

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

**TOBAMOVÍRUS EM *Capsicum* spp. NO ESTADO DE SÃO PAULO:
OCORRÊNCIA, ANÁLISE DA VARIABILIDADE E AVALIAÇÃO DE
RESISTÊNCIA.**

MÁRCIA APARECIDA CEZAR

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

BOTUCATU-SP

Fevereiro – 2007

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

**TOBAMOVÍRUS EM *Capsicum* spp. NO ESTADO DE SÃO PAULO:
OCORRÊNCIA, ANÁLISE DA VARIABILIDADE E AVALIAÇÃO DE
RESISTÊNCIA.**

MÁRCIA APARECIDA CEZAR

Orientador: Prof^a Dr^a. Renate Krause Sakate
Co-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 (Proteção de Plantas)

BOTUCATU-SP

Fevereiro – 2007

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

C424t Cezar, Márcia Aparecida, 1976-
Tobamovirus em *Capsicum* spp. no Estado de São Paulo: ocorrência, análise da variabilidade e avaliação de resistência / Márcia Aparecida Cezar.- Botucatu : [s.n.], 2007. viii, 73 f. : il. color., tabs.

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2007
Orientador: Renate Krause Sakate
Co-orientador: Marcelo Agenor Pavan
Inclui bibliografia.

1. Pimenta. 2. Pimentão. 3. Biologia molecular. 4. Tobamovirus. 5. Resistência genética. I. Sakate, Renate Krause. II. Pavan, Marcelo Agenor. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. IV. Título.

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

TÍTULO: TOBAMOVÍRUS EM *Capsicum* spp. NO ESTADO DE SÃO PAULO:
OCORRÊNCIA, ANÁLISE DA VARIABILIDADE E AVALIAÇÃO
DE RESISTÊNCIA

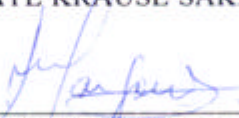
ALUNA: MARCIA APARECIDA CEZAR

ORIENTADORA: PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE

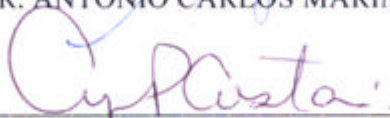
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE



PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI



PROF. DR. CYRÓ PAULINO DA COSTA



DR. RÔMULO FUJITO KOBORI



DR. VALDIR ATSUSHI YUKI

Data da Realização: 01 de fevereiro de 2007.

“O Senhor é meu pastor, nada me faltará. Em verdes pastagens me faz repousar; para fontes tranqüilas me conduz e restaura minhas forças; ele me guia por bons caminhos por causa do seu nome. Embora eu caminhe por um vale tenebroso, nenhum mal temerei, pois junto a mim estás; teu bastão e teu cajado me deixam tranqüilo. Diante de mim preparas a mesa, a frente dos meus opressores; unges minha cabeça com óleo, e minha taça transborda. Sim, felicidade e amor me acompanham todos os dias da minha vida. Minha morada é a casa de Deus, por dias sem fim.

Salmo 23

A **DEUS** que esteve, está e sempre estará constantemente presente em minha vida.

AGRADEÇO

Aos meus queridos e amados pais, **Ana e Luiz**
pelo amor incondicional, por todos os ensinamentos concretos de perseverança,
honestidade e trabalho
e ao meu irmão, cunhada e
sobrinhos por fazerem parte dessa conquista.

OFEREÇO

Meus avós Felisberto Mariano de Souza e
Maria Maffei de Souza (in memorian)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelas vitórias conquistadas e principalmente por sua presença constante em minha vida.

A minha orientadora **Profa. Dra. Renate Krause Sakate** pela determinação, coragem, ensinamentos, orientação e acima de tudo a amizade.

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

À **minha família** pelo apoio, compreensão, e estímulo, dedicados durante toda a minha vida.

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

Aos **Professores e Funcionários** do Departamento de Produção Vegetal/Defesa Fitossanitária pelos ensinamentos, amizade, apoio e colaboração.

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

Ao **Dr. Romulo Fujito Kobori** pela disponibilização e suporte na realização das coletas de isolados e principalmente pelo incentivo.

Ao **Dr. Cyro Paulino da Costa** pela concessão de materiais utilizados.

À amiga-irmã **Márcia Michelle Queiroz Ambrósio** pelos agradáveis anos de convívio, grande apoio nos momentos mais difíceis e sincera amizade que concertiza perdurará pela vida inteira.

À amiga **Caroline da Costa Melo**, pela convivência, amizade e ajuda nos experimentos.

Ao amigo **Júlio Massaharu Marubayashi** pelo incentivo, apoio e amizade.

Ao colega de laboratório **Márcio Martinello Sanches** pela convivência e amizade.

Aos amigos do curso de pós-graduação, Adimara Colturato, Alniusa Maria de Jesus, Humberto Shiomi, Patrícia Paraíso Lopes Pinheiro, Renata de Cássia Câmara, Rosana Sambugaro, pela companhia, incentivo e agradável convivência.

Ao Sr. Paulo Roberto Rodrigues e ao Sr. Domingos Paulossi pelo auxílio nos trabalhos conduzidos em casa-de-vegetação e ao Sr. Norberto Vaz de Carvalho nos trabalhos conduzidos em laboratório.

Aos **funcionários Cláudio, Dinha e Fátima** pelos momentos alegres de convivência.

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

As **funcionárias** da seção de pós-graduação pela colaboração e gentileza.

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

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	VIII
1 RESUMO.....	01
2 SUMMARY.....	03
3 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	05
3.1. Principais vírus em <i>Capsicum</i> spp. no Brasil.....	07
3.2. Principais características dos tobamovírus.....	09
3.3. <i>Capsicum</i> spp e a resistência a <i>Tobamovirus</i>	13
CAPÍTULO 1.....	17
Tobamovírus infectando <i>Capsicum</i> spp: ocorrência e análise da variabilidade genética.	18
Resumo.....	18
Abstrat.....	19
Introdução.....	20
Material e Métodos.....	21
Resultados e Discussão.....	22
Referências Bibliográficas	26
CAPÍTULO 2.....	34
Avaliação da resistência a tobamovirus em acessos de <i>Capsicum</i> spp.	35
Resumo.....	35
Abstrat.....	36
Introdução.....	37

Material e Métodos.....	38
Resultados e Discussão.....	40
Referências Bibliográficas.....	42
4 CONCLUSÕES GERAIS.....	50
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
APÊNDICE.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Introdução e Revisão de Literatura	
Figura 1. Organização do genoma de um tobamovírus.....	10
Capítulo 1	
Figura 1. Sintomas de lesões locais em plantas de <i>N. glutinosa</i> inoculadas com: A: PMMoV (lesões menores) e B: ToMV (lesões maiores).....	32
Figura 2. Árvores filogenéticas obtidas pelas seqüências de aminoácidos referentes à parte da proteína capsidial dos isolados de tobamovírus.....	33
Capítulo 2	
Figura 1. Sintomatologia observada em pimentão Magda e <i>Capsicum frutescens</i> para diferentes isolados de ToMV (A) e PMMoV (B) respectivamente.....	49
Apêndice	
Figura 1. Mapa das principais regiões no Estado de São Paulo produtoras de pimentão e pimenta visitadas nas coletas.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Introdução e Revisão de Literatura	
Tabela 1. Interação de tobamovírus com genótipos de <i>Capsicum</i> spp.....	11
Capítulo 1	
Tabela 1. Relação de isolados de PMMoV e de ToMV coletados em <i>Capsicum</i> spp de diferentes regiões produtoras do Estado de São Paulo.....	29
Tabela 2. Porcentagem de identidade de seqüências de parte da porção codificadora para a capa protéica: nucleotídeos (em branco) e aminoácidos (em cinza) entre os isolados brasileiros PMMoV	30
Tabela 3. Porcentagem de identidade de seqüências da capa protéica: nucleotídeos (em branco) e aminoácidos (em cinza) entre isolados ToMV.....	31
Capítulo 2	
Tabela 1. Acessos de <i>Capsicum</i> spp. utilizados nos ensaios e reação de plantas ao ToMV e ao PMMoV.....	46
Apêndice	
Tabela 1. Alinhamento de nucleotídeos de parte da porção codificadora para a proteína capsidial entre isolados de PMMoV, utilizando o programa Clustal W.....	64
Tabela 2. Alinhamento de aminoácidos de parte da porção codificadora para a proteína capsidial entre isolados de PMMoV, utilizando o programa Clustal W.....	67
Tabela 3. Alinhamento de nucleotídeos de parte da porção codificadora para a proteína capsidial dos isolados de ToMV, utilizando o programa Clustal W.....	68
Tabela 4. Alinhamento de aminoácidos de parte da porção codificadora para a proteína capsidial entre isolados de ToMV, utilizando o programa Clustal W.....	70
Tabela 5. Locais de coleta de amostras de pimentão e pimenta, número de amostras coletadas sob diferentes sistemas de cultivos e principais vírus ou gêneros de vírus detectados.....	72

RESUMO

Amostras de plantas sintomáticas provenientes de produções comerciais de pimentão e pimenta das regiões de Lins, Salto, Sorocaba, Itapetininga, Joanópolis no Estado de São Paulo foram obtidos durante os anos de 2000 a 2005 e analisadas quanto à espécie de tobamovírus presente.

Visando ampliar o conhecimento da variabilidade biológica, bem como genética destes isolados, após a purificação por monolesões, estes isolados foram inoculados na série diferenciadora de *Capsicum* spp. contendo os genes L¹, L², L³ e L⁴ que permitiram a separação dos mesmos em patótipos. Foram observadas as espécies *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) pertencentes ao patótipo P₀ e *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) pertencente ao patótipo P₁₋₂, respectivamente. A maioria dos isolados de tobamovírus foram encontrados sob cultivo de estufa e com predominância do ToMV, porém com baixa incidência.

A identidade das espécies de tobamovírus nas amostras de pimentão e pimenta foi confirmada por RT-PCR, utilizando-se oligonucleotídeos universais para o gênero

Tobamovirus seguido de sequenciamento e específicos para cada uma das espécies. O sequenciamento do fragmento amplificado correspondente à parte da porção codificadora para a capa protéica dos isolados identificados como ToMV revelou identidade de aminoácidos entre 90% a 100% quando comparados com outras seqüências de ToMV. Três isolados de ToMV não detectados pelos oligonucleotídeos específicos tiveram sua identidade confirmada após sequenciamento como pertencentes a esta espécie. Os isolados caracterizados como patótipo P₁₋₂ de PMMoV apresentaram identidade de aminoácidos entre 96% a 100% quando comparados com outras seqüências de PMMoV. Nas principais regiões produtoras do Estado de São Paulo ainda não ocorre o patótipo P₁₋₂₋₃ de PMMoV, bem como a incidência de tobamovírus em pimentão e pimenta é baixa. Não houve correlação de uma possível origem geográfica comum para os isolados de ToMV coletados, enquanto que para os de PMMoV houve separação dos isolados brasileiros em dois ramos filogenéticos, o primeiro, compreendendo isolados provenientes do Japão, Alemanha e Taiwan, e o segundo, da Itália, China e Coréia.

Oitenta e seis acessos de pimentão e pimenta foram avaliados quanto a resistência por meio de reação de hipersensibilidade a tobamovírus, sendo 62 de *Capsicum annuum*, 18 de *C. baccatum* e seis de *C. chinense*. Plantas da cv. Magda foram utilizadas como controle suscetível. Dezoito dos 62 acessos de *C. annuum*, 15 dos 18 de *C. baccatum* e os acessos ICA #39, Pimenta de cheiro e PI 152225 de *C. chinense* apresentaram hipersensibilidade ao ToMV, enquanto que o acesso Ancho de *C. annuum* foi considerado tolerante, permanecendo assintomático, porém permitindo a recuperação do vírus quando inoculado em *Nicotiana glutinosa*.

Para o PMMoV patótipo P_{1,2} foram avaliados os 36 acessos de pimentão e pimenta considerados resistentes ao ToMV, sendo destes 18 de *Capsicum annuum*, 15 de *C. baccatum* e três de *C. chinense*. Destes acessos avaliados somente PI 152225 de *C. chinense* desencadeou reação de hipersensibilidade ao PMMoV, sendo fonte potencial de resistência para programas de melhoramento a este vírus.

Palavras-chave: *Tobamovirus*, caracterização biológica, molecular, *Capsicum spp.*, resistência.

TOBAMOVIRUS INFECTING *Capsicum* spp. IN SÃO PAULO STATE: OCCURRENCE, ANALYSIS OF THE VARIABILITY AND *Capsicum* spp. SCREENING TRIALS FOR RESISTANCE. Botucatu, 2007. 73 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: MÁRCIA APARECIDA CEZAR

Adviser: RENATE KRAUSE SAKATE

Co-adviser: MARCELO AGENOR PAVAN

2 SUMMARY

Isolates from commercial hot and sweet peppers fields surrounding the cities of Lins, Salto, Sorocaba, Itapetininga, Bragança Paulista in São Paulo State were collected during the years 2000 to 2005 and analyzed for the presence of tobamovirus species.

The biological and genetic variability of these isolates, purification by local lesions, was analysed using the differential genotypes of *Capsicum* spp. with the L¹, L²,

L³ e L⁴ genes that permit the classification of the isolates in pathotypes. The occurrence of *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Tomato mosaic virus* (ToMV) belonging to the P₀ pathotype and *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) belonging to the P₁₋₂, respectively, was observed. The most part of tobamovirus isolates were found in indoor conditions and with predominance of the ToMV specie, however with low incidence.

The identification of the tobamovirus species was confirmed by RT-PCR using degenerated primers for the *Tobamovirus* genus and specific primers for TMV, ToMV and PMMoV. The analysis of part of the coat protein sequence gene of the isolates of ToMV characterized as P₀ showed amino acids identity ranging between 90 to 100% when compared with others ToMV sequences. The identity of three ToMV isolates that could not be detected by the ToMV specific primers was confirmed only after the sequence analysis. The isolates characterized as P₁₋₂ PMMoV showed amino acids identity ranging between 96 to 100% when compared with others PMMoV sequences. The pathotype P_{1-2,3} PMMoV still does not occurs in the main producing areas of São Paulo State, as well as the tobamovirus incidence in sweet and hot pepper is low. There is no possible geographic correlation origin for the ToMV Brazilian isolates, whereas the PMMoV isolates could be separated in two phylogenetics branches, one including isolates from Japan, Germany and Taiwan and the second including isolates from Italy, China and Korea.

Eighty six genotypes of sweet and hot pepper were evaluated for the resistance to tobamovirus, (62 genotypes of *C. annuum*, 18 of *C. baccatum* and six of *C. chinense*). Eighteen genotypes of *C. annuum*, fifteen of *C. baccatum* and the three genotypes ICA #39, Pimenta de cheiro AND PI 152225 of *C. chinense* showed hypersensitivity reaction to ToMV, while the genotype Ancho of *C. annuum* was considered tolerant to ToMV, remaining symptomless but allowing the multiplication of the virus. Thirty-six genotypes of sweet and hot peppers (18 of *Capsicum annuum*, 15 of *C. baccatum* and three of *C. chinense*) considered resistant to ToMV, were evaluated for the reaction to P_{1,2} PMMoV. From them genotypes, only PI 152225 of *C. chinense* showed hypersensitivity reaction to PMMoV P₁₋₂ and could be used as a potential source of resistance in breeding programs for this virus.

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

3 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Capsicum* spp., pertencente à família *Solanaceae*, possui de 20 a 25 espécies, sendo as formas silvestres de pimentas e pimentões encontradas desde o Sul dos Estados Unidos até o Norte do Chile (Filgueira, 2000).

A palavra capsicum vem do termo grego Kapto, que significa morder ou picar. O nome foi associado à pungência ou ardor provocado pelas pimentas, representantes deste gênero (Reifschneider, 2000). *Capsicum* é um gênero tipicamente americano, com a existência de apenas uma espécie fora das Américas e, dentre as quais, cinco espécies são domesticadas e de 15-20 semidomesticados ou silvestres. (Bianchetti et al., 1999).

Anualmente, no Brasil, são cultivados cerca de 13.000 hectares com espécies de *Capsicum* e produzidas aproximadamente 280.000 t de frutos de pimentão para o consumo *in natura* e processamento de molhos, conservas e outras formas de preparo de pimenta (Carvalho et al., 2003). Todos os Estados brasileiros produzem pimentões, porém a maior produção está concentrada nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, que são responsáveis pelo plantio de 5.000 ha e produção de 120.000 t. Somente o mercado de sementes de pimentão movimentou US\$ 1,5 milhões (Ribeiro & Cruz, 2003). O cultivo de

pimentas ocorre praticamente em todas as regiões do País sendo a área anual cultivada de cerca de 2.000 ha e tendo como principais Estados produtores Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul. A crescente demanda do mercado, estimado em 80 milhões de reais ao ano, tem impulsionado o aumento da área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias, tornando o agronegócio de pimentas (doces e picantes) um dos mais importantes do país (Reifschneider & Ribeiro, 2003).

A produtividade média da pimenta pode variar de acordo com a variedade. Pimentas do tipo ‘Dedo-de-moça’ e ‘Tabasco’ apresentam uma produtividade de 10 t/ha, no caso das pimentas do tipo ‘Malagueta’, estas podem atingir uma produtividade de 4 ton/ha, e as do tipo ‘Jalapeño’ podendo atingir 30 t/ha (Vilela, 2007). Enquanto que o pimentão atinge uma produtividade média ao redor de 27 t/ha (Pierro, 2005). De acordo com os dados do Anuário da Agricultura Brasileira (2004), o volume comercializado de pimentão na CEAGESP-SP no ano de 2000 foi de 35.079 t e no ano de 2003, até o mês de junho, a comercialização foi de 17.164 t.

Além do pimentão (*Capsicum annuum* var. *annuum*), são cultivadas no Brasil diferentes tipos de pimentas pertencentes às quatro espécies domesticadas: *C. annuum* (jalapeño), *C. baccatum* (dedo-de-moça), *C. frutescens* (malagueta) e *C. chinense* (pimenta-de-cheiro, bode, cumari-do-Pará). Diferentemente do pimentão, as pimentas apresentam certa rusticidade em campo e um ciclo mais longo podendo o período de colheita estender-se por mais de um ano (Reifschneider, 2000).

Apesar de o gênero *Capsicum* ocupar uma posição importante no consumo brasileiro de hortaliças e destacar-se entre as dez de maior consumo tanto em valor quanto em volume comercializado (Echer, 2001), tem-se verificado um decréscimo na área cultivada no Estado de São Paulo, devido principalmente à alta incidência de doenças na cultura, principalmente as de origem viral (Dias, 2004). No Brasil espécies pertencentes aos gêneros *Cucumovirus*, *Begomovirus*, *Luteovirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus*, *Tospovirus* e *Potyvirus* já foram relatadas infectando pimentão e pimenta (Brioso, 1996; Lima et al., 2001; Nozaki et al., 2006).

3.1. Principais vírus em *Capsicum* spp. no Brasil

Potato virus Y (PVY), espécie tipo do gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, por várias décadas foi considerado o principal entrave à produção de pimentão no País (Echer, 2001). Trata-se de um vírus transmitido por afídeos. A incorporação da resistência a este vírus em cultivares de pimentão e a criação da série “Agrônômico” pelo pesquisador Hiroshi Nagai, do Instituto Agrônômico de Campinas (IAC) minimizaram as perdas causadas por este vírus até a ocorrência, na década de 80 da estirpe PVY^m, capaz de suplantar a resistência especialmente da cultivar Agrônômico 10G, que prevaleceu no mercado por mais de duas décadas (Nagai, 1993). A classificação proposta por Gebre-Selassie et al., 1985 divide os isolados de PVY em três patótipos: P(0), patótipo comum que infecta ‘Yolo Wonder’; P(1), virulento na cultivar ‘Yolo Y’, e P(1,2) que infecta ‘Yolo Y’ e ‘Florida VR2’. No Brasil existe uma classificação proposta por Nagai, 1983, na qual isolados de PVY provenientes de pimentão são classificados em dois subgrupos: PVY^N contendo apenas a estirpe N, e PVY^W, contendo as estirpes PVY^W, PVY^F, PVY^M, PVY^{AT} e PVY^{FT}.

Nos últimos anos um aumento significativo da incidência de mosaico foi observada em campos de produção de pimentão e pimenta, sugerindo a emergência de novas estirpes de PVY, ou a presença de outros potyvirus (Truta et al., 2004). Inoue-Nagata et al. (2002) relataram a ocorrência de uma possível nova espécie de potyvirus causando mosaico amarelo e distorção foliar em pimentão ao qual denominaram de Pepper yellow mosaic virus (PepYMV), anteriormente classificada como uma estirpe severa do PVY (PVY^m).

Gioria et al., (2006) observaram na região de Lins, SP, alta incidência de mosaico em plantas de pimentão cv. Magali R, e verificaram que estas plantas encontravam-se possivelmente infectadas por um isolado distinto de PepYMV.

Cucumber mosaic virus (CMV), membro do gênero *Cucumovirus*, é um vírus de distribuição mundial e pode causar epidemias em várias culturas de importância econômica, inclusive em plantas do gênero *Capsicum* spp. (Boari, 1998; Dias, 2004). Trata-se de um vírus transmitido por mais de 60 espécies de afídeos, de modo não-persistente. Os isolados de CMV podem ser classificados em dois subgrupos, CMV I e CMV II por métodos biológicos, sorológicos e moleculares (Palukaitis et al., 1992). De modo geral o CMV-I, mais termo tolerante, predomina em regiões tropicais e subtropicais e o CMV-II é mais prevalente em regiões temperadas (Boari, 1998). No Brasil, ao contrário do que ocorre nas regiões

temperadas, a incidência do CMV em pimentão foi descrita ocorrendo de forma esporádica (Nagai, 1984). Porém, mais recentemente no Estado de São Paulo, o CMV foi encontrado causando grandes perdas em plantios comerciais de pimentão cv. Magali R na região de Lins, SP (Dias, 2004).

Já foram verificados também no Brasil begomovírus infectando *Capsicum* spp. (Lima et al. 2001; Nozaki et al., 2005; Luna et al. 2006; Nozaki et al., 2006). O *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e a espécie tentativa *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), relatados então somente em tomateiro, foram observados no Estado de São Paulo (Nozaki et al., 2005; Luna et al. 2006; Nozaki et al., 2006).

As espécies *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Groundnut ringspot virus* (GRSV) pertencentes ao gênero *Tospovirus*, podem causar perdas significativas na cultura do pimentão e tomateiro, principalmente nos plantios de novembro a fevereiro (Kurozawa et al., 2005). Estes vírus são transmitidos de modo circulativo propagativo por diferentes espécies de tripses dos gêneros *Frankliniella* e *Thrips* (Ávila 1993; Fauquet et al. 2005), sendo as espécies *F. occidentalis*, *F. shultzei*, *F. zucchini*, *T. tabaci* e *T. palmi* as principais vetoras de tospovírus (Monteiro, 2001). Colariccio et al. (2001) verificaram que em diferentes regiões produtoras de olerícolas do Estado de São Paulo, ocorreu a predominância da espécie TCSV, tendo sido as espécies TSWV, GRSV também identificadas em menor proporção.

Com relação aos tobamovírus, três espécies já foram observadas infectando pimenta e pimentão no Brasil (Kobori et al., 2001; Cezar, 2003). O *Tobacco mosaic virus* (TMV), que é a espécie tipo do gênero *Tobamovirus* (Fauquet et al. 2005) e o *Tomato mosaic virus* (ToMV) podem causar enfermidades na cultura do pimentão. Suas ocorrências são de formas esporádicas, pois a grande maioria de cultivares e híbridos de pimentão comercializados possuem genes de resistência a estes vírus (Boukema, 1984). Outra espécie é o *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), recentemente relatado no Brasil infectando *Capsicum* spp. (Kobori et al., 2001; Cezar, 2003; Eiras et al., 2004), que é considerado um dos mais destrutivos da cultura do pimentão, sob condições de cultivo protegido na Europa, devido à sua capacidade de infectar cultivares de pimentão resistentes ao TMV e ToMV (Garcia-Luque et al. 1990).

3.2. Principais características dos tobamovírus.

O gênero *Tobamovirus* é constituído por dezessete espécies. De acordo com o número de nucleotídeos presentes entre as ORFs (*Open Reading Frame*) da proteína de movimento e da proteína capsidial, análise filogenética e gama de hospedeiras, o gênero pode ser dividido nos seguintes subgrupos: subgrupo 1 que compreende os vírus que infectam solanáceas, ao qual pertencem as espécies TMV, ToMV, PMMoV, *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV) e o *Odontoglossum ring spot virus* (ORSV), o subgrupo 2 compreendido pelos vírus que infectam crucíferas e o subgrupo 3 englobando os vírus de cucurbitáceas (Lartey et al., 1996).

Os vírus que compõem o gênero *Tobamovirus* apresentam morfologia alongada, cilíndrica e rígida com aproximadamente 300 nm de comprimento e 18 nm de diâmetro. O ácido nucléico é constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, com aproximadamente 6395 nucleotídeos codificando quatro proteínas: 126 kDa e 183 kDa (replicase viral), 30 kDa (proteína de movimento-MP) e a proteína capsidial (CP) de 17,5 kDa como pode ser observado na Figura 1. Partículas virais são constituídas de 5% de ácido nucléico e 95% de proteínas (Lewandowski, 2005)

Os tobamovírus são eficientemente transmitidos por contato entre plantas e pela ação do homem através das mãos contaminadas, ferramentas e utensílios utilizados nos tratos culturais exigidos pela cultura, principalmente em condições de cultivo protegido (Tanzi et al., 1986). Além de atuarem como contaminantes na parte externa das sementes, representando a principal fonte de disseminação a longas distâncias (Erkan & Delen, 1985), possuem alta estabilidade permanecendo desta forma por longos períodos em restos de cultura no solo (Pares & Gunn, 1989; Cuadrado Gómez, 1994; Duarte, 1995; Pares et al., 1996). No Brasil, a forte tendência da produção de pimentas e pimentões sob cultivo protegido em estufas, principalmente os de coloração vermelho e amarelo, aliada a esta característica de transmissão e sobrevivência dos tobamovírus, faz com que o produtor fique bastante atento para ocorrência destes vírus em suas estufas.

De acordo com van Regenmortel et al. (2000), além das espécies anteriormente citadas o pimentão pode ser infectado ainda por outras espécies do gênero *Tobamovirus*: *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV), *Paprika mild mottle virus* (PaMMV) e *Obuda pepper virus* (ObPV).

Os tobamovírus isolados de plantas de pimentão infectadas têm sido classificados em patótipos P₀, P₁, P₁₋₂ e P₁₋₂₋₃ de acordo com a reação obtida na série alélica de diferenciadoras de *Capsicum* spp. possuidoras dos genes L¹, L², L³ e L⁴ (Boukema, 1984; Berzal-Herranz et al., 1995; Nuez et al., 1996; Gilardi et al., 2004). Todos os isolados de TMV, ToMV e TMGMV até então estudados são classificados como patótipo P₀, os quais são incapazes de suplantar o gene de resistência L¹ (Ruiz del Pino et al., 2003).

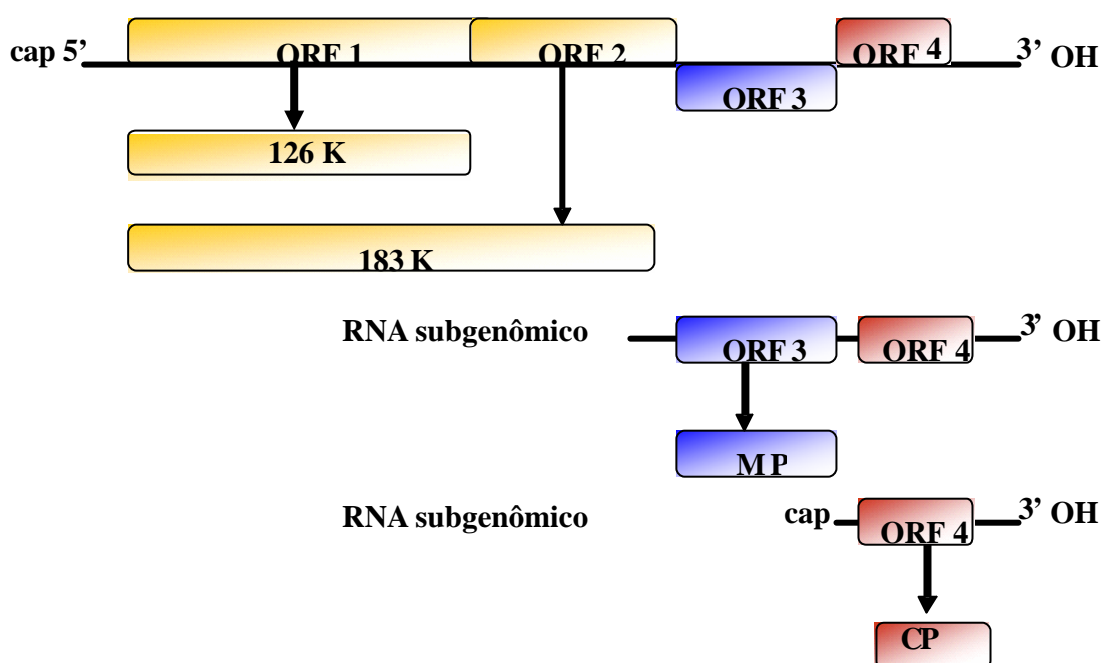


Figura 1: Organização do genoma de um tobamovírus. O RNA viral está indicado pelas suas extremidades 5' e 3'. CP: capa protéica; MP proteína de movimento, (adaptado de Lewandowski, 2005).

Os isolados de PaMMV e ObPV são classificados como pertencente ao P₁, pois contornam o gene L¹ (Tobias et al., 1982; Garcia-Luque et al., 1993). Isolados capazes de infectar plantas de *Capsicum* spp. que apresentam os genes de resistência L² e L³ são classificados como P₁₋₂ e P₁₋₂₋₃ respectivamente, e até o momento somente a espécie

PMMoV possui esta propriedade (Tabela 1). De acordo com Gilardi et al. (2004) plantas L⁴ são resistentes a todas as espécies de tobamovírus testadas até o momento.

Tabela 1. Interação de *Tobamovirus* com genótipos de *Capsicum* spp, adaptado de Boukema (1984).

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

+ = Suscetível

- = Resistente com reação de hipersensibilidade

A caracterização biológica deve ser utilizada para verificar a reação de um isolado/espécie de tobamovírus com os genes de resistência presente nos genótipos diferenciais de *Capsicum* spp., porém não permite identificar a espécie viral (Cezar, 2003). Baseado no tipo de lesão local induzido em *Nicotiana glutinosa*, uma hospedeira diferencial bastante utilizada na diagnose rápida de tobamovírus, pode-se inferir se o isolado em questão pertence à espécie de ToMV ou PMMoV, pois as lesões ocasionadas pelo ToMV são maiores e surgem mais rapidamente (3 dias) quando comparadas com as do PMMoV (Alonso et al., 1989). Para a correta identificação pode-se utilizar ferramentas sorológicas e/ou moleculares como a transcrição reversa (RT) seguida da reação de polimerização em cadeia (PCR) denominada RT-PCR capaz de revelar a identidade da espécie viral presente na amostra (Duarte et al., 2001; Velasco et al., 2002; Letschert et al., 2002; Cezar, 2003 e Eiras et al., 2004).

Para tobamovírus existem oligonucleotídeos universais do gênero Letschert et al. (2002), bem como espécie-específicos (Duarte et al., 2001; Alexandre et al., 2002; Maroon & Zavriev, 2002; Moreira et al., 2003 e Hamada et al., 2003). Um

procedimento resultando da associação das técnicas de transcrição reversa (RT) seguida da reação de polimerização em cadeia (PCR) com a Imunocaptura (IC) denominada de IC-RT-PCR, desenvolvido por Takeuchi et al. (2005) para a discriminação das espécies e patótipos de TMV, ToMV, TGMMV, PaMMV e PMMoV, utilizando-se primers específicos.

Cezar et al. (2003) verificaram que os oligonucleotídeos universais descritos por Letschert et al. (2002) podem ser utilizados eficientemente para detecção dos tobamovírus, porém os específicos nem sempre são capazes de discriminar a espécie envolvida, fazendo-se necessário o sequenciamento do fragmento viral amplificado pelos oligonucleotídeos universais. Particularmente, o sequenciamento de nucleotídeos da porção da região codificadora para a proteína capsial dos tobamovírus pode ser bastante informativa uma vez que está diretamente ligada à resistência em plantas do gênero *Capsicum* spp. (Berzal-Herranz et al., 1995; Hamada et al., 2002). Nas diversas espécies de tobamovírus, esta região tem atuado como elicitadora de genes de resistência em *Capsicum* spp. (Gilardi et al., 2004).

Através da análise filogenética entre isolados de um mesmo vírus pode-se muitas vezes inferir uma possível origem geográfica. Kirita et al. (1997) verificaram que o isolado PMMoV (J) japonês classificado como patótipo P₁₋₂ apresentou 100% de identidade com o isolado PMMoV (S) espanhol na região codificadora para a capa protéica (Garcia-Luque et al., 1993). Ambos pertencem ao patótipo P₁₋₂ e são capazes de suplantar a resistência do gene L² presente em *C. frutescens* 'Tabasco'. Uma possível explicação para a longa jornada do PMMoV da Espanha ter ocorrido no Japão seria devido ao tráfego de sementes (Kirita et al., 1997) uma vez que este vírus pode ser transmitido desta maneira (van Regenmortel et al., 2000).

Garcia-Luque et al. (1993) e Tenllado et al., (1994), comparando dados da seqüência nucleotídica de um isolado previamente caracterizado biologicamente como P₁ de tobamovírus e dois outros isolados caracterizados como P₁₋₂ (Garcia-Luque et al., 1990) e P₁₋₂₋₃ (Wetter et al., 1984) de PMMoV, verificaram que o isolado pertencente ao P₁ tratava-se de um isolado de PaMMV e que até o momento vinha sendo denominado de patótipo P₁ de PMMoV.

Métodos rápidos para diferenciar os isolados de tobamovírus quanto à capacidade ou não de suplantar a resistência dos genes L² e L³ por meio da RT-PCR-RFLP

foram desenvolvidos por Tenllado et al., (1997), Letschert et al. (2002) e Velasco et al. (2002). Estas metodologias foram baseadas nas seqüências de nucleotídeos da capa protéica.

Levantamentos realizados com intuito de verificar a incidência de espécies do gênero *Tobamovirus* em diferentes regiões produtoras de pimentas e pimentões têm sido realizados em diferentes regiões do mundo (Avgelis, 1987; Green & Wu, 1991; Escudero, 1996; Hiskias et al., 1999; Buzkan et al., 2006).

3.3. *Capsicum* spp e a resistência a *Tobamovirus*.

Há diferentes mecanismos de resistência que podem ser identificados no processo de seleção de plantas resistentes aos vírus, podendo estes ser complexos e envolver vários fatores. De acordo com Matthews (1991), os indivíduos podem ser classificados em imunes e sujeitos à infecção.

Uma planta imune é aquela na qual o vírus não se replica no protoplasma das suas células, ou em quaisquer células da planta intacta. Pode haver desencapsidação do vírus, mas não há replicação, não sendo, portanto a planta hospedeira do vírus. Os indivíduos sujeitos à infecção são aqueles considerados hospedeiros, pois o vírus se replica em seu protoplasma e nas células da planta intacta quando inoculados mecanicamente ou transmitidos naturalmente. Esses indivíduos podem ser divididos em suscetíveis e resistentes. Quando o indivíduo é suscetível, além de ocorrer replicação, há o movimento sistêmico do vírus pela planta. São considerados dois padrões para a suscetibilidade, um é aquele representado pelo indivíduo sensível, onde a planta reage à infecção com um quadro patológico, podendo ser severo ou moderado. O outro padrão de suscetibilidade é a tolerância, na qual a planta permite a multiplicação do vírus, porém sem a manifestação de sintomas do mesmo, o efeito visível da infecção na planta é muito discreto ou inexistente. Plantas tolerantes tornam-se fonte de inóculo para outras culturas e podem também contribuir para a seleção de estirpes mais severas do vírus.

Indivíduos resistentes são aqueles que não apresentam um quadro de infecção sistêmica. Matthews (1991) os divide em resistentes de extrema hipersensibilidade e resistentes de hipersensibilidade, de acordo com o fator que impede a disseminação sistêmica do vírus pela planta. A resistência de extrema hipersensibilidade ocorre quando o vírus se

multiplica, mas fica limitado às células inicialmente infectadas. Na resistência por hipersensibilidade, a infecção é limitada por uma reação das células do hospedeiro ao redor das células inicialmente infectadas, formando geralmente lesão local necrótica, sendo que a restrita localização do vírus é considerada uma resposta de resistência ao patógeno viral (Fraser 1990). A resposta de hipersensibilidade (RH) é um evento altamente específico que depende de uma combinação entre um gene de resistência (R) na planta e um gene de avirulência (*avr*) no patógeno, um conceito referido por Flor (1971) como resistência gene-a-gene.

Doenças de origem viral são particularmente de difícil controle, de modo que a obtenção de cultivares com resistência torna-se uma das medidas mais indicadas (Suzuki et al., 2003). Diversos genes de resistência a vírus em *Capsicum* spp. foram relatados, e a transferência desses genes à cultivares de pimentão tem sido realizada através do melhoramento clássico (Boukema, 1984; Grube et al., 2000). Três etapas básicas devem ser consideradas em qualquer programa de obtenção e utilização de cultivares resistentes: 1) identificação de fontes de resistência, ou seja, identificar germoplasma que possua os genes de resistência procurados; 2) incorporação desses genes em cultivares comerciais por meio de métodos de melhoramento; 3) finalmente, após a obtenção de um cultivar resistente, deve-se traçar a melhor estratégia para que a resistência seja durável à natureza dinâmica das populações patogênicas (Camargo & Bergamin Filho, 1995).

De acordo com Boukema (1984) diversos tobamovírus que infectam pimentas e pimentões são controlados mundialmente através do uso de cultivares resistentes.

A resistência a tobamovírus em *Capsicum* spp. é mediada por uma reação de hipersensibilidade, sendo manifestada através da indução de lesões locais necróticas. A resistência é governada pela série alélica L^1 , L^2 , L^3 e L^4 (Gilardi et al., 2004). Os genes LL foram os primeiros genes de resistência em plantas identificado e com dominância simples, pelo caráter Mendeliano (Holmes, 1934, citado por de la Cruz et al., 1997; Berzal-Herranz et al., 1995). De acordo com Nagai (1984) estes genes dominantes já foram transferidos para muitas cultivares de pimentão, como Yolo Wonder, Keystone Resistant, entre outros.

Estes genes de resistência foram inicialmente identificados em *C. annum* cv. Verbeterde Glas (L^1/L^1), *C. frutescens* cv. Tabasco (L^2/L^2), *C. chinense* PI 152225 (L^3/L^3), e *C. chacoense* PI 260429 e AS 185 (L^4/L^4). Materiais com genes dominantes

L¹ e L² apresentam a mesma reação ao ToMV e TMV (Nuez et al., 1996). De acordo com estes autores, na Europa, a proteção proporcionada por este gene foi efetiva até 1975, quando foi verificada ocorrência da espécie PMMoV capaz de infectar estas variedades.

Tobamovírus capazes de suplantarem os genes de resistência L¹, L² e L³ já foram relatadas em diversas regiões do mundo (Tenllado et al., 1994; Kirita et al., 1997 e Tsuda et al., 1998).

De acordo com Boukema (1980; 1982) citados por Nuez et al., 1996 plantas jovens que contêm os genes L¹, L² e L³ em combinações heterozigóticas e em determinadas circunstâncias de alta temperatura (30° C), fotoperíodo curto entre outras condições de cultivo, desencadeiam uma reação de hipersensibilidade mais lenta, permitindo o escape do vírus que pode causar infecção sistêmica, necrose apical e conseqüente morte da planta. Berza-Herranz et al. (1995) também verificaram que plantas heterozigotas para este gene, sob certas condições ambientais, podem apresentar sintomas de necroses no ápice e nas nervuras das folhas ao invés da reação de hipersensibilidade, comprometendo dessa forma a efetividade do gene L³. Em plantas homozigotas L³ L³ este fenômeno é menos severo e o patótipo P₁₋₂₋₃ de PMMoV é o único tobamovírus até o momento capaz de suplantar a resistência. De acordo com Sawada et al. (2004) e Sawada et al. (2005), temperaturas superiores a 30 °C também podem prejudicar a efetividade dos genes L¹ e L².

Tanzi et al. (1986) demonstraram que o patótipo P₁₋₂ quando inoculado em híbridos comerciais “Novi” e “Delgado” (L¹ L³) causaram mosqueado clorótico, necrose e queda das folhas inoculadas, seguida por uma necrose sistêmica e mosaico. Este tipo de sintomatologia foi classificado por Rast & Th (1985) como suscetibilidade parcial. Dos dois híbridos testados o “Delgado” desenvolveu necrose sistêmica em todas as plantas testadas, enquanto que o “Novi” mostrou um prevalente mosaico após a abscisão das folhas inoculadas. O patótipo P₁₋₂₋₃ produziu mosaico sistêmico, porém, atenuado em ambos híbridos, estes resultados corroboram com os obtidos por Boukema (1980), o qual demonstra que a herança da resistência governada pelo gene L³ é de dominância incompleta.

Suzuki et al. (2003) verificaram que os acessos de *C. baccatum* PI 439381, *C. frutescens* LS 1839-2-4 e *C. annuum* cv. Saporooonaga, foram altamente suscetíveis ao patótipo P₁₋₂ de PMMoV, indicando possuírem apenas os alelos L¹ ou L².

O gene L^2 tem sido encontrado em algumas cultivares de *C. frutescens* cv. Tabasco (de la Cruz et al., 1997). A resistência ao patótipo P_{1-2} de PMMoV pode ser observada nos diversos acessos PI 159236, PI 315008 e PI 315023 de *C. chinense* (Van der Berkmortel, 1977 citado por Nuez et al., 1996) e *C. chinense* PI 152225 (Boukema 1984) pois apresentam o gene L^3 que na maioria das vezes é efetivo para este patótipo.

Atualmente, o gene L^4 confere resistência a todos patótipos de tobamovírus conhecidos que infectam pimentão (Marte et al., 1992; Gilardi et al., 2004). Visando incorporação deste gene em materiais comerciais, Marte et al. (1992) avaliaram gerações F1 de híbridos obtidos de cruzamentos interespecíficos entre *C. chacoense* PI 260429 ($L^4 L^4$) e *C. annuum* L ($L^+ L^+$) ou *C. chacoense* PI 260429 e *C. chinense* ($L^3 L^3$) quanto a resistência ao patótipo P_{1-2-3} e a presença do alelo L^4 nestes genótipos. Plantas suscetíveis (segregantes) ao patótipo P_{1-2-3} foram detectadas a partir das progênes $L^4 L^+ \times L^+ L^+$ (17 de 38 plantas testadas) e $L^4 L^3 \times L^+ L^+$ (duas de cinco plantas testadas). Entretanto, observaram que duas plantas derivadas de $L^4 L^+ \times L^3 L^3$ apresentaram resistência por hipersensibilidade exibindo lesões locais necróticas nas folhas inoculadas. Gerações F1 de híbridos Novares, Rapires, B-420 e C1-39 foram obtidos de cruzamentos interespecíficos entre *C. annuum* L ($L^+ L^+$) e *C. chinense* ($L^3 L^3$) por Moór & Zatyko (1995). Geração F1 do híbrido H6-19 contendo o gene L^4 de resistência a todos os patótipos de tobamovírus foi também obtido por estes autores.

Deste modo o presente trabalho teve por objetivos realizar o estudo da ocorrência e variabilidade genética de tobamovírus infectando *Capsicum* spp. no Estado de São Paulo e triagem para a resistência. Para atingir estes objetivos a tese foi dividida em dois capítulos, sendo o primeiro capítulo intitulado “Tobamovírus infectando *Capsicum* spp: ocorrência e análise da variabilidade genética”, redigido conforme as normas da revista Summa Phytopathologica; o segundo capítulo intitulado “Avaliação da resistência a *Tobamovirus* em *Capsicum* spp” redigido conforme as normas da revista Horticultura Brasileira.

CAPÍTULO 01

**Tobamovírus infectando *Capsicum* spp: ocorrência e
análise da variabilidade genética.**

Tobamovirus infectando *Capsicum* spp: ocorrência e análise da variabilidade genética.

Márcia Aparecida Cezar^{1*}, Renate Krause-Sakate¹, Rômulo Fujito Kobori², Marcelo Agenor Pavan¹

¹Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP, CEP-18.610-307, Botucatu-SP, e-mail: marciaapcezar@hotmail.com

²Sakata Seed Sudamerica Ltda, CP 427, CEP-12.906-840, Bragança Paulista-SP.

* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor: Bolsista da CAPES

Aceito para publicação em: ___/___/_____

RESUMO

Cezar, M.A.; Krause-Sakate, R.; Kobori, R.F.; Pavan, M.A. **Tobamovirus infectando *Capsicum* spp: ocorrência e análise da variabilidade genética.** *Summa Phytopathologica*, 2006.

Isolados provenientes de produções comerciais de pimentão e pimenta das regiões produtoras de Joanópolis, Sorocaba, Lins, Salto, Cafelândia, Óleo, Santa Cruz do Rio Pardo, Itapetininga, Angatuba, Campinas, Paranapanema, Piraju e Ubirajara no Estado de São Paulo, foram obtidos durante os anos de 2000 a 2005 e analisados quanto à espécie de tobamovirus presente e a classificação nos patótipos P₀, P₁, P₁₋₂ e P₁₋₂₋₃ de acordo com a reação obtida na série diferenciadora de *Capsicum* spp. contendo os genes L⁺, L¹, L², L³ e L⁴. Foram observadas as espécies *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), pertencentes aos patótipos P₀ e *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) pertencente ao patótipo P₁₋₂, respectivamente. A maioria dos isolados de tobamovirus foram encontrados sob cultivo de estufa e com predominância do ToMV.

A identidade das espécies foi confirmada por RT-PCR, utilizando-se oligonucleotídeos universais para o gênero *Tobamovirus* e específicos para cada uma das espécies. O sequenciamento do fragmento amplificado correspondente à parte da porção codificadora para a capa protéica dos isolados caracterizados como patótipo P₀ de ToMV revelou identidade de aminoácidos entre 90% a 100% quando comparados com outras seqüências de ToMV. A identidade de três isolados de ToMV, não detectados pelos oligonucleotídeos específicos para ToMV, foi confirmada após sequenciamento. Os isolados caracterizados como patótipo P₁₋₂ de PMMoV apresentaram identidade de aminoácidos entre 96% a 100% quando comparados com outras seqüências de PMMoV. Nas principais regiões produtoras de *Capsicum* spp. do Estado de São Paulo ainda não ocorre o patótipo P₁₋₂₋₃ de PMMoV, bem como a incidência de tobamovírus em pimentão e pimenta é baixa. Não houve correlação de uma possível origem geográfica dos isolados de ToMV analisados, enquanto que para os de PMMoV houve separação dos isolados em dois ramos filogenéticos: o primeiro compreendendo isolados provenientes do Japão, Alemanha e Taiwan, e o segundo da Itália, China e Coréia.

Palavras-chave adicionais: pimentão, pimenta, PMMoV, ToMV e TMV

ABSTRACT

Cezar, M.A.; Krause-Sakate, R.; Kobori, R.F.; Pavan, M.A. **Tobamovirus infecting *Capsicum* spp: occurrence and genetic variability.** *Summa Phytopathologica*, 2006.

Isolates from commercial hot and sweet peppers fields surrounding the cities of Joanópolis, Sorocaba, Lins, Salto, Cafelândia, Óleo, Santa Cruz do Rio Pardo, Itapetininga, Angatuba, Campinas, Paranapanema, Piraju and Ubirajara in São Paulo State were collected during the years 2000 to 2005 and analyzed for the presence of tobamovirus species and characterized as P₀, P₁, P₁₋₂ and P₁₋₂₋₃ pathotypes based on the symptoms observed on the differential genotypes of *Capsicum* spp. with the L⁺, L¹, L², L³ and L⁴ genes. The occurrence of *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Tomato mosaic virus* (ToMV) belonging to the P₀ pathotype and *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) belonging to the P₁₋₂, respectively was

observed. The most part of tobamovirus isolates were found in indoor conditions and with predominance of the ToMV specie.

The identification of the tobamovirus species was confirmed by RT-PCR using degenerated primers for the *Tobamovirus* genus and specific primers for TMV, ToMV and PMMoV. The analysis of the sequence of part of coat protein gene of the isolates characterized as P₀ of ToMV showed amino acids identity ranging between 90 to 100% when compared with others ToMV sequences. The identity of three ToMV isolates that could not be detected by the ToMV specific primers was confirmed only after the sequence analysis. The isolates characterized as P₁₋₂ PMMoV showed amino acids identity ranging about 96 to 100% when compared with others PMMoV sequences. The pathotype P₁₋₂₋₃ PMMoV still does not occurs in the main producing areas of São Paulo State, as well as the tobamovirus incidence in sweet and hot pepper is low. There is no possible geographic correlation origin for the ToMV Brazilian isolates, whereas the PMMoV isolates could be separated in two phylogenetics branches, one including isolates from Japan, Germany and Taiwan and the second including isolates from Italy, China and Korea.

Additional keywords: sweet pepper, hot pepper, PMMoV, ToMV and TMV

INTRODUÇÃO

Os pimentões e pimentas estão entre as hortaliças mais populares no mundo. No Brasil a produção anual é de cerca de 350.000 toneladas, em uma área aproximadamente de 13.000 ha (14). Dentre os vírus que infectam o gênero *Capsicum*, destacam-se os tobamovírus, pois, são eficientemente transmitidos por contato entre plantas e pelo homem, ferramentas e utensílios utilizados nos tratamentos culturais exigidos pela cultura, principalmente em condições de cultivo protegido (17). Além de atuarem na forma de contaminantes na parte externa das sementes, representando a principal fonte de disseminação a longas distâncias (8), possuem alta estabilidade permanecendo por longos períodos em restos de cultura no solo (15). Este gênero de planta pode ser infectado por cinco espécies de tobamovírus: *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Paprika mild mottle virus* (PaMMV), *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV) e *Obuda pepper virus* (ObPV) (19).

No Brasil foram observadas em pimenta e pimentão somente o TMV, ToMV e o PMMoV (6, 11).

A resistência a estes vírus é conferida por quatro genes alélicos, L^1 , L^2 , L^3 e L^4 encontrados em plantas de *Capsicum* spp. (3,4) e segundo a reação obtida nestas plantas, os isolados de tobamovírus podem ser classificados em quatro patótipos P_0 , P_1 , $P_{1,2}$ e $P_{1,2,3}$ (16). Todos isolados de TMV e ToMV até então estudados enquadram-se como patótipo P_0 , enquanto que os de PMMoV como P_1 , $P_{1,2}$ e $P_{1,2,3}$. No Brasil já foi observada a ocorrência do patótipo $P_{1,2}$ de PMMoV (6, 7, 11). O patótipo $P_{1,2,3}$ de PMMoV já foi relatado nos seguintes países: Itália (21), Espanha (9,20), e Japão (18) e vem sendo considerado um sério entrave à produção de pimentas e pimentões.

No Brasil não existem informações sobre qual das espécies de tobamovírus predominam sob cultivo de campo e/ou estufa, tão pouco se sabe sobre a variabilidade genética destes isolados infectando *Capsicum* spp. Sequenciamento parcial da capa protéica foi efetuado para um isolado de PMMoV proveniente de pimenta (*Capsicum baccatum*) 'Dedo de Moça', tendo sido verificada maior identidade com um isolado japonês (7).

Visando ampliar o conhecimento da ocorrência das espécies de tobamovírus em diferentes regiões produtoras do Estado de São Paulo, hoje considerado maior produtor de pimentão do Brasil, bem como dos patótipos destes vírus, foram realizadas análises biológicas e moleculares, que permitiram também avaliar a variabilidade genética de alguns dos isolados encontrados em campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras e diferenciação em patótipos.

Amostras de pimentão apresentando sintomas de mosaico foram coletadas nas regiões de Joanópolis, Sorocaba, Lins, Salto, Cafelândia, Óleo, Santa Cruz do Rio Pardo, Itapetininga, Angatuba, Campinas, Paranapanema, Piraju e Ubirajara (Tabela 1) entre os anos de 2000 a 2005 e armazenadas em sacos plásticos. Trazidas ao laboratório, estas foram inoculadas via extrato vegetal em folhas de plantas de *Nicotiana glutinosa* no estádio do quarto par de folhas verdadeiras, na proporção de 1g de tecido fresco para 10 ml de tampão fosfato de

potássio 0,01 M pH 7,0 contendo 0,01 M de sulfito de sódio, utilizando-se carborundum 600 mesh como abrasivo. Após o aparecimento das lesões locais, três lesões por planta, foram destacadas das folhas com o auxílio de uma lâmina de barbear, previamente flambada, e trituradas individualmente em almofariz contendo 1 ml desse tampão, e posteriormente friccionadas sobre folhas previamente polvilhadas com carborundum de *Nicotiana clevelandii*, hospedeira utilizada na multiplicação de tobamovírus.

Visando a classificação biológica em patótipos, amostras de plantas de *N. clevelandii* utilizadas na manutenção dos isolados foram posteriormente inoculadas individualmente na série diferenciadora de *Capsicum* spp. portadora de genes de resistência para tobamovírus (3) constituída de plantas de *Capsicum annuum* `Early Califórnia Wonder` (L⁺ L⁺), *Capsicum annum* `Tisana` (L¹ L¹), *Capsicum frutescens* (L² L²), *Capsicum chinense* PI 159236` (L³ L³) e *Capsicum chacoense* `PI 260429` (L⁴ L⁴) e mantidas em casa de vegetação para a observação dos sintomas.

Detecção e análise molecular

Após a purificação biológica através do isolamento monolesional, o RNA total de plantas de *N. clevelandii* com sintomas de mosaico sistêmico foi extraído pelo método de Bertheau et al., (1). Amostras de RNAs totais de plantas de *N. clevelandii* sadias também foram extraídas e utilizadas como controle negativo. A RT-PCR foi realizada a partir de 2,5 µl de RNA total extraído, utilizando oligonucleotídeos universais para tobamovírus Tob Uni 1 e Tob Uni 2 e específicos para o ToMV, TMV e PMMoV (13) conforme descrito em Cezar et al., (5).

Os produtos amplificados via RT-PCR foram purificados (PROMEGA Wizard SV Gel and PCR Clean-up System) e submetidos diretamente ao sequenciamento. As seqüências foram comparadas com demais disponíveis no GenBank utilizando-se o programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O alinhamento das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos foi obtido utilizando-se o programa Clustal X 1.8 (10) e a análise filogenética com o programa Mega 3.1 (12).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de 2000 a 2005 pôde-se observar uma baixa ocorrência de tobamovírus em pimentão e pimentas. Durante este levantamento foram analisadas 235 amostras provenientes das regiões citadas anteriormente, sendo que foram encontrados somente nove isolados de PMMoV e treze de ToMV, ocasionando lesões locais típicas em *N. glutinosa* como observado na Figura 1. Foram observados diferentes tipos de lesões na mesma planta quando inoculada, demonstrando a presença de infecções mistas. Nos anos de 2003 e 2005 não foram observadas plantas infectadas por nenhum tobamovírus.

Inserir figura 1

Conforme mostra a Figura 1, as lesões locais de PMMoV são menores e mais claras, aparecendo aos cinco dias após inoculação, diferentemente das causadas pelo ToMV que são maiores e mais escuras visíveis aos 3 dias, permitindo em *N. glutinosa* uma separação prévia dos isolados em ToMV e PMMoV (6, 22). Todos os isolados de PMMoV quando inoculados nos genótipos diferenciais induziram somente sintomas sistêmicos de mosaico em *C. annuum* 'Early Califórnia Wonder' (L⁺ L⁺), *C. annuum* 'Tisana' (L¹ L¹), *C. frutescens* cv. Tabasco (L² L²), sendo, portanto classificados como patótipos P_{1,2}. Resposta de hipersensibilidade através de lesões locais e queda do cotilédone foram observadas em *C. chinense* 'PI 159236' (L³ L³) e *C. chacoense* 'PI 260429' (L⁴ L⁴), conforme Boukema (3).

Inserir Tabela 1

De acordo com a Tabela 1 a caracterização biológica preliminar dos isolados aqui permitiu concluir que nas principais regiões produtoras do Estado de São Paulo além do patótipo P₀ de ToMV ocorre o patótipo P_{1,2} de PMMoV. O isolado PMMoV-BR08 (Lins) foi proveniente do híbrido Magali R, enquanto que os isolados PMMoV-BR12, PMMoV-BR14 e PMMoV-BR15 foram coletados de pimentão amarelo cultivado em estufa na região de Salto – SP. Os isolados PMMoV-BR16 e PMMoV-BR17 foram coletados em campo aberto de pimentão "Atlantis", na região de Itapetininga. No Brasil a grande maioria dos cultivares e híbridos de *Capsicum* spp. apresentam resistência somente ao TMV/ToMV, por meio da

introgessão do gene L^1 , enquanto que a resistência ao PMMoV é conferida pelos genes L^2 , L^3 e L^4 (2,3). Alguns híbridos produzidos no exterior e que estão sendo comercializados no Brasil possuem resistência ao PMMoV (gene L^3 ou L^4), mas são minoria no mercado nacional. Desta forma, acredita-se que mesmo com a suscetibilidade existente na maioria dos híbridos e cultivares comercializados hoje no mercado, a ocorrência de PMMoV no campo é baixa possivelmente devido às boas práticas culturais atualmente adotadas na cultura como o uso de sementes de boa qualidade e menor manuseio da cultura em campo, quando comparada com cultivo protegido em estufa.

A identidade de aminoácidos entre os isolados de PMMoV analisados variou entre 96 a 100%, para a porção da proteína codificadora da capa protéica. Pôde-se verificar um nítido agrupamento dos isolados de PMMoV, segundo a capacidade de suplantar genes de resistência, também observado por Eiras et al. (7). Todos os isolados analisados foram agrupados com isolados de PMMoV patótipo $P_{1,2}$, enquanto que os $P_{1,2,3}$ são representados pelos isolados PMMoV-Ia, PMMoV-Italian e PMMoV-P91 e ocorrem atualmente em países da Europa e no Japão (9, 18, 20).

Inserir Tabela 2

Entre os isolados de PMMoV classificados como patótipo P_{1-2} , verifica-se uma separação dos isolados quanto a uma possível origem comum (Tabela 2). No grupo 1 encontram-se a maioria dos isolados coletados, verificando-se maiores identidades destes isolados brasileiros com os provenientes do Japão (PMMoV-J), PMMoV-DSMZ PV-16 (Alemanha), PMMoV-Taiwan. No grupo 2 encontra-se o isolado PMMoV-BR8 apresentando maiores identidades com isolados provenientes da Itália (PMMoV-1.2), China (PMMoV-China), Coreia (PMMoV-P) e Coreia do Sul (PMMoV-P0) conforme mostra a Figura 2A. Este fato sugere que possivelmente, isolados de PMMoV foram introduzidos no Brasil por meio de sementes contaminadas provenientes de diferentes regiões geográficas.

A não ocorrência do patótipo $P_{1,2,3}$ de PMMoV nas condições do Estado de São Paulo pode ser explicada pela baixa pressão de seleção, uma vez que a maioria das cultivares e híbridos comerciais de pimentão possuem somente o gene L^1 . Porém, este mesmo fato não

explica a presença do patótipo P₁₋₂, uma vez que não existem cultivares comerciais com o gene L². Este trabalho indica que possivelmente este patótipo foi introduzido no Brasil por intermédio de sementes contaminadas e de diferentes regiões geográficas.

Inserir Figura 2

Os isolados de ToMV induziram sintomas sistêmicos somente em *C. annuum* 'Early Califórnia Wonder' (L⁺ L⁺), tendo sido verificadas reações de hipersensibilidade e ausência de sintomas sistêmicos, nos demais genótipos, caracterizando-os em patótipo P₀. De acordo com a Tabela 3 a identidade de aminoácidos entre os isolados brasileiros com os demais variou de 91 a 100%, tendo sido inferiores a 86% quando comparadas com o TMV e 79% quando comparado com o PMMoV. Na análise filogenética (Figura 2 B), dois grupos foram formados, sendo o G2 constituído por isolados de ToMV provenientes de pimenta, porém mais próximos ao isolado brasileiro ToMV-Brasil To (tomate) e o G1 englobando a maioria dos isolados coletados, provenientes de diferentes regiões geográficas.

Inserir Tabela 3

Os isolados ToMV-BR02 e ToMV-BR04 (Sorocaba) ambos coletados de pimenta, não foram amplificados com os oligonucleotídeos específicos descritos por Letschert et al. (13) tendo suas identidades confirmadas somente após o sequenciamento da porção da região codificadora para a capa protéica. Não há correlação com o hospedeiro da qual os isolados foram coletados, uma vez que o isolado ToMV-BR 11, também proveniente de pimenta, foi eficientemente amplificado pelos oligonucleotídeos específicos para ToMV. Este fato demonstra a fragilidade de alguns oligonucleotídeos fornecerem resultados falso negativos quanto a identificação da espécie viral, embora esses oligonucleotídeos sejam indicados para este fim (13).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bertheau, Y., D. et al. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). IN: Perombelon, M. C. M.; van der Wolff. J. M. **Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes.** Scottish Crop Research Institute Occasional Publication, 1998.
2. Berzañ-Herranz, A.; de La Cruz, A., Tenllado, F.; Diaz-Ruiz, J.R. Lopez, L., sanz, A.I., Vaquero, C., serra, M.T.; Garcia-Luque, I. The *Capsicum* L³ gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. **Virology**, Orlando n.209, n. 2, p. 498-505. 1995.
3. Boukema, I. W. Resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. is governed by an allele of the L-locus. **Capsicum Newsletter**, n.3, p. 47-48, 1984.
4. Boukema, I. W. Allelism of genes controlling resistance to TMV in *Capsicum*. **Euphytica**, v. 29, n. 2, p. 433-439, 1980.
5. Cezar, M. A; Krause-Sakate, R.; Mezzena, L.; Kobori, R.F.; Pavan, M. A. Caracterização biológica e identificação molecular de vírus pertencentes ao gênero *Tobamovirus* provenientes de *Capsicum* spp. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.29, n.4, p. 359-361, 2003.
6. Cezar, M.A. **Caracterização biológica e molecular de isolados de vírus pertencentes ao gênero *Tobamovirus* provenientes de *Capsicum annuum* L.** 2003. 42 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
7. Eiras, M; Chaves, A.L.R.; Moreira, S.R.; Araújo, J.; Colariccio, A. Caracterização de um isolado do *Pepper mild mottle virus* que não quebra a resistência do gene L3 em *Capsicum* sp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.6, p.670-675, 2004.

8. Erkan, S.; Delen, N. Seed treatments to eliminate seed-borne tobacco mosaic virus in pepper seeds. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, Turim, v. 4, n. 2, p. 50,1985.
9. Garcia-Luque, I.; Ferrero, M. I.; Rodriguez, J. M.; Alonso, E.; de la Cruz, A.; Sanz, A.; Vaquero, C.; Serra, M. T.; Diaz, J. R. The nucleotide sequence of the coat protein genes and 3' non-coding regions of two resistance-breaking tobamoviruses in pepper shows that they are different viruses. **Archives of Virology**, Vienna, v. 131, n. 1-2, p. 75-88, 1993.
10. Jeanmougin, F.; Thompson, J. D.; Gouy, M.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. Multiple sequence alignment with Clustal X. **Trends Biochemical Science**, v. 23, p. 403-405, 1998.
11. Kobori, R. F.; Wierzbicki, R.; Della Vecchia, P.T., Pavan, M.A.; Rezende, J.A.M. Ocorrência do *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) em pimentão (*Capsicum annuum*) cultivado sob estufas no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, supl., p.516, 2001 (Resumo).
12. Kumar, S.; Tamura. K.; Nei, M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. **Briefings in Bioinformatics**, n.5, p.150-163, 2004.
13. Letschert, B.; Adam, G.; Lesermann, D. E.; Willingmann, P.; Heinze, C. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of the economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.106, n. 1, p.1-10, 2002.
14. Lopes, C. A. & Ávila, A. C. **Doenças do Pimentão Diagnose e Controle**, Brasília Embrapa Hortaliças, 96 p. 2003
15. Pares, R. D.; Gunn, L. V.; Keskula, E. N. The role of infective plant debris, and its concentration in soil, in the ecology of tomato mosaic tobamovirus -a non-vectored plant virus. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 3, p. 147-150, 1996.

16. Rast, A. Th. B. Pepper Tobamoviruses and Pathotypes used in resistance Breeding. **Capsicum Newsletter**, n. 7, p. 20-23, 1988.
17. Tanzi, M.; Betti.; Canova, A. Behaviour of two new commercial pepper cvs. With L¹ , L³ genotype towards TMV pepper strain infection. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, Grugliasko v. 5, n. 2, p. 45, 1986.
18. Tsuda, S.; Kirita, M.; Watanabe, Y. Characterization of a pepper mild mottle tobamovirus strain capable of over-coming the / L3 gene-mediated resistance, distinct from the resistance-breaking Italian isolate. **Molecular Plant Microbe Interactions**. St Paul v. 11, p. 327-331, 1998.
19. van Regenmortel, M.H.V.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.; Carstens, E. B.; Estes, M. K.; Lemon, S. M.; Maniloff, J.; Mayo, M. A. ; McGeoch, D. J.; Pringle, C. R.; Wickner, R. B. **Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego, Academic Press, 2000, 1162 p.
20. Velasco, L.; Jansen, D.; Ruiz-Garcia, L.; Segundo, E.; Cuadrado, I. M. The complete nucleotide sequence and development of a differential detection assay for a *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) isolate that overcomes L3 resistance in pepper. **Journal Virological Methods**. Netherlands, v.106, n. 1, p. 135-140, 2002.
21. Wetter, C.; Conti, M.; Altschuh, D.; Tabillion, R.; van Regenmortel, M.H.V. Pepper mild mottle virus, a tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, n. 4, p. 405-410, 1984.
22. Wetter, C. Serological identification of four tobamoviruses infecting pepper. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, n. 7, p. 597-599, 1984

Tabela 1: Relação de isolados de PMMoV e de ToMV coletados em *Capsicum* spp. de diferentes regiões produtoras do Estado de São Paulo.

ANO COLETA	LOCAL	SISTEMA DE CULTIVO	AMOSTRAS COLETADAS	PMMoV P_{1,2}	ToMV P₀	TMV P₀	PMMoV SEQUENCIADOS	ToMV SEQUENCIADOS
2000	Joanópolis	Estufa	03	-	01	-	-	ToMV BR18 ToMV BR06
2000	Lins	Campo	03	01	02	-	PMMoV BR08	ToMV BR07 ToMV BR02
2000	Sorocaba		05	03	02	-	-	ToMV BR04
2000	Salto		01	-	01	01	-	-
2001	Lins		01	-	01	-	-	ToMV BR10
2001	Salto	Estufa	02	01	01	-	PMMoV BR14 PMMoV BR12	ToMV BR11
2002	Salto	Estufa	04	02	02	-	PMMoV BR15	ToMV BR13
2003	Cafelândia	Campo	21	-	-	-	-	-
2003	Lins	Campo	09	-	-	-	-	-
2003	Óleo	Estufa	22	-	-	-	-	-
2003	Santa C R Pardo	Estufa	05	-	-	-	-	-
2004	Salto	Estufa	21	-	03	-	-	-
2004	Itapetininga	Campo Estufa	25	02	-	-	PMMoV BR16 PMMoV BR17	-
2004	Angatuba		29	-	-	-	-	-
2004	Campinas		25	-	-	-	-	-
2005	Paranapanema	Estufa	20	-	-	-	-	-
2005	Piraju	Estufa	14	-	-	-	-	-
2005	Ubirajara		25	-	-	-	-	-
TOTAL			235	09	13	01	06	08

Tabela 2. Porcentagem de identidade de seqüências de parte da porção codificadora para a proteína capsial: nucleotídeos (em branco) e aminoácidos (em cinza) entre os isolados brasileiros PMMoV-BR08 (AM411433), PMMoV-BR12 (AM 411434), PMMoV-BR14 (AM411435), PMMoV-BR15 (AM411436), PMMoV-BR16 (AM411437), PMMoV-BR17 (AM411438) e PMMoV-China (AY632863); PMMoV-J (AB000709); PMMoV-P (AB084456); PMMoV-P0 (AF103776); PMMoV-BR (AF525080) (7); PMMoV-Ia (AJ308228) (20); PMMoV-DSMZ PV-16 (AJ429087) (13); PMMoV-Tai (M87827); PMMoV-Italian (X72587); PMMoV-1.2 (AJ429088) (13); PMMoV-P91 (AJ429089) (13) e os isolados ToMV-L11A Fukushima (AB0831961); TMV-INDto (AF1265051) e PaMMV-Japanese (NC-004106).

ISOLADO	PMMoV BR08	PMMoV BR12	PMMoV BR14	PMMoV BR15	PMMoV BR16	PMMoV BR17	PMMoV CHINA	PMMoV J	PMMoV P	PMMoV P0	PMMoV BR	PMMoV Ia	PMMoV DSMZ PV-16	PMMoV TAI	PMMoV Italian	PMMoV 1.2	PMMoV P91	ToMV L11A Fukushima	TMV INDto	PaMMV Japanese
PMMoV BR08	-	98	98	98	97	97	100	98	99	98	98	94	97	97	94	99	94	68	65	65
PMMoV BR12	100	-	99	99	98	98	98	99	98	97	99	94	98	99	94	98	94	67	64	65
PMMoV BR14	99	99	-	99	98	98	98	99	97	96	99	94	98	99	94	97	94	67	64	65
PMMoV BR15	99	99	98	-	98	98	98	99	97	96	99	94	98	99	94	97	94	66	64	65
PMMoV BR16	100	100	99	99	-	100	97	98	97	96	98	94	97	98	94	97	94	66	65	65
PMMoV BR17	100	100	99	99	100	-	97	98	97	96	98	94	97	98	94	97	94	66	65	65
PMMoV CHINA	100	100	99	99	100	100	-	98	99	98	98	94	97	97	94	99	94	68	65	65
PMMoV J	100	100	99	99	100	100	100	-	98	96	100	94	99	99	94	97	94	67	64	65
PMMoV P	100	100	99	99	100	100	100	100	-	98	98	94	97	97	94	99	94	68	65	65
PMMoV P0	96	96	96	96	96	96	96	96	96	-	96	92	95	96	92	98	92	63	64	65
PMMoV BR	100	100	99	99	100	100	100	100	100	96	-	94	99	99	94	97	94	67	64	65
PMMoV Ia	96	96	96	96	96	96	96	96	96	94	96	-	93	94	98	94	98	64	62	95
PMMoV DSMZPV-16	97	97	96	96	97	97	97	97	97	94	97	94	-	98	93	97	93	67	64	65
PMMoV TAI	100	100	99	99	100	100	100	100	100	96	100	96	97	-	94	97	94	67	64	65
PMMoV Italian	98	98	98	97	98	98	98	98	98	94	98	98	95	98	-	94	100	64	62	65
PMMoV1.2	99	99	98	98	99	99	99	99	99	96	99	96	96	99	97	-	94	68	65	65
PMMoV P91	98	98	98	97	98	98	98	98	98	94	98	98	95	98	100	97	-	64	62	65
ToMVL11A Fukushima	73	73	74	73	73	73	73	73	73	71	73	73	71	73	74	73	74	-	72	64
TMV INDto	67	67	67	66	67	67	67	67	67	66	67	67	66	67	68	67	68	78	-	60
PaMMV Japanese	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	71	68	70	70	70	70	62	57	-

Tabela 3. Porcentagem de identidade de seqüências de parte da porção codificadora para a proteína capsial: nucleotídeos (em branco) e aminoácidos (em cinza) entre isolados ToMV-BR02 (AM411425), ToMV-BR04 (AM411426), ToMV-BR06 (AM411427), ToMV-BR07 (AM411428), ToMV-BR10 (AM411429), ToMV-BR11 (AM411430), ToMV-BR13 (AM411431) e ToMV-BR18(AM411432) e ToMV-DSMZ PV-0135 (AJ429084) (13); ToMV-TAI (AJ383730); ToMV-L11A Fukushima (AB0831961); ToMV-Queensland (AF332868); ToMV-Brasilto (AF411922); ToMV-BrasilIm (AY063743); ToMV-CHCam (AJ417701); ToMVCHIto (DQ661035) e os isolados TMV-Brasilpet (AY029262); TMV-INDto (AF1265051) e PMMoV-S (M81413) foram utilizados como grupo externo para as análises.

ISOLADO	ToMV BR02	ToMV BR04	ToMV BR06	ToMV BR07	ToMV BR10	ToMV BR11	ToMV BR13	ToMV BR18	ToMV DSMZ PV-0135	ToMV TAI	ToMV L11A Fukushima	ToMV Queensland	ToMV Brasilto	ToMV BrasilIm	ToMV CHCam	ToMV CHIto	TMV Brasilpet	TMV INDto	PMMV-S
ToMV BR02	-	86	86	86	86	98	94	86	87	86	86	86	98	86	86	86	77	75	68
ToMV BR04	92	-	99	98	100	86	92	98	97	98	99	99	86	99	98	98	74	72	69
ToMV BR06	92	100	-	98	99	86	92	98	97	98	98	99	86	98	98	98	74	72	69
ToMV BR07	90	98	98	-	98	86	92	98	96	98	99	99	86	99	98	98	74	72	69
ToMV BR10	92	100	100	98	-	86	92	98	97	98	99	99	86	99	98	98	74	72	69
ToMV BR11	99	93	93	91	93	-	93	86	87	86	86	86	99	86	86	86	77	76	68
ToMV BR13	95	94	94	94	94	95	-	91	90	92	92	92	93	92	91	91	76	74	68
ToMV BR18	91	99	99	99	99	92	94	-	96	98	98	98	86	98	98	98	75	72	69
ToMV DSMZ PV-0135	90	98	98	96	98	91	92	97	-	96	97	97	87	97	96	97	73	72	70
ToMV TAI	91	99	99	99	99	92	94	100	97	-	99	99	86	99	98	98	75	72	69
ToMV L11A Fukushima	91	99	99	99	99	92	94	100	97	100	-	99	86	99	98	98	74	72	69
ToMV Queensland	91	99	99	99	99	92	94	100	97	100	100	-	86	99	98	99	74	72	69
ToMV Brasilto	97	93	93	91	93	98	95	92	91	92	92	92	-	86	85	86	78	76	69
ToMV BrasilIm	91	99	99	99	99	92	94	100	97	100	100	100	92	-	98	98	74	72	69
ToMV CHCam	90	98	98	97	98	91	93	98	96	98	98	98	91	98	-	98	74	72	69
ToMV CHIto	91	99	99	99	99	92	94	100	97	100	100	100	92	100	98	-	74	72	70
TMV Brasilpet	84	84	84	84	84	85	84	85	83	85	85	85	86	85	85	85	-	91	67
TMV INDto	78	78	78	78	78	79	78	79	77	79	79	79	80	79	79	79	92	-	65
PMMV-S	74	77	77	77	77	75	75	78	77	78	78	78	76	78	78	78	77	72	-

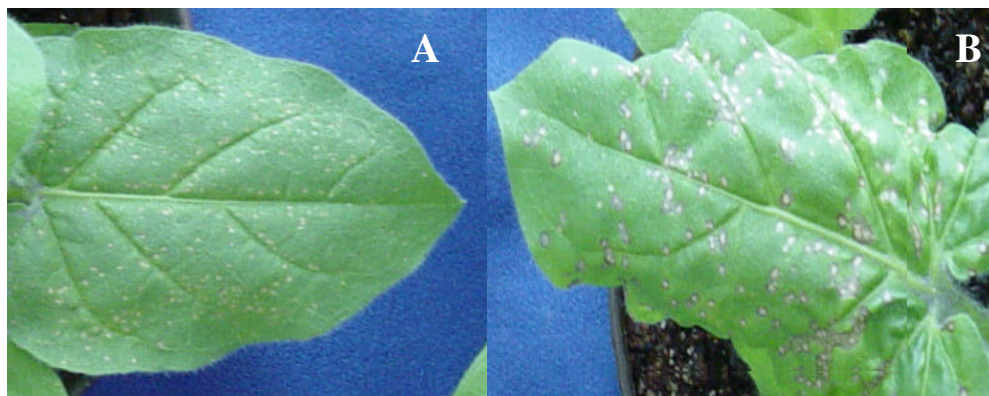


Figura 1. Sintomas de lesões locais em plantas de *N. glutinosa* inoculadas com: **A:** PMMoV (lesões menores) e **B:** ToMV (lesões maiores).

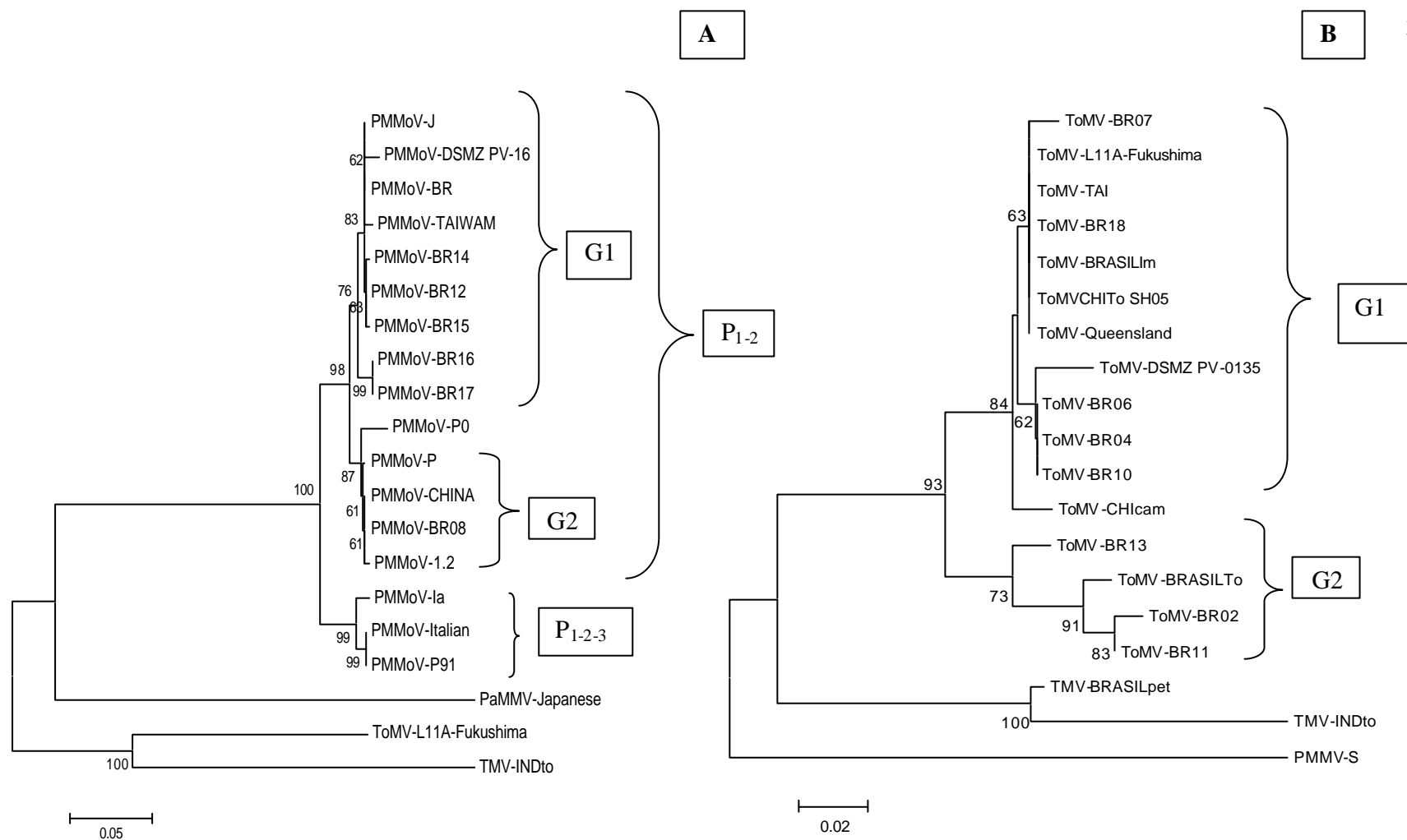


Figura 2. Árvores filogenéticas obtidas pelas análises das seqüências de aminoácidos referentes a parte da proteína capsidial dos isolados de tobamovírus: PMMoV (A) e ToMV (B) utilizando o programa Mega 3.1, com valor de bootstrap 2000.

CAPÍTULO 02

Avaliação da resistência a tobamovirus em acessos de

***Capsicum* spp.**

Avaliação da resistência a tobamovirus em acessos de *Capsicum* spp.

Márcia Aparecida Cezar^{1*}, Renate Krause-Sakate¹, Marcelo Agenor Pavan¹, Cyro Paulino da Costa²

¹Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP, CP 237, CEP-18.603-970, Botucatu-SP, ² USP/ESALQ – Depto. De Produção Vegetal – CEP 13418-900 – Piracicaba, SP

* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor: Bolsista da CAPES

Aceito para publicação em: ___/___/_____

RESUMO

Cezar, M.A.; Krause-Sakate, R.; Pavan, M.A.; Costa, C. P. **Avaliação da resistência a tobamovirus em acessos de *Capsicum* spp.** *Horticultura Brasileira*, 2006.

A resistência em *Capsicum* spp a tobamovírus é governada pela série alélica L¹- L⁴. Baseado na capacidade de alguns isolados suplantarem a resistência destes genes, os tobamovírus podem ser classificados nos patótipos P₀, P₁, P₁₋₂ e P₁₋₂₋₃. No Brasil, até o momento as três espécies de tobamovírus são conhecidas: *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), pertencentes aos patótipos P₀ e *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) pertencente ao patótipo P₁₋₂, respectivamente e podem infectar pimentas e pimentões. Oitenta e seis acessos de pimentão e pimenta foram avaliados quanto à resistência a tobamovírus, sendo 62 de *Capsicum annuum*, 18 de *C. baccatum* e seis de *C. chinense*. Plantas da cv. Magda foram utilizadas como controle suscetível. Dezoito dos 62 acessos de *C. annuum*, 15 dos 18 de *C. baccatum* e os acessos ICA #39, Pimenta de cheiro e PI 152225 de *C. chinense* apresentaram reação de hipersensibilidade ao ToMV, enquanto que o acesso

Ancho de *C. annuum* foi considerado tolerante, permanecendo assintomático, porém permitindo a recuperação do vírus quando inoculado em *Nicotiana glutinosa*.

Para o PMMoV patótipo P_{1,2} foram avaliados os 36 acessos de pimentão e pimenta considerados resistentes ao ToMV, sendo destes 18 de *Capsicum annuum*, 15 de *C. baccatum* e três de *C. chinense*. Dos 36 acessos avaliados somente PI 152225 de *C. chinense* desencadeou reação de hipersensibilidade ao PMMoV, sendo fonte potencial de resistência para programas de melhoramento a este vírus.

Palavras-chave: Pimentão, Pimenta, TMV, ToMV, PMMoV

Evaluation of the *Capsicum* spp. genotypes resistance to tobamovirus.

ABSTRAT

Cezar, M.A.; Krause-Sakate, R.; Pavan, M.A.; Costa, C. P. **Evaluation of the *Capsicum* spp. genotypes resistance to tobamovirus.** *Horticultura Brasileira*, 2006.

The resistance in *Capsicum spp* to tobamoviruses is conferred by the allelic series L¹- L⁴. Based on the ability of some isolates to overcome the resistance genes, the tobamovirus can be classified in the pathotypes P₀, P₁, P₁₋₂ and P₁₋₂₋₃. In Brazil, at this moment, three species of tobamovirus: *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), belonging to pathotype P₀ and *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) belonging to pathotype P₁₋₂ respectively, can infect hot and sweet peppers. Eighty six genotypes of sweet and hot pepper (62 genotypes of *C. annuum*, 18 of *C. baccatum* and six of *C. chinense*) were evaluated for the resistance to tobamovirus. Eighteen genotypes of *C. annuum*, fifteen of *C. baccatum* and the three genotypes ICA #39, Pimenta de cheiro e PI 152225 of *C. chinense* reacted with hipersensibility to ToMV, while the genotype Ancho of *C. annuum* was considered tolerant to ToMV, remaining symptomless but allowing the multiplication of the virus. Thirty-six genotypes of sweet and hot peppers (18 of *Capsicum annuum*, 15 of *C.*

baccatum and three of *C. chinense*) considered resistant to ToMV, were evaluated for the reaction to P_{1,2} PMMoV. From 36 genotypes only the PI 152225 of *C. chinense* reacted with hypersensitivity to PMMoV, indicating that it could be used as a potential source resistance of breeding programs.

Keywords: Sweet pepper, hot pepper, ToMV, TMV and PMMoV

Recebido para publicação em:

INTRODUÇÃO

As pimentas e pimentões, pertencentes ao gênero *Capsicum* spp., são amplamente cultivadas em todo mundo (Nuez *et al.* 1996). Ocupam uma posição importante no consumo brasileiro de hortaliças destacando-se entre as dez de maior consumo, tanto em valor, quanto em volume comercializado (Echer, 2001). A produtividade média da pimenta pode variar de acordo com a variedade. Pimentas do tipo ‘Dedo-de-moça’ e ‘Tabasco’ apresentam uma produtividade de 10 t/ha, no caso das pimentas do tipo ‘Malagueta’, estas podem atingir uma produtividade de 4 ton/ha, e as do tipo ‘Jalapeño’ podendo atingir 30 t/ha (Vilela, 2007). Enquanto que a cultura do pimentão atinge uma produtividade média ao redor de 27 toneladas por ha. (Pierro, 2005).

Uma das limitações para estas culturas são as doenças de origem viral. Várias espécies do gênero *Tobamovirus* podem infectar *Capsicum* spp., tais como o: *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) e o *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) sendo este último inicialmente relatado no Brasil infectando plantas de pimenta e pimentão em cultivos protegidos desde 2001 (Kobori *et al.*, 2001; Cezar, 2003; Eiras *et al.* 2004).

Os tobamovírus são eficientemente transmitidos por contato entre plantas, pela ação do homem, ferramentas e utensílios utilizados nos tratamentos culturais exigidos pela cultura, principalmente em condições de cultivo protegido (Tanzi *et al.*, 1986). Além disto são transmitidos na forma de contaminantes na parte externa das sementes, e estas são consideradas a principal fonte de disseminação a longas distâncias (Erkan & Delen, 1985). Estes vírus possuem alta estabilidade, permanecendo viáveis por longos períodos em restos

culturais no solo (Pares & Gunn, 1989; Cuadrado Gómez, 1994; Duarte, 1995; Pares *et al.*, 1996).

A resistência a tobamovírus em *Capsicum* spp. é controlada por uma reação de hipersensibilidade (Gilardi *et al.*, 2004). Quanto à reação obtida na série de diferenciadoras de *Capsicum* spp. contendo os genes L^+ , L^1 , L^2 e L^3 (Boukema, 1984; Berzal-Herranz *et al.*, 1995; Nuez *et al.*, 1996; Gilardi *et al.*, 2004) as espécies de tobamovírus podem ser classificadas nos patótipos P_0 , P_1 , $P_{1,2}$ e $P_{1,2,3}$, respectivamente. Todos isolados de TMV e ToMV até então estudados enquadram-se como patótipo P_0 e são incapazes de suplantar a resistência em plantas de *Capsicum* que contém o gene L^1 (Ruiz del Pino *et al.*, 2003), enquanto que, plantas com os genes de resistência L^2 e L^3 são facilmente infectadas pelos patótipos $P_{1,2}$ e $P_{1,2,3}$ de PMMoV, respectivamente (Nuez *et al.*, 1996). No Brasil, até o momento, somente foi verificado o patótipo $P_{1,2}$ de PMMoV (Kobori *et al.*, 2001; Cezar, 2003; Eiras *et al.*, 2004), porém em países, como Espanha (Garcia-Luque *et al.*, 1993; Velasco *et al.*, 2002), Itália (Wetter *et al.*, 1984), e o Japão (Tsuda *et al.*, 1998) já foi observado o patótipo $P_{1,2,3}$ de PMMoV e este vem sendo considerado um sério entrave à produção de pimentas e pimentão. Somente o gene L^4 é capaz de conferir resistência a este patótipo (Gilardi *et al.*, 2004). A resistência em plantas do gênero *Capsicum* spp. presente no locus L é do tipo resistência dominante (Boukema, 1980; Berzal-Herranz *et al.*, 1995; de la Cruz *et al.*, 1997). O gene L^1 têm sido utilizado como fonte de resistência a tobamovírus em diversos híbridos e cultivares comerciais no Brasil como Yolo Wonder, Keystone Resistant (Nagai, 1984) e Magali R. Esta resistência não é efetiva para o patótipo $P_{1,2}$ de PMMoV (Gilardi *et al.*, 2004), que ocorre no Brasil.

No Brasil, a introdução dos genes L^3 e L^4 nos híbridos e/ou cultivares nacionais seria satisfatória para o controle dos isolados de tobamovírus locais. Porém, pensando-se na coevolução patógeno-hospedeiro, objetivou-se verificar a reação de diversas populações de *Capsicum* spp. ao patótipo P_0 de ToMV e ao patótipo $P_{1,2}$ de PMMoV, visando buscar possíveis novas fontes de resistência para o melhoramento genético de *Capsicum* spp., uma vez que a utilização de plantas resistentes é a medida mais indicada no controle destes vírus em condições de campo e estufa.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos isolados de ToMV e PMMoV

Os isolados de ToMV e PMMoV, provenientes de *Capsicum* spp., caracterizados como patótipos P₀ de ToMV e P₁₋₂ de PMMoV obtidos por Cezar (2003) foram submetidos a um teste de agressividade. Para seleção do isolado patótipo P₀ de ToMV foi avaliada a sintomatologia em plantas da cultivar Magda (suscetível), enquanto que para seleção do isolado patótipo P₁₋₂ de PMMoV foi avaliada a sintomatologia em plantas de *Capsicum frutescens* 'Tabasco' (gene L²) suscetíveis a este patótipo. Plantas de *Nicotiana glutinosa* foram utilizadas como controle da inoculação. A avaliação foi realizada visualmente por um período de 30 dias após a inoculação, onde foram observados sintomas de mosaico nas plantas inoculadas.

Avaliação da resistência de *Capsicum* spp. ao ToMV e PMMoV

Foram avaliados 86 genótipos de pimentão e pimenta, sendo 62 acessos de *C. annuum*, 18 de *C. baccatum* e seis de *C. chinense* (Tabela 1).

As sementes foram pré-germinadas em "Gerbox" e em seguida individualmente transplantadas em bandejas de isopor com 72 células, avaliando-se 6 plantas por acesso, mantidas em estufa. A coleção 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.

Na obtenção do inóculo do patótipo P₀ de ToMV, plantas de tomate suscetível (AF-2485) foram utilizadas. As folhas cotiledonares (aproximadamente 15 dias da germinação das sementes) dos genótipos avaliados foram inoculadas, utilizando-se as folhas de tomate infectado na proporção 1:20 (Peso:Volume) em tampão de fosfato de potássio 0,01 M, pH 7,0, contendo sulfato de sódio 0,01 M e carbureto de silício (Carborundum), como abrasivo. Em seguida, as folhas cotiledonares foram lavadas com água para a remoção do excesso de inóculo e de abrasivo e avaliadas por 30 dias. As plantas foram inoculadas três vezes consecutivas com intervalos de três dias para evitar escapes. Plantas da cv. Magda foram utilizadas como controle suscetível. A avaliação foi realizada visualmente observando-se inicialmente reação de hipersensibilidade, bem como presença ou ausência de mosaico. Após 30 dias as plantas que

apresentaram queda de cotilédone e permaneceram assintomáticas foram inoculadas em *N. glutinosa*, na tentativa para a recuperação do vírus.

Plantas consideradas resistentes ou tolerantes ao patótipo P₀ de ToMV foram posteriormente avaliadas para resistência ao P₁₋₂ de PMMoV. Plantas de *C. frutescens* foram utilizadas para a multiplicação do inóculo e a inoculação e avaliação foi realizada de forma semelhante como para o ToMV. Plantas de *N. glutinosa* foram utilizadas na retroinoculação de plantas que permaneceram assintomáticas após a inoculação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os isolados de ToMV e PMMoV avaliados, foram escolhidos os isolados mediamente agressivos, ToMV-BR 02 (patótipo P₀), proveniente de pimenta da região de Sorocaba, e o isolado PMMoV-BR 12 (patótipo P_{1,2}), proveniente de pimentão da região de Salto, obtidos por Cezar (2003). (Figuras 1A e B).

A resistência ao patótipo P₀ de ToMV foi verificada em 18 acessos de *C. annuum*; 15 acessos de *C. baccatum* e três de *C. chinense* (Tabela 1), sendo que o cv. Magda que foi utilizado como controle suscetível produziu intenso mosaico. Nestas plantas resistentes foram observadas lesões locais necróticas nas folhas e cotiledonares. Após a queda das folhas cotiledonares, esses acessos permaneceram assintomáticos. Quando inoculados individualmente em plantas de *N. glutinosa* (retro-inoculação) não foram observadas lesões locais características do ToMV, indicando que estas plantas não permitiram a multiplicação viral. Entretanto, um acesso de *C. annuum* (Ancho), proveniente do México, foi considerado tolerante ao ToMV, não tendo desenvolvido reação de hipersensibilidade, porém permitindo replicação viral com ausência de sintomas.

Dos trinta e seis acessos de *Capsicum* spp que apresentaram reação de hipersensibilidade ou tolerância ao ToMV, quando inoculados com o patótipo P₁₋₂ de PMMoV, trinta e cinco mostraram-se suscetíveis a este isolado, desenvolvendo sintomas sistêmicos de mosaico também verificados no híbrido Magali R (susceptível). Este fato evidencia que possivelmente estes possuam o gene L¹ ou L² que confere resistência somente

ao patótipo P₀ e P₁. O acesso PI 152225, porém, desencadeou reação de hipersensibilidade ao PMMoV, mantendo-se a planta assintomática e com ausência de multiplicação viral. Suzuki *et al.* (2003) também avaliaram o mesmo acesso de *C. chinense* quanto à reação a um isolado de PMMoV P_{1,2} e concluíram que este possui o gene L³. Este acesso pode ser uma fonte potencial para programas de melhoramento, visando à resistência a estes vírus no Brasil, pois ainda no momento predominam os patótipos P₀ e P_{1,2} tanto no campo e em cultivos protegidos, para as quais este gene é efetivo.

A coleção de *Capsicum* spp testada neste trabalho é tipicamente americana. O ToMV é um vírus que ocorre no Brasil há muito mais tempo que o PMMoV, cuja primeira detecção foi somente em 2001 (Kobori *et al.*, 2001). Possivelmente o pequeno número encontrado de materiais resistentes ao PMMoV se deve a não exposição destes genótipos a este vírus.

Sabe-se que a série alélica L¹ - L⁴ que confere reação de hipersensibilidade a tobamovírus é elicitada pela capa protéica destes vírus (Gilardi *et al.* 2004). A troca entre os aminoácidos específicos Met (metionina) por Asn (asparagina) na posição 139 na sequência de aminoácidos da capa protéica do PMMoV é responsável pela capacidade ou não de um isolado suplantando os genes L¹, L², L³ e L⁴ (Velasco *et al.*, 2002; Gilardi *et al.* 2004).

O gene L¹ presente em alguns híbridos comerciais, como Magali R, confere resistência às espécies de TMV, ToMV e TMGMV classificadas como P₀, porém não é efetivo para as espécies *Paprika mild mottle virus* (PaMMV) e *Obuda pepper virus* (ObPV) classificadas como P₁ (Tobias *et al.*, 1982; Garcia-Luque *et al.*, 1993), ainda não relatadas infectando *Capsicum* spp. no Brasil, bem como para o PMMoV. Até o momento somente o gene L⁴ presente em *C. chacoense* PI 260429 é efetivo contra todas as espécies e/ou patótipos de tobamovírus até então relatadas em *Capsicum* spp. (Gilardi *et al.*, 2004). A durabilidade de um gene é variável, pois este pode exercer pressão de seleção sobre o patógeno e desencadear o surgimento de novas estirpes capazes de suplantá-lo. Os genes dominantes *N* e *N'* que conferem hipersensibilidade ao TMV em fumo, são um bom exemplo quanto à durabilidade conferida por um gene. Enquanto que mutações pontuais na capa protéica do TMV determinam à expressão do gene *N'* e sua durabilidade, o gene *N* é totalmente durável em condições de campo contra estirpes do TMV, sendo somente suplantada por um outro

tobamovírus, o *Obuda pepper virus* que ocorre somente ocasionalmente em casa-de-vegetação e não a campo na Hungária (Harrison *et al.*, 2002).

Deste modo, como a durabilidade de um gene é difícil de ser prevista, sugere-se que no Brasil os programas de melhoramento visando resistência a tobamovírus levem em consideração o gene L³, presente em pelo menos dois acessos americanos de *C. chinense*, PI 152225 e PI 159236, pois este ainda é efetivo para o ToMV/TMV, bem como ao PMMoV P₁₋₂ até então observados nas principais regiões produtoras do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERZAL-HERRANZ, A.; DE LA CRUZ, A., TENLLADO, F.; DIAZ-RUIZ, J.R. LOPEZ, L., SANZ, A.I., VAQUERO, C., SERRA, M.T.; GARCIA-LUQUE, I. 1995. The *Capsicum* L³ gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. *Virology*, 209:498-505.

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

BOUKEMA, I. W. 1980. Allelism of genes controlling resistance to TMV in *Capsicum*. *Euphytica*, 29:433-439.

CEZAR, M.A. 2003. *Caracterização biológica e molecular de isolados de vírus pertencentes ao gênero Tobamovirus provenientes de Capsicum annuum L.* Botucatu:FCA-UNESP. 42 p (Dissertação Mestrado).

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

de la CRUZ, A.; LÓPEZ, L.; TENLLADO, F.; DÍAZ-RUIZ, J. R.; SANZ, A. I.; VAQUERO, C. SERRA, M. T.; GARCIA-LUQUE, I.1997. The coat protein is required for the elicitation of the

- Capsicum* L² gene-mediated resistance against the tobamoviruses. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 10:107-113.
- DUARTE, K. M. R. 1995. *Produção de anticorpos monoclonais contra o vírus do mosaico do tomateiro (ToMV)*. 84 p (Dissertação Mestrado).
- ECHER, M. M. 2001. *Reação de pimentão (Capsicum annuum L.) a Phytophthora capsici e o Potato virus Y (PVY^m)*. Piracicaba:USP-ESALQ. 62 p. (Tese Doutorado).
- EIRAS, M; CHAVES, A.L.R.; MOREIRA, S.R.; ARAÚJO, J.; COLARICCIO, A. 2004. Caracterização de um isolado do *Pepper mild mottle virus* que não quebra a resistência do gene L3 em *Capsicum* sp. *Fitopatologia Brasileira*, 29:670-675.
- ERKAN, S.; DELEN, N. 1985. Seed treatments to eliminate seed-borne tobacco mosaic virus in pepper seeds. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 4:50.
- FILGUEIRA, F. A. R. 1983. *Manual de olericultura: cultura e comercialização de hortaliças*. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p.301-318
- GARCIA-LUQUE, I.; FERRERO, M. L.; RODRIGUEZ, J. M.; ALONSO, E.; DE LA CRUZ, A.; SANZ, A.; VAQUERO, C.; SERRA, M. T.; DIAZ, J. R. 1993. The nucleotide sequence of the coat protein genes and 3' non-coding regions of two resistance-breaking tobamoviruses in pepper shows that they are different viruses. *Archives of Virology*, 131:75-88,.
- GILARDI, P.; GARCIA-LUQUE, I.; SERRA, M.T. 2004. The coat protein of tobamovirus acts as elicitor of both L2 and L4 gene-mediated resistance in *Capsicum*. *Journal of General Virology*, 85:2007-2085.
- HARRISON, B.D. 2002. Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. *Euphytica*, 124:181-192,

KOBORI, R. F.; WIERZBICKI, R.; DELLA VECCHIA, P.T., PAVAN, M.A.; REZENDE, J.A.M. 2001. Ocorrência do *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) em pimentão (*Capsicum annuum*) cultivado sob estufas no Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, 26:516.

NAGAI, H. Viroses do pimentão e pimenta. 1984. *Informe agropecuário*. 10:52-54.

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

PARES, R. D.; GUNN, L. V. 1989. 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*, 126:353-360.

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

PIERRO, A. C. O assunto é pimentão. 2005. *Tecnologia de Produção HFF&Citrus*. 10:10-14.

RÚÍZ del PINO, M.; MORENO, A.; GARCÍA DE LACOBIA, M.; CASTILLO-LLUVA, S.; GILARDI, P.; SERRA, M. T.; GARCIA-LUQUE, I. 2003. Biological and molecular characterization of P101 isolate a tobamoviral pepper strain from Bulgária. *Archives of Virology*, 148:2115-2135.

SUZUKI, K.; KURODA, T.; MIURA, Y.; MURAI, J. 2003. Screening and field trials of virus resistant sources in *Capsicum* spp. *Plant Disease*. 87:779-783.

TANZI, M.; BETTI.; CANOVA, A. 1986. Behaviour of two new commercial pepper cvs. With L¹, L³ genotype towards TMV pepper strain infection. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 5:45.

TÓBIÁZ, I.; RAST, A. T. B.; MAAT, D. Z. 1982. Tobamoviruses of pepper, eggplant and tobacco: comparative host reactions and serological relationships. *Netherlands Journal of Plant Pathology*,.88:257-268.

TSUDA, S.; KIRITA, M.; WATANABE, Y. 1998. Characterization of a pepper mild mottle tobamovirus strain capable of over-coming the /L3 gene-mediated resistance, distinct from the resistance-breaking Italian isolate. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 11:327-331.

VELASCO, L.; JANSEN, D.; RUIZ-GARCIA, L.; SEGUNDO, E.; CUADRADO, I. M. 2002. The complete nucleotide sequence and development of a differential detection assay for a *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) isolate that overcomes L3 resistance in pepper. *Journal Virological Methods*. 106:135-140.

WETTER, C.; CONTI, M.; ALTSCHUH, D.; TABILLION, R.; VAN REGENMORTEL, M.H.V. 1984. Pepper mild mottle virus, a tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. *Phytopathology*, 74:405-410.

VILELA, N. J. Coeficientes técnicos, custos, rendimentos e rentabilidade. Embrapa, 2007
Disponível em http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_pimenta/coeficientes_tecnicos.htm> Acesso em 22/03/2007

Tabela 1. Acessos de *Capsicum* spp. utilizados nos ensaios e reação de plantas ao ToMV e ao PMMoV.

Acessos	Espécie	Origem	Sintomas Patótipo P ₀ ToMV	Sintomas Patótipo P ₁₋₂ PMMoV
#124	<i>C. annuum</i>	Filipinas	M	M
#132	<i>C. annuum</i>	Filipinas	M	M
#138	<i>C. annuum</i>	Filipinas	LL/AF/-	M
#36	<i>C. annuum</i>	Filipinas	LL/AF/-	M
Pimenta ornamental	<i>C. annuum</i>	Filipinas	LL/AF/-	M
Agrônomo 10G	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Ancho	<i>C. annuum</i>	México	-	M
Ano Todo	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Pimenta orn P001	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
BGH 3058 chocolate	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
BGH 3757	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
BGH 3890	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
BGH 3878	<i>C. annuum</i>	Brasil	LL/AF/	M
BGH 3978	<i>C. annuum</i>	Brasil	LL/AF/	M
BGH 3717	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
BGH 3756	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
BGH 3757 comprido	<i>C. annuum</i>	Brasil	LL/AF/-	M
BGH 3758	<i>C. annuum</i>	Brasil	LL/AF/-	M
BGH 3881	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
BGH 3883 Criolo M.	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
BGH 3889	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Catarino Cascabel	<i>C. annuum</i>	México	M	M
Catie 8063	<i>C. annuum</i>	Costa Rica	M	M
Chili	<i>C. annuum</i>	Índia	M	M
CNPH 145	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
CNPH 146	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
CNPH 162	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
CNPH 185	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
CNPH 40	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
ICA # 12	<i>C. annuum</i>	Colômbia	M	M
ICA # 132	<i>C. annuum</i>	Colômbia	M	M
Jalapeño	<i>C. annuum</i>	México	M	M
Jalapeno Monte Alto	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Jalapeno Cica nº1	<i>C. annuum</i>	México	M	M
Kan Cluster	<i>C. annuum</i>	EUA	M	M
Morrões	<i>C. annuum</i>	Portugal	M	M
Mulato Dulce	<i>C. annuum</i>	Portugal	M	M
Mulato V-2	<i>C. annuum</i>	México	M	M

Acessos	Espécie	Origem	Sintomas Patótipo P ₀	Sintomas Patótipo P ₁₋₂
<i>C. annuum</i> PI 187331	<i>C. annuum</i>	EUA	M	M
<i>C. annuum</i> PI 188476	<i>C. annuum</i>	EUA	M	M
Pimenta ornamental P01	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Pimenta Roque ICA#63	<i>C. annuum</i>	México Colômbia	M	M
Dagmar	<i>C. annuum</i>		M	M
Pimentão All Big	<i>C. annuum</i>		M	M
Pimentão 808	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Pimentão 220.01	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Pimentão 3781	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Pimentão 37.04	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Pimentão 813	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Pimentão 188	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Pimentão 193	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Pimentão 597	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Pimentão 932	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Pimentão 33 A	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Pimentão 34 A	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Pimentão 97 A	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Pimentão 99 A	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Pimentão Rubia-R	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Pimentão Magali	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Pimentão Magali R	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
Pimentão Magda	<i>C. annuum</i>	Brasil	M	M
AJI #284	<i>C. baccatum</i>	Bolívia	M	M
AJI #286	<i>C. baccatum</i>	Bolívia	M	M
AJI #289 Amarelo	<i>C. baccatum</i>	Bolívia	M	M
AJI limo	<i>C. baccatum</i>	Peru	M	M
Arivivi #212	<i>C. baccatum</i>	Bolívia	M	M
BGH 2994	<i>C. baccatum</i>	Viçosa BR	M	M
BGH 5025	<i>C. baccatum</i>	Viçosa BR	M	M
Guarnica #243	<i>C. baccatum</i>	Bolívia	M	M
Habanera BG 592	<i>C. baccatum</i>	México	M	M
Pimenta Mogi Guaçu	<i>C. baccatum</i>	Brasil	M	M
Pimenta BodeBalão verm.	<i>C. baccatum</i>	Brasil	M	M
Pimenta branca Piranga	<i>C. baccatum</i>	Brasil	M	M

Acessos	Espécie	Origem	Sintomas Patótipo P₀	Sintomas Patótipo P₁₋₂
Pimenta Caraguatatuba	<i>C. baccatum</i>	Brasil	LL/AF/-	M
Pimenta Coração	<i>C. baccatum</i>	Cuiabá MT	LL/AF/-	M
Yerba Mala #251	<i>C. baccatum</i>	Bolívia	LL/AF/-	M
ICA #60	<i>C. baccatum</i>	Bolívia	LL/AF/-	M
AJI 284	<i>C. baccatum</i>	Bolívia	LL/AF/-	M
Pimenta Pitanga	<i>C. baccatum</i>	Argentina	LL/AF/-	M
#2	<i>C. chinense</i>	Colômbia	M	M
ICA #39	<i>C. chinense</i>	Cruzeiro Sul	LL/AF/-	M
Pimenta	<i>C. chinense</i>	Cruzeiro Sul	M	M
Pimenta	<i>C. chinense</i>	Brasil	M	M
Pimenta Cheiro	<i>C. chinense</i>	EUA	LL/AF/-	M
PI 152225	<i>C. chinense</i>	Argentina	LL/AF/-	LL/AF/-

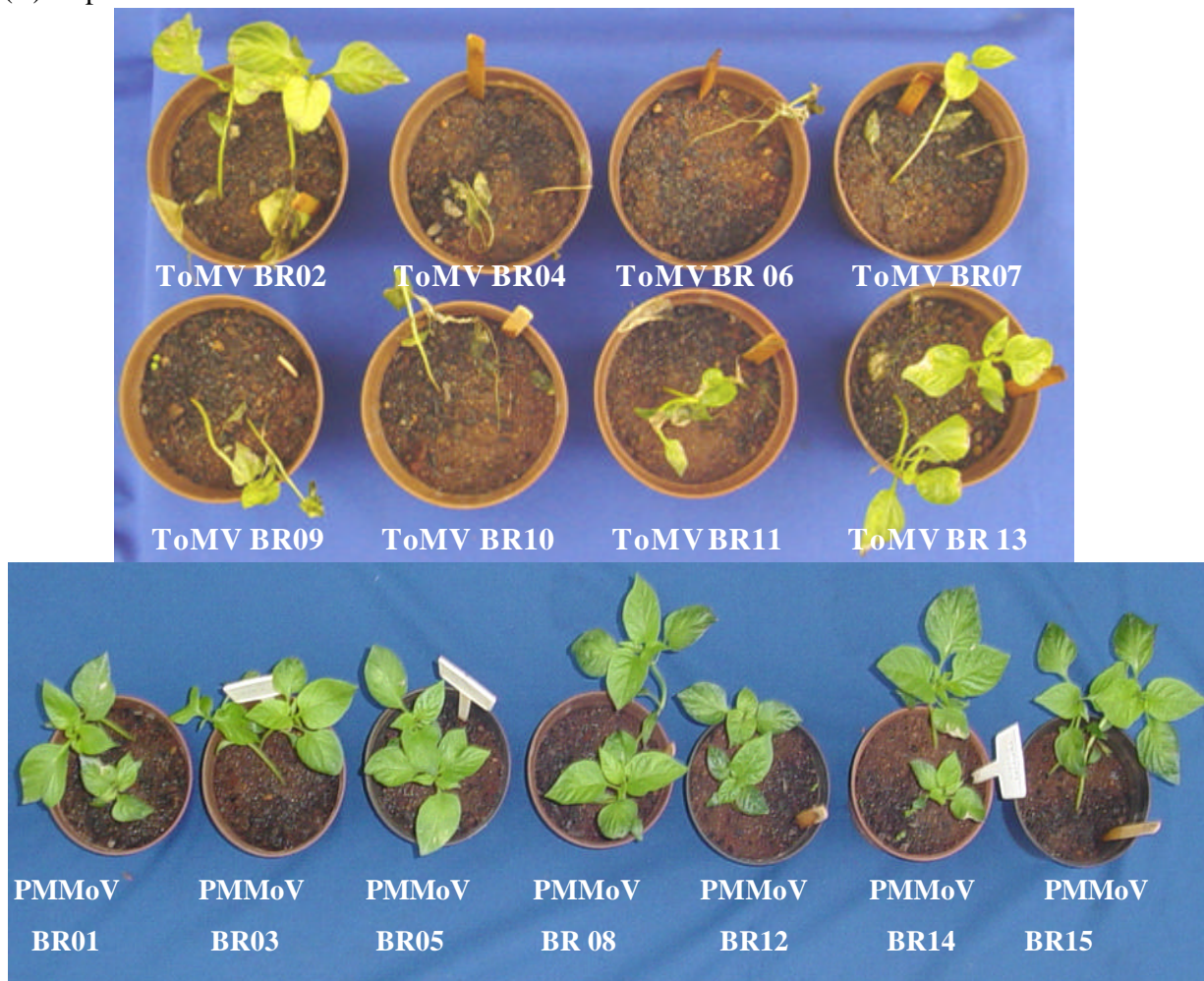
-: Sem sintomas

M: Mosaico

LL: Lesões Locais Necróticas

AF: Abcisão Foliar

Figura 1. Sintomatologia observada em *Capsicum annuum* Magda e *Capsicum frutescens* 'Tabasco' para diferentes isolados de ToMV (A) e PMMoV (B) respectivamente.



4 CONCLUSÕES GERAIS

- Tobamovírus tem baixa ocorrência em pimentão e pimenta no Estado de São Paulo;
- Foram identificados e caracterizados os patótipos R_0 de ToMV e P_{1-2} de PMMoV ocorrendo em *Capsicum* spp. no Estado de São Paulo.
- Os isolados de PMMoV no Brasil possivelmente foram introduzidos por meio de sementes contaminadas, provenientes de diferentes regiões geográficas;
- Foi verificada maior variabilidade genética dos isolados brasileiros de ToMV, quando comparados aos de PMMoV;
- O PI 152225 de *C. chinense* pode ser utilizado como fonte de resistência ao patótipo P_{1-2} para introgressão do gene L^3 em cultivares e híbridos comerciais brasileiros.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, M. A. V. et al. Characterization of a strain of Tobacco mosaic virus from petunia. **Journal of Phytopathology**, Berlim , v.148, n. 11-12, p. 601-607, 2000.

ALONSO, E. et al. A tobamovirus causing heavy losses in protected pepper crops in Spain. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 125, n.1, p. 67-76, 1989.

ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. São Paulo, p. 412-414, 2004

AVGELIS, A. D. Viruses of pepper in plastic houses in Crete. **Netherlands Journal of Plant Pathology**. Wageningen, v. 93, n. 4, p. 153-158, 1987.

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

ÁVILA, A. C. Virus do vira-cabeça do tomateiro (TSWV): organização do genoma, taxonomia, diagnose e controle. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v.11, n.2, p. 179-183, 1993

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

BERZAL-HERRANZ, A. et al. The *Capsicum* L³ gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. **Virology**, Orlando, v. 209, n. 2, p. 498-505, 1995.

BIANCHETTI, L. B. et al. **Relatório de viagem para coleta de espécies de *Capsicum* (Solanaceae), realizada entre os dias 28/04 e 26/05 de 1999, no Sudeste Brasileiro**. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/projetos/capsicum/index.htm>> Acesso em 01/06/2005.

BOARI, A. J. **Caracterização biológica e molecular de isolados do vírus do mosaico do pepino (CMV) e de RNAs satélites associados**. 1998. 82p. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG.

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

BOUKEMA, I. W. Resistance to a newstrain of TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. **Capsicum Newsletter**, n. 1, p. 49-51, 1982.

BOUKEMA, I. W. Allelism of genes controlling resistance to TMV in *Capsicum*. **Euphytica**, Netherlands, v. 29, n. 2, p. 433-439, 1980.

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

BUZKAN, N. et al., Evaluation of the status of capsicum viruses in the main growing regions of Turkey. **EPPO Bulletin**. Paris, v. 36, n1, p. 15-19, 2006.

CAMARGO, L. E. A. ; BERGAMIN FILHO, A. Controle Genético. In: BERGAMIN FILHO et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p.729 – 760.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B; HENZ, G. P. Germoplasm collection of *Capsicum* spp. maintained by Emprapa Hortaliças (CNPQ). **Capsicum and Eggplant Newsletter**. Turin, v. 22, n. 1, p. 17-20, 2003.

CEZAR, M. A, et al. Caracterização biológica e identificação molecular de vírus pertencentes ao gênero *Tobamovirus* provenientes de *Capsicum* spp. **Summa Phytopathologica**, Botucatu. v.29, n.4, p. 359-361, 2003.

CEZAR, M.A. **Caracterização biológica e molecular de isolados de vírus pertencentes ao gênero *Tobamovirus* provenientes de *Capsicum annuum* L.** 2003. 42 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

COLARICCIO, A. et al. Diversidade de tospovírus em diferentes regiões produtoras de olerícolas do Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**. Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 177-182, 2001.

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

de la CRUZ, A. et al., The coat protein is required for the elicitation of the *Capsicum* L² gene-mediated resistance against the tobamoviruses. **Molecular Plant Microbe Interactions**. St Paul, v. 10, n. 1, p. 107-113, 1997.

DIAS, P. R. P. **Caracterização de isolados e reação de *Capsicum* spp. ao *Cucumber mosaic virus* (CMV)**. 2004. 86 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Universidade Estadual Paulista/UNESP, Botucatu.

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

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

ECHER, M. M. **Reação de pimentão (*Capsicum annuum* L.) a *Phytophthora capsici* e o *Potato virus Y* (PVYtm)**. 2001. 62 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

EIRAS, M. et al., Caracterização de um isolado do *Pepper mild mottle virus* que não quebra a resistência do gene L3 em *Capsicum* sp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília. v.29, n.6, p.670-675, 2004.

ERKAN, S.; DELEN, N. Seed treatments to eliminate seed-borne tobacco mosaic virus in pepper seeds. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, Turim, v. 4, n. 2, p. 50,1985.

ESCUADERO, J. Survey of viruses affecting pepper (*Capsicum annuum* L.) in Southern Puerto Rico. **Journal of Agricultural University of Puerto Rico**. v. 80, n. 1-2, p.11-80, 1996.

FAUQUET, C. M. et al., **Virus Taxonomy Virus Classification and Nomenclature of Viruses: Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 1259 p.

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

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

FRASER, R. S. S. The genetics of resistance to plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v. 28, p. 179-200, 1990.

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

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

GEBRE-SELASSIE, K.; MARCHOUX, G.; DELECLLE, B.; POCHARD, E. Variabilité naturelle des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sud-est de la France. Caractérisation et classification en pathotypes. *Agronomie*, v. 5, p. 621-630, 1985.

GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal Virological Methods**, Netherlands, v. 63, n. 1-2, p. 9-16, 1997.

- GILARDI, P.; GARCIA-LUQUE, I.; SERRA, M.T. The coat protein of tobamovirus acts as elicitor of both *L2* and *LA* gene-mediated resistance in *Capsicum*. **Journal of General Virology**, v.85, n. 7, p. 2007-2085, 2004.
- GIORIA, R. et al., Isolado Lins-SP do vírus do mosaico amarelo do pimentão quebra a resistência de *Capsicum annuum* cv. Magali R. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n. 1, 2006 (Resumos, nº 140).
- GREEN, S. K. & WU, S. F. Tobamoviruses on *Capsicum annuum* in Taiwan. **Plant Disease**, St Paul, v.75, n.11, p. 1186, 1991.
- GRUBE, R. C. et al., New source of resistance to *Cucumber mosaic virus* in *Capsicum frutescens*. **Plant Disease**. St Paul, v.84, n. 8, p. 885-891, 2000.
- HAMADA, H. et al., Characterization of *Paprika mil mottle virus* first isolated in Japan. **Journal of General Plant Pathology**. Tóquio. v.63, n. 3, p. 199-204. 2003.
- HAMADA, H. et al., Amino acid changes in *Pepper mild mottle virus* coat prote in that affect *L³* gene-mediated resistance in pepper. **Journal of General Plant Pathology**. v.68, p. 155-162. 2002.
- HISKIAS, Y.; LESEMANN, D. E.; VETTEN, H. J. Ocurrence, distribution and relative importance of viruses infecting hot pepper and tomato in the major growing areas of Ethiopia. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 147, n. 1, p. 5-11, 1999.
- INOUE-NAGATA, A. K. et al., Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus em sweetpepper, *Capsicum annuum*. **Archives of Virology**, Austria, v. 147, n. 4, p. 849-855, 2002.
- JEANMOUGIN, F. et al. Multiple sequence alignment with Clustal X. **Trends Biochemical Science**, v. 23, p. 403-405, 1998.

- KIRITA, M. et al., Nucleotide sequence of the japanese isolate of *Pepper mild mottle virus* Tobamovirus (TMV-P) RNA. **Annual Phytopathological Society of Japan**. Tóquio. v. 63, p. 373-376, 1997.
- KOBORI, R. F. et al. Ocorrência do *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) em pimentão (*Capsicum annuum*) cultivado sob estufa no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 516, 2001 (Resumos, nº 910).
- KUMAR, S.; TAMURA. K.; NEI, M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. **Briefings in Bioinformatics**, n.5, p.150-163, 2004.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R Doenças das solanáceas. In: Kimati et al. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Ceres, v.2, 4 ed., p. 589-596, 2005.
- LARTEY, R.T; VOSS, T.C.; MELCHER, U. Tobamovirus evolution: genes overlaps, recombination and taxonomic implications. **Molecular Biological Evolution**. v. 13, n. 10, p. 1327-1338, 1996.
- LETSCHERT, B. et al. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of the economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 1-10, 2002.
- LIMA, M. F. et al. Distribuição de geminivírus nas culturas do tomate e pimentão em doze municípios do Submédio do Vale São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 81-85, 2001.
- LOPES, C. A. & ÁVILA, A. C. **Doenças do Pimentão Diagnose e Controle**, Brasília Embrapa Hortaliças, 96 p. 2003

LUNA, C. P. et al., Levantamento de begomovírus em *Capsicum* nas regiões Centro-oeste e sudeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, 2006 (Resumos, nº 629).

MAROON, C. J. M.; ZAVRIEV, S. PCR-Basead tests for detection of tobamoviruses and carlaviruses. **Acta Horticulturae**. Bélgica, v. 568, n. 1, p. 117-122, 2002.

MARTE, M. CASTAGNOLI, F. SACCARDO, F. Screening peppers for resistance to *Pepper mild mottle virus* (tobamoviruses). **VIII Meeting “Genetics and Breeding on Capsicum and Eggplant”**. Roma, p. 144-149, 1992.

MATTHEWS, R. E. F. **Plant Virology**. 3. ed. San Diego, California: Academic Press, 1991, 835 p.

MONTEIRO, R. C. The thysanoptera fauna of Brazil. Thrips and Tospoviruses. **Proceedings of the 7 th International Symposium of Thysanoptera**, Reggio Calabria, Itália, p. 325-340, 2001.

MOÓR, A.; ZATYKÓ, L. Results of pepper breeding in Hungary. **Acta Horticulturae**. Bélgica, v. 412, p. 88-91, 1995.

MOREIRA, S. R. et al., Caracterização de uma nova estirpe do *Tomato mosaic virus* isolada de tomateiro no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 602-607, 2003.

MOTA, L. D. L. et al. *Pfaffia mosaic virus*: a new potyvirus found infecting *Pfaffia glomerata* in Brazil. **Plant Pathology**, v. 53, p. 368-373, 2004.

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

NAGAI, H. Pimentão, pimenta-doce e pimentas. In: FURLANI, A. M. C.; VIÉGAS, G. P. (Ed.) **O melhoramento de plantas no Instituto Agrônômico**. Campinas: IAC. p. 276-294, 1993.

NAGAI, H. Viroses do pimentão e pimenta. **Informe agropecuário**. Belo Horizonte. v. 10, nº 113, p. 52-54. 1984.

NOZAKI, D. N. et al. First report of *Tomato severe rugose virus* infecting pepper plants in Brazil. , **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.3, p. 321, 2006.

NOZAKI, D. N. et al., Ocorrência de *Tomato severe rugose virus* em pimentão (*Capsicum annuum* L.) no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, 2005 (Resumos, nº 799).

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

PALUKAITS, S.P., ROOSSINK, M.J., DIETZGEN, R.G., FRANCKI, R.I.B. Cucumber mosaic virus. *Advances of Virus Research*, Orlando, v.41, p. 281-342, 1992.

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

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

PIERRO, A. C. O assunto é pimentão. **Tecnologia de Produção HFF&Citrus**. Jaguariúna, n.10, p.10-14. ago, 2005.

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

RAST, A. Th. B. Isolation and identification of pathogenic strains of tomato mosaic virus by host passage. **Netherland Journal Plant Pathology**, Netherlands, v. 91, n. 6, p. 285-294, 1985.

REISCHNEIDER, F. J. B. & RIBEIRO, S. C. **Sistema de produção de Pimentas (*Capsicum* spp.) – Introdução e importância econômica**. Embrapa, 2003. Disponível em <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/index.htm> Acesso em 21/06/2005.

REISCHNEIDER, F. J. B. (ORG). ***Capsicum* – pimentas e pimentões no Brasil**. Embrapa comunicação para a transferência de Tecnologia, Brasília, 2000, 113p.

RIBEIRO, C. S. da C.; CRUZ, D. M. R. Comércio de sementes de pimentão está em expansão. Apenas o mercado nacional movimentou US\$ 1, 5 milhão. **Revista cultivar Hortaliças e Frutas**, Pelotas, n.21, set, 2003.

RUÍZ del PINO, M. et al., Biological and molecular characterization of P101 isolate, a tobamoviral pepper strain from Bulgária. **Archives of Virology**, Austria, v. 148, n. 11, p. 2115-2135, 2003.

SACCHI, H.; MELO, A. T.; COLARICCIO, A. Reação de progênies de pimentão ao potato virus y. **Bragantia**, Campinas, v.62, n.1, p.53-60, 2003.

SAWADA, H. et al. A new tobamovirus-resistance gene, *L^{1a}*, of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal Japanese Society Horticultural Science**. Kochi, v. 74, n.4, p. 289-294, 2005.

- SAWADA, H. et al. A new tobamovirus-resistance gene, *Hk*, in *Capsicum annuum*. **Journal Japanese Society Horticultural Science**. Kochi, v. 73, n.6, p. 552-557, 2004.
- SUZUKI, K. et al., Screening and field trials of virus resistant sources in *Capsicum* spp. **Plant Disease**, St Paul, v. 87, n. 7, p. 779-783, 2003.
- TAKEUSHI, S. et al., Discrimination between tobamoviruses and their pathotypes for *L*-gene-mediated resistance in green pepper (*Capsicum annuum* L.) by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of General Plant Pathology**. Tóquio. v.71, p. 60-67. 2005.
- TANZI, M.; BETTI.; CANOVA, A. Behaviour of two new commercial pepper cvs. With *L*¹, *L*³ genotype towards TMV pepper strain infection. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, Grugliasko v. 5, n. 2, p. 45, 1986.
- TENLLADO, F. et al. Pepper resistance-breaking tobamoviruses: can they co-exist in single pepper plants? **European Journal of Plant Pathology**, , v. 103, n. 3, p. 235-243, 1997.
- TENLLADO, F. et al., Rapid detection and differentiation of tobamoviruses infecting *L*-resistant genotypes of pepper by RT-PCR and restriction analysis. **Journal of Virological Methods**, Netherlands, v. 47, n. 1-2, p. 165-174, 1994.
- TÓBIÁZ, I.; RAST, A. T. B.; MAAT, D. Z. Tobamoviruses of pepper, eggplant and tobacco: comparative host reactions and serological relationships. **Netherlands Journal of Plant Pathology**. Netherlands, v.88, n. 6, p. 257-268, 1982.
- TRUTA, A. A. C. et al., Identidade e propriedades de isolados de potyvirus provenientes de *Capsicum* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 160-167, 2004.
- TSUDA, S.; KIRITA, M.; WATANABE, Y. Characterization of a pepper mild mottle tobamovirus strain capable of over-coming the *L*3 gene-mediated resistance, distinct from the

resistance-breaking Italian isolate. **Molecular Plant Microbe Interactions**. St Paul, v. 11, p. 327-331, 1998.

van REGENMORTEL, M. H. V. et al. **Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego, Academic Press, 2000, 1162 p.

VELASCO, L. et al., The complete nucleotide sequence and development of a differential detection assay for a *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) isolate that overcomes L3 resistance in pepper. **Journal Virological Methods**, Netherlands, v.106, n. 1, p. 135-140, 2002.

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

VILELA, N. J. **Coefficientes técnicos, custos, rendimentos e rentabilidade**. Embrapa, 2007
Disponível em http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_pimenta/coeficientes_tecnicos.htm> Acesso em 22/03/2007.

WYATT, S. D.; BROWN, J. K. Detection of subgroup III Geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. **Phytopathology**, St Paul, v. 86, n. 12, p. 1288-1293, 1996.

APÊNDICE

Continuação

PMMoV - Italian GTTAGATTTCTGCTACTGGTTTCAAAGTTTTTCGATACAATGCCGTGCTAGATTCTCTA 240
 PMMoV - P91 GTTAGATTTCTGCTACTGGTTTCAAAGTTTTTCGATACAATGCCGTGCTAGATTCTCTA 240
 PMMoV - Ia ATTAGATTTCTGCTACTGGTTTCAAAGTTTTTCGATATAATGCCGTGCTAGATTCTCTA 240
 PMMoV - BR08 GTTAGATTTCTGCTACTGGTTTCAAAGTTTTTCGATATAATGCCGTGCTAGATTCTCTA 240
 PMMoV - CHINA GTTAGATTTCTGCTACTGGTTTCAAAGTTTTTCGATATAATGCCGTGCTAGATTCTCTA 240
 PMMoV - 1.2 GTTAGATTTCTGCTACTGGTTTCAAAGTTTTTCGATATAATGCCGTGCTAGATTCTCTA 240
 PMMoV - P GTTAGATTTCTGCTACTGGTTTCAAAGTTTTTCGATATAATGCCGTGCTAGATTCTCTA 240
 PMMoV - P0 GTTAGATTTCTGCTACTGGTTTCAAAGTTTTTCGATATAATGCCGTGCTAGATTCTCTA 240
 PMMoV - J GTTAGATTTCTGCTACTGGTTTCAAAGTTTTTCGATA TAATGCCGTGCTAGATTCTCTA 240
 PMMoV - BR GTTAGATTTCTGCTACTGGTTTCAAAGTTTTTCGATATAATGCCGTGCTAGATTCTCTA 240
 PMMoV - TAIWAM GTTAGATTTCTGCTACTGGTTTCAAAGTTTTTCGATATAATGCCGTGCTAGATTCTCTA 240
 PMMoV - DSMZ_PV-16 GTTAGATTTCTGCTACTGGTTTCAAAGTTTTTCGATATAATGCCGTGCTAGATTCTCTA 240
 PMMoV - BR12 GTTAGATTTCTGCTACTGGTTTCAAAGTTTTTCGATATAATGCCGTGCTAGATTCTCTA 240
 PMMoV - BR15 GTTAGATTTCTGCTACTGGTTTCAAAGTTTTTCGATATAATGCCGTGCTAGATTCTCTA 240
 PMMoV - BR14 GTTAGATTTCTGCTACTGGTTTCAAAGTTTTTCGATATAATGCCGTGCTAGATTCTCTA 240
 PMMoV - BR16 GTTAGATTTCTGCTACTGGTTTCAAAGTTTTTCGATATAATGCCGTGCTAGATTCTCTA 240
 PMMoV - BR17 GTTAGATTTCTGCTACTGGTTTCAAAGTTTTTCGATATAATGCCGTGCTAGATTCTCTA 240
 PaMMV - Japanese ATCAGATTTAGTGACAACGGTTTTAGAGTGTAGGTATAATAGTACGCTGGATCCGTTG 240
 ToMV-L11A-Fukushima GTCAGATTTCTGGCGATGTTTATAAGGTGTACAGGTACAATGCAGTTTTAGATCCTCTA 240
 TMV -INDto GTCAGTTCCCTGACAGCGACTTAAAGTATATAGGTACATTCGGTATTAGAGCTCTA 240
 * * * * *

PMMoV - Italian GTGTCCGCCTTCTCGGAGCCTTTGATACTAGGAATAGGATAATAGAAGTTGAAAATCCG 300
 PMMoV - P91 GTGTCCGCCTTCTCGGAGCCTTTGATACTAGGAATAGGATAATAGAAGTTGAAAATCCG 300
 PMMoV - Ia GTGTCCGCCTTCTCGGAGCCTTTGATACTAGGAATAGGATAATAGAAGTTGAAAATCCG 300
 PMMoV - BR08 GTGTCCGCCTTCTCGGAGCCTTTGATACTAGGAATAGGATAATAGAAGTTGAAAATCCG 300
 PMMoV - CHINA GTGTCCGCCTTCTCGGAGCCTTTGATACTAGGAATAGGATAATAGAAGTTGAAAATCCG 300
 PMMoV - 1.2 GTGTCCGCCTTCTCGGAGCCTTTGATACTAGGAATAGGATAATAGAAGTTGAAAATCCG 300
 PMMoV - P GTGTCCGCCTTCTCGGAGCCTTTGATACTAGGAATAGGATAATAGAAGTTGAAAATCCG 300
 PMMoV - P0 GTGTCCGCCTTCTCGGAGCCTTTGATACTAGGAACAGGATAATAGAAGTTGAAAATCCG 300
 PMMoV - J GTGTCCGCCTTCTCGGAGCCTTTGATACTAGGAACAGGATAATAGAAGTTGAAAATCCG 300
 PMMoV - BR GTGTCCGCCTTCTCGGAGCCTTTGATACTAGGAACAGGATAATAGAAGTTGAAAATCCG 300
 PMMoV - TAIWAM GTGTCCGCCTTCTCGGAGCCTTTGATACTAGGAACAGGATAATAGAAGTTGAAAATCCG 300
 PMMoV - DSMZ_PV-16 GTGTCCGCCTTCTCGGAGCCTTTGATACTAGGAACAGGATAATAGAAGTTGAAAATCCG 300
 PMMoV - BR12 GTGTCCGCCTTCTCGGAGCCTTTGATACTAGGAACAGGATAATAGAAGTTGAAAATCCG 300
 PMMoV - BR15 GTGTCCGCCTTCTCGGAGCCTTTGATACTAGGAACAGGATAATAGAAGTTGAAAATCCG 300
 PMMoV - BR14 GTGTCCGCCTTCTCGGAGCCTTTGATACTAGGAACAGGATAATAGAAGTTGAAAATCCG 300
 PMMoV - BR16 GTGTCCGCCTTCTCGGAGCCTTTGATACTAGGAACAGGATAATAGAAGTTGAAAATCCG 300
 PMMoV - BR17 GTGTCCGCCTTCTCGGAGCCTTTGATACTAGGAACAGGATAATAGAAGTTGAAAATCCG 300
 PaMMV - Japanese ATCACGGCGTTATTGAAATCGTTTTGATACTAGAAATAGGATCATAGAACTGAAAACCCG 300
 ToMV-L11A-Fukushima ATTACTCGCTTGCTGGGGCTTTTCGATACTAGGAATAGAAATAGAAAGTTGAAAATCCG 300
 TMV -INDto GTTACTCGACTATTAGGCGCTTTTGTACTAGAAATAGAAATAGAAAGTTGAAAATCAA 300
 * * * * *

PMMoV - Italian CAAAATCCTACTACTGCTGAGACGCTCGATGCGACGAGGCGAGTA GATGATGCTACGGTG 360
 PMMoV - P91 CAAAATCCTACTACTGCTGAGACGCTCGATGCGACGAGGCGAGTAGATGATGCTACGGTG 360
 PMMoV - Ia CAAAATCCTACTACTGCTGAGACGCTCGATGCGACGAGGCGAGTAGATGATGCTACGGTG 360
 PMMoV - BR08 CAAAATCCTACAACCTGCCGAGACGCTTGTATGCGACGAGGCGGGTAGATGATGCGACGGTG 360
 PMMoV - CHINA CAAAATCCTACAACCTGCCGAGACGCTTGTATGCGACGAGGCGGGTAGATGATGCGACGGTG 360
 PMMoV - 1.2 CAAAATCCTACAACCTGCCGAGACGCTTGTATGCGACGAGGCGGGTAGATGATGCGACGGTG 360
 PMMoV - P CAAAATCCTACAACCTGCCGAGACGCTTGTATGCGACGAGGCGGGTAGATGATGCGACGGTG 360
 PMMoV - P0 CAAAATCCTACAACCTGCCGAGACGCTTGTATGCGACGAGGCGGGTAGATGATGCGACGGTG 360
 PMMoV - J CAAAATCCTACAACCTGCCGAGACGCTTGTATGCGACGAGGCGGGTAGATGATGCGACGGTG 360
 PMMoV - BR CAAAATCCTACAACCTGCCGAGACGCTTGTATGCGACGAGGCGGGTAGATGATGCGACGGTG 360
 PMMoV - TAIWAM CAAAATCCTACAACCTGCCGAGACGCTTGTATGCGACGAGGCGGGTAGATGATGCGACGGTG 360
 PMMoV - DSMZ_PV-16 CAAAATCCTACAACCTGCCGAGACGCTTGTATGCGACGAGGCGGGTAGATGATGCGACGGTG 360
 PMMoV - BR12 CAAAATCCTACAACCTGCCGAGACGCTTGTATGCGACGAGGCGGGTAGATGATGCGACGGTG 360
 PMMoV - BR15 CAAAATCCTACAACCTGCCGAGACGCTTGTATGCGACGAGGCGGGTAGATGATGCGACGGTG 360
 PMMoV - BR14 CAAAATCCTACAACCTGCCGAGACGCTTGTATGCGACGAGGCGGGTAGATGATGCGACGGTG 360
 PMMoV - BR16 CAAAATCCTACAACCTGCCGAGACGCTTGTATGCGACGAGGCGAGTAGATGATGCGACGGTG 360
 PMMoV - BR17 CAAAATCCTACAACCTGCCGAGACGCTTGTATGCGACGAGGCGAGTAGATGATGCGACGGTG 360
 PaMMV - Japanese GCAAATCCCAACACAGCTGAAATAGCATCTGCTACTCAGCGTGTGATGATGATGATGATGAT 360
 ToMV-L11A-Fukushima CAGAGTCCGACAACAGCTGAAACGTTAGATGCTACCCTGAGGCTAGACGACGCTCGGTT 360
 TMV -INDto GCAAACCCACGACTGCCGAAACGTTAGATGCTACTCGTAGAGTAGAGGACGCAACGGTG 360
 * * * * *

Continuação

PMMoV - Italian GCTATTAGGGCCAGTATTAGTAACCTCATGAATGAGTTAGTTCGTGGCACGGGAAATTAC 420
 PMMoV - P91 GCTATTAGGGCCAGTATTAGTAACCTCATGAATGAGTTAGTTCGTGGCACGGGAAATTAC 420
 PMMoV - Ia GCTATTAGGGCCAGTATTAGTAACCTCATGAATGAGTTAGTTCGTGGCACGGGAAATTAC 420
 PMMoV - BR08 GCCATTAGGGCCAGTATAAGTAACCTCATGAATGAGTTAGTTCGTGGCACGGGAATGTAC 420
 PMMoV - CHINA GCCATTAGGGCCAGTATAAGTAACCTCATGAATGAGTTAGTTCGTGGCACGGGAATGTAC 420
 PMMoV - 1.2 GCCATTAGGGCCAGTATAAGTAACCTCATGAATGAGTTAGTTCGTGGCACGGGAATGTAC 420
 PMMoV - P GCCATTAGGGCCAGTATAAGTAACCTCATGAATGAGTTAGTTCGTGGCACGGGAATGTAC 420
 PMMoV - P0 GCCATTAGGGCCAGTATAAGTAACCTCATGAATGAGTTAATTTCGTGGCACGGGAATGTAC 420
 PMMoV - J GCCATTAGGGCCAGTATAAGTAACCTCATGAATGAGTTAGTTCGTGGCACGGGAATGTAC 420
 PMMoV - BR GCCATTAGGGCCAGTATAAGTAACCTCATGAATGAGTTAGTTCGTGGCACGGGAATGTAC 420
 PMMoV - TAIWAM GCCATTAGGGCCAGTATAAGTAACCTCATGAATGAGTTAGTTCGTGGCACAGGAATGTAC 420
 PMMoV - DSMZ_PV-16 GCCATTAGGGCCAGTATAAGTAACCTCATGAATGAGTTAGTTCGTGGCACGGGAATGTAC 420
 PMMoV - BR12 GCCATTAGGGCCAGTATAAGTAACCTCATGAATGAGTTAGTTCGTGGCACGGGAATGTAC 420
 PMMoV - BR15 GCCATTAGGGCCAGTATAAGTAACCTCATGAATGAGTTAGTTCGTGGCCCGGAATGTAC 420
 PMMoV - BR14 GCCATTAGGGCCAGTATAAGTAACCTCATGAATGAGTTAGTTCGTGGCACGGGACTGTAC 420
 PMMoV - BR16 GCCATTAGGGCCAGTATAAGTAACCTCATGAATGAGTTAGTTCGTGGCACGGGAATGTAC 420
 PMMoV - BR17 GCCATTAGGGCCAGTATAAGTAACCTCATGAATGAGTTAGTTCGTGGCACGGGAATGTAC 420
 PaMMV - Japanese AGTATTAGGGCTTGTATTAATAATCTTATGAACGAGCTTGCGCGTGGTACGGGTATGTTA 420
 ToMV-L11A-Fukushima GCAATTTCGGTCTGTGTATAAATAATTTAGTTAATGAAGTACTAGTAAGAGGTACTGGACTGTAC 420
 TMV - INDT0 GCCATAAGGAGCGCGATAAATAATTTAATAGTAGAATTGATCAGAGGAACCTGGATCTTAT 420
 * * * * *

PMMoV - Italian AATCAAGCTCTGTTCGAGAGCGTGAGTGGACTTACGTGGGCTACAACCTCCTTA 473
 PMMoV - P91 AATCAAGCTCTGTTCGAGAGCGTGAGTGGACTTACGTGGGCTACAACCTCCTTA 473
 PMMoV - Ia AATCAAGCTCTGTTCGAGAGCGTGAGTGGACTCACGTGGGCTACAACCTCCTTA 473
 PMMoV - BR08 AATCAAGCTCTGTTCGAGAGCGCGAGTGGACTCACCCTGGGCTACAACCTCCTTA 473
 PMMoV - CHINA AATCAAGCTCTGTTCGAGAGCGCGAGTGGACTCACCCTGGGCTACAACCTCCTTA 473
 PMMoV - 1.2 AATCAAGCTCTGTTCGAGAGCGCGAGTGGACTCACCCTGGGCTACAACCTCCTTA 473
 PMMoV - P AATCAAGCTCTGTTCGAGAGCGCGAGTGGACTCACCCTGGGCTACAACCTCCTTA 473
 PMMoV - P0 AATCAAGCTCTGTTCGAGATGGCGAGTGATTACACCCTGGGCTACAATTCCTTA 473
 PMMoV - J AATCAAGCTCTGTTCGAGAGCGCGAGTGGACTCACCCTGGGCTACAACCTCCTTA 473
 PMMoV - BR AATCAAGCTCTGTTCGAGAGCGCGAGTGGACTCACCCTGGGCTACAACCTCCTTA 473
 PMMoV - TAIWAM AATCAAGCTCTGTTCGAGAGCGCGAGTGGACTCAC CTGGGCTACAACCTCCTTA 473
 PMMoV - DSMZ_PV-16 AATCAAGCTCTGTTCGAGAGCGCGAGTGGACTCACCCTGGGCTACAACCTCCTTA 473
 PMMoV - BR12 AATCAAGCTCTGTTCGAGAGCGCGAGTGGACTCACCCTGGGCTACAACCTCCTTA 473
 PMMoV - BR15 AATCAAGCTCTGTTCGAGAGCGCGAGTGGACTCACCCTGGGCTACAACCTCCTTA 473
 PMMoV - BR14 AATCAAGCTCTGTTCGAGAGCGCGAGTGGACTCACCCTGGGCTACAACCTCCTTA 473
 PMMoV - BR16 AATCAAGCTCTGTTCGAGAGCGCGAGTGGACTCACCCTGGGCTACAACCTCCTTA 473
 PMMoV - BR17 AATCAAGCTCTGTTCGAGAGCGCGAGTGGACTCACCCTGGGCTACAACCTCCTTA 473
 PaMMV - Japanese AATACGGCTCTCCTTCGAGACTGTTTCTAACTTGACCTGGACTACCGCAGCTAC 473
 ToMV-L11A-Fukushima AATCAGAATACTTTTGAAGTATGTCTGGGTTGGTCTGGACCTCTGCACCTGC 473
 TMV - INDT0 AATCGGAGCTCTTTCGAGAGCTCTTCTGGTTTGGTTTGGACCTCTAGTCCGGC 473
 * * * * *

Figura 01. Mapa das principais regiões no Estado de São Paulo produtoras de pimentão e pimenta visitadas nas coletas.

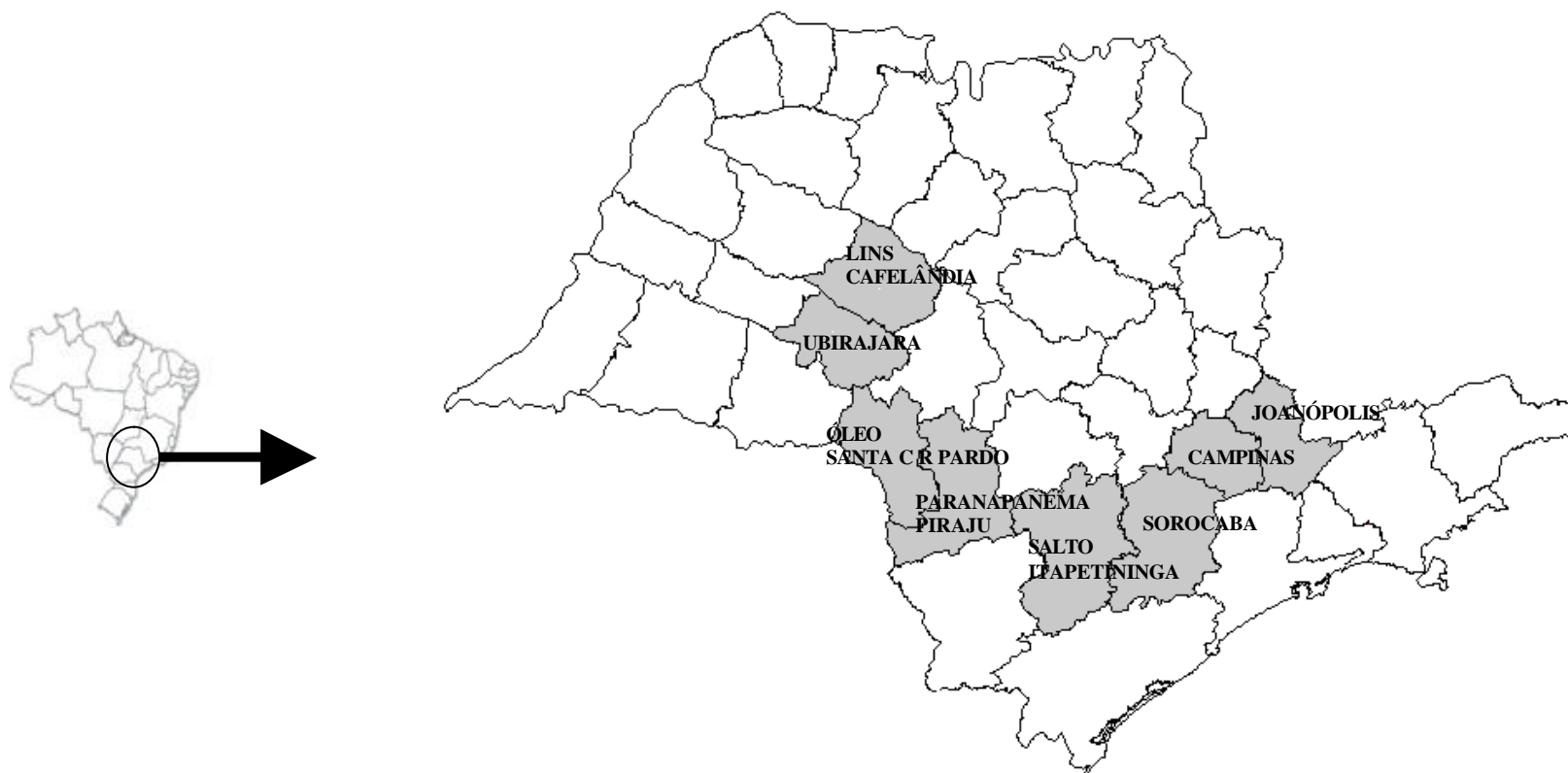


Tabela 5. Locais de coleta de amostras de pimentão e pimenta, número de amostras coletadas sob diferentes sistemas de cultivos e principais vírus ou gêneros de vírus detectados.

ANO	LOCAL	SISTEMA DE CULTIVO	AMOSTRAS COLETADAS	CMV	PMMoV	ToMV	TMV	Potyvirus	Begomovirus
2000	Joanópolis	Estufa	03	-	-	01	-	-	-
2000	Lins	Campo	03	-	01	02	-	-	-
2000	Sorocaba		05	-	03	02	-	-	-
2000	Salto		01	-	-	01	01	-	-
2001	Lins		01	-	-	01	-	-	-
2001	Salto		01	-	01	-	-	-	-
2002	Salto	Estufa	03	-	01	02	-	-	-
2003	Cafelândia	Campo	21	14	-	-	-	-	-
2003	Lins	Campo	09	04	-	-	-	-	-
2003	Óleo	Estufa	22	-	-	-	-	01	-
2003	Santa C R Pardo	Estufa	05	-	-	-	-	-	-
2003	Porto Velho		02	-	-	-	-	-	-
2004	Salto	Estufa	21	-	-	03	-	-	-
2004	Itapetininga	Campo e Estufa	25	-	02	-	-	-	-
2004	Angatuba		29	-	-	-	-	-	-
2004	Campinas		25	-	-	-	-	-	-
2005	Paranapanema	Estufa	20	-	-	-	-	16	-
2005	Piraju	Estufa	14	-	-	-	-	05	02
2005	Ubirajara		25	-	-	-	-	02	-
TOTAL			235	18	09	13	01	25	02

Deteccção do *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potyvirus* e *Begomovirus* em amostras de *Capsicum* spp

Para a deteção do CMV plantas de *N. glutinosa* que reage com sintomas de mosaico sistêmico para o vírus (Dias 2004) foram inoculadas com as amostras coletadas ao campo. A deteção molecular foi realizada por meio da extração de RNA total de plantas de *N. glutinosa* utilizando-se o protocolo descrito por Bertheau et al., 1998, seguido da RT-PCR com os oligonucleotídeos 5' cp (5' GCCGTAAGC TGGATGGACAA-3') e 3' CP (5' TATGATAAGAA (A/G) CTTGTTTCGCG-3') de acordo com o protocolo descrito por Dias (2004).

Na deteção molecular de isolados de potyvirus, foram realizadas extrações de RNA total (Bertheau et al., 1998) das amostras de pimentão e pimenta coletadas, seguido de RT-PCR com os oligonucleotídeos W CIEN 5' ATGGTTTGGTGYATYGARAAT 3' (Gibbs & Mackenzie, 1997) e PV-1 5' GAT TTA GGT GAC ACT ATA GTT TTT TTT TTT TTT TTT 3' (Mota et al., 2004) e posterior sequenciamento da região da capa protéica e comparação com demais seqüências depositadas no Gen Bank.

Isolados de begomovírus foram detectados a partir de plantas de pimentão que foram submetidas à extração de DNA total de acordo com o protocolo descrito por Dellaporta et al. (1983), seguido de PCR utilizando-se os oligonucleotídeos PrV 324/PrC 883 (Wyatt & Brown, 1996) e posterior sequenciamento do fragmento e comparação com demais seqüências depositadas no Gen Bank.