

# Identidade e Propriedades de Isolados de Potyvirus Provenientes de *Capsicum* spp.\*

Adriana A.C. Truta<sup>1</sup>, Ana R. R. e Souza<sup>1</sup>, Ana V. S. do Nascimento<sup>1</sup>, Rita de Cássia Pereira<sup>1</sup>, Cleide M.F. Pinto<sup>2</sup>, Sérgio H. Brommonschenkel<sup>1</sup>, Murilo G. de Carvalho<sup>1</sup> & F. Murilo Zerbini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, CEP 36570-000;

<sup>2</sup>EPAMIG, Centro Tecnológico da Zona da Mata, Vila Gianneti 46, Viçosa, MG, CEP 36570-000, e-mail: zerbini@ufv.br

(Aceito para publicação em 01/12/2003)

Autor para correspondência: F. Murilo Zerbini

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. Fitopatologia Brasileira 29:160-168. 2004.

## RESUMO

Vinte isolados virais provenientes de *Capsicum* spp. foram coletados em Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Rio de Janeiro visando definir a etiologia dos mosaicos. Para a caracterização biológica realizou-se teste de gama de hospedeiros e inoculação em cultivares diferenciadoras de pimentão (*Capsicum annuum*). Dois isolados provenientes de batata (*Solanum tuberosum*) (PVY<sup>N</sup>-BR e PVY<sup>O</sup>-BR) foram utilizados como controles. Os resultados indicaram considerável grau de variabilidade biológica entre os isolados, embora todos tenham sido identificados preliminarmente como *Potato virus Y* (PVY). A reação das cultivares diferenciadoras classificou os isolados como patótipo 1 ou 1.2 de PVY. Anti-soros foram produzidos a partir de partículas virais purificadas de um isolado fraco e um forte. O uso desses anti-soros em ELISA indireto levou a resultados positivos contra os isolados testados. Os anti-soros reagiram também contra PVY<sup>N</sup>-

BR e PVY<sup>O</sup>-BR, embora este último tenha apresentado reação mais fraca. Para caracterização molecular, seqüenciaram-se os genes da polimerase (*Nib*) e da proteína capsial (*cp*), e da região 3' não-traduzida (3'NTR) de isolados biologicamente distintos. A análise filogenética confirmou a identidade de seis isolados como Pepper yellow mosaic virus (PepYMV), um potyvirus descrito recentemente infectando pimentão no Brasil. Esse resultado sugere que o PepYMV pode ser a espécie de potyvirus predominante em *Capsicum* spp. no Brasil. O fato de isolados de PepYMV apresentarem gama de hospedeiros semelhante à do PVY, e de os dois vírus apresentarem relacionamento sorológico, ressalta a utilidade da análise molecular para a classificação de potyvirus provenientes de *Capsicum* spp.

**Palavras-chave adicionais:** pimentão, pimenta, PVY, PepYMV, caracterização biológica, sorologia, análise filogenética, proteína capsial.

## ABSTRACT

**Identity and properties of potyvirus isolates obtained from *Capsicum* spp.**

Twenty isolates were obtained from *Capsicum* spp. plants in the states of Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo and Rio de Janeiro. The isolates were biologically characterized using a host range assay and inoculation into a series of differential sweetpepper (*Capsicum annuum*) cultivars. Two isolates from potato (*Solanum tuberosum*) (PVY<sup>N</sup>-BR e PVY<sup>O</sup>-BR) were used as controls. The isolates displayed a high degree of biological variability, although they were all preliminarily identified as *Potato virus Y* (PVY). The reaction in the differential cultivars enabled the classification of the isolates as pathotypes 1 or 1.2 of PVY. The production of antiserum was carried out using purified virions of one mild and one severe isolate. Using these antisera in indirect ELISA, positive

reactions against all the isolates were observed. The antisera also reacted against PVY<sup>N</sup>-BR and PVY<sup>O</sup>-BR, although the latter reacted weakly. For molecular characterization, the polymerase (*Nib*) and capsid protein (*cp*) genes and the 3' non-translated region (3'NTR) of biologically distinct isolates were cloned and sequenced. Phylogenetic analysis confirmed the identity of six isolates as Pepper yellow mosaic virus (PepYMV), a potyvirus recently described infecting sweet pepper (*Capsicum annuum*) in Brazil. This result suggests that PepYMV could be the predominant potyvirus causing mosaic in *Capsicum* species in Brazil. Since PepYMV isolates have host ranges similar to PVY (including the reaction in differential cultivars), and the two viruses cross-react serologically, the usefulness of the molecular analysis is demonstrated in the identification of potyviruses from *Capsicum* spp.

## INTRODUÇÃO

Existem diversos relatos de vírus ocorrendo em pimentão (*Capsicum annuum* L.) e pimenta (*C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq. e *C. frutescens* L.) 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, 1996; Caranta & Palloix, 1996; Dogimont *et al.*, 1996; Caranta *et al.*, 1997; Inoue-Nagata *et al.*, 2002). No Brasil, o PVY foi relatado pela primeira vez em 1941 em batata (*Solanum tuberosum* L.) (Nóbrega & Silberschmidt, 1944), e apenas a partir de 1950

\*Parte da tese de Doutorado da primeira autora. universidade Federal de Viçosa (2002).

em pimentão, já causando sérios prejuízos (Costa & Alves, 1950). As perdas causadas por essa virose no campo levaram Nagai (1968) a iniciar um programa de melhoramento de pimentão visando à incorporação de genes de resistência ao mosaico causado pelo PVY, dando origem à série de cultivares “Agrônômico”. A resistência ao PVY introduzida na série Agrônômico mostrou-se bastante eficiente, conseguindo impedir a disseminação de todas as estirpes do vírus então presentes no Brasil. No entanto, um aumento significativo da incidência de mosaico vem sendo observado em campos de pimentão e pimenta nos últimos anos, sugerindo a emergência de novas estirpes do vírus, ou a presença de outros potyvírus que não o PVY. Até há pouco tempo o único potyvírus relatado em espécies de *Capsicum* no Brasil era o PVY (Nagai, 1983; Boiteux & Pessoa, 1994; Brioso, 1996; Brioso *et al.*, 1996). Em 2002, Inoue-Nagata *et al.* (2002) relataram a ocorrência de uma nova espécie de potyvírus causando mosaico amarelo e distorção foliar em pimentão. Anteriormente considerada uma estirpe severa do PVY (PVY<sup>M</sup>), essa nova espécie foi denominada Pepper yellow mosaic virus (PePYMV). Curiosamente, não existem, até o momento, dados de seqüência de nucleotídeos de isolados brasileiros de PVY que infetem espécies de *Capsicum*.

Neste trabalho estudou-se a etiologia do mosaico em pimentão e pimenta na região Sudeste do Brasil, por meio da caracterização biológica de isolados de potyvírus coletados no campo, produção de anti-soros específicos para isolados representativos, seqüenciamento dos genes *nib* (replicase) e *cp* (proteína capsidial) de isolados biologicamente distintos e comparação das seqüências obtidas com as seqüências de outros potyvírus disponíveis em banco de dados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção e manutenção dos isolados virais

Os isolados virais foram obtidos em campos de produção de pimentão e pimenta localizados nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo, coletando-se plantas com sintomas de mosaico e deformação foliar. Para descartar plantas infetadas pelo *Tobacco mosaic virus* (TMV) gênero *Tobamovirus*; *Cucumber mosaic virus* (CMV) família *Bromoviridae*, gênero *Cucumovirus*; *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) família *Bunyaviridae*, gênero *Tospovirus* e *Potato virus X* (PVX) gênero *Potexvirus*, todos os isolados foram inoculados inicialmente em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L. ‘TNN’), abobrinha (*Cucurbita pepo* L. ‘Caserta’), tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. ‘Rutgers’) e *Datura stramonium* L. A inoculação foi realizada via extrato vegetal tamponado em fostato de sódio 0,01 M, pH 7,2, contendo sulfito de sódio a 0,1% e utilizando óxido de alumínio (600 mesh) como abrasivo. Dessa forma foram obtidos 20 isolados (Tabela 1), que foram mantidos em plantas de *Nicotiana debneyi* Domin. por meio de inoculações sucessivas via extrato vegetal tamponado conforme descrito anteriormente. Dois isolados de PVY provenientes de batata (PVY<sup>N</sup>-BR e PVY<sup>O</sup>-BR, números de acesso no GenBank

AF225660 e AF225659, respectivamente) foram utilizados como controle no decorrer de todos os experimentos.

### Caracterização biológica

A gama de hospedeiros dos isolados virais foi testada por meio de inoculação de plantas de dez espécies vegetais, selecionadas com base em dados de literatura (Brunt *et al.*, 1997): 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. As plantas, quinze dias após emergência, foram inoculadas via extrato vegetal tamponado conforme descrito anteriormente, e reinoculadas três dias após a primeira inoculação. Os isolados PVY<sup>N</sup>-BR e PVY<sup>O</sup>-BR (Tabela 1) foram utilizados como controles. Foram inoculadas oito plantas de cada espécie por isolado, e duas plantas de cada espécie foram inoculadas apenas com solução tampão. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e avaliadas visualmente para o surgimento de sintomas, 30 dias após a inoculação. Plantas assintomáticas foram testadas por Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) indireto (Van Regenmortel & Burckard, 1980) com o objetivo de detectar infecções latentes. O experimento foi repetido duas vezes.

Isolados biologicamente distintos foram inoculados via extrato vegetal tamponado, conforme descrito anteriormente, em cultivares diferenciadoras de pimentão contendo genes de resistência conhecidos. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e avaliadas visualmente para o surgimento de sintomas, 30 dias após a inoculação.

TABELA 1 - Origem dos isolados virais utilizados neste estudo

Isolado	Hospedeiro	Procedência
1	<i>Capsicum baccatum</i>	Leopoldina, MG
2	<i>C. annuum</i>	Igarapé, MG
3	<i>C. annuum</i>	Igarapé, MG
4	<i>C. annuum</i>	Guidoval, MG
7	<i>C. annuum</i>	Guidoval, MG
8	<i>C. baccatum</i>	Guarani, MG
9	<i>C. annuum</i>	Venda Nova do Imigrante, ES
10	<i>C. frutescens</i>	Guarani, MG
11	<i>C. baccatum</i>	Guarani, MG
12	<i>C. chinense</i>	Montes Claros, MG
13	<i>C. frutescens</i>	Guarani, MG
14	<i>C. frutescens</i>	Guarani, MG
15	<i>C. frutescens</i>	Guarani, MG
16	<i>C. frutescens</i>	Guarani, MG
17	<i>C. frutescens</i>	Guarani, MG
18	<i>C. annuum</i>	Ribeirão Vermelho, MG
19	<i>C. annuum</i>	Itumirim, MG
20	<i>C. annuum</i>	Vala o do Barro, RJ
21	<i>C. annuum</i>	Viçosa, MG
22	<i>C. annuum</i>	Bragança Paulista, SP
PVY <sup>N</sup> -BR	<i>Solanum tuberosum</i>	Lavras, MG
PVY <sup>O</sup> -BR	<i>S. tuberosum</i>	Lavras, MG

## Produção de anti-soro

A produção de anti-soro foi realizada utilizando-se como imunógeno partículas virais purificadas dos isolados biologicamente distintos 1 e 3. Os isolados foram purificados a partir de folhas de *N. debneyi* apresentando sintomas de mosaico, colhidas entre 15 e 21 dias após a inoculação, utilizando-se o método de Carvalho & Shepherd (1983). O vírus purificado foi injetado em coelhos brancos da raça Nova Zelândia com aproximadamente 30 dias de idade (dois coelhos para cada isolado viral). Após a coleta de sangue para obtenção do soro normal (pré-imune), foi realizada uma injeção intravenosa de 100 µg de partículas virais em solução salina. Em seguida foram efetuadas seis injeções intramusculares (100, 100, 250, 250, 500 e 500 µg) a intervalos semanais. Para as injeções intramusculares a preparação viral foi emulsificada em volume igual de adjuvante incompleto de Freund. Foram realizadas seis coletas de sangue com intervalo de uma semana entre cada coleta.

O relacionamento sorológico entre os isolados foi avaliado por ELISA indireto (Van Regenmortel & Burckard, 1980) utilizando-se os dois anti-soros produzidos e um anti-soro específico para PVY<sup>N</sup> (produzido na UFV por M.G. Carvalho). A reação foi avaliada 20 minutos após a adição do substrato em uma leitora Titertek Multiskan Plus MK II, a 405 nm.

## Caracterização molecular

Preparações concentradas foram obtidas a partir de folhas de *N. debneyi* infetadas com os isolados virais aos 21 dias após a inoculação, de acordo com o método descrito por Lane (1992). O RNA viral foi extraído a partir de 200 µl da preparação viral concentrada, conforme descrito por Krause-Sakate *et al.* (2001). O RNA viral foi utilizado como molde para a síntese de uma fita de DNA complementar (cDNA), utilizando-se o “Superscript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis” (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Para a síntese de cDNA foi utilizado um oligonucleotídeo contendo uma seqüência de bases timina (poli-T: 5'-G-G-A-C-T-G-G-A-T-C-C-T<sub>14</sub>-3', sítio de *Bam*H I sublinhado). Para a amplificação dos genes da replicase viral (*NIb*) e da proteína capsidial (*cp*) e da região 3' não-traduzida (3'NTR) via PCR, o oligonucleotídeo poli-T foi utilizado em conjunto com um oligonucleotídeo universal para o gênero *Potyvirus* (poty 4: 5'-G-C-G-G-G-A-T-C-C-G-T-N-T-G-Y-G-T-N-G-A-Y-G-A-Y-T-T-T-Y-A-A-Y-A-A-3', sítio de *Bam*H I sublinhado). As condições de RT-PCR foram as mesmas descritas por Krause-Sakate *et al.* (2001). Uma alíquota de 5 µl foi utilizada para análise dos produtos de amplificação por meio de eletroforese em gel de agarose (0,9%).

Os produtos de amplificação via PCR correspondentes aos genes *NIb* e *cp* e à 3'NTR dos isolados 1, 2, 3, 4, 7 e 19 foram clonados no plasmídeo vetor pGEM-T-Easy (Promega), utilizando-se procedimentos padrão (Sambrook *et al.*, 1989). Os fragmentos clonados foram parcialmente seqüenciados utilizando-se o kit “BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Perkin Elmer), conforme as instruções do

fabricante, e um seqüenciador automático ABI 310 (Applied Biosystems).

As seqüências de aminoácidos parciais das proteínas *NIb* e *CP*, e de nucleotídeos da 3'NTR foram comparadas com outras seqüências virais depositadas no GenBank utilizando o algoritmo BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). Árvores filogenéticas foram obtidas com o programa MEGA, versão 2.1 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)), a partir de alinhamento múltiplo realizado com o programa Clustal W ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)). No caso de seqüências de aminoácidos, a árvore filogenética foi obtida pelo método de “neighbour-joining”, enquanto para seqüências de nucleotídeos utilizou-se o UPGMA. Em ambos os casos utilizou-se correção por Poisson. Os ramos das árvores foram testados por “bootstrap”, com 2.000 repetições.

## RESULTADOS

### Caracterização biológica

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 potyvírus que infetam o pimentão e a pimenta, como PepMoV e TEV. Nenhum isolado causou necrose em pimenta ‘Malagueta’, sintoma característico de PepMoV nessa hospedeira. Da mesma forma não infetaram *D. stramonium*, espécie indicadora do TEV. Os isolados 9 e 16 causaram infecção latente em batata, e o isolado 2 causou infecção com sintomas de mosaico nessa hospedeira (Tabela 2). Os demais isolados não infetaram a batata.

Doze isolados causaram anéis necróticos nas folhas inoculadas e mosaico em *N. physaloides* (Tabela 2). No caso dos isolados 3, 18, 19 e 21 o sintoma local evoluiu para necrose de nervuras nas folhas não inoculadas. O isolado 7 induziu sintoma de pontuações necróticas nessa hospedeira, mas não em forma de anel conforme observado para os demais isolados. Essas pontuações necróticas evoluíram rapidamente para uma necrose sistêmica bastante severa. Os oito isolados restantes causaram apenas pontuações cloróticas que não evoluíram para necrose nessa hospedeira.

Nove isolados induziram lesão local clorótica nas folhas inoculadas de *C. quinoa* (Tabela 2). Os demais isolados não causaram qualquer sintoma nessa hospedeira.

Um sintoma atípico para infecção por potyvírus, uma necrose branca em forma de anel nas folhas inoculadas de *N. debneyi*, foi induzido por doze isolados (Tabela 2). Dez isolados causaram esse mesmo sintoma em tomateiro, e cinco destes causaram necrose branca nos dois hospedeiros. Nenhum dos isolados causou o sintoma de risca amarela em tomateiro, considerado típico para isolados de PVY.

Foi possível observar, de maneira generalizada, a distinção de três grupos de isolados, causando sintomas fortes, moderados e fracos em várias das espécies hospedeiras utilizadas. Os isolados 3, 7, 19 e 21 foram classificados como severos. Os isolados 1, 2, 4, 8, 18 e 20 como moderados, e os isolados 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 como fracos. O isolado 22 foi incorporado à coleção após a realização do teste

TABELA 2 - Sintomas observados nas espécies hospedeiras infetadas pelos diferentes isolados de potyvirus provenientes de *Capsicum* spp.

ISOLADO	Espécies hospedeiras <sup>a, b</sup>										
	<i>Capsicum annuum</i>	<i>C. frutescens</i>	<i>Chenopodium quinoa</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Nicotiana debneyi</i>	<i>N. tabacum</i> Sa msun	TNN	<i>N. tabacum</i> White Burley	<i>N. tabacum physaloides</i>	<i>Physalis floridana</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
1	-/m	-/ms	llc/-	nb/m	-/m	-/ml	-/cn, ml	/ml, cn	pc,an/ml	-/ma	-/-
2	-/m	-/m	llc/-	-/ml	nb/m	-/ml	-/cn, ml	-/m	pc,an/ml	-/ma	-/m
3	-/ms	-/ms	llc/-	nb/m, cn	nb/ms	-/m, cn	-/m	-/m, cn	pc,an/m, ms	-/ms	-/-
4	-/m	-/m	llc/-	nb/m	nb/m	-/m	-/cn, ml	-/m, cn	pc,an/ml	-/ma	-/-
7	-/ms	-/m	llc/-	nb/ml	nb/ms	-/m	-/m, ml	-/m	pn/m, nn	-/ms	-/-
8	-/m	-/m	-/-	-/m	nb/ml	-/m, cn	-/m	-/m, cn	pc, an/m	-/m	-/-
9	-/ml	/-m	-/-	-/m	nb/m	-/ml	-/ml	-/ml	pc, an/m	-/m	-/c
10	-/ml	-/m	-/-	-/ml	nb/m	-/m	-/m	-/ml	-/ml	-/ml	-/-
11	-/ml	-/m	-/-	nb/m	-/m	-/ml	-/cn, ml	-/ml	-/ml	-/ml	-/-
12	-/ml	-/m	-/-	nb/m	-/m	-/ma	-/cn, ml	-/ma	pc/ml	-/ml	-/-
13	-/ml	-/m	-/-	nb/m	-/m	-/ma	-/cn, ml	-/ma	pc/ml	-/ml	-/-
14	-/ml	-/m	llc/-	-/ml	nb/m	-/m	-/ml	-/m	pc, an/m, cn	-/m	-/-
15	-/ma	-/m	-/-	-/ml	nb/m	-/ml, cn	-/cn, m	-/ml, cn	pc, an/m, cn	-/m	-/-
16	-/ml	-/m	llc/-	-/ml	-/m	-/ml	-/ml	-/ml	pc, an/m, cn	-/m	-/c
17	-/ml	-/m	-/-	nb/ml	-/m	-/ml	-/ml	-/ml	-/m	-/ml	-/-
18	-/ms	-/ms	-/-	-/m	nb/m	-/m	-/cn, ml	-/m	an,nn, m	-/m	-/-
19	-/ms	-/ms	llc/-	-/m	-/m	-/m	-/m	-/m	an,nn, m	-/m	-/-
20	-/m	-/ms	-/-	-/m	-/m	-/ml	-/m	-/ml	pc, an/m	-/m	-/-
21	-/ms	-/m	llc/-	-/m	nb/m	-/m	-/cn, m	-/mb	an/nn, m	-/m	-/-
PVY <sup>N</sup> -BR	-/m	-/m	-/-	nb/m	nb/m	-/ml	-/m	-/m	pc,an/ml	-/ma	-/m
PVY <sup>O</sup> -BR	-/ms	-/ms	-/-	-/m	-/m	-/m	-/m	-/m	pc,an/ml	-/m	-/m

<sup>a</sup> A espécie *Datura stramonium* não foi infetada por nenhum dos isolados.

<sup>b</sup> Os sintomas em folhas inoculadas/não inoculadas, 30 dias após a inoculação, estão representados por: an, anéis necróticos; cn, clareamento das nervuras; lle, lesão local clorótica; m, mosaico; ma, mosaico amarelo; ml, mosaico leve; ms, mosaico severo; nb, necrose branca; nn, necrose de nervuras; pc, pontuações cloróticas; -, ausência de sintomas.

<sup>c</sup> Infecção latente comprovada por ELISA indireto.

de gama de hospedeiros.

A Tabela 3 lista as reações das cultivares diferenciadoras de pimentão à inoculação com os diferentes isolados. É interessante ressaltar que, mesmo antes da confirmação definitiva da identidade dos isolados, os resultados da série diferenciadora permitiram distinguir diferentes patótipos de PVY dentre os isolados coletados. Os isolados 1 e 10 infetaram Bastidon, Yolo Wonder e Yolo Y, o que os classifica como patótipo 1. Os isolados 2, 3, 19 e 22 infetaram Bastidon, Yolo Wonder, Yolo Y e Florida VR2, o que os classifica como patótipo 1.2. As cultivares W4, Criollo de Morellos 334 e Perennial foram resistentes a todos os isolados inoculados.

### Produção de anti-soros

O procedimento adotado para purificação possibilitou a obtenção de vírus purificado em rendimento satisfatório e alto grau de pureza. O rendimento obtido foi de 4,1 mg/kg para o isolado 1 e 2,6 mg de vírus/kg de folhas para o isolado 3 (dados não mostrados). O título e especificidade dos anti-soros obtidos foram avaliados por ELISA indireto. Reações positivas foram obtidas com uma diluição do anti-soro bruto acima de 1:32.000. Nenhuma reação contra extrato de plantas sadias foi detectada. Também não houve reação positiva contra vírus heterólogos como *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Watermelon mosaic virus* (WMV) e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) da família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus* (dados não mostrados).

O relacionamento sorológico entre os 20 isolados de pimentão e pimenta foi avaliado por meio de ELISA indireto, utilizando o anti-soro produzido contra o isolado 3. Alguns isolados também foram testados com o anti-soro produzido contra o isolado 1. Reações positivas foram observadas para todos os isolados com ambos os anti-soros (Tabela 4). Foi observada também reação positiva do isolado PVY<sup>N</sup>-BR contra ambos os anti-soros. O isolado PVY<sup>O</sup>-BR apresentou reação positiva, porém bem mais fraca em relação aos demais isolados e ao PVY<sup>N</sup>-BR (Tabela 4). No teste recíproco utilizando anti-soro para PVY<sup>N</sup>, diversos isolados apresentaram reação positiva, porém bem mais fraca em comparação aos controles (PVY<sup>N</sup>-BR e PVY<sup>O</sup>-BR) (Tabela 4).

### Caracterização molecular

Os RNAs virais extraídos a partir de preparações concentradas foram separados em gel de agarose na forma de uma banda única com aproximadamente 10.000 nucleotídeos (nt), conforme esperado para potyvírus (dados não mostrados). Os oligonucleotídeos utilizados na RT-PCR levaram à amplificação de um fragmento com aproximadamente 2.000 nt (dados não mostrados). Os fragmentos amplificados para os isolados 1, 2, 3, 4, 7 e 20 foram parcialmente seqüenciados. Para os isolados 1, 3 e 4 foram obtidas seqüências parciais da proteína N1b (217, 221 e 224 aminoácidos da região carboxi-terminal, respectivamente), CP (92, 136 e 92 aminoácidos da região carboxi-terminal, respectivamente) e a seqüência completa da região 3'-não traduzida (264, 253 e 260 nucleotídeos, respectivamente). Para os isolados 2, 7 e 20 foram obtidas seqüências parciais da proteína N1b (190, 181 e 83 aminoácidos da região central, respectivamente). Os resultados indicaram identidade das seqüências de aminoácidos da CP dos isolados 1, 3 e 4 em torno de 84% com PVY, e acima de 95% com PepYMV. Esse resultado identifica os isolados 1, 3, e 4 como pertencentes à espécie *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). Para os isolados 2, 7 e 20 os resultados indicaram identidade das seqüências de aminoácidos da N1b em torno de 90% com PVY, e acima de 98% com os isolados 1, 3 e 4, o que também permite inferir que estes isolados pertencem à espécie PepYMV. A região seqüenciada para os isolados 2, 7 e 20 não apresenta sobreposição com a seqüência correspondente do isolado original de PepYMV disponível no GenBank (AF348610), e portanto não foi possível determinar o nível de identidade entre essas seqüências.

A árvore filogenética obtida com base nas seqüências de aminoácidos da proteína capsidial confirmou a identidade dos isolados 1, 3 e 4 como PepYMV. Esses isolados se agruparam com o isolado original de PepYMV, formando um ramo distinto da árvore com 98% de confiabilidade na análise de *bootstrap* (Figura 1).

## DISCUSSÃO

Isolados de potyvírus provenientes de pimenta e

**TABELA 3** - Reação de cultivares diferenciadoras de pimentão (*Capsicum annum*) à inoculação com os isolados de potyvírus provenientes de *Capsicum* spp.

ISOLADO	Cultivares de pimentão diferenciadoras							Patótipo
	Bastidon	Yolo Wonder	Yolo Y	Florida VR2	W4	CM 334	Perennial	
1	ml <sup>a</sup>	ml	m	-	-	-	-	1
2	ml	ms, ep	ms, ep	ms	-	-	-	1.2
3	mb, ep	ms	ms	ms	-	-	-	1.2
10	ml	ml	ml	-	-	-	-	1
19	ml	ms	ms	ms	-	-	-	1.2
22	ms, ep	ms, ep	ms, ep	ms, ep	-	-	-	1.2
PVY <sup>N</sup> -BR	ml	m	ml	-	-	-	-	1
PVY <sup>O</sup> -BR	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Sintomas em folhas não inoculadas, 30 dias após a inoculação: ep, epinastia; m, mosaico; mb, mosaico bolhoso; ml, mosaico leve; ms, mosaico severo; -, ausência de sintomas.

**TABELA 4** - Valores médios de absorvância a 405 nm obtidos em ELISA indireto utilizando anti-soro produzido a partir dos isolados 1 e 3, e anti-soro produzido a partir de um isolado de *Potato virus Y* (PVY<sup>N</sup>). Valores superiores a duas vezes o valor obtido para a planta sadia (entre parênteses) são considerados positivos. n.t., não testado

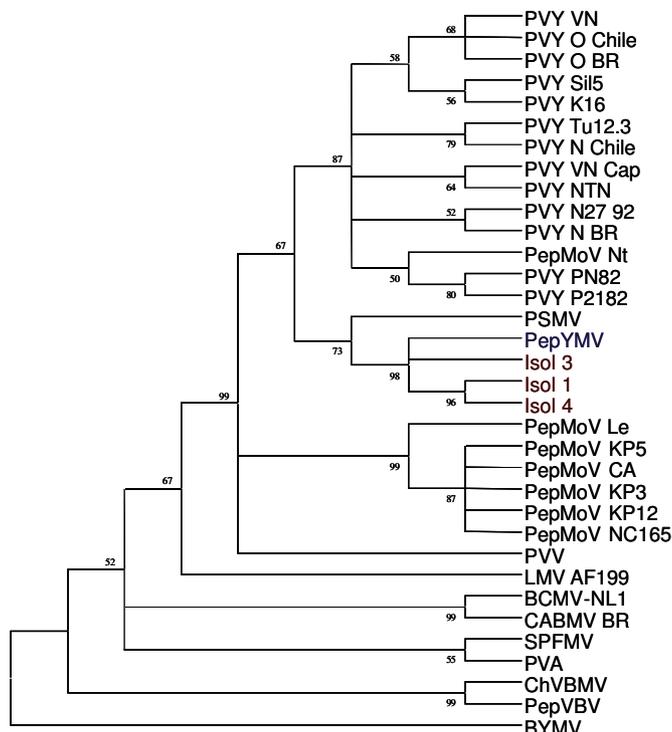
ISOLADO	A <sub>450</sub>		
	AS-1	AS-3	AS-PVY <sup>N</sup>
Planta sadia	0,078 (2x = 0,156)	0,114 (2x = 0,228)	0,138 (2x = 0,276)
1	0,871	0,987	0,391
2	0,845	0,928	0,325
3	0,745	1,187	0,387
4	n.t.*	0,932	n.t.
7	n.t.	1,121	n.t.
8	n.t.	1,065	n.t.
9	n.t.	1,004	n.t.
10	0,924	1,186	0,385
11	n.t.	0,833	n.t.
12	n.t.	0,947	n.t.
13	n.t.	1,032	n.t.
14	n.t.	0,890	n.t.
15	n.t.	0,932	n.t.
16	n.t.	1,063	n.t.
17	n.t.	0,982	n.t.
18	n.t.	0,813	n.t.
19	0,796	1,050	0,372
20	n.t.	0,973	n.t.
21	n.t.	1,021	n.t.
22	0,523	0,639	0,291
PVY <sup>N</sup> -BR	0,801	1,006	0,945
PVY <sup>O</sup> -BR	0,234	0,401	0,838

\* nt = não testado

pimentão foram caracterizados biologicamente, especialmente em comparação com isolados de PVY provenientes de batata. No teste de gama de hospedeiros, pimentão e batata não se comportaram como hospedeiros diferenciais, uma vez que os dois isolados de batata utilizados como controle (PVY<sup>N</sup>-BR e PVY<sup>O</sup>-BR) infetaram pimentão, e três dos isolados analisados foram capazes de infetar sistemicamente batata. Destes, os isolados 9 e 16 causaram infecção latente, porém o isolado 2 induziu sintomas de mosaico.

Não foi observada correlação entre a severidade do isolado e o hospedeiro a partir do qual ele foi obtido. Entretanto, deve-se ressaltar que os isolados mais severos (3, 7 e 19) foram obtidos de pimentão. O isolado 1, obtido de pimenta, causa um mosaico severo em *C. frutescens* mas apenas mosaico em pimentão. Já o isolado 3 causou sintomas severos nos dois hospedeiros. Todos os isolados que causaram pontuações necróticas seguidas de necrose sistêmica em *N. physaloides* provieram de pimentão. Já os que foram capazes de infetar batata tiveram origem tanto de pimentão quanto de pimenta.

*Chenopodium quinoa* é citada na literatura como uma planta indicadora de lesão local para PVY (De Bokx &



**FIG. 1** - Árvore filogenética obtida com base em alinhamento múltiplo das seqüências completas de aminoácidos da proteína capsidial de espécies de potyvírus, e dos isolados virais 1, 3 e 4 provenientes de *Capsicum*. Os números em cada ramo correspondem ao valor de *bootstrap* (2000 repetições). *Bean common mosaic virus*, número de acesso no GenBank S66251 (BCMV-NL1); *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), S77515; *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV-BR), AF241233; *Chili vein banding mottle virus* (ChVBMV), U72193; *Lettuce mosaic virus* (LMV-AF199), AJ278854; *Pepper mottle virus* (PepMoV-CA), M96425; PepMoV-NC165, AF227728; PepMoV-Nt, M11598; PepMoV-Le, AF440801; PepMoV-KP3, AB084486; PepMoV-KP5, AB084487; PepMoV-KP12, AB084485; *Pepper vein banding virus* (PepVBV), AJ237843; *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), AF348610; *Pepper severe mosaic virus* (PSMV), X66027; *Potato virus A* (PVA), Z21670; *Potato virus Y* (PVY<sup>O</sup>-BR), AF255659; PVY<sup>O</sup>-Chile, X68226; PVY<sup>N</sup>-BR, AF225660; PVY<sup>N</sup>-Chile, X68221; PVY<sup>NTN</sup>, X79305; PVY-Si15, AJ303093; PVY-K16.94, AJ303094; PVY-Tu12.3, AJ303095; PVY-PN82, AJ303096; PVY-P2182, AJ303097; PVY-VN, U06789; PVYN-27-92, U09508; *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV), D16664.

Huttinga, 1981; Shukla *et al.*, 1994). Entretanto, apenas nove isolados (1, 2, 3, 4, 7, 14, 16, 19 e 21) induziram lesão local clorótica neste hospedeiro. Os demais isolados não induziram qualquer sintoma. Os isolados que causaram lesão local em *C. quinoa* são provenientes tanto de pimenta quanto de pimentão, e causam sintomas severos, moderados ou fracos, indicando que a agressividade do isolado não foi fator determinante para indução desse sintoma em *C. quinoa*. Romancer *et al.* (1994) encontraram resultados semelhantes estudando isolados de batata pertencentes à estirpe PVY<sup>NTN</sup>. Isolados dessa estirpe não infetaram *C. quinoa*, porém infetaram *C. annuum*.

Apesar de os resultados da gama de hospedeiros serem por si só insuficientes para uma adequada classificação dos isolados, estes podem constituir-se em um componente essencial da classificação, pois diferenças biológicas como severidade e indução de necrose, dentre outras, são informações relevantes na distinção de grupos de isolados. Por exemplo, os isolados 1 e 3 apresentam diferenças biológicas significativas. O isolado 1 é proveniente de pimenta e induziu sintomas mais severos nessa hospedeira do que em pimentão. Esse isolado induziu a formação de anéis necróticos nas folhas inoculadas de *N. physaloides*, mas não induziu necrose sistêmica nessa indicadora, e causou necrose branca apenas em tomateiro. O isolado 3 é proveniente de pimentão, e induziu sintomas severos tanto em pimentão quanto em pimenta. Esse isolado causou anéis necróticos nas folhas inoculadas de *N. physaloides* que evoluíram para necrose sistêmica, e causou necrose branca em *N. debneyi* e em tomateiro.

A resposta de cultivares diferenciadoras de pimentão à inoculação com os diferentes isolados permitiu classificá-los nos patótipos 1 e 1.2 de PVY, mesmo antes da confirmação definitiva da identidade de alguns isolados como PepYMV por meio da caracterização molecular. Nenhum isolado foi classificado como patótipo 0. As cultivares brasileiras Avelar, Casca Dura, Ikeda e Moura pertencem ao grupo da cultivar Yolo Y, que possui o gene de resistência *pvr2<sup>1</sup>*, portanto resistentes ao patótipo 0 (Gebre-Selassie *et al.*, 1985). Esse é provavelmente o motivo pelo qual esse patótipo não foi detectado, uma vez que a maioria das cultivares utilizadas no Brasil atualmente possui uma ou mais destas cultivares como progenitores (Nagai, 1983). Na França, Itália e Espanha o patótipo mais encontrado é o 0 (Caranta *et al.*, 1999). Nenhum dos isolados em estudo foi capaz de infetar a cv. Perennial. Essa cultivar possui uma resistência complexa (Caranta & Palloix, 1996), não desenvolvendo nenhum sintoma após a inoculação com quaisquer dos três patótipos de PVY, ou com outros potyvírus que infetam pimentão, como TEV, PVMV e ChiVMV.

No Brasil, trabalhos desenvolvidos por Boiteux *et al.* (1996), classificaram um isolado severo de PVY proveniente de *Capsicum* spp., denominado PVY<sup>M</sup>, como patótipo 1.2. Esse isolado foi recentemente reclassificado como PepYMV (Inoue-Nagata *et al.*, 2002). Da mesma forma, a classificação em patótipos foi possível mesmo para os isolados classificados aqui como PepYMV (1, 2, 3, 4, 7 e 20), indicando que os genes de resistência presentes nas cultivares diferenciadoras são eficientes contra essa espécie de potyvírus.

Uma característica peculiar dos genes controlando a resistência a potyvírus em diferentes espécies de plantas é que, em espécies infetadas por mais de um potyvírus, como o pimentão e o tomateiro, o mesmo *locus* freqüentemente confere resistência a diferentes espécies. Diversos genes de resistência que mostram resposta a mais de uma espécie de potyvírus tem sido identificados em pimentão (Cook & Anderson, 1959; Palloix & Kyle, 1995; Dogimont *et al.*, 1996; Caranta *et al.*, 1997). O fato da série diferenciadora aos isolados de PVY ter diferenciado adequadamente o PepYMV reforça o amplo

espectro da resistência proporcionada pelos genes existentes nessas cultivares.

Um dos fatores que podem explicar a diversidade genética de isolados de potyvírus é a provável evolução de patótipos influenciada pelo plantio de cultivares resistentes. A prevalência de um determinado patótipo em uma região deve interferir nessa estratégia de controle, pois certas práticas podem acelerar ou facilitar a evolução dos patótipos (Gebre-Selassie *et al.*, 1985). Esses autores sugerem que isolados de PVY infetando pimentão a partir de 1972 são provenientes de contaminações com isolados de batata. A especificidade do hospedeiro é um importante critério para a diferenciação em estirpes, consistindo em um fator importante para a evolução dos potyvírus (Romero *et al.*, 2001).

Em ELISA indireto, os anti-soros policlonais produzidos contra os isolados 1 e 3 foram capazes de identificar os dois isolados de PVY, embora a reação com PVY<sup>O</sup> tenha sido bem mais fraca em comparação ao PVY<sup>N</sup>. Os isolados 1 e 3 foram identificados como PepYMV pela análise molecular, e o fato dos anti-soros produzidos contra esses isolados detectarem todos os isolados da coleção sugere a existência de relacionamento sorológico entre o PepYMV e o PVY. Deve-se ressaltar que o isolado 22 foi detectado pelos anti-soros produzidos contra os isolados 1 e 3, porém apresentou valores de absorvância inferiores em relação aos demais isolados, sugerindo um relacionamento sorológico distante entre esse isolado e os demais.

Os isolados 1, 2, 3, 4, 7 e 20 foram identificados como PepYMV com base nas seqüências de aminoácidos das proteínas NIB e CP. Esse resultado indica que essa nova espécie viral já se encontra disseminada no estado de Minas Gerais, e é responsável pela severidade dos sintomas e pelas perdas na produção observadas na cultura.

O PepYMV foi descrito recentemente (Inoue-Nagata *et al.*, 2002), mas foi possível detectar variabilidade entre isolados, conforme discutido anteriormente: o isolado 1 é biologicamente distinto do isolado 3. A análise filogenética indica que o PepYMV, *Pepper severe mosaic virus* (PSMV) e PVY possuem um ancestral em comum, pois esses três vírus se agrupam em um ramo com 67% de confiabilidade na análise de *bootstrap* (Figura 1). Semelhante ao PepMoV, o PepYMV também pode fazer parte de um complexo viral que causa mosaico em espécies de *Capsicum*. Situação semelhante foi descrita por Berger *et al.* (1997), que ao estudar as características moleculares dos sorogrupos A e B do potyvírus *Bean common mosaic virus* (BCMV) considerou-os como vírus distintos, porém componentes de um complexo viral.

Segundo Blanco-Urgoiti *et al.* (1998), isolados classificados como diferentes patótipos podem pertencer à mesma estirpe genética. Essa afirmação resulta da visão de que o conceito de patótipo é diferente do conceito de estirpe, pois se refere a características genéticas de uma região particular do genoma viral. Pode não haver um padrão claro de correlação entre patótipos e agrupamentos filogenéticos baseados na seqüência de aminoácidos da proteína capsidial, pois o fator virulência pode não ser a CP. De fato, na maioria

dos casos estudados até o presente para potyvírus, o fator de virulência não é a CP (Berger *et al.*, 1997). Esses autores ressaltam que potyvírus que infetam hortaliças são diversos e heterogêneos quanto às suas propriedades biológicas, porém estreitamente relacionados quando se considera a seqüência da CP. Dessa forma os agrupamentos moleculares baseados nessa proteína podem não refletir a heterogeneidade biológica do vírus. Ressaltam ainda que pode existir um contínuo de seqüências, o que reforça o conceito de *quasispecies*.

Embora a análise molecular tenha sido realizada apenas com uma parcela dos isolados coletados neste estudo, os resultados sugerem que o PepYMV pode ser a espécie de potyvírus predominante em pimentão e pimenta no Sudeste do Brasil. A utilização de cultivares resistentes ao PVY pode ser responsável pelo surgimento dessa nova espécie. Os resultados das análises biológica, sorológica e molecular aqui realizados indicam um estreito relacionamento entre o PepYMV e o PVY<sup>N</sup>. A análise de um maior número de isolados e o seqüenciamento do genoma completo do PepYMV poderão indicar a prevalência dessa nova espécie em pimentão e pimenta no Brasil.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Iedo Valentim Carrijo (Semini Vegetable Seeds, São Joaquim de Bicas, MG) pelo envio dos isolados 2 e 3, e Antonia dos Reis Figueira (Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG) pelo envio dos isolados PVY<sup>N</sup>-BR e PVY<sup>O</sup>-BR.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARROYO, R., SOTO, M.J., MARTINEZ-ZAPATER, J.M. & PONZ, F. Impaired cell-to-cell movement of potato virus Y in pepper plants carrying the *y<sup>a</sup>* (*pvr2<sup>1</sup>*) resistance gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9:314-318. 1996.

BERGER, P.H., WYATT, S.D., SHIEL, P.J., SILBERNAGEL, M.J., DRUFFEL, K. & MINK, G.I. Phylogenetic analysis of the Potyviridae with emphasis on the legume-infecting potyviruses. *Archives of Virology* 142:1979-1999. 1997.

BLANCO-URGOITI, B., SÁNCHEZ, F., SAN ROMÁN, C.P., DOPAZO, J. & PONZ, F. Potato virus Y group C isolates are a homogeneous pathotype but two different genetic strains. *Journal of General Virology* 79:2037-2042. 1998.

BOITEUX, L.S., CUPERTINO, F.P., SILVA, C., DUSI, A.N., MONTE-NESHICH, D.C., VAN DER VLUGT, R.A.A. & FONSECA, M.E.N. Resistance to potato virus Y (pathotype 1-2) in *Capsicum annuum* and *Capsicum chinensis* is controlled by two independent major genes. *Euphytica* 87:53-58. 1996.

BOITEUX, L.S. & PESSOA, H.B.S.V. Additional sources of resistance to isolates of PVY<sup>m</sup> in *Capsicum* germoplasm. *Fitopatologia Brasileira* 19:291. 1994. (Resumo)

BRIOSO, P.S.T. Doenças causadas por vírus em pimentão. *Informe Agropecuário* 8:74-80. 1996.

BRIOSO, P.S.T., PEREIRA, M.A. & OLIVEIRA, D.E. "Potato virus Y" - Identificação de estirpe infectando naturalmente pimentão (*Capsicum annuum* L.) e fonte de resistência. *Fitopatologia Brasileira*

21:226-235. 1996.

BRUNT, A.A., CRABTREE, K., DALLWITZ, M.J., GIBBS, A.J., WATSON, L. & ZURCHER, E.J. *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. URL: <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/> Versão: 16/01/1997.

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.

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., THABUIS, A. & PALLOIX, A. Development of a CAPS marker for the *Pvr4* locus: A tool for pyramiding potyvirus resistance genes in pepper. *Genomics* 42:1111-1116. 1999.

CARVALHO, M.G. & SHEPHERD, R.J. Purificação do vírus do mosaico amarelo da cebola (OYDV) e do "estriado" do alho (GYSV). *Fitopatologia Brasileira* 8:626. 1983. (Resumo)

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. *Bragantia* 10:95-96. 1950.

DE BOKX, J.A. & HUTTINGA, H. Potato virus Y. In: *Descriptions of Plant Viruses* no. 242. Kew, England: CMI/AAB. 1981.

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.

GEBRE-SELASSIE, K., MARCHOUX, G., DELECOLLE, B. & POCHARD, E. Variabilité des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sud-est de la France. *Characterization et classification en pathotypes*. *Agronomie* 5:621-630. 1985.

INOUE-NAGATA, A.K., FONSECA, M.E.N., RESENDE, R.O., BOITEUX, L.S., MONTE, D.C., DUSI, A.N., ÁVILA, A.C. & VAN DER VLUGT, R.A.A. Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annuum*. *Archives of Virology* 147:849-855. 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. *Fitopatologia Brasileira* 26:153-157. 2001.

LANE, L.C. A general method for detecting plant viruses. In: Maramorosch, K. (Ed.) *Plant diseases of viral, viroid, mycoplasma and uncertain origin*. New Delhi: Oxford & IBH Publishing. 1992. pp.3-17

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

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

NÓBREGA, N.R. & SILBERSCHMIDT, K. Sobre uma provável variante do vírus "Y" da batatinha (*Solanum virus 2*, Orton) que tem a peculiaridade de provocar necroses em plantas de fumo. *Arquivos*

do Instituto Biológico de São Paulo 15:307-333. 1944.

PALLOIX, A. & KYLE, M. Proposal for a revision of gene nomenclature for potyvirus resistance genes in *Capsicum* spp. *Capsicum and Eggplant Newsletter* 14:26-29. 1995.

ROMANCER, M., KERLAN, C. & NEDELLEC, M. Biological characterization of various geographic isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathology* 43:138-144. 1994.

ROMERO, A., BLANCO-URGOITI, B., SOTO, M.J., FERERES, A. & PONZ, F. Characterization of typical pepper isolates of PVY

reveals multiple pathotypes within a single genetic strain. *Virus Research* 79:71-80. 2001.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2<sup>a</sup> ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SHUKLA, D.D., WARD, C.W. & BRUNT, A.A. *The Potyviridae*. Wallingford, UK: CAB International. 1994.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. & BURCKARD, J. Detection of a wide spectrum of tobacco mosaic virus strains by indirect enzyme-linked immunosorbent assays. *Virology* 106:327-334. 1980.