

LEVANTAMENTO DE VIROSES EM PIMENTEIRA-DO-REINO NO ESTADO DO PARÁ

Késsia de Fátima da Cunha PANTOJA¹; Alessandra de Jesus BOARI²; Ana Carolina Sonsim de OLIVEIRA³; Cristiane Melo de SOUSA⁴; Caroline Amaral SOUZA⁵

Resumo

O estado do Pará é o principal produtor de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) no Brasil, seguido pelo Espírito Santo, Bahia, Minas Gerais, Maranhão, Ceará e Paraíba. Entretanto, os vírus *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) podem causar grandes perdas na produção. Os sintomas causados por estes vírus são clorose, mosqueado, mosaico, clareamento de nervuras, deformação foliar, nanismo e redução da produção de frutos. A propagação vegetativa contribui para a disseminação destes vírus no campo. O objetivo deste trabalho foi o levantar, por PCR, os vírus PYMoV e CMV no Banco Ativo de Germoplasma de pimenta-do-reino da Embrapa Amazônia Oriental e em amostras provenientes de nove municípios do estado do Pará. No BAG foi detectado PYMoV em dez das treze cultivares do BAG, mas não foi verificada a presença de CMV por meio do RT-PCR. O CMV foi detectado em dezesseis amostras provenientes dos municípios de Rondon do Pará, Baião, Mocajuba e São Francisco do Pará. O PYMoV foi detectado em trinta e quatro amostras de seis (Altamira, Baião, Mocajuba, São Francisco, Tomé-Açu e Abaetetuba) dos oito municípios avaliados.

Palavras-chave: *Piper nigrum* L., *Cucumber mosaic virus*, *Piper yellow mottle virus*.

Área do conhecimento: Área: Ciências Agrárias; Sub Área: Agronomia; Linha de pesquisa: Fitopatologia.

Introdução

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) é a especiaria mais consumida no mundo e é de grande importância para o comércio agrícola internacional, sendo o Vietnã o maior produtor e exportador, seguido da Índia, Indonésia e Brasil. Também é o mais importante produto agrícola de exportação do Estado do Pará. Entretanto, 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 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 pimenteira-do-reino, onde causa sintomas de mosaico, deformação foliar, clorose de nervuras, definhamento da planta e dano na produção. Foram detectadas partículas do *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) em plantas de pimenta-do-reino no Pará, causando os sintomas de deformação foliar, mosqueado, clareamento das nervuras, manchas cloróticas e redução

^{2,3} Pesquisadores da Embrapa Amazônia Oriental; Trav. Enéas Pinheiros, s/n Marco, CEP 66095-100, Belém-PA; E-mail: ajboari@cpatu.embrapa.br; ^{1,4 e 5} Alunas do curso de Agronomia da UFRA; Av. Presidente Tancredo Neves, Nº 2501; Bairro: Montese Cep: 66.077-530 Caixa Postal: 917; Belém-PA

da produção de frutos (Albuquerque *et al.*, 1999; Brioso *et al.*, 2000). Até o momento este vírus havia sido detectado apenas no estado do Pará.

Na Índia, Silva *et al.* (2002) verificaram que o PYMoV 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, Duarte *et al.* (2000) verificaram que a cochonilha *Pseudococcus elisae* se encontrava associada às plantas com sintomas de mosqueado, mas nenhum teste de transmissão foi realizado para confirmá-la como vetora.

Segundo Duarte *et al.* (2000) há relatos de plantas com sintomas de viroses nas principais áreas produtoras do Pará, Tomé-Açu, Santa Isabel do Pará, Acará, Altamira, Abaetetuba e Baião, agravando as perdas de produção da cultura. Entretanto, não foram realizados testes diagnósticos mais detalhados sobre as espécies de vírus e incidências relativas que ocorrem.

Desse modo, este trabalho visou identificar o PYMoV e CMV nas cultivares/acessos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental e lavouras em diferentes municípios do estado do Pará.

Os resultados obtidos darão subsídios à elaboração de estratégias de controle das viroses no BAG e Pará.

Material e Métodos

Inicialmente, foram coletadas preferencialmente folhas novas de 3 plantas de cada cultivar de pimenteira-do-reino do BAG (Bragantina, Guajarina, Pannyur-3, Balankota, Kuthiravally, Apra, Perumkodi Karinkotta, Cingapura, laçará, Kottanadan, Bento e Karimunda). Além disso, foram avaliadas 343 amostras provenientes de nove municípios e 33 propriedades, distribuídas entre os

cultivares Cingapura, Guajarina, Índia, Apra, Kottanadan, Balankota, laçará, Pannyur, Kuthiravally, sendo predominante o cultivar Cingapura. Também foram analisadas amostras com suspeitas de viroses provenientes dos estados do Amazonas (21 amostras), Minas Gerais (11 amostras) e Espírito Santo (11 amostras). As amostras foram devidamente identificadas com nome do cultivar, nome do proprietário e município. As amostras foram acondicionadas em caixa de isopor e levadas para o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental.

Foi feita a avaliação das amostras de pimenta-do-reino por meio do teste PCR (PYMoV) e RT-PCR (CMV) do BAG e lavouras.

A extração de ácido nucléico foi feita a partir de folhas com e sem sintomas de mosaico, segundo o protocolo de Gibbs & Mackenzie (1997), modificado. Para detecção de CMV inicialmente foi feita a síntese de cDNA utilizando a transcriptase reversa e para isso utilizou-se 5µL do ácido nucléico extraído. Em seguida, foi realizado o teste de PCR e para isso foram utilizados 5 µl do ácido nucléico, 2,5 uL do tampão de reação 10X, 1,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,5µL de dNTP (10 mM), 0,5 uL da Taq DNA Polimerase, 0,5µl dos *primers* específicos para CMV e PYMoV e 15 uL de água ultra-pura. A reação consistiu de 30 ciclos de 94°C, 53.4°C para detectar CMV e 49.5°C para detectar PYMoV e 72°C, com duração de um minuto além de uma extensão de 72 °C por 5 minutos. Fragmentos de DNA foram observados e fotografados sob luz UV após a corrida eletroforética em gel de agarose (0,8%) e coloração em brometo de etídio. Como controle positivo foi utilizado fumo infectado com CMV de pimentão infectado e como controle negativo foi utilizado folha de fumo sadio e *P. nigrum* proveniente de semente.

Resultados e Discussão

Na avaliação do BAG, verificou-se que dos treze cultivares avaliados dez apresentaram-se positivos para PYMoV e nenhum para o CMV. Apenas os cultivares Cingapura e Bento não reagiram positivas para o PYMoV, embora o primeiro cultivar apresente sintomas característicos de viroses. Plantas dos cultivares Bragantina e Guajarina embora tenham sido positivas para PYMoV, não mostraram sintomas típicos de viroses como mosaico, *fleck*, clorose das nervuras, ondulamento foliar, redução do limbo foliar e nanismo da planta. Assim, a sintomatologia não é adequada para ser utilizada como diagnose de plantas em relação às viroses.

No teste de PCR e RT-PCR de plantas provenientes de produtores de nove municípios do estado do Pará, observou-se que das 331 amostras avaliadas 13,29 % sinalizaram positivamente para vírus. Amostras provenientes dos municípios de Santa Isabel e Acará não sinalizaram positivamente para CMV e PYMoV, embora muitas delas tenham apresentado sintomas de viroses.

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 bandas de RNA ribossômicos 18S (1.900nts) e 28S (4.700 nts) nas extrações de pimenta-do-reino, indicando a boa qualidade da extração. O protocolo de extração de ácido nucléico foi promissor tanto para

detecção de CMV (RNAss) com PYMoV (DNA).

O par primer para CMV amplificou a banda esperada de cerca de 500pb, entretanto para a cultura de pimenta do reino observou-se também a amplificação de uma banda inespecífica de cerca de 400pb também vista em controle sadio de sadio de pimenta-do-reino (Figura 1). Das 343 amostras avaliadas 18 apresentaram-se positivas para o CMV, perfazendo 5,25% das amostras (Figura 1 e Tabela 1).

O par de primer para o PYMoV permitiu a amplificação de somente uma banda de 450pb (Figura 2). Das 343 amostras PYMoV foi detectado em 34, perfazendo 9,91% das amostras infectadas distribuídas em seis municípios do Pará.

Também foi observado que muitas amostras com sintomas característicos de viroses não sinalizaram nem para o CMV e nem para o PYMoV, indicando que possa haver um terceiro vírus ou uma variante do CMV ou PYMoV nas lavouras de pimenta-do-reino no estado do Pará. Primers utilizados pelos pesquisadores indianos foram testados, mas estes permitiram a detecção de CMV em um menor número de amostras. Assim, optou-se pelo par primer desenhado pelo par de primer de Wyllie *et al.* (1993), que permite a amplificação de um maior número de isolados de CMV.

O teste de PCR detectou o PYMoV em amostras provenientes de Minas Gerais, Espírito Santo e Amazônia, o que mostra que este vírus se encontra disseminado nas regiões produtores de pimenta-do-reino no Brasil.

Tabela 1. Avaliação de amostras de pimenta-do-reino quanto à presença de PYMoV e CMV, provenientes dos municípios do Estado do Pará.

Município	Nº de propriedades	Nº de amostras	Nº de amostras com PYMoV	Nº de amostras com CMV
Mocajuba	05	37	05	01
Baião	05	60	12	03
Rondon do Pará	01	04	00	04
Tomé-Açú	05	56	07	00
Santa Isabel	02	29	00*	00*
Abaetetuba	04	41	03	00
Acará	05	43	00*	00*
Altamira	01	12	03	00
São Francisco do Pará	04	61	04	08

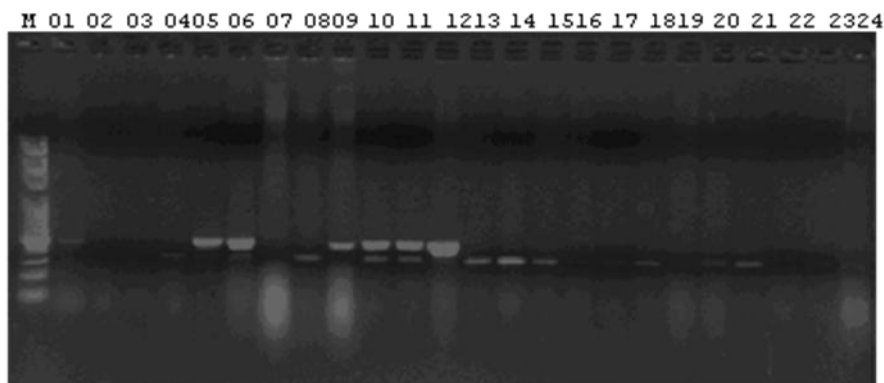


Figura 1. Teste de RT-PCR para *Cucumber mosaic virus* para amostras de produtores do Pará. M. Marcador Kb ladder, 1. Controle positivo; 2 e 3. Controle negativo fumo e *P. nigrum*, 4 a 24 amostras provenientes do município de São Francisco.



Figura 2. Teste de PCR para *Piper yellow mottle virus* para amostras de produtores de pimenta-do-reino do Pará. M. marcador Kb ladder, 1. controle positivo PYMoV; 2. controle negativo de *P. nigrum*, 3 a 24 amostras provenientes do Pará. Amostras 05 24 foram positivas.

Conclusões

Das 13 cultivares/acessos do BAG de pimenteira-do-reino, oito se encontram infectadas pelo PYMoV.

Novo BAG de pimenta-do-reino deve ser feito a partir de mudas sadias.

De 343 amostras coletadas em produtores de pimenta-do-reino 34 amostra foram positivas para PYMoV e 12 amostras sinalizaram positivas para CMV.

A diagnose por sintomatologia não pode ser a única metodologia utilizada para escolha de matrizeiros ou em inspeção.

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica e financiamento de parte do projeto (proc. 481138/2007-2), e aos produtores rurais.

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* - PYMoV) no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 25., n.1, p. 36-36, 1999. (resumo).

BRIOSO, P. S. T.; POZZER, L.; SILVA, S.; KITAJIMA, E. W.; POLTRONIERI, L. S.; DUARTE, M. L. R. Amplificação de fragmento específico do PYMoV a partir de pimenta do reino. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25. p. 438-438, 2000. (resumo).

DUARTE, M.L.R.; ALBURQUEQUE, F.C., POLTRONIERI, L.S.; TRINDADE, D.R.; KITAJIMA, E.W.; BRIOSO, P.S.T. **Mosqueado amarelo da pimenta-do-reino**. Belém: 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**, v. 63, p. 9-16, 1997.

LOCKART, B.E.L.; KIRATIYA-ANGUL, K.; SILVA, P. De; OLSZEWSKI, N.E.; LOCKHART, N.; DEEMA, N.; SANGALANG, J. Identification of *Piper yellow mottle virus*, a mealybug transmitted badnavirus infecting *Piper* spp. in Southeast Asia. **European of Plant Pathology**. v. 103, p. 303-311, 1997.

SILVA, D.P.P. DE; 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**, v. 51, n.5, p. 537-545, 2002.

WYLIE, S., WILSON, C.R., JONES, R.A.C. & JONES, M.G.K. A polymerase chain reaction assay for cucumbermosaic virus in lupin seeds. **Australian Journal Agricultural Research** 44:41-51. 1993.