

# Análise comparativa da região codificadora para a proteína capsidial de isolados de PepYMV e PVY coletados em pimentão.

Monika Fecury Moura, Julio Massaharu Marubayashi; Tatiana Mituti; Ricardo Gioria; Romulo Fujito Kobori; Marcelo Agenor Pavan; Renate Krause-Sakate.

UNESP-FCA (Botucatu), Rua José Barbosa de Barros, 1780, Departamento de Defesa Fitossanitária – Laboratório de Virologia Vegetal.

Autor para correspondência: Renate Krause-Sakate (renatekrause@fca.unesp.br)

Data de chegada: 30/05/2011. Aceito para publicação em: 13/02/2012.

1761

## RESUMO

Moura, M.F.; Marubayashi, J.M.; Mituti, T.; Gioria, R.; Kobori, R.; Pavan, M.A.; Krause-Sakate, R. Análise comparativa da região codificadora para a proteína capsidial de isolados de PepYMV e PVY coletados em pimentão. *Summa Phytopathologica*, v.38, n.1, p.93-96, 2012.

O *Potato virus Y* (PVY) e *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) são as únicas espécies de potyvirus encontradas em pimenta e pimentão no Brasil. A região codificadora para a proteína capsidial de isolados de PepYMV e PVY coletados em pimentão, foi avaliada quanto à variabilidade e presença de motivos específicos aos potyvirus. A identidade da sequência de aminoácidos na CP entre os isolados de PepYMV foi de 93% a 100%, enquanto que para os de PVY 94% a

98%. Entre os vírus esta variou de 73% a 79%. Foi observada variabilidade nas regiões conservadas da CP. Todos os isolados de PepYMV seqüenciados não apresentaram o motivo DAG na CP, relacionada a transmissão dos vírus por afídeos, enquanto que para as seqüências obtidas de PVY foi observada. Demais domínios como MVWCIENG, ENTERH, QMKAAA e PYMPRYG foram verificadas em ambas espécies.

**Palavras-chave adicionais:** pimentão, variabilidade, *Potyvirus*

## ABSTRACT

Moura, M.F.; Marubayashi, J.M.; Mituti, T.; Gioria, R.; Kobori, R.; Pavan, M.A.; Krause-Sakate, R. Comparative analysis of coding region for the coat protein of PepYMV and PVY isolates collected in sweetpepper. *Summa Phytopathologica*, v.38, n.1, p.93-96, 2012.

*Potato virus Y* (PVY) and *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) are the only potyvirus species found in pepper and sweetpepper in Brazil. The region encoding the coat protein of PVY and PepYMV isolates collected in sweetpepper was evaluated for the presence of specific motifs of potyviruses. The identity of the amino acid sequence in CP among PepYMV isolates was 93% to 100%, while for PVY was

94% to 98%. Among the viruses that ranged from 73% to 79%. It was observed variability in the conserved regions of the CP. All PepYMV isolates sequenced did not show the DAG motif in the CP, related to virus transmission by aphids, while for sequences of PVY this motif was observed. Other motifs, such MVWCIENG, ENTERH, QMKAAA and PYMPRYG were found in both species.

**Keywords:** sweet pepper, variability, *Potyvirus*

O pimentão (*Capsicum annum* L.) é uma hortaliça cultivada em todo o Brasil, e encontra-se entre as dez olerícolas mais consumidas no país. A produção de pimentão é predominantemente em campo aberto, sendo que o Estado de São Paulo abrange cerca de 23,70% da área cultivada brasileira que é de 12.000 ha (11).

A suscetibilidade do pimentão a problemas fitossanitários causados por vírus ocasiona graves problemas à cultura. Entre os principais vírus do gênero *Potyvirus* pode-se citar *Potato virus Y* (PVY), *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Tobacco etch virus* (TEV), *Pepper veinal mottle virus* (PVMV) e *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV) (5,8) e *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (10), sendo que até o momento somente o PVY e o PepYMV são descritas no Brasil. O PVY no Brasil foi observado em pimentão pela primeira vez na década de 50 (6) e o PeYMV em 2002 (10). Ambos vírus são sorologicamente relacionados (7), e causam sintomas de mosaico indistinguíveis, tornando-os de difícil identificação visual.

Um dos critérios taxonômicos para classificação de espécies no

gênero *Potyvirus* é comparação da identidade de sequência de aminoácidos codificadora para proteína capsidial (CP), que sendo inferior a 80%, classifica isolados em diferentes espécies (3).

Neste trabalho foi analisada a CP de uma coleção de isolados de potyvirus provenientes das seguintes áreas produtoras de pimentão no Estado de São Paulo: Iacanga, Piraju, Lins e Mogi-Mirim. O RNA total foi extraído a partir de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* cv. TNN), mantidas em casa de vegetação, utilizando-se o método de Bertheau (4) ou pelo kit de extração Total RNA Purification Norgen, seguindo as recomendações do fabricante. Para amplificação da CP tanto de PVY como PepYMV foi desenhado um par de oligonucleotídeos iniciadores denominados PepNib (5' GWTSGYGMMTTGGATGATG 3') e PepUTR (5' AGTAGTACAGGAAAAGCC 3') que amplifica a região codificadora para a proteína capsidial (960 nts). A reação de RT-PCR para PVY e PepYMV foi realizada em uma só etapa e foram utilizados os Kits de PCR Master Mix das marcas PROMEGA, AMPLIQON e FERMENTAS.

Para um volume final de 25 µL foram adicionados: 5 µL de produto de extração de RNA, 12,5 µL de tampão Master Mix, 1mM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 unidade da transcriptase reversa AMV (Avian myeloblastosis virus, Promega, 15 u/µl) e água DEPC para completar o volume. O ciclo utilizado no termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf) consistiu em 30 minutos a 42 °C, seguido de 2 minutos à 95 °C e 39 ciclos de 92 °C/60 segundos, 53 °C/1 minuto e 72 °C/90 segundos e finalizando com 72 °C/10 minutos. Foram retirados 5 µL da reação de RT-PCR para análise em gel de agarose a 1% em tampão TBE (0,1 M de ácido bórico, 0,02 mM EDTA pH 8,3). Utilizou-se o marcador 1kb Ladder da Invitrogen.

A região codificadora para a proteína capsial de 8 amostras foi clonada no vetor comercial pGEM-T Easy (Promega). Inicialmente, os fragmentos obtidos por RT-PCR foram purificados através dos Kits comerciais Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) ou QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). A reação de ligação foi realizada adicionando-se 4 µL de fragmento, 50 ng/µL de vetor, T4 DNA ligase (10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1mM DTT, 0,1mM EDTA, 50% glicerol), 5 µL do tampão de ligação (60mM Tris-HCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 20 DTT, 2mM ATP, 10% PEG). A reação foi deixada durante a noite a 4 °C. O vetor foi eletroporado em células competentes de *Escherichia coli* da estirpe XL1. Para verificar a presença do fragmento nos plasmídeos foi realizada uma clivagem com a enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen) por 1h a 37 °C. As amostras com fragmento de tamanho desejado foram selecionadas para extração do plasmídeo pelo QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), de acordo com as especificações do fabricante.

Para alguns isolados não foi necessário clonar o fragmento para posterior sequenciamento. A análise das sequências foi realizada pelo programa Mega 4. 1 (12) e CLUSTAL Interative W (13).

Foram obtidas dez sequências completas para PepYMV e duas para PVY. Os dois isolados de PVY apresentaram 94% de identidade de aminoácidos com a sequência de PVY depositada

no GenBank sob número PVY-LYE84.2. A identidade entre os isolados de PVY e PepYMV variou de 73% a 79%. Os isolados de PepYMV apresentaram variações de porcentagem de identidade de aminoácidos de 93% a 100% entre si (Quadro 1).

Foram também analisados outros domínios específicos aos potyvirus (14). O domínio E(N/D)TERH (seqüência de nucleotídeos GARRAYACDGARMGNCAAYRC) encontrada na CP dos potyvirus é considerado o mais conservado seguido pelos domínios QMKAAA, YAFDFYE, MVWCI(E/D)NG, V(W/T)MMDG(D/E/N), (P/R/A)YMPRYG e (A/S)SYN(ED)VD. As seqüências de aminoácidos ENTERH, QMKAAA, MVWCIENG e PYMPRTG foram observadas na região codificadora para a proteína capsial dos isolados analisados de PVY e PepYMV. O domínio YAFDFYE foi observado em todas as seqüências, exceto para o isolado 234-23q de PepYMV em que foi substituído pela sequência HAFDFYE. Para todos os isolados de PepYMV observou-se a falta da sequência de aminoácidos DAG (Asparagina - Asp, Alanina - Ala, glicina - Gly) na região N-terminal da CP, altamente conservada entre os potyvirus e relacionada com a transmissão dos potyvirus por afídeos (1, 2). A seqüência DAG foi detectada em ambos os isolados de PVY analisados (Figura 1). Para PepYMV, este motivo não é essencial para transmissão aos afídeos uma vez que transmissão pelas espécies *Aphis gossypii* e *Myzus persicae* já foi observada para um isolado de PepYMV (9). (Figura 1).

Neste trabalho foram evidenciadas as principais diferenças moleculares entre as CPs do PepYMV e PVY. A maioria dos domínios foram encontrados em ambas espécies, porém a que se destaca é a ausência do motivo DAG em todas as sequências de PepYMV até então seqüenciadas.

### Agradecimentos

À FAPESP pelo suporte financeiro e CAPES pela concessão da bolsa de mestrado para a primeira autora.

**Quadro 1.** Porcentagem de identidade da seqüência de nucleotídeos (diagonal superior) e da seqüência de aminoácidos (diagonal inferior) para a região codificadora para a proteína capsial entre os isolados de PepYMV (252-29n, 268-32a, 254-6q, 257-6t, 249-29l, 237-23t, 240-29c, 389-2c, 234-23q e 348) ; PVY (225-23j e 331); PepYMV AF348610 e PVY-LYE 84.2.

	251-29n	PepYMV	268-32a	254-6q	257-6t	249-29l	237-23t	240-29c	389-2c	234-23q	PVY	225-23j	348	331
<b>251-29n</b>	-	94	94	93	93	99	99	99	93	99	65	65	98	65
<b>PepYMV</b>	98	-	91	97	97	93	94	94	98	93	64	65	94	65
<b>268-32 a</b>	94	93	-	91	91	93	94	94	91	94	64	64	95	65
<b>254-6q</b>	98	98	93	-	100	93	93	93	97	93	65	65	94	66
<b>257-6t</b>	98	98	93	100	-	93	93	93	97	93	65	65	94	66
<b>249-29l</b>	98	97	93	97	97	-	99	98	93	98	65	65	98	65
<b>237-23t</b>	99	97	94	97	97	97	-	99	93	99	65	65	98	65
<b>240-29c</b>	99	98	94	97	97	98	98	-	93	99	65	65	98	65
<b>389-2c</b>	97	98	93	98	98	96	97	97	-	93	64	65	94	65
<b>234-23q</b>	98	96	93	96	96	96	97	97	96	-	65	65	98	65
<b>PVY</b>	76	78	77	78	78	75	75	76	78	74	-	93	65	93
<b>225-23j</b>	74	75	76	76	76	74	74	74	78	73	94	-	65	99
<b>348</b>	100	98	94	98	98	98	99	99	97	98	76	74	-	65
<b>331</b>	75	76	76	76	76	74	74	75	79	74	94	98	75	-

```

254-6q      ADEKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPVDASNLRGKEKGVSTSKDNDVNTGTTGTFVTPRIKA 60
257-6t      ADEKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPVDASNLRGKEKGVSTSKDNDVNTGTTGTFVTPRIKA 60
PepYMV-AF348610  ADEKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPVDASNLGKKEKGVSTSRDNDVNTGTTGTFVTPRIKA 60
251-29n     ADEKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPVDASNLGKKEKGVSTSRDNDVNTGTTGTFVTPRIKA 60
348         ADEKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPVDASNLGKKEKGVSTSRDNDVNTGTTGTFVTPRIKA 60
240-29c     ADEKLAVLDAAEEDKKEKRAKNEQPVDASNLGKKEKGVSTSRDNDVNTGTTGTFVTPRIKA 60
234-23q     ADEKPAVLDAAEEDKKKRAKNEQPVDASNLGKKEKGVSTSRDNDVNTGTTGTFVTPRIKA 60
237-23t     ADEKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPVDASNLGKKEKGVSTSRDNDVNTGTTGTFVTPRIKA 60
249-291     ADERLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPVDASNLGKKEKGVSTSRDNDVNTGTTGTFVTPMDKA 60
389-2c      ADDKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPVDASNSKKEKGVSTSRDNDVNTGTTGTFVTPRIKA 60
268-32a     ADEKLAVLDAAEEDKKKRAKNEKPEVPSLKGEEKEVSTARDNDVNTGTTGTFVTPRIKA 60
225-23j     ANDT---IDAGENSKK---DAKPAQGSIQQSPNK---AKEKDVNAGTSGTHTVTPRIKA 49
331         GNDT---IDAGENSKK---DAKPAQGSIQQSPNK---AKEKDVNAGTSGTHTVTPRIKA 49
PVY-LYE84.2 ANDT---IDAGSSKK---DAKPEQGSIQQTPNK---GKDKDVNAGTSGTHTVTPRIKA 49
.:. :*. .*: .: * . :* .: .:***:***:*** **

254-6q      ITSKMRMPKVGGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNMYAAVKNVYDVGDETMQ 120
257-6t      ITSKMRMPKVGGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNMYAAVKNVYDVGDETMQ 120
PepYMV-AF348610  ITSKMRMPKVGGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNMYAAVKNVYDVGDAEMQ 120
251-29n     ITGKMRMPKVGGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNMYAAVKNVYDVGDETMQ 120
348         ITGKMRMPKVGGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNMYAAVKNVYDVGDETMQ 120
240-29c     ITGKMRMPKVGGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNMYAAVKNVYDVGDETMQ 120
234-23q     ITGKMRMPKVGGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNMYAAVKNVYDVGDETMQ 120
237-23t     ITGKMRMPKVGGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNMYAAVKNVYDVGDETMQ 120
249-291     ITGKMRMPKVGGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNMYAAVKNVYDVGDETMQ 120
389-2c      ITSKMRMPKVGGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNMYAAVKNVYDVGDETMQ 120
268-32a     ITGKMRMPKVGGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTRNQFDNMYAAVKNVYDVGDETMQ 120
225-23j     ITSKMRMPKSKGAVALNLEHLLTYTPQQIDISNTRATQSQFDTWYDAVRVAYDIGENEMP 109
331         ITSKMRMPKSKGAALNLEHLLTYTPQQIDISNTRATQSQFDTWYDAVRVAYDIGENEMP 109
PVY-LYE84.2 ITSKMRMPKSKGAVALNLEHLLTYTPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVRVAYDIGETEMP 109
**.* ** *.. ***:*** *****:*.***_* ** :.***: **

254-6q      TIMNGLMWCIENGTS PNINGVWIMMDGEEQVEYPLKPIENSKPTFRQIMAHFSDVAEA 180
257-6t      TIMNGLMWCIENGTS PNINGVWIMMDGEEQVEYPLKPIENSKPTFRQIMAHFSDVAEA 180
PepYMV-AF348610  TIMNGLMWCIENGTS PNINGVWIMMDGEEQVEYPLKPIENSKPTFRQIMAHFSDVAEA 180
251-29n     TIMNGLMWCIENGTS PNINGVWIMMDGEEQVEYPLKPIENSKPTFRQIMAHFSDVAEA 180
348         TIMNGLMWCIENGTS PNINGVWIMMDGEEQVEYPLKPIENSKPTFRQIMAHFSDVAEA 180
240-29c     TIMNGLMWCIENGTS PNINGVWIMMDGEEQVEYPLKPIENSKPTFRQIMAHFSDVAEA 180
234-23q     TIMNGLMWCIENGTS PNINGVWIMMDGEEQVEYPLKPIENSKPTFRQIMAHFSDVAEA 180
237-23t     TIMNGLMWCIENGTS PNINGVWIMMDGEEQVEYPLKPIENSKPTFRQIMAHFSDVAEA 180
249-291     TIMNGLMWCIENGTS PNINGVWIMMDGEEQVEYPLKPIENSKPTFRQIMAHFSDVAEA 180
389-2c      TIMNGLMWCIENGTS PNINGVWIMMDGEEQVEYPLKPIENSKPTFRQIMAHFSDVAEA 180
268-32a     TIMNGLMWCIENGTS PNINGVWIMMDGEEQVEYPLKPIENSKPTLRQIMAHFSDVAEA 180
225-23j     TVMNGLMWCIENGTS PNVNGVWIMMDGSEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEA 169
331         TVMNGLMWCIENGTS PNVNGVWIMMDGSEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEA 169
PVY-LYE84.2 TVMNGLMWCIENGTS PNINGVWIMMDGNEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEA 169
*:*****:***_* **.******:***:***:*****

254-6q      YEEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLAR YAFDFYEVTSRTPTFRAREAHI QMKAAALKSAQ 240
257-6t      YEEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLAR YAFDFYEVTSRTPTFRAREAHI QMKAAALKSAQ 240
PepYMV-AF348610  YEEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLAR YAFDFYEVTSRTPTFRAREAHI QMKAAALKSAQ 240
251-29n     YEEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLAR YAFDFYEVTSRTPTFRAREAHI QMKAAALKSAQ 240
348         YEEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLAR YAFDFYEVTSRTPTFRAREAHI QMKAAALKSAQ 240
240-29c     YEEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLAR YAFDFYEVTSRTPTFRAREAHI QMKAAALKSAQ 240
234-23q     YEEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLAR YAFDFYEVTSRTPTFRAREAHI QMKAAALKSAQ 240
237-23t     YEEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLAR YAFDFYEVTSRTPTFRAREAHI QMKAAALKSAQ 240
249-291     YEEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLAR YAFDFYEVTSRTPTFRAREAHI QMKAAALKSAQ 240
389-2c      YEEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLAR YAFDFYEVTSRTPTFRAREAHI QMKAAALKSAQ 240
268-32a     YEEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLAR YAFDFYEVTSRTPTFRAREAHI QMKAAALKSAQ 240
225-23j     YEEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDISSAR YAFDFYEVTSRTPTFRAREAHI QMKAAALKSAQ 229
331         YEEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLAR YAFDFYEVTSRTPTFRAREAHI QMKAAALKSAQ 229
PVY-LYE84.2 YEEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLAR YAFDFYEVTSRTPTFRAREAHI QMKAAALKSAQ 229
*****:***_* **.******:***:***:*****

254-6q      TRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM 278
257-6t      TRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM 278
PepYMV-AF348610  TRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM 278
251-29n     TRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM 278
348         TRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM 278
240-29c     TRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM 278
234-23q     TRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM 278
237-23t     TRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM 278

```

**Figura 1.** Alinhamento completo da região codificadora para a proteína capsidial entre os isolados coletados no campo comparados ao PepYMV (número de acesso AF348610) e PVY (número de acesso LYE84.2).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Atreya, P.B.; Atreya, C.D.; Pirone, T.P. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. n. 88, p-7887-7891, 1991.
2. Atreya, P.B.; Lopez-Moya, J.J.; Chu, M.; Atreya, C.D.; Pirone, T.P. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyviral transmission by aphids. **Journal of General Virology**, London. n.76, p. 265-270, 1995.
3. Berger, P.H.; Adams, M.J.; Barnett, O.W.; Brunt, A.A.; Hammond, J.; Hill, J.H.; Jordan, R.L.; Kashiwazaki, S.; Rybicki, E.; S, N.; Stenger, D.C.; Ohki, S.T.; Uyeda, I.; van Zaayen, A. Valkonen, A.; Vetten, H.J. Potyviridae. In: Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball, L.A. **Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, p. 819-841, 2005.
4. Bertheau, Y.D., Frechon, I.K., Toth, L.J., Hyman. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). In: PEROMBELON, M.C.M.; VAN DER WOLFF, J.M. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes. Aberdeen: **Scottish Crop Research Institute Occasional Publication**, 1998.
5. 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**, Saint Paul, v.10, p.872-878. 1997.
6. Costa, A.S., Alves, S. Mosaico do pimentão. **Bragantia**, Campinas, v.10, p.95-96, Campinas, 1950.
7. Cunha, L.C.V. Da, Resende, R. De O., Nagata, T., Inoue-Nagata, A.K. Distinct features of Pepper yellow mosaic virus isolates from tomato and sweetpepper. **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, v.29, n.6, p.663-667, 2004.
8. 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**, Wageningen, v.88, p.231-239, 1996.
9. Gioria, R., Braga, R.S., Krause-Sakate, R., Roullier, C., Rosa, D.D., Moura, M.F., Souza-Dias, J.A.C., Sawazaki, H.E., Camargo, L.E.A., Rezende, J.A.M. Breakdown of resistance in sweet pepper against Pepper yellow mosaic virus in Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.66, n.2, p.267-269, 2009.
10. Inoue-Nagata, A. K., Fonseca, M.E.N., Resende, R.O.; Boiteux, L.S.; Monte, D.C.; Dusi, A.N.; Ávila, 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.
11. Kobori, R.F.; Gioria, R.; Brunelli, K.R. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças do pimentão no Brasil. In: GHINI, R.; HAMADA, E. **Mudanças climáticas – Impactos sobre doenças de plantas no Brasil**. Brasília – DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008, p.121-128.
12. Kumar, S., Tamura, K., Kakobson, I.B., Nei, M. Molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, Oxford, v.17, p. 1244-1245, 2001.
13. Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.22, p. 4673-4680, 1994.
14. Zheng, L.; Wayper, P.J.; Gibbs, A.J.; Fourment, M.; Rodoni, B.C.; Gibbs, M.J. Accumulating variation at conserved sites in Potyvirus genomes is driven by species discovery and affects degenerate primer design. **PLoS ONE** v.3, n.2, p. e1586. 2008. Disponível em: <http://www.plosone.org>. Acesso em: 16 de março de 2011.