

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

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE VÍRUS  
PERTENCENTES AO GÊNERO *Tobamovirus* PROVENIENTES DE *Capsicum annuum* L.**

**MÁRCIA APARECIDA CEZAR**

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

Janeiro – 2003

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

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE VÍRUS  
PERTENCENTES AO GÊNERO *Tobamovirus* PROVENIENTES DE *Capsicum annuum* L.**

**MÁRCIA APARECIDA CEZAR**

*Orientador:* **Dr<sup>a</sup>. Renate Krause Sakate**

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

Janeiro – 2003

À **DEUS**, pela **Sua** constante presença em todos os momentos de minha vida e pela realização deste trabalho

### **AGRADEÇO.**

Aos meus amados pais **Luiz e Ana**, pelo amor insubstituível, incentivo constante e educação exemplar, que me são dedicados.

### **OFEREÇO.**

Ao meu querido e saudoso avô **Felisberto Mariano de Souza** (*in memorian*), pelo seu exemplo de vida.

### **MINHA HOMENAGEM.**

Ao meu irmão **Marcelo Donizete Cezar** e à minha cunhada, **Danielle Cezar**, e às minhas queridas sobrinhas **Marcela, Grace e Millena** pelo amor, incentivo e amizade.

### **DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu**, pela oportunidade de realização do curso.

À **Dr<sup>a</sup> Renate Krause Sakate** pela orientação, apoio, companheirismo e acima de tudo a amizade.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan** pela orientação, confiança, apoio, e amizade.

À **minha família e meus amigos** pela confiança em mim depositada e pelo incentivo e estímulo sempre dedicados.

A **Rômulo Fujito Kobori**, pelo incentivo, e disponibilização de materiais para realização do trabalho.

Aos **Professores Antonio Carlos Maringoni, Nilton Luiz de Souza e Édson Luiz Furtado** pelos ensinamentos, apoio e colaboração.

Aos **Funcionários José Martins Dias, Maria de Fátima Almeida Silva, Norberto Vaz de Carvalho, Paulo Roberto Rodrigues, Vera Lúcia da Silva Mendes** e as estagiárias **Ana Carolina e Karina Fattori** pela amizade e colaboração.

À **CAPES** pela concessão de bolsa de estudos.

À grande amiga **Márcia Michelle Queiroz Ambrósio** pela força, apoio, incentivo e amizade durante todos os momentos.

A **Luciano Quaglia**, pela amizade, apoio, e incentivo constantes.

Aos amigos do curso de pós-graduação **Paulo Rogério Parente, César Júnior Bueno, Desiré Frangioni, Renata Nunes Soares, Luana Mezzena, Alnusa Maria de Jesus, Rosana Sambugaro, Cristiane Aparecido Ceriani, Denise Nakada Nozaki, Márcia de Moraes Echer, Juliano César da Silva, Viviane Lara Biazon, Deine Azambuja, Adriana Salomão Jadão, Priscila Silvério, Daniel Dias Rosa, Ana Paula Lombardi, Juliana Sodário e Ricardo Ferrari Silva** pela companhia e incentivo.

Aos **funcionários** da Biblioteca da Faculdade de Ciências Agronômicas pela gentileza e disposição.

A **todos** que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>IX</b>
<b>1) RESUMO.....</b>	<b>1</b>
<b>2) SUMMARY.....</b>	<b>3</b>
<b>3) INTRODUÇÃO.....</b>	<b>5</b>
<b>4) REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>8</b>
4.1) Aspectos gerais do gênero <i>Tobamovirus</i> .....	8
4.2) Sintomatologia.....	10
4.3) Transmissão.....	11
4.4) Caracterização biológica.....	13
4.5) Identificação molecular.....	15
<b>5) MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
5.1) Localização do experimento.....	17

5.2) Coleta de isolados de tobamovírus em pimentão e pimenta.....	17
5.3) Caracterização biológica, sorológica e identificação molecular dos isolados.....	18
5.3.1) Teste sorológico.....	18
5.3.2) Isolamento e caracterização biológica.....	19
5.3.3) Microscopia eletrônica.....	21
5.3.4) Manutenção dos isolados virais “in vivo” e “in vitro” .....	21
5.3.5) Extração do RNA.....	22
5.3.6) Amplificação por transcrição reversa/reação de polimerização em cadeia (RT-PCR).....	23
<b>6) RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
6.1) Teste sorológico.....	25
6.2) Isolamento biológico.....	25
6.3) Microscopia eletrônica.....	27
6.4) Caracterização biológica.....	27
6.5) Identificação molecular.....	32

<b>7) CONCLUSÕES.....</b>	<b>37</b>
<b>8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>33</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figuras</b>	<b>Página</b>
1. Morfologia da partícula viral de um tobamovírus.....	8
2. Organização do genoma de um tobamovírus.....	9
3. Sintomas de lesões locais em plantas de <i>N. glutinosa</i> inoculadas com: A: PMMoV e B: ToMV.....	26
4. Sintoma sistêmico exibido em planta de <i>N. clevelandii</i> , aos 21 dias após inoculação com tobamovírus.....	26
5. Microscopia eletrônica de extrato foliar de <i>N. clevelandii</i> , multiplicadora de tobamovírus.....	27
6. Sintoma sistêmico exibido <i>C. annuum</i> cv. Magda L <sup>+</sup> L <sup>+</sup> , aos 11 dias após a inoculação com o isolado Pe-01 caracterizado como P <sub>1-2</sub> .....	29
7. Sintoma sistêmico exibido <i>C. frutescens</i> cv. Tabasco L <sup>2</sup> L <sup>2</sup> , aos 21 dias após a inoculação com o isolado Pe-12 caracterizado como P <sub>1-2</sub> .....	29
8. Reação de lesões locais em <i>C. chinense</i> PI-159236 L <sup>3</sup> L <sup>3</sup> , aos 5 dias após a inoculação com o isolado Pe-12 caracterizado como P <sub>1-2</sub> .....	30
9. Reação de lesões locais em <i>C. chacoense</i> PI-260429 L <sup>4</sup> L <sup>4</sup> , aos 5 dias após a inoculação com o isolado Pe-12 caracterizado como P <sub>1-2</sub> .....	30

10. Sintoma sistêmico exibido <i>C. annuum</i> cv. ECW L <sup>+</sup> L <sup>+</sup> , aos 21 após a inoculação com o isolado Pe-02 caracterizado biologicamente como P <sub>0</sub> .....	31
11. Reação de lesões locais em <i>C. annuum</i> cv. Tisana L <sup>1</sup> L <sup>1</sup> , aos 5 após a inoculação com o isolado Pe-02 caracterizado biologicamente como P <sub>0</sub> .....	32
12. Padrão eletroforético obtido pelos oligonucleotídeos Tob-Uni 1 e Tob-Uni 2 em RT-PCR.....	33
13. Detecção específica via RT-PCR de isolados de ToMV, utilizando os oligonucleotídeos Tob-Uni 1 e ToMV.....	34
14. Detecção específica via RT-PCR de isolados de TMV, utilizando os oligonucleotídeos Tob-Uni 1 e TMV.....	34
15. Detecção específica via RT-PCR de isolados de PMMoV, utilizando os oligonucleotídeos Tob-Uni 1 e PMMoV.....	35

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro</b>	<b>Página</b>
1. Interação de espécies de tobamovírus com genótipos de <i>Capsicum</i> spp.....	14
2. Relação dos isolados de tobamovírus coletados a partir de plantas de pimentão e pimenta.....	18
3. Relação e reação de genótipos diferenciais de <i>Capsicum</i> spp utilizados para a caracterização biológica de vírus pertencentes ao gênero <i>Tobamovirus</i> .....	20
4. Seqüência nucleotídica dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR.....	23
5. Reação de genótipos diferenciais de <i>Capsicum</i> spp inoculados com isolados de tobamovírus de pimentão.....	28

## 1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar isolados de tobamovírus coletados em campos de produção comercial de pimentão e pimenta nas regiões de Lins, Sorocaba e Salto, Estado de São Paulo.

A coleção de isolados foi submetida a testes sorológicos utilizando-se antissoros policlonais para o ToMV e PMMoV e em seguida à purificação biológica por meio de lesões monolesionais em *Nicotiana glutinosa*, onde algumas das lesões foram transferidas para *Nicotiana cleavelandi*, hospedeira multiplicadora de tobamovírus. Os isolados foram mantidos em plantas de *Nicotiana cleavelandi* por meio de sucessivas passagens mecânicas. Os isolados foram inoculados em uma série diferencial de *Capsicum* spp: *C. annuum* cv. ECW (L<sup>+</sup>L<sup>+</sup>); *C. annuum* cv. Magda (L<sup>+</sup>L<sup>+</sup>); *C. annuum* cv. Tisana (L<sup>1</sup>L<sup>1</sup>); *C. frutescens* cv. Tabasco (L<sup>2</sup>L<sup>2</sup>); *C. chinense* PI 159236 (L<sup>3</sup> L<sup>3</sup>); *C. chacoense* PI 260429 (L<sup>4</sup>L<sup>4</sup>). Foram inoculados três plantas de cada genótipo diferencial no estágio de primeira folha verdadeira e estas avaliadas durante 21 dias.

Realizou-se a identificação molecular destes isolados utilizando-se oligonucleotídeos universais e específicos para as espécies de TMV, ToMV e PMMoV em reação de RT-PCR de uma só etapa, utilizando-se a transcriptase reversa *AMV* e a *Taq* DNA polimerase. A especificidade dos oligonucleotídeos foi inicialmente avaliada por meio de comparação da seqüência nucleotídica dos oligonucleotídeos com a do genoma de espécies de tobamovírus disponíveis no Genbank.

O teste biológico confirmou a presença de tobamovírus nas amostras coletadas a partir de pimentão e pimenta, entretanto não permitiu diferenciar as espécies de vírus presentes. De acordo com os resultados obtidos através da inoculação dos isolados em genótipos diferenciais, observou-se que os isolados Pe-01, Pe-03, Pe-05 e Pe-12 foram caracterizados como pertencentes ao patótipo P<sub>1-2</sub>. O isolado Pe-08 foi caracterizado como patótipo P<sub>1</sub> e os isolados Pe-02, Pe-04, Pe-06, Pe-07, Pe-09, Pe-10, Pe-11 e Pe-13 como sendo do patótipo P<sub>0</sub>.

Pela detecção molecular os isolados Pe-06, Pe-07, Pe-09, Pe-10 e Pe-13 foram identificados como sendo da espécie ToMV de tobamovírus, enquanto que os isolados Pe-01, Pe-03, Pe-05, Pe-12 da espécie PMMoV. O isolado Pe-08, mesmo após a purificação biológica a partir de monolesionais foi identificado tanto pelos oligonucleotídeos específicos de TMV e de ToMV, indicando a presença de infecção mista. Todos os isolados testados foram positivos para os oligonucleotídeos universais, entretanto os isolados Pe 02, Pe-04 e Pe-11 não puderam ser identificados por nenhum dos oligonucleotídeos específicos de TMV, TMoV ou PMMoV. Duas hipóteses podem explicar este resultado: estes isolados podem tratar-se de uma outra espécie de tobamovírus ou de estirpes de TMV, TMoV ou PMMoV que apresentem uma grande diferença de nucleotídeos na região de anelamento dos oligonucleotídeos impossibilitando a sua detecção por estes .

BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF VIRUS BELONGING TO THE *TOBAMOVIRUS* GENUS ISOLATED FROM *Capsicum annuum* L. Botucatu, 2003. p.42  
Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: MÁRCIA APARECIDA CEZAR

Adviser: RENATE KRAUSE SAKATE

## 2 SUMMARY

The objective of this work was to characterize virus isolates belonging to the *Tobamovirus* genus collected from commercial sweet and hot peppers fields surrounding the cities of Lins, Sorocaba and Salto, São Paulo State.

The collection of isolates was subjected to serological detection using ToMV and PMMoV antiserums, followed by single local lesion passages in *Nicotiana glutinosa*. Some of the local lesion isolates were selected and inoculated in *Nicotiana cleavelandi* plants, a propagative host of tobamoviruses. The isolates were maintained in *Nicotiana cleavelandi* plants through successive sap-inoculations. These isolates were further inoculated on the differential genotypes of *Capsicum* spp: *C. annuum* cv. ECW (L<sup>+</sup>L<sup>+</sup>); *C. annuum* cv. Magda (L<sup>+</sup>L<sup>+</sup>); *C. annuum* cv. Tisana (L<sup>1</sup>L<sup>1</sup>); *C. frutescens* cv. Tabasco (L<sup>2</sup>L<sup>2</sup>); *C. chinense* PI 159236 (L<sup>3</sup> L<sup>3</sup>); *C. chacoense* PI 260429 (L<sup>4</sup>L<sup>4</sup>). Three plants of each differential genotypes were inoculated at the first leaf stage, and evaluated during 21 days.

The same isolates were submitted to the molecular identification using degenerated and specific primers for the TMV, ToMV and PMMoV species, in a one step RT-PCR protocol, using the *AMV* reverse transcriptase and the *Taq* DNA polymerase. The specificity of the primers were first evaluated by a nucleotide sequence alignment of the primers with the sequence of the genome of tobamovirus disposable in the Genbank.

The biological test has confirmed the presence of tobamovirus in the sweet pepper and hot pepper samples, but could not differentiate the species of virus. Using the differential genotypes of *Capsicum* spp, the isolates Pe-01, Pe-03, Pe-05 and Pe-12 could

be classified as belonging to the P<sub>1-2</sub> pathotype. The isolate Pe-08 belongs to the P<sub>1</sub> and Pe-02, Pe-04, Pe-06, Pe-07, Pe-09, Pe-10, Pe-11 and Pe-13 as P<sub>0</sub> pathotype.

By the RT-PCR the isolates Pe-06, Pe-07, Pe-09, Pe-10 and Pe-13 could be detected as ToMV and the isolates Pe-01, Pe-03, Pe-05 and Pe-12 as PMMoV. The isolate Pe-08 was detected by the TMV and ToMV primers indicating the presence of mixed infections after the single local lesion passages.

All the isolates were positive for the universal primers, but Pe-02, Pe-04 and Pe-11 could not be detected by any one of the specific primers of TMV, ToMV and PMMoV. Two hypotheses could explain this result: these isolates are strains of another species of tobamovirus or they are strains of TMV, TMoV or PMMoV with a high divergence of the nucleotide sequence that did not permit their detection by the specific primers.

---

Keywords: *Tobamovirus*, *biological*, *molecular*, *characterization*, *Capsicum annuum*.

### 3 INTRODUÇÃO

O pimentão (*Capsicum annum* L.), tipicamente de origem americana pertence à família das solanáceas, ocorrendo formas silvestres desde o Sul dos Estados Unidos até o Norte do Chile. O ciclo da cultura da sementeira até o início da colheita de frutos verdes é de 100-110 dias (Filgueira, 2000).

Os frutos do pimentão podem apresentar diferentes cores, tamanhos e formatos, sendo consumidos na forma de saladas, molhos, condimentos, recheados e em conservas. O gênero *Capsicum* ocupa uma posição importante no consumo brasileiro de hortaliças, destacando-se entre as dez hortaliças de maior consumo, tanto em valor quanto em volume comercializado. Seu cultivo pode ser em condições de ambiente protegido ou campo aberto, que neste caso representa a maior área ocupada no Brasil, amplamente cultivado, dessa forma em todo o território nacional, sendo os estados de São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro e estados da região Nordeste responsáveis pela maior parcela da produção (Maldonado, 2001).

Segundo dados do Anuário da Agricultura Brasileira (2002), o volume comercializado no CEAGESP de pimentão para o ano de 2001 foi de um total de 35.079 toneladas, sendo 23.212 toneladas só de frutos verdes.

Dentre as enfermidades que ocorrem na cultura do pimentão, as de origem viral representam atualmente um dos mais sérios problemas para a cultura. Mundialmente mais de 50 diferentes vírus distribuídos em 13 gêneros têm sido relatados como agentes de enfermidades em plantas de pimentão. No Brasil foram relatados como patógenos



da cultura cerca de nove vírus, pertencente aos gêneros *Cucumovirus*, *Geminivirus*, *Luteovirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus*, e às famílias virais *Bunyaviridae* e *Potyviridae* (Brioso, 1996). Devido ao manejo constante requerido pela cultura, como transplante, desbrota, amarrão e pulverizações, os vírus do gênero *Tobamovirus* tornam-se muito importantes para a cultura do pimentão, principalmente em condições de cultivo protegido, devido às características destes vírus de serem transmitidos por contato entre plantas e ferramentas contaminadas e permanecerem por longos períodos em restos de plantas no solo.

O *Tobacco mosaic virus* (TMV), que é a espécie tipo do gênero *Tobamovirus* (van Regenmortel et al. 2000) e o *Tomato mosaic virus* (ToMV) que também é membro deste gênero, podem causar enfermidades na cultura do pimentão, porém sua ocorrência é de forma esporádica, pois a grande maioria de cultivares e híbridos de pimentão comercializados presentes no mercado, possuem genes de resistência já incorporados para estes vírus (Boukema, 1984).

Recentemente foi relatada no Brasil, a ocorrência do *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) em híbridos comerciais provenientes do exterior, cultivados sob estufa (Kobori et al., 2001). O PMMoV é um membro do gênero *Tobamovirus* e é muito próximo das espécies anteriormente citadas, sendo considerado um dos vírus mais destrutivos da cultura do pimentão sob condições de cultivo protegido na Europa, devido a sua capacidade de infectar cultivares de pimentão resistentes ao TMV e ToMV (Garcia-Luque et al., 1990).

A identificação e caracterização de tobamovírus em pimentão têm sido feita tradicionalmente por meio de antissoros policlonais e através da inoculação dos isolados em genótipos diferenciais de *Capsicum* spp que apresentam genes de resistência a tobamovírus (Boukema, 1984). Baseado na capacidade de um isolado de tobamovírus em contornar os genes de resistência  $L_1$ ,  $L_2$  e  $L_3$  este é classificado em patótipo  $P_1$ ,  $P_{1-2}$  e  $P_{1-2-3}$ , respectivamente, e  $P_0$  quando o isolado somente infecta cultivares sem genes de resistência (Boukema, 1984).

Oligonucleotídeos universais e específicos também já foram publicados e utilizados por diferentes autores permitindo a detecção via transcrição reversa (RT) e reação de polimerização em cadeia (PCR) de isolados de vírus do gênero *Tobamovirus* (Tenllado et al., 1994; Ryu & Park, 1995; Lestchert et al., 2002).

Deste modo, o presente trabalho teve por objetivos caracterizar biologicamente isolados de vírus pertencentes ao gênero *Tobamovirus* coletados a partir de plantas de pimentão e pimenta e realizar a sua identificação por meio de RT-PCR utilizando oligonucleotídeos universais específicos para as espécies de TMV, ToMV e PMMoV.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Aspectos gerais do gênero *Tobamovirus*

Os vírus que compõem o gênero *Tobamovirus* apresentam morfologia alongada, cilíndrica e rígida com aproximadamente 300 a 310 nm de comprimento e 18 nm de diâmetro, com uma cavidade central de simetria helicoidal (Figura 1). Os vírions podem formar corpos cristalinos visíveis ao microscópio de luz (van Regenmortel et al., 2000).

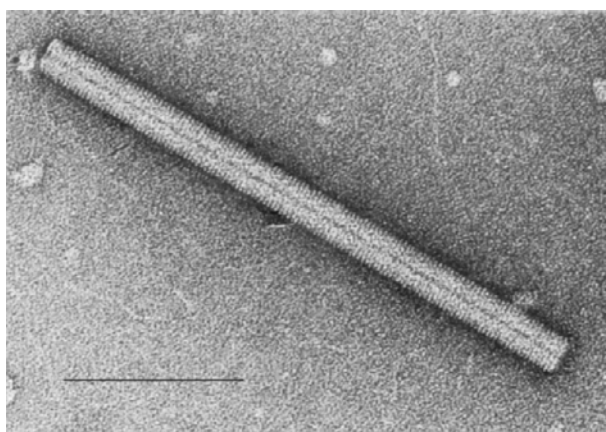


Figura 1: Morfologia da partícula viral de um tobamovírus (van Regenmortel et al., 2000).

O ácido nucléico é constituído por uma molécula simples de RNA de polaridade positiva, com aproximadamente 6395 nucleotídeos. O RNA possui quatro fases abertas de leitura ou ORFs (Open Reading Frames), compreendendo quatro proteínas: a replicase viral de 126 kDa e 183 kDa, a proteína de movimento (MP) de 30 kDa, que é requerida para o movimento célula-a-célula e a proteína capsidial (CP) de 17,5 kDa, que também é necessária para o movimento a longa distância, como ilustrado na Figura 2.

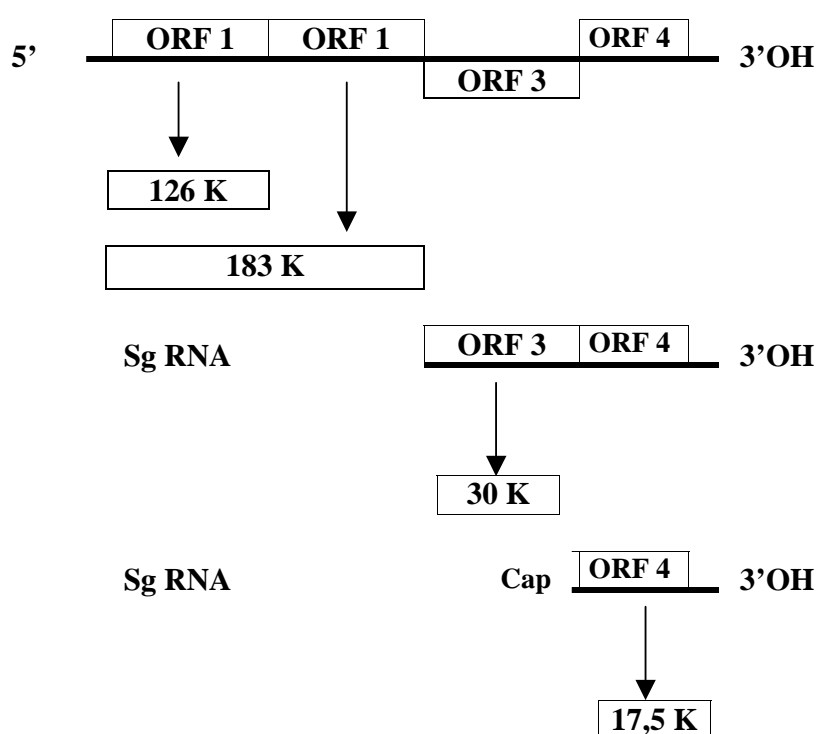


Figura 2: Organização do genoma de um tobamovírus. O RNA viral está indicado pelas suas extremidades 5'e 3'. CP: capa protéica; MP proteína de movimento (adaptado de van Regenmortel et al., 2000).

Uma importante característica, é que as espécies dentro deste gênero são altamente estáveis podendo permanecer infectivas num período de 30, 500 e 3000 dias, variando de acordo com a espécie. Partículas virais são constituídas de 5% de ácido nucléico e 95% de proteínas, não apresentando lipídeos em sua composição. Os vírions são encontrados

no citoplasma em todas as partes da planta hospedeira, e podem formar agregados, denominados inclusões do tipo cristais, que são os corpos X, os quais contém os vírions (van Regenmortel et al., 2000).

O TMV é a espécie-tipo do gênero *Tobamovirus* e agente causal do mosaico do fumo, descrita com detalhes e transmitida experimentalmente em plantas de *Nicotiana tabacum* pela primeira vez por Mayer (1886). Até pouco tempo atrás, espécies diferentes dentro do gênero *Tobamovirus* eram denominadas de estirpes de TMV. Os critérios utilizados pelo ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) para demarcação de espécies dentro do gênero *Tobamovirus* são similaridade de seqüência, onde homologia de seqüência nucleotídica do genoma completo inferior a 90% indica tratar-se de uma nova espécie; gama de hospedeiro e relacionamento antigênico (van Regenmortel et al., 2000). Deste modo, diferentes espécies são hoje reconhecidas pelo ICTV.

Os tobamovírus relatados que infectam o pimentão são TMV – *Tobacco mosaic virus*; ToMV – *Tomato mosaic virus*; PMMoV – *Pepper mild mottle virus*; PaMMV – *Paprika mild mottle virus*, TMGMV – *Tobacco mild green mosaic virus* e ObPV – *Obuda pepper virus* (Garcia-Luque et al., 1993; van Regenmortel et al., 2000).

## 4.2 Sintomatologia

A sintomatologia ocasionada pelos vírus do gênero *Tobamovirus* em plantas de pimentão pode variar, dependendo do genótipo de *Capsicum* spp e da espécie do vírus, influenciando conseqüentemente o desenvolvimento vegetativo e a produção (Tanzi et al., 1986.).

Os sintomas causados pelo TMV em pimentão são sintomas foliares de mosqueado e afilamento foliar, assim como deformação de frutos (Nagai, 1984; Nuez et al., 1996). No caso do ToMV, os sintomas podem ser semelhantes aos ocasionados pelo TMV dependendo do cultivar, podendo apresentar um estriado pardo na haste e ramos, seguido de necrose foliar e abscisão de folhas (Nuez et al., 1996), enquanto que para o PMMoV, os sintomas consistem em um mosaico suave e generalizado ocorrendo entre as nervuras das folhas, podendo ser mais aparente nas folhas apicais, seguido do aparecimento de manchas ou estrias necróticas no caule, queda de folhas e nanismo, entretanto são mais evidentes e severos

nos frutos, levando à redução do tamanho, abortamentos de sementes e deformações, assim como manchas cloróticas irregulares que às vezes podem se tornar necróticas (Gebre-Selassie et al., 1981; Cuadrado-Gómez, 1994; Nuez et al., 1996). No campo, a infecção pode atingir 100% da produção, reduzindo a produtividade e rendimento dos frutos, depreciando dessa forma o produto (van Regenmortel et al., 2000).

A infecção ocasionada por alguns vírus como o TMV e ToMV (Betti et al., 1986), pode acarretar a resposta de hipersensibilidade em alguns cultivares de pimentão ou pimenta. A reação de hipersensibilidade é uma resposta celular extrema por parte da planta, que resulta na morte repentina de um número limitado de células do hospedeiro, podendo leva-la a um alto grau de resistência a doença.

Nas doenças causadas por vírus, a RH resulta na formação das chamadas lesões locais, onde as partículas virais podem sobreviver por algum tempo, em baixas concentrações, porém sem a possibilidade de movimentação para fora da área lesionada (Paschoalati & Leite, 1995). Entretanto, em plantas de pimentão suscetíveis, a reação à infecção ocorre com o aparecimento inicial de lesões localizadas de origem cloróticas, as quais tornam-se sistemicamente infectadas, expressando dessa forma diferentes tipos de sintomas, como, necroses, mosaico foliar e deformação de frutos entre outros (Salomon et al., 2001).

### **4.3 Transmissão**

Como resultado de cultivos sucessivos, adensamento incorreto de plantas de pimentão, utilização de ferramentas e sementes contaminadas, os vírus do gênero *Tobamovirus* tem sido frequentemente observados em plantações de pimentão (Tanzi et al., 1986).

A primeira evidência da transmissão de um tobamovírus por sementes do gênero *Capsicum* foi em plantas de pimenta, onde o vírus atua como um contaminante na parte externa da semente (McKinney, 1952). Podendo ser encontrado no endosperma, porém não no embrião, a infecção ocorre após o transplante das plântulas de pimentão, pois estando o vírus presente na superfície da semente, este será introduzido através dos ferimentos nas raízes (Demski, 1981).

A utilização de sementes contaminadas por tobamovírus pode representar a principal fonte de disseminação a longas distâncias, sendo suficiente para causar sérios prejuízos em áreas de produção da cultura. (Erkan & Delen, 1985).

O ToMV apresenta uma taxa de mais de 94% de transmissão em sementes de tomate. No caso do PMMoV, esta taxa varia de 29 e 22% em *Capsicum annuum* e *Capsicum frutescens*, respectivamente (van Regenmortel et al., 2000).

Por outro lado, a sanidade das sementes infestadas com estes vírus pode ser mantida por meio de práticas culturais. O uso de tratamentos baseados na quimioterapia e termoterapia visando a eliminação das viroses nas sementes foi demonstrada por Demski (1981); Erkan & Delen (1985); Nascimento & Boiteux (1993); Salamon & Kaszta (2000), onde os melhores resultados na erradicação de vírus do gênero *Tobamovirus* foram a utilização de 10% de fosfato trissódico ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ), por 30 minutos; 2 % de hipoclorito de sódio (NaOH) ou tratamento térmico das sementes, utilizando 70 °C por 72 horas.

Salamon & Kaszta (2000), demonstraram que alguns tobamovírus podem estar presentes na superfície dos grãos de pólen de plantas de pimentão infectadas, sendo dessa forma facilmente disseminados pelo vento.

Segundo Duarte (1995), esses vírus possuem uma gama bastante grande de hospedeiros intermediários, sendo mais comuns as plantas das famílias *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Scrophulariaceae* e *Solanaceae*.

No campo, os tobamovírus são transmitidos com eficiência pelo contato das mãos e roupas contaminadas dos trabalhadores, contato entre plantas, ferramentas e utensílios utilizados nos tratos culturais em plantas infectadas. Entretanto a eficiência de transmissão pode ser reduzida, através da utilização de tratamento químico nos utensílios, o mesmo utilizado para o tratamento de sementes (Pategas et al., 1989).

Os restos culturais de plantas infectadas podem também representar uma importante fonte de inóculo e permanência destes vírus no solo (Pares & Gunn, 1989; Pares et al., 1996). No solo o ToMV pode ser infectivo durante dois anos (Cuadrado Gomez, 1994; Duarte, 1995). Em um levantamento da ocorrência de ToMV presente no solo, feito por Makkouk & Rana (1979), demonstraram que 24% das amostras de solo coletadas estavam infestadas com o vírus, sendo esta uma importante fonte de inóculo.

A transmissão por insetos vetores é até no momento desconhecida. As viroses deste gênero podem ser encontradas em todas as partes da planta hospedeira.

#### 4.4 Caracterização biológica

Durante anos diferentes tobamovírus infectando pimentão foram caracterizados como estirpes do TMV (Gebre-Selassie et al., 1981; Boukema, 1984), entretanto hoje, sabe-se que pelo menos cinco espécies diferentes de tobamovírus infectando pimentão já foram reconhecidas pelo ICTV (van Regenmortel et al., 2000). No gênero *Capsicum*, a resistência a tobamovírus é conferida por uma série alélica de genes situada no locus L: L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup> e L<sup>4</sup> (Boukema, 1984), os quais são conhecidos pela indução da resposta de hipersensibilidade - HR (Berzal-Herranz et al., 1995).

As diferentes espécies de tobamovírus são caracterizadas biologicamente em patótipos P<sub>0</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>1-2</sub> e P<sub>1-2-3</sub>, baseado na capacidade de contornar a resistência dos genes L<sup>+</sup>, L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup> e L<sup>3</sup> respectivamente, presentes em genótipos de *Capsicum* spp, como demonstrado no Quadro 1 (Boukema, 1984; Nuez et al., 1996). O patótipo P<sub>0</sub> induz reação de hipersensibilidade (HR) nos quatro genótipos (L<sup>1</sup> a L<sup>4</sup>), enquanto que o patótipo P<sub>1</sub>, infecta sistemicamente genótipos que apresentam o alelo L<sup>1</sup>, e elicita uma reação de hipersensibilidade (HR) em plantas que apresentam os alelos L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup> e L<sup>4</sup>. No caso do patótipo P<sub>1-2</sub>, este infecta sistemicamente plantas que apresentam os alelos L<sup>1</sup> e L<sup>2</sup>, e induz reação de hipersensibilidade em plantas com os alelos L<sup>3</sup> e L<sup>4</sup>. O patótipo P<sub>1-2-3</sub>, infecta sistemicamente plantas que apresentam os alelos L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup>, elicitando somente hipersensibilidade em plantas com o alelo L<sup>4</sup> (Berzal-Herranz et al., 1995).

Porém, esta classificação em patótipos não permite diferenciar as diferentes espécies de tobamovírus capazes de infectar o pimentão e somente fornece dados sobre a interação do vírus com seu hospedeiro. Erroneamente, passou-se a adotar que o patótipo P<sub>0</sub> poderia representar isolados de TMV ou ToMV, enquanto que os isolados de PMMoV poderiam ser classificados em patótipos P<sub>1</sub>, P<sub>1-2</sub> e P<sub>1-2-3</sub> (Nuez et al., 1996). Rast (1988) já suspeitava que dentro desta classificação diferentes espécies de vírus poderiam estar sendo englobados em um mesmo patótipo e alerta que melhoristas deveriam optar pela utilização do nome científico do vírus ao invés de englobá-los como se fossem o mesmo vírus.



Quadro1. Interação de espécies de *Tobamovirus* com genótipos de *Capsicum* spp, adaptado de Boukema (1984).

Hospedeiro	Genótipo	Patótipo			
		P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>1-2</sub>	P <sub>1-2-3</sub>
<i>C. annuum</i> cv. 'Early Califórnia Wonder'	L <sup>+</sup> L <sup>+</sup>	+	+	+	+
<i>C. annuum</i> cv. 'Tisana'	L <sup>1</sup> L <sup>1</sup>	-	+	+	+
<i>C. frutescens</i> cv. 'Tabasco'	L <sup>2</sup> L <sup>2</sup>	-	-	+	+
<i>C. chinense</i> PI 159236	L <sup>3</sup> L <sup>3</sup>	-	-	-	+
<i>C. chacoense</i> PI 260429	L <sup>4</sup> L <sup>4</sup>	-	-	-	-

+ = suscetível

- = resistente

Garcia-Luque et al. (1993) e Tenllado et al. (1994), comparando dados da seqüência nucleotídica de um isolado previamente caracterizado biológica e sorologicamente como patótipo P<sub>1</sub> de tobamovírus e dois outros isolados caracterizados como P<sub>1-2</sub> (Garcia-Luque et al., 1990) e P<sub>1-2-3</sub> (Wetter et al., 1984) de PMMoV, verificaram que o isolado pertencente ao P<sub>1</sub> tratava-se de uma nova espécie de vírus do gênero *Tobamovirus*, denominado de *Paprika mild mottle virus* (PaMMV).

Portanto, a atual caracterização biológica adotada para vírus do gênero *Tobamovirus* em pimentão, apesar de prática torna-se bastante confusa. De acordo com Brunt et al.(1996) e Salamon et al.(2001), o termo patótipo empregado por Boukema (1984), não é cientificamente correto, pois é adotado para espécies diferentes de vírus, enquanto deveria ser adotado somente para classificar isolados de uma mesma espécie viral baseado na capacidade de contornar genes de resistência conhecidos em um hospedeiro, como pode ser verificado no caso do *Lettuce mosaic virus*-LMV, em alface (Pink et al., 1992).

Segundo Alonso et al. (1989) o ToMV e o PMMoV também podem ser diferenciados pela sintomatologia em *Nicotiana glutinosa* e capacidade ou não de infectar tomate. O ToMV infecta tomate e causa lesões maiores e de coloração escura quando

inoculado em *N. glutinosa*, enquanto que o PMMoV além de não infectar plantas de tomate, causa lesões de coloração mais claras e tamanho menor quando inoculado nesta mesma hospedeira. De acordo com Wetter (1984) e Alonso et al. (1989), o PMMoV seria uma das tobamoviroses mais destrutivas da cultura do pimentão em cultivo protegido devido a capacidade do vírus infectar cultivares de pimentão que possuem os genes de resistência ao TMV e ToMV.

#### 4.5 Identificação molecular

Além da caracterização biológica os tobamovírus podem ser diagnosticados por técnicas moleculares como hibridização utilizando sondas radioativas ou não radioativas e a reação de polimerização em cadeia (PCR) (Mullis & Faloona, 1987). A combinação da transcrição reversa (RT), com a subsequente amplificação via PCR (RT-PCR), tem sido usada na diagnose de diversas viroses que apresentam o genoma constituído por RNA.

Um procedimento baseado na transcrição reversa e na reação de polimerização em cadeia (RT-PCR) foi desenvolvido por Tenllado et al. (1994), usando dados da sequência viral de algumas espécies de tobamovírus, onde os oligonucleotídeos específicos CP1 5'- CTGTGTACTIONTCGGCGTTAGG e CP2 5'- AATTCCTCAACATCGGGTCC foram usados na amplificação do gene da capa protéica de isolados de PMMoV. Ryu & Park (1995) utilizaram oligonucleotídeos específicos, os quais foram desenhados entre as regiões das proteínas de movimento e da capa protéica para detecção do *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), isolado de orquídeas. Tenllado et al. (1997) utilizaram a RT-PCR para detecção de infecções mistas de vírus do gênero *Tobamovirus*, em pimentão.

Para a detecção de tobamovírus provenientes de plantas ornamentais, foi desenhado um par de 'primers' (PAS1 e PAS2) que amplifica a região codificadora para parte das proteínas da capa protéica e de movimento, originando um fragmento com aproximadamente 800 pb (Alexandre et al., 2002).

Duarte et al. (2001) realizaram a caracterização molecular, por meio de RT-PCR, de um isolado de ToMV proveniente de *Impatiens hawkeri*, na qual obtiveram a

amplificação da região codificadora da capa protéica e da porção 3' terminal da proteína de movimento.

Letschert et al. (2002) desenvolveram oligonucleotídeos universais, os quais podem detectar diferentes espécies de tobamovírus, entre elas TMV, ToMV, PMMoV, TMGMV, ORSV e CGMMV. Oligonucleotídeos específicos para os diferentes vírus também foram desenhados permitindo a detecção rápida e segura das diferentes espécies dentro do gênero *Tobamovirus*.

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Localização do experimento**

Os trabalhos foram realizados no Departamento de Produção Vegetal – Setor Defesa Fitossanitária, Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Agrônomicas – UNESP – Campus de Botucatu.

### **5.2 Coleta de isolados de Tobamovírus em pimentão e pimenta.**

Os vírus do gênero *Tobamovirus* foram isolados de plantas de pimentão e pimenta apresentando sintomas de mosaico. As folhas foram coletadas, acondicionadas em sacos plásticos, sendo transferidas para o interior de caixas de isopor com gelo e, nessa condição, transportadas para o laboratório. Os isolados naturalmente infectados foram coletados no período de 2000 a 2002, sendo a sua região de origem descritos no Quadro 2.

Quadro 2. Relação dos isolados de tobamovírus coletados a partir de plantas de pimentão e pimenta.

<b>Código</b>	<b>Local</b>	<b>Origem</b>	<b>Ano</b>
Pe-01	Sorocaba	Pimenta	2000
Pe-02	Sorocaba	Pimenta	2000
Pe-03	Sorocaba	Pimenta	2000
Pe-04	Sorocaba	Pimenta	2000
Pe-05	Sorocaba	Pimenta	2000
Pe-06	Lins	Pimentão	2000
Pe-07	Lins	Pimentão	2000
Pe-08	Lins	Pimentão	2000
Pe-09	Salto	Pimentão	2000
Pe-10	Lins	Pimentão	2001
Pe-11	Salto	Pimenta	2002
Pe-12	Salto	Pimentão	2002
Pe-13	Salto	Pimentão	2002

### **5.3 Caracterização biológica, sorológica e identificação molecular dos isolados.**

#### **5.3.1 Teste sorológico**

Como técnica preliminar para diagnóstico e caracterização sorológica dos isolados de pimentão coletados, foi utilizada uma modificação da técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), denominada de PTA – ELISA (*Plate Trapped Antigen*), descrita por Mowart & Dawson (1987), onde se utilizou antissoros policlonais para os vírus ToMV e PMMoV cedidos pelo Prof. Dr. Jorge A. M. Rezende, do Departamento de Fitopatologia e Entomologia e Zoologia Agrícola, da ESALQ-USP, e pela empresa Sakata

Seed Sudamerica. Utilizaram-se como controles positivos para este teste, isolados de ToMV e PMMoV previamente caracterizados biológica e sorologicamente por Kobori et al. (2001).

A técnica consistiu na trituração individual de folhas dos isolados e de folhas de pimentão sadia, usada como controle negativo, em almofariz na presença de tampão carbonato pH 9,6 na proporção 1:20 (1g de tecido foliar para 20 ml de tampão). Foram utilizados 100 µl de antígeno por orifício da placa, incubando-se por 1 hora e 30 minutos a 37 °C. Após o período de incubação realizaram-se três lavagens consecutivas com tampão PBS-Tween pH 7,4 (Phosphate buffered saline) em lavador automático Titertek Plus M96 V Washer. Foram adicionados 100 µl de antissoro por cavidade, diluído 1:1000 em tampão Tris-HCl pH 7,2, incubando-se por 1 hora e 30 minutos a 37 °C. Após o período de incubação realizaram-se três lavagens consecutivas da placa com tampão PBS-Tween. Foram adicionados 100 µl de Imunoglobulina G conjugada com fosfatase alcalina (Sigma A 8025) diluída em tampão Tris-HCl, na proporção 1:8000, incubando-se por 1 hora e 30 minutos a 37 °C, seguidos de três lavagens consecutivas com tampão PBS-Tween. Utilizou-se como substrato o P-fosfato de nitrofenil diluído em tampão dietanolamina pH 9,8 (1 mg/ml no tampão). As leituras foram realizadas a 405 nm em leitor Titertek Multiskan Plus. Foram utilizadas duas repetições por isolado e as amostras foram consideradas infectadas quando o valor médio das leituras excedia em 3 vezes o valor médio das leituras das amostras de pimentão sadio.

### **5.3.2 Isolamento e caracterização biológica.**

O isolamento de tobamovírus em pimentão é trabalhoso, pois além da ocorrência de infecções mistas de espécies do gênero *Tobamovirus* é freqüente a presença de outros vírus, como do *Cucumber mosaic virus* (CMV). Deste modo é necessário realizar o isolamento monolesional por meio da inoculação mecânica de folhas de pimentão em plantas de *Nicotiana glutinosa* que reage com sintomas de lesões locais para tobamovírus.

Para facilitar a visualização e individualização das lesões, a inoculação mecânica em *N. glutinosa* foi efetuada no estádio do quarto par de folhas verdadeiras, na proporção de 1g de tecido fresco para 10 ml de tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 contendo 0,01 M de sulfito de sódio. Após o aparecimento das lesões, estas foram destacadas

das folhas com o auxílio de uma lâmina barbear, previamente flambada, e trituradas individualmente em almofariz contendo 1 ml de tampão, e em seguida friccionadas sobre folhas de *Nicotiana clevelandii* (Garcia-Luque et al., 1990), hospedeira multiplicadora de tobamovírus. Foi utilizado para inoculação carborundum 600 mesh como abrasivo.

Os isolados foram também inoculados em plantas de *Nicotiana rustica*, que de acordo com Bastos (1998) é uma planta diferenciadora dos vírus TMV e ToMV, pois reage respectivamente com sintoma sistêmico e local para esses vírus.

Na caracterização biológica foram utilizados genótipos diferenciais de *Capsicum* spp, portadores de genes de resistência para tobamovírus, cedidos pela Empresa Sakata Seed Sudamérica. Estes genótipos diferenciais (Quadro 3) permitem separar os isolados em patótipos, baseado na capacidade de contornar genes de resistência (Boukema 1984 e Nuez et al., 1996).

Quadro 3. Relação e reação de genótipos diferenciais de *Capsicum* spp utilizados para a caracterização biológica de vírus pertencentes ao gênero *Tobamovirus*.

Genótipo	Gene de Resistência	Classificação em patótipos			
		P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>1-2</sub>	P <sub>1-2-3</sub>
<i>C. annuum</i> cv. 'Early Califórnia Wonder'	L <sup>+</sup> L <sup>+</sup>	+	+	+	+
<i>C. annuum</i> cv. Magda	L <sup>+</sup> L <sup>+</sup>	+	+	+	+
<i>C. annuum</i> cv. Tisana	L <sup>1</sup> L <sup>1</sup>	-	+	+	+
<i>C. frutescens</i> cv. Tabasco	L <sup>2</sup> L <sup>2</sup>	-	-	+	+
<i>C. chinense</i> PI-159236	L <sup>3</sup> L <sup>3</sup>	-	-	-	+
<i>C. chacoense</i> PI-260429	L <sup>4</sup> L <sup>4</sup>	-	-	-	-

+ = mosaico

- = reação de hipersensibilidade (lesão local)

Os isolados multiplicados em *N. clevelandii* foram inoculados em mudas dos genótipos diferenciais de *Capsicum* spp, no estágio de emissão da primeira folha verdadeira. Foram utilizadas três plantas de cada genótipo para cada um dos isolados de tobamovírus. A avaliação foi realizada diariamente até aos 21 dias após a inoculação, através da observação de sintomas visuais nas plantas.

### **5.3.3 Microscopia eletrônica**

Para a observação da morfologia das partículas de vírus presentes, foram realizados testes de microscopia eletrônica utilizando-se as plantas de *Nicotiana clevelandii* com sintomas. Utilizou-se a técnica de imersão foliar rápida “leaf dip”, onde as folhas foram trituradas em tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 contendo 0,01 M de sulfato de sódio e contrastadas com acetato de uranila 3%, por 5 minutos (Kitajima, 1965). A observação foi realizada no microscópio eletrônico de transmissão marca PHILIPS – CM100 do Departamento de Produção Vegetal da FCA, UNESP Botucatu.

### **5.3.4 Manutenção dos isolados virais “in vivo” e “in vitro”**

Após a diferenciação das espécies de *Tobamovirus* por meio de genótipos diferenciais, os isolados foram mantidos “in vivo” em plantas de *N. clevelandii*, através sucessivas inoculações mecânicas.

Concomitantemente à manutenção “in vivo”, as amostras foliares dos isolados foram cortadas em finas tiras e colocadas no interior de placas de petri sobre uma camada de cloreto de cálcio e papel filtro, sendo mantidas em dessecador contendo sílica gel, durante 7 dias a 4°C. Após esse período o armazenamento das folhas dessecadas foi efetuado em pequenos frascos preparados com uma camada de sílica gel no fundo, sobreposta com algodão e papel filtro. Os frascos foram vedados, etiquetados e armazenados a -20°C (Bos, 1977). Dessa forma pode ser preservada a infectividade viral dos isolados.



### 5.3.5 Extração do RNA

Após a purificação biológica através do isolamento monolesional, foi realizada a extração do RNA total de acordo com o procedimento descrito por Bertheau et al. (1998). Foram utilizadas folhas de *N. clevelandii* previamente inoculadas com os isolados apresentando sintomas sistêmicos de mosaico. Amostras de RNAs totais de plantas de *N. clevelandii* sadias também foram extraídas como controle negativo. O procedimento realizou-se da seguinte maneira: trituraram-se 0,11 g de folhas de *N. clevelandii* em 550 µl de tampão PBS-Tween (proporção 1:5) contendo PVP K25, a 2%, e Na-DIECA 20 mM, sendo centrifugadas em tubos de microcentrífuga por 10 minutos, a 13.000 rpm, a 4 °C (Centrífuga Eppendorf 5804 R). Duzentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, acrescentando-se 20 µl de SDS a 1%. Após incubação a 55 °C por 15 minutos, adicionou-se 100 µl de solução de acetato de potássio a 3 M e agitou-se bem. Seguiu-se incubação em gelo, por 5 minutos, e centrifugação por 5 minutos, a 13.000 rpm a 4 °C. Recolheu-se o sobrenadante em um novo tubo e adicionaram-se 700 µl de NaI 6 M e 5 µl de uma solução contendo silício previamente agitada para que o silício fosse ressuspendido. Agitou-se bem e manteve-se a solução por 10 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida a solução foi centrifugada por 1 minuto, a 5.000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5415 C). Descartou-se o sobrenadante, e procedeu-se à lavagem do 'pellet' por duas vezes com 500 µl de solução de lavagem (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM e igual volume de etanol absoluto), seguida de centrifugação por 1 minuto a 5.000 rpm para cada lavagem. Após centrifugação por 1 minuto o 'pellet' foi secado a vácuo (Speed Vaccum Eppendorf Concentrator 5301) e o RNA foi ressuspendido em 400 µl de água Milli-Q tratada com DEPC, seguido de incubação por 5 minutos, a 55 °C e centrifugação por 5 minutos, a 13.000 rpm. Trezentos microlitros do sobrenadante foram recolhidos para um novo tubo e armazenados a -20 °C. Utilizou-se uma alíquota de 2,5 µl para a PCR realizada em um volume total de 25 µl.

### 5.3.6 Amplificação por transcrição reversa/reação de polimerização em cadeia (RT-PCR).

A RT-PCR foi realizada a partir de 2,5 µl de RNA total extraído pelo método de Bertheau et al. (1998). Oligonucleotídeos universais denominados de Tob-Uni 1 e Tob-Uni 2 capazes de amplificar qualquer espécie de tobamovírus e os oligonucleotídeos específicos para isolados de TMV, ToMV e PMMoV, descritos por Letschert et al. (2002), foram utilizados nos experimentos (Quadro 4). Para amplificação da espécie de TMV foi utilizada a combinação dos oligonucleotídeos Tob Uni 1 e TMV, para o ToMV os pares Tob Uni 1 e ToMV e para a espécie de PMMoV a combinação Tob Uni 1 e PMMoV. Os tamanhos esperados dos fragmentos de DNA amplificados foram: 804 pares de bases (pb) para Tob Uni 1/ Tob Uni 2; 694 pb para Tob Uni 1/ TMV; 686 pb para Tob Uni 1/ ToMV e 688 para Tob Uni 1/ PMMoV.

A reação de RT-PCR seguiu o protocolo descrito por Letschert et al. (2002), com algumas modificações. A reação de transcrição reversa e o PCR foram efetuados no mesmo tubo, misturando-se todos os reagentes de uma só vez, resultando em economia de reagentes e tempo para término da reação. Estes oligonucleotídeos foram inicialmente avaliados, por meio de comparação da seqüência nucleotídica destes com a do genoma de espécies de tobamovírus disponíveis no Genbank.

Quadro 4. Seqüência nucleotídica dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR descritos por Letschert et al. (2002).

<b>Nome</b>	<b>Seqüência Nucleotídica 5' – 3'</b>	<b>Posição</b>	<b>Tipo</b>
<b>Tob-Uni 1</b>	ATT TAA GTG GAS GGA AAA VCA CT	6283-6260	Universal
<b>Tob-Uni 2</b>	GTY GTT GAT GAG TTC RTG GA	5479-5498	Universal
<b>TMV</b>	CGG TCA GTG CCG AAC AAG AA	5609-5589	Específico
<b>ToMV</b>	CGG AAG GCC TAA ACC AAA AAG	5618-5597	Específico
<b>PMMoV</b>	GGG TTT GAA TAA GGA AGG GAA GC	5617-5595	Específico

A RT-PCR foi efetuada em um volume total de 25  $\mu$ l constituído de: 2,5  $\mu$ l de tampão da enzima *Taq* DNA polimerase; 3,5 mM de  $MgCl_2$ ; 0,1 unidades de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen); 0,8 mM de cada oligonucleotídeo; 4 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado dGTP, dATP, dCTP, dTTP; 0,12 unidades de AMV Reverse Transcriptase (Amersham Pharmacia Biotech) e 13,3  $\mu$ l de água Mili Q tratada com DEPC. A reação foi efetuada em um termociclador 'Eppendorf Mastercycler Gradient'.

As condições da reação foram as seguintes: 42 °C por 30 minutos para formação do DNA complementar (cDNA), 94 °C por 5 minutos para inativação da AMV, 25 ciclos de amplificação a 94 °C por 1 minuto, 55-60 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto, proporcionando, respectivamente, desnaturação, anelamento dos 'primers' e a extensão, seguida da extensão final a 72 °C por 5 minutos. A temperatura de anelamento utilizada para os oligonucleotídeos degenerados foi de 60°C, enquanto que para os oligonucleotídeos específicos foi de 55 °C.

Os produtos da RT-PCR, juntamente com o marcador molecular 1 kb Ladder foram visualizados em gel de agarose 1%, em tampão TBE (0,1 M Tris HCl; 0,1M de ácido bórico; 0,02 mM de EDTA pH 8,3), corado com 0,1  $\mu$ l/ml de brometo de etídeo. O gel foi submetido a uma voltagem de 100 V por aproximadamente, 40 minutos. Os géis foram observados sob luz ultravioleta e fotografado em aparelho 'Eagle eye', para análise.

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 Teste sorológico**

O teste PTA – ELISA realizado com antissoros policlonais para o ToMV e PMMoV, foi preliminarmente utilizado no diagnóstico dos isolados de pimentão coletados no campo. Os resultados indicaram que a maioria dos isolados coletados no campo apresentavam infecções mistas de ToMV, PMMoV e ainda com o CMV, fazendo-se necessário o isolamento monolesional destes vírus em *Nicotiana glutinosa*.

### **6.2 Isolamento biológico**

Os isolados de tobamovírus coletados de pimentão e pimenta apresentaram diferentes tipos de lesões locais quando inoculados concomitantemente em *N. glutinosa*. De acordo com os dados verificados por Alonso et al.(1989), pôde-se verificar que o PMMoV ocasionou lesões locais menores e mais claras, enquanto que as do ToMV foram maiores e mais escuras como demonstra a Figura 3. Outro aspecto observado foi o intervalo do aparecimento dos sintomas, pois para isolados de ToMV os sintomas apareceram aos três dias após a inoculação enquanto que, para o PMMoV, aos cinco dias.

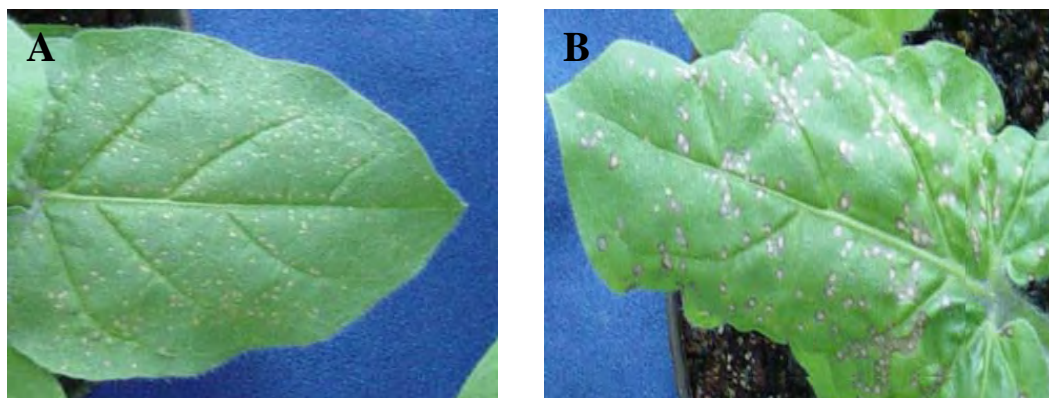


Figura 3. Sintomas de lesões locais em plantas de *N. glutinosa* inoculadas com: **A:** PMMoV e **B:** ToMV

Os sintomas apresentados por *N. clevelandii* aos 21 dias após inoculação com ToMV podem ser observados na Figura 4. Esta planta mostrou ser uma boa multiplicadora para tobamovírus.



Figura 4. Sintoma sistêmico exibido em planta de *N. clevelandii*, aos 21 dias após a inoculação com tobamovírus.

### 6.3 Microscopia eletrônica

A técnica de imersão foliar rápida “leaf dip” foi utilizada para auxiliar a diagnose dos vírus, permitindo a observação de partículas virais em forma de bastonete rígido típicas de tobamovírus, presentes em plantas de *N. clevelandii* (Figura 5).

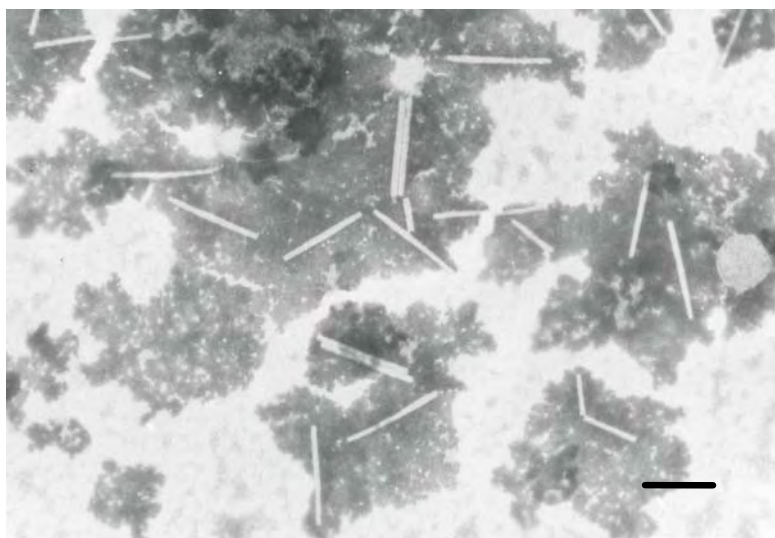


Figura 5. Microscopia eletrônica de extrato foliar de *N. clevelandii*, multiplicadora de tobamovírus. Barra: 200 nm.

### 6.4 Caracterização biológica

Isolados multiplicados em *N. clevelandii* foram inoculados em genótipos diferenciais de *Capsicum* spp, cujas reações são demonstradas no Quadro 5.

Quadro 5. Reação de genótipos diferenciais de *Capsicum* spp inoculados com isolados de Tobamovirus de pimentão.

Isolados	Reação obtida para os isolados de Tobamovirus					
	<i>C.annuum</i> cv. ECW L <sup>+</sup> L <sup>+</sup>	<i>C. annum</i> cv. Magda L <sup>+</sup> L <sup>+</sup>	<i>C. annum</i> cv. Tisana L <sup>1</sup> L <sup>1</sup>	<i>C. frutescens</i> cv. Tabasco L <sup>2</sup> L <sup>2</sup>	<i>C. chinense</i> PI-159236 L <sup>3</sup> L <sup>3</sup>	<i>C. chacoense</i> PI-260429 L <sup>4</sup> L <sup>4</sup>
<b>Pe-01</b>	+	+	+	+	-	-
<b>Pe-02</b>	+	+	-	-	-	-
<b>Pe-03</b>	+	+	+	+	-	-
<b>Pe-04</b>	+	+	-	-	-	-
<b>Pe-05</b>	+	+	+	+	-	-
<b>Pe-06</b>	+	+	-	-	-	-
<b>Pe-07</b>	+	+	-	-	-	-
<b>Pe-08</b>	+	+	+	-	-	-
<b>Pe-09</b>	+	+	-	-	-	-
<b>Pe-10</b>	+	+	-	-	-	-
<b>Pe-11</b>	+	+	-	-	-	-
<b>Pe-12</b>	+	+	+	+	-	-
<b>Pe-13</b>	+	+	-	-	-	-

+ : mosaico

- : lesão local ou reação de hipersensibilidade

Quatro dos isolados coletados foram caracterizados biologicamente como pertencentes aos patótipos P<sub>1-2</sub>. De acordo com os sintomas observados por Kobori et al.(2001), os isolados Pe-01, Pe-03, Pe-05 e Pe-12, apresentaram reação sistêmica de mosaico nos seguintes genótipos: *C.annuum* cv. ECW L<sup>+</sup>L<sup>+</sup>; *C.annuum* cv. Magda L<sup>+</sup>L<sup>+</sup> (Figura 6); *C.annuum* cv. Tisana L<sup>1</sup>L<sup>1</sup> e *C. frutescens* cv. Tabasco L<sup>2</sup>L<sup>2</sup> (Figura 7), e reação de hipersensibilidade nos genótipos *C. chinense* PI-159236 L<sup>3</sup>L<sup>3</sup> e *C. chacoense* PI-260429 L<sup>4</sup>L<sup>4</sup> (Figuras 8 e 9).



Figura 6. Sintoma sistêmico exibido em *C. annuum* cv. Magda L<sup>+</sup>L<sup>+</sup>, aos 11 dias após a inoculação com o isolado Pe-01 caracterizado como P<sub>1-2</sub>.



Figura 7. Sintoma sistêmico exibido em *C. frutescens* cv. Tabasco L<sup>2</sup>L<sup>2</sup>, aos 21 dias após a inoculação com o isolado Pe-12 caracterizado como P<sub>1-2</sub>.





Figura 8. Reação de lesões locais em *C. chinense* PI-159236 L<sup>3</sup>L<sup>3</sup>, aos 5 dias após a inoculação com o isolado Pe-12 caracterizado como P<sub>1-2</sub>.



Figura 9. Reação de lesões locais em *C. chacoense* PI-260429 L<sup>4</sup>L<sup>4</sup>, aos 5 dias após inoculação com o isolado Pe-12 caracterizado como P<sub>1-2</sub>.

O isolado Pe-08 apresentou reação sistêmica nos genótipos *C. annuum* cv. ECW L<sup>+</sup>L<sup>+</sup>; *C. annuum* cv. Magda L<sup>+</sup>L<sup>+</sup> e *C. annuum* cv. Tisana L<sup>1</sup>L<sup>1</sup>, sendo classificado como patótipo P<sub>1</sub>.

Os isolados Pe-02, Pe-04, Pe-06, Pe-07, Pe-09, Pe-10, Pe-11 e Pe-13 foram caracterizados como P<sub>0</sub>. Conforme a classificação de Boukema (1984), as plantas mostraram sintomas sistêmicos apenas nos genótipos suscetíveis *C. annuum* cv. ECW L<sup>+</sup>L<sup>+</sup> (Figura 10) e *C. annuum* cv. Magda L<sup>+</sup>L<sup>+</sup>, enquanto que os demais genótipos apresentaram reação de hipersensibilidade ou lesões locais e abscisão das folhas cotiledonares (Figura 11).



Figura 10. Sintoma sistêmico exibido em *C. annuum* cv. ECW L<sup>+</sup>L<sup>+</sup>, aos 21 dias após a inoculação com o isolado Pe-02 caracterizado biologicamente como P<sub>0</sub>.



Figura 11. Reação de lesões locais em *C. annuum* cv. Tisana L¹L¹, aos 5 dias após a inoculação com o isolado Pe-02 caracterizado biologicamente como P<sub>0</sub>.

### 6.5 Identificação molecular

Todos os isolados causadores de mosaico foliar em pimentão e pimenta foram testados por meio da RT-PCR. Os isolados de PMMoV e ToMV anteriormente caracterizados biológica e sorologicamente por Kobori et al. (2001) foram utilizados em um teste preliminar que permitiu avaliar a eficiência dos oligonucleotídeos degenerados e específicos descritos por Letschert et al. (2002).

Como pode ser observado na Figura 12, todos os isolados foram amplificados pelos oligonucleotídeos universais Tob-Uni 1 e Tob-Uni 2. Estes oligonucleotídeos podem ser utilizados na diagnose rápida e precisa de tobamovírus em materiais provenientes do campo, sem identificar, porém a espécie de vírus presente na amostra.

**M S 01 02 03 04 05 06 07 08 To PM 09 10 11 12 13 TMV**

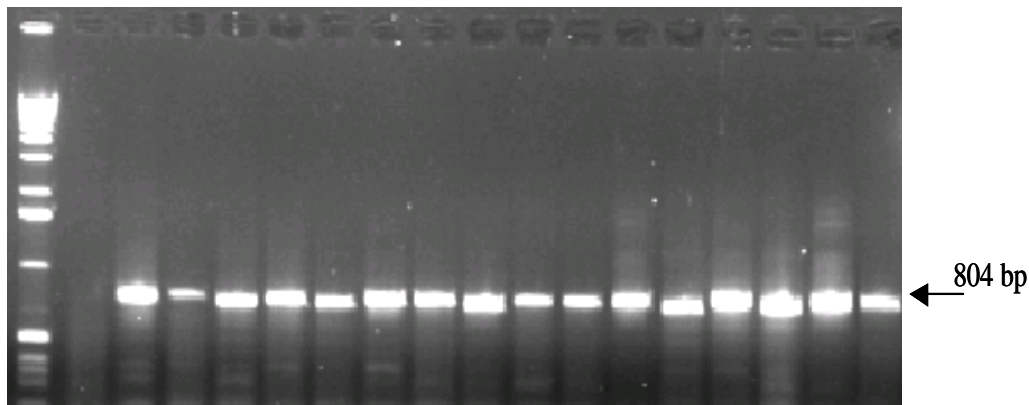


Figura 12. Padrão eletroforético obtido pelos oligonucleotídeos Tob-Uni 1 e Tob-Uni 2 em RT-PCR. **M.** Marcador de peso molecular; **S.** *N. clevelandii* sadia; **01-13.** Isolados: Pe-01, Pe-02, Pe-03, Pe-04, Pe-05, Pe-06, Pe-07, Pe-08, Pe-09, Pe-10, Pe-11, Pe-12, Pe-13 respectivamente em *N. clevelandii*. **To:** ToMV, **PM:** PMMoV, e **TMV,** utilizados como controles positivos

Os isolados Pe-06, Pe-07, Pe-10 e Pe-13 foram especificamente amplificados pelos oligonucleotídeos Tob-Uni 1 e ToMV (Figura 13), indicando tratar-se de isolados de ToMV. Pela caracterização biológica estes haviam sido caracterizados como patótipo P<sub>0</sub>. Entretanto, o isolado Pe-09 foi amplificado por ambos oligonucleotídeos específicos TMV (Figura 14) e ToMV, indicando a presença de infecção mista mesmo após a purificação biológica por monolesionais.

Os isolados Pe-01, Pe-03, Pe-05, Pe-08 e Pe-12 foram identificados molecularmente como pertencentes à espécie PMMoV (Figura 15). A caracterização biológica por meio dos genótipos diferenciais permitiu identificá-los como patótipos P<sub>1-2</sub>. O isolado Pe-08 que foi detectado via RT-PCR como PMMoV foi considerado biologicamente como patótipo P<sub>1</sub>. Segundo Nuez et al. (1996), este patótipo englobaria isolados da espécie PMMoV, porém Garcia-Luque et al. (1993) encontrou um isolado patótipo P<sub>1</sub> da espécie PaMMV.

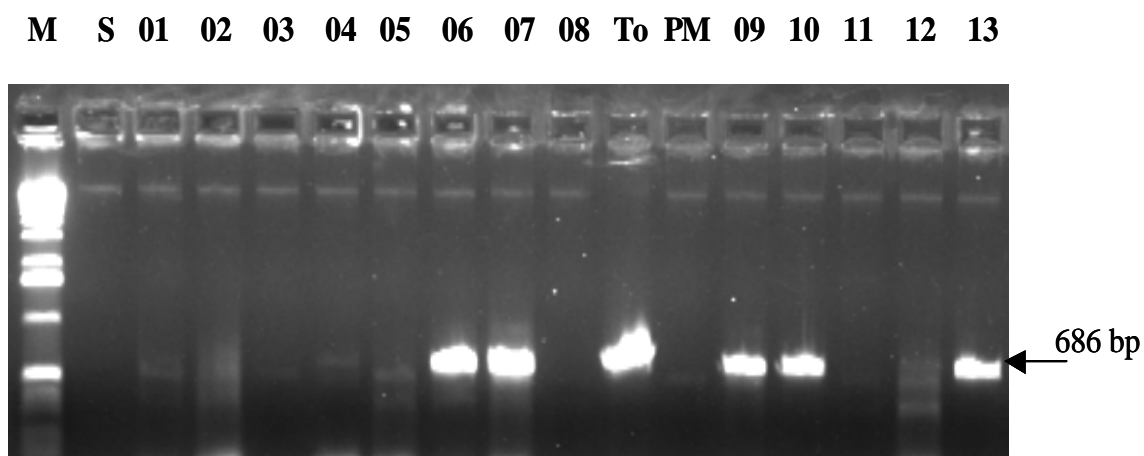


Figura 13. Detecção específica via RT-PCR de isolados de ToMV, utilizando os oligonucleotídeos Tob-Uni 1 e ToMV. **M.** Marcador de peso molecular; **S.** *N. clevelandii* sadia; **01-13:** Isolados Pe-01, Pe-02, Pe-03, Pe-04, Pe-05, Pe-06, Pe-07, Pe-08, Pe-09, Pe-10, Pe-11, Pe-12, Pe-13 respectivamente em *N. clevelandii*. **To:** ToMV, **PM:** PMMoV, utilizados como controles positivos.

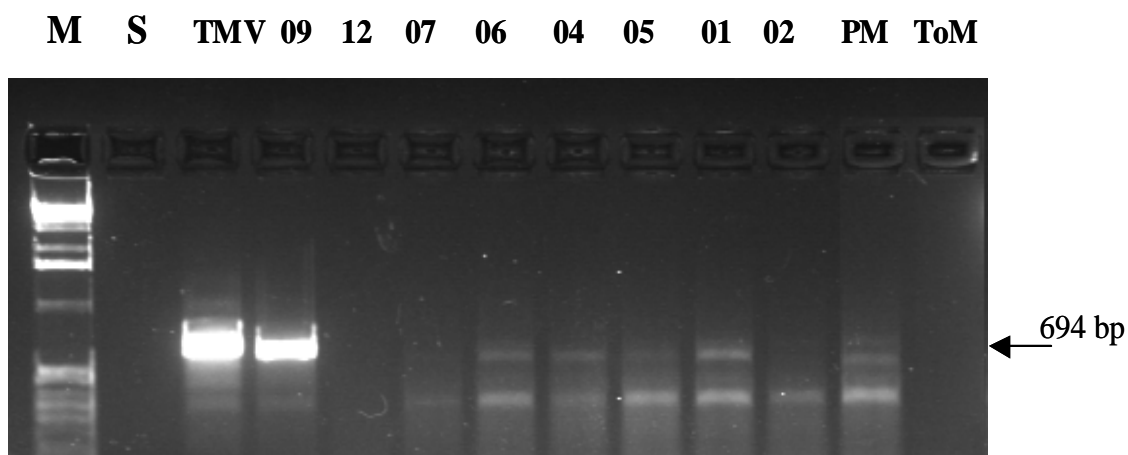


Figura 14. Detecção específica via RT-PCR de isolados de TMV, utilizando os oligonucleotídeos Tob-Uni 1 e TMV. **M.** Marcador de peso molecular; **S.** *N. clevelandii* sadia; Isolados em *N. clevelandii*. **To:** ToMV, **PM:** PMMoV, utilizados como controles positivos.

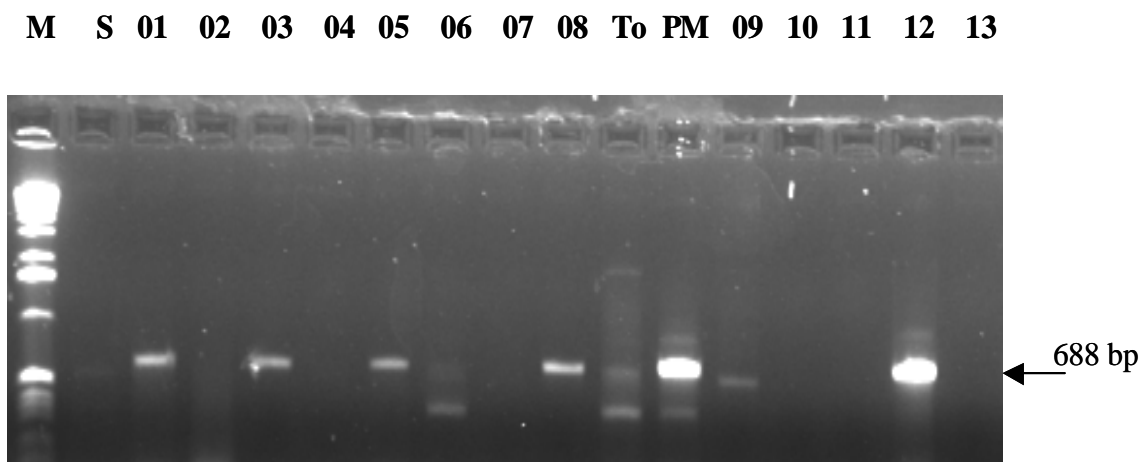


Figura 15. Detecção específica via RT-PCR de isolados de PMMoV, utilizando os oligonucleotídeos Tob-Uni 1 e PMMoV. **M.** Marcador de peso molecular; **S.** *N. clevelandii* sadia; **01-13:** Isolados Pe-01, Pe-02, Pe-03, Pe-04, Pe-05, Pe-06, Pe-07, Pe-08, Pe-09, Pe-10, Pe-11, Pe-12, Pe-13 respectivamente em *N. clevelandii*. **To:** ToMV, **PM:** PMMoV, utilizados como controles positivos.

Os isolados Pe-02, Pe-04 e Pe-11 coletados a partir de pimenta e caracterizados biologicamente como P<sub>0</sub> foram amplificados pelos oligonucleotídeos universais, indicando tratar-se de isolados de tobamovírus (Figura 12). Entretanto, não foi verificada amplificação para nenhum dos oligonucleotídeos específicos. Pelo menos duas hipóteses podem explicar este resultado: os isolados Pe-02, Pe-04 e Pe-11 podem ser uma outra espécie de tobamovírus, daí não serem amplificados pelos oligonucleotídeos específicos. Outros tobamovírus como o PaMMV, TMGMV e ObPV infectam a cultura do pimentão, entretanto neste trabalho não se tinha disponível os oligonucleotídeos específicos para estas espécies. Uma outra explicação seria o fato destes isolados, mesmo sendo de uma das espécies de TMV, ToMV ou PMMoV apresentarem diferenças na sequência de nucleotídeos nas regiões de anelamento dos oligonucleotídeos específicos para estes vírus. Estas hipóteses poderão ser esclarecidas por meio do sequenciamento do fragmento amplificado pelos oligonucleotídeos degenerados e posterior comparação com as sequências de tobamovírus disponíveis no GenBank.

A caracterização biológica de tobamovírus descrita por Boukema (1984) não deve ser utilizada a fim de determinar a identidade viral do isolado como sugerido

por Nuez et al. (1996), pois somente fornece dados sobre a interação do isolado viral nas espécies de *Capsicum* spp, ou seja, a capacidade do isolado em contornar os genes de resistência L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>. Para identificação das espécies virais deve-se optar pela detecção molecular, como a RT-PCR, pois esta técnica mostrou-se uma alternativa eficiente e rápida na caracterização de isolados de tobamovírus em pimentão.

## 7 CONCLUSÕES

- A caracterização biológica deve ser utilizada somente como uma ferramenta para se conhecer as propriedades da interação de um isolado com os genótipos diferenciais de *Capsicum* spp. Esta interação não permite identificar a espécie de vírus presente na amostra, uma vez que espécies diferentes podem ser agrupadas em um mesmo patótipo.
- A identificação molecular utilizando-se os oligonucleotídeos específicos aparece como uma ferramenta altamente confiável e rápida para se conhecer a identidade da espécie viral presente na amostra. Por outro lado ela não fornece dados sobre as propriedades biológicas do isolado, de modo que as duas técnicas devem ser utilizadas em conjunto.
- A identidade dos isolados Pe-02, Pe-04 e Pe-11 coletados a partir de pimenta também necessita ser melhor estudada pois estes isolados podem representar uma espécie de tobamovírus ainda não relatada no Brasil.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, M. A. V. et al. Detecção de três espécies de *tobamovirus* por RT-PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, 2002 (Resumos, nº 665).

ALONSO, E. et al. A tobamovirus causing heavy losses in protected pepper crops in Spain. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 125, p. 67-76, 1989.

**ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA**, São Paulo, p. 456-459, 2002.

BASTOS, H. B. **Vírus do mosaico do tomateiro: levantamento, identificação, caracterização de estirpes em algumas regiões do Estado de São Paulo e determinação da herança da resistência**. 1998. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu-SP.

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

---

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Faculdade de Ciências Agronômicas. **Normas para elaboração de dissertação e teses**. Botucatu, 2002. 25 p.

BERZAL-HERRANZ, A. et al. The *Capsicum* L<sup>3</sup> gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. **Virology**, Orlando, v. 209, n. 2, p. 498-505, 1995.

BETTI, L.; TANZI, M.; CANOVA, A. Genes for resistance in *Capsicum* and TMV pepper strains. VI<sup>th</sup> meeting on genetics and breeding on *Capsicum* and *Eggplant*. **Eucarpia**, p. 173-176, 1986.

BOS, L. Persistence of infectivity of three viruses in plant material dried over CaCl<sub>2</sub> and stored under different conditions. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 83, p. 217-220.

BOUKEMA, I. W. Resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. Is governed by an allele of the L-locus. **Capsicum Newsletter**, n. 3, p. 47-48, 1984.

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

BRUNT, A. A. et al. **Viruses of plants:** descriptions and lists from vide database. London: CAB Internacional, London, 1996. 1451 p.

CUADRADO-GÓMEZ, I. M. **Las virosis de las hortalizas en los cultivos de invernadero de almeria**. Almeria. 1994. v. 5.

DEMSKI, J. W. Tobacco mosaic virus is seedborne in pimiento peppers. **Plant Disease**, St. Paul, v. 65, n. 9, p. 723-724, 1981.

DUARTE, K. M. R. **Produção de anticorpos monoclonais contra o vírus do mosaico do tomateiro (ToMV)**. 1995. 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

DUARTE, L. M. L. et al. Caracterização sorológica e molecular de *Tomato mosaic virus* isolado de *Impatiens hawkeri*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 115, 2001 (Resumos, nº 123).

ERKAN, S.; DELEN, N. Seed treatments to eliminate seed-borne tobacco mosaic virus in pepper seeds. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, n. 4, p. 50,1985.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000, 402 p.

GARCIA-LUQUE, I. et al. The nucleotide sequence of the coat protein genes and 3' non-coding regions of two resistance-breaking tobamoviruses in pepper shows that they are different viruses. **Archives of Virology**, Vienna, v. 131, n. 1-2, p. 75-88, 1993.

GARCIA-LUQUE, I. et al. Characterization of a spanish strain of pepper mild mottle virus (PMMV-S) and its relationship to other tobamoviruses. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 129, n. 1, p. 1-8, 1990.

GEBRE-SELASSIE, K. G. et al. L'ê virus de la mosaïque du tabac chez le piment 1. apparition em france du pathotype p<sup>1-2</sup>. **Agronomie**, Paris, v. 1, n. 10. p. 853-858, 1981.

KITAJIMA, E. W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. **Journal Electronic Microscopy**, v. 14, p. 119-121, 1965.

KOBORI, R. F. et al. Ocorrência do *pepper mild mottle virus* (PMMoV) em pimentão (*Capsicum annum*) cultivado sob estufa no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 516, 2001 (Resumos, nº 910).

LETSCHERT, B. et al. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of the economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 106, p. 1-10, 2002.

MAKKOUK, K. M.; RANA, N. H. Occurrence of tomato mosaic virus in the soils of the coastal region of Lebanon. **Plant Disease Reporter**, St Paul, v. 63, n. 4, p. 290-293, 1979.

MALDONADO, V. O cultivo do pimentão. **Cultivar**, Pelotas, v. 5, n.1, p. 23-25, 2001.

McKINNEY, H. H. Two strains of tobacco mosaic virus, one of which is seed-borne in an etch-immune pungent pepper. **Plant Disease Reporter**, St Paul, v. 36, p. 184-187, 1952.

MOWART, W. P.; DAWSON, S. Detection and identification of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and infractionated antisera. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 15, p. 233-247, 1987.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 55, p. 335-350. 1987.

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

NASCIMENTO, W. M.; BOITEUX, L. S. Termo e quimioterapia visando o controle de TMV em tomate: Eficiência na erradicação do vírus e efeitos na qualidade fisiológica das sementes. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 1, p. 86, 1993 (Resumos, nº 164).

NUEZ, F.; ORTEGA, R. G.; COSTA, J. Enfermedades producidas por virus y micoplasmas. In: NUEZ, F.; ORTEGA, R. G.; COSTA, J. **El cultivo de pimientos, chiles y ajies**. Madrid: Mundi-Prensa, 1996. p. 249-313.

PARES, R. D.; GUNN, L. V.; KESKULA, E. N. The role of Infective plant debris, and its concentration in soil, in the ecology of tomato mosaic tobamovirus -a non-vectorred Plant Virus. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 3, p. 147-150, 1996.

PARES, R. D.; GUNN, L. V. The role of non-vectorred soil transmission as a primary source of infection by pepper mild mottle and cucumber mosaic viruses in glasshouse-grown capsicum in Australia. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 126, n. 4, p. 353-360, 1989.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 418-453.

PATEGAS, K. G.; SCHUERGER, A. C.; WETTER, C. Management of tomato mosaic Virus in hydroponically grown pepper (*Capsicum annuum*). **Plant Disease**, St. Paul, v. 73, n. 7, p. 570-573, 1989.

PINK, D. A. C.; KOSTOVA, D.; WALKEY, D. G. A. Dfferentiation of pathotypes of lettuce mosaic virus. **Plant Pathology**, London, v. 41, p. 5-12, 1992.

RAST, A. Th. B. Pepper Tobamoviruses and Pathotypes used in resistance Breeding. **Capsicum Newsletter**, n. 7, p. 20-23, 1988.

RYU, K. H.; PARK. W. M. Rapid detection and identification of odontoglossum ringspot virus by polymerase chain reaction amplification. **Fems Microbiology Letters**, v. 133, p. 265-269, 1995.

SALAMON, P. et al. Studies on the tobamovirus resistance of the pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivar Greygo. **International Journal of Horticultural Science**, Hungary, v. 7, n. 1, p.71-75, 2001.

SALAMON, P.; KASZTA, M. Investigation on the transmission of some tobamoviruses by pollen and seed in pepper (*Capsicum annuum* L.). **International Journal of Horticultural Science**, Hungary, v. 6, n. 3, p. 127-131, 2000.

TANZI, M.; BETTI.; CANOVA, A. Behaviour of two new commercial pepper cvs. With L<sup>1</sup>, L<sup>3</sup> genotype towards TMV pepper strain infection. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, Grugliasko v. 5, p. 45, 1986.

TENLLADO, F. et al. Pepper resistance-breaking tobamoviruses: can they co-exist in single pepper plants? **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 103, n. 3, p. 235-243, 1997.

TENLLADO, F. et al. Rapid detection and differentiation of tobamoviruses infecting L-resistant genotypes of pepper by RT-PCR and restriction analysis. **Journal of Virological Methods**, Madrid, v. 47, p. 165-174, 1994.

van REGENMORTEL, M. H. V. et al. **Virus taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Academic Press, 2000. 1162 p.

WETTER, C. et al. Pepper mild mottle virus, a tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, n. 4, p. 405-410, 1984.