

## Detecção de *Piper yellow mottle virus* da pimenteira do reino nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Amazonas.

Ana Carolina Sonsim de Oliveira<sup>1</sup>; Alessandra de Jesus Boari<sup>1</sup>; Cristiane Melo de Sousa<sup>2</sup>; Késsia de Fátima Cunha Pantoja<sup>2</sup>; Caroline do Amaral Souza<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Amazônia Oriental – Trav. Enéas Pinheiros s/n, Marco, 66095-100 Belém-PA, [ajboari@cpatu.embrapa.br](mailto:ajboari@cpatu.embrapa.br), <sup>2</sup> UFRA – Avenida Perimetral, 250, 1Belém - PA, 66077-830, [carolsonsims@hotmail.com](mailto:carolsonsims@hotmail.com); [cris.ufra@hotmail.com](mailto:cris.ufra@hotmail.com); [kessiapantoja@yahoo.com.br](mailto:kessiapantoja@yahoo.com.br); [caroline\\_agro07@yahoo.com.br](mailto:caroline_agro07@yahoo.com.br)

### RESUMO

No Brasil, os maiores estados produtores de pimenta do reino são Pará, Espírito Santo, Bahia e Minas Gerais. Entretanto, as doenças como as viroses vêm contribuindo com a redução da produção brasileira. No Brasil, já foram relatados os vírus *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) e um isométrico ainda não identificado, sendo o segundo, até então, relatado apenas no Estado do Pará. Os sintomas causados por estes vírus são clorose, mosqueado, mosaico, clareamento de nervuras, deformação foliar, nanismo e redução da produção de frutos. O PYMoV é disseminado por cochonilhas e mudas infectadas. No estado do Pará, maior produtor de pimenta do reino, o PYMoV se encontra bastante disseminado e ocorre em maior incidência que o CMV. O fato de este vírus ser disseminado por mudas infectadas levou a hipótese de que lavouras de outros estados brasileiros produtores de pimenta do reino também tivessem infectadas por esse vírus. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar amostras de folhas de pimenteira do reino provenientes dos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Amazonas quanto a presença do PYMoV. Foram avaliadas 21 amostras do Amazonas, 11 de Minas Gerais e 11 do Espírito Santo. O PYMoV foi detectado nos três estados e, provavelmente,

o vírus foi introduzido nesses por meio de estacas infectadas.

**Palavras-chave:** PYMoV, disseminação, *Piper nigrum* L.

### ABSTRACT

**Detection of *Piper yellow mottle virus* on black pepper (*Piper nigrum*) in the States of Minas Gerais, Espírito Santo and Amazonas, Brazil.**

The largest Brazilian states where black pepper (*Piper nigrum* L.) is cultivated are Pará, Espírito Santo, Bahia and Minas Gerais. However, diseases such as viruses have been contributing to reduce pepper Brazilian production. *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) and an unidentified isometric particle have been reported but PYMoV has been so far reported only in the State of Pará. Chlorosis, mottling, mosaic, vein discoloration, leaf distortion, stunting and reduced numbers of berries per spike are the main symptoms showed by infected plants. The PYMoV is spread by mealybugs and infected stem cuttings and seedlings. In the state of Pará, PYMoV is widespread and occurs in higher incidence than CMV. The fact that PYMoV is transmitted by infected stem cutting and seedlings led to the hypothesis that pepper crops from other Brazilian states were also infected by this

virus. In order to evaluate the incidence of PYMoV, leaf samples were collected in pepper crops in the States of Minas Gerais, Espírito Santo and Amazonas. About 21 samples from Amazonas, 11 from Minas Gerais and 11 from the Espírito Santo were

evaluated. PYMoV was detected in all states, and probably it was introduced in those states through infected stem cuttings.

**Keywords:** PYMoV, dissemination, *Piper nigrum* L.

Considerada uma das principais especiarias no mundo, a pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) tem grande importância para o comércio agrícola, sendo o Vietnã o maior produtor e exportador, seguido da Índia, Indonésia e Brasil. A produção brasileira de pimenta do reino, prevista para a safra 2009/2010, é de 35 mil toneladas, 90% produzidas no Pará, onde os maiores polos produtores são Castanhal, Tomé-Açu e Baião. O setor gera cerca de 25 mil empregos diretos e 100 mil indiretos. Durante a colheita, que dura de três a quatro meses, são mobilizadas 50 mil pessoas. Na última safra, a cultura gerou ao estado do Pará uma receita de US\$ 90 milhões. De 1999 a 2008 foram US\$ 783 milhões (Sampaio, 2009). Os estados do Espírito Santo, Bahia, Minas Gerais, Maranhão, Ceará e Paraíba são responsáveis por cerca de 10% da produção brasileira. A produtividade média, que já foi de 3 a 3,5 ton/ha, hoje é de 2,5 ton/ha devido, principalmente às doenças e dentre elas as viroses.

No Brasil, já foram relatados os vírus *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) e um isométrico ainda não identificado, sendo os dois primeiros verificados no Estado do Pará. O PYMoV causa os sintomas de deformação foliar, mosqueado, mosaico, clareamento das nervuras, manchas cloróticas (Figura 1) e redução da produção de frutos (Albuquerque et al., 1999; Brioso et al., 2000; Duarte et al. 2000). No estado do Pará este vírus já identificado nos municípios de Tomé-Açu, Santa Izabel do Pará, Acará, Altamira, Abaetetuba, São Francisco, Peixe Boi, Moju, Mocajuba, Belém e Baião, agravando as perdas de produção da cultura (Pantoja et al, 2009). O PYMoV já foi detectado nas cultivares Guajarina, Cingapura, Bragatina, Perumkodi, Balankota, Apra, Kuthiravally, Kotanadan, laçará e Pannyur (Boari et al. 2009; Pantoja et al. 2008).

Segundo Silva (2002), o PYMoV pode ser transmitido pela cochonilha *Planacoccus citri* e pelo percevejo de renda *Corythucha ciliata* e, segundo Bhat et al. (2003), pela cochonilha *Ferrisia virgata*, por enxertia e mecanicamente.

Nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo apenas o CMV foi relatado infectando pimenteiros do reino (Maciel-Zambolim et al., 1990).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar amostras de folhas de pimenteira do reino provenientes dos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Amazonas quanto a presença do PYMoV.

Os resultados obtidos darão subsídios à elaboração de estratégias de controle da virose de pimenta do reino.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas amostras de pimenta do reino dos municípios ou capital: Manaus-AM (21 amostras), Boacaiúva-MA (11 amostras) e Linhares-ES (11 amostras). As amostras

de Manaus foram provenientes da unidade de observação da Embrapa Amazônia Ocidental. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e imediatamente encaminhadas para o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Ocidental, Belém-PA para serem analisadas quanto à presença do PYMoV utilizando o teste molecular PCR. De Minas Gerais avaliaram-se amostras dos cultivares Cingapura e Apra; do Espírito Santo Guajarina, Uruacu, Cingapura, Apra, Kotanadan, Bragatina, Espírito Santo e Iaçará; e do Amazonas os cultivares Kuthiravally, Iaçará, Cingapura, Guajarina, Bragatina e Apra.

Para realizar o teste de PCR fez-se a extração de ácido nucléico a partir de folhas novas, segundo o protocolo de Gibbs & Mackenzie (1997), modificado. Cem miligramas do tecido foliar foi macerado em almofariz gelado com 1,6 mL do tampão de lavagem (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0; 2 M NaCl e BSA a 0.05%) juntamente com 10 µL do antioxidante β-mercaptoetanol. Após a centrifugação a 13.000 rpm e descarte do sobrenadante foram adicionados 800 µL do Tampão CTAB (2% CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide); 1.4 M NaCl; 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 e 0,5% de β-mercaptoetanol). Depois de misturado este foi colocado em banho maria a 55°C por 15-30 minutos. Em seguida, foram homogeneizados com 800 µL de clorofórmio:isoamílico (24:1) e centrifugados a 13.000 rpm e então transferiu a fase aquosa para um novo aonde repetiu-se uma vez a clarificação do extrato. Coletou-se 600 µL da fase aquosa e foram adicionados 600 µL de isopropanol e 60 µL de acetato de amônio 7,5M e posteriormente incubados por 1 hora no freezer. Após centrifugação o sedimento foi lavado com álcool 70% e posteriormente secados, ressuspendido com 50 µL de água ultrapura autoclavada e armazenados a -20 °C.

Em seguida, fez-se o teste de PCR e para isso foram utilizados 3 µL do ácido nucléico, 3 µL do tampão de reação 10X, 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,25 µL de dNTP (10 mM), 0,15 µL da Taq DNA Polimerase, 0,25 µL dos *primers* específicos para PYMoV e 16,6 µL de água ultrapura. A reação consistiu de 30 ciclos de 94 °C, 49,5 °C e 72 °C, com duração de um minuto além de uma extensão de 72 °C por 10 minutos. Fragmentos de DNA foram observados e fotografados sob luz UV após a corrida eletroforética em gel de agarose (1,0%) e coloração em GelRed.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O PYMoV foi detectado, por meio do PCR, nas amostras provenientes dos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Amazonas (Figura 2). Em Minas Gerais o PYMoV foi detectado em duas amostras, uma do cultivar Apra e outra de Cingapura; Em Espírito Santo foi detectado em três de amostras: de Uruacu, bragatina e uma não identificada; no Amazonas também foi detectado em três amostras sendo uma amostra do cultivar Kuthiravally, uma de Cingapura e outra de Apra.

O fato da pimenteira do reino ser de propagação vegetativa contribui para a disseminação do vírus por meio da comercialização de estacas e/ou mudas. Em uma avaliação prévia observou-se que o principal vírus que ocorre no estado do Pará é o PYMoV e não o CMV como se imaginava por esse último ser disseminado por pulgões. Outra observação importante no estado do Pará é o desconhecimento dos sintomas de viroses por parte dos produtores, viveiristas, fiscais agropecuários e extensionistas. Além da comercialização de mudas infectadas pelos viveiristas o que agrava ainda mais a disseminação do vírus no Brasil.

## AGRADECIMENTOS

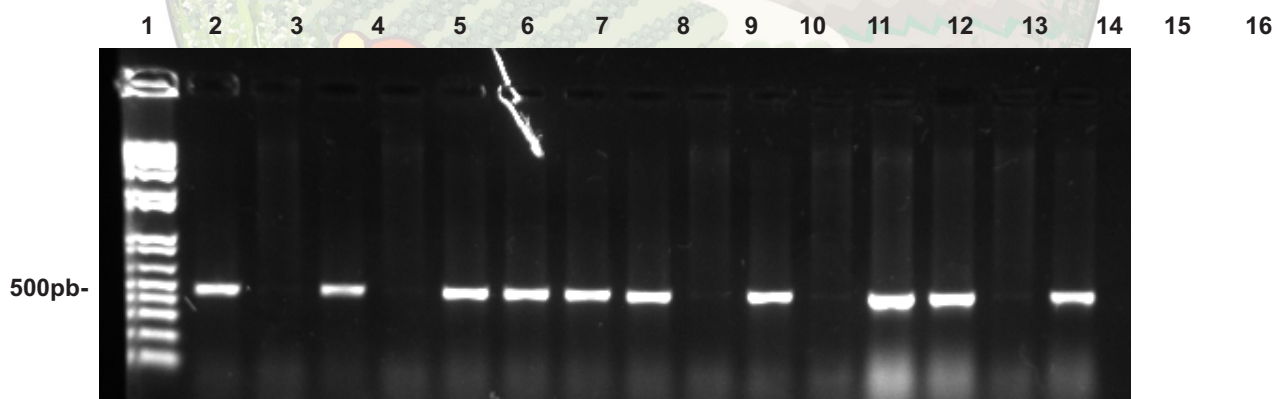
Ao CNPq e FINEP pelo apoio financeiro e bolsas.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE FC; TRINDADE DR; POLTRONIERI LS; DUARTE, ML R; BRIOSO PST; REZENDE JAM; KITAJIMA EW. 1999. Evidências preliminares da ocorrência do vírus do mosqueado da pimenteira-do-reino (*Piper yellow mottle virus* - PYMoV) no Brasil. 1999. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, XXII, 36. Anais... Jaboticabal: UNESP. p. 36.
- BHAT AI; DEVASAHAYAM S; SARMA YR; PANT RP 2003. Association of a Badnavirus in black pepper (*Piper nigrum* L.) transmitted by mealbug. *Current Science*, 84:1547-1550.
- BOARI AJ; OLIVEIRA, ACS; PANTOJA KFC; TREMACOLDI CR; SOUZA CA; SOUSA, C. M. 2009. Avaliação do banco de germoplasma de pimenteira-do-reino quanto à presença de *Piper yellow mottle virus*. 2009. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 35. Anais ... São Pedro-SP: SPF p.35.
- BRIOSO PST; POZZER L; SILVA S; KITAJIMA EW; POLTRONIERI, LS; DUARTE MLR. 2000. Amplificação de fragmento específico do PYMoV a partir de pimenta do reino. In: XXXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 438. Anais ... Belém – PA: SBF p. 438.
- DUARTE MLR; ALBURQUEQUE FC, POLTRONIERI LS; TRINDADE DR; KITAJIMA EW; BRIOSO PST. *Mosqueado amarelo da pimenta-do-reino*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000, 20 p. (Embrapa Amazônia Oriental, Documentos, 62).
- GIBBS A; MACKENZIE A. 1997. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *Journal of virology methods* 63: 9-16.
- MACIEL-ZAMBOLIM E; CARVALHO MG; MATSUOKA K 1990. Caracterização parcial do vírus do mosaico do pepino isolado da pimenta-do-reino. *Fitopatologia Brasileira*, 15:220-225.
- PANTOJA KFC; BOARI AJ; OLIVEIRA ACS; SOUZA CM; SOUZA, CA. 2009. Levantamento de viroses em pimenteira-do-reino no estado do Pará. In: 7º SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRA E 13º SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA 61. Anais .... Belém-PA: p. 61.
- SAMPAIO L. Comunidade Internacional debaterá a produção de pimenta do reino. Disponível em <http://www.sagri.pa.gov.br/?q=node/292>, acessado em 03 de maio de 2010.
- SILVA DPP DE; JONES P; SHAW MW. 2002. Identification and transmission of *Piper yellow mottle virus* and *Cucumber mosaic virus* infecting black pepper (*Piper nigrum*) in Sri Lanka, *Plant Pathology* 51: 537–545.



**Figura 1.** Planta de pimenta do reino com sintomas de viroses e redução de frutos. (Symptoms on PYMoV-infected black pepper plant). Belém-PA, Embrapa Amazônia Oriental, 2010.



**Figura 2.** Produtos do PCR de PYMoV. 1. Marcador 1 kb ladder; 2. Controle positivo PYMoV; 3. Controle sadio; 4. Cingapura AM; 5. Bento BAG; 6. Kuthiravally AM; 7. Apra - AM; 8. Apra - MG; 9. Cingapura - MG; 10. Bento - BAG; 11. Uruacu - ES; 12. Bento - BAG; 13. Bragantina ES; 14 cv. não identificada - ES; 15. Bento - BAG; 16. Apra BAG. (PCR products of PYMoV. 1. Plus 1kb ladder; 2. Positive control, 3. Negative control, 4. Cingapura - AM; 5. Bento - BAG; 6. Kuthiravally - AM; 7. Apra - AM; 8. Apra - MG; 9. Cingapura - MG; 10. Bento - BAG; 11. Uruacu - ES; 12. Bento - BAG; 13. Bragantina - ES; 14 non identified cv. - ES; 15. Bento - BAG; 16. Apra - BAG). Belém-PA, Embrapa Amazônia Oriental, 2010.