

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS E REAÇÃO DE *Capsicum* spp. AO
Cucumber mosaic virus (CMV)**

PAULO ROGÉRIO PARENTE DIAS

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em Agronomia.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia –
Proteção de Plantas.

BOTUCATU-SP
Novembro - 2004

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS E REAÇÃO DE *Capsicum* spp. AO
Cucumber mosaic virus (CMV)**

PAULO ROGÉRIO PARENTE DIAS

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em Agronomia.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia –
Proteção de Plantas

BOTUCATU-SP
Novembro – 2004

BIOGRAFIA DO AUTOR

Paulo Rogério Parente Dias, nascido aos 18 de fevereiro de 1973 em São Paulo, Estado de São Paulo. Filho de Vera Soares Parente Dias e José Carlos Dias.

Cursou a graduação em Engenharia Agrônômica na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, no período de fevereiro de 1993 a fevereiro de 1998.

Obteve o título de Mestre em Agronomia, na Área de Concentração em Fitopatologia, pela ESALQ-USP em setembro de 2000, sob orientação do prof. Dr. Jorge Alberto Marques Rezende.

Ingressou no curso de Doutorado em março de 2001 na Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, em Botucatu-SP, sob orientação do prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan. Em outubro de 2004 submeteu-se à defesa do Doutorado.

Publicou trabalhos na área de Fitopatologia, principalmente relacionados à virologia.

Atualmente, exerce atividade profissional no Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso (INDEA/MT), na cidade de Tangará da Serra – MT, como Técnico de Defesa Agropecuária e Florestal. Recentemente, em junho de 2004 foi designado responsável-chefe por Posto Fiscal do Estado de Mato Grosso.

*À memória dos meus avós,
Avô Dias e Avó Dina, dedico.*

*Aos meus pais José Carlos e Vera e à
minha irmã Mirela, ofereço.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de inspiração e força.

A toda minha família e amigos, que com amor e esperança sempre estiveram presentes.

Agradecimento especial a meus pais, minha irmã, à minha querida avó Leonor com sua contagiosa alegria de viver e à Carla Araújo Pereira, que com amor e carinho incentivou a conclusão dos trabalhos, sempre em busca da vitória.

Ao Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan, pela orientação, amizade e apoio na realização deste curso de doutorado.

Ao Prof. Dr. Cyro Paulino da Costa, do Departamento de Horticultura da ESALQ/USP pelo acompanhamento dos trabalhos práticos realizados, sugestões apresentadas, conselhos e amizade formada.

A todos os colegas de laboratório da FCA-UNESP pelo profissionalismo e valiosa amizade.

Ao Departamento de Produção Vegetal da FCA-UNESP pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação em agronomia (Doutorado).

À ESALQ/USP, em destaque aos Profs. Drs. Cyro Paulino da Costa e Jorge Alberto Marques Rezende, pela utilização de suas estruturas laboratoriais e de campo, que foram de fundamental importância ao desenvolvimento desta Tese.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos, que garantiu o pleno desenvolvimento dos trabalhos.

Aos colegas da ESALQ, Sally Ferreira Blat e Fernando César Sala (Gambé), e da UNESP, Márcia Aparecida Cezar e Renate Krause Sakate, pela colaboração técnica nos ensaios laboratoriais e de campo.

Aos professores, funcionários e colegas da FCA/UNESP e ESALQ/USP que contribuíram direta ou indiretamente para a conquista deste Título de Doutor em Agronomia.

À Sakata Seed Sudamerica pelo suporte nas coletas de materiais de campo e fornecimento de isolados do vírus.

Ao Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso (INDEA/MT), em especial aos colegas da ULE de Tangará da Serra e URS de Barra do Bugres, pelo incentivo na finalização de mais esta etapa em minha carreira profissional.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras.....	X
Lista de Tabelas.....	XI
RESUMO.....	1
SUMMARY.....	3
1 INTRODUÇÃO.....	5
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Populações de plantas utilizadas nos ensaios experimentais.....	17
3.2 Fonte dos isolados virais.....	25
3.3 Inoculação Mecânica.....	26
3.4 Teste sorológico dos isolados virais.....	26
3.5 Purificação biológica e manutenção dos isolados do CMV.....	27
3.6 Teste de hospedeiro diferenciador dos isolados virais.....	28
3.7 Análise molecular dos isolados virais.....	28
3.7.1 Extração dos RNAs virais.....	29
3.7.2 Amplificação de RNA e satRNA por RT-PCR.....	29
3.7.3 Clivagem enzimática de fragmentos de DNA.....	30
3.8 Seleção de isolado severo do CMV para avaliação da reação de <i>Capsicum</i> spp.....	31
3.9 Teste de recuperação do isolado do vírus selecionado para reação de <i>Capsicum</i> spp CMV.....	31
3.10 Avaliação da reação de <i>Capsicum</i> spp. ao CMV.....	32
3.11 Efeito da idade de planta inoculada na expressão de sintomas do CMV.....	34
4 RESULTADOS.....	35

4.1 Identificação de vírus em amostras de <i>Capsicum</i> spp.....	35
4.2 Purificação biológica e manutenção dos isolados do CMV.....	37
4.3 Teste de hospedeiro diferenciador dos isolados virais.....	41
4.4 Transcrição reversa e reação em cadeia de polimerase (RT-PCR).....	42
4.5 Clivagem enzimática de fragmentos de DNA.....	42
4.6 Identificação de RNA satélite associado ao CMV.....	44
4.7 Seleção do isolado severo do CMV.....	45
4.8 Avaliação da reação de <i>Capsicum</i> spp. ao CMV.....	46
4.9 Efeito da idade de planta inoculada na expressão de sintomas do CMV.....	59
5 DISCUSSÃO.....	65
6 CONCLUSÕES.....	75
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 À esquerda, sintomas sistêmicos de mosaico e redução do limbo foliar em planta de <i>N.glutinosa</i> , em comparação a uma planta sadia da mesma idade. À direita, detalhe do mosaico sistêmico em desenho em <i>N.glutinosa</i> infectada com estirpe severa do CMV.	39
2 Lesões locais necróticas em <i>N. glutinosa</i> formadas por ToMV e/ou PMMoV a partir de inóculo proveniente de plantas de pimentão coletadas em campo.....	39
3 Lesões locais em <i>C. quinoa</i> formadas em decorrência da inoculação mecânica de isolado do CMV extraído de <i>N. glutinosa</i>	40
4 Reação de plantas de <i>N. glutinosa</i> à inoculação com estirpes do CMV: Folha sadia, folha inoculada com o satélite do CMV e folha inoculada com estirpe severa do CMV, respectivamente da esquerda para a direita.....	40
5 Reação de mosaico sistêmico em plantas de <i>V. unguiculata</i> induzida por isolados do CMV, 20 dias após inoculação.....	41
6 Malformação e perda de limbo foliar e mosaico sistêmico em plantas de <i>N. glutinosa</i> , inoculadas mecanicamente com isolado agressivo do CMV.....	42
7 Análise de fragmentos de RNA dos isolados de CMV, amplificados por RT-PCR e clivados pela enzima <i>Msp</i> I, em gel de agarose 1,5%. M: marcador molecular de DNA (1 Kb “ladder”), A: H ₂ O, S2: CMV-II (plasmidial), S1: CMV-I e B: sadia. Os comprimentos das bandas estão indicados à esquerda do gel.....	43
8 Análise de fragmentos de RNA dos 23 isolados de CMV, amplificados por RT-PCR e clivados pela enzima <i>Msp</i> I, em gel de agarose 1,5%. M: marcador molecular de DNA (1 Kb “ladder”), A: H ₂ O, S2: CMV-II (plasmidial), S1: CMV-I, e de 1 a 23: isolados purificados selecionados para os testes. Os comprimentos das bandas correspondentes estão indicados à esquerda do gel (em pares de bases).....	44
9 Planta indicadora de <i>N. glutinosa</i> infectada com o isolado severo do CMV selecionado (14), apresentando um desenvolvimento anormal, atrofia e deformação foliar, folhas filiformes, ausência de limbo foliar e mosaico intenso.....	46

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Acessos de <i>Capsicum</i> spp. utilizados nos ensaios de reação de plantas ao CMV.....	18
2 Populações de <i>Capsicum</i> spp. utilizadas nos ensaios de reação ao CMV.....	33
3 Notas de sintomas atribuídas às plantas na população de <i>Capsicum</i> spp	34
4 Detecção sorológica de vírus em amostras de pimentão e pimenta coletadas em diferentes municípios nos anos de 2000 a 2002 em diferentes regiões produtoras.....	36
5 Lista dos isolados de CMV utilizados nos testes em casa-de-vegetação provenientes de <i>Capsicum</i> spp. em diferentes municípios.....	38
6 Reação de plantas das espécies de <i>Capsicum</i> spp. inoculadas mecanicamente com a estirpe severa do CMV.....	51
7 Relação dos acessos selecionados de <i>Capsicum</i> spp. com resistência ou tolerância ao CMV.....	58
8 Reação e evolução dos sintomas em plantas de pimenta e pimentão inoculadas cor dias de idade com o isolado severo do CMV.....	61
9 Reação e evolução dos sintomas em plantas de pimenta e pimentão inoculadas com 30 dias de idade com o isolado severo do CMV.....	62
10 Reação e evolução dos sintomas em plantas de pimenta e pimentão inoculadas com 45 dias de idade com o isolado severo do CMV.....	63
11 Reação e evolução dos sintomas em plantas de pimenta e pimentão inoculadas com 60 dias de idade com o isolado severo do CMV.....	64

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS E REAÇÃO DE *Capsicum* spp. AO *Cucumber mosaic virus* (CMV). Botucatu, 2004. 86p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Autor: Paulo Rogério Parente Dias

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan

RESUMO

Cucumber mosaic virus (CMV), uma espécie do gênero *Cucumovirus*, é um dos mais importantes vírus que infecta pimentão, causando prejuízos consideráveis na produção em todo o mundo. Quando da infecção precoce, em geral, ambas a qualidade e a quantidade de frutos produzidos são afetados. O vírus apresenta inúmeras estirpes capazes de infectar pimentão, diferindo na expressão dos sintomas. CMV pode infectar mais de 865 espécies de plantas, incluindo ervas daninhas, sendo transmitido por diversas espécies de afídeos de maneira não circulativa. Inseticidas são ineficazes para prevenir a disseminação da doença em virtude da forma de transmissão do vetor. No presente trabalho, verificou-se que o CMV foi o principal vírus identificado em campo. Vinte e três isolados de *Capsicum* spp. foram purificados biologicamente e caracterizados através de análises sorológica, biológica e molecular. Todos os 23 isolados da coleção foram classificados no subgrupo I do CMV, induzindo mosaico sistêmico, redução do desenvolvimento vegetativo e deformação foliar em *Nicotiana glutinosa* e *Nicotiana tabacum* ‘Havana 425’, diferindo apenas na intensidade de sintomas. Somente 8 isolados foram capazes de causar mosaico em *Vigna unguiculata*. Amplificação combinada com clivagem pela enzima *Msp* I foi eficiente para distinguir os subgrupos do CMV, resultando em banda de 500 pb somente para a amostra-controle do CMV II, dando origem a 3 fragmentos com 190, 150 e 120 pb, enquanto todos os outros isolados permaneceram com 488 pb e sem clivagem, correspondendo ao CMV-I. Não foi detectado RNA satélite em nenhum isolado do campo. A reação ao CMV de cultivares e híbridos comerciais de pimentão é desconhecida, mas tudo indica serem susceptíveis. A identificação de populações de pimentão e pimenta resistentes aos isolados locais do CMV é o primeiro passo para o desenvolvimento de cultivares comerciais resistentes. A triagem dos acessos da coleção de *Capsicum* da ESALQ/USP demonstrou que 11,6 % de pimentões e pimentas, incluindo as espécies *C.*

annuum, *C. baccatum*, *C. chinensi* e *C. frutescens* apresentaram características de tolerância ou resistência de plantas. Somente um acesso, ‘Aji Dulce’ (*C. frutescens*), apresentou resistência de todas as plantas testadas. Neste estudo, foi possível observar que os sintomas causados pelo CMV, em geral, manifestaram-se após o 9º internódio formado, seguido da primeira bifurcação caular. Nas populações tolerantes, sintomas de mosaico foliares foram mais acentuados no começo do desenvolvimento vegetativo e durante os estádios de florescimento e frutificação. A identificação de novos acessos com tolerância ou resistência ao CMV é a primeira etapa para posteriores pesquisas da elucidação da herança da resistência e seu uso no melhoramento genético.

Palavras-chave: CMV, Caracterização, Resistência, Tolerância, *Capsicum*

CHARACTERIZATION OF ISOLATES AND REACTION OF *Capsicum* spp. TO *Cucumber mosaic virus* (CMV). Botucatu, 2004. 86p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: Paulo Rogério Parente Dias

Adviser: Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan

SUMMARY

Cucumber mosaic virus (CMV), a species of the genus *Cucumovirus*, is one of the most important virus that infect pepper, causing notable losses in pepper production worldwide. With early infection, in general, both quality and quantity of fruit produced will be affected. The virus exists as a number of strains capable of infecting pepper, differing in symptom expression. CMV can infect more than 865 plant species including many weed species and it is transmitted by many aphid species in a non-circulative manner, meaning that insecticides cannot prevent the spread of this disease. At this work, the CMV was the main virus identified in the field. Twenty-three CMV isolates from *Capsicum* spp. were biologically purified and characterized for serological, biological and molecular analysis. All 23 isolates from collection were found to belong to subgroup I. All isolates caused systemic mosaic, reduction of vegetative development and deformation in the leaf in *N. glutinosa* and *N. tabacum* ‘Havana 425’, differing in symptom intensity. Only 8 isolates were able to cause systemic mosaic in *V. unguiculata*. Amplification combined with *Msp* I cleavage was efficient to distinguish the CMV subgroups. This process resulted in a 500 pb for the CMV II control only, giving origin to three fragment with 190, 150 and 120pb, while all other isolates remained uncleaved with 488 pb, corresponding to the CMV-I isolates. It was not detect RNA satellite in a field isolates. Pepper comercial cultivars and hybrids reaction to CMV is unknowledge, but it seems to be susceptible. The identification of cultivated varieties or wild relatives of pepper that are better able to fend off attack by viral pathogens such as CMV is a critical first step towards developing resistant commercial varieties. The screening of *Capsicum* accesses collection from ESALQ/USP shows that 11,6 % of peppers and hot peppers, including *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinensi* and *C. frutescens* presented tolerance or resistance characteristics. Only one genotype, ‘Aji Dulce’ (*C. frutescens*), presented resistance in all test plants. In this study

was possible observe that the symptoms caused by CMV, in general, appear after 9 internodes formed and with the first stem bifurcation. At the tolerant varieties, leaf symptoms are more accentuated in the beginning of vegetative development and during flower and fruit stage. The identification of new accesses with tolerance or resistance to CMV is the first step for further resistance of inheritance and its use for breeding.

Keywords: CMV, Characterization, Resistance, Tolerance, *Capsicum*

1 INTRODUÇÃO

Nas espécies do gênero *Capsicum*, encontram-se as pimentas e pimentões (*C. annuum* L., *C. baccatum* L., *C. frutescens* L., *C. chinensi* L.), apresentando-se como importantes hortaliças cultivadas e de alto valor comercial nos cenários brasileiro e internacional de alimentação, com altos rendimentos dentro desta cadeia do agronegócio. O pimentão, uma cultura alimentícia de alta rentabilidade e importante fonte de renda para diversos agricultores de todo o país, encontra-se entre as cinco mais importantes hortaliças cultivadas no Brasil.

A cultura de pimentão tem apresentado um decréscimo na área plantada nos últimos anos no Estado de São Paulo, devido principalmente à alta incidência de doenças. Cultivares de pimentão de alta produtividade, utilizados em plantios comerciais, tais como Avelar, Ikeda, Agrônômico 10-G, Gigante Inowe, Margareth, Magda, Híbrido Magali R, Híbrido Atenas AG-322, Híbrido Safari, Apolo AG-511, Hércules AG-672, Itaipu, Híbrido Amanda, Híbrido Ligia, Acauã e Híbrido Maira, Nathali, Rubia R, Maximus, Elisa, Priscila, mostram-se altamente susceptíveis ao CMV, causando importantes danos à cultura e prejuízos à comercialização.

O CMV tem distribuição mundial e infecta diversos hospedeiros naturais e principalmente plantas cultivadas (Tomlinson, 1987). Mais de 865 espécies em 85 famílias de plantas foram identificadas como sendo hospedeiras do CMV (Douine et al., 1979; Gallitelli, 1998). Esse vírus tem sido um dos mais preocupantes encontrados nos plantios comerciais de *C. annuum* no Estado de São Paulo. Destaca-se a região de Lins-SP, onde estão situados diversos produtores de pimentão, que nos últimos anos têm diminuído a área plantada devido à ocorrência da virose, como um dos fatores limitantes. Veñals et al. (1996) destacam que o CMV é um dos vírus que causam os maiores danos ao pimentão em campo.

Transmitido por diversas espécies de afídeos de maneira não circulativa, principalmente por *Aphis gossypii* Glover e *Myzus persicae* Sulz. (Simons, 1957), o CMV tem a capacidade de

provocar sintomas foliares e nos frutos de pimentão, depreciando a qualidade e prejudicando o seu comércio.

Um grande número de isolados do CMV tem sido descritos (Kaper & Waterworth, 1981) e agrupados em dois subgrupos: CMV I e CMV II (Owen & Palukaitis, 1988; Edwards & Gonsalves, 1983), relacionados a determinadas regiões climáticas (Haase et al., 1989) e caracterizados através de vários métodos biológicos (Devergne & Cardin, 1973), sorológicos (Devergne & Cardin, 1975; Edwards & Cooper, 1985; Haase et al., 1989; Kearney et al., 1990) e moleculares (Edwards & Gonsalves, 1983; Owen & Palukaitis, 1988; Rizos et al., 1992; De Blas et al., 1994).

Esses subgrupos podem ser caracterizados com o auxílio de hospedeiros diferenciais (Devergne & Cardin, 1973), reação serológica (Devergne & Cardin, 1975; Edwards & Cooper, 1985; Haase et al., 1989; Kearney et al., 1990), mapeamento peptídico (Edwards & Gonsalves, 1983) e de RNA (Owen & Palukaitis, 1988), mapeamento de restrição do gene da capa protéica, amplificado pela reação em cadeia de polimerase (PCR) (Rizos et al., 1992) e transcrição reversa (RT) associada à PCR (RT-PCR) (De Blas et al., 1994). Haase et al. (1989) verificaram que a utilização de anticorpos monoclonais em testes sorológicos de DAS-ELISA direto é uma alternativa viável para detecção do CMV. Atencio et al. (1997), realizando testes de dupla imunodifusão e DAS-ELISA indireto com anticorpos monoclonais e policlonais separaram o CMV em subgrupos do CMV, porém verificaram que esses foram menos sensíveis que o RT-PCR. O sequenciamento de isolados do CMV, segundo Maciel-Zambolim (1998), mostrou que há 80-81% de similaridade entre os subgrupos CMV I e CMV II, sendo que os isolados específicos do CMV I e aqueles do CMV II foram semelhantes na sequência de nucleotídeos (99 – 100%). As estirpes do CMV, segundo Kaper & Waterworth (1981), apresentam diferenças em patogenicidade e gama de hospedeiros. Maciel-Zambolim (1998), trabalhando com infecção de tomateiros com o CMV, verificou que sintomas em *N. tabacum* ‘Havana 425’ e *N. tabacum* ‘Xanthi’ permitiram distinguir os subgrupos do CMV (CMV I e CMV II). Daniels & Campbell (1992) relataram a importância do CMV, como sendo o principal vírus que infecta o pimentão na Califórnia. Na Austrália, muitos agricultores observaram 90% de infecção em pimentão, com destruição das plantas, sendo que o principal vírus encontrado em amostras analisadas foi o CMV (Pares & Gunn, 1989).

O controle do CMV é difícil, principalmente pelo fato de apresentar a capacidade de infectar diversas espécies de plantas (Quiot et al., 1979; Rist & Lorbeer, 1989), pelo insucesso no combate aos afídeos vetores com inseticidas para o controle do vírus (Chalfant et al., 1977; Wyman et al., 1979; Orozco et al., 1994) e pela diversidade de estirpes provocando diferentes reações de patogenicidade em plantas infectadas (Kaper & Waterworth (1981). Há diversas alternativas relatadas para o controle do mosaico causado pelo CMV em cultivares de pimentão. Entre elas, as mais expressivas estão a utilização de RNA satélite, que atenua os sintomas do CMV (Wang & Simon, 1999), o desenvolvimento de cultivares transgênicos tolerantes ou resistentes ao CMV (Kim et al., 2000; Zhu et al., 2000) e a resistência ou tolerância de plantas (Nono-Womdim et al., 1991; Nono-Womdim et al., 1993a; Dogimont et al., 1994; Lapidot et al., 1997; Soler et al., 1999; Grube et al., 2000) são as mais expressivas. A tolerância pode ser definida como a característica da planta que permite a multiplicação do vírus, porém sem manifestação de sintomas. Plantas resistentes são aquelas que não permitem a multiplicação do vírus e, portanto, permanecem sadias. No Brasil não se têm relatos ou avaliações de campo de cultivares comerciais de pimentão resistentes ao CMV.

Em se tratando do desenvolvimento de novos cultivares de pimentão contra o CMV, há necessidade da disponibilidade de fontes confiáveis de resistência ou tolerância ao vírus e o conhecimento da herança dessas características. Nesse sentido, os principais objetivos desse trabalho foram a caracterização de isolados do CMV de plantas de pimentão e pimenta em subgrupos a que pertencem, bem como a avaliação da reação de plantas de pimentão e pimenta ao CMV, contribuindo para a disponibilização de materiais de *Capsicum* spp. geneticamente favoráveis ao controle do CMV e para futuros estudos de melhoramento genético de *Capsicum* spp. para resistência ao CMV.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Gênero *Capsicum* é originário do continente americano, apresentando ampla distribuição de espécies selvagens na América Central e do Sul, sendo o México o centro de diversidade de formas cultivadas (Minami & Tessariolli, 1994).

Onze gêneros formam a família Solanaceae, entre eles o gênero *Capsicum*, no qual fazem parte os pimentões e as pimentas (*Capsicum annuum* L., *C. baccatum* L., *C. frutescens* L., *C. chinensi* L.). Esse gênero relaciona-se principalmente com o valor alimentício (importante fonte de vitaminas, principalmente C, B1, B2 e Niacina e sais minerais, destacando-se o Fósforo e o Ferro) e culinário dos frutos, que são consumidos *in natura* e utilizados pela indústria no processamento de produtos agropecuários industrializados. As melhores condições de desenvolvimento para essas olerícolas estão nas médias de temperatura de 25°C, sendo que temperaturas inferiores a 15°C prejudicam o crescimento das plantas.

De acordo com Junqueira & Luengo (2000), há um crescente interesse dos consumidores por produtos diferenciados ou não convencionais e de alta qualidade, com características organolépticas superiores, principalmente no que se refere ao item saúde. O mercado de hortaliças destinado ao consumo *in natura* no Brasil vem recebendo um crescente público consumidor. Essa tendência faz com que ocorra uma constante busca por novos cultivares de hortaliças para que atendam a essa demanda brasileira.

O Brasil vem exportando os frutos de pimentão para vários países da América do Sul, Europa e Reino Unido (Minami & Tessariolli, 1994), representando uma importante fonte de renda para centenas de agricultores de todo o país.

Plantas do gênero *Capsicum* estão sujeitas a doenças causadas por diversas espécies de vírus (Kendrick et al., 1951; Paulus et al., 1963; Makkouk & Gumpf, 1974; Abdalla et al., 1991), sendo que mais de 30 viroses são conhecidas por causar danos econômicos em

pimentão (Watterson, 1993). Makkouk & Gumpf (1974) destacaram esses patógenos como fatores limitantes da produção, afetando consideravelmente o mercado consumidor, principalmente pela falta de produtos ou frutos com qualidade inferior à exigida. No Brasil, os vírus de maior frequência detectados em amostras de pimentão pertencem ao gênero *Cucumovirus* (CMV), *Tospovirus* (*Tomato spotted wilt virus* – TSWV), *Tobamovirus* (*Tomato mosaic virus* – ToMV, *Tobacco mosaic virus* – TMV e *Pepper mild mottle virus* – PMMoV) e *Potyvirus* (*Potato virus Y* – PVY, *Pepper yellow mosaic virus* - PepYMV).

Há relatos de ocorrência do CMV em diversos países, desde as regiões temperadas até as tropicais, provocando perdas na produção de diferentes culturas (Douine et al., 1979; Pares & Gunn, 1989; Brunt et al., 1990; Kearney et al., 1990; Daniels & Campbell, 1992; Nono-Womdim et al., 1993a; Atencio et al., 1997; Mavrodieva et al., 1997; Sikora et al., 1998). Simons (1957) relatou a ocorrência de três estirpes do CMV afetando cultivar comercial de pimentão no sul da Flórida, EUA. Daniels & Campbell (1992) avaliaram a importância do CMV, como o principal vírus que infecta o pimentão na Califórnia. Na Austrália, agricultores têm observado 90% de infecção em pimentão, com destruição das plantas, sendo que o principal vírus encontrado em amostras analisadas foi o CMV (Pares & Gunn, 1989). Em estudos de incidência de viroses em pimentão na Califórnia, foram identificados isolados virais do *Tobacco etch virus* (TEV), CMV, *Potato virus X* (PVX), PVY, *Alfafa mosaic virus* (AMV), TMV, estando o CMV em posição de destaque entre os de maior frequência encontrados (Abdalla et al. 1991). Duas outras espécies que tem sido relatadas infectando pimentão são o TSWV (Soler et al., 1999) e PepYMV (Inoue-Nagata et al., 2002).

Na Austrália, produtores registraram perdas provocadas por vírus que variaram de 50% a 90% em *C. annuum*, sendo que o principal patógeno identificado foi o CMV (Pares & Gunn, 1989). No Brasil, são poucos os relatos de danos quantitativos causados por esse vírus em espécies do gênero *Capsicum*. Bergmann et al. (2003) observaram a ocorrência de CMV do subgrupo I, na região de Elias Fausto - SP, associado a severos danos nas plantas de pimentão e perdas de produção da ordem de 80%.

A maioria dos vírus de plantas relatados é constituída por RNA (Matthews, 1991), sendo o CMV um exemplo. O CMV faz parte do gênero *Cucumovirus*, da família Bromoviridae, apresentando partículas isométricas de aproximadamente 30 nm de diâmetro. O capsídeo é composto de 180 subunidades de um polipeptídeo com massa de aproximadamente

24 KDa e um genoma tripartido composto de 3 RNAs genômicos e 1 subgenômico de fita simples, sentido positivo (Ding et al., 1994). Os RNAs 1 e 2, maiores, codificam proteínas relacionadas com a replicação viral e o terceiro segmento (RNA 3) codifica uma proteína relacionada com o movimento de célula a célula. A capa protéica é traduzida a partir de um RNA mensageiro subgenômico do RNA 3, denominado RNA 4, que também é encapsidado (Palukaitis et al., 1992). Fragmentos de ácido nucléico do vírus foram amplificados com 486 a 488 pares de bases (pb) em amostras de banana (Singh et al., 1995) e 488 a 500 pb em amostras de diferentes espécies vegetais, inclusive pimentão e pimentas (Boari, 1998) e tomate (Maciel-Zambolim, 1998), utilizando “Reverse Transcription – Polimerase Chain Reaction” (RT-PCR). Determinadas estirpes do vírus apresentam uma quinta molécula de RNA, determinado RNA satélite (sRNA) (Kaper & Waterworth, 1981, Fraile et al., 1994) que modula os sintomas do vírus (Waterworth et al., 1979).

Os sintomas provocados pelo CMV em pimentão, relatados por Paulus et al. (1962), em geral, são os de mosaico foliar, folhas filiformes e atrofia da planta, sendo mais severos quando a infecção ocorre nas primeiras folhas verdadeiras da planta. Malformação, atrofia de frutos, manchas e desenhos necróticos em folhas e frutos também podem ocorrer (Atencio et al., 1997), bem como sintomas foliares de mosqueado (Nagai, 1984). Quando a infecção é precoce, pode produzir necrose do talo principal e morte da planta (Veñals et al., 1996).

As estirpes de CMV podem ser identificadas de acordo com os sintomas causados em hospedeiras diferenciais (Simons, 1957). Esse mesmo autor, no sul da Flórida, relatou a presença de três (3) diferentes estirpes de CMV afetando *C. frutescens*, as quais apresentaram propriedades físicas idênticas, como inativação térmica de 65°C a 70°C e ponto final de diluição 1: 10 000 e 1: 20 000. Atualmente, com o auxílio de técnicas de identificação e classificação de vírus, baseadas em sorologia, RT-PCR e seqüenciamento, pode-se definir com maior precisão e detalhamento diversas estirpes do vírus. O teste de ELISA tem sido largamente utilizado na identificação dessas estirpes (Haase et al., 1989) e adaptado para a detecção de numerosos vírus, incluindo aqueles de pimentão (Benner et al., 1985).

Como os métodos sorológicos apresentam limitações de sensibilidade na detecção de mínimas quantidades de partículas virais e possibilidade de ocorrência de reações cruzadas com proteínas vegetais (Wylie et al., 1993), pode-se gerar resultados inconclusivos (Maciel-Zambolim, 1998). Outros métodos com maior especificidade na detecção e identificação do

patógeno têm sido aplicados para consolidar resultados de ensaios experimentais, utilizando-se hospedeiros diferenciais (Simons, 1957; Abdalla et al., 1991; Daniels & Campbell, 1992; Maciel-Zambolim, 1998; Boari, 1998), microscopia eletrônica (Abdalla et al., 1991), reação de polimerização em cadeia (PCR) (Rizos et al., 1992; Maciel-Zambolim, 1998, Boari, 1998), mapeamento peptídico da proteína capsidial (Edwards & Gonsalves, 1983) e hibridização molecular (Piazzola et al., 1979, Haase et al., 1989, Daniels & Campbell, 1992).

Devergne & Cardin (1973) dividiram as estirpes de CMV em dois grandes grupos: ToRS e DTL, que são equivalentes aos subgrupos I e II, respectivamente (Owen & Palukaitis, 1988; Edwards & Gonsalves, 1983). Essa divisão apresenta importância devido às informações geográficas de localização desses subgrupos e dos sintomas que causam (Maciel-Zambolim, 1998). Segundo Haase et al. (1989), o CMV I predomina nas regiões tropicais e subtropicais, induzindo sintomas mais severos, enquanto o CMV II ocorre com maior frequência nas regiões temperadas. No Brasil, até o momento, foi relatado apenas o subgrupo I do vírus (Boari, 1998). Frangioni et al. (2002) identificaram o subgrupo I do CMV em isolados provenientes de pimentão no estado de São Paulo. Daniels & Campbell (1992), caracterizando isolados do CMV, subdividiram o subgrupo CMV I em CMV Ia e CMV Ib pela reação sintomatológica em hospedeiros diferenciais. CMV Ia causou sintomas sistêmicos em *V. unguiculata*, enquanto CMV Ib e CMV II induziram lesões locais necróticas nesse mesmo hospedeiro. Eiras et al., 2001 relataram a ocorrência do subgrupo Ia do CMV em isolado de bananeira do Vale do Ribeira, estado de São Paulo, quando verificaram mosaico em plantas inoculadas de *V. unguiculata*.

Determinadas estirpes do vírus apresentam uma quinta molécula de RNA, determinado RNA satélite (sRNA) (Kaper & Waterworth, 1981). Os RNAs satélites apresentam-se como pequenos ácidos nucleicos de RNA (Veñals et al., 1996) que não estão relacionados sequencialmente ao CMV, necessitando apenas do vírus auxiliar para replicação (Montasser et al., 1998), modulando os sintomas provocados pelo CMV (Waterworth et al., 1979). O RNA satélite pode induzir sintomas tanto atenuantes (Wang & Simon, 1999; Montasser et al., 1998) como severos (RNA5 associado ao CMV - CARNA 5) (Gonsalves et al., 1982, Kaper et al., 1988). Alonso-Prados et al. (1998) observaram uma heterogeneidade de RNAs satélites nas populações, mostrando que em 100 variantes de RNA satélite pode-se formar uma população que não é estruturada de acordo com o lugar, ano, planta hospedeira ou estirpe do vírus

auxiliar, concluindo que o CMV satRNA espalha-se epidemicamente como um hiper-parasita na população de seu vírus auxiliar. Essa diversidade genética dos RNAs satélites deve-se, principalmente, à acumulação sequencial de mutações (Fraile et al. 1994).

Devido a diferenças de especificidade e sensibilidade dos testes de diagnóstico, há a necessidade de se utilizar diferentes técnicas em conjunto, que proporcionem resultados confiáveis, minimizando erros. O diagnóstico, identificação, caracterização e comparação de estirpes do CMV têm sido realizados através de diferentes métodos, tais como hibridização de ácido nucléico, eletroforese viral, efeito biológico em diferentes hospedeiros (Boari, 1998, Maciel-Zambolim, 1998, Rodríguez-Alvarado et al., 1995, Daniels & Campbell, 1992), mapeamento peptídico (Edwards & Gonsalves, 1983, Daniels & Campbell, 1992), sorologia através do “Enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) (Edwards & Gonsalves, 1983, Abdalla et al., 1991, De Blas et al., 1994, Haase et al., 1989, Daniels & Campbell, 1992), RT-PCR (De Blas et al., 1994) combinada com enzimas de restrição (Rizos et al., 1992, Maciel-Zambolim, 1998, Boari, 1998). Boari (1998), caracterizando molecularmente isolados do CMV, utilizou com sucesso para a realização do RT-PCR oligonucleotídeos iniciadores específicos para o CMV e para comprovar a presença de RNAs satélites. Métodos de amplificação de fragmentos do gene da proteína capsidial e região 3’ não traduzida, por transcrição reversa e reação em cadeia de polimerase (RT-PCR), associada a enzimas de restrição, foram utilizadas eficientemente na distinção de subgrupos do CMV. Atencio et al. (1997) identificaram o CMV diretamente de amostras de pimentão de campo através de extratos de RNA por RT-PCR e os produtos amplificados foram processados com enzimas de restrição *PvuII* e *VspI* para distinguir os subgrupos de CMV. Maciel-Zambolim (1998), utilizando RT-PCR combinado com enzima de restrição *EcoR I*, verificou na Califórnia a presença dos dois subgrupos do CMV em amostras foliares de tomateiros infectados, com predominância do subgrupo I. Singh et al. (1995), na Austrália, identificando isolados do CMV de amostras de banana, utilizaram com sucesso a técnica de RT-PCR combinada com as enzimas *EcoRI* e *MspI*. No Brasil, Boari (1998), distinguindo os subgrupos do CMV, observou que a enzima *EcoRI* sozinha não diferenciou adequadamente os isolados de CMV nos dois subgrupos, sendo necessário o uso da enzima *MspI*. Mavrodieva et al. (1997) encontraram pouca variação entre os padrões de digestão das enzimas *EcoRI* e *MspI*, indicando variabilidade entre isolados dentro dos subgrupos.

Rodríguez-Alvarado et al. (1995), purificando biologicamente isolados do CMV, inocularam plântulas de *Chenopodium quinoa* Willd. com extratos foliares de *N. tabacum* L. 'Xanthi nc' infectadas para obtenção de lesões locais individualizadas. Essas lesões foram transferidas individualmente em plântulas sadias de tabaco para multiplicação do vírus. No processo de caracterização viral, após o procedimento de purificação, usualmente utiliza-se hospedeiros diferenciais para a identificação das estirpes virais. Maciel-Zambolim (1998), caracterizando 22 isolados de CMV, observou que sintomas em *N. tabacum* 'Havana 425' e *N. tabacum* 'Xanthi' permitiram distinguir CMV I do CMV II. As estirpes do subgrupo I apenas provocaram sintomas sistêmicos sem ocorrência de lesões locais nesses hospedeiros, enquanto estirpes do subgrupo II provocaram sintomas de anéis necróticos e/ou desenho em forma de linhas nas folhas inoculadas, e mosaico nas folhas não inoculadas. Boari (1998) estudando a gama de hospedeiros do vírus no Brasil, selecionou as espécies *N. glutinosa* e *N. edwardsonii* como aquelas capazes de diferenciar subgrupos do CMV. Foi observado que os isolados do CMV I causaram apenas mosaico sistêmico nas hospedeiras e CMV II, clorose sistêmica das nervuras.

Os danos na produção de pimentão, induzidos pelo CMV, podem ser significativos, especialmente nas épocas de maior incidência e/ou quando a infecção das plantas ocorre precocemente. Esses danos podem ser tanto quantitativos como qualitativos, pois além da redução no tamanho e no peso dos frutos, podem ficar manchados e/ou deformados.

Devido ao fato de muitas espécies vegetais servirem de reservatório do CMV entre as estações do ano (Simons, 1957; Douine et al., 1979; Quiot et al., 1979; Pares & Gunn, 1989; Rist & Lorbeer, 1989; Brunt et al., 1990; Kearney et al., 1990; Daniels & Campbell, 1992; Nono-Womdim et al., 1993a; Atencio et al., 1997; Sikora et al., 1998) e da ocorrência natural de numerosas estirpes do vírus ao redor de todo o mundo, o controle do CMV torna-se difícil. Brioso (1996) destaca a importância da utilização de cultivares tolerantes ao inseto vetor, pois o uso de inseticidas é ineficiente em razão da forma de transmissão do vetor ser do tipo não circulativo (picada de prova). O combate aos afídeos vetores com aplicação de inseticidas não é recomendável devido a resultados insatisfatórios obtidos (Chalfant et al., 1977; Wyman et al., 1979; Orozco et al., 1994). Trabalhos experimentais para a redução da infestação dos vetores através da cobertura do solo com casca de arroz ou outras superfícies refletoras foram desenvolvidas para o controle desses vetores, mostrando resultados positivos, porém com

dificuldades de utilização prática (Moore et al., 1965; Adlerz & Everett, 1968; Costa & Costa, 1971; Chalfant et al., 1977; Wyman et al., 1979; Perring et al., 1989; Brown et al., 1993; Orozco et al., 1994). Medidas de controle devem ser desenvolvidas de modo que funcionem em convivência com o patógeno, pois a sua erradicação é impraticável.

Entre as medidas de controle em convivência, tem-se estudado a utilização de RNA satélite como agente de controle biológico (vacina) capaz de atenuar os sintomas do CMV (Tien & Wu, 1991; Kosaka & Fukunishi, 1997; Montasser et al., 1998; Wang & Simon, 1999), o desenvolvimento de cultivares transgênicos tolerantes ou resistentes ao CMV (Kim et al., 2000; Zhu et al., 2000) e a utilização da resistência ou tolerância de plantas para o controle do mosaico causado pelo CMV em cultivares de pimentão e pimenta (Nono-Womdim et al., 1991; Nono-Womdim et al., 1993b; Dogimont et al., 1994; Lapidot et al., 1997; Soler et al., 1999; Grube et al., 2000)

Fontes de resistência ao CMV em *Capsicum* spp. têm sido descritas por diversos autores, sendo que uma das mais estudadas e utilizadas em melhoramentos genéticos para a transferência de sua característica de tolerância ao CMV é a pimenta indiana *C. annuum* 'Perennial' (Van Der Plank, 1968, Singh & Thakur, 1977, Nono-Womdim et al., 1991, Dogimont et al., 1994, Nono-Womdim et al., 1993a, Nono-Womdim et al., 1993b, Lapidot et al., 1997, Grube et al., 2000).

Não há relato, até o momento, de cultivar de pimentão com resistência completa ao CMV. Alguns dos cultivares utilizados comercialmente no Brasil não apresentam resistência ao vírus, tais como Avelar, Agrônômico 10-G, Gigante Inowe, Margareth, Magda, híbrido Magali R, híbrido Atenas AG-322, híbrido Safari, Apolo AG-511, Hércules AG-672, Itaipu, híbrido Amanda, híbrido Ligia, Acauã e Híbrido Maira, Nathalie, Rubia R, Maximus, Elisa e Priscila, sujeitos a danos provocados pela infecção viral e conseqüente prejuízos na comercialização. Veñals et al. (1996) listaram alguns cultivares com resistência parcial, como Moura e Ikeda (do Brasil), que são tolerantes em campo, Perennial (da Índia), Antibois, Val e Piment Sucette (da França).

Entre as medidas de controle em convivência, tem-se estudado a utilização de RNA satélite que possa atenuar os sintomas do CMV (Kosaka & Fukunishi, 1997; Montasser et al., 1998; Wang & Simon, 1999), o desenvolvimento de cultivares transgênicos tolerantes ou resistentes (Kim et al., 2000; Zhu et al., 2000) e o melhoramento genético visando a resistência

ou tolerância de plantas para o controle do mosaico causado pelo CMV em cultivares de pimentão e pimenta (Nono-Womdim et al., 1991; Nono-Womdim et al., 1993b; Dogimont et al., 1994; Lapidot et al., 1997; Soler et al., 1999; Grube et al., 2000). Resistência genética, quando derivada de genes que ocorrem naturalmente ou por manipulação das seqüências gênicas, permanece a melhor estratégia para limitar perdas provocadas por essas doenças (Kyle, 1993).

Há diferentes mecanismos de resistência que podem ser identificados no processo de seleção de plantas resistentes a viroses. Russel (1978) destacou a resistência à transmissão pelos vetores, escape da infecção viral, seqüestro do vírus após infecção, impedindo sua multiplicação, resistência à translocação na planta, à multiplicação do vírus e à aquisição do vírus pelo vetor. Além desses tipos de resistência, Veñals et al. (1996) também relataram a capacidade de certas plantas de recuperarem-se à infecção, apresentando sintomas fracos principalmente nos frutos. Kyle (1993) apontou a resistência a vetores de doença viral e a resistência dependente de mecanismos que reduzem a eficiência de transmissão na planta, como os tipos de resistência que podem ocorrer, porém ainda pouco estudados. A avaliação visual de sintomas no melhoramento de plantas tolerantes permanece como um critério de ampla utilização nesse processo (Lapidot et al., 1997). Fraser (1990) destacou a hipersensibilidade como uma reação local, restrita a células invadidas ou adjacentes a essas, sendo que a restrita localização do vírus é considerada uma resposta de resistência da planta ao patógeno viral.

Fontes de resistência ao CMV em *Capsicum* spp. têm sido descritas por diversos autores, sendo que a mais caracterizada e utilizada é a pimenta indiana *C. annuum* 'Perennial'. Esse cultivar não é apenas tolerante à infecção, mas pela inibição parcial da multiplicação do vírus, também é considerado resistente, mostrando a diversidade de mecanismos de resistência parcial que pode ocorrer em uma espécie (Nono-Womdim et al., 1993a). Cultivares resistentes apresentam gene ou genes que conferem resistência a um vírus específico, podendo ser dominada por isolados virulentos ou mutantes do vírus (Fraser, 1990). Há algumas controversas na herança da resistência em 'Perennial', como sendo poligênica recessiva (Grube et al., 2000), monogênica recessiva (Singh & Thakur, 1977), ou caracterizada por dominância incompleta e herdada quantitativamente (Lapidot et al., 1997).

Nono-Womdim et al. (1991), estudando o movimento de CMV em plantas de pimentão, observaram que os cultivares ‘Milord’ e ‘Vania’ foram resistentes à migração do vírus. Esses autores ainda destacaram que essa migração está relacionada ao genótipo da planta, estágio de seu desenvolvimento e temperatura ambiente. Dogimont et al. (1994) observaram que a migração do vírus ficou restrita aos cotilédones inoculados em plântulas dos cultivares ‘Milord’ e ‘Vania’ com uma determinada estirpe do CMV (Fulton CMV/N). Ainda demonstraram que o nível de expressão de resistência depende do estágio de desenvolvimento da planta, condições ambientais e da concentração do inóculo. Em campo, Nono-Womdim et al. (1993b), relataram a eficiência da resistência encontrada nos cultivares ‘Vania’ e ‘Milord’, devido à reduzida incidência do CMV e ao atraso na disseminação do vírus em três anos de estudo. Esse trabalho sugere que a resistência de CMV atua de modo combinado entre resistência horizontal e vertical. Van Der Plank (1968) explica que a resistência horizontal reduz o grau de infecção aparente e a vertical atrasa a epidemia. Em outro experimento, Nono-Womdim et al. (1993a), estudando a multiplicação do CMV em *C. annuum* susceptíveis e resistentes, determinaram que o cultivar Yolo Wonder foi susceptível ao CMV, reagindo com sintomas sistêmicos à infecção, enquanto na cultivar ‘Perennial’ o vírus foi recuperado em folhas não inoculadas, e em ‘Vania’, restrito às folhas inoculadas. Os autores concluíram que a restrição do vírus nas folhas inoculadas de ‘Vania’ foi devido à multiplicação do vírus apenas nesse local, concordando com dados obtidos por Nono-Womdim et al. (1991) quando relataram a inibição da migração do vírus nesse cultivar. Perennial foi resistente à multiplicação do CMV, devido à baixa extração e infecção viral nesse cultivar em relação ao ‘Yolo Wonder’ e ‘Vania’ (Nono-Womdim et al., 1993a). Grube et al. (2000) revelaram a resistência a diversos isolados do CMV em *C. frutescens* ‘BG2814-6’, regulada por ao menos dois genes recessivos. Esses autores indicaram ainda que a resistência em plantas de ‘BG2814-6’ e ‘Perennial’ não é absoluta, devido à detecção do vírus nas folhas não inoculadas, mesmo que em baixa porcentagem. Lapidot et al. (1997), introduzindo tolerância do cultivar indiano ‘Perennial’ em diversas outras pimentas doces do tipo “sino”, determinaram que a tolerância foi regulada por dominância incompleta, não havendo associação entre níveis de acumulação do vírus nas folhas mais altas da planta e o grau de tolerância ao vírus. Concluíram que a base para o desenvolvimento de cultivares tolerantes a partir de ‘Perennial’ é primeiramente a habilidade do cultivar de recuperar-se de altos títulos de vírus e não de sua restrição à multiplicação viral.

Apesar da tolerância e resistência de plantas ser um dos fatores de destaque e de eficiência na proteção de campo contra vírus, há situações que dificultam os trabalhos de melhoramento, como a descoberta de poucos materiais resistentes, a sensibilidade de plantas tolerantes a métodos de inoculação, idade do hospedeiro, estirpe do vírus e condições ambientais, a associação entre características hortícolas mínimas e a tolerância de plantas, e a incapacidade de estabilização da reação de tolerância (sintomas sistêmicos fracos) em determinada população de plantas (Watterson, 1993).

A idade da planta na inoculação é uma variável altamente significativa na expressão da doença e pode ser manipulada no processo de seleção para se alcançar o nível mais favorável de severidade entre populações segregantes ou em materiais melhorados. O efeito das doenças virais pode se tornar mais ou menos drástico se a planta for infectada no início do desenvolvimento ou na maturidade (Kyle, 1993). Paulus et al, (1962) observou que pimentões inoculados no estágio juvenil de primeiras folhas verdadeiras foram mais afetados que aqueles inoculados tardiamente.

Devido ao valor econômico e alimentício característico do pimentão, às exigências do mercado consumidor para aquisição de produtos de alta qualidade organoléptica, aparência dos produtos expostos à venda e ao aumento de produtividade das lavouras, há necessidade de maiores estudos que viabilizem o desenvolvimento de resistência ou tolerância genética ao CMV em cultivares de pimentão comerciais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Populações de plantas utilizadas nos ensaios experimentais

Nos testes de purificação, manutenção e multiplicação dos isolados virais, realizados em casa-de-vegetação, foram utilizadas plantas das espécies *N. glutinosa* e *C. quinoa*. No teste biológico de diferenciação dos isolados de CMV foram utilizadas plantas de *N. tabacum* ‘Havana 425’, *V. unguiculata* (feijão caupi) e *N. glutinosa*. Na obtenção das plântulas, foram utilizados vasos de plástico como sementeira, com volume aproximado de 1L. O transplante foi efetuado em novos vasos individualizados de mesmo volume, contendo terra misturada com

composto orgânico e adição semanal de nutrientes minerais, mantendo-se duas plantas por vaso.

Nos testes realizados em casa-de-vegetação para avaliar a reação de *Capsicum* spp. ao CMV foram utilizadas as seguintes espécies: *N. glutinosa*, *C. quinoa* e 189 acessos de pimentão e pimenta das espécies *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinensi* e *C. baccatum* (Tabela 1). Plântulas de pimentão e pimenta, por sua vez, foram obtidas a partir de semeadura em bandejas de isopor com 128 células, preenchidas com substrato industrializado à base de vermiculita, com duas sementes por célula, totalizando 16 sementes para cada acesso, mantidas em casa-de-vegetação com irrigação automática. As regas foram realizadas intermitentemente a cada 2 horas. Posteriormente, com aproximadamente 5 folhas, 10 plântulas de cada cultivar por repetição experimental foram selecionadas aleatoriamente e transferidas para bandejas de isopor com 72 células de maior volume, proporcionando melhor desenvolvimento vegetativo. Para o florescimento e frutificação, as 10 plântulas foram transferidas para vasos de aproximadamente 10 L, contendo substrato e macro e micro-nutrientes minerais. Foram mantidas quatro plantas por vaso em casa-de-vegetação, com fertirrigação via gotejamento. O cultivar de pimentão Magali R, altamente sensível ao CMV, foi utilizado como controle das inoculações. A população de *Capsicum* spp, utilizada nos testes de resistência, foi gentilmente cedida pelo prof. Dr. Cyro Paulino da Costa, do Departamento de Horticultura da ESALQ-USP. Particularmente, dois cultivares provenientes dos EUA, Tolomeu e LY8080 ('Eppo'), que estão em fase de testes de campo no Brasil, foram cedidos pela empresa Syngenta.

Tabela 1. Acessos de *Capsicum* spp. utilizados nos ensaios de reação de plantas ao CMV.

Código	Acessos	Espécie	Procedência
1	HV-12	<i>C. annuum</i>	EUA
2	Tolomeu	<i>C. annuum</i>	EUA
3	LY 8080	<i>C. annuum</i>	EUA
4	Reiger	<i>C. annuum</i>	Brasil
5	Magali R	<i>C. annuum</i>	Brasil
6	Criollo de Morelos	<i>C. annuum</i>	Brasil

7	CNPH 40	<i>C. annuum</i>	Brasil
8	CNPH 145	<i>C. annuum</i>	Brasil
9	BGH 3890	<i>C. annuum</i>	Brasil
10	BGH 3886	<i>C. annuum</i>	Brasil
11	90	<i>C. annuum</i>	Brasil
12	R-17	<i>C. annuum</i>	Filipinas
13	Pimenta Roque	<i>C. annuum</i>	México
14	Pimenta Ornamental Picante	<i>C. annuum</i>	Brasil
15	Pimenta Doce IH 1763	<i>C. annuum</i>	Brasil
16	Pimenta Doce IH 1750	<i>C. annuum</i>	Brasil
17	Pimenta Doce IH 1758	<i>C. annuum</i>	Brasil
18	Pimenta Doce IH 1761	<i>C. annuum</i>	Brasil
19	ICA 63	<i>C. annuum</i>	Colômbia
20	Pimenta Ornamental nº 5	<i>C. annuum</i>	Brasil
21	Emerald Isle F1	<i>C. annuum</i>	EUA
22	Marvello F1	<i>C. annuum</i>	França
23	Magali	<i>C. annuum</i>	Brasil
24	Pepper 571580 F1	<i>C. annuum</i>	EUA
25	Pepper 529802118 F1	<i>C. annuum</i>	EUA
26	Pepper 529801145 F1	<i>C. annuum</i>	EUA
27	AF 2710	<i>C. annuum</i>	Brasil
28	P-48	<i>C. annuum</i>	França
29	Quantum-R F1	<i>C. annuum</i>	França
30	CLX P907 F1	<i>C. annuum</i>	França
31	CLX P1454 F1	<i>C. annuum</i>	França
32	CLX P965 F1	<i>C. annuum</i>	França
33	CLX P1463 F1	<i>C. annuum</i>	França
34	Hercules F1	<i>C. annuum</i>	Brasil
35	P49-R	<i>C. annuum</i>	França
36	Conan	<i>C. annuum</i>	Brasil

37	PEP 1216-VP	<i>C. annuum</i>	EUA
38	PZ14 F1	<i>C. annuum</i>	Holanda
39	PY13 F1	<i>C. annuum</i>	Holanda
40	Zafiro RZ	<i>C. annuum</i>	Holanda
41	PI 159236	<i>C. annuum</i>	EUA
42	Perennial	<i>C. annuum</i>	Índia
43	5543	<i>C. annuum</i>	EUA
44	481	<i>C. annuum</i>	EUA
45	Ikeda	<i>C. annuum</i>	Brasil
46	124	<i>C. annuum</i>	Filipinas
47	132	<i>C. annuum</i>	Filipinas
48	138	<i>C. annuum</i>	Filipinas
49	36	<i>C. annuum</i>	Filipinas
50	125	<i>C. annuum</i>	Filipinas
51	Agrônômico 10G	<i>C. annuum</i>	Brasil
52	Ancho	<i>C. annuum</i>	México
53	Ano Todo	<i>C. annuum</i>	Brasil
54	Avelar	<i>C. annuum</i>	Brasil
55	BGH 3058 (vermelho)	<i>C. annuum</i>	Brasil
56	BGH 3464	<i>C. annuum</i>	Brasil
57	BGH 3058 (chocolate)	<i>C. annuum</i>	Brasil
58	BGH 3743	<i>C. annuum</i>	Brasil
59	BGH 3744	<i>C. annuum</i>	Brasil
60	BGH 3756	<i>C. annuum</i>	Brasil
61	BGH 3757	<i>C. annuum</i>	Brasil
62	BGH 3757 (comprido)	<i>C. annuum</i>	Brasil
63	BGH 3886 (Cubano Amarillo)	<i>C. annuum</i>	Brasil
64	BGH 3890	<i>C. annuum</i>	Brasil
65	BGH 3896	<i>C. annuum</i>	Brasil
66	BGH 3878	<i>C. annuum</i>	Brasil

67	BGH 3978	<i>C. annuum</i>	Brasil
68	BGH 3464	<i>C. annuum</i>	Brasil
69	BGH 3756	<i>C. annuum</i>	Brasil
70	BGH 3884	<i>C. annuum</i>	Brasil
71	BGH 3758	<i>C. annuum</i>	Brasil
72	BGH 3881	<i>C. annuum</i>	Brasil
73	BGH 3888	<i>C. annuum</i>	Brasil
74	BGH 3889	<i>C. annuum</i>	Brasil
75	BGH 4016	<i>C. annuum</i>	Brasil
76	Calahora	<i>C. annuum</i>	México
77	Caprioglio	<i>C. annuum</i>	Itália
78	Catarino Cascavel	<i>C. annuum</i>	México
79	CATIE 8063	<i>C. annuum</i>	Costa Rica
80	CNPH 144	<i>C. annuum</i>	Brasil
81	CNPH 145	<i>C. annuum</i>	Brasil
82	CNPH 146	<i>C. annuum</i>	Brasil
83	CNPH 162	<i>C. annuum</i>	Brasil
84	CNPH 185	<i>C. annuum</i>	Brasil
85	CNPH 40	<i>C. annuum</i>	Brasil
86	Corno di Toro	<i>C. annuum</i>	Itália
87	El Saltenito	<i>C. annuum</i>	México
88	Florida VR-4	<i>C. annuum</i>	EUA
89	ICA 8 Mogi	<i>C. annuum</i>	Colômbia
90	ICA 12	<i>C. annuum</i>	Colômbia
91	ICA 131	<i>C. annuum</i>	Colômbia
92	ICA 132	<i>C. annuum</i>	Colômbia
93	ICA 218	<i>C. annuum</i>	Colômbia
94	Jalapeno	<i>C. annuum</i>	Brasil
95	Jalapeño	<i>C. annuum</i>	México
96	Jalapeño Cica 1	<i>C. annuum</i>	México

97	Kan Cluster	<i>C. annuum</i>	EUA
98	Maalab	<i>C. annuum</i>	Filipinas
99	Marconi	<i>C. annuum</i>	EUA
100	Mexicana Tosello	<i>C. annuum</i>	México
101	Morrones	<i>C. annuum</i>	Portugal
102	Mulato Dulce	<i>C. annuum</i>	Portugal
103	Mulato V2	<i>C. annuum</i>	México
104	Myr 10	<i>C. annuum</i>	Brasil
105	<i>C. annuum</i> 187331	<i>C. annuum</i>	EUA
106	PI 188476	<i>C. annuum</i>	EUA
107	Pimenta Ornamental P01	<i>C. annuum</i>	Brasil
108	Pimenta Ornamental P001	<i>C. annuum</i>	Brasil
109	Pimenta Roque	<i>C. annuum</i>	México
110	ICA 63	<i>C. annuum</i>	Colômbia
111	Pimenta Doce IH 1744	<i>C. annuum</i>	Brasil
112	Aji Rojo 258	<i>C. annuum</i>	Bolívia
113	Arivivi 261	<i>C. annuum</i>	Bolívia
114	BGH 5122	<i>C. annuum</i>	Brasil
115	ICA 64	<i>C. annuum</i>	Colômbia
116	Jalapeno (Monte Alto)	<i>C. annuum</i>	Brasil
117	K homernahu	<i>C. annuum</i>	Bolívia
118	Pimenta Verde	<i>C. annuum</i>	Brasil
119	Pimenta 17	<i>C. annuum</i>	Brasil
120	BGH 3883	<i>C. annuum</i>	Brasil
121	BGH 3759	<i>C. annuum</i>	Brasil
122	BGH 3887	<i>C. annuum</i>	Brasil
123	BGH 3757	<i>C. annuum</i>	Brasil
124	CNPH 32	<i>C. annuum</i>	Brasil
125	Catie 7300-121	<i>C. annuum</i>	Costa Rica
126	RFG/FAO 858	<i>C. annuum</i>	Guatemala

127	Aji Rojo 265	<i>C. annuum</i>	Bolívia
128	Arivivi 142	<i>C. annuum</i>	Bolívia
129	Pimenta Doce IH 1749	<i>C. annuum</i>	Brasil
130	Pimenta Malagueta	<i>C. annuum</i>	Tacarantus-PE
131	Pimenta 102b	<i>C. annuum</i>	Brasil
132	Aji 263	<i>C. baccatum</i>	Bolívia
133	Aji 264	<i>C. baccatum</i>	Bolívia
134	ICA 146	<i>C. baccatum</i>	Colômbia
135	Pimenta IH 1492	<i>C. baccatum</i>	Brasil
136	Aji 286	<i>C. baccatum</i>	Bolívia
137	Aji Amarillo 126	<i>C. baccatum</i>	Bolívia
138	RFG/fAO 553	<i>C. baccatum</i>	Guatemala
139	Aji Amarillo 269	<i>C. baccatum</i>	Bolívia
140	Aji Amarillo 60	<i>C. baccatum</i>	Bolivia
141	Aji Amarillo 67	<i>C. baccatum</i>	Bolivia
142	Aji Limo	<i>C. baccatum</i>	Peru
143	Arivivi 212	<i>C. baccatum</i>	Bolívia
144	BGH 1037	<i>C. baccatum</i>	Brasil
145	BGH 1603	<i>C. baccatum</i>	Brasil
146	BGH 1675	<i>C. baccatum</i>	Brasil
147	BGH 2994	<i>C. baccatum</i>	Brasil
148	BGH 4176	<i>C. baccatum</i>	Brasil
149	BGH 4301	<i>C. baccatum</i>	Brasil
150	BGH 4366	<i>C. baccatum</i>	Brasil
151	BGH 5025	<i>C. baccatum</i>	Brasil
152	Guarnica 243	<i>C. baccatum</i>	Bolivia
153	Habanera BGH 592	<i>C. baccatum</i>	México
154	ICA 65	<i>C. baccatum</i>	Colômbia
155	Pimenta 236	<i>C. baccatum</i>	Brasil
156	Pimenta Bode	<i>C. baccatum</i>	Brasil

157	Pimenta Branca Piranga	<i>C. baccatum</i>	Brasil
158	Pimenta Coração	<i>C. baccatum</i>	Brasil
159	Uchu 148	<i>C. baccatum</i>	Bolivia
160	Yerba Mala 251	<i>C. baccatum</i>	Bolívia
161	Pimenta Bode Balão vermelha	<i>C. baccatum</i>	Brasil
162	ICA 60	<i>C. baccatum</i>	Bolívia
163	Aji 284	<i>C. baccatum</i>	Bolívia
164	Pimenta 154	<i>C. baccatum</i>	Brasil
165	Aji Rojo 268	<i>C. baccatum</i>	Bolívia
166	BGH 0620	<i>C. baccatum</i>	Brasil
167	Aji Amarillo 267	<i>C. baccatum</i>	Bolívia
168	Pimenta Cambuci	<i>C. baccatum</i>	Brasil
169	ICA 65	<i>C. baccatum</i>	Colômbia
170	Aji Limo	<i>C. baccatum</i>	Peru
171	Pimenta Chata	<i>C. chinensi</i>	Brasil
172	Rabo de Macaco	<i>C. chinensi</i>	Brasil
173	Pimenta cheiro laranja	<i>C. chinensi</i>	Brasil
174	Pimenta 122	<i>C. chinensi</i>	Brasil
175	Murici IH 1477	<i>C. chinensi</i>	Brasil
176	Murici IH 1490	<i>C. chinensi</i>	Brasil
177	Jobito Picante	<i>C. chinensi</i>	Venezuela
178	Pimenta Cheiro	<i>C. chinensi</i>	Brasil
179	Pimenta nº2	<i>C. chinensi</i>	Brasil
180	Pimenta nº5	<i>C. chinensi</i>	Brasil
181	Pimenta Doce IH 1766	<i>C. chinensi</i>	Brasil
182	Pimenta Indio	<i>C. chinensi</i>	Brasil
183	Santarém 50	<i>C. chinensi</i>	Brasil
184	PI 152225	<i>C. chinensi</i>	EUA
185	ICA 39	<i>C. chinensi</i>	Colômbia
186	Murici IH 1473	<i>C. chinensi</i>	Brasil

187	Habanera	<i>C. chinensi</i>	México
188	Pimenta 99 Planta 2	<i>C. chinensi</i>	Brasil
189	Aji Dulce	<i>C. chinensi</i>	Venezuela

3.2 Fonte dos isolados virais

Os isolados de CMV foram obtidos a partir de coletas realizadas em diferentes acessos de pimentão e pimenta (*Capsicum* spp.) com sintomas indicativos de infecção viral, como mosaico e deformações foliares, crescimento reduzido da planta, ou mesmo amostras coletadas de plantas assintomáticas. Foi possível totalizar 113 amostras coletadas em diferentes propriedades nos municípios de Salto-SP, em março de 2002 (29 amostras), e em Lins-SP, em maio de 2002 (55 amostras). Uma (1) amostra foi adquirida no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, sendo gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Jorge Alberto Marques Rezende, em julho de 2002. Outras 9 amostras representativas de pimentão coletadas de setembro a dezembro de 2001, provenientes dos municípios de Piacatu-SP, Lins-SP, Tuiuti-SP, Cajarana-SP, Joanópolis-SP e Taguatinga-DF foram gentilmente cedidas pelos Drs. Rômulo Kobori e Ricardo Gioria, da Sakata Seed Sudamerica, de Bragança Paulista-SP. Em novembro de 2000 foram coletadas 19 amostras de pimentão no município de Lins-SP, posteriormente dessecadas e armazenadas no Laboratório de Virologia do Departamento de Produção Vegetal da FCA/UNESP para as devidas análises. No processo de caracterização dos isolados do CMV foram utilizados como controles um isolado de CMV-II na forma de plasmídio, mantido *in vitro* a -20°C (CMV-S), uma estirpe de CMV contendo o RNA satélite (satRNA), mantido dessecado e *in vivo* em *N. glutinosa*, ambos gentilmente cedidos pela Dra. Alessandra de Jesus Boari, e um isolado de CMV-I proveniente de pimentão (*C. annuum*) do município de Lins-SP, cedido pela Sakata Seed Sudamerica

Todas as amostras coletadas em campo foram individualizadas em sacos plásticos com identificação numérica e transportadas em caixa de isopor até o laboratório. Parte de cada amostra de folha coletada foi utilizada em testes sorológicos iniciais e o restante dessecado em placas de Petri contendo Carbonato de Cálcio. As placas foram vedadas e mantidas em

dessecador por aproximadamente 15 dias a 4°C. Em seguida, as amostras dessecadas foram transferidas para pequenos frascos de vidro individualizados contendo sílica-gel, perfeitamente vedados, rotulados e armazenados em freezer a -20°C para conservação e posterior utilização. Amostras negativas quanto à presença do CMV nos testes de ELISA foram descartadas.

3.3 Inoculação Mecânica

O processo de inoculação mecânica consistiu na maceração foliar de plantas infectadas em almofariz estéril na proporção de 1:50 (Peso:Volume) aproximadamente, na presença de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,2, contendo sulfito de sódio 0,01 M. O extrato obtido foi aplicado, manualmente, em folhas novas e sadias das plantas, previamente polvilhadas com carbureto de silício (Carborundum), individualmente, nos diversos ensaios realizados. Em seguida, as folhas foram lavadas com água para remoção do excesso de inóculo e de abrasivo. Foram utilizados detergente neutro e álcool 70% para a assepsia das mãos a cada procedimento de inoculação.

3.4 Teste sorológico dos isolados virais

O teste sorológico de ELISA indireto (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”) do tipo PTA (“Plate Trapped Antigen”) (Mowat & Dawson, 1987), com algumas modificações, foi utilizado nas seguintes situações: a) identificação nas amostras coletadas em campo dos principais vírus que infectam as espécies do gênero *Capsicum*, destacando-se: o CMV, TSWV, TMV, ToMV, PVY e PMMoV; b) monitoramento das inoculações das plantas de *N. glutinosa* por ocasião da purificação biológica, multiplicação e manutenção dos isolados de CMV; c) monitoramento da inoculação das populações de pimentão e pimenta por ocasião dos testes de resistência em casa-de-vegetação; d) monitoramento da inoculação de plantas de *N. glutinosa* quando da recuperação de sintomas das plantas de *Capsicum* spp.; e) detecção de vírus contaminantes nos experimentos de casa-de-vegetação, sempre que necessário, utilizando-se antissoros contra o TMV, ToMV, TSWV, PVY e PMMoV.

As amostras submetidas ao teste sorológico foram primeiramente maceradas em almofariz, na presença de tampão de carbonato de sódio, pH 9,6 e diluição de 1:20. Foram

colocados 100 µL do extrato de cada amostra por “pocinho” na placa de ELISA, seguido de incubação por 1 hora e 30 minutos a 37°C. A placa foi lavada por três vezes consecutivas com PBS-Tween com posterior secagem. Foram adicionados 100 µL de antissoro diluído em tampão Tris-HCl, pH 7,2, seguido de incubação por 1 hora e 30 minutos a 37°C. Os antissoros policlonais específicos para os vírus, utilizados nessa etapa, foram adquiridos da AGDIA, com exceção do antissoro para CMV, que foi cedido pelo Prof. Dr. Jorge Alberto Marques Rezende, da ESALQ-USP. A placa foi então lavada três vezes consecutivas com PBS-Tween com posterior secagem. Em seguida, foram adicionados 100 µL de imunoglobulina G conjugada com fosfatase alcalina, diluída em tampão Tris-HCl, pH 7,2, em cada pocinho, seguido de incubação por 1 hora e 30 minutos a 37°C. A placa foi lavada três vezes consecutivas com PBS-Tween com posterior secagem. Foram adicionados 100 µL de pastilha de nitrofenil fosfato diluída em tampão de dietanolamina, 0,6 mg/mL, pH 9,8, em cada pocinho. A placa foi incubada à temperatura ambiente e no escuro por 30 a 40 minutos. A reação foi verificada visualmente e analisada medindo-se a absorbância a 405 nm no Leitor de Elisa Σ 960 (Metertech, Taiwan). Uma amostra foi considerada positiva quando o valor de absorbância foi três vezes superior à do extrato da planta sadia.

3.5 Purificação biológica e manutenção dos isolados do CMV

Isolados do CMV detectados nas amostras foliares coletadas de *Capsicum* spp, em infecção mista ou não, através do PTA-ELISA, foram transferidos via inoculação mecânica para plantas de *N. glutinosa*. Após 15 dias, aproximadamente, amostras das plantas que apresentaram mosaico foram retiradas e maceradas com a finalidade de inoculação dos extratos foliares em plantas individualizadas de *C. quinoa* com aproximadamente 5 a 6 folhas. Lesão local simples e única formada em *C. quinoa* foi removida individualmente com extrator cilíndrico de metal, macerada na presença de tampão de fosfato de potássio e inoculada em duas plântulas saudáveis de *N. glutinosa* com aproximadamente 3 a 4 folhas. Três passagens monolesionais foram realizadas a partir de *C. quinoa* para *N. glutinosa*, a fim de purificar os isolados de CMV. Durante o processo, foram efetuados testes sorológicos de ELISA no monitoramento das inoculações, confirmando-se a infecção das plantas inoculadas. Plantas de

N. glutinosa foram utilizadas como hospedeiras de multiplicação e manutenção dos isolados virais. Os materiais dessecados de cada isolado purificado foram mantidos em frascos de vidros rotulados e armazenados a -20°C , como fonte recorrente para manutenção da pureza viral ‘*in vivo*’ durante todos os ensaios. Periodicamente, a cada 60 dias, aproximadamente, foram transferidos os isolados das amostras dessecadas para *N. glutinosa*, eliminando possíveis contaminações no decorrer dos testes. Todas as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação do Departamento de Proteção de Plantas da FCA/UNESP, Botucatu-SP.

3.6 Teste de hospedeiro diferenciador dos isolados virais

No teste biológico complementar de diferenciação dos isolados de CMV foram utilizadas plântulas de *V. unguiculata*, *N. tabacum* ‘Havana 425’ e *N. glutinosa*, a fim de se observar possíveis diferenças sintomatológicas nessas espécies, provocadas por distintas estirpes de CMV. As estirpes purificadas mantidas em *N. glutinosa* foram mecanicamente inoculadas em folhas novas de 2 plântulas dos hospedeiros diferenciais por vaso, com até 4 folhas definitivas, totalizando 4 plantas inoculadas por estirpe do vírus. Os sintomas foram observados durante 30 dias aproximadamente.

3.7 Análise molecular dos isolados virais

No processo de identificação molecular, os isolados foram classificados em subgrupos, mediante a utilização de RT-PCR e clivagem enzimática, empregando-se os oligonucleotídeos e enzima, específicos para os testes. Amostras foliares das plantas de *N. glutinosa*, inoculadas com os isolados purificados de CMV foram submetidas à extração do RNA viral pelo método de Bertheau et al. (1998), seguido da transcrição reversa e amplificação por RT-PCR. Os fragmentos de DNA obtidos da amplificação foram clivados com enzima de restrição a fim de se classificar os subgrupos do CMV em CMV I e CMV II e verificar a presença de RNA satélite nas amostras.

3.7.1 Extração dos RNAs virais

No processo de extração de RNA viral, de acordo com o método de Bertheau et al. (1998), as amostras frescas foram trituradas, cada qual, na proporção de 1:5 (P/V) de tampão PBS-Tween contendo PVP K (25mg/mL) a 2% (P/V) e Na-DIECA 20 mM. O conteúdo obtido foi transferido para um tubo de microcentrífuga e centrifugado por 10 minutos a 13000 rpm e a 4°C. Foram recolhidos 200µL do sobrenadante e transferidos para um novo tubo de 1000 µL. Com a finalidade de degradar a partícula viral, foram acrescentados 20µL SDS 10% e o conteúdo incubado a 55°C por 15 minutos em banho-maria. Para precipitar o RNA foram adicionados 100µL de solução de acetato de potássio a 3 M, agitado em “Vortex”, seguido de incubação em gelo por 5 minutos. O conteúdo foi centrifugado por 5 minutos a 13000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionados 700µL de Iodeto de sódio (NaI) 6 M mais 5 µL de solução contendo silício, previamente agitado em “Vortex” para a ressuspensão do silício. A solução foi agitada em vortex e mantida por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de centrifugação por 1 minuto a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” lavado por 2 vezes com 500 µL de solução de lavagem com auxílio de agitador. Entre cada lavagem a solução foi centrifugada por 1 minuto a 5000 rpm para o descarte do sobrenadante. O “pellet” contendo RNA viral foi seco a vácuo por 30 minutos e ressuscitado em 400 µL de água Milli-Q tratada com DEPC. O conteúdo foi agitado em “Vortex”, seguido de incubação por 5 minutos a 55°C e posterior centrifugação por 5 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante (300 µL) foi transferido a um novo tubo e armazenado a -20°C para posterior utilização na síntese de cDNA.

3.7.2 Amplificação de RNA e satRNA por RT-PCR

Para esta etapa, foi preparada uma reação contendo 5 µL de RNA do produto da extração, 5 µL de tampão 10X concentrado, 1,5 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂) a 50 mM, 50 mM de dNTP (mistura dos quatro nucleotídeos precursores: dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 0,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Platinum), 0,75 unidades de RTase e 30 µM de cada primer 5' *cp* (5'GCCGTAAGC TGGATGGACAA-3') e 3' *cp* (5'-

TATGATAAGAA(A/G)CTTGTTCGCG-3') que amplificaram um fragmento de DNA com 488 pb para CMV I e 500 pb para CMV II, incluindo 2/3 do gene da proteína capsidial (correspondendo ao terminal 3') e parte da região 3' não traduzida. O mesmo processo de amplificação foi utilizado para análise de RNA satélite, porém empregando um par de "primers" específicos: Primer CMV Sat A, 5'-GTTTTGTTTG(A/T)T (A/G)GAGAATT-3'), no sentido viral, e Primer CMV Sat B, 5'-GGGTCCTGGTAGAGGAATGA(A/G)-3', no sentido complementar, como descrito por Boari (1998). Todos os "primers" utilizados foram sintetizados e adquiridos da empresa Invitrogen.

A RT-PCR, efetuada a 35 ciclos, teve seu início a 42°C por 30 minutos, seguido pela desnaturação a 94°C por 3 minutos, mais 1 minuto a 94°C, anelamento e extensão do oligonucleotídeo a 55 °C por 2 minutos e alongamento, ou síntese de DNA, a 72°C por 2 minutos. Acrescentou-se mais 10 minutos a 72°C. O processo foi finalizado a 4°C.

Uma alíquota de 6 µL dos produtos amplificados foi analisada por eletroforese em gel de agarose (0,7%), em tampão Tris-borato-EDTA (TBE), com a utilização de marcador de massa molecular "1 kb ladder" (BRL).

3.7.3 Clivagem enzimática de fragmentos de DNA

Com o objetivo de distinguir os subgrupos do CMV em CMV I e CMV II, os fragmentos de DNA amplificados foram clivados com a enzima de restrição *Msp* I. No processo de digestão enzimática foram utilizados para cada amostra 5,8 µL de água destilada autoclavada com adição de 0,2 µL da enzima *Msp* I, 1 µL de tampão específico para a enzima e 3 µL do produto da amplificação (PCR) de cada amostra individualmente, totalizando 10 µL. A solução obtida foi mantida por 1 hora e 30 minutos a 37°C e 2 µL de corante azul de bromofenol foram acrescentados ao produto da reação a fim de análise em gel de agarose (1,5%).

3.8 Seleção de isolado severo do CMV para avaliação da reação de *Capsicum* spp.

Para o procedimento de avaliação da reação das plantas nas populações de *Capsicum* spp. um único isolado severo foi selecionado, dentre os 23 isolados previamente purificados, identificados e mantidos em casa-de-vegetação. A patogenicidade desses isolados virais foi avaliada biologicamente através de sintomatologia em plantas de *N. glutinosa*, acompanhada de testes sorológicos para confirmação da infecção. Três plantas de *N. glutinosa* serviram como hospedeiras de cada isolado da coleção. As plantas foram inoculadas em uma única etapa, utilizando 2 folhas de cada planta. O ensaio constou de três repetições, totalizando 9 plantas avaliadas para cada isolado do CMV. A avaliação de patogenicidade em *N. glutinosa* teve início 5 dias após a inoculação e as plantas receberam notas de sintomas, variando de 1,00 a 5,00, durante 30 a 40 dias, aproximadamente. O isolado que se mostrou mais agressivo em todos os testes, provocando os mais severos sintomas (nota média 5,00), foi selecionado para os experimentos de resistência em casa-de-vegetação.

3.9 Teste de recuperação do isolado do vírus selecionado para reação de *Capsicum* spp. ao CMV

O teste de recuperação do vírus em *Capsicum* spp. foi realizado, principalmente, para a avaliação de características de tolerância, devido à presença do CMV em plantas assintomáticas, ou de resistência, quando da ausência de multiplicação do vírus em plantas inoculadas. Extratos foliares individualizados de plantas de pimentão e pimenta assintomáticas foram inoculados mecanicamente em um par de folhas novas de plântulas de *N. glutinosa*, que são altamente sensíveis ao CMV, respondendo com sintomas de mosaico severo, deformações foliares e redução no tamanho de planta. As observações de sintomas foram feitas periodicamente após a inoculação, por até 30 dias aproximadamente.

A infecção de todas as plantas de *Capsicum* spp. inoculadas com o isolado severo do CMV foi confirmada com auxílio do teste sorológico do tipo PTA-ELISA 15 dias após a primeira inoculação. A indexação biológica do isolado do vírus, em plantas de *N. glutinosa*, foi realizada sempre que as plantas inoculadas de pimentão e pimenta não manifestaram sintomas. Foi possível verificar características de tolerância ou de resistência das plantas

submetidas aos desafios com o CMV. Deve-se destacar que o processo de inoculação do extrato das plantas de *Capsicum* spp. foi realizado evitando-se ao máximo qualquer contaminação que pudesse prejudicar as análises. Além da esterilização de todo o instrumental utilizado e lavagem das mãos com sabão e álcool 70% a cada inoculação, a mínima manipulação das plantas inoculadas foi imprescindível. O monitoramento das plantas contra agentes virais contaminantes foi realizado através de análise de sintomas e testes sorológicos sempre que necessário. Quando da contaminação por outros patógenos, principalmente virais, e manifestação de sintomas atípicos do CMV, as plantas contaminadas de *N. glutinosa* foram descartadas e a indexação repetida para que não gerasse nenhuma dúvida nos procedimentos e obtenção de resultados confiáveis.

3.10 Avaliação da reação de *Capsicum* spp. ao CMV

Para a avaliação da reação de *Capsicum* spp. ao CMV foram inoculados por duas vezes consecutivas acessos de pimentões e pimentas das espécies *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinensi* e *C. frutescens*, pertencentes à coleção do Departamento de Horticultura da ESALQ-USP (Tabela 2). A população de *Capsicum* spp. que apresentou indicativos de tolerância ou resistência ao vírus no primeiro ensaio, foi avaliada ao longo de mais dois experimentos conduzidos em casa-de-vegetação durante os anos de 2002 e 2003. As avaliações foram realizadas após 15 dias das inoculações e por mais, aproximadamente 40 a 50 dias. Após esse período, 3 plantas de cada acesso, tolerantes ou resistentes, foram mantidas sob observações e análises durante todo o ciclo vegetativo e reprodutivo, até a fase de frutificação e colheita. Os frutos desses materiais foram processados e as sementes estocadas para novos testes. A infecção foi confirmada através do teste de PTA-ELISA. A escala de notas de sintomas utilizada nas avaliações de cada planta variou de 1,00 a 5,00 (Tabela 3). Ao final dos três ensaios, foi possível o cálculo de uma nota média de sintomas de cada acesso, que definiu os materiais tolerantes, susceptíveis e resistentes ao CMV.

No primeiro ensaio experimental, discriminou-se aqueles materiais que se mostraram altamente susceptíveis nas populações de pimentão e pimenta que apresentaram sintomas severos de mosaico e deformações foliares precoces (nota média de sintomas acima de 4,00). No segundo ensaio experimental, apenas os acessos com a maioria das plantas classificadas

com notas médias de sintomas inferiores a 3,00 e, portanto potencialmente tolerantes, foram novamente avaliados. Na terceira fase experimental, as plantas-teste que receberam notas médias de sintomas iguais ou inferiores a 3,00 foram consideradas tolerantes nos testes visuais. Após análise sorológica e indexação biológica em plantas indicadoras de *N. glutinosa*, as plantas de *Capsicum* spp. com ausência de sintomas, porém com resultados positivos em sorologia, ou que apresentaram leves descolorações foliares (nota 1,00) e resultado positivo em sorologia, foram consideradas tolerantes. As plantas foram denominadas resistentes quando os resultados sorológicos foram expressos negativamente para as amostras de plantas inoculadas e assintomáticas. A reação das plantas foi expressa em número de plantas resistentes, número de plantas tolerantes e número de plantas susceptíveis, com notas médias de sintomas por planta. No caso particular do cultivar HV-12, devido à disponibilidade de plantas adultas (início de florescimento) e sadias em casa de vegetação, foram inoculadas 6 plantas desse cultivar, com monitoramento pelo teste sorológico. As inoculações foram realizadas em três períodos distintos, através de três perfurações em uma pequena área do caule e no pecíolo das plantas, com seringas esterilizadas, com inóculo proveniente de plantas de *N. glutinosa* infectadas com o isolado severo do CMV. Os locais de inoculação foram marcados com fita colorida para observações de sintomas. Os híbridos Tolomeu e LY8080, cedidos pela empresa “Syngenta”, também fizeram parte dos desafios com o isolado severo do CMV. Duas inoculações foram realizadas em 6 plantas de cada cultivar, a fim de aumentar a probabilidade de infecção.

Tabela 2 Populações de *Capsicum* spp. utilizadas nos ensaios de reação ao CMV.

Espécies	Número de acessos
<i>Capsicum annuum</i>	131
<i>Capsicum baccatum</i>	39
<i>Capsicum chinensi</i>	17
<i>Capsicum frutescens</i>	2
Total	189

Tabela 3 Notas de sintomas atribuídas às plantas na população de *Capsicum* spp .

Notas	Sintomas
1	Folhas levemente descoloridas ou opacas
2	Mosaico leve
3	Mosaico acentuado, sem bolhosidades ou deformação foliar
4	Mosaico acentuado, bolhosidades e/ou deformações foliares
5	Mosaico severo, bolhosidades, deformações foliares, folhas filiformes e redução do porte da planta

3.11 Efeito da idade de planta inoculada na expressão de sintomas do CMV

Paralelamente às análises de reação de *Capsicum* spp. ao CMV, foram realizadas observações da reação das plantas inoculadas em diferentes idades. Os cultivares da espécie *C. annuum*: Emerald Isle (susceptível), Perennial (tolerante) e Pimenta Doce IH 1758 (tolerante) foram escolhidos para compor um ensaio complementar específico para esse estudo, instalado no ano de 2004. O objetivo foi encontrar possíveis reações diferenciais quando da infecção das plantas susceptíveis e tolerantes em diferentes fases de seu desenvolvimento ou idade. As plântulas foram obtidas a partir de 24 células semeadas da bandeja de isopor, sendo duas sementes por célula da bandeja para cada cultivar. As bandejas foram mantidas em casa-de-vegetação com irrigação intermitente, a cada 2 horas. Posteriormente, com aproximadamente 4 folhas, 24 plântulas de cada cultivar foram selecionadas aleatoriamente e transferidas para vasos de aproximadamente 2 L, contendo composto a base de vermiculita e macro e micro-nutrientes minerais. Foi mantida uma planta por vaso em casa-de-vegetação, com fertirrigação via gotejamento. Após o procedimento de transplante, as 24 plantas sadias foram inoculadas uma única vez em 4 diferentes idades (15, 30, 45 e 60 dias da germinação) com a estirpe mais agressiva do CMV (nº 14) da coleção de isolados. A evolução dos sintomas foi acompanhada, sendo analisada periodicamente a dinâmica de desenvolvimento vegetal. O intervalo de inoculação de cada grupo de 6 plantas foi de 15 dias. O primeiro grupo de plantas foi inoculado aos 15 dias, aproximadamente, após a germinação das sementes. As avaliações por

notas de sintomas foram realizadas a cada 15 dias, por ocasião das inoculações, completando 4 avaliações. A última análise foi realizada aos 75 dias de idade das plantas. Foram mantidas plantas-controle sadias de cada cultivar a fim de comparação do desenvolvimento e sintomas apresentados. A infecção das plantas foi confirmada pelo teste sorológico de ELISA indireto. A viabilidade do inóculo foi confirmada através de inoculação de plantas indicadoras de *N. glutinosa*, que respondem com mosaico sistêmico à infecção pelo CMV.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação de vírus em amostras de *Capsicum* spp.

Os resultados dos testes sorológicos indicaram a presença de CMV em 70 amostras do total de 113 (61,9%) coletadas, em mistura ou não com outros vírus. Em 42,5% das amostras positivas foi detectado apenas o CMV, enquanto em 3,5%, CMV em conjunto com PMMoV; 9,7%, CMV e ToMV; 6,2%, CMV, PMMoV e ToMV combinados. Em 8% das amostras, apenas o ToMV foi identificado, assim como 2,6% de infecção pelo PMMoV e 2,6%, ToMV conjuntamente com PMMoV. Não foi registrada a presença de PVY e TSWV nas amostras avaliadas. Constatou-se que 28 amostras (24,8%) estavam sadias frente aos resultados obtidos nos testes sorológicos realizados com antissoros específicos para os vírus em destaque (Tabela 4). Nas lavouras em final de ciclo produtivo foram observados sintomas intensos típicos de viroses nas plantas. As amostras sadias e aquelas nas quais não foi detectada a presença do CMV foram descartadas para efeito das avaliações subsequentes. Especificamente, das 29 amostras coletadas em casa-de-vegetação no município de Salto-SP, 24 apresentaram reação no teste de ELISA para ao menos uma espécie de vírus, sendo que o CMV foi detectado em 17 (58,6%) amostras.

Esses resultados indicam que o CMV foi o principal vírus detectado nas propriedades inspecionadas, identificado em mais da metade das plantas amostradas, sendo via de regra o principal agente causador dos característicos sintomas observados, como folhas distorcidas, opacas, necrose em desenho (forma de um “V” no limbo foliar), frutos manchados, deformados, pequenos e/ou plantas de tamanho reduzido. Foi observado que os sintomas, aparentemente, foram mais intensos quando da múltipla infecção viral.

Tabela 4 Detecção sorológica de vírus em amostras de pimentão e pimenta coletadas em diferentes municípios nos anos de 2000 a 2002 em diferentes regiões produtoras.

QUANTIDADE AMOSTRAS COLETADAS	DATA DA COLETA	ORIGEM	CMV	TSWV	ToMV	PVY	PMMoV	CMV + PMMoV	CMV + ToMV	CMV + PMMoV + ToMV	PMMoV + ToMV
19	Nov / 2000	Lins-SP (Dessecadas)	12	0	0	0	1	3	0	2	0
29	Mar / 2002	Salto-SP	4	0	6	0	0	0	9	4	1
56	Mai / 2002	Lins-SP	25	0	2	0	2	1	2	1	2
1	Jul / 2002	Lins-SP	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	Set / 2002	Piacatu-SP	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	Dez / 2001	Lins-SP	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	Dez / 2001	Piacatu-SP	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	Set / 2001	Tuiuti-SP	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	Set / 2001	Taguatinga-DF	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	Set / 2001	Cajarana-SP	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	Set / 2001	Joanópolis-SP	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	Mar / 2002	Paranapanema-SP	0	0	1	0	0	0	0	0	0
TOTAL	-	-	48 (42,5%)	0	9 (8,0%)	0	3 (2,6%)	4 (3,5%)	11 (9,7%)	7 (6,2%)	3 (2,6%)

4.2 Purificação biológica e manutenção dos isolados do CMV

N. glutinosa foi a espécie utilizada para a multiplicação e manutenção do CMV em casa-de-vegetação, por ser altamente susceptível ao vírus, apresentando sintomas característicos e evidentes da infecção, além da facilidade de utilização das amostras foliares dessa espécie nos testes de diagnóstico, inoculação, manutenção e dessecação. Dessa forma, as 70 amostras proveniente de pimentão, com resultados positivos para o CMV, em infecção mista ou não, nos testes sorológicos de PTA-ELISA, foram maceradas separadamente e os extratos, individualmente, inoculados em *N. glutinosa*. Desse total, 23 amostras foram selecionadas, devido ao sucesso na transferência do CMV a essas plantas hospedeiras (Tabela 5). A infecção foi confirmada pelo teste sorológico de ELISA e pelos sintomas sistêmicos de mosaico, leve amarelecimento e/ou redução do limbo foliar (Figura 1). Aproximadamente quatro dias após a inoculação inicial, foram observadas lesões locais necróticas na área foliar inoculada de plantas-teste de *N. glutinosa*, atribuindo esse fato aos agentes patogênicos ToMV e PMMoV (Figura 2). A partir dessa observação, foi dado início ao processo de purificação dos isolados do CMV. Todas as folhas de *N. glutinosa*, que tão logo apresentaram lesões locais, foram cuidadosamente removidas e eliminadas. Após 15 dias da inoculação, aproximadamente, foram retiradas amostras de folhas novas das plantas infectadas e os extratos obtidos de sua maceração foram inoculados individualmente em *C. quinoa*. Após quatro dias da inoculação, aproximadamente, das diversas lesões locais formadas, apenas uma única lesão simples foi removida e inoculada em *N. glutinosa* (Figura 3), sendo o suficiente para a infecção das plantas-teste em todas as três passagens monolesionais consecutivas. Durante as avaliações foram constatados sintomas característicos do CMV nas plantas de *N. glutinosa*, confirmados por testes sorológicos de ELISA (resultados não apresentados). Evidências de sintomas fracos, que poderiam ser atribuídos ao satélite do CMV, não foram observados. Testes de ELISA e RT-PCR foram realizados em plantas assintomáticas, confirmando resultados negativos da presença de CMV. Os isolados foram mantidos em plantas de *N. glutinosa* a fim de comparação de sintomas entre todas as plantas até o estágio de florescimento e frutificação. Na Figura 4 estão ilustrados os sintomas em folhas de *N. glutinosa* individualmente inoculadas com uma estirpe severa do vírus e com o RNA satélite do CMV, que serviram de controles dos testes visuais de sintomas em casa-de-vegetação.

Tabela 5 Lista dos isolados de CMV utilizados nos testes em casa-de-vegetação provenientes de *Capsicum* spp. em diferentes municípios.

Isolado	Hospedeira	Município
1 (28)	<i>Capsicum annuum</i>	Tuiuti – SP
2 (41)	<i>Capsicum annuum</i>	Taguatinga – DF
3 (100)	<i>Capsicum annuum</i> cv. Maximus	Lins – SP
4 (101)	<i>Capsicum annuum</i> cv. Maximus	Lins – SP
5 (104)	<i>Capsicum annuum</i> cv. Maximus	Lins – SP
6 (107)	<i>Capsicum annuum</i> cv. 1439	Lins – SP
7 (109)	<i>Capsicum annuum</i> cv. 1439	Lins – SP
8 (110)	<i>Capsicum annuum</i> cv. 1439	Lins – SP
9 (111)	<i>Capsicum annuum</i> cv. 0474	Lins – SP
10 (116)	<i>Capsicum annuum</i> cv. Priscila	Lins – SP
11 (117)	<i>Capsicum annuum</i> cv. Priscila	Cajarana – SP
12 (123)	<i>Capsicum annuum</i> cv. Magali R	Lins – SP
13 (127)	<i>Capsicum annuum</i> cv. Magali R	Lins – SP
14 (128)	<i>Capsicum annuum</i> cv. Magali R	Lins – SP
15 (130)	<i>Capsicum annuum</i> cv. Magali R	Lins – SP
16 (130B)	<i>Capsicum annuum</i> cv. Magali R	Lins – SP
17 (132)	<i>Capsicum annuum</i> cv. Rubia R	Lins – SP
18 (132B)	<i>Capsicum annuum</i> cv. Rubia R	Lins – SP
19 (141)	<i>Capsicum annuum</i> cv. Elisa	Salto – SP
20 (142)	<i>Capsicum annuum</i> cv. Elisa	Salto – SP
21(206)	<i>Capsicum annuum</i> cv. Magali R	Piacatu – SP
22 (Pet)	<i>Petúnia integrifolia</i>	Botucatu - SP
23 (06/2647)	<i>Capsicum annuum</i>	Lins – SP
S2 (CMV-II)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Califórnia - EUA
S1 (CMV-I)	<i>Capsicum annuum</i>	Lins – SP
C (satRNA)	<i>Capsicum annuum</i>	Viçosa – MG



Figura 1 À esquerda, sintomas sistêmicos de mosaico e redução do limbo foliar em planta de *N.glutinosa*, em comparação a uma planta sadia da mesma idade. À direita, detalhe do mosaico sistêmico em desenho em *N.glutinosa* infectada com estirpe severa do CMV.



Figura 2 Lesões locais necróticas em *N. glutinosa* formadas por ToMV e/ou PMMoV a partir de inóculo proveniente de plantas de pimentão coletadas em campo.



Figura 3 Lesões locais em *C. quinoa* formadas em decorrência da inoculação mecânica de isolado do CMV extraído de *N. glutinosa*.



Figura 4 Reação de plantas de *N. glutinosa* à inoculação com estirpes do CMV: Folha sadia, folha inoculada com o satélite do CMV e folha inoculada com estirpe severa do CMV, respectivamente da esquerda para a direita.

4.3 Teste de hospedeiro diferenciador dos isolados virais

No teste de diferenciação dos isolados de CMV, plantas de *N. tabacum* ‘Havana 425’, *V. unguiculata* e *N. glutinosa*, inoculadas individualmente com os 23 isolados purificados do CMV, indicaram a semelhança dos isolados virais. Foram observadas reações sintomatológicas de mosaico sistêmico em todas as plantas inoculadas de ‘Havana 425’ e *N. glutinosa*, característico de estirpe do CMV pertencente ao subgrupo I, mesmo com diferenças na intensidade de sintomas observadas principalmente em *N. glutinosa*. Em *V. unguiculata*, 35% dos isolados inoculados (2, 4, 5, 11, 14, 15, 17, 22) foram capazes de induzir sintomas de mosaico sistêmico (Figura 5). O restante dos isolados não causou nenhum tipo de sintoma. Nenhum isolado provocou sintomas atenuados em todas as três espécies hospedeiras diferenciais avaliadas, o que poderia indicar a presença de RNA satélite associado ao CMV. Houve apenas diferenças na intensidade de sintomas sistêmicos de mosaico nas plantas de *N. glutinosa*, variando de mosaico severo de coloração verde claro e escuro, bolhosidades, até deformações foliares. Quatro isolados (2, 14, 15, 17) provocaram perda intensa de limbo foliar (forma de cordão de sapato) em plantas de *N. glutinosa* (Figura 6).



Figura 5 Reação de mosaico sistêmico em plantas de *V. unguiculata* induzida por isolados do CMV, 20 dias após inoculação.



Figura 6 Malformação e perda de limbo foliar e mosaico sistêmico em plantas de *N. glutinosa*, inoculadas mecanicamente com isolado agressivo do CMV.

4.4 Transcrição reversa e reação em cadeia de polimerase (RT-PCR)

Os 23 isolados do CMV, após análises biológicas e sorológicas, foram submetidos a avaliações moleculares com auxílio do RT-PCR, técnica altamente específica que confirmou a ocorrência de CMV em todas as 23 amostras testadas, comparando-se à amostra-controle do CMV I.

Os oligonucleotídeos iniciadores específicos utilizados nos testes amplificaram um fragmento de aproximadamente 480 pb para todos os 23 isolados analisados neste estudo, e de um fragmento de 500 pb para o isolado CMV-S (subgrupo II), proveniente da Califórnia (EUA).

4.5 Clivagem enzimática de fragmentos de DNA

Com o objetivo de distinguir os subgrupos do CMV em CMV I e CMV II, os fragmentos de DNA amplificados foram clivados com a enzima de restrição *Msp* I após o procedimento de digestão da enzima. A enzima de restrição clivou o fragmento amplificado do

isolado plasmidial CMV-S, da Califórnia (EUA), de 500 pares de bases (pb), originando três fragmentos de aproximadamente 190, 150 e 120 pb, correspondendo ao CMV-II (Figura 7).

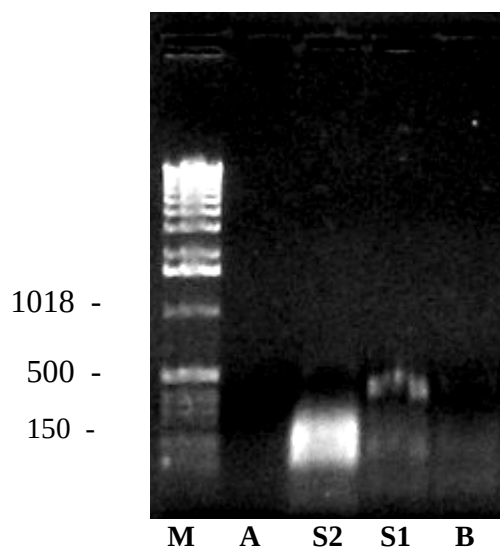


Figura 7 Análise de fragmentos de RNA dos isolados de CMV, amplificados por RT-PCR e clivados pela enzima *Msp* I, em gel de agarose 1,5%. M: marcador molecular de DNA (1 Kb “ladder”), A: H₂O, S2: CMV-II (plasmidial), S1: CMV-I e B: sadia. Os comprimentos das bandas estão indicados à esquerda do gel.

A clivagem enzimática não ocorreu em nenhum dos 23 isolados selecionados provenientes do campo, indicando a ausência de um sítio de restrição capaz de separar um fragmento de oligonucleotídeos em outros três, como verificado com o CMV-II na presença da *Msp* I. Esses resultados demonstram que todos os isolados testados pertencem ao subgrupo I do CMV. Os isolados de número 3, 10, 14 e 19 apresentaram um padrão diferenciado em gel, observando-se uma segunda banda formada, o que não ocorreu com os demais isolados (Figura 8).

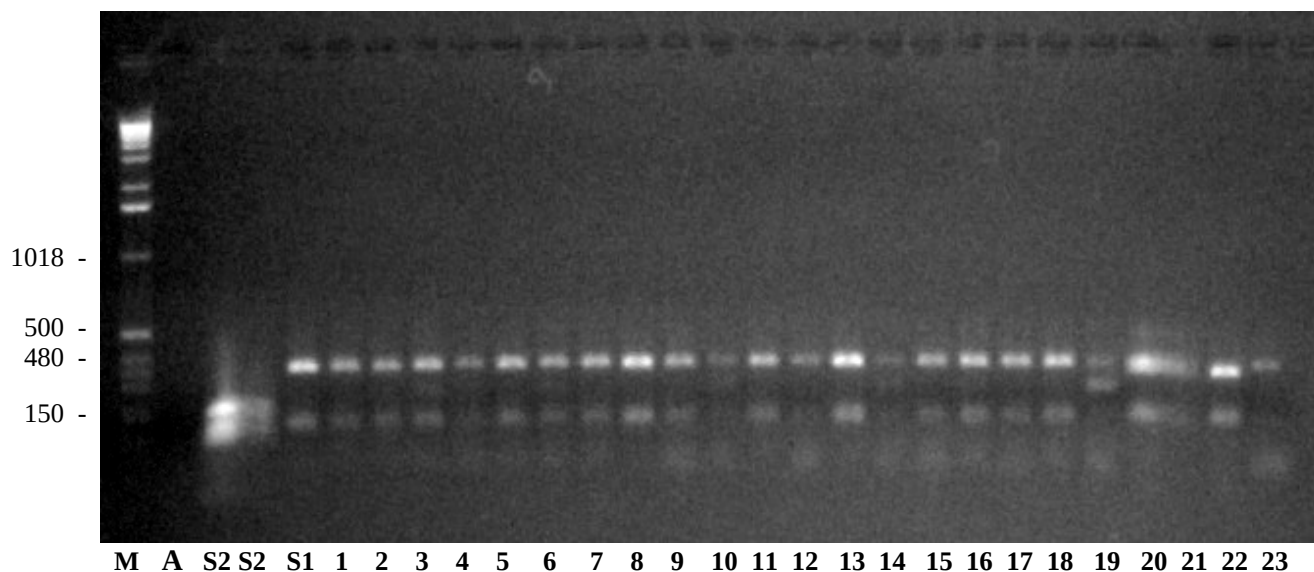


Figura 8 Análise de fragmentos de RNA dos 23 isolados de CMV, amplificados por RT-PCR e clivados pela enzima *Msp* I, em gel de agarose 1,5%. M: marcador molecular de DNA (1 Kb “ladder”), A: H₂O, S2: CMV-II (plasmidial), S1: CMV-I, e de 1 a 23: isolados purificados selecionados para os testes. Os comprimentos das bandas correspondentes estão indicados à esquerda do gel (em pares de bases).

4.6 Identificação de RNA satélite associado ao CMV

Após a extração de RNA dos 23 isolados, foi realizada a amplificação dos fragmentos correspondentes ao RNA satélite através dos “primers” específicos aplicados em RT-PCR. Os resultados obtidos indicaram que todos os isolados testados não apresentaram bandas específicas do satélite em gel de agarose 1,5%. Houve a confirmação de banda formada com aproximadamente 350 pb, correspondendo ao satélite do CMV do isolado controle empregado (dados não apresentados).

4.7 Seleção do isolado severo do CMV

Após a purificação biológica e identificação dos isolados de CMV em casa-de-vegetação, todos os 23 isolados selecionados e mantidos em plantas de *N. glutinosa* foram submetidos à avaliação sintomatológica para a seleção da estirpe mais agressiva, que foi utilizada nos testes de resistência dos acessos de *Capsicum* spp. Apesar de todos os isolados testados terem apresentado alto grau de severidade, com atribuição de notas altas de sintomas nas plantas inoculadas (notas 4,00 e 5,00) nas três repetições, os isolados números 2 (Taguatinga-DF), 14 (Lins-SP), 15 (Lins-SP) e 17 (Lins-SP) provocaram sintomas altamente severos e distintos, com aparecimento dos primeiros sinais de mosaico, com perda da coloração verde intensa das folhas, após 7 dias da inoculação, aproximadamente. Com 30 a 40 dias da inoculação, as plantas de *N. glutinosa* apresentaram desenvolvimento comprometido, atrofia e deformação foliar, com folhas filiformes, sem limbo foliar, e mosaico intenso (Figura 9), comparadas àquelas sadias e às inoculadas com os demais isolados. Foi atribuída nota média máxima de severidade de sintomas (5,00) para os 4 isolados ao final das três repetições realizadas, caracterizando-os como os mais agressivos isolados durante o período de observações. Esses isolados demonstraram alto potencial de utilização para os testes de resistência de *Capsicum* spp. Foi selecionado o isolado de número 14, proveniente de Lins-SP, para o desafio dos acessos de *Capsicum* spp. O isolado 14 foi mantido em plantas de *N. glutinosa* individualizadas e também ‘*in vitro*’ (dessecado) a -20°C , até o final dos experimentos em casa-de-vegetação, com monitoração de contaminações durante os experimentos.



Figura 9 Planta indicadora de *N. glutinosa* infectada com o isolado severo do CMV selecionado (14), apresentando um desenvolvimento anormal, atrofia e deformação foliar, folhas filiformes, ausência de limbo foliar e mosaico intenso.

4.8 Avaliação da reação de *Capsicum* spp. ao CMV

Aos 50 dias, aproximadamente, do início da avaliação de resistência ou tolerância de plantas, verificou-se que 139 acessos testados nesta primeira fase experimental apresentaram 7 plantas altamente susceptíveis, com notas médias de sintomas acima de 4,00 (Tabela 6), quando comparadas com plantas-controle inoculadas e sadias de pimentão Magali R (altamente susceptível ao vírus). Testes sorológicos de ELISA demonstraram que todas as plantas sintomáticas geraram resultados positivos para CMV, confirmando a infecção e o sucesso das inoculações realizadas. Dessa forma, os materiais susceptíveis não foram submetidos a novos ensaios de triagem, devido à ausência de plantas indicativas de tolerância ou resistência. Todos os 50 acessos restantes, 26,4 % da população de *Capsicum* spp., preliminarmente, foram selecionados devido às suspeitas de possíveis fontes tolerantes ou resistentes ao CMV. Plantas de Pimenta Doce IH 1750, Pimenta Bode e ICA 39, de códigos 16, 156 e 185, respectivamente, tiveram seu desenvolvimento comprometido desde a fase germinativa até logo após a inoculação, quando foram observadas manchas necróticas foliares e a conseqüente morte dessas plantas. Mesmo com tamanho reduzido, em comparação ao

desenvolvimento das plantas dos outros acessos, o procedimento de inoculação mecânica foi efetuado, principalmente devido ao reduzido desenvolvimento vegetativo. Mesmo mediante aplicação de nutrientes minerais, essas plantas não apresentaram uma recuperação normal em comparação às demais plantas dos outros acessos. Não houve possibilidade de confirmação da infecção do CMV nesses 3 acessos, devido ao subdesenvolvimento dos vegetais, plantas com tamanho reduzido e formação de manchas necróticas aproximadamente 3 a 4 dias após inoculação, seguidos de morte das plantas. O mesmo fato ocorreu no segundo ensaio de repetição, totalizando 20 plantas inoculadas e mortas de cada acesso.

Deve-se destacar a constatação de contaminações pelo TMV durante a fase de avaliações das plantas deste primeiro ensaio. A presença do TMV foi confirmada através de testes sorológicos de ELISA e de indexação biológica em *N. glutinosa*, a qual manifestou de início sintomas de lesões locais quando inoculadas com extratos das plantas infectadas. Plantas contaminadas de 15 acessos apresentaram sintomas distintos e atípicos de CMV, além de mosaico característico e/ou descoloração foliar: ICA 63, Habanera, Pimenta nº5, Pimenta Cheiro, Aji 263 e Aji 264 apresentaram pequenas lesões locais foliares generalizadas; RFG/FAO 553, manchas necróticas foliares; Aji 286 e BGH4301, pontos necróticos e queda de folhas; BGH 5025, necrose de ponteiro; Yerba Mala 251 e Aji Rojo 268, necroses de ponteiro e hipocótilo e queda de folhas; Pimenta Doce IH 1749 e Pimenta Doce IH 1758, lesões locais, necrose foliar e queda de folhas; Pimenta Doce IH 1758, lesões necróticas, amarelecimento, queda de folhas e retorcimento foliar. Todas as plantas com esses sintomas apresentaram contaminações pelo TMV e foram eliminadas tão logo houve a confirmação da infecção. Novamente esses materiais foram semeados e o teste repetido. Teste de ELISA foi novamente realizado após inoculações com CMV, expressando resultados negativos para *Tobamovirus*, possibilitando a continuidade das avaliações.

Plantas dos cultivares de pimentão HV-12, Tolomeu e LY 8080, de códigos 1, 2 e 3, respectivamente, submetidos aos testes de desafio, demonstraram reações de alta tolerância, sendo que algumas plantas apresentaram-se resistentes. O cultivar HV-12, após inoculação de plantas adultas, ao final da fase vegetativa, comportou-se de forma tolerante quando 4 das 6 plantas receberam nota média de sintomas 2,75, sendo que os sintomas foram perceptíveis nas folhas próximas dos pontos de inoculação, porém o vírus não foi detectado em outros locais distantes do ponto de inoculação. Esse fato foi comprovado por teste de ELISA de amostras de

três diferentes pontos das planta, tanto de folhas com mosaico como daquelas isentas de sintomas. Os resultados de três testes sorológicos de diferentes amostras foliares, respectivamente, demonstraram que amostras retiradas de pontos distantes daqueles inoculados apresentaram médias dos valores de absorbância menores e de resultado negativo (0,112; 0,83; 0,97) em relação a amostras de folhas sintomáticas (0,312; 0,240; 0,293) e aquelas sadias (0,081; 0,069; 0,076). As outras 2 plantas foram assintomáticas e sadias pelos testes de recuperação em *N. glutinosa* e testes sorológicos de ELISA, respectivamente. Os cultivares Tolomeu e LY 8080 manifestaram sintomas fracos da doença e plantas assintomáticas, mesmo após três tentativas de inoculação do CMV em intervalo de 7 a 10 dias. Tolomeu apresentou 3 plantas com nota média de sintomas 1,66 e 3 plantas assintomáticas e sadias. LY 8080 foi representado por 2 plantas com nota média de sintomas 2,00 e 4 plantas assintomáticas e sadias. Não foi constatada nenhuma planta com sintomas acentuados ou severos da virose.

Os demais 47 materiais selecionados preliminarmente foram submetidos a uma segunda avaliação de repetição, devido às suspeitas de plantas representativas de tolerância e/ou resistência, resultando em uma nova triagem. Dessa seleção, foram descartados outros 12 acessos que apresentaram menos de 15% das plantas com notas de sintomas entre 2,50 e 3,00 (Tabela 4, códigos 13, 18, 53, 78, 96, 130, 136, 140, 142, 145, 163 e 179).

Apenas os acessos de códigos 16, 156 e 185, tal como ocorrido no primeiro ensaio, novamente reagiram com a morte das plantas, aproximadamente 4 dias depois da inoculação. Não houve o registro de morte de plantas de nenhum outro acesso após as inoculações de desafio.

As plantas de Aji 286, RFG/FAO553, Pimenta Doce IH 1758 e Pimenta nº2, sob códigos 136, 138, 17, 179, respectivamente, foram contaminadas com TMV, confirmado pelo teste de ELISA e de indexação em *N. glutinosa*. Como no primeiro ensaio, procedeu-se à eliminação das plantas contaminadas. Esses materiais foram novamente semeados e o teste repetido.

Na terceira repetição, foram inoculadas mais 10 plantas sadias de cada um dos 35 acessos do processo de triagem, os quais apresentaram alto grau de tolerância ou resistência de plantas. Após as avaliações visuais de sintomas e teste sorológico de ELISA, foram selecionados 14 acessos com alta porcentagem de plantas tolerantes, acima de 56%, (Tabela 7,

códigos 11, 12, 15, 17, 42, 135, 137, 175, 176, 177, 181, 182, 183 e 184). As plantas que se mostraram assintomáticas, com resultados negativos nos testes sorológicos, foram submetidas ao teste de recuperação em *N. glutinosa*. Como não foram observados sintomas característicos do CMV nas indicadoras, corroborando os resultados do teste sorológico, essas plantas de *Capsicum* spp. foram classificadas como resistentes ao final das análises.

A maior parte das plantas avaliadas de Pimenta 99 planta 2 e Aji Dulce, ambas da espécie *C. frutescens* (Tabelas 6 e 7, códigos 188 e 189, respectivamente) demonstraram resistência ao CMV. No caso da Pimenta 99 PL2, de 28 plantas avaliadas nos três ensaios realizados, 25 mostraram-se resistentes ao vírus, com resultados negativos em testes de ELISA e de indexação biológica. As demais 3 plantas foram altamente tolerantes, recebendo nota média 1,00 de sintomas (leve descoloração foliar), sendo a menor nota recebida por um acesso na média de todas as notas dos três ensaios realizados. De maneira distinta de todos os materiais avaliados no presente trabalho, destacou-se Aji Dulce (código 189), o qual demonstrou resistência à invasão sistêmica do CMV em 100% das plantas duplamente inoculadas (23 plantas). Não houve detecção do CMV em testes sorológicos das plantas assintomáticas desses acessos, nem sintomas aparentes quando da tentativa de recuperação do vírus em *N. glutinosa*.

Na tentativa de avaliar a evolução de sintomas durante o desenvolvimento das plantas-teste, aproveitou-se a ocasião para observar as reações expressas das plantas inoculadas no estágio juvenil de acordo com as etapas de seu desenvolvimento. De modo mais evidente nos acessos classificados como os mais sensíveis ao vírus (altamente susceptíveis), os sintomas foram mais explícitos, em geral, logo após a 1ª bifurcação do caule, com plantas apresentando em geral 9 internódios, deixando a fase juvenil. Foi também observado nos cultivares das espécies *C. chinensi* (Pimenta nº 2), *C. baccatum* (Aji Amarillo 264 e Arivivi 212) e *C. annuum* (Pimenta Roque, Catarino Cascavel, CNPH 162, CNPH 40, ICA 218, Mexicana Tosello, Mulato Dulce, Pimenta Malagueta) que, após o início do florescimento, as plantas apresentaram progressivamente sintomas mais intensos e severos nas folhas baixas, enquanto os sintomas de mosaico nos ponteiros, característico do início da infecção, foram atenuados. Em destaque para as plantas da pimenta indiana 'Perennial', durante os três ensaios comportaram-se de maneira tolerante ao vírus, porém observou-se que sintomas fracos na planta de um modo geral desapareciam com o desenvolvimento vegetal, reaparecendo quando

na fase de florescimento e frutificação, porém nunca de forma acentuada. Reação semelhante ocorreu com o cultivar Pimenta Doce IH 1758. As plantas apresentaram leve mosaico nas folhas do ponteiro, aproximadamente 15 dias após a inoculação. Esses sintomas foram desaparecendo momentânea e gradualmente no decorrer do desenvolvimento vegetativo até o início do florescimento. Os sintomas voltaram a se manifestar na forma de mosaico mais acentuado, evoluindo até a nota 3,00 durante o florescimento até a fase de frutificação, porém sem a constatação de frutos afetados pelo CMV.

Tabela 6 Reação de plantas das espécies de *Capsicum* spp. inoculadas mecanicamente com a estirpe severa do CMV.

Código	Acessos	Espécie	Nº Plantas Inoculadas	Nº Plantas Tolerantes/ ** Nota Média Sintomas *	Nº Plantas Susceptíveis/ ** Nota Média Sintomas *	Nº Plantas sem Sintomas
1	HV-12	<i>C. annuum</i>	6	4 / 2,75	0	2
2	Tolomeu	<i>C. annuum</i>	6	3 / 1,66	0	3
3	LY 8080	<i>C. annuum</i>	6	2 / 2,00	0	4
4	Reiger	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
5	Magali R	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
6	Criollo de Morelos	<i>C. annuum</i>	10	0	9 / 5,00	1
7	CNPH 40	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
8	CNPH 145	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
9	BGH 3890	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
10	BGH 3886	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
11	90	<i>C. annuum</i>	30	23 / 2,30	0	7
12	R-17	<i>C. annuum</i>	30	26 / 2,34	0	4
13	Pimenta Roque	<i>C. annuum</i>	20	2 / 3,00	15 / 4,86	3
14	Pimenta Ornamental Picante	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
15	Pimenta Doce IH 1763	<i>C. annuum</i>	30	22 / 2,13	1 / 4,00	7
16	Pimenta Doce IH 1750	<i>C. annuum</i>	20	M	M	M
17	Pimenta Doce IH 1758	<i>C. annuum</i>	30	27 / 2,14	0	3
18	Pimenta Doce IH 1761	<i>C. annuum</i>	20	4 / 2,75	16 / 4,81	0
19	ICA 63	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
20	Pimenta Ornamental nº 5	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 4,90	0
21	Emerald Isle F1	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
22	Marvello F1	<i>C. annuum</i>	10	0	8 / 5,00	2
23	Magali	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
24	Pepper 571580 F1	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
25	Pepper 529802118 F1	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 4,80	0
26	Pepper 529801145 F1	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
27	AF 2710	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0

Código	Acessos	Espécie	Nº Plantas Inoculadas	Nº Plantas Tolerantes/ ** Nota Média Sintomas *	Nº Plantas Susceptíveis/ ** Nota Média Sintomas *	Nº Plantas sem Sintomas
28	P-48	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
29	Quantum-R F1	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
30	CLX P907 F1	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
31	CLX P1454 F1	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
32	CLX P965 F1	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
33	CLX P1463 F1	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
34	Hercules F1	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
35	P49-R	<i>C. annuum</i>	10	0	8 / 5,00	2
36	Conan	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
37	PEP 1216-VP	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
38	PZ14 F1	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
39	PY13 F1	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
40	Zafiro RZ	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
41	PI 159236	<i>C. annuum</i>	10	0	9 / 5,00	1
42	Perennial	<i>C. annuum</i>	30	21 / 1,38	0	9
43	5543	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
44	481	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
45	Ikeda	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
46	124	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
47	132	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
48	138	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
49	36	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
50	125	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 4,60	0
51	Agrônômico 10G	<i>C. annuum</i>	30	6 / 2,83	22 / 4,13	2
52	Ancho	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
53	Ano Todo	<i>C. annuum</i>	20	5 / 3,00	14 / 4,14	1
54	Avelar	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 4,30	0
55	BGH 3058 (vermelho)	<i>C. annuum</i>	10	0	9 / 5,00	1
56	BGH 3464	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
57	BGH 3058 (chocolate)	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 4,80	0
58	BGH 3743	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
59	BGH 3744	<i>C. annuum</i>	10	0	9 / 5,00	1

Código	Acessos	Espécie	Nº Plantas Inoculadas	Nº Plantas Tolerantes/ ** Nota Média Sintomas *	Nº Plantas Susceptíveis/ ** Nota Média Sintomas *	Nº Plantas sem Sintomas
60	BGH 3756	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
61	BGH 3757	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
62	BGH 3757 (comprido)	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
63	BGH 3886 (Cubano Amarillo)	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
64	BGH 3890	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
65	BGH 3896	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
66	BGH 3878	<i>C. annuum</i>	30	6 / 2,66	24 / 4,29	0
67	BGH 3978	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
68	BGH 3464	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
69	BGH 3756	<i>C. annuum</i>	30	2 / 2,00	26 / 4,23	2
70	BGH 3884	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 4,80	0
71	BGH 3758	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
72	BGH 3881	<i>C. annuum</i>	30	9 / 2,77	18 / 4,55	3
73	BGH 3888	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 4,00	0
74	BGH 3889	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
75	BGH 4016	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
76	Calahora	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
77	Caprioglio	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 4,90	0
78	Catarino Cascavel	<i>C. annuum</i>	20	5 / 3,00	15 / 4,86	0
79	Catie 8063	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 4,00	0
80	CNPH 144	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 4,80	0
81	CNPH 145	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
82	CNPH 146	<i>C. annuum</i>	10	0	9 / 5,00	1
83	CNPH 162	<i>C. annuum</i>	10	0	8 / 5,00	2
84	CNPH 185	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 4,30	0
85	CNPH 40	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
86	Corno di Toro	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
87	El Saltenito	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 4,90	0
88	Florida VR-4	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
89	ICA 8 Mogi	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 4,50	0
90	ICA 12	<i>C. annuum</i>	30	9 / 2,55	19 / 4,15	2
91	ICA 131	<i>C. annuum</i>	30	8 / 3,00	19 / 4,63	3

Código	Acessos	Espécie	Nº Plantas Inoculadas	Nº Plantas Tolerantes/ ** Nota Média Sintomas *	Nº Plantas Susceptíveis/ ** Nota Média Sintomas *	Nº Plantas sem Sintomas
92	ICA 132	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
93	ICA 218	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
94	Jalapeno	<i>C. annuum</i>	30	3 / 2,66	27 / 4,74	0
95	Jalapeño (México)	<i>C. annuum</i>	30	6 / 2,83	20 / 4,80	4
96	Jalapeño Cica 1	<i>C. annuum</i>	20	1 / 3,00	17 / 4,41	2
97	Kan Cluster	<i>C. annuum</i>	30	8 / 2,62	22 / 4,09	0
98	Maalab	<i>C. annuum</i>	30	3 / 3,00	25 / 4,84	2
99	Marconi	<i>C. annuum</i>	30	6 / 3,00	18 / 4,44	6
100	Mexicana Tosello	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
101	Morrone	<i>C. annuum</i>	10	0	8 / 5,00	2
102	Mulato Dulce	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
103	Mulato V2	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
104	Myr 10	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
105	C. annuum 187331	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
106	PI 188476	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 4,70	0
107	Pimenta Ornamental P01	<i>C. annuum</i>	10	0	9 / 5,00	1
108	Pimenta Ornamental P001	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
109	Pimenta Roque	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
110	ICA 63	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 4,40	0
111	Pimenta Doce IH 1744	<i>C. annuum</i>	30	2 / 3,00	25 / 4,28	3
112	Aji Rojo 258	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 4,30	0
113	Arivivi 261	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
114	BGH 5122	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
115	ICA 64	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 4,40	0
116	Jalapeno (Monte Alto)	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
117	K homernahu	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
118	Pimenta Verde	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
119	Pimenta 17	<i>C. annuum</i>	10	0	9 / 5,00	1
120	BGH 3883	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
121	BGH 3759	<i>C. annuum</i>	10	0	8 / 5,00	2
122	BGH 3887	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
123	BGH 3757	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0

Código	Acessos	Espécie	Nº Plantas Inoculadas	Nº Plantas Tolerantes/ ** Nota Média Sintomas *	Nº Plantas Susceptíveis/ ** Nota Média Sintomas *	Nº Plantas sem Sintomas
124	CNPH 32	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
125	Catie 7300-121	<i>C. annuum</i>	10	0	9 / 5,00	1
126	RFG/FAO 858	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
127	Aji Rojo 265	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
128	Arivivi 142	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 5,00	0
129	Pimenta Doce IH 1749	<i>C. annuum</i>	10	0	10 / 4,8	0
130	Pimenta Malagueta	<i>C. annuum</i>	20	2 / 2,50	12 / 4,00	6
131	Pimenta 102b	<i>C. annuum</i>	30	7 / 2,57	19 / 4,47	4
132	Aji 263	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 4,90	0
133	Aji 264	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
134	ICA 146	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
135	Pimenta IH 1492	<i>C. baccatum</i>	30	23 / 1,95	2 / 4,00	5
136	Aji 286	<i>C. baccatum</i>	20	4 / 3,00	16 / 4,43	0
137	Aji Amarillo 126	<i>C. baccatum</i>	30	28 / 2,21	0	2
138	RFG/FAO 553	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
139	Aji Amarillo 269	<i>C. baccatum</i>	30	9 / 3,00	17 / 4,52	4
140	Aji Amarillo 60	<i>C. baccatum</i>	20	3 / 2,66	17 / 4,23	0
141	Aji Amarillo 67	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
142	Aji Limo	<i>C. baccatum</i>	20	5 / 2,80	15 / 4,26	0
143	Arivivi 212	<i>C. baccatum</i>	30	9 / 2,22	18 / 4,33	3
144	BGH 1037	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
145	BGH 1603	<i>C. baccatum</i>	20	2 / 3,00	15 / 4,86	3
146	BGH 1675	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
147	BGH 2994	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
148	BGH 4176	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
149	BGH 4301	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
150	BGH 4366	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
151	BGH 5025	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
152	Guarnica 243	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
153	Habanera BGH 592	<i>C. baccatum</i>	10	0	9 / 5,00	1
154	ICA 65	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
155	Pimenta 236	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0

Código	Acessos	Espécie	Nº Plantas Inoculadas	Nº Plantas Tolerantes/ ** Nota Média Sintomas *	Nº Plantas Susceptíveis/ ** Nota Média Sintomas *	Nº Plantas sem Sintomas
156	Pimenta Bode	<i>C. baccatum</i>	20	M	M	M
157	Pimenta Branca Piranga	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
158	Pimenta Coração	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
159	Uchu 148	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
160	Yerba Mala 251	<i>C. baccatum</i>	10	0	8 / 4,75	2
161	Pimenta Bode Balão (verm.)	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
162	ICA 60	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 4,90	0
163	Aji 284	<i>C. baccatum</i>	20	6 / 2,50	12 / 4,41	2
164	Pimenta 154	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
165	Aji Rojo 268	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 4,80	0
166	BGH 0620	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
167	Aji Amarillo 267	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
168	Pimenta Cambuci	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 4,70	0
169	ICA 65	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 4,80	0
170	Aji Limo	<i>C. baccatum</i>	10	0	10 / 5,00	0
171	Pimenta Chata	<i>C. chinensi</i>	10	0	10 / 5,00	0
172	Rabo de Macaco	<i>C. chinensi</i>	10	0	10 / 4,20	0
173	Pimenta cheiro laranja	<i>C. chinensi</i>	30	3 / 2,00	24 / 105	3
174	Pimenta 122	<i>C. chinensi</i>	10	0	10 / 5,00	0
175	Murici IH 1477	<i>C. chinensi</i>	30	20 / 1,65	0	10
176	Murici IH 1490	<i>C. chinensi</i>	30	19 / 1,47	0	11
177	Jobito Picante	<i>C. chinensi</i>	30	26 / 1,84	0	4
178	Pimenta Cheiro	<i>C. chinensi</i>	10	0	10 / 5,00	0
179	Pimenta nº2	<i>C. chinensi</i>	20	4 / 3,00	14 / 4,42	2
180	Pimenta nº5	<i>C. chinensi</i>	10	0	10 / 5,00	0
181	Pimenta Doce IH 1766	<i>C. chinensi</i>	30	27 / 2,00	0	3
182	Pimenta Indio	<i>C. chinensi</i>	30	22 / 2,09	0	8
183	Santarém 50	<i>C. chinensi</i>	30	17 / 2,29	1 / 4,00	12
184	PI 152225	<i>C. chinensi</i>	30	18 / 1,88	0	12
185	ICA 39	<i>C. chinensi</i>	20	M	M	M
186	Murici IH 1473	<i>C. chinensi</i>	10	0	10 / 5,00	0
187	Habanera	<i>C. chinensi</i>	10	0	8 / 4,12	2

Código	Acessos	Espécie	Nº Plantas Inoculadas	Nº Plantas Tolerantes/ ** Nota Média Sintomas *	Nº Plantas Susceptíveis/ ** Nota Média Sintomas *	Nº Plantas sem Sintomas
188	Pimenta 99 planta 2	<i>C. frutescens</i>	28	3 / 1,00	0	25
189	Aji Dulce	<i>C. frutescens</i>	23	0	0	23

* Avaliação feita após três ensaios de repetição

** 0 = plantas assintomáticas, 1 = folhas levemente descoloridas ou opacas, ausência de mosaico e bom desenvolvimento a 5 = Mosaico severo, bolhosidades, deformações foliares, folhas filiformes e redução do porte da planta.

“M” = morte de plantas após inoculação.

Tabela 7 Relação dos acessos selecionados de *Capsicum* spp. com resistência ou tolerância ao CMV.

Código	Acessos	Espécie	Nº Plantas Tolerantes	Nº Plantas Resistentes	Nº Plantas Inoculadas	** Nota Média de Sintomas*
1	HV-12	<i>C. annuum</i>	4	2	6	2,75
2	Tolomeu	<i>C. annuum</i>	3	3	6	1,66
3	LY 8080	<i>C. annuum</i>	2	4	6	2,00
11	90	<i>C. annuum</i>	23	7	30	2,30
12	R-17	<i>C. annuum</i>	26	4	30	2,34
15	Pimenta Doce IH 1763	<i>C. annuum</i>	22	7	30	2,13
16	Pimenta Doce IH 1750	<i>C. annuum</i>	M	M	20	M
17	Pimenta Doce IH 1758	<i>C. annuum</i>	27	3	30	2,14
42	Perennial	<i>C. annuum</i>	21	9	30	1,38
135	Pimenta IH 1492	<i>C. baccatum</i>	23	5	30	1,95
137	Aji Amarillo 126	<i>C. baccatum</i>	28	2	30	2,21
156	Pimenta Bode	<i>C. baccatum</i>	M	M	20	M
175	Murici IH 1477	<i>C. chinensi</i>	20	10	30	1,65
176	Murici IH 1490	<i>C. chinensi</i>	19	11	30	1,47
177	Jobito Picante	<i>C. chinensi</i>	26	4	30	1,84
181	Pimenta Doce IH 1766	<i>C. chinensi</i>	27	3	30	2,00
182	Pimenta Indio	<i>C. chinensi</i>	22	8	30	2,09
183	Santarém 50	<i>C. chinensi</i>	17	12	30	2,29
184	PI 152225	<i>C. chinensi</i>	18	12	30	1,88
185	ICA = 39	<i>C. chinensi</i>	M	M	20	M
188	Pimenta 99 planta 2	<i>C. frutescens</i>	3	25	28	1,00
189	Aji Dulce	<i>C. frutescens</i>	0	23	23	0

* Avaliação feita após três ensaios de repetição

** 0 = plantas assintomáticas, 1 = folhas levemente descoloridas ou opacas, ausência de mosaico e bom desenvolvimento a 5 = Mosaico severo, bolhosidades, deformações foliares, folhas filiformes e redução do porte da planta.

“M”= morte de plantas.

4.9 Efeito da idade de planta inoculada na expressão de sintomas do CMV

No ensaio para avaliar a evolução dos sintomas pela idade de inoculação das plantas, no caso da pimenta ‘Perennial’, as plantas mantiveram-se tolerantes e com mosaico fraco sistêmico até o final das avaliações. Não foram observadas diferenças sintomatológicas significativas durante as fases de desenvolvimento das plantas, porém observou-se resistência ligeiramente maior quando da infecção em estágio mais avançado de desenvolvimento (45 e 60 dias de idade). Como apresentado na sequência das Tabelas 8, 9, 10, 11, o número de plantas assintomáticas aumentou à medida que as plantas foram inoculadas em idade mais avançada, considerando o mesmo intervalo de tempo de inoculação.

Quanto à Pimenta Doce IH 1758, que se mostrou tolerante ao CMV, 4 plantas inoculadas aos 15 dias de idade (Tabela 8) apresentaram os primeiros sintomas de mosaico fraco com 30 dias de idade nas folhas mais novas do ponteiro e foram desaparecendo com o desenvolvimento vegetativo. Logo após o florescimento, apesar de fracos, os sintomas de mosaico voltaram a se manifestar de modo generalizado na planta, com maior evidência no estágio de frutificação. Na Tabela 8, aos 75 dias de idade, portanto na 4ª avaliação, 3 plantas apresentaram mosaico mais acentuado (nota 3 de sintomas). Os frutos não foram afetados, apresentando tamanho e cores normais. Nas Tabelas 10 e 11, em inoculações tardias, esse cultivar continuou apresentando sensivelmente maior tolerância ao vírus. Os sintomas foram mais lentos em sua expressão. Com 45 dias de idade as plantas foram inoculadas (Tabela 10) e após 30 dias dessa inoculação (plantas com 75 dias de idade), havia apenas 1 planta com nota 3 de sintomas. Nas plantas mais velhas, inoculadas com 60 dias de idade (Tabela 11), após 15 dias da inoculação apenas 2 delas apresentaram mosaico, contra 4 plantas inoculadas com 15 dias de idade e após 15 dias da inoculação.

As plantas do cultivar susceptível Emerald Isle, quando inoculadas em diferentes idades e em diversas fases de desenvolvimento, reagiram com sintomas progressivos de mosaico, até atingir severidade máxima. Os primeiros sintomas foram evidentes principalmente após a primeira bifurcação caular, acentuando-se quando do florescimento e frutificação. Analisando as Tabelas 8, 9, 10 e 11 nota-se que as plantas requereram aproximadamente 30 dias da inoculação, independentemente de sua idade, para que apresentassem os mais altos graus de severidade, característicos de estirpes agressivas do

CMV, recebendo notas 4,00 e 5,00 de sintomas. Ao final das avaliações, folhas das plantas inoculadas, comparadas àquelas sadias do mesmo cultivar, apresentaram deformações e os frutos formados tornaram-se manchados, pequenos e deformados.

Tabela 8 Reação e evolução dos sintomas em plantas de pimenta e pimentão inoculadas com 15 dias de idade com o isolado severo do CMV.

1ª Avaliação (30 dias de idade)	Acessos	Nº de plantas inoculadas	Nº de plantas com as notas de sintomas *					
			0**	1	2	3	4	5
	Perennial	6	2	4				
	Pimenta Doce IH 1758	6		2	4			
	Emerald Isle	6				3	2	
2ª Avaliação (45 dias de idade)								
	Perennial	6	2	4				
	Pimenta Doce IH 1758	6			5	1		
	Emerald Isle	6				1	4	1
3ª Avaliação (60 dias de idade)								
	Perennial	6	1	5				
	Pimenta Doce IH 1758	6			4	2		
	Emerald Isle	6					3	3
4ª Avaliação (75 dias de idade)								
	Perennial	6	1	5				
	Pimenta Doce IH 1758	6			3	3		
	Emerald Isle	6						6

*Avaliação feita 15 dias após a inoculação

**0 = plantas assintomáticas, 1 = folhas levemente descoloridas ou opacas, ausência de mosaico e bom desenvolvimento a 5 = Mosaico severo, bolhosidades, deformações foliares, folhas filiformes e redução do porte da planta.

Tabela 9 Reação e evolução dos sintomas em plantas de pimenta e pimentão inoculadas com 30 dias de idade com o isolado severo do CMV.

1ª Avaliação (30 dias de idade)	Acessos	Nº de plantas inoculadas	Nº de plantas com as notas de sintomas *					
			0**	1	2	3	4	5
	Perennial	6			--			
	Pimenta Doce IH 1758	6			--			
	Emerald Isle	6			--			
2ª Avaliação (45 dias de idade)								
	Perennial	6	4	2				
	Pimenta Doce IH 1758	6		1	5			
	Emerald Isle	6				3	3	
3ª Avaliação (60 dias de idade)								
	Perennial	6	2	4				
	Pimenta Doce IH 1758	6			6			
	Emerald Isle	6					2	4
4ª Avaliação (75 dias de idade)								
	Perennial	6		6				
	Pimenta Doce IH 1758	6			4	2		
	Emerald Isle	6						6

*Avaliação feita 15 dias após a inoculação

**0 = plantas assintomáticas, 1 = folhas levemente descoloridas ou opacas, ausência de mosaico e bom desenvolvimento a 5 = Mosaico severo, bolhosidades, deformações foliares, folhas filiformes e redução do porte da planta.

Tabela 10 Reação e evolução dos sintomas em plantas de pimenta e pimentão inoculadas com 45 dias de idade com o isolado severo do CMV.

1ª Avaliação (30 dias de idade)	Acessos	Nº de plantas inoculadas	Nº de plantas com as notas de sintomas *					
			0**	1	2	3	4	5
	Perennial	6			--			
	Pimenta Doce IH 1758	6			--			
	Emerald Isle	6			--			
2ª Avaliação (45 dias de idade)								
	Perennial	6			--			
	Pimenta Doce IH 1758	6			--			
	Emerald Isle	6			--			
3ª Avaliação (60 dias de idade)								
	Perennial	6	6					
	Pimenta Doce IH 1758	6		3	3			
	Emerald Isle	6			1	4	1	
4ª Avaliação (75 dias de idade)								
	Perennial	6	4	2				
	Pimenta Doce IH 1758	6			5	1		
	Emerald Isle	6					2	4

*Avaliação feita 15 dias após a inoculação

**0 = plantas assintomáticas, 1 = folhas levemente descoloridas ou opacas, ausência de mosaico e bom desenvolvimento a 5 = Mosaico severo, bolhosidades, deformações foliares, folhas filiformes e redução do porte da planta.

Tabela 11 Reação e evolução dos sintomas em plantas de pimenta e pimentão inoculadas com 60 dias de idade com o isolado severo do CMV.

1ª Avaliação (30 dias de idade)	Acessos	Nº de plantas inoculadas	Nº de plantas com as notas de sintomas *					
			0**	1	2	3	4	5
	Perennial	6			--			
	Pimenta Doce IH 1758	6			--			
	Emerald Isle	6			--			
2ª Avaliação (45 dias de idade)								
	Perennial	6			--			
	Pimenta Doce IH 1758	6			--			
	Emerald Isle	6			--			
3ª Avaliação (60 dias de idade)								
	Perennial	6			--			
	Pimenta Doce IH 1758	6			--			
	Emerald Isle	6			--			
4ª Avaliação (75 dias de idade)								
	Perennial	6	6					
	Pimenta Doce IH 1758	6		4	2			
	Emerald Isle	6			1	3	2	

*Avaliação feita 15 dias após a inoculação

**0 = plantas assintomáticas, 1 = folhas levemente descoloridas ou opacas, ausência de mosaico e bom desenvolvimento a 5 = Mosaico severo, bolhosidades, deformações foliares, folhas filiformes e redução do porte da planta.

5 DISCUSSÃO

Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos para identificar e caracterizar estirpes do CMV, com o objetivo de subdividir estirpes de CMV em subgrupos, CMV I e CMV II (Edwards & Gonsalves, 1983, Haase et al., 1989, Abdalla et al., 1991, Daniels & Campbell, 1992, Rizos et al., 1992, De Blas et al., 1994, Rodríguez-Alvarado et al., 1995, Boari, 1998, Maciel-Zambolim, 1998, Eiras et al., 2001).

No presente trabalho, foi possível identificar o CMV nas amostras coletadas em campo, formar uma coleção de isolados purificados de diferentes regiões e caracterizá-los biológica (plantas indicadoras) sorológica (PTA-ELISA) e molecularmente (RT-PCR). Apesar da técnica de DAS-ELISA ser eficientemente utilizada para a caracterização do CMV (Eiras et al., 2001; Eiras et al., 2004), inclusive utilizando anticorpos monoclonais (Frangioni et al., 2002), a técnica de PTA-ELISA também foi utilizada com sucesso em processos de caracterização de isolados do CMV (Kobori et al., 2000). Em 61,9% das amostras coletadas nas propriedades produtoras de pimentão e pimenta houve a detecção do CMV via PTA-ELISA, sugerindo a associação do patógeno em estudo ao principal agente causador das enfermidades virais observadas em campo. *N. glutinosa* foi utilizada como modelo de hospedeira a ser manipulada no presente estudo devido a facilidade e eficiência com que essa espécie reage às inoculações mecânicas e ao vírus, sendo portanto altamente susceptível e de rápido crescimento, além de ser uma das espécies capazes de distinguir subgrupos do CMV (Boari et al., 2000). Extratos das 70 amostras avaliadas, sorologicamente positivas para CMV, foram inoculados em *N. glutinosa*, possibilitando a confirmação da presença de CMV, além de outros vírus em conjunto comumente encontrados em *Capsicum* spp., como PMMoV e ToMV (Wetter, 1984). Sabendo-se que PMMoV e ToMV provocam sintomas de hipersensibilidade em *N. glutinosa* (Bunt et al., 1996), as lesões locais formadas foram atribuídas a esses patógenos, auxiliando no processo de purificação do CMV. A incidência de ToMV e PMMoV verificada em campo pode ter sido ocasionada pelos tratos culturais realizados na cultura, haja vista que esses vírus são altamente infecciosos quando da transmissão mecânica de uma planta a outra (Bunt et al., 1996), através de desbastes e raleamento de frutos realizados durante o ciclo produtivo das culturas de pimentão e pimenta, e pelo atrito entre plantas, naturalmente. A incidência de CMV

encontrada em campo está relacionada com a transmissão natural de CMV, que, de acordo com Simons (1957) é eficientemente realizada por afídeos vetores, de modo não circulativo, ou seja, por picadas de prova, dificultando o controle dos vetores com inseticidas visando o combate ao vírus.

Na Argentina, Atencio et al. (1997), caracterizando isolados de CMV em amostras de pimentão com sintomas diversos, relataram pela primeira vez a presença de RNA satélite em materiais analisados. Da mesma forma Boari (1998) também detectou RNA satélite no Brasil. Apesar da suspeita da presença de RNA satélite nas amostras de pimentão, devido principalmente à aparente ausência de sintomas em plantas inoculadas de *N. glutinosa* a partir de inóculos de pimentão, no presente trabalho não foi registrada sua ocorrência. A não constatação de RNA satélite pode ter sido provocada pelos locais de coleta de amostras, que se concentraram em regiões específicas e em apenas um gênero de plantas (*Capsicum*), diminuindo a possibilidade de variação de isolados do vírus.

O processo de purificação biológica de isolados do CMV, coletados em *Capsicum* spp, proporcionou a seleção de 23 isolados do vírus, após inoculações em plantas de *N. glutinosa* e *C. quinoa*. Após aparecimento de sintomas locais necróticos e sistêmicos de mosaico nas plantas de *N. glutinosa*, inoculadas com os extratos foliares das amostras de campo, procurou-se eliminar todas as folhas que apresentaram lesões locais. Esse procedimento permitiu uma parcial purificação do CMV com o descarte de vírus indesejáveis, como o ToMV e PMMoV, devido à ocorrência das lesões locais necróticas apenas nos pontos de inoculação. Posteriormente, foram obtidas lesões locais do CMV em plantas de *C. quinoa*, após inoculações com extratos daquela hospedeira, confirmando resultados obtidos por Rodríguez-Alvarado et al. (1995), o qual purificou com sucesso isolados do CMV através de plântulas de *C. quinoa* inoculadas com extratos foliares de plantas de *N. tabacum* L. 'Xanthi nc' infectadas.

Embora o CMV tenha sido detectado na maioria das amostras, não foi possível recuperar todos os isolados. Apesar do teste sorológico de ELISA ser largamente utilizado em diversos trabalhos de identificação de estirpes de vírus (Haase et al., 1989), representando uma importante ferramenta de diagnóstico e identificação de patógenos, apresenta algumas limitações, como a requisição de maior sensibilidade do teste, necessidade de um suprimento de antissoros de alta qualidade (isento de reações cruzadas com proteínas da planta) e dependência de operação habilidosa para evitar falhas (Wylie et al., 1993). Outro fator de

potencial interferência na recuperação de isolados virais foi o comprometimento da viabilidade das partículas do CMV durante os processos de coleta, processamento, armazenamento e inoculação das plantas-teste. Esses fatores podem ter prejudicado a recuperação total dos isolados do CMV diagnosticados.

Na tentativa de subdividir os subgrupos I e II do CMV (Edwards & Gonsalves, 1983) por hospedeiros diferenciais, foram utilizadas as espécies *V. unguiculata*, *N. glutinosa* e *N. tabacum* ‘Havana 425’, que auxiliaram na confirmação da ocorrência de apenas a estirpe CMV I. Maciel-Zambolim (1998), caracterizando 22 isolados de CMV, observou que sintomas em *N. tabacum* ‘Havana 425’ e *N. tabacum* ‘Xanthi’ permitiram distinguir CMV I do CMV II. As estirpes do subgrupo I apenas provocaram sintomas sistêmicos sem ocorrência de lesões locais nesses hospedeiros, enquanto estirpes do subgrupo II provocaram sintomas de anéis necróticos e/ou mosaico em nervuras das folhas inoculadas e mosaico sistêmico nas folhas não inoculadas. Boari et al. (2000) observou que os isolados do CMV I causaram mosaico e deformações foliares em *N. glutinosa* e *N. edwardsonii* e CMV II, clorose de nervuras nesses dois hospedeiros, destacando-se como importantes diferenciadores dos subgrupos do CMV. Esses resultados confirmaram o relato de Haase et al. (1989), os quais citaram o CMV I como predominante nas regiões tropicais e subtropicais, enquanto o CMV II com maior frequência nas regiões temperadas.

Como ocorrem interferências climáticas na adaptação das estirpes do CMV e indução de reações sintomáticas diferenciadas em diversas regiões: tropicais, subtropicais e temperadas (Haase et al., 1989), todos os 23 isolados da coleção foram submetidos a testes nos hospedeiros diferenciais na tentativa de caracterizar estirpes do CMV nos subgrupos I (Ia e Ib) e II.

Após tentativas de inoculação de *V. unguiculata* com os diversos isolados, apenas 35 % desses foram capazes de induzir sintomas indicativos de CMV, caracterizados no subgrupo Ia. Analisando os isolados de CMV selecionados do campo, há um indicativo da relação existente entre agressividade de isolados e capacidade de infecção de *V. unguiculata*, pois os quatro isolados que se mostraram mais agressivos nos testes realizados em *N. glutinosa* (2, 14, 15 e 17) foram capazes de infectar plantas de *V. unguiculata*. Na Califórnia, Maciel-Zambolim (1998) também não obteve sucesso em inoculações realizadas em *V. unguiculata* para todos os isolados testados, porém caracterizou isolados infectivos em CMV Ib. Boari et al. (2000) relatou a impossibilidade de utilização dessa espécie para fins de classificação dos subgrupos

do CMV devido alguns isolados não induzirem sintomas nesse hospedeiro. Já, Daniels & Campbell (1992), caracterizando isolados do CMV, obtiveram resultados positivos na subdivisão do subgrupo CMV I em CMV Ia e CMV Ib pela reação sintomática em *V. unguiculata*. CMV Ia causou mosaico sistêmico, enquanto CMV Ib e CMV II induziram lesões locais necróticas nesse hospedeiro. Kobori et al. (2000), caracterizando um isolado de CMV através de hospedeiras diferenciais, verificou que em *Lactuca saligna* e em *V. unguiculata*, principalmente, esse isolado foi caracterizado como pertencente ao subgrupo Ib do CMV, devido às lesões locais necróticas formadas. Eiras et al., 2001 relatou a ocorrência do subgrupo Ia do CMV em isolado de bananeira do Vale do Ribeira, estado de São Paulo, quando verificou mosaico em plantas inoculadas de *V. unguiculata*.

Em relação à espécie *N. glutinosa*, houve diferenças significativas observadas na intensidade de sintomas, provocadas pelos isolados do CMV. Na natureza, há uma grande variabilidade de estirpes do CMV, provocando diferentes reações em plantas infectadas (Kaper & Waterworth, 1981), além da possibilidade de ocorrência de mutações no genoma viral (Fraile et al. 1994). Essas diferenças sintomáticas, observadas em *N. glutinosa*, podem estar diretamente associadas a esses fatores.

Assim como Frangioni et al. (2002) e Eiras et al. (2004), que caracterizaram isolados do CMV, obtendo fragmentos amplificados com aproximadamente 486 pares de bases e 486 a 499 pb, respectivamente, no presente trabalho de caracterização foram obtidos fragmentos de ácido nucléico semelhantes com primers específicos.

Com a utilização do RT-PCR, foi possível identificar e caracterizar, com maior especificidade, isolados do CMV nas amostras testadas, devido à sensibilidade desse método diante de testes biológicos e sorológicos. Devido à impossibilidade de diferenciação dos subgrupos do CMV utilizando apenas o RT-PCR, houve a necessidade da amplificação de fragmentos de parte do gene da proteína capsidial e da região 3' não traduzida, combinada com a clivagem por enzimas de restrição. Quando da aplicação da enzima *MspI*, os resultados obtidos com os 23 isolados da coleção indicaram a ocorrência de estirpes do CMV pertencentes ao subgrupo I. Apenas no caso do isolado de número 19 da coleção, que apresentou uma segunda banda formada em gel, diferentemente dos outros isolados, há necessidade de testes complementares. Pode-se supor que esse isolado seja uma estirpe ligeiramente diferente do padrão do subgrupo I do CMV. Destaca-se a eficiência da utilização

da enzima *MspI* na distinção dos isolados do CMV, o que corrobora os resultados obtidos por diversos autores com a utilização de enzimas de restrição na distinção de subgrupos do CMV (Rizos et al., 1992, Maciel-Zambolim, 1998, Boari, 1998, Atencio et al., 1997). No Brasil, Boari (1998) observou que a enzima *MspI* diferenciou adequadamente os isolados de CMV, relatando que a enzima *EcoR* I individualmente não diferenciou adequadamente os isolados. Singh et al. (1995), na Austrália, registrou a ocorrência de isolados do CMV de amostras de banana, utilizando com sucesso a técnica de RT-PCR combinada com as enzimas *EcoR* I e *MspI*.

Com o objetivo de avaliar a resistência dos acessos de *Capsicum* spp., foi necessário utilizar um isolado padrão agressivo do CMV e representativo do campo. Após a purificação e caracterização dos isolados virais no subgrupo I do CMV, foram distinguidos 4 isolados que provocaram sintomas mais acentuados nas plantas indicadoras de *N. glutinosa*. Essa observação sugere a existência de uma diversidade de isolados do CMV com sensíveis características distintas dentro de um mesmo subgrupo do vírus. Estudos têm demonstrado a variabilidade encontrada de isolados e estirpes do CMV em diversas regiões (Simons, 1957; Devergne & Cardin, 1973; Kaper & Waterworth, 1981; Owen & Palukaitis, 1988; Haase et al., 1989; Zambolim, 1998; Boari, 1998). Apesar de haver poucas diferenças moleculares na sequência de nucleotídeos entre isolados específicos do CMV I e aqueles do CMV II (99 – 100% de similaridade), há 19 a 20 % de diferenças diversas entre os subgrupos do CMV (Zambolim, 1998). A variabilidade genética do vírus explica em parte a variedade de sintomas observados em plantas infectadas (Veñals et al., 1996). Por essa razão, segundo Kaper & Waterworth (1981), as estirpes do CMV apresentam diferenças de patogenicidade e gama de hospedeiros, de sorte que não se pôde descartar a possibilidade da ocorrência de diferenças nas reações sintomáticas, mesmo que mínimas, porém perceptíveis, de plantas infectadas por diversos isolados do CMV. Por esses indicativos e pela necessidade de efetuar as avaliações de resistência de plantas com apenas um isolado padrão que fosse altamente agressivo, foi escolhido o de número 14, representando aqueles provenientes da região de Lins, Estado de São Paulo. Esse isolado foi escolhido principalmente pela precocidade no aparecimento de sintomas de mosaico e pelas intensas deformações foliares induzidas nas plantas inoculadas.

No primeiro ensaio de triagem foram descartados 73% dos acessos desafiados, devido à indução de sintomas severos nas plantas após inoculações com CMV. O teste de PTA-ELISA

indireto foi eficiente na confirmação de infecção das plantas após aproximadamente 10 dias da inoculação. O teste apontou valores de absorbância de amostras infectadas três vezes superiores ao das amostras sadias. Como nenhum desses acessos apresentou plantas com sintomas fracos ou ausentes, foram considerados susceptíveis e descartados para efeito de novos testes. Em destaque para o pimentão híbrido Emerald Isle F1, ao contrário do que revela a empresa Harris Moran Seed Company, no presente trabalho foi considerado altamente susceptível ao vírus. Segundo Haase et al. (1989), estirpes pertencentes ao subgrupo I do CMV, encontrados nas regiões tropicais e subtropicais, são mais agressivas. Além disso, há uma diversidade de estirpes do vírus que provocam diferentes reações em plantas infectadas (Kaper & Waterworth, 1981). Tendo em vista esses fatores, podemos sugerir que houve uma reação de susceptibilidade do cultivar Emerald Isle diante da infecção pela estirpe severa brasileira coletada no Estado de São Paulo. Esses fatos indicam que o cultivar não apresenta características de resistência adequadas ao plantio comercial em regiões tropicais e subtropicais, com alta incidência do vírus. Sugere-se, portanto, a utilização de estirpes locais para o sucesso em trabalhos de melhoramento genético visando a resistência de cultivares.

No primeiro ensaio, 47 acessos que apresentaram plantas potencialmente tolerantes foram novamente testados. Desse total, 12 acessos foram desconsiderados para efeito de novos testes, devido à não confirmação de tolerância nem resistência das plantas. Mesmo com um total de 15% das plantas inoculadas com nota média razoavelmente baixa de sintomas (2,50 a 3,00), portanto plantas passíveis de serem classificadas como tolerantes ao vírus, decidiu-se pelo descarte desses materiais para novos testes. Além dessas notas de sintomas estarem no limite de transição de sintomas severos, característicos de plantas susceptíveis, a porcentagem de plantas nessas condições foi baixa, portanto não significativa a ponto de classificar os seus respectivos acessos como tolerantes.

Plantas dos cultivares de Pimenta Doce IH 1750, Pimenta Bode e ICA 39 não tiveram um desenvolvimento normal e homogêneo desde a sua germinação em ambos ensaios preliminares repetitivos, em comparação às plântulas dos demais acessos. Com isso, devido à inoculação mecânica ser naturalmente drástica, as plantas desses 3 cultivares apresentaram uma alta vulnerabilidade às inoculações, levando ao aparecimento de manchas necróticas, seguido de morte das plantas, o que não foi verificado em plantas de nenhum outro acesso por ocasião do processo de inoculação. Mesmo considerando os relatos de Watterson (1993), sobre

a sensibilidade de acessos tolerantes a métodos de inoculação, e de Paulus et al. (1962) e Kyle (1993), que evidenciam a maior sensibilidade de reações ao vírus quanto menor a idade da planta, e de Fraser (1990), que destaca a hipersensibilidade (reação local e restrita a células invadidas ou adjacentes a essas) como uma resposta de resistência da planta a um patógeno viral, descartou-se a possibilidade de uma possível resistência das plantas desses 3 cultivares desafiados devido à fragilidade física que as plantas apresentaram no momento da inoculação. Com isso, há necessidade de testes complementares para avaliar a sensibilidade desses acessos à infecção viral.

O cultivar HV-12, com plantas inoculadas em fase adulta, apresentou particularidades devido à manifestação de sintomas apenas nas folhas próximas do ponto de inoculação. Esse tipo de reação pode estar envolvido com o mecanismo de resistência parcial à translocação do vírus na planta (Russel, 1978), sugerido pelas evidências apresentadas nos valores médios de absorbância dos testes sorológicos, que foram menores ou ausentes em locais da planta distantes do ponto de inoculação. Resultados semelhantes foram obtidos por Nono-Wondim et al. (1991), que relataram a inibição da migração do vírus no cultivar ‘Vania’. Anos depois, Nono-Womdim et al. (1993a), verificaram que em ‘Vania’ o vírus ficou restrito às folhas inoculadas, concluindo que essa restrição foi devido à multiplicação do vírus apenas nesse local. Dogimont et al. (1994) também observaram que a migração do vírus ficou restrita aos cotilédones inoculados em plântulas dos cultivares ‘Milord’ e ‘Vania’ com uma estirpe do CMV. O escape à infecção (Russel, 1978; Veñals et al., 1996), como uma forma de resistência de plantas, foi a explicação plausível encontrada para a não infecção de 2 plantas de HV-12, considerando a forma drástica de inoculação realizada nas plantas-teste (por injeção no caule de extrato de folhas contaminadas) e as evidências apresentadas, em geral, de alta resistência das plantas ao vírus. Dessa forma, o cultivar de pimentão HV-12, como ocorre com a introdução indiana ‘Perennial’, pode apresentar uma diversidade de mecanismos de resistência parcial passível de ocorrência (Nono-Womdim et al., 1993a). Como o HV-12 foi inoculado na fase adulta com uma determinada concentração de inóculo e uma dada temperatura ambiental, a expressão de resistência pode ter sido dessa forma manifestada, pois Dogimont et al. (1994) demonstraram que o nível de expressão de resistência depende do estágio de desenvolvimento da planta, condições ambientais e a concentração do inóculo.

O comportamento dos cultivares Tolomeu e LY 8080, ambos da espécie *C. annuum*, também são destacados devido à dificuldade de infecção das plântulas e manifestação de sintomas após duas inoculações mecânicas. O teste de ELISA confirmou as infecções. Tolomeu apresentou 3 plantas com nota média de sintomas 1,66 e 3 plantas assintomáticas e sadias. LY 8080 foi representado por 2 plantas com nota média de sintomas 2,00 e 4 plantas assintomáticas e sadias. Não foi constatada nenhuma planta com sintomas acentuados ou severos da virose. Esses dois cultivares devem ser considerados e aproveitados em novos testes de desafio com outras estirpes do CMV e para avaliação da herança de uma possível resistência parcial ao vírus, mesmo porque são cultivares de pimentão prontos, com características de frutos comerciais.

Os resultados de tolerância apresentados para a pimenta indiana ‘Perennial’, a qual manteve sintomas muito fracos do CMV, e que durante o desenvolvimento vegetal os sintomas foram regredindo em intensidade até a sua invisibilidade, reaparecendo quando na fase de florescimento e frutificação. Essa reação pode estar envolvida na característica de resistência parcial à multiplicação do vírus que a introdução ‘Perennial’ apresenta, como relatado por Nono-Womdim et al. (1993a).

A resistência verificada da Pimenta 99 planta 2 e de Aji Dulce, ambas da espécie *C. frutescens* (Tabelas 1 e 2, códigos 188 e 189) foram representadas por 89,2% e 100%, respectivamente, de plantas assintomáticas e sadias após inoculações com CMV. Devido à alta porcentagem de plantas não infectadas pelo CMV após duas inoculações, sendo que foi confirmada a viabilidade do inóculo através de sintomas severos induzidos no cultivar Magali R, foi possível classificar esses cultivares como imunes. Trabalhando com essa mesma espécie, Grube et al. (2000) mostraram que mais de 73 % das plantas de *Capsicum frutescens* 'BG2814-6' não foram infectadas pelo CMV, acrescentando que a herança de resistência observada é controlada por ao menos dois genes. Esses autores descrevem que um desses genes pode ser o mesmo encontrado em ‘Perennial’.

Quanto a contaminações que ocorreram durante os testes de resistência, envolvendo espécies do gênero *Tobamovirus*, altamente infecciosos e facilmente transmitidos mecanicamente (Veñals et al., 1996) e por sementes (Demski, 1981), a principal suspeita foi a manipulação e contato com plantas diversas quando das avaliações periódicas dos ensaios. A circulação e o contato com uma planta e outra no interior da casa-de-vegetação, onde haviam

plantas infectadas por TMV, por ocasião de experimentos diversos, e a curta distância entre uma planta e outra, aumentou a probabilidade de contaminações. Não foi descartada a possibilidade de ocorrência de contaminação por ocasião das inoculações ou através de sementes, porém foi considerado fatos remotos, haja vista o cuidado na assepsia e coleta de frutos de plantas ausentes de contaminações. A esterilização dos instrumentos em autoclave e a assepsia das mãos a cada procedimento de inoculação asseguraram a ausência de qualquer outro patógeno que pudesse dificultar a obtenção de resultados confiáveis na triagem dos acessos. Foram utilizadas plantas indicadoras de *N. glutinosa*, as quais apresentam reações de hipersensibilidade (lesões necróticas) quando inoculadas com vírus do gênero *Tobamovirus*, e PTA-ELISA, com antissoros específicos para TMV, ToMV e PMMoV, capazes de infectar *Capsicum* spp. (Veñals et al., 1996). Respeitando o padrão estabelecido para os ensaios de resistência, e por segurança, optou-se por eliminar todas as plantas contaminadas, realizando novas semeadura e inoculação dos acessos envolvidos na contaminação, principalmente para manter os padrões, a homogeneidade e sanidade de plantas nos experimentos.

No processo de avaliação da evolução de sintomas, conduzido durante o desenvolvimento vegetal, logo após inoculações em estágio juvenil das plantas com isolado severo do CMV, foi possível verificar que os sintomas mais evidentes de mosaico foram expressos após a primeira bifurcação caulinar, ocorrendo após aproximadamente 15 dias da inoculação do vírus. De acordo com Veñals et al. (1996), em geral, os sintomas de vírus variam dependendo do estágio de desenvolvimento da planta. Quando as plantas são infectadas no início do desenvolvimento, toda a planta apresenta mosaico nas folhas, o crescimento dos frutos se reduz, não chegando a apresentar valor comercial. Neste trabalho pode-se notar algumas particularidades envolvendo determinados acessos. Os acessos susceptíveis das espécies *C. chinensi* (Pimenta nº 2), *C. baccatum* (Aji Amarillo 264 e Arivivi 212) e *C. annuum* (Pimenta Roque, Catarino Cascavel, CNPH 162, CNPH 40, ICA 218, Mexicana Tosello, Mulato Dulce, Pimenta Malagueta) os sintomas foram progressivamente aumentando conforme as plantas entravam no estágio de florescimento e frutificação, principalmente nas folhas baixas. Nas folhas mais novas os sintomas foram se atenuando com a idade da planta. Em se tratando do cultivar Pimenta Doce IH 1758 e da introdução 'Perennial', as plantas-teste apresentaram leve mosaico nas folhas do ponteiro, aproximadamente 15 dias após a inoculação, desaparecendo momentânea e gradualmente no

decorrer do desenvolvimento vegetativo até o início do florescimento. Posteriormente, os sintomas voltavam a se manifestar de maneira fraca, e sem que fossem observados frutos afetados pelo CMV. Do ponto de vista de Veñals et al. (1996) além da possibilidade de coexistência de setores sadios e enfermos sobre uma mesma planta, como um mecanismo de defesa que consiste em uma resistência parcial à migração do vírus, determinadas populações de plantas têm a capacidade de recuperar-se de infecções (Veñals et al., 1996). Uemachi et al. (1995), no Japão verificaram que brotações laterais vigorosas de plantas de *C. frutescens* infectadas pelo CMV não apresentavam o vírus, de acordo com o método de ELISA. Além disso, os autores observaram o desenvolvimento normal e assintomático dessa parte da planta não afetada, relatando a sua resistência ao vírus por uma atividade inibitória da própria planta. Essa resistência de parte de uma planta ao vírus pode explicar em parte o que ocorreu com os acessos de Pimenta Doce IH 1758 e Perennial, cujas plantas inoculadas apresentaram variação de sintomas durante seu desenvolvimento ou mesmo parte das plantas assintomáticas. Esses dois acessos, classificados como tolerantes ao CMV, demonstraram maior resistência quando a inoculação das plantas foi realizada na fase avançada de desenvolvimento. Corroborando apontamentos de Kyle (1993), o efeito das doenças virais pode se tornar mais ou menos drástico se a planta for infectada no início do desenvolvimento ou na maturidade. Paulus et al. (1962) observou que pimentões inoculados no estágio de primeiras folhas verdadeiras foram mais afetados que aqueles inoculados tardiamente. Essas observações parecem explicar a maior resistência à expressão de sintomas das plantas de ‘Perennial’ e da Pimenta Doce IH 1758 quando inoculadas na fase adulta. Os sintomas do cultivar susceptível Emerald Isle F1 evoluíram em intensidade semelhante quando as plantas foram inoculadas em diferentes fases de desenvolvimento, não havendo distinção significativa quando da inoculação do CMV na fase juvenil ou de florescimento, apenas para que os primeiros sinais de sintomas do vírus aparecessem foram necessários aproximadamente 20 dias, até 30 dias quando os sintomas atingiram alta severidade.

Embora há situações que dificultam os trabalhos de melhoramento, como a descoberta de poucos materiais resistentes, a sensibilidade dos acessos tolerantes a métodos de inoculação, idade do hospedeiro, estirpe do vírus e condições ambientais, a associação entre características hortícolas mínimas e a tolerância de plantas, e a incapacidade de estabilização da reação de tolerância (sintomas sistêmicos fracos) em determinados acessos

homozigotos (Watterson, 1993), a tolerância e a resistência de plantas ainda é um dos fatores de destaque e de eficiência na proteção de campo contra viroses.

Como não foi objeto deste trabalho, sugere-se, o estudo complementar da herança de resistência genética a partir dos acessos selecionados neste processo de triagem. A identificação de novos acessos com resistência ao CMV, bem como informações sobre o número e tipo de genes controlando a resistência, são importantes ferramentas para o desenvolvimento de cultivares resistentes e comercialmente desejáveis.

6 CONCLUSÕES

- 1- Os 23 isolados pertencem ao subgrupo I do CMV, pelo método RT-PCR e clivagem enzimática.
- 2- Não houve constatação de RNA satélite.
- 3- Os acessos Aji Dulce e Pimenta 99 planta 2, da espécie *C. frutescens* são resistentes ao CMV.
- 4- As fases iniciais e finais do desenvolvimento das plantas são mais susceptíveis à infecção do vírus e à manifestação de sintomas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, O.A., DESJARDINS, P.R., DODDS, J.A. Identification, disease incidence, and distribution of viruses infecting peppers in California. **Plant Disease**, v.75, p.1019-1023, 1991.
- ADLERZ, W.C.; EVERETT, P.H. Aluminum foil and white polyethylene mulches to repel aphids and control watermelon mosaic. **Journal of Economic Entomology**, v.61, n.5, p.1276-1279, 1968.
- ALONSO-PRADOS, J.L., ARANDA, M.A., MALPICA, J.M., GARCÍ-ARENAL, F., FRAILE, A. Satellite RNA of Cucumber Mosaic *Cucumovirus* Spreads Epidemically in Natural Populations of Its Helper Virus. **Phytopathology**, v88, n.6, p. 520-524, 1998.
- ATENCIO, F.A., GRACIA, O., MENDONZA, E.E.A. Detection of both subgroups I and II of Cucumber mosaic *cucumovirus* and their satellite RNAs on pepper in Argentina. **Plant Disease**, v.81, p.695, 1997.
- BENNER, C.P., KUHN, C.W., DEMSKI, J.W., DODSON, J.W., COLDITZ, P., NUTTER, F.W., JR. Identification and incidence of pepperviruses in northeastern Georgia. **Plant Disease**, v.69, p.999-1001, 1985.
- BERGMANN, J.C., MOREIRA, S.R., CHAVES, A.L.R., EIRAS, M., COLARICCIO, A. Novo surto do Cucumber mosaic virus (CMV) em plantações comerciais de pimentão no estado de São Paulo, Brasil. **1º Congresso de Iniciação Científica em Ciências Agrárias e Ambientais (CICAM)**. Arquivos do Instituto Biológico, v.70, suplemento 2, 2003.
- BOARI, A.J. **Caracterização biológica e molecular de isolados do vírus do mosaico do pepino (CMV) e de RNAs satélites associados**. Viçosa-MG: UFV, 1998. 82p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federa de Viçosa.

- BOARI, A.J., MACIEL-ZAMBOLIM, E., DE 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, n. 1, p.49-58, 2000.
- BROWN, J.E.; DANGLER, J.M.; WOODS, F.M.; HENSHAW, M.C.; GRIFFY, W.A.; WEST, M.W. Delay in mosaic virus onset and aphid vector reduction in summer squash grown on reflective mulches. **HortScience**, v.28, p.895-896, 1993.
- BRUNT, A., CRABTREE, K., GIBBS, A. Viruses of tropical plants: descriptions and lists from the VIDE data base. **CAB International**, Wallingford, UK. 1990.
- BRIOSO, P.S.T. Doenças Causadas por Vírus em Pimentão. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.184, 1996.
- BUNT, A.A., CRABTREE, K., DALLWITZ, M.J., GIBBS, A.J., WATSON, L., ZURCHER, E.J. Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Versão 20 de agosto de 1996. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>.
- CHALFANT, R.B.; JAWORSKI, C.A.; JOHNSON, A.W.; SUMMER, D.R. Reflective film mulches, millet barriers, and pesticides effects on watermelon mosaic virus, insects, nematodes, soil borne fungi, and yield of yellow summer squash. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, n. 102, p.11-15, 1977.
- COSTA, C. L. & COSTA, A. S. Redução na disseminação de mosaico em abóbora de moita (*Cucurbita pepo* var. *meloepo*) com superfícies repelentes aos afídeos vetores. **Revista de Olericultura**, n. 11, p.24-25, 1971.
- DANIELS, J., CAMPBELL, R.N. Characterization of cucumber mosaic virus isolates found in California. **Plant Disease**, v.76, n.12, p.1245-1250, 1992.

- DE BLAS, C., BORJA, M.J., SAIZ, M., ROMERO, J. Broad spectrum detection of Cucumber mosaic virus (CMV) using the Polymerase Chain Reaction. **Journal of Phytopathology**, v.141, p.323-329, 1994.
- DEMSKI, J.W. Tobacco mosaic virus is seedborn in pimienta peppers. **Plant Disease**, v. 65, p. 723-724, 1981.
- DEVERGNE, J.C., CARDIN, L. Contribution a l'étude du virus de la mosaïque concombre (CMV). IV. Essai de classification de plusieurs isolats sur la base de leur structure antigenique. **Annals of Phytopathology**, v.9, p.409-430, 1973.
- DEVERGNE, J.C., CARDIN, L. Relations serologiques entre *cucumovirus* (CMV, TAV, PSV). **Annals of Phytopathology**, v.7, p.255-276, 1975.
- DING, S.W., ANDERSON, B.J., HAASE, H.R., SYMONS, R.H. New overlapping gene encoded by the Cucumber mosaic virus genome. **Virology**, v.198, p.593-601, 1994.
- DOGIMONT, C., DAUBEZE, A.M., PALLOIX, A. Expression of resistance to CMV migration in pepper seedlings. **Journal of Phytopathology**, v.141, p.209-216, 1994.
- DOUINE, L., QUIOT, J.B., MARCHOUX, G., ARCHANGE, P. Index of plants susceptible to cucumber mosaic virus bibliographical study. **Annals of Phytopathology**, v.11, p.439-475, 1979.
- 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.
- EDWARDS, M.L., COOPER, J.I. Plant virus detection using a new form of indirect ELISA. **Journal of Virology Methods**, v.11, p.309-319, 1985.

- EIRAS, M., COLARICCIO, A., CHAVES, A.L.R. Isolado do vírus do mosaico do pepino obtido de bananeira no Estado de São Paulo pertence ao subgrupo IA. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 1, p.53-59, 2001.
- EIRAS, M., BOARI, A.J., COLARICCIO, A., CHAVES, A.L.R., BRIONES, M.R.S., FIGUEIRA, A.R., HARAKAVA, R. Characterization of isolates of the *Cucumovirus* *Cucumber mosaic virus* present in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 86, n.1, 2004.
- FRAILE, A., ARANDA, M.A., GARCIA-ARENAL, F. Variabilidad y evolución del RNA satélite del virus del pepino durante epidemias en cultivos de tomate. **Investigación Agraria**, n.2, p. 253-262, 1994.
- FRANGIONI, D.S.S., PAVAN M.A., COLARICCIO A. Identificação do *Cucumber mosaic virus* subgrupo I em pimentão no Estado de São Paulo e triagem para resistência. **Summa Phytopathologica**, v. 29, n.1, 2003.
- FRASER, R.S.S. The genetics of resistance to plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, p. 179 – 200. 1990
- GALLITELLI, D. Present Status of Controlling Cucumber mosaic virus. **Plant Virus Disease Control**. APS Press, St. Paul, Capítulo 38, p.507-523, 1998.
- GONSALVES, D., PROVVIDENTI, R., EDWARDS, M.C. Tomato White leaf: The relation of na apparent satellite RNA and Cucumber mosaic vírus. **Phytopathology**, v.72, p.1533-1538, 1982.
- GRUBE, R.C.; ZHANG, Y.; MURPHY, J.F.; LOAIZA-FIGUEROA, F.; LACKNEY, V.K.; PROVVIDENTI, R.; JAHN, M.K. New source of resistance to Cucumber mosaic vírus in *Capsicum frutescens*. **Plant Disease**, v.84, n.8, p.885-891, 2000.

- 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.
- INOUE-NAGATA, A.K., FONSECA M.E., RESENDE R.O., BOITEUX L.S., MONTE D.C.A.N., DE AVILA A.C., VAN DER VLUGT R.A. *Pepper yellow mosaic virus*, a new *potyvirus* in sweetpepper, *Capsicum annuum*. **Archive Virology**, v. 147, n.4, p.849-855, 2002.
- JUNQUEIRA, A.H.; LUENGO, R.F.A. Mercados Diferenciados de Hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, n.2, p.95-99, 2000.
- KAPER, J.M., WATERWORTH, H.E. *Cucumoviruses*. in: KURSTAK, E. **Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis**. New York: Elsevier-North Holland Biomedical Press, 1981. p. 257-332.
- KAPER, J.M., TOUSIGNANT, M.E., STEEN, M.T. Comparison of 14 CARNA 5 variants relates ability to induce tomato necrosis to a conserved nucleotide sequence. **Virology**, v.163, p.284-292, 1988.
- KIM,S.J.; LEE, S.J.; KIM, B.D.; PAEK, K.H. Satellite-RNA-mediated resistance to Cucumber mosaic virus in transgenic plants of hot pepper (*Capsicum annuum* cv. Golden Tower). **Plant Cell Report**, v.16, p.825-830, 2000.
- KEARNEY, C.M., ZITTER, T.A., GONSALVES, D. A field survey for serogroups and the satellite RNA of cucumber mosaic virus. **Phytopathology**, v.80, p.1238-1243, 1990.
- KENDRICK, J.B., ANDERSON, L.D., DICKSON, R.C. Source and seasonal spread of certain viruses in pepper in southern California. **Phytopathology**, v.41, p.20, 1951. (Abstract).

KOBORI, R.F., WIERZBICKI, R., PAVAN, M.A. Caracterização de um isolado de *Cucumber mosaic vírus* (CMV) através de hospedeiras diferenciais. **Summa Phytopathologica**, v. 26, n.1, p.130, 2000.

KOSAKA, Y., FUKUNISHI, T. Multiple Inoculation with three attenuated viruses for the control of Cucumber virus disease. **Plant Disease**, v. 81, p.733-738. 1997.

KYLE, M.M. **Resistance to viral diseases of vegetables: genetics and breeding**. 278 p., 1993.

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.

MACIEL-ZAMBOLIM, E. **Caracterização biológica e molecular do vírus do mosaico do pepino (CMV) isolado do tomateiro: função da proteína capsidial do CMV na movimentação intercelular do vírus e construções transgênicas para resistência do tomateiro ao CMV**, Viçosa-MG: UFV, 1998. 97p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa.

MAKKOUK, K.M., GUMPF, D.J. Further identification of naturally occurring virus diseases of pepper in California. **Plant Disease Report**, v.58,p.1002-1006, 1974.

MATTHEWS, R.E.F., 1991. **Plant Virology**, 3rd ed. Academic Press Inc., New York.

MAVRODIEVA, V.A., BARBARA, D.J., SPENCE, N.J. Subgroup determination of Bulgarian isolates of *Cucumber mosaic virus* and the presence of RNAs satélites. **Plant Disease**, v. 82, n.8, p. 960, 1997.

MINAMI, K., TESSARIOLLI NETO, J. **Cultura do pimentão**. Piracicaba: ESALQ, 1994. 57p.

MONTASSER, M.S., TOUSIGNANT, M.E., KAPER, J.M. Viral satellite RNAs for the prevention of Cucumber mosaic virus (CMV) disease in field-grown pepper and melon plants. **Plant Disease**, v.82, p.1298-1303, 1998.

MOORE, W. D., SMITH, F. F., JOHNSON, G. V. & WOLDENBARGER, W. O. Reduction of aphid population and delayed incidence of virus infection on yellow neck squash by use of aluminum foil. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, n. 78, p.187-191, 1965.

MOWAT, W.P. & DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. **Journal of Virology Methods**, n.15, p.233-247, 1987.

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

NONO-WOMDIM, R., MARCHOUX, G., POCHARD, E., PALLOIX, A., GEBRE-SELASSIE, K. Resistance of pepper lines to the movement of Cucumber mosaic virus. **Journal of Phytopathology**, v.132, p.21-32, 1991.

NONO-WOMDIM, R., GEBRE-SELASSIE, K., PALLOIX, A., POCHARD, E., MARCHOUX, G. Study of multiplication of Cucumber mosaic virus in susceptible and resistant *Capsicum annum* lines. **Annals of Applied Biology**, v.122, p.49-56, 1993a.

NONO-WOMDIM, R., PALLOIX, A., GEBRE-SELASSIE, K., MARCHOUX, G. Partial resistance of bell pepper to Cucumber mosaic virus movement within plants: field evaluation of its efficiency in southern France. **Journal of Phytopathology**, v.137, p.125-132, 1993b.

- OROZCO, S.M.; LOPEZ, A.O.; PEREZ, Z.O.; DELGADILLO, S.F. Effect of transparent mulch, floating row covers and oil sprays on insect populations, virus disease and yield of cantaloupe. **Biological Agriculture and Horticulture**, v.10, p.229-234, 1994.
- 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.
- PALUKAITIS, S.P., ROOSSINK, M.J., DIETZGEN, R.G., FRANCKI, R.I.B. Cucumber mosaic virus. **Advances of Virus Research**, Orlando, 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. **Journal of Phytopathology**, v.126, p.353-360, 1989.
- PAULUS, A.O., KENDRICK, J.B. Jr., WEATHERS, L.G. Cucumber mosaic virus on pepper in California. **Phytopathology**, v.52, p.25, 1962.
- PAULUS, A.O., THOMASON, I.J., WEATHERS, L.G. A soil-borne virus disease of pepper in California. **Phytopathology**, v.53, p.885-886, 1963 (Abstract).
- PERRING, T.M., ROYALTY, R.N., FARRAR, C.A. Floating row covers for the exclusion of virus vectors and the effect on disease incidence and yield of cantaloupe. **Entomological Society of America**, n. 6, p.1709-1715, 1989.
- QUIOT, J.B., MARCHOUX, G., DOUINE, L., VIGOUROUX, A. Ecology and epidemiology of cucumber mosaic virus in southeast France 5. overwintering in weeds. **Annals of Phytopathology**, v.1, p.325-348, 1979.

- RIST, D.L., LORBEER, J.W. Occurrence and overwintering of cucumber mosaic virus and broad bean wilt virus in weeds growing near commercial lettuce fields in New York, USA. **Phytopathology**, v.79, p.65-69, 1989.
- RIZOS, H., GUNN, L.V., PARES, R.D., GILLINHS, M.R. Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. **Journal of General Virology**, Reading, v.73, p.2099-2103, 1992.
- RODRÍGUEZ-ALVARADO, G., KURATH, G., DODDS, J.A. Heterogeneity in pepper isolates of Cucumber mosaic virus. **Plant Disease**, v. 79, n.5, p.450-455, 1995.
- RUSSEL, G.E. **Plant breeding for pest and disease resistance**. First Published. Butterworth & CO. USA. 485 p., 1978.
- SIKORA, E.J., GUDAUSKAS, R.T., MURPHY, J.F., PORCH, D.W., ANDRIANIFAHANANA, M., ZEHNDER, G.W., BAUSKE, E.M., KEMBLE, J.M., LESTER, D.F. A multivirus epidemic of tomatoes in Alabama. **Plant Disease**, v.82, p.117-120, 1998.
- SIMONS, J.N. Three strains of Cucumber mosaic virus affecting bell pepper in the Everglades area of south Florida. **Phytopathology**, v.47, p.145-150, 1957.
- 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, n.7, 1995.
- SINGH, J., THAKUR, M.R. 1977. Genetics of resistance to Tobacco mosaic virus, Cucumber mosaic virus and Leaf curl virus in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). In: *Capsicum* 77, 3rd. **Eucarpia Meeting**, Montfavet, France.

- SOLER, S., DÍEZ, M.J., ROSELLÓ, S., NUEZ, F. Movement and distribution of tomato spotted wilt virus in resistant and susceptible accessions of *Capsicum* spp. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.21, p.317-325, 1999.
- TIEN, P., WU, G.S. 1991. Satellite RNA for the biological control of plant disease, p. 321-339 in: **Advances in virus research**, v.39 Maramorosch, K., Murphy, F., Shatkin, A. ed. Academic Press, New York.
- TOMLINSON, J.A. Epidemiology and control of virus diseases of vegetables . **Annals of Applied Biology**, v.110, p.661-681, 1987.
- 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 DER PLANK, J.E., 1968. **Disease Resistance in Plants**, 206 p. Academic Press, New York, London.
- VEÑALS, F.N.; ORTEGA, R.G.; GARCIA, J.C. 1996. **El cultivo de pimientos, chiles e ajíes**, 607 p. Mundi-Prensa, Madrid.
- WANG, J., SIMON, A.E. Symptom attenuation by asatellite RNA *in vivo* is dependent on reduced levels of virus coat protein. **Virology**, v.259, p.234-245, 1999.
- WATTERSON, J.C. 1993. Development and breeding of resistance to pepper and tomato viruses. In: **Resistance to Viral Diseases of Vegetables: Genetics and Breeding**. Ed. M.M. Kyle. Portland, Oregon: Timber Press, p. 80.
- WATERWORTH, H.E., KAPER, J.M., TOUSIGNANT, M.E. CARNA 5, the small cucumber mosaic virus-dependent replicating RNA, regulates disease expression. **Science**, v.204, p.845-847, 1979.

WETTER, C. Serological identification of four tobamoviruses infecting pepper. **Plant Disease**, v. 68, n. 7, p. 597-599, 1984.

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. **Australian Journal of Agriculture Research**, v. 44, p. 41-51, 1993.

WYMAN, J.A.; TOSCANO, N.C.; KIDO, K.; JOHNSON, H.; MAYBERRY, K. Effects of mulching on the spread of aphid-transmitted watermelon mosaic virus to summer squash. **Journal of Economic Entomology**, n.72, p.139-143, 1979.

ZHU, Y.X., OU-YANG, Y.F., CHEN, Z.L. Transgenic sweet pepper plants from *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell Report**, v.16, p.71-75, 2000.