

**Alan Mario Zuffo**  
(Organizador)

# A produção do Conhecimento nas Ciências Agrárias e Ambientais



**Atena**  
Editora

Ano 2019

**Alan Mario Zuffo**  
(Organizador)

# **A produção do Conhecimento nas Ciências Agrárias e Ambientais**

Atena Editora  
2019

## AVALIAÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *CAPSICUM* SPP A UM ISOLADO VIRAL OBTIDO DE PIMENTEIRA COLETADA NO MUNICÍPIO DE SUMÉ - PB

**Dayse Freitas de Sousa**

Universidade Federal de Campina Grande  
Sumé - PB

**Ana Verônica Silva do Nascimento**

Universidade Federal de Campina Grande  
Sumé - PB

**José Davi dos Santos Neves**

Universidade Federal de Campina Grande  
Sumé – PB

**RESUMO:** As pimentas e pimentões, pertencentes ao gênero *Capsicum spp.*, são amplamente cultivadas em todo mundo. Uma das limitações para estas culturas são as doenças de origem viral. Diversos vírus infectam as pimenteiras, destacando-se o potyvírus *Pepper yellow mosaic virus (PepYMV)*. Uma ferramenta que advém da biotecnologia é a micropropagação, que é uma técnica de cultura de tecido vegetal que tem por interesse, a obtenção de plantas saudáveis e resistentes. Dessa forma, o presente trabalho visou realizar um levantamento e caracterizar os principais vírus que causa dano econômico em *capsicum spp.* no Município de Sumé, PB e identificar possíveis fontes de resistência em plantas de pimenteiras micropropagadas. Inicialmente, foram realizadas coletas das amostras de pimenteira no município de Sumé

para a identificação de Potyvirus e através do teste sorológico (ELISA indireto) confirmou-se a infecção viral ao *PepYMV*. Em seguida, sementes de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*), pimenta cambuci (*Capsicum baccatum*), pimenta lupita (*Capsicum annuum*), pimenta bico (*Capsicum chinense*) e pimenta cayenne (*Capsicum annuum*), foram micropropagadas e inoculadas com isolado viral para avaliação de possíveis fontes de resistência ao vírus. No teste de resistência das plantas micropropagadas, apenas a pimenta bico apresentou infecção viral ao *PepYMV*. Podemos concluir que as demais espécies de pimentas se apresentam não suscetíveis ao isolado viral podendo ser estudada futuramente como fonte de resistência.

**PALAVRAS-CHAVE:** Pimenta. Micropropagação. Resistência. ELISA indireto.

**ABSTRACT:** The peppers and chilis, pertaining to the *Capsicum* sort spp., widely are cultivated in all the world. One of the limitations for these cultures is the illnesses of viral origin. Diverse viruses infect the peppers, being distinguished potyvirus *Pepper yellow mosaic virus (PepYMV)*. A tool that they happen of the biotechnology is the micropropagation, that is one technique of vegetal fabric culture that has for interest, the attainment of healthy and resistant plants. Of this form, the present work aimed at to carry

through a survey the main viruses that cause economic damage in capsicum spp. in the City of Sumé, PB and to identify possible sources of resistance in plants of spread pe. Initially, collections of the samples of peppers in the city of Sumé for the identification of Potyvirus had been carried through and through the serologic test (indirect ELISA) it was confirmed viral infection to the PepYMV. After that, pepper seeds chilli (*Capsicum frutescens*), pepper cambuci (*Capsicum baccatum*), lupita pepper (*Capsicum annuum*), pepper peak (chinense *Capsicum*) and pepper cayenne (*Capsicum annuum*), had been spread and inoculated with isolated viral for evaluation of possible sources of resistance the virus. In the test of resistance of the spread plants, only the pepper peak presented viral infection to the PepYMV. We can conclude that the other species of peppers are not susceptible to the viral isolate and can be studied in the future as sources of resistance.

**KEYWORDS:** Chilli, micropropagation, resistance, indirect ELISA.

## 1 | INTRODUÇÃO

No gênero *Capsicum* encontram-se as pimentas e os pimentões, os quais pertencem à família *Solanaceae* (FIGUEIRA, 1996). O cultivo de pimentas deste gênero ocorre todas as regiões do país, destacando-se os principais estados produtores Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul (ESTEVES, 2011). Existindo uma grande diversidade e tipos de pimentas, com diferentes tamanhos, cores, sabores, ardume e nomes.

A tecnologia tem avançado bastante no sistema de produção de tais espécies e apresentado bons resultados, entretanto os problemas fitossanitários ainda são um dos maiores obstáculos para a produção e conseqüentemente a qualidade das mesmas, principalmente as doenças causadas por vírus (AZEVEDO et al., 2005).

As pimenteiras são expostas a insetos e fitopatógenos, que as infectam, e muitas vezes causam perdas irreparáveis. Um desses fitopatógenos são os vírus, sendo os mais importantes: *potyvirus Pepper yellow mosaic virus (PepYMV)* e *Potato virus Y (PVY)*, os *tospovirus Tomato spotted wilt virus (TSWV)*, *Groundnut ringspot virus (GRSV)* e *Tomato chlorotic spot virus (TCSV)*, o *tobamovirus Pepper mild mottle virus (PMMoV)* e o *cucumovirus Cucumber mosaic vírus (CMV)* (INOUE-NAGATA et al., 2002; TRUTA et al., 2004).

Através de técnicas advindas da biotecnologia é possível identificar infecções virais em mostras contaminadas, segundo Zerbini et al. (2002), os testes mais utilizados na detecção são os biológicos, sorológicos e moleculares. O teste Elisa indireto é um dos métodos do teste sorológico que tem sido amplamente utilizado na identificação de infecção viral por proporcionar bons resultados.

A micropropagação tem sido utilizada como uma alternativa de controle de doenças virais, provem das técnicas de cultura de tecidos vegetais para obter plantas sadias que consiste em cultivar em ambiente asséptico com temperatura e iluminação

controlada, qualquer parte da planta, em recipientes apropriados contendo meio de cultivo adequado, o que proporciona a produção em larga escala de plantas inteiras e idênticas à planta mãe (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A pesquisa objetivou realizar um levantamento dos principais vírus que causa dano econômico em *capsicum* spp. no município de Sumé, PB e identificar possíveis fontes de resistência em plantas de pimenteiras micropropagadas.

## **2 | MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Caracterização do município de realização da pesquisa**

A pesquisa realizou-se na Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (UFCG/CDSA), localizado no município de Sumé-PB.

O município de Sumé está localizado na Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba, Semiárido do Estado da Paraíba, Bioma Caatinga, mesorregião da Borborema, microrregião do Cariri Ocidental. Sumé está localizado nas seguintes coordenadas geográficas: Latitude 7° 40' 18" S, Longitude 36° 52' 54" W, altitude de 518 m. A área territorial é de 838,071 km<sup>2</sup>. A população para 2016 foi estimada em 16.691 habitantes (IBGE, 2016).

Predomina no município o tipo climático Bsh de Köppen (semiárido quente), com chuvas apresentando uma forte variação na distribuição espacial, temporal e interanual, e uma estação de estiagem que pode atingir 11 meses, com precipitação média anual superior a 600 mm (SENA et al, 2014).

A temperatura média é de 26° C, com máxima nos meses de novembro e dezembro e mínima nos meses de julho a agosto. A insolação na região de Sumé corresponde a cerca de 2800 horas luz (MOURA, 2002). A vegetação é do tipo caatinga hiperxerófila e pelas limitações climáticas apresenta o sistema de exploração agrícola, pecuária e agricultura de subsistência (FRANCISCO, 2010).

### **2.2 Obtenção e preservação do isolado viral**

Plantas de pimenta possuindo sintomas típicos de infecção por vírus, foram identificadas em plantios no município de Sumé-PB, totalizando desta forma, dezessete matrizes, dez amostras de cada matriz foram coletadas e submetidas ao teste Elisa indireto para a identificação fitopatológica. E no restante das amostras aplicou-se o processo de secagem e logo após preservação de fitovírus.

### **2.3 Caracterização sorológica através do teste Elisa indireto**

O teste Elisa indireto (MOWAT; DAWSON, 1987) 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 a seguinte: adicionado-se aos poços da placa 200  $\mu\text{l}$  da solução de IgG dissolvido em tampão de cobertura (pH 9,6), em seguida incubou-se por 2 horas a 37 °C em câmara úmida, após a incubação realizou-se três lavagens com PBS – Tween, tendo cada uma a duração de três minutos. Colocou-se em cada poço 150  $\mu\text{l}$  da amostra e incubou-se novamente nas mesmas condições, e em seguida foram realizadas mais três lavagens. Os poços receberam o conjugado (150  $\mu\text{l}$ /poço), houve nova incubação e lavagens, só então recebeu o substrato p-nitrofenilfosfato dissódico tampão de substrato (150  $\mu\text{l}$ /poço, a partir daí aguardar a formação da coloração até a intensidade adequada).

## 2.4 Micropropagação de sementes de pimenta

O processo de micropropagação foi desenvolvido no Laboratório de cultura de Tecidos Vegetais (UFCG/CDSA). Para o experimento utilizou-se cinco cultivares de sementes obtidas comercialmente: pimenta malagueta (*Capsicum frutescens L.*), pimenta cambuci (*Capsicum baccatum L.*), pimenta lupita (*Capsicum annuum L.*), pimenta de bico (*Capsicum chinense L.*) e pimenta cayenne (*Capsicum annuum L.*).

Utilizou-se a metodologia proposta por Andrade (2002) em que inicialmente, as sementes foram lavadas com detergente neutro e desinfestadas com álcool 70% por dois minutos e posteriormente lavados com água destilada autoclavadas. Após a lavagem, adicionou-se hipoclorito de sódio a 1% durante 20 minutos. Por último, as sementes foram lavadas com água destilada por três vezes. Após o processo de desinfestação, as sementes foram transferidas, com o auxílio de uma pinça esterilizada para frascos de vidros contendo 40 mL de meio de cultivo ágar-ágar previamente autoclavado, ilustrado na Figura 2A. Todos os fracos foram levados a BDO para o processo de incubação, na temperatura de 25°C até o período de aclimação. No período de 15 dias iniciou-se o processo germinativo das plântulas e após 25 dias as plântulas mostraram-se aptas para o processo de aclimação, como mostra a figura 2B.

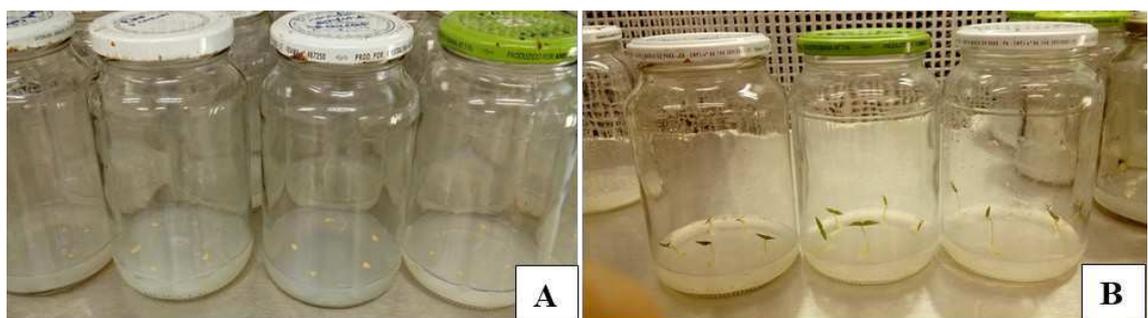


Figura 2. Micropropagação de sementes de *capsicum* em ambiente asséptico.

## 2.5 Aclimação das plântulas

Após o período de incubação, retirou-se as plântulas dos frascos de vidros, lavou-se com água corrente a raiz das mesmas para retirar o meio de cultivo e posteriormente foram transferidas para vasos de plástico contendo substrato comercial umedecido ascendentemente com água. Por fim levaram-se os vasos plásticos contendo as plantas para a estufa a qual apresenta telado de 50%. E irrigou-se apenas uma vez por dia, utilizando um regador de mão.

## 2.6 Inoculação de extrato de folhas infectadas em plantas sadias

Após a aclimação foram inoculadas cinco plantas de cada cultivar para análise da resistência, através da sintomatologia apresentada, deixando-se uma planta como teste controle. Para o procedimento da inoculação seguiu-se a metodologia de Truta et al. (2004) com pequenas modificações, onde folhas jovens de pimenta coletada no Viveiro de Mudas do CDSA com sintomas típicos de vírus juntamente com as amostras armazenadas após o processo de preservação de fitovírus, que apresentaram infecção viral, detectada pela caracterização sorológico através do teste Elisa indireto, 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%), como mostra a Figura 3A. Após a maceração, inoculou-se o extrato resultante mecanicamente em folhas sadias de pimenta pela fricção de pedaços de gaze embebidos no extrato vegetal nas superfícies adaxiais (Figura 3B), 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. Após dois dias fez-se uma reinoculação para assegurar o processo.



Figura 3. Processo de inoculação do isolado viral nas plantas de pimenteira.

## 2.7 Avaliação de fonte de resistência ao vírus

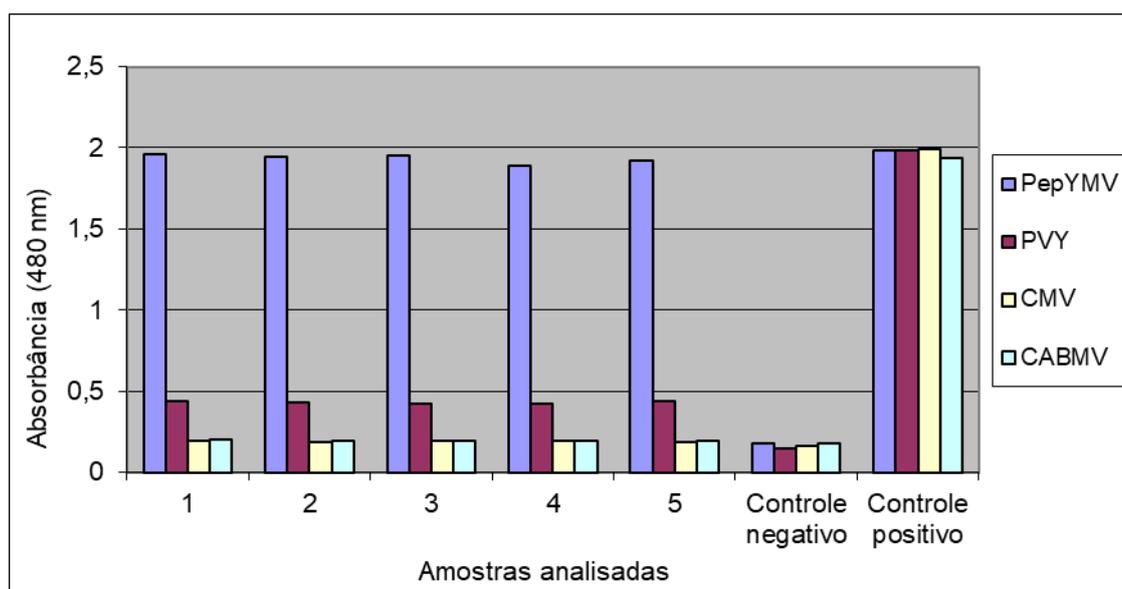
Após a inoculação do extrato vegetal infectado nas plantas sadias, amostras foliares das seis plantas de cada cultivar, foram coletadas adequadamente e realizou-

se a caracterização sorológica através do teste Elisa indireto nas mesmas.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da caracterização sorológica utilizando o teste ELISA indireto foi possível identificar reação positiva com o antissoro para *Pepper yellow mosaic virus (PepYMV)* nas amostras de pimentas. Entretanto, para os antissoros contra *Potato Vírus 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)* (Figura 4), pois abaixo da absorbância 0,5 encontram-se as amostras livres de vírus e acima de tal absorbância as amostras contaminadas pelo vírus *PepYMV*.

Figura 4. Caracterização sorológica através do Teste ELISA indireto realizado em amostras coletadas de pimenteira que apresentaram os sintomas mais severos. Controle negativo - plantas de pimenta saudas, Controle positivo - plantas de pimenta infectadas com os respectivos vírus testados.



A baixa incidência do *CMV*, *PVY* e *CABMV* nas amostras pode ser explicada por uma possível inibição ou interferência na sua transmissão pela presença de outros vírus (SILVEIRA et al., 2009). O vírus responsável pela inibição ou interferência é o *PepYMV* de acordo com os resultados obtidos após a caracterização sorológica.

Segundo Reis et al. (2016), o *Potato vírus Y (PVY)* era o vírus mais identificado na cultura de *capsicum*, mas atualmente o *Pepper yellow mosaic virus (PepYMV)* é o mais detectado, e é um dos maiores problemas da cultura da pimenteira, sua incidência chega a 100% causando grandes prejuízos, mas os sintomas causados pelo *PepYMV* e *PVY* apresentam-se de forma indistinguíveis. De acordo com Lucinda et al. (2012) a espécie *PepYMV* apresenta uma similaridade de 62,07% com *PVY*.

Através do teste sorológico (Elisa indireto) aplicado nas cultivares

micropropagadas observou-se que apenas a cultivar pimenta de bico (*C. chinense*) foi suscetível ao isolado viral *PepYMV*. Enquanto que as outras cultivares apresentaram não suscetível ao isolado viral, o que pode ter sido proveniente do próprio material genético dos indivíduos ou obtidos após o processo de micropropagação. A qual tem como objetivo promover a limpeza clonal, além de gerar explantes sadios e livres de contaminação para posterior aplicação das técnicas de cultura de tecidos e transformação genética, bem como manter os indivíduos micropropagados livres de patógenos (CARVALHO, 1999; CABRAL et al., 2003).

Segundo Bento et al. (2013) uma das principais formas de controle do *PepYMV* é a resistência genética. Pois alguma modificação genética nos genes das plantas dificulta o alojamento dos vírus, uma vez que os vírus são parasitas e necessitam de um hospedeiro para realizar suas atividades (DIAZ-PENDON et al., 2004).

#### 4 | CONCLUSÃO

Observou-se nessa pesquisa que a espécie viral responsável pela infecção causada em pimenteira no município de Sumé-PB era o *PepYMV* o qual pertence à família Potyvirus. Em plantas de pimentas micropropagadas foi possível detectar que a penas a cultivar pimenta de bico (*C. chinense*) foi suscetível quando submetida ao contato com o isolado viral *PepYMV*, enquanto as outras apresentaram-se não suscetível podendo ser estudada futuramente como fonte de resistência.

#### REFERÊNCIAS

- ANDRADE, Solange Rocha Monteiro de. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 16 p, ISSN 1517-5111, 2002 (Embrapa Cerrados. Documentos, 58).
- AZEVEDO, C. P.; CAFÉ FILHO, A. C.; HENZ, G. P.; REIS, A. **Pimentão: Antracnose arrasadora. Cultivar HF**, 18-20. 2005.
- BENTO, C.S.; RODRIGUES, R.; GONÇALVES, L.S.A.; OLIVEIRA, H.S.; SANTOS, M.H.; PONTES, M.C; SUDRÉ, C.P. **Inheritance of resistance to Pepper yellow mosaic virus in *Capsicum baccatum* var. *pendulum***. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, v. 12, n. 2, p. 1074-1082, 2013.
- CABRAL, G.B.; PIRES, M.V.V.; LACERDA, A.L.; CARNEIRO, V.T. de C. **Introdução in vitro, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria* sp.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.
- CARVALHO, J. M. F. C. **Técnicas de micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 1999.
- DIAZ-PENDON, J.A.; TRUNIGER, V.; NIETO, C.; GARCIA-MAS, J.; BENDAHMANE, A.; ARANDA, M.A. **Advances in understanding recessive resistance to plant viruses**. *Molecular Plant Pathology*. v.5, p. 223-233, 2004.
- ESTEVES, M. **As novas variedades de pimenta da Embrapa e o mercado pimenteiro: oportunidade de renda para agricultores**. 2011. Disponível em: <<http://hotsites.sct.embrapa.br/>

prosarural/programacao/2011/cultivaresde-pimenta-mais-resistentes-e-produtivas-1>. Acessado em 20 jul. 2018.

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.

FRANCISCO, P. R. M. **Classificação e mapeamento das terras para mecanização do Estado da Paraíba utilizando sistemas de informações geográficas**. Dissertação (Mestrado em Manejo de Solo e Água). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2010.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa – SPI. p.183-260. 1998.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades. 2016. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/painel/painel.php?codmun=251630>>. Acesso em: 03 de Jul de 2018.

INOUE-NAGATA, A. K.; FONSECA, M.E.N.; RESENDE, R.O.; BOITEUX, L.S.; MONTE, D.C.; DUSI, A.N.; AVILA, A.C.; 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.

LUCINDA, N. R.; INOUE-NAGATA, A. K.; NAGATA, T. **Complete genome sequence of pepper yellow mosaic virus, a potyvirus, occurring in Brazil**. Archives of Virology, New York, v. 157, n. 7, p. 1397-1401, 2012.

MOURA, C. S. **Vulnerabilidades das Terras Agrícolas, Degradação Ambiental e Riscos e Desastres ENOS no Município de Sumé-PB**. 155p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2002.

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

REIS, A.; DUVAL, A. M. Q.; INOUE-NAGATA, A. K.; ÁVILA, A. C.; LOPES, C. A. **Manejo de doenças em pimentas no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2016.

SENA, J. P. O.; LUCENA, D. B. **Caracterização da precipitação na microrregião do Cariri paraibano por meio da técnica dos quantis**. Revista Brasileira de Geografia Física, v.07, n.05, p. 1-9, 2014.

SILVEIRA, L. M.; QUEIROZ, M. A.; LIMA, J. A. A.; NASCIMENTO, A. K. Q.; NETO, I. S. L. **Levantamento sorológico de vírus em espécies de cucurbitáceas na região do submédio São Francisco, Brasil**. Tropical Plant Pathology, vol. 34, n. 2, 123-126 p. 2009.

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.

ZERBINI, F. M.; CARVALHO, M. G.; ZAMBOLIM, E. M. **Introdução à virologia vegetal**. UFV, 2002. 145p.