

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE EDUCAÇÃO, AGRICULTURA E AMBIENTE
CURSO DE AGRONOMIA

Caracterização biológica e sorológica de um isolado viral obtido de pimenta (*Capsicum* spp.) no município de Humaitá, AM

Discente: Carla Rafaela Xavier Costa

Humaitá-AM
Novembro de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE EDUCAÇÃO, AGRICULTURA E AMBIENTE
CURSO DE AGRONOMIA

Caracterização biológica e sorológica de um isolado viral obtido de pimenta (*Capsicum* spp.) no município de Humaitá, AM

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Colegiado de Agronomia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Engenheiro Agrônomo, pelo Instituto de Educação, Agricultura e Ambiente da Universidade Federal do Amazonas.

Discente: Carla Rafele Xavier Costa

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Verônica Silva do Nascimento

Humaitá-AM
Novembro de 2012

“A sabedoria não é um produto da escolaridade, mas da tentativa, ao longo de uma vida, para obtê-la”

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

A meu pai, Raimundo Oliveira Costa, um homem extraordinário que por acreditar em mim possibilitou a realização deste sonho, a minha mãe, Lucicleia Nascimento Xavier Costa, incentivadora do meu crescimento profissional, aos meus irmãos, Raíza Caroline, Paulo Vithor e Rui Ueliton, pelo incentivo e força, ao meu cachorrinho Charlie Uilson, pela companhia, nos momentos de solidão.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pelo dom da vida.

A Universidade Federal do Amazonas/Instituto de Educação, Agricultura e Ambiente UFAM/IEAA. Que foi minha casa ao longo destes anos, pela oportunidade de realizar o tão sonhado curso de graduação em Agronomia.

A meus pais, Raimundo Oliveira Costa e Lucicleia Nascimento Xavier Costa, por me prepararem para o mundo, ensinando-me sempre o melhor caminho a seguir, nunca deixando faltar educação, amor, carinho, confiança e apoio.

Aos meus irmãos Raiza Caroline Nascimento Costa, Paulo Vithor Nascimento Costa e Rui Ueliton Lima Oliveira, pela amizade e pelos momentos inesquecíveis de nossa juventude. A todos meus familiares por sempre me apoiarem nos momentos difíceis e me incentivarem a buscar meus objetivos, em especial, minha prima e amiga Elena Santos, que apesar da distância, sempre nos dedicamos amizade sincera.

As minhas melhores amigas, Monique Barreto, Kariza Marcelino e Débora Angeli, que mesmo distantes, nunca deixaram de me apoiar, transmitindo amor, carinho e cumplicidade. Amo-as.

Aos meus amigos-irmãos, Karla Daniele Lima Pereira e Lizandro Lopes Paiva, pela força, amizade fiel e ajuda nos momentos mais difíceis.

Ao parceiro, Paulo Ricardo Mêrces de Moraes, que apesar da distância, estará sempre em meu coração, onde, com muita perseverança no tempo em que estivemos juntos ensinou-me a viver a vida com ambição e coragem para lutar pelos meus objetivos.

A todos os colegas de Curso, em especial, aos amigos da turma de 2006, que apesar de não estamos todos juntos nessa etapa final, ficaram na memória todas as experiências vividas.

As minhas amigas Nislene Molina e Jordana Flôres, que entraram em minha vida apenas para somar, companheirismo, incentivo e apoio incessante, por todos os momentos inesquecíveis que vivemos. Sou eternamente grata por fazerem parte de minha vida.

Aos amigos Renato Aquino, Douglas Pinheiro, Thiago Souza, Julimar Fonseca, Maicon Sene, Leôncio Nery, Ewerton Nunes, Délcio Martins, Hudson Lobo, pelo companheirismo e bons momentos.

Ao Professor Msc. Prof^o Valdemir Araújo Câmara (*in memoriam*), meu amigo e orientador, que com muita paciência e perseverança, apresentou-me a iniciação científica, e por quem tenho grande admiração, carinho e respeito.

A Prof^a. Dr^a. Ana Verônica Silva do Nascimento, pela oportunidade de estágio e orientação, onde, pacientemente e carinhosamente soube lecionar e coordenar os trabalhos relacionados à pesquisa científica. Serei eternamente grata aos seus ensinamentos.

A todos os professores do colegiado de Agronomia em especial: Milton César Costa Campos, Francimara Souza da Costa e Luciano Augusto Rohleder, e aos demais professores do IEAA pelos ensinamentos e conselhos.

Ao amigo e professor Msc. Fabrício Berton Zanchi pela amizade e conselhos, por me ajudar a moldar não só a acadêmica, mas o ser humano que sou hoje. Serei eternamente grata.

Ao INPA, na pessoa do Sr. Kaoru Yuyama. Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica.

A EMATER-RO e seus funcionários, pela oportunidade de estágio, consequentemente construção de conhecimento, em especial, Jairo Jair Silva Siqueira, pelos laços construídos, que jamais serão esquecidos.

A todos que de alguma forma contribuíram para conclusão deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1. Espécies domesticadas pertencentes ao gênero <i>Capsicum</i> | 14 |
| TABELA 2. Aspectos da comercialização de pimentas <i>Capsicum</i> no Brasil.... | 15 |
| TABELA 3. Espécies de <i>Capsicum</i> spp. utilizadas na caracterização parcial da gama de hospedeiro, Humaitá, AM-2012..... | 28 |
| TABELA 4. Reação de cultivares de pimenta e pimentão à inoculação com os isolados de PepYMV provenientes de <i>capsicum</i> spp., Humaitá, AM - 2012.... | 32 |
| TABELA 5. Valores médios de absorbância obtidos em ELISA indireto utilizando antissoros policlonais, Humaitá, AM - 2012. | 34 |

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Foto das cultivares de *Capsicum*. 1A: Pimenta Dedo de Moça: *Capsicum baccatum*. Fonte: Embrapa, 2008; 1B: Pimenta Doce Comprida: *Capsicum annuum*. Fonte: FELTRIN, 2012; 1C: Pimenta Malagueta: *Capsicum frutescens*. Fonte: FELTRIN, 2012; 1D: Pimenta Tekila: *Capsicum chinense*. Fonte: FELTRIN, 2012; 1E: Pimentão Yolo Wonder: *Capsicum annuum*. Fonte: ISLA, 2012; 1F: Pimentão All Big: *Capsicum annuum*. Fonte: Isla, 2012.....18
- FIGURA 2. Eletromicrografia de partículas de um *Potyvirus* (PVY) contratadas negativamente. Fonte: FENNER, 1976.....19
- FIGURA 3. Representação esquemática da organização e expressão do genoma de um *Potyvirus*. O RNA viral possui uma proteína viral (VPg) ligada à sua extremidade 5' e uma cauda poli-A em sua extremidade 3'. A única fase aberta de leitura gera uma poliproteína que sofre autoproteólise gerando diferentes intermediários e, finalmente, 8 proteínas virais (P1, HC-Pro, P3, CI, 6K₂, NIa, NIb e CP). A proteína NIa pode sofrer uma clivagem adicional gerando VPg e Pro, dependendo da espécie viral. Adaptado de (Shukla, 1994).....20
- FIGURA 4. Virose em pimentão, provavelmente causada por uma espécie de vírus do gênero *Potyvirus*. Foto: Ailton Reis, 2009.23
- FIGURA 5. Esquema do processo de infecção viral em plantas. Fonte: Nascimento, 2006.....24
- FIGURA 6. Diagnóstico sorológico ELISA indireto. Fonte: Imunologia & Hematologia, 2010. Adaptado por Carla Costa.....29
- FIGURA 7. Planta de pimenta coletada no município de Humaitá, AM apresentando sintomas de infecção viral. Foto: Carla Costa, 2012.....30
- FIGURA 8. Cultivares inoculadas mecanicamente via extrato vegetal. Foto: Carla Costa, 2012.....31
- FIGURA 9. Sintomas apresentados pelas cultivares. 9A: Pimenta Dedo de Moça: *Capsicum baccatum*; 9B: Pimentão Yolo Wonder: *Capsicum annuum*; 9C: Pimentão All Big: *Capsicum annuum*; 9D: Pimenta Malagueta: *Capsicum frutescens*; 9E: Pimenta Tekila: *Capsicum chinense*; 9F: Pimenta doce comprida: *Capsicum annuum*. Foto: Carla Costa, 2012.....32
- FIGURA 10. Detecção viral via ELISA indireto de amostras de pimenta com infecção viral. 1-5; Amostras de pimenta com sintomas de infecção viral; Controle negativo: plantas sadia; Controle positivo: plantas inoculadas com cada vírus testados como antissoros.34

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| RESUMO | 9 |
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. OBJETIVOS | 12 |
| 2.1 Geral | 12 |
| 2.2 Específicos..... | 12 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 3.1. Gênero <i>Capsicum</i> | 13 |
| 3.2. Origem das pimentas (<i>Capsicum</i> spp.) | 14 |
| 3.3. Importância econômica da pimenta (<i>Capsicum</i> spp.) | 15 |
| 3.4. Características das cultivares | 16 |
| 3.5. Doenças causadas por vírus no gênero <i>Capsicum</i> | 18 |
| 3.6. Controle e diagnóstico de viroses vegetais..... | 24 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 27 |
| 4.1. Área experimental..... | 27 |
| 4.2. Obtenção e manutenção dos isolados virais..... | 27 |
| 4.3. Caracterização biológica..... | 27 |
| 4.4. Caracterização sorológica através do Teste ELISA indireto | 28 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 30 |
| 5.1. Obtenção e manutenção dos isolados virais..... | 30 |
| 5.2 Caracterização biológica..... | 31 |
| 5.3 Caracterização sorológica através do Teste ELISA indireto | 33 |
| 6. CONCLUSÕES | 36 |
| 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA | 37 |

RESUMO

Caracterização biológica e sorológica de um isolado viral obtido de pimenta (*Capsicum* spp.) no município de Humaitá, AM.

O gênero *Capsicum* spp., inclui as pimentas e os pimentões, o qual podem ser atacados por muitas doenças, que assumem diferentes graus de importância na cultura dependendo da época do plantio, estado nutricional e variedade cultivada, principalmente as causadas pelo vírus *Potato virus Y* (PVY). Este trabalho possui como objetivo a caracterização de um isolado viral que infecta cultivares de pimenta através de testes biológico e sorológico, incluindo a utilização do teste ELISA indireto, teste de cultivares via extrato vegetal e avaliação do grau de resistência. Onde foram utilizadas as seguintes cultivares: Pimenta Malagueta (*C. frutescens*), Pimenta Dedo de Moça (*C. baccatum*), Pimenta Doce Comprida (*C. annuum*), Pimenta Tekila (*C. chinense*), Pimentão Yolo Wonder (*C. annuum*) e Pimentão All Big (*C. annuum*). Para obtenção dos resultados utilizou-se cultivares inoculadas mecanicamente via extrato vegetal, obtido de plantas de pimenta (*Capsicum* spp.). Onde possivelmente, encontrou-se uma cultivar com potencial de resistência. O teste ELISA indireto comprovou a etiologia viral com PepYMV.

Palavras-chave: Gênero *Capsicum*, doenças, PVY, resistência.

1. INTRODUÇÃO

As pimentas e os pimentões competem à família Solanaceae e ao gênero *Capsicum*. Este gênero possui de 20 a 25 espécies, geralmente classificadas de acordo com seu nível de domesticação. As espécies e variedades domesticadas e semidomesticadas podem ser discriminadas por características morfológicas visualizadas principalmente nas flores e nos frutos (CARVALHO *et al*, 2007).

Segundo Bianchetti (1996) as pimentas são apreciadas em varias partes do mundo: México, América Central, Antilhas, Índia Ocidental, Caribe, Bolívia (maior diversidade) e em todo Brasil, principalmente no Nordeste, Sudeste e Bacia Amazônica.

Todas as regiões brasileiras são produtoras e consumidoras de pimenta (*Capsicum spp.*), estimando-se a área de produção em 15.000 ha. A produção anual, aproximadamente 280.000 toneladas, destina-se tanto ao consumo *in natura* como ao processamento. O mercado anual, estimado em R\$ 80 milhões, continua em crescimento pelo seu alto valor econômico. O agronegócio de pimentas tornou-se um dos mais importantes do país e um dos melhores exemplos de sucesso da agricultura familiar e de integração pequeno agricultor-agroindústria (REIFSCHNEIDER, 2000).

No que diz respeito ao cultivo de pimentões de acordo com Ribeiro *et al* (2002), esta é uma atividade significativa para o setor agrícola brasileiro. Anualmente, cerca de 12.000 ha são cultivados com esta hortaliça, com uma produção de aproximadamente 280.000 toneladas de frutos. A produção de pimentão existe em todos os Estados da Federação, mas concentra-se nos estados de São Paulo e Minas Gerais que plantam, em conjunto, cerca de 5.000 ha, alcançando uma produção de 120 mil toneladas. Somente o mercado nacional de sementes de pimentão movimenta US\$ 1,5 milhão.

As pimentas e pimentões podem ser atacados por muitas doenças, que assumem diferentes graus de importância na cultura dependendo da época do plantio, do estado nutricional e da variedade da pimenteira cultivada (OLIVEIRA *et al*, 2000). As doenças, nas espécies de pimentas, são pouco estudadas,

sendo consideradas escassas as informações sobre a ocorrência e sua importância econômica.

A sensibilidade do gênero *Capsicum* a problemas fitossanitários causados por vírus ocasiona grandes barreiras para o desenvolvimento da cultura. Dentre as famílias, destaca-se a família *Potyviridae* constituindo a maior e economicamente mais importante família de vírus de plantas, contendo cerca de 20% dos vírus descritos, sendo transmitidos por afídeos e que possuem somente um componente genômico, e o mais numeroso, com mais de 100 espécies classificadas (MOURA, 2009).

Segundo Truta *et al* (2004) a sintomatologia apresentada por estas espécies são amplas, tornando a diagnose no campo difícil, principalmente quando há infecções mistas, com as espécies *Potato virus Y* (PVY)(COSTA & ALVES, 1950) e *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (INOUE-NAGATA *et al*, 2002). PVY e PepYMV podem causar sintomas idênticos no hospedeiro.

Trabalhos de melhoramento genético buscando a incorporação de genes de resistência ao mosaico causado pelo PVY vêm sendo realizados, na intenção de originar cultivares que possuam resistência ao PVY, visando evitar à disseminação de todas as estirpes do vírus então presentes no Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Caracterizar um isolado viral que infecta cultivares de pimenta através de testes biológico e sorológico.

2.2 Específicos

- Caracterizar através de teste ELISA indireto a espécie viral;
- Testar diferentes cultivares de pimenta e pimentão via extrato vegetal tamponado;
- Avaliar o grau de resistência e suscetibilidade das cultivares testada.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Gênero *Capsicum*

As pimentas e pimentões pertencem à Divisão *Spermatophyta*, Filo *Angiospermae*, Classe *Dicotyledonea*, Ordem *Solanales*, Família *Solanaceae* e gênero *Capsicum* (FILGUEIRA, 2005). De acordo com Carvalho *et al* (2003), são plantas tipicamente herbáceas. Seu tamanho varia de acordo com a espécie e as condições de cultivo, principalmente temperatura e irrigação. Suas folhas podem variar em formato, coloração, tamanho e pilosidade. As flores são tipicamente hermafroditas e preferencialmente autógamas. Os frutos são do tipo baga e oco, com espessura da polpa variando entre as variedades.

No gênero *Capsicum* (Grego *Kapso* – picar ou arder) encontram-se os pimentões, as pimentas doces e pimentas picantes. Este gênero possui de 20-25 espécies, a classificação do gênero é realizada com base nos níveis de domesticação, podendo as espécies serem consideradas silvestres, semidomesticadas e domesticadas (BIANCHETTI & CARVALHO, 2005).

Esta classificação segundo Bianchetti (1996) e Reifschneider (2000), é caracterizada da seguinte forma: plantas domesticadas são aquelas em que foram selecionadas determinadas características, de modo que são incapazes de sobreviver em condições naturais; plantas semidomesticadas: são plantas selecionadas, cultivadas, mas ainda não domesticadas, apresentando um grau de dependência do homem; plantas silvestres: são aquelas que não são cultivadas e nem ocorrem normalmente em ambientes alterados pelo homem.

O Brasil destaca-se por possuir ampla diversidade em todas as categorias e contempla 4 espécies domesticadas: *Capsicum annum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens*. Existem ainda 3 espécies semi-domesticadas: *Capsicum glabriusculum*, *Capsicum praetermissum*, *Capsicum baccatum baccatum*. E também 8 a 10 espécies silvestres (REIFSCHNEIDER, 2000).

3.2. Origem das pimentas (*Capsicum* spp.)

As pimentas, assim como os pimentões, pertencem à família Solanaceae, gênero *Capsicum* spp. e são originários das Américas de acordo com a Tabela 1. O Brasil destaca-se como o país com maior número de espécies silvestres do gênero, pois a distribuição natural, além da zona andina (Argentina-Venezuela) que vai até América Central, predomina também na zona litorânea brasileira (BIANCHETTI, 1996).

TABELA 1. Espécies domesticadas pertencentes ao gênero *Capsicum*

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

Fonte: Moura (2009).

De acordo com a Embrapa Hortaliças (2007), as pimentas cultivadas no Brasil são uma das características culturais das tribos indígenas que habitavam as terras brasileiras na época do descobrimento. As pimentas são originárias das Américas e foram introduzidas no resto do mundo na época do descobrimento. Os navegadores portugueses e espanhóis foram os primeiros a descobrir a pimenta em uma de suas viagens a América quando procurava uma fonte alternativa de pimenta preta, o condimento preferido na Europa na época. Após o descobrimento a semente e os frutos passaram a ser mais cultivadas e disseminadas entre vários povos e utilizadas de diversas formas. Após um século as pimentas vermelhas tinham se espalhado por todos os continentes.

3.3. Importância econômica da pimenta (*Capsicum* spp.)

Henz e Ribeiro (2008) citam que o mercado de pimentas é muito segmentado e diverso, em razão da grande variedade de produtos, subprodutos, usos e formas de consumo (Tabela 2). Este mercado pode ser dividido em dois grandes grupos: o de consumo *in natura*, geralmente em pequenas porções, e o de formas processadas, que inclui molhos, conservas, flocos desidratados e pó como ingrediente de alimentos processados. Sendo o mercado mais comum o das pimentas *in natura*, em pequenas quantidades, no atacado e varejo, em todos os estados brasileiros.

TABELA 2. Aspectos da comercialização de pimentas *Capsicum* no Brasil

| Produto | Formato | Utilização |
|------------------|--|---|
| Pimenta | Fruta fresca | Inteira ou amassada em molhos e picles |
| Pimenta Massa | Fruta fresca amassada e preservada em sal e vinagre | Indústria de molhos |
| Molho de Pimenta | Amassada misturada com água, aroma natural e estabilizante | Restaurantes e residências |
| Seca e moída | Seca em fornos e moída até pó | Alimentos processados, “fast food” e “catering” |
| Extrato | Oleosina e óleos de capsaicina de variedade picante | Alimentos processados, medicina, química e Indústria de defesa. |

Fonte: Embrapa – II Encontro Nacional do Agronegócio Pimenta, Brasília-DF, Dezembro de 2007. Disponível em www.embrapa.br. Acesso em 25/8/12.

Outro setor que tem estimulado a comercialização e o aumento do consumo das pimentas é na área da saúde. A substância química capsaina, que confere o caráter ardido das pimentas, tem sido bastante estudada. Sabe-se que ela pode atuar como antioxidante, na cicatrização de feridas, na dissolução de coágulos sanguíneos, na prevenção da arteriosclerose e no controle do colesterol. Além disso, ela influencia na liberação de endorfinas, responsáveis pelo bem-estar e elevação do humor (OLIVEIRA, 2000).

Na opinião de especialistas do setor, as estatísticas referentes à produção de pimentas *Capsicum* spp. podem ser consideradas como insatisfatórias. As fontes consultadas, normalmente, apresentaram dados referentes apenas à produção de pimenta-do-reino (*piper nigrum*), como é o caso, por exemplo, das informações sobre produção de pimentas contidas na base de dados da Organização das Nações Unidas para a Agricultura.

De acordo com tais dados, os países asiáticos são os maiores produtores e consumidores do produto, com destaque para a Índia, China, Coreia do Sul, Indonésia e Tailândia (EMBRAPA, 2006).

Ademais especialistas afirmam que, normalmente é difícil obter dados confiáveis sobre a produção brasileira de pimentas *Capsicum*, uma vez que grande parte da produção *in natura* não passa pelas centrais de abastecimento e, portanto, não faz parte das estatísticas oficiais de produção (PSCI, 2008).

O cultivo de pimentas ocorre em todas as regiões do Brasil. Segundo dados da Embrapa (2008), o agronegócio de pimentas movimenta, desde o processamento até à comercialização, cerca de R\$ 80 milhões por ano, sendo que a Instituição tem investido na parceria com empresas privadas e associações de produtores para desenvolvimento de variedades resistentes a viroses e com características melhoradas para atender as exigências do mercado nacional e internacional.

Na região Norte, o gênero *Capsicum*, além de estar presente na culinária regional, é tido como uma atividade de grande importância sócio-econômica, sendo um dos melhores exemplos de agricultura familiar e de integração pequeno agricultor-agroindústria. Contribuindo como fonte geradora de renda na pequena propriedade e na fixação de pessoas na área rural. Diante deste fato, a mensuração de dados de produção tornam-se escassos. Sendo as variedades mais consumidas 'Murupi', 'Cumari do Pará' e a 'de Cheiro' (PSCI, 2008).

3.4. Características das cultivares

Cinco espécies de *Capsicum* se destacam em termos de importância agrônômica: *C. annum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* e *C.*

pubescens, a última não cultivada no Brasil. A espécie *C. annuum* (pimentão) apresenta a maior variabilidade genética, é a mais cultivada e economicamente mais importante (CASALI & COUTO, 1984).

A Pimenta Dedo de Moça (*Capsicum baccatum*) (Figura 1A) é cultivada no nordeste da América do Sul, incluindo Colômbia, Equador, Peru, Bolívia, norte da Argentina e sudeste do Brasil, sendo uma das variedades mais consumida no Brasil. Considerada de pungência variável, de não picante a picante, com a maioria possuindo pungência suave (FELTRIN, 2012).

A Pimenta Doce Comprida (*Capsicum annuum*) (Figura 1B) possui pungência praticamente inexistente e aroma acentuado. Possui fruto alongado e uniforme, sabor doce e coloração verde intensa e brilhante com pequenos laivos avermelhados quando madura. É muito utilizada na culinária para consumo em saladas (FELTRIN, 2012).

A Pimenta Malagueta (*Capsicum frutescens*) (Figura 1C) é uma das mais usadas na culinária e na medicina popular brasileira. Os frutos são pequenos e vermelhos quando maduros; têm aroma e sabor forte e bastante picante. Utilizada numa grande variedade de pratos na culinária baiana (FELTRIN, 2012).

A Pimenta Tekila (*Capsicum chinense*) (Figura 1D) apresenta aroma marcante é mais intenso quando os frutos estão imaturos. Produz frutos arredondados que surgem no tom verde-escuro e adquirem a cor vermelha quando maduros. A colheita se dá a 105 dias após o plantio das sementes. Sabor altamente picante (FELTRIN, 2012).

O Pimentão Yolo Wonder (*Capsicum annuum*) (Figura 1E) caracteriza-se por uma planta arbustiva, semiperene, mas cultivada como planta anual. Apresenta folhas de coloração verde-escuro e com formato oval-lanceolado. Os frutos são do tipo baga, com formato que varia de cúbico a piramidal (FELTRIN, 2012).

Já o Pimentão All Big (*Capsicum annuum*) (Figura 1F) apresenta caule ramificado, ereto e folhas lanceoladas, verdes e brilhantes, com nervuras bem marcadas. As flores são brancas a arroxeadas. O fruto carnoso é do tipo quadrado com lombadas de coloração verde ao vermelho. Esta variedade caracteriza-se pela alta produtividade (FELTRIN, 2012).

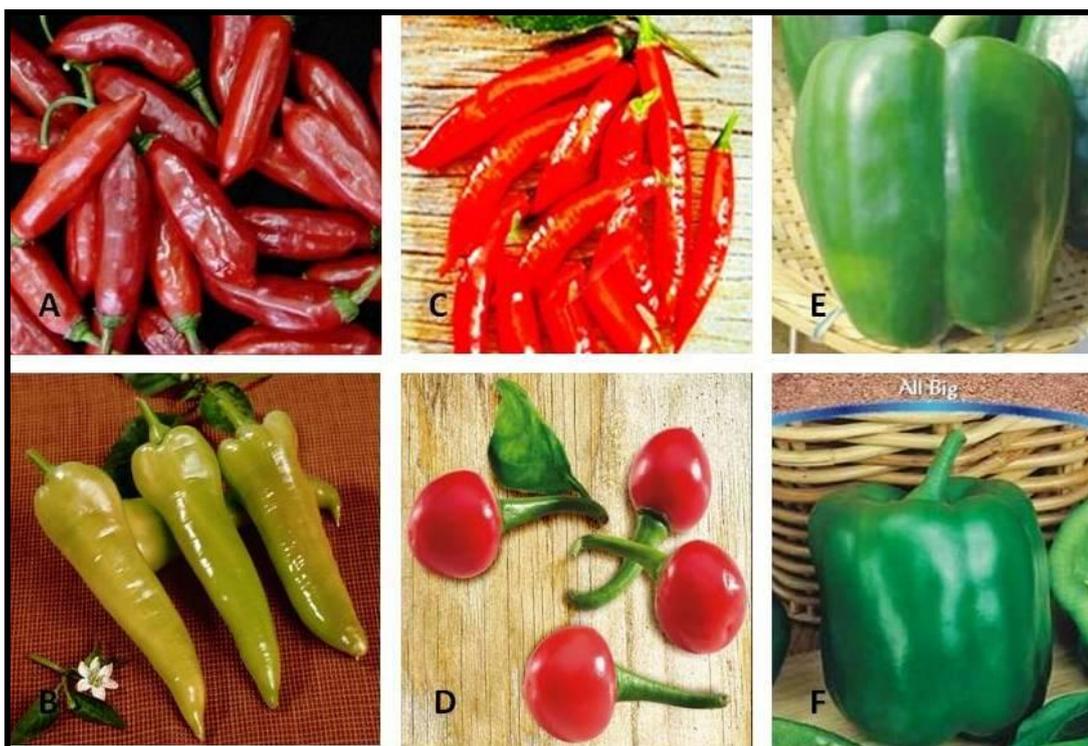


FIGURA 1. Foto das cultivares de *Capsicum*. 1A: Pimenta Dedo de Moça: *Capsicum baccatum*. Fonte: Embrapa, 2008; 1B: Pimenta Doce Comprida: *Capsicum annuum*. Fonte: FELTRIN, 2012; 1C: Pimenta Malagueta: *Capsicum frutescens*. Fonte: FELTRIN, 2012; 1D: Pimenta Tekila: *Capsicum chinense*. Fonte: FELTRIN, 2012; 1E: Pimentão Yolo Wonder: *Capsicum annuum*. Fonte: ISLA, 2012; 1F: Pimentão All Big: *Capsicum annuum*. Fonte: Isla, 2012.

3.5. Doenças causadas por vírus no gênero *Capsicum*

Doenças de plantas são anormalidades provocadas geralmente por microrganismos, como bactérias, fungos, nematóides e vírus. Em termos de importância econômica, as doenças causadas por vírus são superadas apenas pela podridão do colo, causada pelo fungo *Phytophthora capsici*. Existem diversos relatos de vírus ocorrendo em pimentão e pimenta em todo o mundo, incluindo seis vírus pertencentes ao gênero *Potyvirus*: *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco etch virus* (TEV), *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Pepper veinal mottle virus* (PVMV), *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV) e *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (COOK & ANDERSON, 1959; BRIOSO *et al*, 1996; CARANTA & PALLOIX, 1996; DOGIMONT *et al*, 1996; CARANTA *et al*, 1997; INOUE-NAGATA *et al*, 2002).

O gênero *Potyvirus* pertence a família *Potyviridae* a qual está organizada em seis gêneros, de acordo com o inseto vetor e a organização do

genoma viral (BERGER, 2005). Todos os membros da família são transmitidos por vetores e possuem genoma composto por RNA de fita simples (ssRNA) (HULL, 2002). Os gêneros *Rymovirus* e *Tritimovirus* incluem os vírus com um componente genômico e transmitidos por ácaros (Arachnida: Acarina: *Eriophyidae*). Um componente genômico também é observado para os gêneros *Ipomovirus* e *Macluravirus*, porém o vetor é a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aphididae). *Bymovirus* é o único gênero que agrupa vírus transmitidos por fungos e que possuem dois componentes genômicos. Por fim, o gênero *Potyvirus* inclui os vírus transmitidos por afídeos (Homoptera: Aphididae) e com um componente genômico. Uma propriedade intrínseca dos vírus pertencentes a essa família é a indução de inclusões citoplasmáticas cilíndricas (*cylindrical inclusions*, CIs), também denominadas “cata-ventos”, no citoplasma das células infectadas (ZERBINI *et al*, 1999). *Potyviridae* constitui a maior e economicamente mais importante família de vírus de plantas, com cerca de 20% dos vírus descritos (CASALI & COUTO, 1984). Infectam uma grande variedade de culturas agrícolas incluindo leguminosas, solanáceas, ornamentais, gramíneas e frutíferas (ZERBINI *et al*, 1999).

Os vírus da família *Potyviridae* tem um genoma de RNA fita simples, que se encapsula em partículas flexíveis de aproximadamente 11-14 mm de diâmetro e 680-950 mm de tamanho formado por 2000 unidades repetidas de uma única proteína estrutural (*Capsid protein- CP*) (Figura 2).



FIGURA 2. Eletromicrografia de partículas de um *Potyvirus* (PVY) contratadas negativamente. Fonte: FENNER, 1976.

A fita *sense* positiva do RNA genômico dos membros monopartidos possui entre 8.2 kb até 11 kb de tamanho e no caso em concreto do PPV

(isolado Rankovic) possui 9786 nt. A extremidade 5' do genoma esta ligada covalentemente a uma proteína viral de 24 kDa (VPg) e a extremidade 3' e poliadenilada com um número variável de adeninas (An). O RNA contém um longa região aberta de leitura (ORF) que codifica uma proteína de 350 kDa, contendo, na maioria dos casos os seguintes produtos gênicos no sentido N- a C- terminal: P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa (VPg+Pro), NIb e CP (Figura 3).

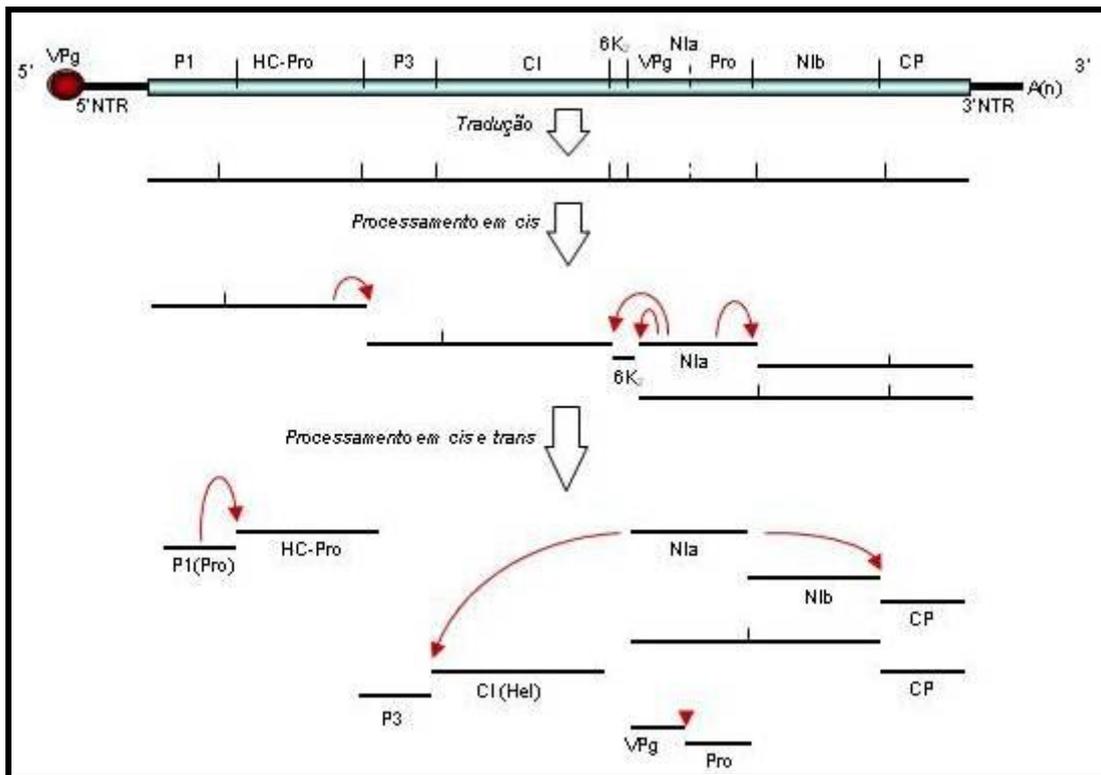


FIGURA 3. Representação esquemática da organização e expressão do genoma de um *Potyvirus*. O RNA viral possui uma proteína viral (VPg) ligada à sua extremidade 5' e uma cauda poli-A em sua extremidade 3'. A única fase aberta de leitura gera uma poliproteína que sofre autoproteólise gerando diferentes intermediários e, finalmente, 8 proteínas virais (P1, HC-Pro, P3, CI, 6K₂, NIa, NIb e CP). A proteína NIa pode sofrer uma clivagem adicional gerando VPg e Pro, dependendo da espécie viral. Adaptado de (Shukla, 1994).

A replicação é iniciada com a síntese de uma fita complementar negativa a partir da fita de RNA positiva, reação esta catalisada pela RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) viral, em conjunto com proteínas do hospedeiro. As novas fitas positivas são em seguida sintetizadas utilizando as fitas negativas como molde. A especificidade do complexo replicativo é assegurada pelo

reconhecimento de sinais em *cis* encontrados em ambas as fitas (SIMÓN-BUELA *et al*, 1997).

A maioria das proteínas codificadas pelos *Potyvirus* são necessárias, direta ou indiretamente, para a replicação viral. As proteínas virais envolvidas na replicação do RNA incluem P1, HC-Pro, P3, 6K₂, VPg-Pro (N1a), N1b, e CI. As proteínas P1, HC-Pro e P3 não são essenciais na replicação, porém são consideradas fatores de amplificação do genoma viral, por aumentarem a taxa da replicação (revisado por ZERBINI & ZAMBOLIM, 1999).

A proteína P1, localizada na extremidade amínica da poliproteína, é um dos três peptídeos virais com atividade de proteinase, sendo responsável pela clivagem do seu próprio terminal carboxílico, separando-se da proteína HC-Pro (VERCHOT *et al*, 1991). Além da atividade de proteinase, a P1 atua como fator de amplificação do genoma (VERCHOT & CARRINGTON, 1995).

A proteína HC-Pro (*helper component proteinase*) tem função de proteinase (também clivando seu próprio terminal carboxílico), de fator auxiliar de transmissão por afídeos, de movimento célula a célula e possivelmente a longa distância, e de supressão de silenciamento gênico pós-transcricional (MAIA *et al*, 1996; PLISSON *et al*, 2003).

A P3 é a proteína menos estudada dos *Potyvirus*. Ela é detectada em células infectadas, isoladamente (RODRIGUEZ-CEREZO & SHAW, 1991) ou em conjunto com as proteínas CI (RODRIGUEZ-CEREZO *et al*, 1993) ou N1b (LANGENBERG & ZHANG, 1997). Como essas duas proteínas estão envolvidas diretamente na replicação viral, sugere-se que P3, à semelhança de P1, seja um fator acessório de amplificação do genoma (SHUKLA *et al*, 1994).

A proteína CI (*cylindrical inclusion*) forma as inclusões citoplasmáticas do tipo “cata-vento”, típicas da infecção por membros da família *Potyviridae* (MURPHY *et al*, 1991). Esta proteína é a helicase dos *Potyvirus*, responsável pela separação da fita dupla de RNA produzida durante a replicação. A CI, juntamente com a N1a e N1b, forma o núcleo replicativo, catalisando processos enzimáticos essenciais durante a replicação. A CI tem também papel no movimento célula-a-célula dos *Potyvirus* (CALDER & INGERFELD, 1990).

A proteína 6K₂ possui um domínio central hidrofóbico de 19 aminoácidos que lhe confere a propriedade de associação a membranas, sugerindo que pode

ser responsável pela associação do complexo replicativo a membranas (RESTREPO-HARTWIG & CARRINGTON, 1994; SCHAAD *et al*, 1997).

A proteína NIa (*nuclear inclusion a*) consiste de dois polipeptídeos com funções distintas, VPg (*viral protein, genome-linked*) e Pro (proteínase). A VPg atua como iniciadora da síntese de fitas de RNA negativo, por meio do grupamento hidroxil presente em um resíduo conservado de tirosina (MURPHY *et al*, 1996). Além disso, essa proteína é capaz de se associar ao fator de iniciação de tradução eIF4E, embora o efeito dessa associação no ciclo de replicação viral ainda não esteja totalmente esclarecido (LELLIS *et al*, 2002). Pro é a principal proteínase dos *Potyvirus*, responsável pela maioria das clivagens da poliproteína (CARRINGTON *et al*, 1990).

A proteína NIb (*nuclear inclusion b*) é a polimerase (RNA polimerase dependente de RNA, RdRp) dos *Potyvirus*, cuja função principal é a síntese de novas cópias do RNA viral (DOMIER *et al*, 1987; LAÍN *et al*, 1989; ROBAGLIA *et al*, 1989).

A proteína capsidial (CP) está envolvida em várias funções, como encapsidação do RNA viral, transmissão pelo vetor (ATREYA *et al*, 1995), movimento célula-a-célula (DOLJA *et al*, 1995; ROJAS *et al*, 1997) e movimento a longa distância (DOLJA *et al*, 1995).

A região 3' não-traduzida (3' NTR) do genoma dos *Potyvirus* apresenta uma cauda poli-A, codificada pelo próprio vírus. Essa cauda está envolvida na proteção do RNA, evitando ou atenuando os efeitos da degradação exonucleotídica. A seqüência da 3' NTR é importante para o reconhecimento do RNA genômico viral pelo complexo replicativo, contendo *cis*-elementos essenciais para que esse processo ocorra (HALDEMAN-CAHILL *et al*, 1998; MAHAJAN *et al*, 1996).

O único *Potyvirus* relatado em espécies de *Capsicum* no Brasil era o PVY (NAGAI, 1983; BOITEUX & PESSOA, 1994; BRIOSO *et al*, 1996). Em 2002, Inoue-Nagata *et al*, relataram a ocorrência de uma nova espécie de *Potyvirus* causando mosaico amarelo e distorção foliar em pimentão, denominada *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). Estudos moleculares desse novo vírus demonstraram que a seqüência de aminoácidos da proteína capsidial (CP) difere significativamente de outros *Potyvirus* conhecidos. Após a avaliação de uma

seqüência parcial de 1.330 nucleotídeos correspondendo à região codificadora da CP e à região 3' não-traduzida, os autores verificaram uma homologia entre 62 e 46% com os *Potyvirus* PVY, PepMoV, *Potato virus V* (PVV) e *Sunflower mottle virus* (SCMV) (INOUE-NAGATA *et al*, 2002). Outro relato da ocorrência de PepYMV em pimentões nos estados de São Paulo e Minas Gerais foi feito por Stangarlin *et al* (2001).

Os sintomas típicos induzidos pelos *Potyvirus* incluem mosaico, clorose, clareamento de nervuras, mosqueado, pontos necróticos, distorção foliar e necrose (Figura 4). Flores, sementes e frutos podem ser afetados (SHUKLA *et al*, 1994). Contudo, para ocorrer a infecção sistêmica, é necessária uma série de interações compatíveis entre o vírus e fatores do hospedeiro (fatores de iniciação da tradução, co-fatores para a replicação viral, proteínas que auxiliam no movimento célula-a-célula do vírus e outros), de forma a permitir a replicação do RNA viral, o movimento célula-a-célula do vírus através dos plasmodesmas e o movimento a longa distância, via floema (CARRINGTON *et al*, 1996). Dependendo da combinação vírus-hospedeiro, diferentes fatores virais e do hospedeiro podem contribuir para a manifestação dos sintomas (Figura 5).



FIGURA 4. Virose em pimentão, provavelmente causada por uma espécie de vírus do gênero *Potyvirus*. Foto: Ailton Reis, 2009.

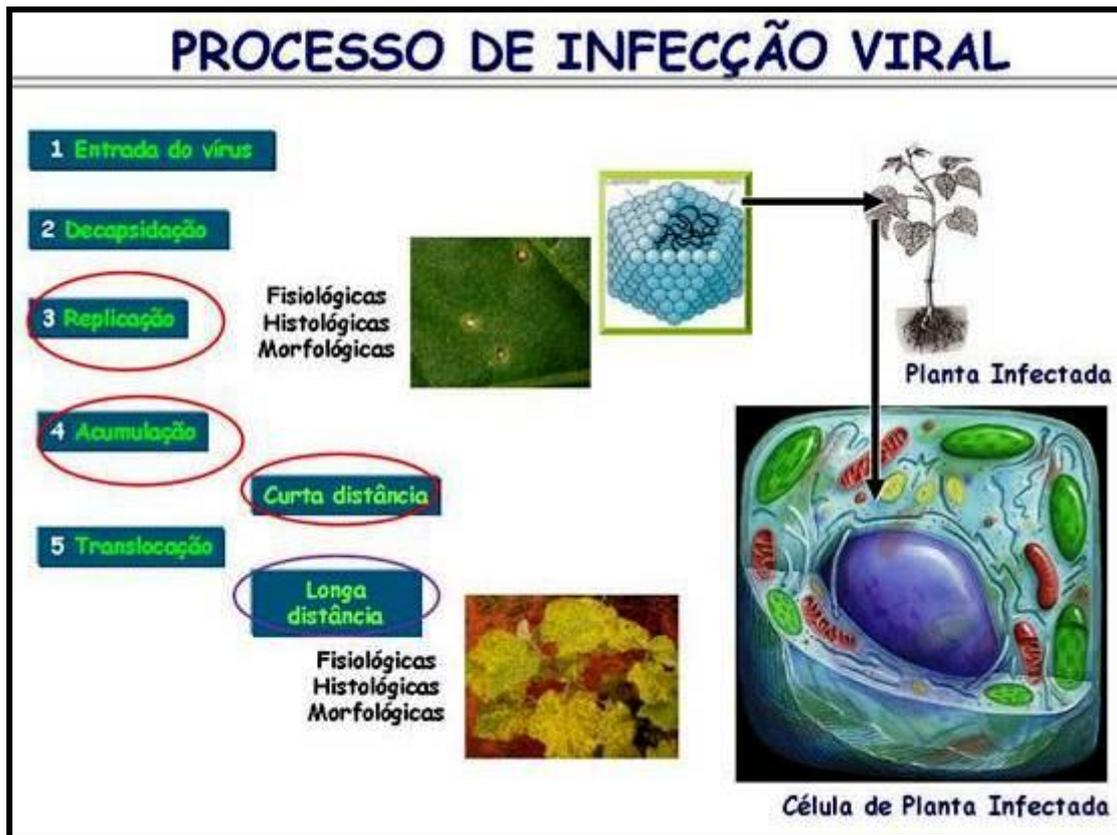


FIGURA 5. Esquema do processo de infecção viral em plantas. Fonte: Nascimento, 2006.

3.6. Controle e diagnóstico de viroses vegetais

Os vírus utilizam uma grande variedade de estratégias para promover a infecção em hospedeiros suscetíveis. A infecção por vírus pode alterar profundamente a fisiologia do hospedeiro. Em plantas, as doenças induzidas por vírus podem variar amplamente em termos de severidade, incluindo respostas tolerantes que pouco alteram a fisiologia da planta hospedeira, até respostas severas que podem culminar com a morte da planta (HULL, 2002).

Durante a coevolução entre vírus e hospedeiro desenvolveu-se uma interação complexa envolvendo diversos mecanismos de ataque do patógeno, e de defesa do hospedeiro. As estratégias utilizadas pelos vírus para infectar o hospedeiro incluem modificações estruturais na célula hospedeira, a supressão do silenciamento gênico pós-transcricional e a interferência com a regulação do ciclo celular (FIGUEIRA, 1996), dentre outras. Em contrapartida, as plantas desenvolveram mecanismos para se proteger da infecção viral e a ativação de respostas como a hipersensibilidade e a resistência sistêmica adquirida.

A capacidade das plantas em montar uma resposta de defesa eficiente depende da capacidade do hospedeiro em reconhecer o patógeno e iniciar um mecanismo de defesa que limite a infecção. Portanto, o conhecimento básico dos mecanismos genéticos, bioquímicos e moleculares que estão envolvidos na interação vírus hospedeiro torna-se extremamente relevante, pois pode permitir o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle.

Doenças causadas por vírus têm enorme impacto negativo na produção agrícola de todo o mundo e, conseqüentemente, vários esforços têm sido empregados no seu controle, assim como na identificação de viroses e de seus agentes causadores. Técnicas clássicas como quarentena, erradicação, rotação de culturas e sementes/plantas certificadas livre de vírus, são ferramentas ainda muito utilizadas e que apresentam algumas desvantagens por serem dispendiosas e perderem a efetividade ao longo dos anos. Entretanto, é fundamental o diagnóstico correto da virose para adotar medidas eficientes de controle. O diagnóstico através de testes biológicos (gama de hospedeiro) e sorologia são bastante utilizados no diagnóstico de viroses, sendo de baixo custo, rápido e sensível (LANE, 2002).

O diagnóstico baseado em gama de hospedeiro compreende na inoculação mecânica através de extrato vegetação tamponado em diferentes hospedeiras, após esse procedimento, analisa-se a reação das plantas em relação a sintomatologia ou ausência de sintomas. Uma vez a planta apresentando sintomas, pode-se dizer que a mesma é uma hospedeira potencial do vírus inoculado. Na ausência de sintomas a planta pode ser considerada como possível fonte de resistência.

Diversos testes sorológicos estão descritos na literatura. Os testes baseiam-se nas reações específicas entre Anticorpos (AC) e Antígenos (Ag) onde epitopos do Ag se ligam aos sítios específicos presentes nos respectivos AC. O precipitado formado pela reação Ag-Ac será maior quando as concentrações de Ag e AC forem as mais adequadas. A utilização de munoglobulina conjugada a uma enzima, para detecção de antígenos e anticorpos, foi sugerida por Avrameas em 1969. Entretanto, o uso conjugado com a finalidade de detectar e quantificar a imunoglobulina G (IgG) foi descrita

por Engvall e Perlmann em 1971, denominado esse método de ELISA (Enzyme Linked Imunosorbent Assay).

Devido à sensibilidade desse método na diagnose e quantificação de antígenos específicos, ele foi muito utilizado no diagnóstico de vírus de seres humanos e de animais (LAÍN *et al*, 1989). A introdução do método de ELISA na virologia de plantas deveu-se ao trabalho pioneiro de Voller *et al* (1976) seguido por outro descrito por Clark e Adams (1977). Posteriormente sua utilização estendeu-se para as áreas da micologia e bacteriologia. Atualmente, ELISA tornou-se importante método auxiliar nos trabalhos com vírus de plantas.

Segundo LAÍN *et al* (1989), as variações no teste de ELISA diferem na sensibilidade e na capacidade de detectar vírus sorologicamente relacionados. Embora existam diversas variações do teste de ELISA, todas elas dependem de um princípio básico: macromoléculas aderem a vários tipos de suportes físicos, tais como plásticos, borracha, vidro, silicone e membranas de nitrocelulose ou náilon, através de adsorção (interação hidrofóbicas não covalentes). Essas ligações possuem força suficiente para promover a adesão das macromoléculas ao suporte físico. Entretanto, algumas poucas moléculas se desprendem do suporte após as diversas e vigorosas lavagens, requeridas pelo teste. Basicamente, o teste ELISA pode ser classificado em ELISA direto e ELISA indireto. No primeiro caso utiliza-se a IgG e o conjugado produzido em apenas um animal e, no segundo caso, utilizam-se duas IgG, uma para reconhecer o antígeno e outra (anti-IgG) produzida em diferentes espécie de animal, que reconhece a primeira IgG, com a qual se ligará.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Área experimental

O ensaio foi implantado na casa de vegetação do Instituto de Educação, Agricultura e Ambiente – IEAA/UFAM, localizada no Município de Humaitá, tendo seu início no mês de junho de 2012. Sendo utilizadas para a realização deste, cultivares de pimenta e pimentão submetidas às mesmas condições plantio, ambiente e disponibilidade de nutrientes.

4.2. Obtenção e manutenção dos isolados virais

Plantas de pimenta (*Capsicum* spp.) possuindo sintomas de mosaico severo, deformação foliar e bolhosidade foram identificadas em plantios no município de Humaitá-AM. Dessas plantas, coletaram-se folhas com sintomas, que foram enviadas para o Laboratório de Fitossanidade/Fitopatologia UFAM/IEAA para diagnóstico prévio. Em seguida, as folhas foram embaladas corretamente e enviada para a análise sorológica na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Laboratório de Fitopatologia/Virologia. Amostras dessas folhas também foram utilizadas na inoculação para determinação da gama de hospedeiros, sendo armazenadas a 4 °C sob a forma de material foliar dessecado.

4.3. Caracterização biológica

A caracterização biológica consistiu na determinação da gama de hospedeiros parcial. As sementes de *Capsicum* spp. utilizadas no experimento foram adquiridas no mercado local de acordo com a disponibilidade, sendo colocadas para germinar em sementeiras contendo substrato comercial Tropstrato[®]. As mudas foram transplantadas para os vasos de plásticos, contendo solo e substrato comercial, na proporção 3:1, respectivamente, permanecendo na casa de vegetação, onde foram inoculadas aos 30 dias após sua emergência.

Para o procedimento de inoculação, folhas jovens de pimenteiras coletadas com sintomas típicos de vírus foram maceradas em almofariz na presença de tampão fosfato (0,05 M, pH 7,0), acrescido do antioxidante sulfito de sódio (0,01M) e do abrasivo celite (0,05%). Após a maceração, o extrato resultante foi filtrado em gaze dupla. O extrato foi inoculado mecanicamente em folhas de *Capsicum* das espécies especificadas na Tabela 3, pela fricção de pedaços de gaze embebidos no extrato vegetal nas superfícies adaxiais. Logo após a inoculação as folhas foram lavadas com água destiladas com a finalidade de eliminar substâncias inibidoras que poderiam impedir a replicação do vírus. Durante todo o processo, o almofariz contendo o extrato foi mantido em banho no gelo. Após a realização do procedimento, as plantas permaneceram na casa de vegetação, com temperatura e umidade ambientes.

TABELA 3. Espécies de *Capsicum* spp. utilizadas na caracterização parcial da gama de hospedeiro, Humaitá, AM-2012.

| Cultivar | Nome Científico | Empresa |
|-----------------------|----------------------|----------------------|
| Pimenta Malagueta | <i>C. frutescens</i> | FELTRIN [®] |
| Pimenta Dedo de moça | <i>C. baccatum</i> | TOPSEED [®] |
| Pimenta Doce comprida | <i>C. annuum</i> | FELTRIN [®] |
| Pimenta Tekila | <i>C. chinense</i> | FELTRIN [®] |
| Pimentão Yolo Wonder | <i>C. annuum</i> | ISLA [®] |
| Pimentão All Big | <i>C. annuum</i> | ISLA [®] |

4.4. Caracterização sorológica através do Teste ELISA indireto

A caracterização sorológica foi realizada em parceria com a Universidade Federal Rural de Pernambuco, Laboratório de Fitopatologia/Virologia. O teste Elisa indireto foi realizado em folhas de pimenta apresentando infecção viral contra os vírus: *Potato Vírus Y* (PVY), *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), *Cucumber Mosaic Virus* (CMV), *Cowpea aphid-borne Mosaic Virus* (CABMV).

As etapas para esta técnica foram as seguintes (Figura 6): A princípio cobriram-se os orifícios da placa com 200 μ L da amostra diluída em tampão de cobertura (carbonato de sódio pH 9,6). Incubou-se por 2 horas a 37°C em câmara úmida, após a incubação seguiu-se, com três lavagens com Tampão PBS, contendo 0,5 ml de Tween 20 e 2 g/L ovalbumina. Em seguida, adicionou-se em cada poço 150 μ L da solução de IgG diluído em Tampão de cobertura (pH 9,6) e incubado novamente nas mesmas condições anteriores, seguindo-se novamente três lavagens. Adicionou-se aos orifícios 100 μ L da solução anti-IgG, obtida de cabra, conjugada a enzima (Sigma A8025). Realizaram-se os procedimentos de incubação e lavagens descritos anteriormente. Foi adicionado ainda 100 μ L do substrato aos orifícios da placa, aguardou-se a formação da coloração até a intensidade desejada (absorbância entre 0,3 e 0,8), finalizou-se, adicionando-se 40 μ L de NaOH 3M aos orifícios e efetuou-se a leitura.

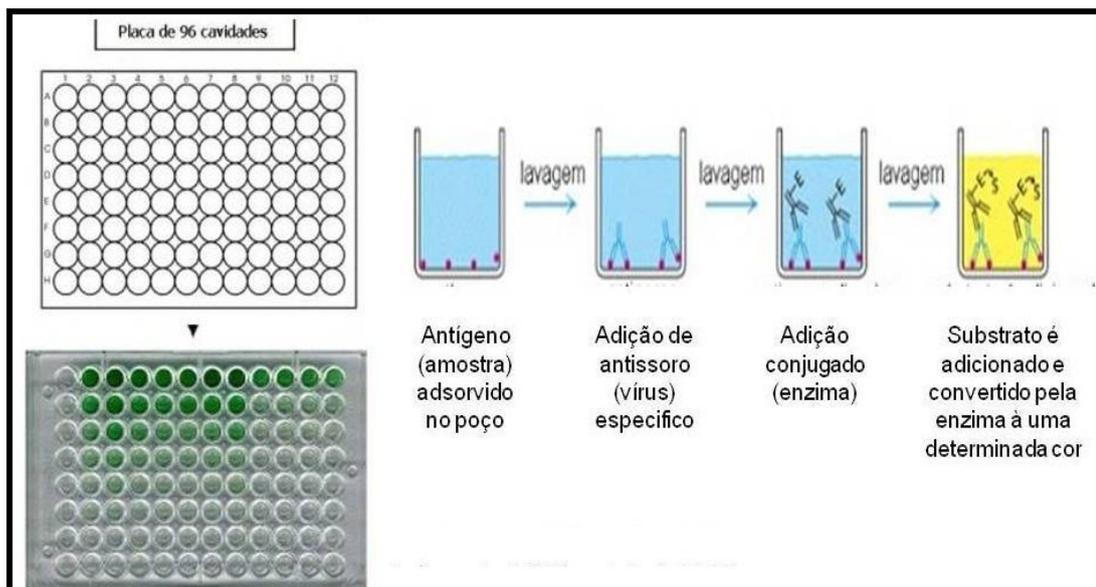


FIGURA 6. Diagnóstico sorológico ELISA indireto. Fonte: Imunologia & Hematologia, 2010. Adaptado por Carla Costa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Obtenção e manutenção dos isolados virais

As amostras de folhas de pimenta coletadas que foram levadas para o laboratório de Fitossanidade/Fitopatologia UFAM/IEAA para o prévio diagnóstico. Foi observado que estas, apresentavam sintomas severos de infecção viral, mosaico e clorose intensa nas folhas (Figura 7). Este resultado está de acordo com as literaturas quando descrevem os sintomas de infecção viral em pimenta. Levantamentos de infecção viral em pimenta tem sido realizado por Truta (2004).



FIGURA 7. Planta de pimenta coletada no município de Humaitá, AM apresentando sintomas de infecção viral. Foto: Carla Costa, 2012.

5.2 Caracterização biológica

Plantas do gênero *Capsicum* foram inoculadas mecanicamente utilizando-se o extrato de planta infectado (Figura 8), sendo cinco plantas de cada cultivar.



FIGURA 8. Cultivares inoculadas mecanicamente via extrato vegetal. Foto: Carla Costa, 2012.

Efetuada a inoculação mecânica com o extrato de pimenta infectado, observaram-se os sintomas descritos na Tabela 4, onde as cultivares de Pimenta Doce Comprida (*C. annuum*), Pimenta Malagueta (*C. frutescens*), Pimenta Tekila (*C. chinense*), Pimentão Yolo Wonder (*C. annuum*) e Pimentão All Big (*C. annuum*) expressaram a sintomatologia positiva para infecção viral, sendo caracterizadas como suscetíveis. Entretanto não foi observada infecção viral na cultivar Dedo de moça (*C. baccatum*) (Figura 9A). Foram observados os sintomas de mosaico suave nas folhas jovens das cultivares Yolo Wonder (*C. annuum*) (Figura 9B) e All Big (*C. annuum*) (Figura 9C). Na cultivar de pimenta malagueta (*C. frutescens*), foram observados os sintomas de mosaico variando de moderado à severo e encarquilhamento nas folhas jovens, bolhosidade intensa e deformação (Figura 9D). Na cultivar de Pimenta Tekila (*C. chinense*), verificou-se a presença de mosaico severo, encarquilhamento das folhas jovens e bolhosidade (Figura 9E). Este resultado é bastante promissor, uma vez que a planta que não apresentou infecção viral pode ser uma fonte de genes de resistência à virose. Na cultivar de Pimenta Doce

Comprida (*C. annuum*), foi observado um sintoma leve de mosaico, entretanto, não interferiu na produção, conforme a figura 9F.



FIGURA 9. Sintomas apresentados pelas cultivares. 9A: Pimenta Dedo de Moça: *Capsicum baccatum*; 9B: Pimentão Yolo Wonder: *Capsicum annuum*; 9C: Pimentão All Big: *Capsicum annuum*; 9D: Pimenta Malagueta: *Capsicum frutescens*; 9E: Pimenta Tekila: *Capsicum chinense*; 9F: Pimenta doce comprida: *Capsicum annuum*. Foto: Carla Costa, 2012.

TABELA 4. Reação de cultivares de pimenta e pimentão à inoculação com os isolados de PepYMV provenientes de *capsicum* spp., Humaitá, AM - 2012.

| Cultivares | Sintomas | | | | | |
|------------------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | ms | msv | bl | en | df | as |
| P. Dedo de Moça | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (+) |
| P. Yolo Wonder | (+) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| P. All Big | (+) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| P. Malagueta | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (-) |
| P. Tekila | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (-) |
| P. Doce Comprida | (+) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |

Sintomas em folhas inoculadas, aos 30 dias: ms: mosaico suave; msv: mosaico severo; bl: bolhosidade; en: encarquilhamento; df: deformação foliar; as: ausência de sintomas, (+): presença;(-): ausência.

Estudos de gama de hospedeiro com infecção viral em *Capsicum* tem sido estudado por Truta *et al* (2004). Os autores estudaram a identidade e propriedade de isolados de potyvirus provenientes de *Capsicum* spp. através da reação de dez espécies vegetais, selecionadas com base em dados de literatura (BRUNT *et al*, 1996): pimentão 'Ikeda', pimenta 'Malagueta', tomate 'Rutgers', batata, fumo ('Samsun', 'White Burley' e 'TNN'), *Chenopodium quinoa* Willd, *D. stramonium*, *Nicandra physaloides* Gaertn., *N. debneyi* e *Physalis floridana* Rydb. Os resultados demonstraram a existência de um considerável grau de variabilidade biológica entre os isolados. As reações de algumas espécies de plantas distinguiram os isolados em estudo de outros potyvirus que infetam o pimentão e a pimenta, como PepMoV. Nenhum isolado causou necrose em pimenta 'Malagueta', sintoma característico de PepMoV nessa hospedeira. Foi observado que o isolado obtido de pimenta causou sintomas mais severos em pimenta do que em pimentão. Esse resultado também foi observado nesse estudo. Dessa forma, os resultados observados nesse estudo e no estudo realizado por Truta *et al*, (2004) confirmam uma variabilidade na expressão de sintomas conforme a hospedeira testada, indicando provavelmente a ativação de mecanismos de resistência na interação vírus/hospedeiro (CARANTA & PALLOIX, 1996).

5.3 Caracterização sorológica através do Teste ELISA indireto

No teste ELISA foi possível identificar reação positiva com o antissoro para *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). Entretanto, para os antissoros contra *Potato Virus Y* (PVY), *Cucumber Mosaic Virus* (CMV), *Cowpea aphid-borne Mosaic Virus* (CABMV) não foi observada reação positiva, confirmando dessa forma, a etiologia viral com o *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (Tabela 5; Figura 10).

TABELA 5. Valores médios de absorbância obtidos em ELISA indireto utilizando antissoros policlonais, Humaitá, AM - 2012.

| $A_{450\text{ nm}}$ | Antissoros | | | |
|--|------------|-------|-------|-------|
| | PepYMV | PVY | CMV | CABMV |
| Amostras de folhas de pimenteira com sintomas de vírus | | | | |
| 1 | 1,090 | 0,440 | 0,190 | 0,199 |
| 2 | 1,094 | 0,434 | 0,189 | 0,198 |
| 3 | 1,090 | 0,420 | 0,190 | 0,197 |
| 4 | 1,089 | 0,424 | 0,191 | 0,198 |
| 5 | 1,092 | 0,441 | 0,188 | 0,197 |
| Planta Sadia (Controle negativo) | 0,178 | 0,157 | 0,167 | 0,177 |
| Planta infectada (controle positivo) | 1,090 | 1,098 | 1,993 | 1,934 |

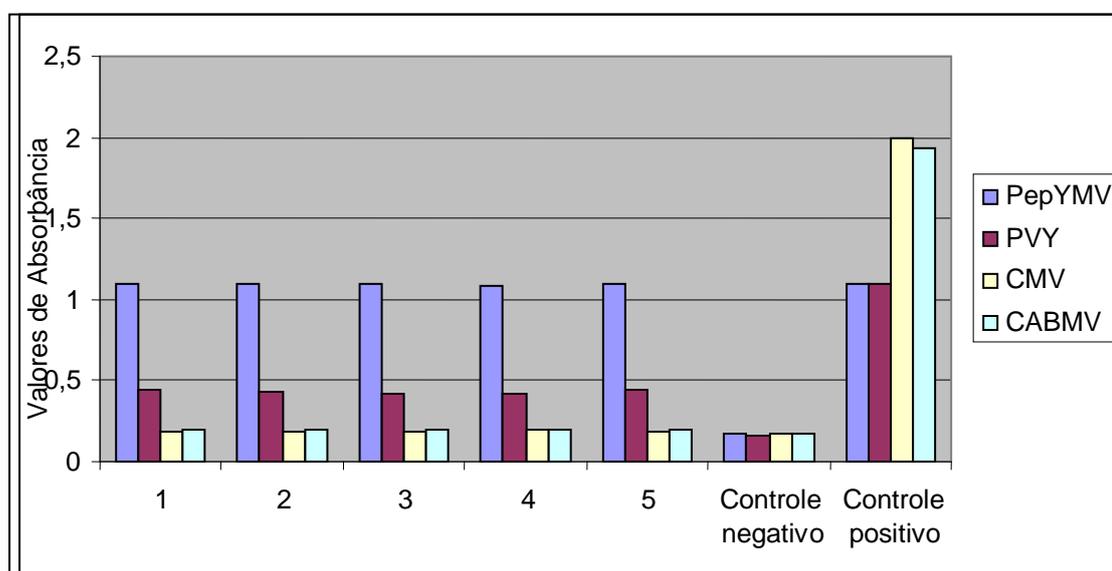


FIGURA 10. Detecção viral via ELISA indireto de amostras de pimenta com infecção viral. 1-5; Amostras de pimenta com sintomas de infecção viral; Controle negativo: plantas sadia; Controle positivo: plantas inoculadas com cada vírus testados como antissoro.

O diagnóstico através da sorologia tem sido foco de estudo em vários trabalhos para diagnósticos de viroses em diversas culturas. Nascimento *et al*, (2006) realizaram o teste ELISA indireto utilizando antissoro policlonais contra CMV, CABM e PWV nas amostras de maracujazeiro objetivando o diagnóstico de *Potyvirus* nas amostras coletadas, confirmando dessa forma a etiologia viral nas amostras. Santos (2011), avaliou a infecção de potyvirus em curcubitáceas utilizando o teste ELISA confirmando a infecção por *Papaya ringspot virus-W* (PRSV-W) e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). Estudos realizados por Lima *et al*, (2010) sobre a detecção e incidência de vírus em 89 acessos de pimenta (*Capsicum* spp.) no Município de Ceres, Goiás utilizando o teste ELISA resultou na confirmação viral nos acessos testados. Dessa forma, conclui-se que o teste ELISA é um método de diagnóstico bastante utilizado para detecção de vírus em plantas de uma forma rápida e sensível.

6. CONCLUSÕES

As amostras de folhas de pimentas coletadas apresentaram infecção de etiologia viral;

Com o teste de gama de hospedeiro foi possível identificar uma planta de pimenta com ausência de sintomas de infecção viral, podendo ser uma provável cultivar resistente;

O teste ELISA Indireto confirmou a ocorrência de infecção nas folhas de pimenta coletadas no campo por um *Potyvirus*, o PepYMV.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ATREYA, P.L., LOPEZ-MOYA, J.J., CHU, M.H., ATREYA, C.D. & PIRONE, T.P. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. **Journal of General Virology** 76:265-270. 1995.
- BERGER, P.H. Phylogenetic analysis of the Potyviridae with emphasis on legume-infecting potyviruses. **Archives of Virology**, v.142, p.1979-1999.2005.
- BIANCHETTI, L. B. Aspectos morfológicos, ecológicos e biogeográficos de 10 táxons de *Capsicum* (Solanaceae) ocorrentes no Brasil. **Revista Acta Botânica Brasileira**, Feira de Santana, v. 10, n.2, Dec. 1996.
- BIANCHETTI, L.B.; CARVALHO, S.I.C. Subsídios a coleta de germoplasma de espécies de pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* (Solanaceas). 2005. In: WALTER, B.M.T; CAVALCANTE, T.B. Fundamentos para coleta de germoplasma vegetal: Teoria e Prática. Brasília – DF; **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2005. p. 355-385.
- BOITEUX, L.S. & PESSOA, H.B.S.V. Additional sources of resistance to isolates of PVY^m in *Capsicum* germoplasm. **Revista Fitopatologia Brasileira** 19:291. 1994.
- BRIOSO, P.S.T.; PEREIRA, M.A.; OLIVEIRA, D.E. "Potato virus Y" - Identificação de estirpe infectando naturalmente pimentão (*Capsicum annum* L.) e fonte de resistência. **Revista Fitopatologia Brasileira** 21:226-235. 1996.
- BRUNT, A.A., CRABTREE, K., **Plant Viruses Online**: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996. URL: <http://biology.Anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- CALDER, V.L. & INGERFELD, M. The roles of the cylindrical inclusion protein of a potyvirus in the induction of vesicles and in cell-to-cell spread. **Journal of Structural Biology** 105:62-66. 1990.
- CARANTA, C. & PALLOIX, A. Both common and specific genetic factors are involved in polygenic resistance of pepper to several potyviruses. **Theoretical and Applied Genetics** 92:15-20. 1996.
- CARANTA, C., LEFEBVRE, V. & PALLOIX, A. Polygenic resistance of pepper to potyviruses consists of a combination of isolate-specific and broad-spectrum quantitative trait loci. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10:872-878. 1997.
- CARRINGTON, J.C., FREED, D.D. & OH, C.-S. Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. **EMBO Journal** 9:1347-1353. 1990.
- CARRINGTON, J.C., KASSCHAU, K.D., MAHAJAN, S.K. & SCHAAD, M.C. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. **Plant Cell** 8:1669-1681. 1996.

- CARVALHO, S.I. C. de; BIANCHETTI, L. de B.; BUSTAMANTE, P.G.; SILVA, D.B. da S. Catálogo de germosplasma de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) da Embrapa Hortaliças. **Brasília: Embrapa Hortaliças**, 2003, 49p. (Documentos 49).
- CARVALHO, S.I.C.; BIANCHETTI, L.B. Pimenta (*Capsicum* spp.): Botânica. Embrapa Hortaliças. Brasília, Nov. 2007. Disponível em http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/botanica.html. Acessado em 29 de março de 2012.
- CASALI, V.W.D. & COUTO, F.A. A origem botânica de *Capsicum*. **Informe Agropecuário** 10:8-10. 1984.
- COOK, A.A. & ANDERSON, C.W. Inheritance of resistance to potato virus Y derived from two strains of *Capsicum annuum*. **Phytopathology** 50:73-75. 1959.
- COSTA, A.S., ALVES, S. Mosaico do pimentão. **Revista Bragantia**, v.10, p.95-96, Campinas, 1950.
- CLARK, M.F., ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v. 34, p. 475-438, 1977.
- DOGIMONT, C., PALLOIX, A., DAUBZE, A.M., MARCHOUX, G., GEBRE-SELASSIE, K. & POCHARD, E. Genetic analysis of broad spectrum resistance to potyvirus using doubled haploid lines of pepper (*Capsicum annuum* L.). **Euphytica** 88:231-239. 1996.
- DOLJA, V.V., HALDEMAN CAHILL, R., MONTGOMERY, A.E., VANDENBOSCH, K.A. & CARRINGTON, J.C. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. **Virology** 206:1007-1016. 1995.
- DOMIER, L.L., SHAW, J.G. & RHODES, R.E. Potyviral proteins share amino acid sequence homology with picorna-, como-, and caulomoviral proteins. **Virology** 158:20-27. 1987.
- EMBRAPA - II Encontro Nacional do Agronegócio Pimentas, realizado em Brasília, em dezembro de 2006. Disponível em: www.embrapa.br. - Acesso em Maio/2012.
- EMBRAPA HORTALIÇAS. Sistemas de Produção, Pimenta (*Capsicum* spp.). Versão Eletrônica Nov./2007.
- EMBRAPA, 2008. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2008/marco/4a-semana/pimentas-sabor-comsaude/?searchterm=pimenta>. Acesso em: maio/2012.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies with a molecular clock. **Systematic Zoology** 34:783-791. 1985.

- FELTRIN, 2012. Disponível em: <http://www.sementesfeltrin.com.br/produtos-detalle-pimenta-tekila-bode-vermelha>. Acesso em: maio/2012.
- FENNER, F. Classification and nomenclature of viruses. Second report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. **Intervirology** 7:1-116. 1976.
- FIGUEIRA, A.R., PINTO, A.C.S. & MORAES, F.H.R. Alta incidência da nova estirpe necrótica do vírus Y da batata está ocorrendo em todos os estados produtores do Brasil. **Revista Fitopatologia Brasileira** 21:425. 1996.
- FILGUEIRA, F.A.R. Novo Manual de Olericultura. **Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de Hortaliças**. Editora UFV, v.2, Universidade Federal de Viçosa; Capítulo 14, p.238-245, 2005.
- HALDEMAN-CAHILL, R., DAROS, J.A. & CARRINGTON, J.C. Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. **Journal of Virology** 72:4072-4079. 1998.
- HENZ, G. P.; RIBEIRO, C. S. C., *Pimentas Capsicum: Mercado e comercialização*. **Brasília: Embrapa Hortaliças**, 2008.
- HULL, R. *Matthew's Plant Virology* (4ª Ed.) Londres, **Inglaterra: Academic Press**. 1001p. 2002.
- INOUE-NAGATA, A. K., FONSECA, M.E.N., RESENDE, R.O.; BOITEUX, L.S.; MONTE, D.C.; DUSI, A.N.; AVILA, A.C. de; VLUGT, R.A.A. van der. Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annuum*. **Archives of Virology**, Vienna, v.147, p.849-855, 2002.
- KRAUSE-SAKATE, R., MELLO, R.N., ZAMBOLIM, E.M., PAVAN, M.A., CARVALHO, M.G., LE GALL, O. & ZERBINI, F.M. Molecular characterization of two Brazilian isolates of *Lettuce mosaic virus* (LMV) with distinct biological properties. **Revista Fitopatologia Brasileira** 26:153-157. 2001.
- LAÍN, S., RIECHMANN, J.L., MARTIN, M.T. & GARCIA, J.A. Homologous potyvirus and flavivirus proteins belonging to a superfamily of helicase-like proteins. **Gene** 82:357-362. 1989.
- LANE, L.C. A general method for detecting plant viruses. pp.3-17 In: MARAMOROSCH, K. (Ed.) *Plant diseases of viral, viroid, mycoplasma and uncertain origin*. **New Delhi: Oxford & IBH Publishing**. 1992.
- LANGENBERG, W.G. & ZHANG, L. Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. **Journal of Structural Biology** 118:243-247. 1997.
- LELLIS, A.D., KASSCHAU, K.D., WHITHAM, S.A. & CARRINGTON, J.C. Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. **Current Biology** 12:1046-1051. 2002.
- LIMA, MF; MELO, W.F.; VALE, LSR.; MORGADO, HS; INOUE-NAGATA,K.; REIFSCHNEIDER, FJB. Detecção e incidência de vírus em 89 acessos de

pimenta (*Capsicum* spp.) no Município de Ceres, Goiás. 2010. **Revista Horticultura Brasileira** 28: S1187-S1194.

MAHAJAN, S., DOLJA, V.V. & CARRINGTON, J.C. Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: Requirements for the translation process and a cis-active element. **Journal of Virology** 70:4370-4379. 1996.

MAIA, I.G., HAENNI, A.L. & BERNARDI, F. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. **Journal of General Virology** 77:1335-1341. 1996.

MOURA, M. F. **Variabilidade de potyvirus infectando *Capsicum* spp. no Estado de São Paulo.** 1ª Ed. BOTUCATU – SP.2009. 76p.

MURPHY, J.F., JARLFORS, U. & SHAW, J.G. Development of cylindrical inclusions in potyvirus-infected protoplasts. **Phytopathology** 81:371-374. 1991.

MURPHY, J.F., KLEIN, P.G., HUNT, A.G. & SHAW, J.G. Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. **Virology** 220:535-538. 1996.

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

NAGAI, H. Pimentão, pimenta doce e pimentas. pp.276-294 In: FURLANI, A.M.C. & VIEGAS, G.P. (Eds.) **O melhoramento de plantas no Instituto Agrônomo. Campinas**, São Paulo: Instituto Agrônomo de Campinas. 1983.

NASCIMENTO, A. V. S.; SANTANA, E. N.; BRAZ, A.S.K. *et al* Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. **Archives of virology**, v. 151, n. 9, p. 1797-809, 2006.

OLIVEIRA, A.B.; SILVA, A.M.; LOPES, C.A.; RIBEIRO, C.S.C.; LOPES, D.; CRUZ, D.M.R.; MARQUES, D.M.C.; FRANÇA, F.H.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; BUSO, G.S.C.; BIANCHETTI, L.B.; FERREIRA, M.E., POZZOBON, M.T.; RESENDE, R.O.; CARVALHO, S.I.C.; PINHEIRO, V.L.; CASALI, V.W.D. ***Capsicum*: pimentas e pimentões no Brasil**. EMBRAPA: CNPH, Brasília-DF, 2000. 113 p. IN: SANTOS, P. V. Reação de acessos de pimenteiros (*Capsicum* spp.) a *Meloidogyne incognita* RAÇA 3. 2008.

PLISSON, C., DRUCKER, M., BLANC, S., GERMAN-RETANA, S., LE GALL, O., THOMAS, D. & BRON, P. Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. **Journal of Biological Chemistry** 278:23753-23761. 2003.

PSCI, **Programa de Substituição Competitiva de Importações. Perfil de produto: o mercado brasileiro para pimentas e pimentões secos, triturados ou em pó originários do Peru.** 2008.

REIFSCHNEIDER, F.J.B. (Org.) ***Capsicum*: pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia / Embrapa Hortaliças, 2000. 113 p.

- RESTREPO-HARTWIG, M.A. & CARRINGTON, J.C. The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. **Journal of Virology** 68:2388-2397. 1994.
- RIBEIRO, C. S. C.; CRUZ, D. M. R. Tendências de mercado. **Revista Cultivar Hortalças e Frutas**. ed. 14. junho/julho de 2002. – *DF*.
- ROBAGLIA, C., DURAND-TARDIF, M., TRONCET, M., BOUDAZIN, G., ASTIER-MANIFACIER, S. & CASSE-DELBART, F. Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA. **Journal of General Virology** 70:935-947. 1989.
- RODRIGUEZ-CEREZO, E. & SHAW, J.G. Two newly detected nonstructural viral proteins in potyvirus-infected cells. **Virology** 185:572-579. 1991.
- RODRIGUEZ-CEREZO, E., AMMAR, E.D., PIRONE, T.P. & SHAW, J.G. Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. **Journal of General Virology** 74:1945-1949. 1993.
- ROJAS, M.R., ZERBINI, F.M., ALLISON, R.F., GILBERTSON, R.L. & LUCAS, W.J. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. **Virology** 237:283-295. 1997.
- SANTOS, V. C. **Caracterização da resistência da moranga (*Curcubita máxima*) “Exposição” ao Zucchini lethal chlorosis vírus (ZLCV) e da não interferência de dois potyvirus na resistência das plantas**. Piracicaba. 2011, 57 p. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2011.
- SCHAAD, M.C., JENSEN, P.E. & CARRINGTON, J.C. Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. **EMBO Journal** 16:4049-4059. 1997.
- SHUKLA, D.D., WARD, C.W. & BRUNT, A.A. The Potyviridae. Wallingford, UK: **CAB International**. 516 p. 1994.
- SIMÓN-BUELA, L., GUO, H.S. & GARCÍA, J.A. Cap-independent *leaky scanning* as the mechanism of translation initiation of a plant viral genomic RNA. **Journal of General Virology** 78:2691-2699. 1997.
- STANGARLIN, O.S., SALATI, R. & REZENDE, J.A.M. Incidência de viroses em pimentões nas regiões de Piedade e Piracicaba, SP e de São Joaquim de Bicas, MG. **Revista Fitopatologia Brasileira** 26:2001.
- TRUTA, A.A.C., SOUZA, A.R.R., NASCIMENTO, A.V.S., PEREIRA, R.C., PINTO, C.M.F., BROMMONSCHENKEL, S.H., CARVALHO, M.G. & ZERBINI, F.M. Identidade e propriedades de isolados de *Potyvirus* provenientes de *Capsicum* spp. **Revista Fitopatologia Brasileira** 29:160-168. 2004.
- VERCHOT, J. & CARRINGTON, J.C. Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modifications. **Journal of Virology** 69:1582-1590. 1995.

VERCHOT, J., KOONIN, E.V. & CARRINGTON, J.C. The 35 kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as the third viral-encoded proteinase. **Virology** 190:527-535. 1991.

ZERBINI, F.M. & ZAMBOLIM, E.M. A família Potyviridae. **Revisão Anual de Patologia de Plantas** 7:1-66. 1999.