

Avaliação do Banco Ativo de Germoplasma de Pimenteira-do-Reino Quanto a Virose e Elaboração de Estratégia de Controle



ISSN 1517-2201

Outubro, 2008

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Oriental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos343

Avaliação do Banco Ativo de Germoplasma de Pimenteira- do-Reino Quanto a Virose e Elaboração de Estratégia de Controle

Alessandra de Jesus Boari

Embrapa Amazônia Oriental
Belém, PA
2008

Esta publicação está disponível no endereço:
http://www.cpatu.embrapa.br/publicacoes_online

Embrapa Amazônia Oriental

Tv. Dr. Enéas Pinheiro, s/n.
Caixa Postal 48. CEP 66095-100 – Belém, PA.
Fone: (91) 3204-1000
Fax: (91) 3276-9845
sac@cpatu.embrapa.br

Comitê Local de Editoração

Presidente: Moacyr Bernardino Dias-Filho
Secretário-Executivo: Walkymário de Paulo Lemos
Membros: Adelina do Socorro Serrão Belém
Ana Carolina Martins de Queiroz
Célia Regina Tremacoldi
Luciane Chedid Melo Borges
Vanessa Fuzinatto Dall’Agnol

Revisão Técnica: Célia Regina Tremacoldi – Embrapa Amazônia Oriental

Supervisão editorial: Adelina Belém
Supervisão gráfica: Guilherme Leopoldo da Costa Fernandes
Revisão de texto: Luciane Chedid Melo Borges
Normalização bibliográfica: Adelina Belém
Editoração eletrônica: Ione Sena
Foto da capa: Alessandra de Jesus Boari

1ª edição

Versão eletrônica (2008)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Amazônia Oriental

Boari, Alessandra de Jesus

Avaliação do banco ativo de germoplasma de pimenteira-do-reino quanto a virose e elaboração de estratégia de controle / Alessandra de Jesus Boari .--
Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2008.

22p. : il. ; 21 cm. – (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 343)

ISSN 1517-2201

1. Planta para condimento. 2. Produção vegetal. 3. Doença fungica. 4. Virose vegetal. 5. Controle cultural. I. Título. II. Série.

CDD 633.84

© Embrapa 2008

Autora

Alessandra de Jesus Boari

Engenheira Agrônoma, Doutora em Fitopatologia,
Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental,
Belém, PA.

ajboari@cpatu.embrapa.br

Apresentação

A cultura da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) tem grande importância socioeconômica nos estados do Norte do Brasil, principalmente no Pará, que está entre os principais produtores, juntamente com: Espírito Santo, Maranhão, Paraíba, Ceará, Amapá, Bahia e Minas Gerais.

Apesar de ser responsável por mais de 80 % da exportação brasileira, sua produção tem sido afetada por doenças, dentre elas as causadas por vírus como o *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Piper yellow mottle virus* (PYMoV). Embora esses vírus já tenham sido relatados no Brasil, há poucos estudos referentes às viroses que afetam essa cultura.

Atualmente, há o agravante de muitas cultivares/aceessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de pimenta-do-reino, o único do Brasil, situado na Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA, apresentarem sintomas característicos de viroses. No passado, ocorreu uma grande erradicação de acessos e cultivares (mais de 20) do BAG na tentativa de eliminar as fontes de inóculos de PYMoV, o que levou a uma perda inestimável de recursos genéticos.

O presente documento “Avaliação do Banco Ativo de Germoplasma de pimenta-do-reino quanto a virose e elaboração de estratégia de controle” é resultante das atividades realizadas durante o período probatório da pesquisadora Alessandra de Jesus Boari e teve o objetivo de avaliar a situação do BAG em relação a viroses para estabelecer estratégias de controle.

Cláudio José Reis de Carvalho

Chefe-Geral da Embrapa Amazônia Oriental

Sumário

Avaliação do Banco Ativo de Germoplasma de Pimenteira- do-Reino Quanto a Virose e Elaboração de Estratégia de Controle	9
Introdução	9
Objetivos	13
Material e Métodos	14
Resultados e Discussão	16
Conclusão	20
Referências	21

Avaliação do Banco Ativo de Germoplasma de Pimenteira-do-Reino Quanto a Virose e Elaboração de Estratégia de Controle

Alessandra de Jesus Boari

Introdução

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma especiaria de grande importância para o comércio agrícola internacional, sendo a Índia o maior produtor, seguido do Vietnã, do Brasil e da Indonésia.

Embora o Pará possua a maior área colhida e produção (88 %), sua produtividade é baixa (média de 2.364 kg/ha) em relação ao Espírito Santo, cuja produtividade é de 3.638 kg/ha (IBGE, 2007). Vários fatores contribuem para a baixa produtividade e dentre eles se encontram as doenças, como as viroses.

No Brasil, já foram relatados os vírus *Cucumber mosaic virus* e *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) e um isométrico ainda não identificado, sendo os dois primeiros verificados no Pará.

Há relatos de plantas com sintomas de viroses nos plantios nos municípios de Tomé-Açu, Santa Izabel do Pará, Acará, Altamira, Abaetetuba e Baião, agravando as perdas de produção da cultura. Todavia, não foram realizados testes diagnósticos mais detalhados sobre as espécies de vírus e incidências que ocorrem nesses municípios.

O CMV, pertencente ao gênero *Cucumovirus*, é transmitido por mais de 60 espécies de pulgões de maneira não-circulativa e já foi relatado causando doenças em mais de 1.000 espécies de plantas, dentre elas a pimenta-do-reino.

No Brasil, o CMV foi relatado pela primeira vez em pimenta-do-reino em lavouras de Tomé-Açu, no Pará (COSTA et al., 1970) e, atualmente, está presente em outros estados, como Minas Gerais e Espírito Santo (MACIEL-ZAMBOLIM et al., 1990). Os sintomas causados pelo CMV variam com a cultivar, mas geralmente são clorose, “flecks” cloróticos, mosaico, mosqueado, deformação e bolhosidade foliar, folhagens esparsas, enfezamento da planta, espigas curtas e falhadas e, conseqüentemente, queda de produção. Algumas vezes, nota-se a ocorrência de ramos assintomáticos (STEIN; ALBUQUERQUE, 1992).

Silva et al. (2002) conseguiram transmitir o CMV para indicadoras mecanicamente e pelo pulgão *Aphis gossypii*, mas não pelo *Myzus persicae*. Maciel-Zambolim et al. (1990) não conseguiram transmitir o CMV para plantas de pimenta-do-reino mecanicamente ou por pulgão. Esse vírus é constituído de três partículas isométricas com cerca de 30 nm, 3 RNAs genômicos e um subgenômico, ambos de fita simples.

Segundo Stein e Albuquerque (1992), o Banco de Germoplasma (BAG) de pimenta-do-reino (BAG) instalado em 1989 na Embrapa Amazônia Oriental já apresentava alta incidência de mosaico causado pelo CMV em cultivares e acessos. Das 30 cultivares/acessos, oito apresentaram sintomas de mosaico, sendo elas Apra (Uthirankotta), Cingapura-colchicina, Balankotta, Belantung, laçará-I, Kottanadan-II e Kuthiravally. Várias plantas do estande foram erradicadas naquela época com o objetivo de eliminar a fonte inócua e impedir a disseminação para o resto das plantas (ALBUQUERQUE et al., 1999).

Albuquerque et al. (1999) relataram a suspeita da existência de pimenteiros-do-reino com sintomas de mosqueado causado por *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) no BAG. Briosso et al (2000) detectaram partículas baciliformes pertencentes ao gênero *Badnavirus*. O PYMoV já foi relatado como sendo disseminado pelas cochonilhas *Planacoccus*

citri, *Diconocoris distantii* (SILVA et al., 2002), *Ferrisia virgata*, pelo percevejo de renda *Corythucha ciliata* (BHAT et al., 2003), por enxertia e mecanicamente, mas não por sementes (SILVA et al., 2002). No Brasil, de acordo com Duarte et al. (2000), a cochonilha *Pseudococcus elisae* se encontrava sempre associada ao mosqueado da pimenta-do-reino, mas não foi realizado o teste de transmissão para confirmá-la como vetora do PYMoV.

A doença mosqueado-amarelo, causada PYMoV, se caracteriza pelo aparecimento de pontos cloróticos brilhantes dispersos na folha ou entre as nervuras. As folhas são deformadas com bordas onduladas. Também ocorre folhagem raleada e, conseqüentemente, redução no tamanho e número de frutos por espiga.

O PYMoV pertencente ao gênero Caulimovirus é constituído de partículas baciliformes de 125 nm x 30 nm de dimensão, com DNA de fita dupla (SILVA et al., 2002).

Em 2000, 22 cultivares/acessos foram erradicadas em virtude do aparecimento de plantas com PYMoV ou sintomas característicos de PYMoV. São elas: Guajarina INATAM, Kudaravally, Trang, Djambi, Belantung, Chumala, Clone 1558, Panniyur-2, Kav, Kotavally, PMKK, Uthirankotta, Panniyur-Cenargen, Clone S-1, Balankotta Jones (Porto Rico), Diemberg, Espírito Santo (pimenta-da-terra – introdução no séc. 17), Pará (pimenta-da-terra – introdução no século 17); Clone 239 (selecionado para sombreado), Cruzamento 5 x 10, *Piper attenuatum* (masculina e feminina); *Piper bettle* (informação verbal)¹. Essa erradicação representa uma grande perda ao BAG, já que atualmente genótipos têm preço inestimável. Além disso, a recuperação desses genótipos será bastante complicada, já que a Índia, centro de origem de pimenta-do-reino, não libera genótipos dessa cultura. As cultivares existentes atualmente no BAG são Guajarina, Bragantina, Cingapura, Kottanadan-1, Iacara-1, Karimunda (verdadeira), Balankotta, Perumkodi, Kuthiravally, Bento, Apra, Panniyur-3 e Karinkotta.

1 Dado fornecido pela Engenheira Agrônoma Maria de Lourdes Reis Duarte (Pesquisadora aposentada da Embrapa Amazônia Oriental) em 2007.

Segundo Maria de Lourdes Duarte (informação verbal)², o BAG de pimenta-do-reino está interditado desde 1995, em decorrência do aparecimento de PYMoV pela Secretaria de Fiscalização Agropecuária. Com a interdição, ficou proibida a doação ou liberação de genótipos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de pimenta-do-reino para outras instituições ou produtores.

A situação do BAG de pimenta-do-reino, único do Brasil, situado na Embrapa Amazônia Oriental, é preocupante, pois se encontra com muitas cultivares/acessos com sintomas típicos de viroses, fazendo-se necessária uma limpeza clonal, já que o BAG é muito importante para o programa de melhoramento e fornecimento de materiais para produtores.

Allard (1971) cita que o banco de germoplasma é fundamental na introdução de plantas, considerando-se este um método de melhoramento, com propósito de desenvolver variedades-elite a partir de programas de melhoramento genético. Esse autor, numa visão futurista em 1971, já argumentava que a introdução de germoplasma teria um papel de menor importância na produção de variedades com interesse comercial, mas seria fundamental na criação de reservatórios de genes que ficariam à disposição dos melhoristas.

A única maneira para recuperar o BAG de pimenta-do-reino é realizar a limpeza das cultivares/acessos pelo uso da cultura de ápice caulinar ou cultura de meristema associada à termoterapia.

A termoterapia consiste na exposição da planta ou parte dela a altas temperaturas por um período determinado e, posteriormente, realiza-se a cultura de ápice caulinar ou meristema. Esse tratamento aumenta as chances de se obter explantes livres de vírus. A eficiência dessa técnica já foi comprovada, por exemplo, em cana-de-açúcar, batata, alho, mandioca e uva. As temperaturas utilizadas variam de 30 °C a 40 °C por períodos de 60 a 150 dias, variando de espécie para espécie. Há várias hipóteses sobre os efeitos da termoterapia sobre a inativação do vírus. Alguns acreditam que a multiplicação do vírus é inibida nesse processo, outros apostam na

2 Idem.

ocorrência de uma redução da movimentação das partículas virais na planta infectada. No entanto, atualmente, há um grande consenso de que, na verdade, a termoterapia não inativa o vírus, mas impede que ele infeccione as brotações desenvolvidas durante o tratamento. Somente pela adoção de técnicas laboratoriais como a cultura de tecidos e a termoterapia, é possível a obtenção de plantas saudáveis a partir de uma planta infectada por vírus. Países onde a viticultura tem longa tradição há muito estabeleceram sistemas de limpeza clonal e distribuição de material propagativo. No Brasil, a Embrapa Uva e Vinho e outras instituições oficiais têm, ao longo de anos, desenvolvido programas de produção e comercialização de material propagativo e matrizes de videira livre de vírus. Para limpeza clonal de uva, tem-se utilizado termoterapia associada à cultura de meristemas (BARLASS et al., 1982), microenxertia, ou cultura de ápices caulinares (MARTELLI; SAVINO, 1994; BARLASS et al., 1982).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o Banco Ativo de Germoplasma de pimenteira-do-reino quanto a virose e elaborar estratégia de controle.

Objetivos

Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é avaliar o BAG de pimenteira-do-reino quanto à presença do CMV e PYMoV e estabelecer estratégia de controle.

Objetivos Específicos

1. Avaliar por sintomatologia as cultivares/acessos do BAG de pimenteira-do-reino.
2. Testar cada cultivar/acesso quanto à presença de CMV e PYMoV no BAG de pimenta-do-reino por meio de PCR e RT-PCR.

Material e Métodos

Avaliação das cultivares/aceessos do BAG de pimenteira-do-reino

Avaliação visual das cultivares/aceessos do BAG

Inicialmente, as plantas do BAG foram devidamente etiquetadas recebendo uma identificação com o nome da cultivar e uma numeração.

Plantas do BAG foram avaliadas visualmente quanto aos sintomas característicos de viroses em pimenteira-do-reino. Os sintomas foram anotados e fotodocumentados.

Avaliação por teste sorológico ELISA e RT-PCR para CMV e PCR para PYMoV

Obtenção das amostras

Folhas jovens de pimenteira-do-reino do BAG foram colhidas, acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e levados para o laboratório para execução das análises.

Teste sorológico ELISA-indireto para CMV

Previamente, foi realizado um teste para verificar a viabilidade do ELISA indireto para a detecção do CMV em amostras de plantas de pimenta-do-reino.

Vinte plantas do BAG foram testadas por meio da maceração de 200 mg de folha jovem com 2 mL de tampão carbonato de sódio adicionado de BSA (0,2 %) e dos antioxidantes Na-dieca e PVP (2 %) para evitar a oxidação do extrato. Como controles positivos, foram utilizadas folhas de fumo 'TNN' e pimenteira-do-reino infectadas pelo CMV e, como controles sadios, folhas de fumo e pimenteira-do-reino sadias. Esse extrato foi colocado em microtubos de 1,5 mL e armazenado em freezer -20 °C.

Em cada cavidade da placa de microtitulação foram colocados 50 μ L de cada amostra. Fez-se a amostragem em duplicata. Após a incubação a 37 °C por 1 hora e 30 minutos, fez-se a lavagem das placas com tampão PBS-Tween e, em seguida, adicionou-se o anticorpo específico para o CMV diluído (1:1000) em tampão PEP (PBS-T, PVP e BSA). Depois da incubação a 37 °C por uma hora, foi feita a lavagem da placa com

PBS-Tween e, posteriormente, adicionou-se 50 μL do anticorpo anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina diluído em tampão PEP (1:5.000), sendo a placa incubada novamente a 37 °C por 1 hora em estufa. Após a lavagem da placa, fez-se a adição de 50 μL do substrato paranitrofenil fosfato (5 mg/mL) diluído em tampão de dietanolamina e incubação no escuro para revelação das amostras infectadas. A cada 15 minutos, fez-se a avaliação na leitora de placa.

Teste molecular PCR

A extração de ácido nucléico total foi feita a partir de folhas jovens de plantas do BAG, segundo o protocolo de Gibbs e Mackenzie (1997), modificado, para detecção de CMV e PYMoV. Cem miligramas de folha jovem foram macerados com 900 μL de tampão de lavagem (Tris-HCl, EDTA, 2M NaCl, BSA e 2-Me) e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso com 900 μL de tampão CTAB (2 % CTAB, Tris-HCl, 1.2 M de NaCl, 2-Me) e incubado em banho-maria a 55 °C por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 500 μL de clorofórmio e homogenizou-se por 2 minutos para então realizar a centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa (700 μL) foi recolhida, transferida para novo microtubo e novamente clarificada com clorofórmio. Após a centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, 400 μL da fase aquosa foram transferidos para um novo microtubo, onde foram adicionados 400 μL de isopropanol e 40 μL de acetato de amônio (7.5 M), homogeneizados e mantidos a -20 °C por 1 hora. Após centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, o sedimento de ácido nucléico foi lavado com álcool 70 % e, posteriormente, seco e ressuspenso com 50 μL de água ultrapura. A qualidade da extração do ácido nucléico foi observada por meio da eletroforese em gel de agarose (1,0 %) e coloração com brometo de etídeo. Quando se observou a presença dos RNAs ribossômicos 18S e 28S, a extração foi considerada boa para a realização do teste de RT-PCR.

Para a detecção do CMV, a síntese de cDNA foi realizada utilizando-se 5 μL de RNA total, 1 μL de primer anti-senso e 8 μL de água ultrapura, que foram submetidos a 70 °C por 10 minutos e acondicionados imediatamente em gelo por 1 minuto. Após a adição de 5 μL de tampão 5X, 1 μL dNTP e 1 μL de transcriptase reversa, incubou-se a 37 °C por 50 min para proceder

à amplificação do cDNA. Para a realização do teste de RT-PCR, utilizou-se 5 μ l do cDNA, 5 μ l do tampão de reação 10X, 3 μ l de $MgCl_2$ (25 mM), 1 μ l de dNTP (10 mM), 1 μ l da Taq DNA Polimerase, 1 μ l dos primers específicos para CMV (CMV1 – 5' GCCGTAAGCTGGATGGACAA 3' e CMV2 – 5' TATGATAAGAAGCTTGTTCGCG 3') e 33 μ l de água ultrapura. A reação consistiu de 35 ciclos de 94 °C/30", 55 °C/30" e 72 °C/2' e uma extensão de 72 °C por 10 minutos.

Para detecção do PYMoV, utilizou-se os primers PYMoV-F (5' TAACAGGAC TAGGGATCG e PYMoV-R (CAGCTGGTCTTCTTGATAATA 3' e a reação consistiu de 30 ciclos de 94 °C, 49,5 °C e 72 °C, com duração de 1 minuto, além de uma extensão de 72 °C por 10 minutos. Fragmentos de DNA foram observados e fotodocumentados após a corrida eletroforética em gel de agarose (1,0 %) e coloração em brometo de etídio.

Resultados e Discussão

Avaliação visual de cultivares/aceessos do BAG

Observou-se que das 13 cultivares/aceessos do BAG, dez apresentam sintomas característicos de viroses, como mosaico amarelo, pontos cloróticos, deformações foliares, subcrescimento e limbo foliar ondulado. Nas cultivares Apra, Karimunda, Karinkota e Kuthiravally, foi observado o sintoma de ondulamento foliar característico do mosqueado amarelo causado pelo Badnavirus *Piper yellow motlle virus*. As cultivares Cingapura, Balankota, Pannyur-3, Iacara, Kottanadan e Perumkodi apresentaram pontos cloróticos e, eventualmente, o mosaico (Fig. 1). Geralmente, os sintomas de viroses em plantas lenhosas variam de acordo com o ambiente no decorrer o ano. Plantas das cultivares Bragantina, Guajarina e Bento não apresentaram sintomas aparentes, sugerindo uma possível tolerância ou resistência a viroses.

Fotos: Alessandra de Jesus Boari.

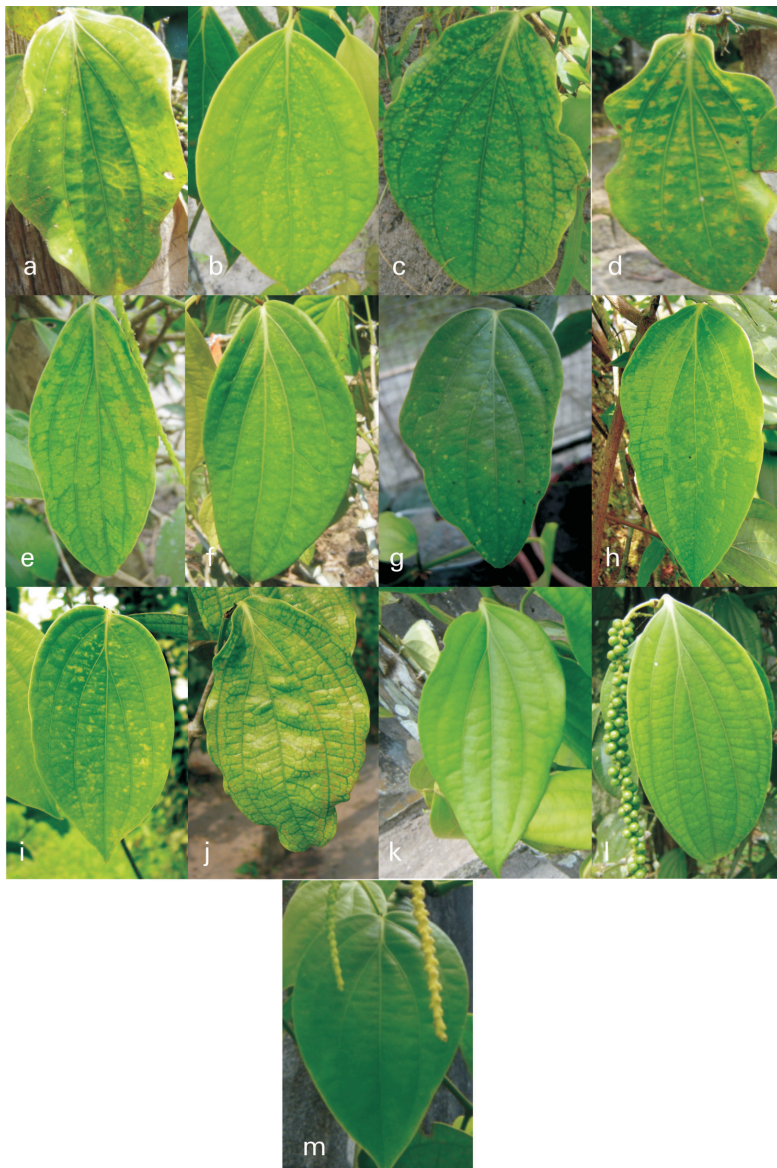


Fig. 1. Sintomas de viroses em cultivares/aceessos do Banco Ativo de Germoplasmas de pimenta-do-reino. a) Apra, b) Cingapura, c) Karimunda, d) Kuthiravally, e) Perunkodi, f) Balankotta, g) Pannyur-3, h) Iacara, i) Kottanadan, j) Karinkotta, k) Guajarina, l) Bento, m) Bragantina.

Detecção de CMV e PYMoV em cultivares/acessos do BAG

ELISA-indireto

O protocolo de ELISA-indireto mostrou-se eficiente apenas quando é utilizada amostra de folhas muito jovens, pois folhas mais velhas induzem ao aparecimento de falso positivo em que se observa a coloração amarela das cavidades. Na literatura, há relatos de detecção do CMV utilizando o teste DAS-ELISA que, sabidamente, é mais sensível que ELISA-Indireta. Entretanto, conforme vários relatos na literatura, o teste PCR se mostra muito mais sensível que o ELISA, cerca de 1.000 vezes. Em virtude do problema de oxidação de extratos de folhas mais velhas que podem levar ao aparecimento de falso positivo e também à baixa sensibilidade do teste na detecção do CMV, optou-se por realizar a diagnose do BAG quanto à presença do CMV apenas por RT-PCR.

Extração de ácido nucléico total

A extração de ácido nucléico total utilizando o protocolo de Gibbs e Mackenzie (1997) modificado por meio da adição de 0,1 % de mercaptoetanol propiciou a formação de um sedimentado sem oxidação. Foram observadas as bandas de RNA ribossômicos 18S (1900 nts) e 28S (4700 nts) em todas as extrações de pimenta-do-reino (Fig. 2), indicando a boa qualidade da extração.

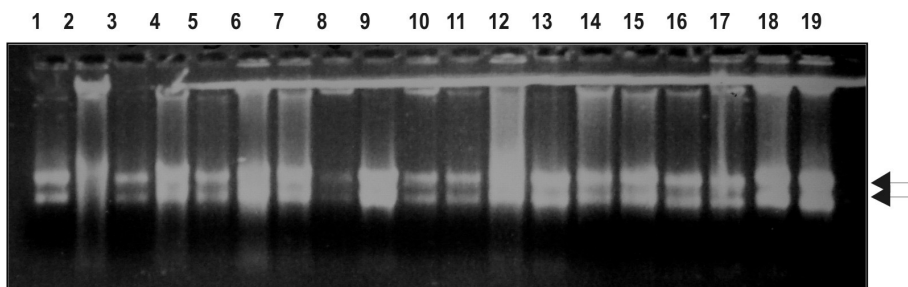


Fig. 2. Ácido nucléico total extraído a partir de folhas de pimenteira-do-reino do BAG. 1 a19: amostras de diferentes cultivares de pimenta-do-reino. As setas indicam as bandas de RNA ribossômico.

Foto: Alessandra de Jesus Boari.

RT-PCR de plantas do BAG para CMV

Não foi observada a banda de produto de PCR correspondente a dois terços do gene da capa protéica do CMV à região não-traduzida 3', aproximadamente 500 pb correspondente. Para plantas de membrana cultivar do BAG, observou-se que o par de primer utilizado permite a amplificação inespecífica de DNA de, aproximadamente, 300 pb, já que esta também foi observada no controle negativo, sadio (dados não mostrados).

PCR de plantas do BAG para PYMoV

Oito cultivares apresentaram-se positivas para o PYMoV: Bragantina, Guajarina, Pannyur, Balankota, Kuthiravally, Apra, Perunkodi, Kottanadan, Karimunda e Karinkotta. Foi observada a banda de 450 pb correspondente ao ORF I do PYMoV (Fig. 3). As cultivares Cingapura, Laçará e Bento não sinalizaram positivas para PYMoV, mas as duas primeiras apresentaram sintomas característicos de viroses. A cultivar Bento parece estar livre de vírus.

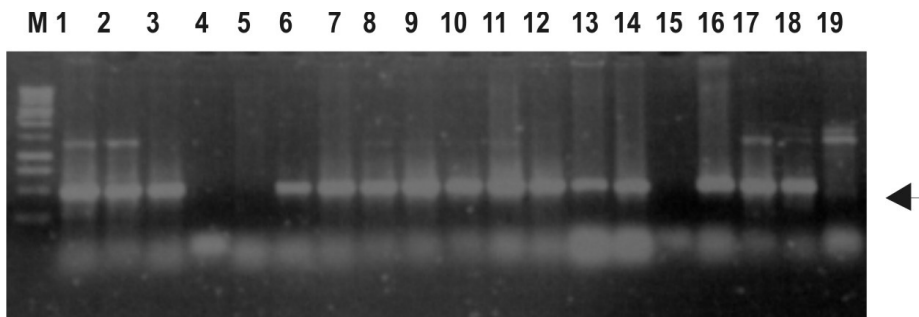


Fig. 3. PCR a partir de amostras de pimenteira-do-reino do BAG para detecção de Cucumber mosaic virus. M – marcador 1Kb ladder; 1 – controle positivo; 2 a 14 amostras das 13 cultivares/aceso de pimenta-do-reino do BAG. Seta indica a banda do PYMoV.

Foto: Alessandra de Jesus Boari.

As cultivares Bragantina e Guajarinas, embora não apresentem sintomas característicos de viroses, mostraram-se positivas para PYMoV. Assim, a diagnose de plantas de pimenta-do-reino por sintomatologia não é indicada.

Esse fato pode explicar a ineficiência da erradiação de plantas com suspeita de PYMoV realizada no passado.

As plantas da cultivar Cingapura e laçará continuarão a ser estudadas, já que, embora tenham apresentado sintomas de viroses, não foram positivas para nenhum dos vírus estudados (CMV e PYMoV). Há a possibilidade de existir uma terceira espécie viral no BAG ainda não identificada.

Estratégias a serem adotadas para o BAG

1. Continuar a proibição da saída de mudas a partir do BAG.
2. Realizar a limpeza clonal de pimenteira-do-reino com vírus por meio de cultura de tecido associada a termoterapia.
3. Implantar o novo BAG em estufa telada antiafídica.
4. Recuperar cultivares e acessos erradicados via Embrapa Recursos Genéticos quando obtidos de outros países.
5. Criar uma comissão multidisciplinar para o BAG da Embrapa Amazônia Oriental.

Conclusões

- Não foi detectada a presença do *Cucumber mosaic virus* – CMV no BAG de pimenteira-do-reino.
- Foi detectada a presença do *Piper yellow mottle virus* – PYMoV em dez das 13 cultivares/acessos do BAG.
- A sintomatologia não pode ser utilizada como um método de diagnose de viroses em pimenteira-do-reino.
- O protocolo de ELISA-indireto utilizado não é um teste apropriado para detecção de vírus na cultura de pimenta-do-reino por gerar falso positivo em amostras de folhas mais velhas.

Referências

- ALBUQUERQUE, F. C.; TRINDADE, D. R.; POLTRONIERI, L. S.; DUARTE, M. L. R.; BRIOSO, P. S. T.; REZENDE, J. A. M.; KITAJIMA, E. W. Evidências preliminares da ocorrência do vírus do mosqueado da pimenteira-do-reino (*Piper yellow mottle virus* - PYMV) no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25. p. 36, 1999. Edição dos Anais do XXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Jaboticabal, 1999.
- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 381 p.
- BARLASS, M.; SKENE, K. G. M.; WOODHAM, R. C.; KRAKE, L. R. Regeneration of virus-free grapevines using in vitro apical culture. **Annals of Applied Biology**, London, v. 101, p. 291-295, 1982.
- BHAT, A. I.; DEVASAHAYAM, S; SARMA, Y. R.; PANT, R. P. Association of a Badnavirus in black pepper (*Piper nigrum* L.) transmitted by mealbug. **Current Science**, Bangalore, v. 84, n. 12, p. 1547-1550, 2003.
- BRIOSO, P. S. T.; POZZER, L.; SILVA, S.; KITAJIMA, E. W.; POLTRONIERI, L. S.; DUARTE, M. L. R. Amplificação de fragmento específico do PYMV a partir de pimenta do reino. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, p. 438-438, 2000. Edição dos Anais do XXXIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Belém, PA, 2000.
- COSTA, A. S.; ALBUQUERQUE, F. C.; IKEDA, H.; CARDOSA, M. **Moléstia da pimenta do reino causada pelo vírus do mosaico do pepino**. Belém, PA: IPEAN, 1970. 18 p. (Série Fitotecnia, n. 1)
- DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R.; KITAJIMA, E. W.; BRIOSO, P. S. T. **Mosqueado amarelo da pimenta-do-reino**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 20 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 62).
- GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by Rt-PCR. **Journal of Virology Methods**, Stoneville, v. 63, p. 9-16, 1997.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola** - LSPA. Rio de Janeiro, 2007. 93 p.

MACIEL-ZAMBOLIM, E.; CARVALHO, M. G.; MATSUOKA, K. Caracterização parcial do vírus do mosaico do pepino isolado da pimenta-do-reino. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 15, n. 3, p. 220-225, 1990.

MARTELLI, G. P.; SAVINO, V. Fanleaf degenetaion. In: PEARSON, R.G.; GOHEEN, A. C. **Compendium of grape diseases**. St. Paul: APS Press, 1994. p. 48-49.

SILVA, D. P. P.; JONES, P.; SHAW, M. W. Identification and transmission of Piper yellow mottle virus and Cucumber mosaic virus infecting black pepper (*Piper nigrum*) in Sri Lanka. **Plant Pathology**, Somerset, v. 51, n. 5, p. 537–545, 2002.

STEIN, R. L. B; ALBUQUERQUE, F. C. Incidência de mosaico (CMV) em cultivares/acessos de pimenta-do-reino em Belém-PA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 17, n. 2, p. 178, 1992.



Amazônia Oriental