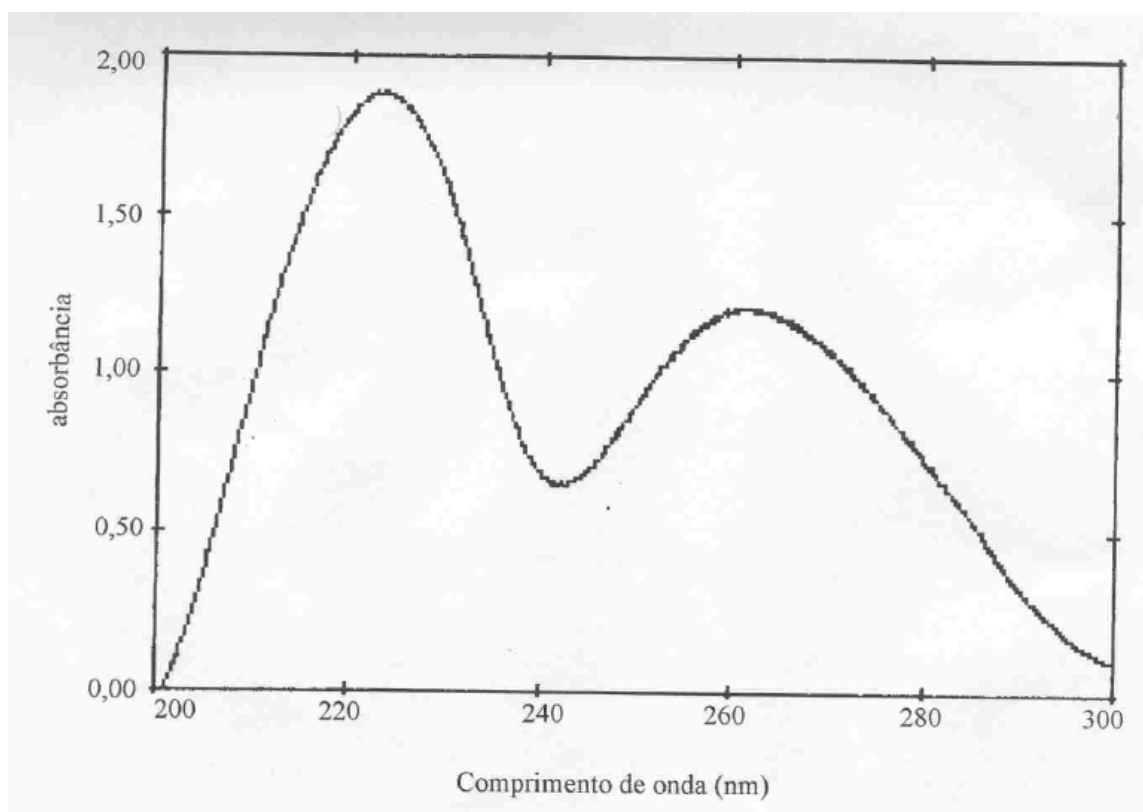


Figura 7. Espectro de absorvância em luz ultravioleta do CMV purificado.



Figura 8. *Chenopodium amaranticolor* → lesão clorótica local (avaliação da infectividade da preparação purificada).

6.5 Produção de antissoro policlonal

O antissoro produzido em galinhas a partir do vírus purificado reagiu positivamente em teste de microprecipitina contra o vírus do mosaico do pepino.

A titulação do antissoro realizada através de teste sorológico de Elisa-indireto demonstrou que o anti-CMV obtido foi capaz de reconhecer e se ligar ao antígeno até a diluição de 1:256000 nos extratos de planta infectada. A preparação do vírus purificado foi detectada até a diluição de 1:512000. Houve detecção do antígeno tanto nos extratos de planta infectada, quanto na preparação do vírus purificado até a diluição de 100 vezes. Não se observou reação com os extratos de plantas sadias.

6.6 Triagem para resistência

Os resultados obtidos na triagem de genótipos de pimentão mostraram sintomas sistêmicos ou ausência de sintomas (Quadros 4 e 5). A avaliação baseou-se nas plantas que não apresentaram sintomas.

Através do teste de retroinoculação das plantas que não apresentaram sintomas verificou-se que os genótipos, fornecidos pela Sakata-Agroflora, AF-188, AF-1178, AF-98A, AF-99A e AF-136A comportaram-se de forma tolerante, não manifestando sintomas, mas mantendo a replicação viral sistêmica. Não foi observada reação de tolerância nos genótipos fornecidos pelo IAC.

Quadro 4. Reação de resistência de genótipos de pimentão (fornecidos pelo IAC) ao *Cucumber mosaic virus* (CMV), expressa pela ausência de sintomas.

Genótipos	Plantas inoculadas	Plantas sem sintomas	% de plantas sem sintomas
F ₃ Mônica	15	8	53,5
F ₃ Lamuyo	30	28	93,5
F ₃ Reinger	90	82	91
F ₃ Magali	15	8	53,5
F ₃ Mikalor	15	9	60
F ₃ Mayata	15	12	80
F ₃ Esterel	15	8	53,5
F ₃ Melody	15	5	33,5
'ALL BIG'	15	7	46,5

Quadro 5. Reação dos genótipos de pimentão (fornecidos pela Sakata-Agroflora) ao *Cucumber mosaic virus* (CMV), expressa pela ausência de sintomas.

Genótipo	Plantas inoculadas	Plantas sem sintomas	% de plantas sem sintoma
AF-690	10	0	0
AF-3781	10	0	0
AF-220.01	10	0	0
AF-808	10	0	0
AF-34.04	10	0	0
AF-813	10	0	0
AF-188	10	10	100
AF-193	10	0	0
AF-1178	10	10	100
AF-932	10	0	0
AF-33 A	10	0	0
AF-34 A	10	0	0
AF-97 A	20	20	100
AF-98 A	10	10	100
AF-99 A	10	10	100
AF-136 A	10	10	100
AF-596	10	0	0
AF-597	10	0	0

7. DISCUSSÃO

O CMV possui um dos círculos de hospedeiras mais amplo dentre os fitovírus. Os relatos referem-se a uma vasta gama de hospedeiras, que envolve 85 famílias botânicas, abrangendo mais de 1000 espécies infectadas de forma natural e experimentalmente (Regenmortel *et al.*, 2000).

A ocorrência em de CMV em pimentão é comum em países como França (Nono-Womdim *et al.*, 1993b), Itália (Siviero & Gallerani, 1992), Grécia (Varveri & Boutsika, 1999), Índia (Rishi & Dhawan, 1989), Estados Unidos (Daniels & Campbell, 1992), Israel (Lapidot *et al.*, 1997), Japão (Monma & Sakata, 1997), Austrália (Perry *et al.*, 1993), Indonésia (Sudarsono *et al.*, 1998b), China (Wu *et al.*, 1989), Hungria (Tóbiás *et al.*, 1982), Argentina (Atencio *et al.*, 1997). Em geral, esse vírus causa severos danos e grandes prejuízos econômicos. No Brasil, exceto os relatos feitos por Nagai (1984) e Cupertino *et al.* (1988), não houve casos da incidência do CMV em culturas de pimentão até 1998 (Kobori *et al.*, 2000),

embora o vírus tenha sido encontrado em outras espécies. Boari *et al.* (2000) relataram a incidência do CMV em pimentão, no Estado de Minas Gerais, o que pode ser interpretado como uma disseminação mais ampla dos focos de infecção. Convém salientar que durante a realização do presente trabalho verificou-se que a incidência e os danos causados pelo CMV em pimentão estão aumentando no Estado de São Paulo. O fato foi confirmado pela identificação dos isolados coletados em municípios localizados em diversas regiões do Estado, como Guaiçara, Jacareí, Lins, Lucianópolis e Paulínia.

A proposta central desse trabalho foi a identificação dos isolados de CMV provenientes das culturas de pimentão fornecendo dados preliminares que auxiliem na compreensão dessa disseminação recente, uma vez que a presença do CMV no Brasil vem sendo relatada desde 1941 (Silberschmidt & Nóbrega, 1941). O conhecimento das causas que levaram ao aumento da ocorrência de CMV em pimentão é fundamental para que se possa estabelecer estratégias de controle.

Os isolados submetidos ao mesmo círculo de hospedeiras demonstraram uma sintomatologia similar. De um modo geral, estão de acordo com os resultados obtidos por Smith & Davis(1986), Maciel-Zambolim *et al.* (1990), Daniels & Campbell (1992), Duarte *et al.* (1994), Colariccio *et al.* (1996), Espinha (1999), Kobori *et al.* (2000) e Boari *et al.* (2000), variando na intensidade de sintomas e pela resposta observada nas indicadoras *D. stramonium* e *S. melongena*. A identificação biológica do subgrupo a que pertence o CMV foi realizada através da observação dos sintomas induzidos em plantas de *N. glutinosa*, de acordo com Daniels & Campbell (1992), onde isolados do CMV subgrupo I causam mosaico e isolados do CMV subgrupo II induzem necrose severa e até a morte dessas plantas. Nenhum dos isolados de pimentão testados em *N. glutinosa* causou necrose e o

sintoma preponderante foi o mosaico, sendo esse um forte indício biológico de que os isolados coletados no Estado de São Paulo, pertencem ao subgrupo I do CMV, o que está de acordo com os resultados obtidos por Kobori *et al.* (2000). Boari *et al.* (2000), ao inocular *N. glutinosa* com o isolado controle do CMV-II, não observou necrose e sim clorose de nervura, e os isolados pertencentes ao CMV-I, quando inoculados nessa mesma hospedeira demonstraram predominantemente sintoma de mosaico, como o observado nos isolados testados no presente trabalho. Situação semelhante ocorreu quando Wahyuni *et al.* (1992) inocularam isolados de CMV provenientes de pimentão em *N. glutinosa*. Os dois isolados pertencentes ao subgrupo I causaram mosaico e deformação foliar, enquanto que, dos isolados pertencentes ao subgrupo II, apenas um causou necrose e os demais provocaram mosaico e deformação foliar.

Os isolados não causaram sintomas em *D. stramonium*, que foi submetida a teste de retroinoculação com resultado negativo. Ficou evidente, pela impossibilidade de recuperar o vírus, que os isolados não se replicaram nessa indicadora. O resultado está de acordo ao obtido por Haq *et al.* (1996), com o isolado do CMV de *Physalis minima*, mas difere dos resultados obtidos por Colariccio *et al.* (1996), Duarte *et al.* (1994), Wahyuni *et al.* (1992) e Maciel-Zambolim *et al.* (1990) que observaram sintomas locais de anéis cloróticos com isolados de banana, espécies de *Comelinaceae*, pimentão e pimenta-do-reino, respectivamente. Também difere de Smith & Davis (1986) que obtiveram sintomas sistêmicos de mosaico com o isolado de *Vinca minor* (*Apocynaceae*). Já a indicadora *S. melongena* apresentou sintomas de mosaico e bolhosidade ao ser inoculada com os isolados de pimentão estudados, o que difere do observado para o isolado do CMV de *Physalis minima* obtido por Haq *et al.* (1996), que não apresentou sintoma e o vírus não pôde ser recuperado.

Exemplos de diferenças na sintomatologia e círculo de hospedeiras de isolados do CMV, demonstram que esse tipo de critério deve ser visto com cautela pois pode ser muito variável. Além disso, a diferenciação dos subgrupos do CMV através de plantas hospedeiras em nosso país envolve a questão da não identificação, até o momento, de isolados do CMV subgrupo II, e a sintomatologia de um isolado brasileiro do CMV-II, se ocorrer, poderá não corresponder ao padrão esperado como critério para diferenciá-los.

Em razão da existência de diversas estirpes do CMV, os isolados demonstram grande variabilidade na sintomatologia e círculo de hospedeiras, podendo ainda, a presença de RNA satélite interferir atenuando ou acentuando a sintomatologia (Palukaitis *et al.*, 1992). Além disso, os sintomas exibidos por uma planta infectada são determinados pela interação de vários fatores como o genoma viral, genoma da planta hospedeira e as condições do ambiente em que estão inseridos, sendo esses fatores extremamente variáveis. A utilização de critérios biológicos, como a sintomatologia, para determinar a identificação do vírus não é recomendável (Wahyuni *et al.*, 1992, Francki & Hatta, 1980), embora possam e devam ser utilizados como indicadores em conjunto com outros procedimentos de diagnose.

A identificação de todos os isolados por meio de teste sorológico ELISA-direto permitiu identificar todos os isolados como pertencentes ao CMV-subgrupo I. A utilização do ELISA, com o emprego de anticorpo monoclonal, têm-se mostrado eficiente para distinguir as estirpes do CMV (Haase *et al.*, 1989, Wahyuni *et al.*, 1992, Eiras *et al.*, 2001). Os antissoros policlonais contêm anticorpos que reagem com todos os subgrupos do CMV, enquanto que os anticorpos monoclonais são sorotipo específicos, podendo diferenciar isolados pertencentes a cada um dos subgrupos do CMV (Haase *et al.*, 1989, Wahyuni *et al.*, 1992, Palukaitis *et al.*, 1992). A alta sensibilidade desse teste e a simplicidade de sua execução

permitiram analisar os 17 isolados com segurança, demonstrando ser esse um procedimento de diagnose eficiente e rápido (dois dias), mesmo quando há um grande número de amostras, aspecto que já havia sido colocado por Hu *et al.* (1995).

Entre os 17 isolados coletados, foram escolhidos 5, por serem originários de regiões diferentes, para a realização da identificação molecular do subgrupo através de RT-PCR / RFLP com a endonuclease de restrição *MspI*. A escolha recaiu sobre a *MspI* porque ela resulta em padrões de digestão diferentes para os dois subgrupos do CMV, originando dois fragmentos em torno de 337 e 152 pb para isolados pertencentes ao subgrupo I e três fragmentos com cerca de 197, 151 e 126 pb para isolados do subgrupo II (Rizos *et al.*, 1992, Singh *et al.*, 1995, Varveri & Boutsika, 1999, Espinha, 1999, Boari *et al.*, 2000, Eiras *et al.*, 2001).

A identificação molecular do subgrupo do CMV, nos 5 isolados estudados, está perfeitamente de acordo com o padrão observado para isolados do CMV-subgrupo I, observado por Singh *et al.* (1995), Varveri & Boutsika (1999), Espinha (1999), Boari *et al.* (2000) e Eiras *et al.* (2001). Essa diferenciação é possível porque a seqüência genômica dessa região do RNA 3 é altamente conservada dentro dos subgrupos (Palukaitis *et al.*, 1992). Os 5 isolados estudados comportaram-se de maneira bastante similar aos isolados de pimentão provenientes de Minas Gerais, testados por Boari *et al.* (2000), que ao serem submetidos à enzima de restrição *MspI*, originaram duas bandas de aproximadamente 340 e 150 pb, reforçando o fato desse método ser preciso e originar resultados confiáveis e de fácil interpretação.

Os resultados obtidos nos testes sorológicos e moleculares foram coincidentes, o que não é surpreendente, pois o teste sorológico, com o anticorpo monoclonal,

reconhece as diferenças na capa protéica do vírus enquanto que a restrição enzimática identifica as diferenças no gene que codifica para esta proteína. Esse aspecto também foi apontado por Varveri & Boutsika (1999) e por Rizos *et al.* (1992).

Convém lembrar que alguns isolados do CMV provenientes de banana não foram identificados em extrato vegetal bruto através de ELISA. Nestes casos, a RT-PCR, pode identificar esses isolados, por ser uma técnica mais sensível que o ELISA. Ainda assim, os autores consideram que, para testes de rotina com grande número de amostras, o ELISA é mais conveniente e prático (Hu *et al.*, 1995).

A utilização de uma técnica de diagnose em detrimento de outra depende do objetivo em questão e da realidade dos laboratórios, mas de um modo geral, o diagnóstico seguro deve ser feito com a utilização de um conjunto de metodologias, em que todas são importantes e decisivas, pois somente com uma abordagem abrangente se estabelece a eficiência do diagnóstico.

A identificação de todos os isolados como pertencentes ao subgrupo I do CMV, reforça os dados de literatura que apontam a predominância desse subgrupo em regiões tropicais e subtropicais (Hasse *et al.*, 1989, Palukaitis *et al.*, 1992). Os resultados estão de acordo com os resultados obtidos no Brasil por Espinha (1999), Boari *et al.* (2000) e Eiras *et al.* (2001).

A identificação dos isolados permitiu verificar que o subgrupo a que pertencem é o mesmo que vem infectando outras espécies cultivadas em nosso país. Outros estudos deverão ser realizados para que se conheçam as causas da disseminação do CMV na cultura de pimentão. Podem ser fatores ligados com a transmissão, como aumento populacional significativo do afídeo-vetor, ou talvez, o aparecimento de uma nova espécie que

transmita o CMV com maior eficiência. Deve-se ainda, analisar a possibilidade de transmissão a partir de restos de cultura infectados ou através da irrigação, como já foi verificado por Pares & Gunn (1989) e Piazzola *et al.*(1989).

Todas as amostras foram isoladas a partir da cultivar de pimentão ‘Magali-R’, o que pode significar que essa cultivar embora resistente ao PVY, seja extremamente suscetível ao CMV, tornando-se mais vulnerável a esse vírus do que outras cultivares utilizadas até então.

O método utilizado na purificação, segundo Lot *et al.* (1972), sofreu algumas modificações baseadas no trabalho de Gera *et al.* (1979), para se obter uma preparação purificada de alta qualidade. Após a alta centrifugação à 78000g, ao invés de ressuspender o “pellet” em água destilada e submetê-lo a ciclos diferenciais de centrifugação, o “pellet” foi ressuspensionado em tampão borato de sódio 0,005 M, pH 9,0 com 0,5 mM de EDTA e submetido a centrifugação em gradiente zonal de sacarose de 10% à 40%, depois submeteu-se a fração com o vírus a uma alta centrifugação e ressuspendeu-se o vírus purificado no mesmo tampão.

A curva da preparação purificada analisada ao espectrofotômetro sob luz ultravioleta é típica de nucleoproteína (Hull, 1985). O rendimento da preparação purificada foi de 40mg por Kg de folhas, estando abaixo do patamar apontado por Palukaitis *et al.* (1992), que foi de 100 à 300 mg/Kg e 380 à 475 mg/Kg relatado por Lot *et al.* (1972) para isolados de tomate. Daniels & Campbell (1992) obtiveram um rendimento em torno de 300mg/Kg e Smith & Davis (1986) obtiveram 110mg/Kg ao purificar o isolado de CMV proveniente de *Vinca minor*. O isolado proveniente de pimenta-do-reino purificado rendeu 10mg/Kg (Maciel-Zambolim *et al.*, 1990) e Espinha (1999), obteve através da purificação do

isolado de *Catharantus roseus* o rendimento de 11mg/Kg. O rendimento das purificações pode variar bastante, de acordo com vários fatores que envolvem a estirpe do isolado em questão, a planta hospedeira utilizada como multiplicadora do vírus, a época da inoculação e colheita, as condições em que as plantas são submetidas durante esse período e a metodologia de purificação (Kaper & Waterworth, 1981, Palukaitis *et al.*, 1992).

A análise espectrofotométrica da preparação purificada permitiu estipular a relação A_{260}/A_{280} que foi de 1,65, exatamente o indicado para esse vírus isométrico, quando adequadamente purificado (Gibbs & Harrison, 1970). O teor de ácido nucléico na preparação purificada foi de 22,5%, dentro dos padrões esperados para o CMV, que estão em torno de 18% (Palukaitis *et al.*, 1992).

A infectividade da preparação purificada foi mantida, sendo um forte indício de que a estabilidade das partículas foi mantida durante o processo de purificação, pois, essa é uma das grandes dificuldades que envolvem a purificação do CMV, e um dos pontos citados como vantajosos na metodologia desenvolvida por Lot *et al.* (1972), o qual não foi comprometido com as modificações estabelecidas.

A preparação purificada foi utilizada para a produção do antissoro para a proteína capsidial do vírus. Dentre os animais possuidores de sistema imunológico, capazes de produzir anticorpos em resposta a um antígeno, a galinha tem a habilidade de produzir altos níveis de anticorpo, mesmo com baixas concentrações de antígeno, além disso ocorre a passagem dos anticorpos antivirais do soro sanguíneo da galinha para as gemas do ovo no processo de transferência dos anticorpos maternos para a prole, nesse caso através do epitélio folicular dos ovários da galinha (Patterson *et al.*, 1962). Experimentos comparativos demonstraram que a concentração de imunoglobulina contida na gema do ovo é superior a

encontrada no soro da galinha imunizada (Jensenius *et al.*, 1981). Além disso, o antissoro pode ser extraído através de metodologias simples que não geram desconforto para as galinhas, o que deve ser prioridade em todos os experimentos que envolvam animais. O antissoro policlonal produzido apresentou um alto título, reconhecendo o antígeno em extratos vegetais brutos até a diluição de 1/256000 e na preparação purificada do vírus até 1/512000. Convém salientar que não houve reação com o extrato de tecido vegetal sadio, o que comprova a qualidade da preparação purificada e a especificidade do antissoro. A concentração do vírus empregada nesse trabalho para a imunização foi bem menor que a empregada por Tóbias *et al.* (1982), com a imunização de um coelho com a preparação purificada de um CMV (ToRS-II) isolado de pimentão, na Hungria, onde utilizaram blocos de uma injeção intravenosa, seguida de uma intramuscular ou subcutânea, com concentrações de 7,5mg cada uma, obtendo um título de 1/256.

Colariccio *et al.* (1996) obtiveram um título de 1/40000, utilizando quatro injeções subcutâneas em galinhas com 1,1mg/mL do CMV semi-purificado e Maciel-Zambolim *et al.* (1990) produziram antissoro com preparação purificada do CMV em coelho, através de três injeções intramusculares com 2,0mg/mL do vírus em cada uma, seguidas de um reforço com uma quarta injeção com 1mg/mL do vírus purificado, na 6ª semana após a primeira injeção, resultando em um título de 1/4096. Moreira (2001), produziu em galinhas o antissoro contra um isolado brasileiro do *Southern bean mosaic virus* com três injeções intramusculares, com alíquotas de 0,170mg/mL da preparação purificada do vírus e obteve o título de 1/128000, resultado esse mais próximo ao obtido nesse trabalho, provavelmente porque o esquema de imunização tenha sido praticamente o mesmo.

A titulação dos antissoros nos diferentes trabalhos citados não foi realizada com a mesma metodologia empregada nesse trabalho, o que pode também influenciar a diferença obtida nos resultados, embora o motivo central de tanta discrepância pareça estar mais relacionado com a escolha do animal a ser imunizado, uma vez que em todos os trabalhos analisados, os títulos mais altos conseguidos foram naqueles que utilizaram a galinha como produtora do antissoro.

Esses resultados permitem afirmar que podem ser utilizadas baixas concentrações do vírus purificado para a imunização, sem afetar a eficiência do antissoro produzido, uma vez que a reação imunológica ocorre de forma mais qualitativa do que quantitativa. Demonstram também, as vantagens da utilização de galinhas para a produção de antissoros contra vírus, como foi colocado por vários autores (Patterson *et al.*, 1962, Bar-Joseph & Malkinson, 1980, Polson *et al.*, 1980, Jensenius *et al.*, 1981, Bade & Stegemann, 1984, Hu *et al.*, 1985, Ball *et al.*, 1990, Colariccio *et al.*, 1996 e Moreira, 2001), entre elas, o fácil manuseio, baixa quantidade de antígenos para gerar a resposta imune, a produção de grande quantidade de antissoro específico, com títulos elevados, em períodos curtos de tempo que podem ser extraídos das gemas dos ovos, que naturalmente são produzidos em grande quantidade.

De acordo com os critérios estabelecidos por Matthews (1991), as plantas assintomáticas submetidas à retroinoculação, em que não se recupera o vírus, são consideradas imunes e não resistentes. Como não houve infecção, também não houve replicação na célula hospedeira, portanto, não houve o estabelecimento de doença e, conseqüentemente, não pode haver resistência. Por sua vez, Russel (1978), qualifica a imunidade como uma alta resistência. Seu critério não se baseia no estabelecimento da doença,

mas nos mecanismos que determinam que certas plantas não são hospedeiras, às quais ele denomina de resistentes. Dessa forma, o padrão observado para todas as plantas submetidas à retroinoculação, onde não foi possível recuperar o vírus, pode ser definido como imunidade ou alta resistência, dependendo dos critérios estabelecidos. No presente trabalho, esse tipo de reação foi considerado como imunidade e a tolerância um padrão de suscetibilidade, que pode ser aproveitada em programas de melhoramento, desde que os benefícios compensem os danos que eventualmente possam ser causados.

Nos materiais testados do germoplasma do IAC, todas as progênies e a cv. All Big apresentaram plantas que reagiram com imunidade. Convém esclarecer que as progênies F₃ não sofreram a pré-seleção contra o CMV em F₂. Embora esse resultado seja promissor, devido a imunidade apresentada, outros estudos serão necessários para determinar a herança dessas progênies e verificar a possibilidade de se obter cultivares resistentes ao CMV.

Os materiais cedidos pela empresa Sakata demonstraram um padrão diferente de reação, entre os 18 genótipos testados. Doze foram absolutamente suscetíveis ao CMV, com a presença de sintomas sistêmicos. Os materiais AF-188, AF-1178, AF-98A, AF-99A e AF-136A, embora tenham reagido com ausência total de sintomas, ao serem submetidos à retroinoculação, o vírus foi recuperado, portanto reagiram ao CMV de forma tolerante. Poderão no futuro ser objeto de maiores estudos em programas de melhoramento de pimentão, pois a tolerância tem sido utilizada em vários programas de melhoramento, principalmente quando não se obtém uma cultivar resistente ou imune (Shifriss & Cohen, 1990, Lapidot *et al.*, 1997). O material AF-97A mostrou-se completamente imune ao CMV, não apresentando nenhum sintoma.

Os resultados obtidos são bastante otimistas e poderão permitir a obtenção de uma cultivar de pimentão resistente ao CMV. No entanto, sabe-se que essa não é uma tarefa fácil, pois tem sido perseguida por vários pesquisadores, em diversos países, sem sucesso (Lapidot *et al.*, 1997).

Muitas triagens já apontaram genótipos resistentes, imunes ou tolerantes e cultivares foram desenvolvidas. A resistência genética ao CMV foi encontrada em poucas espécies, e a maioria, respondeu apenas com tolerância variável aos efeitos do vírus. Além disso, foram facilmente superadas por novas estirpes do vírus (Palukaitis *et al.*, 1992, Monma & Sakata, 1997, Lapidot *et al.*, 1997).

8. CONCLUSÕES

- O vírus causador de mosaico, bolhosidade, nanismo, deformação foliar e dos frutos em pimentão, nos diferentes isolados coletados é o CMV, pertencente ao subgrupo I.

- A identificação do CMV e seu subgrupo através de DAS-ELISA com a utilização de anticorpo monoclonal e através de RT-PCR seguido de RFLP com a endonuclease de restrição *MspI*, foram igualmente eficientes e seguras.

- O método utilizado permitiu a purificação do CMV em concentrações satisfatórias para a imunização da galinha e produção de antissoro policlonal com alta especificidade e alto título.

- A triagem de genótipos para a resistência demonstrou que todas as progênies apresentaram plantas que reagiram com imunidade. O genótipo AF-97A, mostrou-se imune ao CMV e os AF-188, AF-1178, AF-98A, AF-99A e AF-136A, mostraram-se tolerantes ao CMV.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARARIPE, D. F. A., LIMA, J. A. A.. Infecção natural do Vírus do Mosaico do Pepino em *Justicia* sp.. *Fitopatologia Brasileira*, v. 18(suplemento), p. 275, 1993.(res.)

ATENCIO, F. A., GRACIA, O., MENDOZA, E. E. A. Detection of subgroups I and II of cucumber mosaic cucumovirus and their satellite RNAs on pepper in Argentina. *Plant Disease*, v. 81, p. 695, 1997.

BADE, H., STEGEMANN, H. Rapid method of extraction of antibodies from hen egg yolk. *Journal of Immunological Methods*, v. 72, p. 421-426, 1984.

BALL, E. M. Microprecipitation and micro-agglutination. In: HAMPTON, R. O., BALL, E. M., DE BOER, S. H. *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens*. Saint Paul: American Phytopathological Society., p. 153-160, 1990.

BALL, E. M., HAMPTON, R. O., DE BOER, S. H., SCHAAD, N. W. Polyclonal antibodies. In: HAMPTON, R. O., BALL, E. M., DE BOER, S. H. *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens*. Saint Paul: American Phytopathological Society., p. 33-54, 1990.

BAR-JOSEPH, M., MALKINSON, M. Hen egg yolk as source of antiviral antibodies in the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): A comparison of two plant viruses. *Journal of Virological Methods*, v. 1, p. 179-183, 1980.

BARRADAS, M. M. Organização de uma coleção de vírus fitopatogênicos em tecido desidratado com cloreto de cálcio. *Biológico*, v. 44, p. 221-230, 1978.

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.

- BOARI, A. J., ZERBINI, F. M., MACIEL-ZAMBOLIM, E., CARVALHO, M. G. Natural occurrence of satellite RNA in isolates of cucumber mosaic virus belonging to subgroup I. *Virus reviews & Research*, v. 2, n^os 1-2, p. 190, 1997.
- BORSARI, P. L., RIVAS, E. B., GALLETI, S. R., DUARTE, L. M. L., ALEXANDRE, M. A. V. *Lisianthus* (*Eustoma grandiflora* (Raf.) Shinn.), espécie ornamental naturalmente infectada pelo vírus do mosaico do pepino (CMV), no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22(suplemento), p. 332, 1997.(res.)
- CANER, J. Doença de vírus em Pimenta do Reino. *O Biológico*, v. 35, p. 185, 1969.
- CANER, J., IKEDA, H. Doença de vírus em cultura de Pimenta do Reino no Estado de São Paulo. *O Biológico*, v. 38, p. 93-94, 1972.
- CANTO, T., PRIOR, D. A. M., HELLWALD, K-H., OPARKA, K. J., PALUKAITIS, P. Characterization of cucumber mosaic virus IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of cucumber mosaic virus. *Virology*, v. 237, p. 237-248, 1997.
- CHAGAS, C. M., COLARICCIO, A., KUDAMATSU, M., LIN, M. T., BRIOSO, P. S. T., KITAJIMA, E. W. Estirpe incomum do vírus do mosaico do pepino (CMV) isolado de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Fitopatologia Brasileira*, v. 9, p. 402, 1984.

CHOMCZYNSKI, P. , SACCHI, N. Single-step of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, v. 162, p. 156-159, 1987.

COLARICCIO, A., EIRAS, M., VICENTE, M., CHAGAS, C. M., HARAKAVA, R. Caracterização parcial do vírus do mosaico do pepino de *Musa* sp. 'Nanicão'. *Fitopatologia Brasileira*, v. 21, p. 268-274, 1996.

COLARICCIO, A., KUDAMATSU, M., CHAGAS, C. M., VEGA, J., CEREDA, E. Possível ocorrência do Vírus do Mosaico do Pepino (CMV) em Maracujá Amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, v. 10, p. 118-119, 1984.

CONVERSE, R., MARTIN, R. Enzyme-linked immunosorbent assay. In: HAMPTON, R. O., BALL, E. M., DE BOER, S. H. *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens*. Saint Paul: American Phytopathological Society. p. 179-204, 1990.

COSTA, A. S. Tornou-se rara a ocorrência do vírus do mosaico do pepino em plantações de alface e tomate no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, v. 9, p. 39 (resumo nº 27), 1983.

COSTA, A. S., ALBUQUERQUE, F. C., IKEDA, H., CARDOSO, M. Moléstias da pimentado-reino causada pelo Vírus do Mosaico do Pepino. *Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuárias do Nordeste (IPEAN) Série: Fitotecnia*, v. 1, p. 3-18, 1970.

COSTA, A. S., KITAJIMA, E. W. Ocorrência de mosaico em milho no Estado de São Paulo, causada pelo Vírus do Mosaico do Pepino. *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*, v. 5, p. 159-160, 1972.

COSTA, A. S., KITAJIMA, E. W., NAGAI, H. Alguns vírus que afetam o pepino (*Cucumis sativus* L.) em São Paulo. *Revista de Oleicultura*, v. 12, p. 100-101, 1972.

COSTA, A. S., ROBBS, C. F. Morte dos ponteiros da baunilha causada pelo Vírus do Mosaico do Pepino. *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*, v. 4, p. 36-37, 1971.

CUEVAS, J. R., NICKLOW, C. W. Cucumber mosaic virus resistance in *Capsicum annuum* L.. *Capsicum Newsletter*, v. 4, p. 48, 1985.

CUPERTINO, F. P., KITAJIMA, E. W., FONSECA, M. E. N., MEYER, M. C. Viroses em plantas olerícolas no Estado de Goiás. *Fitopatologia Brasileira*, v. 13, nº2, p. 101, 1988 (res.).

- DANIELS, J. CAMPBELL, R. N. Characterization of cucumber mosaic virus isolates from California. *Plant Disease*, v. 76, p. 1245-1250, 1992.
- DEVERGNE, J. C., CARDIN, L. Contribution a l'étude du virus de la mosaïque du cocombre (CMV) IV. Essai de classification de plusieurs isolats sur la base de leur structure antigenic. *Ann. Phytopathol.*, v.5, p. 409-430, 1973.
- DHAWAN, P., DANG, J. K., SANGWAN, M. S., ARORA, S. K. Screening of chilli cultivars and accessions for resistance to cucumber mosaic virus and potato virus Y. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, v. 15, p. 55-57, 1996.
- DOGIMONT, C., DAUBEZE, A. M., PALLOIX, A. Expression of resistance to CMV migration in pepper seedlings. *J. Phytopatology*, v. 141, p. 209-216, 1994.
- DOOLITTLE, S. P. A new infectious mosaic disease of cucumber. *Phytopathology*, v.6, p. 145-147, 1916.
- DUARTE, L. M. L., RIVAS, E. B., ALEXANDRE, M. A. V., FERRARI, J. T. Detection of CMV from *Commelinaceae* species. *Fitopatologia Brasileira*, v. 19, p. 248-253, 1994.
- DUSI, A. N., ZAMBOLIM, E. M., GAMA, M. I. C. S., ÁVILA, A. C., GIORDANO, L. B., SANTOS, J. R. M. Ocorrência e caracterização do vírus do mosaico do pepino (CMV) em ervilha. *Fitopatologia Brasileira*, v. 17, p. 286-291, 1992.

EDWARDS, M. C., GONSALVES, D. Grouping of seven biologically defined isolates of cucumber mosaic virus by peptide mapping. *Phytopathology*, v. 73, p. 1117-1120, 1983.

EIRAS, M., COLARICCIO, A., CHAVES, A. L. R. Isolado do vírus do mosaico do pepino obtido de bananeira no Estado de São Paulo pertencente ao subgrupo Ia. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, n. 1, p. 53-59, 2001.

ESPINHA, L. M., GASPAR, J. O. Caracterização parcial do vírus do mosaico do pepino (“cucumber mosaic virus”, CMV) isolado de *Catharantus roseus*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22, p. 209-212, 1997.

ESPINHA, L. M. *Caracterização de um isolado do vírus do mosaico do pepino obtido de Catharantus roseus*. São José do Rio Preto, 1999. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas / Genética)- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista.

FRANCKI, R. I. B., HATTA, T. Cucumber mosaic virus – variation and problems of identification. *Acta Horticulturae*, v. 110, p. 167-174, 1980.

GALLITELLI, D., VOVLAS, C., MARTELLI, G., MONTASSER, M. S., TOUSIGNANT, M. E., KAPER, J. M. Satellite-mediated protection of tomato against cucumber mosaic virus: II. Field tes under natural epidemic conditions in southern Italy. *Plant Disease*, v. 75, p. 93-95, 1991.

GAL-ON, A., KAPLAN, I., ROOSSINCK, M. J., PALUKAITIS, P. The kinetcs of infection of zucchini squash by cucumber mosaic virus indicate a function for RNA 1 in virus movement. *Virology*, v. 205, p. 280-289, 1994.

GERA, A., LOEBENSTEIN, G., RACCAH, B. Protein coats of two strains of cucumber mosaic virus affect transmission by *Aphis gossypii*. . *Phytopathology*, v. 69, p. 396-399, 1979.

GIBBS, A. J., HARRISON, B. D. Cucumber mosaic virus. *CMI/AAB Description of plant viruses*, n° 1, 1970.

HAASE, A., RICHTER, J., RABENSTEIN, F. Monoclonal antibodies for detection and serotyping of cucumber mosaic virus. *Journal of Phytopathology*, v. 127, p. 129-136, 1989.

HAQ, Q. M. R., SINGH, B. P., SRIVASTAVA, K. M. Biological, serological and molecular characterization of a cucumber mosaic virus isolate from India. *Plant Pathology*, v. 45, p. 823-828, 1996.

HOBBS, H. A., EASTBURN, D. M., D'ARCY, C. J., KINDHART, J. D., MASIUNAS, J. B.,
VOEGTLIN, D. J., WEINZIERL, R. A., McCOPPIN, N. K. Solanaceous weeds as
possible sources of *Cucumber mosaic virus* in southern Illinois for aphid transmission to
pepper. *Plant Disease*, v. 84, p. 1221-1224, 2000.

HU, J. S., LI, H. P., BARRY, K., WANG, M., JORDAN, R. Comparison of Dot Blot,
ELISA, and RT-PCR assay for detection of two cucumber mosaic virus isolates infecting
banana in Hawaii. *Plant Disease*, v. 79, p. 902-906, 1995.

HU, J. S., ROCHOW, W. F., DIETERT, R. R. Production and use of antibodies from hen
eggs for the SGV isolate of Barley yellow dwarf virus. *Phytopathology*, v. 75, p. 914-919,
1985.

HULL, R. Purification, biophysical and biochemical characterisation of viruses with especial
reference to plant viruses In: MAHY, B. W. J. *Virology – a practical approach*. Oxford,
Washington, Irl Press, p. 2-24, 1985.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. Série Informações Estatísticas da Agricultura.
São Paulo, v. 12, p. 153-161, 2001.

JAGGER, I. C. Experiments with the cucumber mosaic disease. *Phytopathology*, v. 6, p. 148-
151, 1916.

JENSENIUS, J. C., ANDERSEN, I., HAU, J., CRONE, M., KOCH, C. Eggs: Conveniently packaged antibodies for purification of yolk IgG. *Journal of Immunological Methods*, v. 46, p. 63-68, 1981.

KAPER, J. M., RE, G. C. Redetermination of the RNA content and the limiting RNA size of the three strains of cucumber mosaic virus. *Virology*, v. 60, p. 308-311, 1974.

KAPER, J. M., WATERWORTH, H. E. Cucumovirus. In: *Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis*. Amsterdam: Elsevier, North Holland Biomedical Press. 1981. p. 257-332.

KAPLAN, I. B., GAL-ON, A., PALUKAITIS, P. Characterization of cucumber mosaic virus III. Localization of sequences in the movement protein controlling systemic infection in cucurbits. *Virology*, v. 230, p. 343-349, 1997.

KITAJIMA, E. W., CUPERTINO, F. P., LIN, M. T., ALBUQUERQUE, F. C., HIRAKATA, R. Dados preliminares de um levantamento de viroses de plantas cultivadas na região de Tomé-açu e Belém, PA. *Fitopatologia Brasileira*, v. 5, p. 407, 1980.(res.)

KOBORI, R. F., WIERZBICKI, R., PAVAN, M. A. Caracterização de um isolado de *Cucumber mosaic virus* (CMV) através de hospedeiras diferenciais. *Summa Phytopathologica*, v. 26, p.291, 2000.

KUDAMATSU, M., ALBA, A. P. C., CHAGAS, C. M. Infecção natural de *Salvia splendens* L. (Sálvia) pelo vírus do mosaico do pepino (CMV) em São Paulo. *Summa Phytopathologica*, v. 7, p. 3-4, 1981.

LAPIDOT, M., PARAN, I., BEN-JOSEPH, R., BEN-HARUSH, S., PILOWSKY, M., COHEN, S., SHIFRISS, C. Tolerance to cucumber mosaic virus in pepper: Development of advanced breeding lines and evaluation of virus level. *Plant Disease*, v. 81, p. 185-188, 1997.

LEINZ, V., AMARAL, S. E. Intemperismo. In: *Geologia Geral*. 11° Ed. São Paulo: Editora Nacional, 1989. p. 55-73.

LIMA NETO, V. C., LIMA, M. L. R. Z. C., SOUZA, V. B. V., HAMMERSCHMIDT, I. Levantamento preliminar de viroses de olerícolas na região metropolitana de Curitiba. *Resumos do XXIII Congresso Brasileiro de Olericultura*, 72pp., 1983.

LIMA, J. A. A., SANTOS, C. D. G. Infecção natural de *Phaseolus lunatus* por uma estirpe de “Cucumber mosaic virus” no Ceará. *Fitopatologia Brasileira*, v. 10, p. 304, 1985.

LIN, M. T., NEMOTO, M., KITAJIMA, E. W. Infecção de melão e maxixe por vírus do mosaico da melancia-I e vírus do mosaico do pepino em Presidente Wenceslau, SP. *Resumos do XX Congresso Brasileiro de Olericultura*, 144pp., 1980.

- LIN, M. T., SANTOS, A. A., KITAJIMA, E. W. Host reactions and transmission of two seed-borne cowpea viruses from Central Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 6, p. 193-203, 1981.
- LOT, H., KAPER, J. M. Physical and chemical differentiation of three strains of cucumber mosaic virus and peanut stunt virus. *Virology*, v. 74, p. 209-222, 1976.
- LOT, H., MARROU, J., QUIOT, J. B., ESVAN, C. Contribution a l'étude du virus de la Mosaic du Concombre (CMV). I. Méthode de purification rapide du virus. *Annales de Phytopathologie*, v. 4, p. 25-38, 1972.
- MACIEL-ZAMBOLIM, E., ASSIS, M. I. T., ZAMBOLIM, L., VENTURIA, J. A., CARVALHO, M. G. Infecção natural da bananeira cultivar 'Prata' (AAB) pelo vírus do mosaico do pepino no Estado de Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, v. 19, p. 483-484, 1994.
- MACIEL-ZAMBOLIM, E., CARVALHO, M. G., MATSUOKA, K. Caracterização parcial do vírus do mosaico do pepino isolado de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*). *Fitopatologia Brasileira*, v. 15, p. 220-225. 1990.

- MACIEL-ZAMBOLIM, E., CARVALHO, M. G., VENTURA, J. A. Infecção natural da pimenta-do-reino pelo vírus do mosaico do pepino no Estado do Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira*, v. 12, p. 158, 1981.(res.)
- MALDONADO, V. O cultivo do pimentão. *Cultivar*, v. 5, p. 23-25, 2001.
- MARTELLI, G. P., RUSSO, M. The use of thin sectioning for visualization and identification of plant viruses. In: MARAMOROSCH, K. & KOPROWSK, H. (eds). *Methods in Virology*. New York, Academic Press, p. 143-192, 1984.
- MATTHEWS, R. E. F. *Plant Virology*. 3° Ed. San Diego, California: Academic Press, 1991. 835p.
- MEDEIROS, A. G. Nota sobre a ocorrência de mosaico em bananeiras no Estado de Pernambuco. *Boletim Técnico Instituto de Pesquisa Agropecuária (Recife)*, v. 4, p. 1-13, 1963.
- MONMA, S., SAKATA, Y. Screening of *Capsicum* accessions for resistance to cucumber mosaic virus. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, v. 65(4), p. 769-776, 1997.
- MONTASSER, M. S., TOUSIGNANT, M. E., KAPER, J. M. Satellite- mediated protection of tomato against cucumber mosaic virus: I. Greenhouse experiments and simulated epidemic conditions in the field. *Plant Disease*, v. 75, p. 86-92, 1991.

MOREIRA, E. S. *Caracterização molecular parcial e localização subcelular de um isolado brasileiro do vírus do mosaico do feijoeiro do sul dos EUA*. São José do Rio Preto, 2001. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas / Genética)- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista.

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

NG, J. C. K., LIU, S., PERRY, K. L. Cucumber mosaic virus mutants with altered physical properties and defective in aphid vector transmission. *Virology*, v. 276, p. 395-403, 2000.

NÓBREGA, N. R. Uma doença de vírus em Orquídea. *O biológico*, v. 13, p. 62, 1947.

NONO-WOMDIM, R., GÉBRÉ-SELASSIE, K., PALLOIX, A., POCHARD, E., MARCHOUX, G. Study of multiplication of cucumber mosaic virus in susceptible and resistant *Capsicum annum* lines. *Ann. Appl. Biol.*, v. 122, p. 49-56, 1993a.

NONO-WOMDIM, R., MARCHOUX, G., POCHARD, E., PALLOIX, A., GÉBRÉ-SELASSIE, K. Resistance of pepper lines to the movement of Cucumber Mosaic Virus. *J. Phytopathology*, v. 132, p. 21-32, 1991.

- NONO-WOMDIM, R., PALLOIX, A., GÉBRÉ-SELASSIE, K., MARCHOUX, G. Partial resistance of bell pepper to cucumber mosaic virus movement within plants: Field evaluation of its efficiency in southern France. *J. Phytopathology*, v. 137, p. 125-132, 1993b.
- OWEN, J., PALUKAITIS, P. Characterization of cucumber mosaic virus. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology*, v. 166, p. 495-502, 1988.
- OWEN, J., SHINTAKU, M., AESCHLEMAN, P., TAHAR, S. B., PALUKAITIS, P. Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA 3. *J. Gen. Virology*, v. 71, p. 2243-2249, 1990.
- PALUKAITIS, P., ROOSSINCK, M. J., DIETZGEN, R. G., FRANCKI, R. I. B. Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research*, v. 41, p. 281-348, 1992.
- PARES, R. D., GUNN, L. V. The role of non-vectored soil transmission as a primary source of infection by Pepper mild mottle and Cucumber mosaic viruses in glasshouse-grown capsicum in Australia. *J. Phytopathology*, v. 126, p. 353-360, 1989.
- PASKO, P. J., NICKLOW, C. W., MOORMAN, G. W. Screening for resistance to cucumber mosaic virus in peppers (*Capsicum* spp.) and factors involved in CMV transmission. *HortScience*, v. 17:3, p. 502, 1982.

PATTERSON, R., YOUNGNER, J. S., WEIGLE, W. O., DIXON, F. J. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *Journal Immunological Methods*, v. 89, p. 272-278, 1962.

PERRY, K. L., HABILI, N., DIETZGEN, R. G. A varied population of cucumber mosaic virus from peppers. *Plant pathology*, v. 42, p. 806-810, 1993.

PERRY, K. L., ZHANG, L., PALUKAITIS, P. Amino acid changes in the coat protein of cucumber mosaic virus differentially affect transmission by the aphids *Mysus persicae* and *Aphis gossypii*. *Virology*, v. 242, p. 204-210, 1998.

PIAZZOLA, P., DIAZ-RUIZ, J. R., KAPER, J. M. Nucleic acid homologies of eighteen cucumber mosaic virus isolates determined by competition hybridization. *J. Gen. Virol.*, v. 45, p. 361-369, 1979.

PIAZZOLA, P., PALMIERI, F., NUZZACI, M. Infectivity studies on Cucumber mosaic virus treated with a clay material. *J. Phytopathology*, v. 127, p. 291-295, 1989.

POLSON, A. , Von WECHMAR, M. B. Isolation of viral antibodies from yolks of immunized hens. *Immunological Communications*, v. 9(5), p. 475-493, 1980.

QUEMADA, H., KEARNEY, C., GONSALVES, D., SLIGHTOM, J. Nucleotide sequence of coat protein genes and flanking regions of cucumber mosaic virus strains C and WL RNA 3. *J. Gen. Virol.*, v. 70, p. 1065- 1073, 1989.

RIBEIRO, M. I. S. D., RIBEIRO, R. L. D., MAIOLINO, W., ROBBS, C. F. Nota sobre a ocorrência de uma forma severa de “Mosaico” em bananais do Estado do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*, v. 06/07/08, p. 26-28, 1975.

RISHI, N., DHAWAN, P. Characterization and identification of viruses causing mosaic diseases of *Capsicum* in nature. *Indian Phytopathology*, v. 42, nº 2, p. 221-226, 1989.

RIZOS, H., GUNN, L. V., PARES, R. D., GILLINGS, M. R. Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.*, v. 73, p. 2099-2103, 1992.

RODRIGUES, M. C. R., KITAJIMA, E. W., LIN, M. T. Manchas anulares em alamanda associadas à infecção pelo vírus do mosaico do pepino. *Fitopatologia Brasileira*, v. 9, p. 151-154, 1984.

RUSSEL, G. E. Resistance to virus disease. In: *Plant Breeding for pest and disease resistance*. Londres: Butterworth & Co, 1978. p. 209-229.

SHARMA, O. P., SINGH, J. Reaction of different genotypes of pepper to cucumber mosaic and tobacco mosaic viruses. *Capsicum Newsletter*, v. 4, p. 47, 1985.

SHIFRISS, C., COHEN, S. Resistance to cucumber mosaic virus (CMV) and linkage with small fruit size. *Capsicum Newsletter*, v. 5, p. 48, 1986.

SHIFRISS, C., COHEN, S. Test for resistance to cucumber mosaic virus (CMV) in *Capsicum annuum* L. germoplasma. *Capsicum Newsletter*, v. 8-9, p. 52-53, 1990.

SILBERSCHMIDT, K. *Asclepias curassavica*, a natural host of cucumber mosaic virus in Brazil. *Plant Disease Reporter*, v. 39, p. 555-557, 1955.

SILBERSCHMIDT, K. Feijoeiro com doença de vírus. *O Biológico*, v. 29, p. 117, 1963.

SILBERSCHMIDT, K., FLORES, E. A interação do vírus causador da “Clorose Infecciosa” das malváceas com o vírus X da batatinha, o vírus do mosaico do fumo ou o vírus do mosaico do pepino em tomateiro. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 34, p. 125-149, 1962.

SILBERSCHMIDT, K., NÓBREGA, N. R. Sobre uma doença de vírus da bananeira. *O Biológico*, v. 7, p. 216-219, 1941.

SINGH, Z., JONES, R. A. C., JONES, M. G. K. Identification of cucumber mosaic virus subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. *Plant Disease*, v. 79, p. 713-716, 1995.

SIVIERO, P., GALLERANI, P. La coltivazione del peperone. Verona: L'Informatore Agrario, 1992. 217p.

SMITH, D. B., DAVIS, R. F. Identification of cucumber mosaic virus from *Vinca minor* in New Jersey. *Plant Disease*, v. 70, p. 1056-1059, 1986.

SOMERVILLE, P. A., CAMPBELL, R. N., HALL, D. H., ROWHANI, A. Natural infection of potatoes (*Solanum tuberosum*) by a legume strain of cucumber mosaic virus. *Plant Disease*, v. 71, p. 18-20, 1987.

SUDARSONO, N., SARI, C. L. N., SUSENO, R. Response of ten hot pepper lines to infection of CMV or PVY. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, v. 17, p. 57-60, 1998a.

SUDARSONO, N., SUSENO, R. Mixed infection among TMV, PVY, and CMV I: Yield of three hot pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, v. 17, p. 53-56, 1998b.

SUZUKI, M., KUWATA, S., KATAOKA, J., MASUTA, C., NITTA, N., TAKANAMI, Y.

Functional analysis of deletions mutants of cucumber mosaic virus RNA 3 using an 'in vitro' transcription system. *Virology*, v. 183, p. 106-113, 1991.

TEWARI, V. P., VISWANATH, S. N. Breeding for multiple virus resistance in red pepper

(*Capsicum annuum* L.). *Capsicum Newsletter*, v. 5, p. 49, 1986.

TÓBIÁS, I., MAAT, D. Z., HUTTINGA, H. Two hungarian isolates of cucumber mosaic

virus from sweet pepper (*Capsicum annuum*) and melon (*Cucumis melo*): identification and antiserum preparation. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, v. 88, p. 171-183, 1982.

UEMACHI, T., WATANABE, H., YAZAWA, S. Emergence of vigorous-growing lateral

shoots from a CMV-infected plant of *Capsicum frutescens* L. found on a subtropical island in Japan. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, v. 14, p. 56-59, 1995.

van REGENMORTEL, M. H. V., FAUQUET, C. M., BISHOP, D. H. L., CARSTENS, E. B.,

ESTES, M. H., LEMON, S. M., MANILOFF, J., MAYO, M. A., MCGEOCH, D. J., PRINGLE, C. R., WICKNER, R. B. *Virus Taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, 2000. 1162p.

VARVERI, C., BOUTSIKA, K. Characterization of cucumber mosaic cucumovirus isolates

in Greece. *Plant Pathology*, v. 48, p. 95-100, 1999.

- WAHYUNI, W. S., DIETZGEN, R. G., HANADA, K., FRANCKI, R. I. B. Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of cucumber mosaic virus. *Plant Pathology*, v. 41, p. 282-297, 1992.
- WU, G., KANG, L., TIEN, P. The effect of satellite RNA on cross-protection among cucumber mosaic virus strains. *Ann. Appl. Biol.*, v. 114, p. 489-496, 1989.
- WYLIE, S., WILSON, C. R., JONES, R. A. C., JONES, M. G. K. A polymerase chain reaction assay for cucumber mosaic virus in lupin seeds. *Aust. J. Agric. Res.*, v. 44, p. 41-51, 1993.
- XUE, B., GONSALVES, C., PROVVIDENTI, R., SLIGHTOM, J. L., FUCHS, M., GONSALVES, D. Development of transgenic tomato expressing a high level of resistance to cucumber mosaic virus strains of subgroup I and II. *Plant Disease*, v. 78, p. 1038-1041, 1994.
- YANG, Y., KIM, K. S., ANDERSON, E. J. Seed transmission of cucumber mosaic virus in spinach. *Phytopathology*, v. 87, p. 924-931, 1997.
- YARWOOD, C. E. Sulphite in plant virus inoculations. *Virology*, v. 39, p. 74-78, 1969.

YAZAWA, S., UEMACHI, T., HIGASHIDE, T., WATANABE, H. CMV resistance developed in vigorous-growing lateral shoots from virus infected plants of *Capsicum annuum* L.. *Scientia Horticulturae*, v. 65, p. 295-304, 1996.