



**15^o Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
24 e 25 de agosto de 2011
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA**

**DETECÇÃO DE *Piper yellow mottle virus* EM ESPÉCIMES DE COCHONILHAS DE
PIMENTEIRA-DO-REINO POR MEIO DE PCR**

Cristiane Melo de Sousa¹; Késsia de Fátima da Cunha Pantoja²; Alessandra de Jesus Boari³

¹ Bolsista Pibit CNPq, ¹ Aluna do curso de Agronomia da UFRA, e-mail: cris.ufra@hotmail.com

² Bolsista DTI, Embrapa, E-mail: kessiapantoja@yahoo.com.br

³ Pesquisadora, Embrapa Amazônia Oriental, e-mail: ajboari@gmail.com

Resumo: A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) pode ser infectada pelos vírus *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) que podem causar grandes perdas na produção. Os sintomas causados por estes vírus são clorose, mosqueado, clareamento de nervuras, deformação foliar, nanismo e redução da produção de frutos. O CMV é transmitido por pulgões enquanto que o PYMoV é transmitido por cochonilhas. Nos plantios de pimenta-do-reino é comum a presença de cochonilhas, e no Brasil já foram relatadas como vetoras do PYMoV as espécies *Ferrisia virgata* e *Planococcus minor*. Segundo a literatura na Índia há outras espécies transmissoras. O objetivo deste trabalho foi o de verificar a adequação do teste de PCR para detecção do PYMoV em espécimes de cochonilhas. Foram colocadas vinte cochonilhas *F. virgata* e vinte *P. minor* para se alimentar em folhas infectadas pelo PYMoV, destacadas, por um período de 24hs. Dez de cada espécie tiveram seu ácido nucléico extraído separadamente para proceder o teste de PCR com *primers* específicos para PYMoV. Este trabalho dará subsídios para os estudos da interação cochonilha x PYMoV, além da elaboração de estratégia de inspeção da vetora no campo e mudas de pimenta-do-reino.

Palavras-chave: *Ferrisia virgulata*, *Planococcus minor*, *Piper nigrum* L.

Introdução

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) é de grande importância sócio-econômica para o Estado do Pará que é responsável por 80% da exportação brasileira. Entretanto, doenças como as viroses podem colaborar com a redução da produção.

O PYMoV já foi detectado nos Estados do Pará, Amazonas, Espírito Santo e Minas Gerais (Oliveira et al., 2010). Embora este vírus cause sintomas de deformação foliar, mosqueado, clareamento das nervuras, manchas cloróticas e redução da produção de frutos em plantas de pimenta-do-reino (Albuquerque et al., 1999), este já foi detectado em muitas plantas assintomáticas. Na Índia,



15^o Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
24 e 25 de agosto de 2011
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

Silva *et al.* (2002) verificaram que este vírus é 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. Já no Brasil, observou-se que o PYMoV é transmitido pelas cochonilhas *Ferrisia virgata* (Boari *et al.*, 2010) e *Planococcus minor* (Sousa *et al.* 2010) (Figura 1).

Este trabalho teve o objetivo de desenvolver protocolo para detectar o PYMoV em espécimes de cochonilhas via PCR (*polymerase chain reaction*) com *primers* específicos para o vírus, pois auxiliará nos estudos de relações vírus x vetor, além de dar subsídios para elaboração de estratégias de defesa fitossanitária de pimenta-do-reino.



Figura 1. Cochonilhas *Ferrisia virgata* [Cockerell] e *Planococcus minor* (Maskell) em planta de pimenta-do-reino.

Material e Métodos

Inicialmente, as cochonilhas *P. minor* (Figura 1A) foram multiplicadas em tubérculos de batata e *F. virgata* (Figura 1B) em mudas de palmeira ornamental. Em seguida, 20 espécimes de cada espécie foram colocadas para se alimentar em folhas destacadas de pimenteira do reino cv. Apra infectadas pelo PYMoV por um período de 14 horas.

Após isso, foi feita a avaliação do PYMoV em cochonilhas por meio de PCR (PYMoV). A extração de ácido nucléico para DNA e RNA foi feita a partir de uma única cochonilha, segundo o protocolo de Gibbs & Mackenzie (1997) modificado. Em seguida, foi realizado o teste de PCR e para isso foram utilizados 5 µl do ácido nucléico (5 a 10 ng/ µl), 5 uL do tampão de reação 5X, 3 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,5µL de dNTP, 0,15 uL da Taq DNA Polimerase, 0,25µl dos *primers* específicos para CMV e 10,85 uL de água ultra-pura



15^o Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
24 e 25 de agosto de 2011
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

O par de *primers* utilizado foi o PYMoV (F) 5' TAA CAG GAC TAG GGA TGG 3' e PYMoV (R) 5' CAG CTG GTC TTC TTG ATA ATA 3'.

A reação consistiu de 30 ciclos de 94 °C, 49,6 °C e 72 °C, com duração de um minuto para cada etapa (desnaturação de DNA, anelamento dos primers e extensão dos iniciadores). Fragmentos de DNA foram observados e fotografados sob luz UV após a corrida eletroforética em gel de agarose (1,0%) e coloração com Gel Red.

Resultados e Discussão

A extração de ácido nucléico total utilizando o protocolo de Gibbs & Mackenzie (1997) modificado, por meio da adição de 0,1% de mercaptoetanol propiciou a formação de um sedimentado sem oxidação. Observou-se as bandas de RNA ribossômicos em todas as extrações de cochonilhas, indicando a boa qualidade da extração (Figura 2A).

Foi observada a banda de 450 pb, aproximadamente, correspondente ao fragmento do gene proteína hipotética (ORF I) do PYMoV (Figura 2B).

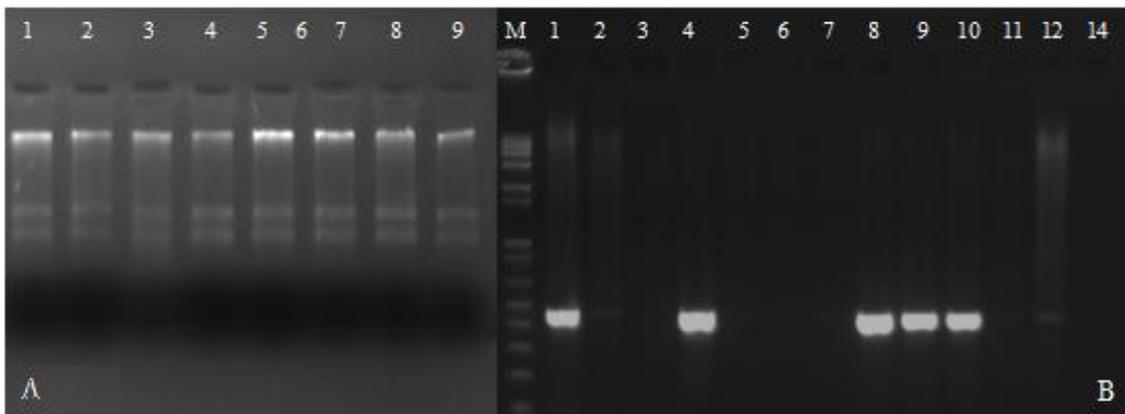


Figura 2. Gel de ácido nucléico extraído de espécimes de cochonilhas (A); Fragmento de DNA provenientes de PCR para PYMoV de um espécime de cochonilha (B).

Conclusões

O protocolo de extração de ácido nucléico e o método de PCR com primer específico para o vírus foi promissor para a detecção do vírus PYMoV nas duas espécies de cochonilhas.



15^o Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
24 e 25 de agosto de 2011
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

Agradecimentos

Ao CNPq, MAPA e FINEP que apoiaram financeiramente esta pesquisa.

Referências Bibliográficas

- 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* - PYMoV) no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 25., n.1, p. 36-36, 1999.
- 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**, v.84, n.12, p.1547-1550, 2003.
- BOARI, A. J.; OLIVEIRA, A.C.S; PRADO, E.; PANTOJA, K.F.C.; SOUSA, C.M. *Ferrisia virgata* (Cockerell): vetora do *Piper yellow mottle virus* da pimenteira do reino. In: 50 Congresso brasileiro de olericultura, 2010, Guarapari. **Anais** do 50 Congresso brasileiro de Olericultura. Brasília: Sociedade brasileira de horticultura, 2010. v. 28.
- GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of virology methods**, v. 63, p. 9-16, 1997.
- OLIVEIRA, A.C. S; BOARI, A. J.; SOUSA, C. M.; Pantoja, K.F.C.; SOUZA, C. A. Detecção de *Piper yellow mottle virus* da pimenteira do reino nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Amazonas. In: 50 Congresso brasileiro de olericultura, 2010, Guarapari. **Anais** do 50 Congresso Brasileiro de Olericultura. Brasília : Sociedade brasileira de horticultura, 2010. v. 28. p. 1-7.
- SOUSA, C. M.; BOARI, A. J. ; PRADO, E. ; PANTOJA, K. F. C. ; SOUSA, A. S. *Planococcus minor* Maskell: virus-vector to piper yellow mottle virus on black pepper. In: XXI Encontro Nacional de Virologia e V Encontro de Virologia do Mercosul, 2010, Gramado. **Anais**. Virus: reviews & research. Gramado: SBV, 2010. v. 15. p. 306-307.