

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA
TROPICAL**

Douglas Vicente do Carmo Lima

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PYMoV (*Piper
yellow mottle virus*) EM VIVEIRO COMERCIAL DE
PIMENTA-DO-REINO**

São Mateus – ES

Outubro de 2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA
TROPICAL**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PYMoV (*Piper
yellow mottle virus*) EM VIVEIRO COMERCIAL DE
PIMENTA-DO-REINO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Espírito
Santo, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação
em Agricultura Tropical, para a
obtenção do título de Mestre em
Agricultura Tropical.

Orientador: Prof. Dra. Andréia Barcelos Passos Lima Gontijo

São Mateus – ES

Outubro de 2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

L732d Lima, Douglas Vicente do Carmo, 1996-
Diagnóstico molecular de PYMoV (Piper yellow mottle virus) em viveiro comercial de pimenta-do-reino / Douglas Vicente do Carmo Lima. - 2021.
42 f. : il.

Orientadora: Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo.
Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo.

1. Pimenta-do-reino. 2. Reação em cadeia de polimerase. 3. Viroses de plantas. I. Gontijo, Andreia Barcelos Passos Lima. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Universitário Norte do Espírito Santo. III. Título.

CDU: 63

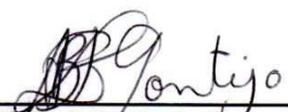
DOUGLAS VICENTE DO CARMO LIMA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PYMoV (*Piper yellow mottle virus*)
EM VIVEIRO COMERCIAL DE PIMENTA-DO-REINO**

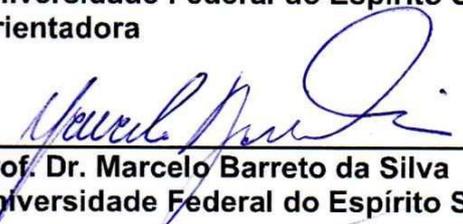
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agricultura Tropical.

Aprovada em 18 de outubro de 2021.

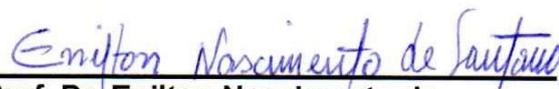
COMISSÃO EXAMINADORA



**Prof.ª Dr.ª Andreia Barcelos Passos
Lima Gontijo**
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora



Prof. Dr. Marcelo Barreto da Silva
Universidade Federal do Espírito Santo



**Prof. Dr. Enilton Nascimento de
Santana**
Incaper

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus pela vida e pela oportunidade de concluir essa etapa importante em minha vida;

À minha mãe Cristiane Maria, avó Darcy e tia Regiane por serem instrumentos de Deus em minha vida;

À Orientadora Dra. Andreia Barcelos pela orientação e paciência durante todo o processo;

À Lana Lírio, Gustavo Almeida pela parceria na execução dos trabalhos laboratoriais;

Ao João Paulo Rodrigues pelo apoio e amizade que foram fundamentais neste período.

Aos amigos especiais, Jailson Maurício, Rosane Rios e Ivani Damasceno que tanto me incentivaram para a realização deste projeto.

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	vi
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 Produção e importância econômica da Pimenta-do-reino	1
1.1.2 Propagação da espécie	2
1.1.3 Doenças que acometem a cultura	4
1.1.4 Estado nutricional como não parâmetro para diagnóstico viral	7
1.1.5 Uso da Cadeia da Polimerase (PCR) na detecção de doenças nas plantas patológicas	9
2. OBJETIVO	12
2.1 Objetivo específico	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Coleta do material	13
3.1.2 Extração de DNA total.....	14
3.1.3 Ensaio de PCR para detecção de PYMoV	16
4. RESULTADO	17
5. DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÃO	26
7. REFERÊNCIAS.....	27

RESUMO

LIMA, Douglas Vicente do Carmo; M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; Outubro de 2021; **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PYMoV (*Piper yellow mottle virus*) EM VIVEIRO COMERCIAL DE PIMENTA-DO-REINO**; Orientadora: Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo.

A pimenta preta (*Piper nigrum*) tem significativo valor econômico, sendo muito utilizada na indústria de alimentos e na saúde por suas particularidades bioquímicas. A infecção causada pelo PYMoV (*Piper yellow mottle virus*) em plantações e a agressividade dos sintomas têm influência direta nos prejuízos que são potencializados quando as mudas são afetadas. Embora as viroses possam ser assintomáticas, elas podem ser identificadas, principalmente pelos sintomas de mosaico, clareamento das nervuras e redução de frutos. Métodos que auxiliem na detecção precoce e segura podem ter benefícios diretos aos produtores. Objetivou-se com este trabalho avaliar a ocorrência de PYMoV em plantas matrizes de viveiro comercial de pimenta-do-reino por meio da técnica de PCR. Foram realizadas coletas de tecidos vegetais de 77 plantas (sintomáticas e assintomáticas) em um viveiro da região de Jaguaré-ES. Após a extração de DNA total, as amostras foram submetidas à reação de PCR com *primers* específicos para detecção de parte do genoma viral. Apenas 5 plantas (6,5%) testaram positivo para a presença do vírus, indicando uma baixa incidência do vírus no matrizeiro avaliado. Dentre as plantas analisadas houve casos em que sintomatologia visual foi confirmada pela PCR, casos em que a PCR negativa indicou que a planta não estava contaminada ou que o sintoma observado seria indicativo, por exemplo, de uma possível deficiência nutricional. Conclui-se que a técnica de PCR mostrou-se eficiente para a identificação molecular de PYMoV nas amostras avaliadas. Trabalhos desta natureza podem trazer benefícios diretos aos produtores, contribuindo para minimizar os danos e perdas a viveiristas e produtores de pimenta-do-reino.

Palavras-chave: *Piper nigrum*, PYMoV, PCR, viveiro

ABSTRACT

LIMA, Douglas Vicente do Carmo; M.Sc.; Federal University of Espírito Santo; October 2021; **MOLECULAR DIAGNOSIS OF PYMoV (*Piper yellow mottle virus*) IN A COMMERCIAL BREWER OF PIMPLE-REINO**; Advisor: Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo.

The black pepper (*Piper nigrum*) has significant economic value, being widely used in the food industry and in health because of its biochemical particularities. The infection caused by PYMoV (*Piper yellow mottle virus*) in crops and the aggressiveness of the symptoms have a direct influence on the losses that are potentiated when seedlings are affected. Although viruses can be asymptomatic, they can be identified mainly by the symptoms of mosaic, whitening of the veins, and fruit reduction. Methods that help in early and reliable detection can have direct benefits to growers. The objective of this work was to evaluate the occurrence of PYMoV in commercial black pepper nursery plants using the PCR technique. Plant tissues from 77 plants (symptomatic and asymptomatic) were collected from a nursery in the region of Jaguaré-ES. After extraction of total DNA, the samples were submitted to PCR reaction with specific primers to detect part of the viral genome. Only 5 plants (6.5%) tested positive for the presence of the virus, indicating a low incidence of the virus in the evaluated nursery. Among the plants analyzed there were cases in which visual symptomatology was confirmed by PCR, cases in which the negative PCR indicated that the plant was not contaminated or that the symptom observed would be indicative, for example, of a possible nutritional deficiency. We conclude that the PCR technique was efficient for the molecular identification of PYMoV in the samples evaluated. Work of this nature can bring direct benefits to producers, contributing to minimize years and losses to nurserymen and black pepper producers.

Key-words: *Piper nigrum*, PYMoV, PCR, nursery

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Produção e importância econômica da Pimenta-do-reino

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), pertencente à família Piperaceae, é considerada uma espécie de significativo valor econômico e muito utilizada na indústria de alimentos e na saúde por possuir características bioquímicas peculiares. O sabor específico deve-se particularmente à presença de piperina, um alcalóide pungente, tendo sua contribuição na medicina, dietas humanas, conservantes e agentes de biocontrole (TRIPATHI *et al.*, 1995).

A primeira cultivar a ser introduzida em território capixaba foi a Cingapura no município de Linhares, mudas essas provenientes do Pará. As cultivares que mais se destacam no território são: Bragantina e Kottanadan (CONAB, 2015).

No estado do Espírito Santo o cenário é promissor, o cultivo possui uma representatividade econômica forte para as famílias rurais devido à sua grande produção. Segundo Vidal (2020), o Estado possui cerca de 11.725 estabelecimentos que produzem a especiaria, 76% desse comércio estão representados pela agricultura familiar. O autor enfatiza ainda que o número é expressivo devido a diversificação das atividades na propriedade facilitado pelas pequenas áreas exigidas no plantio. Ainda nessa perspectiva, a pimenta-do-reino é uma cultura que exige muitos investimentos no manejo e monitoramento da área plantada (COSTA, 2013).

Com a comercialização em alta nos últimos anos, a produção brasileira destaca-se pela sua grande representatividade econômica e de baixo custo quando comparados com outros países sendo os principais estados produtores: Pará com um total de 45,6% e Espírito Santo com 43,8% de área plantada (LEMOS *et al.*, 2014; VIDAL, 2020).

No que se refere à produção mundial, o Vietnã é responsável por uma produção expressiva, cerca de 37% da produção global (FAO, 2020). Nos anos de 1980 a produção brasileira elevou o país ao nível de maior produtor mundial da especiaria,

mas anos depois caiu de forma expressiva devido ao avanço de doenças causadas por vírus e fungos. A recuperação econômica veio mais tarde, nos anos 2000, com o aumento do produto e expansão das lavouras (RAMOS, 2015).

O Espírito Santo possui uma área de plantio significativa, sendo o cultivo concentrado nas microrregiões de São Mateus, Nova Venécia e Linhares, o destaque na produtividade está atrelado ao uso de tecnologia e o bom resultado do uso da irrigação. No último levantamento realizado em 2018 o Espírito Santo expandiu em 56% sua área de colheita, juntamente com a melhora na produtividade que dobrou nos últimos anos (VIDAL, 2020).

O aumento do preço da pimenta-do-reino entre 2015 e 2016, período que ultrapassou R\$ 30,00/kg e a comercialização por meio do cooperativismo incentivaram os produtores a expandirem suas áreas de produção no Espírito Santo. Concomitante a um crescimento de 75%, em 2018 o declínio do mercado internacional interferiu negativamente aos produtores (VIDAL, 2020).

Tendo em vista a realidade atual e os baixos preços da especiaria, que tendem a permanecer, a produção tem perspectiva de crescimento nos próximos anos devido à grande liquidez da cultura e ao período de estoque, que dependendo das condições adequadas de armazenamento pode se conservar por mais de um ano (VIDAL, 2020).

1.1.2 Propagação da espécie

A propagação da pimenta-do-reino dá-se por meio de estaquia, esta por sua vez é a mais usual e recomendada devido à uniformidade do início da fase produtiva (OLIVEIRA, 2020). Neste tipo de propagação ocorre a utilização de plantas matrizes de onde é retirada a estrutura semilenhosa, esse material vegetativo deve ser retirado de pimentais saudáveis e livre de doenças ou deficiência nutricional (EMBRAPA, 2005).

Segundo Costa (2020) a planta está apta para ser cortada quando atingir 1,20 m, essa técnica deve ser utilizada obedecendo a distância de 50 cm acima do solo. Estes

ramos podem então ser cortados para formar estacas que tenham dois nós e uma folha; vale ressaltar que cada matriz deve ser utilizada por apenas três vezes.

Posteriormente a este processo de coleta das estacas ocorre a indução do enraizamento adventício em segmentos destacados da planta matriz que, submetidos às condições favoráveis, originam uma muda (LEITE; INFORZATO, 1966).

Quando essas raízes se formam e os brotos começam a nascer as estacas devem ser transplantadas para sacos plásticos pretos, sanfonados lateralmente. Posteriormente, as mudas ficam no viveiro dentro destes sacos durante quatro meses para desenvolverem a parte aérea. Posteriormente a este processo as mesmas estarão prontas para serem comercializadas (COSTA et al., 2020).

Achados da literatura apontam que existem muitos reguladores de crescimento utilizados nessas plantas, como por exemplo, as auxinas que contribuem para um crescimento rápido e eficaz das mudas, vindo a compensar uma falta endógena (FELICIANA *et al.*, 2017).

Ademais, este tipo de propagação aumenta as chances de transmissão de doenças quando as estacas são provenientes de plantas doentes, isso é um dos grandes problemas na produção de mudas.

Uma outra forma de propagação é por meio da cultura de tecidos que consiste em multiplicar assexuadamente partes de plantas (células, tecidos, órgãos ou propágulos), originando mudas idênticas às matrizes. É uma técnica que está sendo cada vez mais adotada em nível mundial, principalmente por sua maior efetividade em abarcar ganhos genéticos obtidos dos programas de melhoramento (HARTMANN *et al.*, 2011; SILVA, 1984). Porém, ainda não é uma prática comercial para a cultura de pimenta-do-reino.

Ainda nessa perspectiva Silva (2018) salienta que a base genética de pimenta-do-reino em território nacional é limitada e que a propagação por meio da cultura de tecidos ou novas tecnologias poderiam maximizar novas introduções de variedades de pimenta-do-reino

Porém, essa prática biotecnológica exigiria cuidados e um protocolos rigorosos de fitossanidade. Desta forma, o mais recomendável seria a obtenção de novas variedades por meio de intercruzamento utilizando as estratégias já existentes (SILVA et al., 2018).

1.1.3 Doenças que acometem a cultura

Diante do cenário mercadológico, lavouras comerciais apresentam prejuízos causados por fungos e viroses, principalmente. A agressividade dos sintomas tem influência direta nos prejuízos, que são potencializados quando plantas matrizes e mudas são afetadas (LIMA, 2010).

Embora a cultura de pimenta-do-reino exija poucas demandas no controle de fitopatógenos, algumas doenças podem causar danos irreversíveis à plantação, como é o caso das viroses (SILVA et al., 2018).

Um dos fatores que contribuem para a contaminação e propagação de doenças em viveiros são as condições fitossanitárias tais como: condições higiênicas das instalações e da área de plantio. A identificação dos fatores de risco independente das etapas de produção são fundamentais para diminuir as chances de propagação de fitopatógenos (EMBRAPA, 2018).

Dentre as principais doenças que infectam pimenta-do-reino destacam-se aquelas causadas por fungos como o *Fusarium solani f. sp. piper* que pode iniciar a infecção pelas raízes e ramos, levando ao escurecimento dos vasos condutores, ausência de radicelas, podridão das raízes e ao secamento total da planta (ORTIZ et al., 2014). Quando o fungo ataca as raízes, as folhas também ficam amarelas e flácidas e com o avanço da doença pode ocorrer exsudação negra e brilhante na base da planta, e dependendo das condições climáticas peritécios podem vir a serem formados (DUARTE et al., 2016).

Outra patologia peculiar e de complexo controle é antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum* que em condições de umidade, temperatura e luz favoráveis adentra nas aberturas naturais ou por ferimentos da planta e realiza seu processo de infecção (AMORIM; PASCHOLATI, 2011). Essa doença causa queima do ápice foliar,

necrose nos anéis concêntricos, perda das folhas e interferência no tamanho e desenvolvimento dos frutos (TREMACOLDI, 2010 DUARTE, 1999).

Por outro lado, uma doença que possui um pouco mais de controle, quando diagnosticada precocemente, é a Queima-do-fio causado pelo fungo *Koleroganoxia Donk*. As principais sintomatologias estão ligadas a formação de um cordão micelial a partir das raízes adventícias que quando atingem as folhas e as espigas permite que estrutura micelial se ramifique em forma de teia envolvendo toda a superfície da espiga que se endurecem soltando-se da planta (TREMACOLDI, 2010).

As viroses também se destacam pelo seu dano. Para o *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) poucos estudos sinalizam sua forma de transmissão. Há relatos na literatura que os principais vetores são as cochonilhas (*Pseudococcuselisiae*) assim como os percevejos (*Diconocorisdistanti*) que atuam de maneira persistente ou semipersistentes (ICTV, 2005).

Em se tratando das possibilidades de infecção da pimenta-do-reino por vírus, isso poderia ocorrer também por meio do contato entre raízes de planta infectada e saudável. Outra forma seria quando a planta infectada é eliminada e deixada em área de produção tornando-se uma fonte de inóculo para que o vetor possa realizar a transmissão (BELL et al., 2009).

As sintomatologias que este vírus pode causar estão relacionadas com necrose dos tecidos internos na haste da planta; descoloração dos vasos condutores e lesões nos tecidos internos dos ramos; mancha de coloração amarelo limão brilhantes, espaças no limbo ou em faixas transversais e pontos cloróticos ao longo da nervura das folhas (DUARTE, 2000).

A base foliar pode conter numerosas manchas tornando as folhas totalmente sem pigmento verde, malformação foliar e aparecimento de ondulações em uma ou em ambas margens da folha (Figura 1).

Em plantas com alto grau de infecção as folhas podem apresentar bolhas no limbo causando esterilização parcial das flores e redução no número de frutos (DUARTE, 2000).



Figura 1: Planta com sintomas visuais de virose causada por PYMOV (ALMEIDA, 2021)

Com esses sintomas ocorrem a redução do crescimento da planta e posterior a poda, surgem brotações fracas com folhas mal desenvolvidas e com pontos cloróticos intensos (DUARTE, 2000). Vale ressaltar ainda que os sintomas mencionados estão intimamente ligados ao genótipo da espécie (ICTV, 2005). As plantas contaminadas por PYMoV podem apresentar deformação na borda foliar, redução em tamanho e número de frutos, além de pontos cloróticos acentuados (STEIN e ALBURQUEQUE, 1992).

A virose causada pelo PYMoV desencadeia sérios danos à produção e à qualidade dos frutos. A intensidade dos sintomas nas plantas infectadas depende de diversos fatores, como por exemplo, o genótipo da pimenta, nível de resistência da cultivar, idade da planta, nível de virulência e condições adversas como nutrição e fatores climáticos (EMBRAPA, 2018).

Existem vários métodos para identificação da doença, seja *in loco* por meio de análise visual ou em laboratório através de técnicas especializadas. Em casos específicos a identificação torna-se complexa devido ao estágio assintomático da patologia, sendo imprescindível a utilização de métodos mais eficientes como *Polymerase Chain Reaction* - PCR (STEIN e ALBURQUEQUE, 1992).

Estudos apontam que este vírus não é restrito apenas a cultura de pimenta-do-reino. MBOLARINOSY (2019) realizou estudos com esta família de vírus e constatou que o *Rice yellow mottle virus* (RYMV) pertence a uma cepa recombinante única e que sua

inserção em Madagascar deu-se por meio de uma introdução a longa distância, ou seja essa, cepa pode ter sido originada em uma região distante daquela região.

Este vírus (RYMV) pertencente à mesma família do PYMoV, possui uma quantidade limitada de hospedeiros que infectam duas espécies de arroz, *Oryza sativae* *O.glaberrima* e *Oryza longistaminata*, sendo esta última linhagem selvagem (MBOLARINOSY *et al.*, 2019).

A transmissão de RYMV ocorre principalmente por besouros (BAKKER, 1974) e por alguns representantes de mamíferos como também por práticas de tratamentos culturais (SARRA e PETERS, 2003). Ao contrário do que ocorre na pimenta-do-reino, para o RYMV não há. (BAKKER 1974; FAUQUET e THOUVENEL 1977; KONATÉ, SARRA e TRAORÉ 2001; ALLARANGAYE *et al.*, 2006).

O *Cucumber mosaic virus*, CMV (WAHID *et al.*, 1992; SARMA *et al.*, 2001; BHAT *et al.*, 2003) é uma outra classe que também está associado a prejuízos nos plantios de pimenta-do-reino, podendo causar clorose, mosaico, espigas curtas e falhadas, redução da área foliar e conseqüentemente redução fotossintética (PANTOJA *et al.*, 2009).

A detecção precoce de vírus na fase de incubação é crucial para o manejo eficaz da doença, pois a pimenta-do-reino é uma cultura perene propagada vegetativamente e a infecção espalha-se facilmente por ferramentas contaminadas, neste caso o correto manuseio dos utensílios e o monitoramento das mudas em viveiros corroboram para o controle (BHAT *et al.*, 2018).

Ainda nessa perspectiva, os vírus que infectam plantas representam uma ameaça para a economia mundial, podendo causar perdas anuais calculadas em cerca de 50 bilhões de euros (PALLÁS *et al.*, 2018). Isso demonstra a importância de se adotar medidas de controle e incidência de infecção nas plantas que comprometa a produção com conseqüente prejuízo econômico.

1.1.4 Estado nutricional como não parâmetro para diagnóstico viral

Os pimentais possuem um tempo de vida de aproximadamente 12 anos, porém com o avanço das doenças esse tempo não ultrapassa 6 (seis) anos fazendo com que haja

uma queda da produtividade (EMBRAPA, 2014). Com isso a manutenção das lavouras em especial aquelas de pequeno porte tornam-se desafiante devido ao pouco retorno financeiro e grandes investimentos no plantio para o combate de patologias que não existem controle químico ou biológico eficaz (EMBRAPA, 2014).

Outro fator que dificulta o manejo de plantas contaminadas por vírus é a pouca assistência técnica aos pequenos produtores e a falta de informação quanto às especificidades nutricional e patológica da cultura. É importante destacar ainda a comercialização indiscriminada de mudas infectadas que maximizam as chances de propagação da doença e prejuízos (EMBRAPA, 2000).

No que se refere às sintomatologias, as plantas afetadas por vírus podem ser aparentemente saudáveis, assintomáticas. Estudos realizados por BHAT *et al* (2018) mostraram que em um período de 10 dias cultivares infectadas quando expostas a fatores abióticos, como alta temperatura e baixa taxa de nutrientes no solo expressaram sintomas semelhantes.

Sendo assim, com base nas observações realizado por BHAT (2018) pode-se constatar que as condições nutricionais das cultivares podem ser facilmente confundidas com viroses, indicando que a sintomatologia não é uma forma eficiente de diagnóstico.

Pode-se dizer que um dos grandes problemas causados pelas viroses é o fato dos sintomas serem facilmente confundidos com deficiências nutricionais o que pode levar o produtor a realizar manejo incorreto.

Outros estudos que ratificam essa dificuldade no diagnóstico de doenças foram detectados no trabalho de LIMA E DUARTE (2002) onde pimentais infectados por antracnose na região amazônica foram facilmente confundidos com deficiência de potássio, cálcio e magnésio.

Os fitonematóides também representam significativos danos nas lavouras, classificados como um dos mais importantes na área agrônômica (FREITAS *et al.*, 2012). O principal sintoma está relacionado a lesões radiculares que propiciam as

infecções de agentes secundários como o fungo *Fusarium oxysporum* causador da murcha-amarela, também muito relacionado com o déficit nutricional que se apresentam de modo semelhante (DUARTE, 2006).

A murcha amarela é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum*, este por sua vez acessa a cultura através das raízes, favorecido ou não por lesões causadas por *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica* ou de outra natureza. No processo de colonização, invade o sistema vascular causando escurecimento e impedindo a absorção e circulação de água e nutrientes (DUARTE *et al.*, 1999).

A pimenta-do-reino ainda é exposta a viroses que geram perdas e danos irreparáveis e que também causam sintomatologias similares ao déficit nutricional, são eles: potyvírus - *Pepper yellow mosaic virus (PepYMV)* e *Potato virus Y (PVY)*, os tospovírus - *Tomato spotted wilt virus (TSWV)*, *Groundnut ringspot virus (GRSV)* e *Tomato chlorotic spot virus (TCSV)*, o tobamovírus - *Pepper mild mottle virus (PMMoV)* e o cucumovírus - *Cucumber mosaic virus (CMV)* (INOUE-NAGATA *et al.*, 2002; TRUTA *et al.*, 2004).

1.1.5 Uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na detecção de doenças nas plantas patológicas

A partir de 1980 com a utilização da PCR automatizada (em grande escala), houve grandes avanços nos procedimentos técnicos utilizando DNA para identificação e detecção de patógenos em plantas (WARD *et al.*, 2004 ; VINCELLI e TISSERAT, 2008). Essa técnica baseada na amplificação de fragmentos de DNA específicos está sendo gradativamente difundida também para a identificação de bactérias, fungos e vírus em plantas, sendo possível identificar inúmeras doenças fitopatogênicas por meio do uso de *primers* específicos (SCHAAD *et al.*, 2001).

Para fins de diagnóstico, a PCR é considerada um método eficiente (PALLÁS *et al.*, 2018). A grande vantagem da sua aplicação na pimenta-do-reino e nas demais culturas é a sua alta confiabilidade, isto é, mesmo que o patógeno esteja presente na amostra vegetal em pequenas quantidades, a amplificação permite a detecção viral

(BHAT *et al.*, 2018). Para tanto, é uma ferramenta altamente sensível e específica (BOTELHO *et al.*, 2015).

Por meio dessa técnica foi possível detectar uma família de fungo (*Ceratocystidaceae*) altamente agressiva em árvores de plátano, que por avaliação visual estavam saudáveis, mas encontravam-se nas proximidades de árvores com os sintomas da doença (LUCCHI *et al.*, 2013).

Na perspectiva de Oliveira (2010) com a utilização de *primers* para a amplificação de regiões específicas do genoma, a técnica de PCR está sendo cada vez mais utilizada para diagnósticos de patologias causadas por fitonematóides (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Em um experimento utilizando plantações de tomateiro foi possível a identificação e detecção dos fitonematóides *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne enterolobii* e *Meloidogyne javanica* (HU *et al.*, 2011). Todas os fitonematóides desse gênero apresentaram bandas de 500 pb para um *primer* universal enquanto para os *primers* específicos *M. incognita*, *M. enterolobii* e *M. javanica* apresentaram bandas de 1000, 200 e 700 pb, respectivamente (HU *et al.*, 2011).

Segundo LEKE (2015), essa técnica, atualmente, tem corroborado também para a identificação de *Begomovirus* a partir da extração de DNA total de folhas, caule, raízes e tubérculos. Apesar deste não ter sido identificado, ainda, com grande incidência na pimenta-do-reino, ao contrário do que ocorre em tomateiros, estima-se que, devido às más condições ambientais e ao aumento da população de vetores (moscas brancas) poderá ocorrer um aumento desse tipo de infecção, sendo o diagnóstico molecular o mais indicado para um manejo precoce. Outro achado importante utilizando a mesma técnica foi a identificação de *Begomovirus* presentes em tomates (CARMO, 2006; ARAÚJO 2014).

Em outro experimento utilizando sementes de pimenta preta para detecção de PYMoV e CMV foi constatado, por meio da técnica sorológica que as sementes estavam infectadas com o vírus CMV (BAT,2016). No entanto, nenhuma amostra mostrou reação positiva ao anti-soro PYMoV. Provavelmente, isso ocorre porque a concentração de PYMoV se mostrava muito baixa para que haja detecção por ELISA (BAT, 2016), diferentemente da técnica molecular que possui uma significativa abrangência (BHAT *et al.*, 2018).

Quando comparada com outros métodos de detecção, como por exemplo, o sorológico (ELISA), a técnica molecular torna-se mais acessível e de baixo custo (SCHENA *et al.*, 2013).

A identificação adequada de vírus, por meio da PCR, se torna necessária para subsidiar o desenvolvimento de mecanismos de defesa fitossanitária para as culturas, em especial a pimenta-do-reino. O vírus pode infectar a mesma planta sucessivas vezes em um curto período de tempo sendo importante uma forma de detecção precoce (MIFTAKHUROHMAH *et al.*, 2016).

A pimenta-do-reino enfrenta ocorrência sucessiva de infecção viral, diante disso, ferramentas biotecnológicas estão sendo utilizadas para diagnosticar doenças virais, que se propagam em curto período de tempo (MIFTAKHUROHMAH *et al.*, 2016).

Para mitigação dessas doenças e aumento do ciclo de vida da cultura tornam-se necessárias medidas de manejo como: utilização de mudas saudáveis, tratamento com produtos especializados, adubação controlada e manutenção dos espaçamentos entre as plantações (DUARTE, 2004).

A indexação via PCR tem sido eficiente na identificação de PYMoV na pimenta-do-reino principalmente entre os países com maior produção, especialmente quando comparados a testes sorológicos (ELISA) (SILVA *et al.*, 2002; SASI *et al.*, 2018).

Mesmo com uma grande variedade de aplicações, a técnica de PCR exige uma padronização de Protocolos, sendo recomendado o desenvolvimento de procedimentos laboratoriais específicos para a identificação de diferentes patógenos (INNIS; GELFAND, 1990).

Não existem relatos na literatura de medidas curativas para as doenças causadas por vírus em nenhuma cultura. Portanto, medidas de manejo e profilaxia têm sido adotadas visando evitar ou reduzir as infecções, incluindo estratégias de redução da disseminação (EMBRAPA, 2018). O diagnóstico rápido e preciso da infecção por

PYMoV em pimenta-do-reino é de grande importância para o manejo da doença a fim de minimizar danos e perdas.

Quanto ao genoma do vírus PYMoV sabe-se que possui 7.622 nucleotídeos, distribuídos em quatro estruturas de leitura abertas (ORFs) ORF1, ORF2 e ORF4, sendo a ORF3 responsável pela codificação de uma proteína de movimento viral de 256,6 KDa (HANY *et al.*, 2014). A partir da caracterização do genoma foi possível confirmar que este vírus pertence à família *Caulimoviridae*, do gênero *Badnavirus*. Fragmentos de duas novas sequências dessa família também foram identificados em amostras de pimenta-do-reino, sendo chamados de *Piper DNA VIRUS 1* e *2* (HANY *et al.*, 2014).

2. OBJETIVO GERAL

Objetivou-se com este trabalho a detecção de PYMoV em plantas matrizes de viveiro comercial por meio da técnica de PCR.

2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

Realizar extração de DNA de plantas sintomáticas e assintomáticas para PYMoV;

Realizar ensaios de PCR utilizando primers específicos para detecção de parte do genoma viral;

Avaliar a porcentagem de plantas contaminadas e sadias por meio da detecção molecular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material vegetal

Foram utilizados tecidos foliares de plantas sintomáticas e assintomáticas que representavam as plantas matrizes de um viveiro comercial localizado no município de Jaguaré-ES. As coletas foram realizadas nos anos de 2019 e 2021, totalizando 77 amostras analisadas.

O matrizeiro era composto por 13 linhas contendo cerca de 40 plantas por linhas. Pensando na capacidade de processamento de amostras em nível laboratorial, na primeira coleta optou-se por fazer uma amostragem de acordo com o seguinte procedimento: escolheu-se linhas alternadas e dentro de cada linha plantas alternadas, sendo que a coleta procedeu até a metade das linhas devido a morte de plantas por alagamento.

Em 2019 foram coletas um total de 43 amostras. No matrizeiro continha com as cultivares Bragantina, Kotanadã e Guajarina. Não foi escopo deste trabalho fazer qualquer tipo de relação entre cultivar e diagnóstico molecular. A figura a seguir ilustra o procedimento adotado para as coletas.

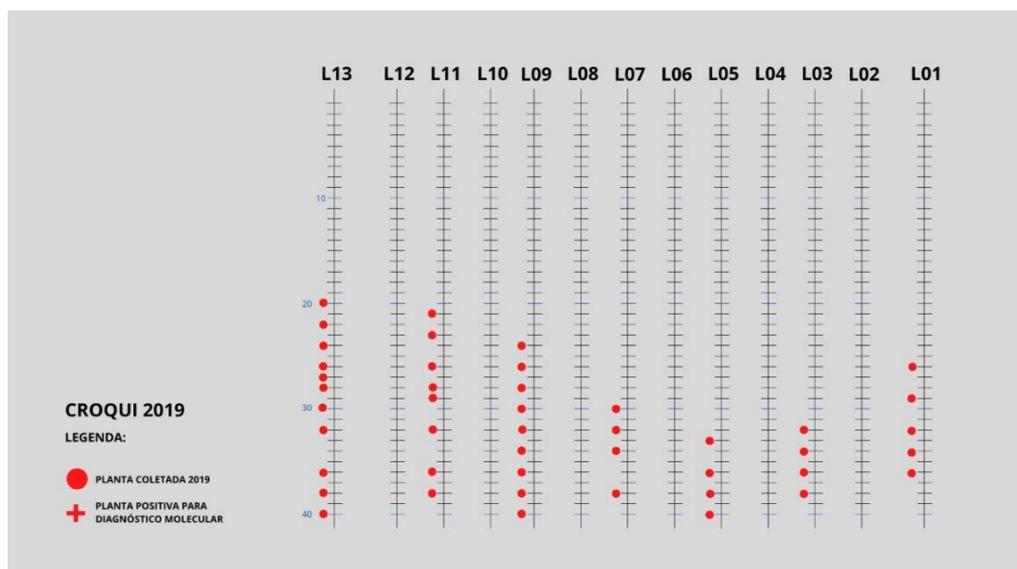


Figura 2: Esquema representativo do procedimento de coleta de plantas na área do viveiro comercial, realizada em 2019.

Dada a ocorrência da pandemia, uma segunda coleta foi realizada em 2021. A maioria das plantas do matizeiro tinham sido renovadas, o que nos impossibilitou de manter o mesmo padrão de amostragem, uma vez que a maioria das plantas tinham recém sido implantadas nas estacas. Foi necessária a realização das coletas de forma aleatória (total de 34 amostras), excluindo-se apenas aquelas plantas mais novas (aproximadamente 8 meses). A figura 3 ilustra o procedimento realizado para a amostragem.

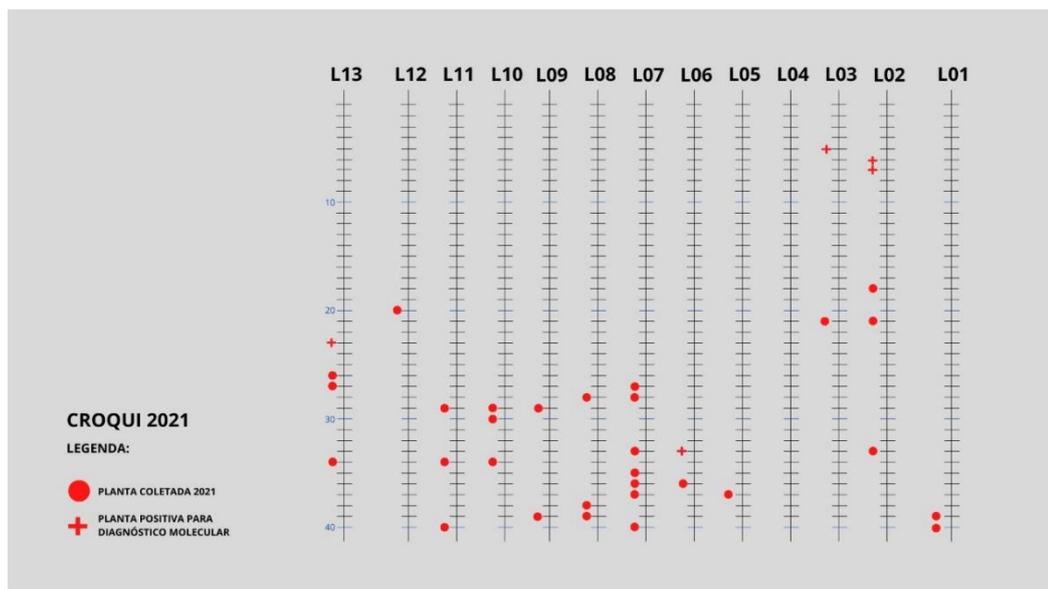


Figura 3: Esquema representativo do procedimento de coleta de plantas na área do viveiro comercial, realizada em 2021.

Após as coletas, as folhas foram colocadas em saco plástico contendo sílica gel, identificadas e acondicionadas em isopor com gelo até o transporte para o laboratório de Biologia Celular e Genética do Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES/UFES) para as análises moleculares.

3.1.2 Extração de DNA total

Inicialmente as folhas foram higienizadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. Foi utilizado o protocolo de extração baseado no método de *Doyle e Doyle* (1990) com modificação, partindo-se de amostras trituradas em cadinho com nitrogênio

líquido. Para cada amostra (planta coletada) foram realizadas 3 repetições, totalizando 231 extrações.

Cerca de 500 mg de folha triturada foram transferidos para microtubo de 1,5mL e acrescentado 700 μ L tampão de extração CTAB (Tris-HCl 100mM pH 8,0; CTAB 2%; NaCl 1,4M, EDTA 20mM 11 pH 8,0 e β -mercaptoetanol 0,4%).

As amostras foram homogeneizadas em vórtex (Phoenix AP-56) por um período de 10 segundos e incubadas em banho-maria (Novatecnica/NT 248) por 30 minutos a temperatura de 65°C. Após este procedimento foi adicionado em cada amostra 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) sendo os tubos agitados ligeiramente por 10 minutos e então as amostras foram centrifugadas (Loccus L3024R) a 12.000 rpm por 15 minutos a temperatura de 23°C.

Cerca de 500 μ L da fase aquosa foram transferidos para um novo microtubo e acrescentado 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), agitado novamente por 10 minutos e submetido a centrifugação (Loccus L3024R) a 12.000 rpm como descrito anteriormente.

Posteriormente foram transferidos 300 μ L da fase aquosa para outro tubo e adicionados 1/3 do volume de acetato de amônio 7,5 M e 1 volume de isopropanol; as amostras foram incubadas a -20°C por 12 horas. Transcorrido este tempo, as amostras foram então centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos a temperatura de 23°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (pellet) foi lavado com etanol 70%, sendo este último desprezado. O pellet foi secado em temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, o DNA foi ressuscitado com 50 μ L de TE (Tris 10 mM e EDTA 0,1 mM) contendo 50ug/mL de RNase A, sendo incubado a 37°C por 30 minutos. As amostras foram armazenadas a -20°C até a utilização.

Para avaliar a qualidade do DNA extraído, as amostras de DNA foram coradas com *GelRed* e *BlueJuice* e submetidas à eletroforese horizontal (Cuba LCH-20x25-Loccus e fonte LPS-Loccus) em gel de agarose a 0,8% e fotodocumentado sob luz ultravioleta.

3.1.3 ENSAIO DE PCR PARA DETECÇÃO DE PYMoV

Para as reações de PCR foram utilizados primers para amplificação de parte do genoma de PYMoV, previamente descrito por ROCHA (2017). Os primers nomeados de PY31F (5' CTGCACAGGAAGGAAGAAGG 3') e PY31R (5' AGTGAGGGGGTCGAAATTCT 3').

Para as reações de PCR foi utilizado um volume total de 30 µL, contendo 50 ng de DNA total, 2,8 mM de Mg, 0,4 µM de cada primer (*forward e reverse*), 0,8 µM DNTP e 2,5 U de Taq DNA Polimerase.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Loccus TC9639) nas seguintes condições: Um ciclo de 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 53°C, 1 minuto a 72°C e um último ciclo de 10 minutos com temperatura de 72°C.

Como controle positivo foi utilizada amostra de planta já identificada por ROCHA (2017), cuja identidade genética foi confirmada por meio de sequenciamento de DNA.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (Cuba LCH-20x25-Loccus e fonte LPS-Loccus), sendo utilizados 2,0 µL de amostras com 1,0µL de corante (*GelRed e BlueJuice*) e posterior fotodocumentadas sob luz ultravioleta.

A confirmação da amplificação foi avaliada por meio do aparecimento no gel de um fragmento de DNA corresponde ao tamanho amplificado pelos *primers*. Cada ensaio de PCR realizado para as 77 amostras foi repetido 3 vezes.

A análise dos resultados de incidência de PYMoV nas plantas matrizes foi realizada com base na porcentagem de bandas amplificadas (plantas positivas para PYMoV) e ausência de amplificação (plantas negativas para PYMoV).

4. RESULTADOS

Neste trabalho foi utilizado a técnica de PCR convencional como ferramenta de diagnóstico molecular de PYMoV em plantas de viveiro comercial. Foi possível identificar a amplificação de fragmento específico corresponde a parte do genoma viral, mostrando que a técnica de PCR tem sensibilidade para amplificar alvos específicos partindo de amostras cujo DNA genômico desejado apresenta-se em quantidade bem pequena em relação ao DNA genômico da planta.

Uma das prerrogativas para o sucesso do uso desta técnica é a obtenção de amostras de DNA, alvo da amplificação, de boa qualidade. A metodologia de extração utilizada neste trabalho resultou em amostras de DNA de qualidade satisfatória para os ensaios posteriores de PCR (Figura 4).

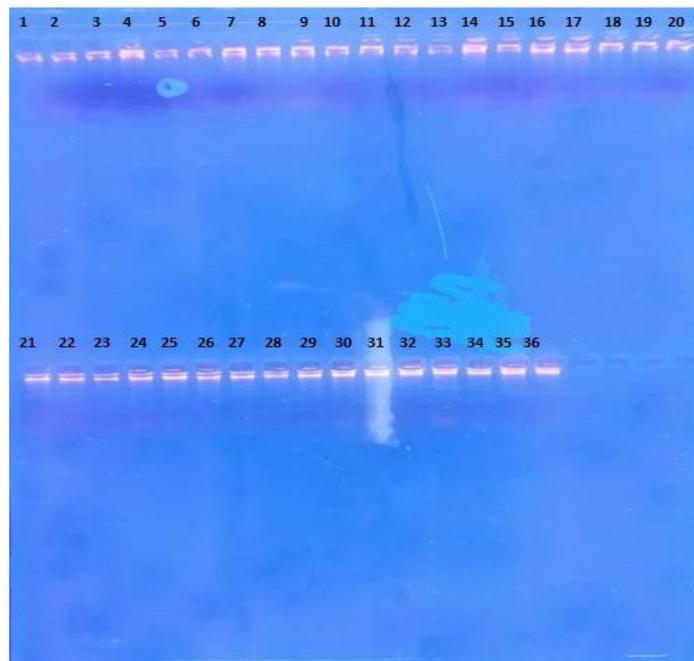


Figura 4 Eletroforese com amostras de DNA total de plantas matrizes. Amostras extraídas: **3:** L1P39; **4:** L1P40; **5:** L2P6; **6:** L2P7; **7:** L3P5; **8:** L6P33; **9:** L2P18; **10:** L2P21; **11:** L2P33; **12:** L3P21; **13:** L5P37; **14:** L6P36; **15:** L7P27; **16:** L728; **17:** L7P35; **18:** L7P36; **19:** L7P37; **20:** L7P40; **22:** L8P28; **23:** L8P38; **24:** L8P39; **25:** L9P29; **26:** L9P39; **27:** L1029; **28:** L10P30; **29:** L10P34; **30:** L11P29; **31:** L11P34; **32:** L11P40; **33:** L13P23; **34:** L12P22; **35:** L13P26; **36:** L13P27

Em função de resultados previamente alcançados por ROCHA (2017) que desenhou, testou e validou a amplificação de *primers* sequência-específicas para a ORF3 do genoma viral, optou-se por usar estes mesmos iniciadores no presente estudo, uma vez que o sequenciamento do fragmento amplificado confirmou a identidade genética como sendo do genoma de PYMoV.

Das 77 plantas avaliadas, 5 tiveram amplificação de fragmento correspondente ao tamanho esperado (950pb), confirmando a presença de PYMoV (Figura 5). Esse resultado indica que apenas 6,5% das plantas avaliadas no matrizeiro apresentavam contaminação viral. Um dado complementar é que uma dessas plantas 5 apresentou resultado positivo tanto para o PYMoV como para o CMV, sugerindo um caso de dupla infecção viral.

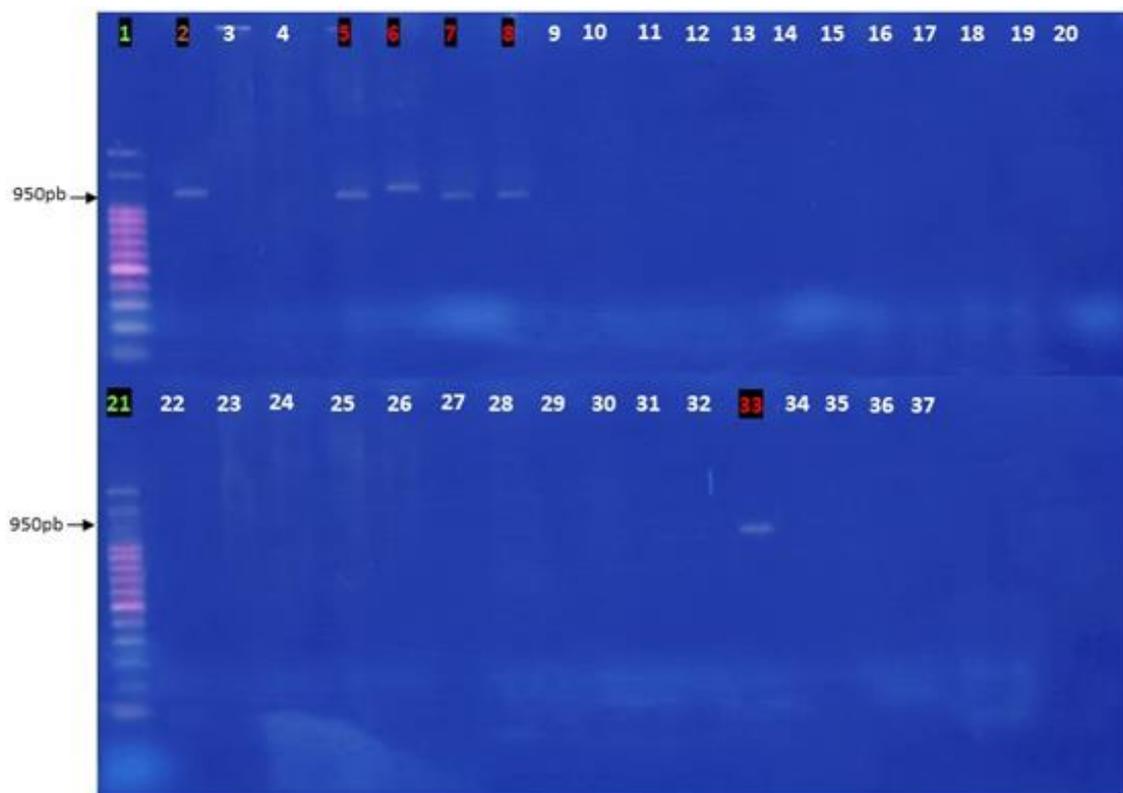


Figura 5: Análise dos produtos amplificados por PCR para a detecção de PYMoV.

Nº 1, 21: Ladder (100-1000pb); Nº 2: Controle positivo; Nº 3 à 20 e 22 à 37: testes 3: L1P39; 4: L1P40; 5: L2P6; 6: L2P7; 7: L3P5; 8: L6P33; 9: L2P18; 10: L2P21; 11: L2P33; 12: L3P21; 13: L5P37; 14: L6P36; 15: L7P27; 16: L728; 17: L7P35; 18: L7P36; 19: L7P37; 20: L7P40; 22: L8P28; 23: L8P38; 24: L8P39; 25: L9P29; 26: L9P39; 27: L1029; 28: L10P30; 29: L10P34; 30: L11P29; 31: L11P34; 32: L11P40; 33: L13P23; 34: L12P22; 35: L13P26; 36: L13P27; 37: L13P34).

Dentre as 5 plantas positivas para a presença de PYMoV 4 dessas apresentavam sintomas como redução das bagas, folhagens curtas, amarelimento, necrose além de pequenos pontos cloróticos (Figura 6). Este diagnóstico visual foi ratificado pela técnica molecular que detectou a presença do vírus na planta em destaque.



Figura 6: Sintomas visuais observados nas plantas (ALMEIDA, 2021).

Por outro lado, tivemos uma planta assintomática (Figura 7) que se apresentava aparentemente saudável e está positiva para a presença de PYMoV.



Figura 7: Planta assintomática com confirmação molecular para a presença do vírus (ALMEIDA, 2021).

Para estabelecer uma relação entre os métodos de identificação do vírus (visual e molecular) os resultados foram compilados e apresentados na tabela abaixo. Do total de plantas analisadas o diagnóstico molecular confirmou a presença do vírus em apenas 4 plantas sintomáticas (5,1%), enquanto apenas 1 planta foi positiva (1,2 %) mesmo se mostrando assintomática para a virose.

Tabela 1. Análise comparativa dos diferentes métodos de identificação (visual e molecular) de PYMoV nas amostras de pimenta-do-reino do viveiro comercial avaliado.

OBSERVAÇÃO <i>in loco</i>	NUMERO DE PLANTAS AVALIADAS	PERCENTUAL DE IDENTIFICAÇÃO*
PLANTAS SINTOMÁTICAS	47 PLANTAS	61%
PLANTAS ASSINTOMÁTICAS	30 PLANTAS	39%
PLANTAS SINTOMÁTICAS E CONFIRMADAS VIA PCR	4 PLANTAS	5,1%
PLANTAS SINTOMÁTICAS COM PCR NEGATIVO	43 PLANTAS	56%
PLANTAS ASSINTOMÁTICAS COM PCR POSITIVO	1 PLANTA	1, 2%
PLANTAS ASSINTOMÁTICAS COM PCR NEGATIVO	29 PLANTAS	38%

* A porcentagem de identificação foi calculada considerando o total de 77 plantas avaliadas em campo.

5. DISCUSSÃO

Rápida, acessível e versátil, a PCR oferece diversas vantagens seja na identificação precoce de patógenos, eficiência nos resultados e como subsidio para o controle em campo. Quando comparado com outros métodos de diagnósticos convencionais mostra-se como melhor custo benefício (LÓPEZ, 2009). Dentro desse contexto, a PCR apresenta alta sensibilidade com potencial teórico capaz detectar uma ou mais moléculas alvo em uma mistura complexa de tecidos em pequena quantidade (HENSON; FRENCH, 1993).

De acordo com LOPÉZ (2009) a PCR convencional mostra-se vantajosa, pois compartilha uma tecnologia sensível, rápida e específica. Contudo, a autora ressalta que os protocolos otimizados devem ser simples e robustos o suficiente para gerar resultados confiáveis e reproduzíveis, devendo ser selecionado, preferencialmente, aquele que, aliado a essas características, apresente uma estratégia diagnóstica de baixo custo.

LEKE (2015) afirma que atualmente a técnica molecular tem corroborado também para a identificação de begomovírus a partir da extração de DNA total de folhas, caule, raízes e tubérculo de plantas daninhas, não sendo a avaliação visual suficiente para medidas de controle. Essa abordagem vai de encontro com nossos achados, que por meio de extração de DNA total de folhas de pimenta-do-reino e uso da PCR detectou-se o DNA viral de PYMoV.

Para além dos estudos envolvendo a pimenta-do-reino, o diagnóstico molecular utilizando PCR foi descrito, desde o século passado, para fitopatógenos virais que acometem culturas de couve-flor (LOPEZ-MOYA, 1992), feijão (GILBERTSON, 1991), milho (RYBICKI, 1990) e de tomate (NAVOT, 1992; ATZMON, 1998); bacterianos, em culturas de batata (BOER & WARD, 1995; DENG, 1991; LEHTONEN, 2004; FLIS, 2005) e de parreira (DONG, 1992) e fúngicos, em culturas de tomate (MILLS, 1992), maçã (BROWN, 1993), trigo, arroz, capim Santo Agostinho e grama bermuda (HENSON, 1993).

Em termos de aplicação prática, o diagnóstico molecular na área de fitopatologia apresenta-se como uma técnica promissora em relação ao custo-benefício aos produtores, incluindo os de pequeno porte, cuja falta de informação quanto às especificidades nutricional e patológica da cultura maximizam as chances de contaminação e os prejuízos (CARMO, 2006).

As ferramentas biotecnológicas que contribuem para o sucesso das práticas agrícolas vêm sofrendo grandes avanços nas últimas décadas, principalmente na área molecular e com o aperfeiçoamento dessas técnicas abre-se espaço para redução de gastos por parte dos produtores, aumento da produção e consequente melhoria na qualidade dos alimentos (GOMES e BORÉM, 2013).

No tocante a prática molecular, para qualquer tipo de análise a partir de DNA, é imprescindível uma boa qualidade do material extraído. Quanto ao protocolo de extração utilizado neste trabalho, este mostrou-se eficaz, propiciando a obtenção de amostras de DNA sem indícios de oxidação e/ou degradação e com nível de pureza satisfatório para os ensaios de PCR.

Com base nas análises dos resultados da PCR verificou-se que das 77 plantas avaliadas 5 dessas apresentaram-se positivas para PYMoV, sendo que 1 delas representaria um caso de dupla contaminação (PYMoV e CMV), o que demonstra que o DNA alvo da amplificação (genoma viral), mesmo presente em pequena quantidade na amostra inicial, foi detectado.

Outros trabalhos da literatura também realizando diagnóstico molecular para PYMoV encontraram baixa incidência do vírus. OLIVEIRA (2010) demonstrou que, analisando um total de 43 amostras foliares de pimenta-do-reino (21 provenientes dos estados de Minas Gerais, 11 do Espírito Santo e 11 do Amazonas) submetidas à amplificação por PCR convencional, apenas 8 positivaram para PYMoV (respectivamente 9.5%, 14.3% e 14.3% das amostras, ao considerarmos cada região; e 18.6% da totalidade).

Do mesmo modo, PANTOJA (2010) avaliou 194 amostras de plantas matrizes as cultivares Kottanadan, Guajarina, Cingapura, Pannyur, Apra, Kuthiravaly, Iaçará, Balankota e Bragantina, provenientes de 5 produtores distribuídos no estado do Pará, sendo observada a presença do PYMoV em todas as propriedades avaliadas, totalizando um percentual de 0.371.

Já é descrito na literatura que os sintomas principais de infecção de PYMoV são formações de bolhas no limbo, presença de manchas ao longo da folha, ondulamento foliar, necrose e coloração amarelo limão brilhantes (DUARTE *et al.*, 2000). No entanto, os resultados do presente trabalho mostraram que o diagnóstico visual nem sempre pode ser o único parâmetro para o diagnóstico viral.

Existem algumas hipóteses que podem explicar o fato de algumas plantas apresentarem sintomas visuais indicativos da presença do vírus, mas que não tiveram a confirmação por meio da detecção molecular. Tal fato pode estar relacionado a possível variante do PYMoV ou um terceiro vírus ainda não identificado (BOARI *et al.*, 2019), não descartando também a possibilidade de ser uma deficiência nutricional. Estudo de BOARI *et al.*, (2019) sustentam essas possibilidades, visto que em suas análises realizadas em matrizeiros comerciais com plantas sintomáticas, os testes via PCR também deram resultado negativo para os vírus PYMoV e CMV.

Deste modo, podemos inferir que a diagnose visual não se caracteriza como parâmetro de diagnóstico diferencial, ao menos no que diz respeito à pimenta-do-reino. Segundo LIMA (2009), a sintomatologia apresentada por plantas doentes pode ser complexa, visto que, sintomas semelhantes aos de viroses apresentados pela planta podem não ter sido causados por vírus, mas sim por outros fitopatógenos ou, até mesmo, por fatores abióticos. De modo inversamente complementar, sabemos também, que é possível que algumas plantas assintomáticas podem apresentar-se positivas para PYMoV (PANTOJA, 2010; ROCHA *et al* 2017). Este fato foi mostrado no presente trabalho.

Seguindo este raciocínio, podemos observar que, curiosamente, 6,5% das amostras testadas neste trabalho foram positivas e apenas uma planta não apresentava os sintomas característicos da virose, como, necrose nas bases foliares, murcha, envergadura nas nervuras das folhas e frutos reduzidos. Sabe-se que essas características se apresentam, comumente, nas fases mais tardias da doença, o que condiz com uma alta titulação patogênica, distribuição uniforme e existência de infecção crônica (LOPÉZ, 2009). Com base no presente trabalho não podemos afirmar que o resultado positivo da PCR está relacionado com a ocorrência de sintomas acentuados nas plantas, sendo necessário a realização de novos estudos referente à relação entre dependência da carga viral na planta e o diagnóstico molecular.

É importante salientar que esperávamos ampliações positivas ou negativas das amostras coletadas de modo a assegurar que o teste molecular fosse sensível e eficaz na identificação de plantas contaminadas, estando elas sintomáticas ou não. Por este motivo, a utilização da técnica de PCR mostrou-se promissora para diagnóstico de PYMoV nas plantas matrizes de pimenta-do-reino analisadas.

Nossos achados corroboram com resultados encontrados por BOARI *et al.* (2010), que usaram o diagnóstico molecular via PCR para identificação de PYMoV em plantas matrizes em viveiro no Estado do Pará. Em um número amostral de 177 plantas, 37,1% mostraram-se positivas para a presença de PYMoV. Em contrapartida, não houveram registros de dupla infecção, diferentemente do presente trabalho.

Em estudo realizado em jardins clonais de pimenta-do-reino no Espírito Santo, BOARI *et al.* (2012) concluíram que dentre as 66 plantas coletadas e avaliadas quanto à presença de PYMoV, 34 testaram positivas, demonstrando por meio da PCR uma taxa de infecção significativa (51,5%).

É importante salientar que em trabalho de BOARI *et al.*, (2019) muitas plantas apresentaram sintomas típicos das viroses, mas não tiveram essa confirmação por meio do diagnóstico molecular de PYMoV. Isso demonstra o quanto a técnica de PCR é sensível para a detecção de fitopatógenos e ratifica que sintoma visual não pode ser considerado um método preciso de diagnóstico.

Na área amostrada no viveiro, três plantas positivas via diagnóstico molecular estavam localizadas muito próximas (5, 6 e 7) e poderia sugerir uma possível ocorrência de sintomas em reboleira. Ratificando essa hipótese, VENTURA; COSTA, (2004) enfatizam que os sintomas causados por PYMoV começam a se espalhar por meio de pequenos grupos de plantas até ao ponto de tornar-se a plantação completamente inviável para a produção.

Uma das causas que poderia explicar uma possível propagação pode estar relacionada as questões fitossanitárias. Segundo COSTA (2020) viroses podem ser facilmente propagadas por utensílios agrícolas como também por insetos-pragas. Entre as medidas gerais que podem ser adotadas para amenizar a possibilidade de transmissão, destacam-se: utilização de mudas vigorosas, eliminação de plantas

daninhas e plantas de cultivos anteriores, que podem servir de abrigo para o inseto vetor.

Ainda no contexto fitossanitário, uma das recomendações para reduzir a transmissão de doenças são as instalações de armadilhas amarelas em viveiros, essa técnica é muito eficiente, visto que impede o fluxo de vetores, como moscas e pulgões. Além disso, limpeza de tesoura de podas e outros tratos são fundamentais para a redução dos riscos (COSTA et al., 2020).

Corroborando com os nossos achados e reportando-se à baixa porcentagem de incidência do vírus no matrizeiro analisado, o presente trabalho traz contribuições importantes para os viveiristas e produtores da região norte do estado. Segundo BOARI *et al* (2019) a falta desse diagnóstico precoce contribui para a produção e disseminação de mudas infectadas. Portanto, a possibilidade de analisar, por métodos moleculares e de forma precoce, viveiros comerciais ou mudas oriundas da sua produção é de suma importância para o setor produtivo, pois pode contribuir na contenção do avanço das viroses e outras doenças, como a fusariose, em nossa região.

Um fator importante e fundamental que contribuiu para se alcançar os resultados de detecção de PYMoV foi a utilização de *primers* específicos para o genoma viral, sendo isolados fragmentos de tamanho esperado conforme já relatado anteriormente por ROCHA (2017). Isso assegura uma maior confiabilidade dos resultados alcançados. BOARI *et al.*, (2019) também fizeram uso de *primers* específicos na detecção de um vírus da mesma família do PYMoV confirmando 54% de infecção em um total de 24 plantas. Em outros trabalhos com pimenta-do-reino BOARI (2019) também identificou em um número amostral de 343 plantas 24 amostras contaminadas, representando um percentual de 10%.

MIFTAKHUROHMAH (2016) também relatou a detecção de PYMoV em pimenta-do-reino por meio de *primers* específicos onde constatou que 100% das amostras coletadas (24 amostras) estavam contaminadas pelo vírus, enquanto 79,1% das bagas (19 amostras) também estavam infectadas. Estes resultados sustentam a importância da especificidade do *primer* utilizado no presente trabalho.

Portanto, considerando a importância da pimenta-do-reino para o Espírito Santo, considerando as perdas de produção causadas por viroses, considerando a sensibilidade que a PCR demonstrou como método de diagnóstico de PYMoV em amostras de pimenta-do-reino, trabalhos desta natureza podem contribuir para a identificação precoce do vírus e outras doenças em viveiros comerciais de modo a diminuir a comercialização de mudas contaminadas, além de auxiliar na redução significativa de perdas e danos em lavouras das regiões produtoras do estado.

6. CONCLUSÃO

A partir de amostras coletas de plantas matrizes de um viveiro comercial de pimenta-do-reino foi possível encontrar, por meio de diagnóstico via PCR, a incidência de PYMoV em 6,5% das plantas avaliadas. A PCR se mostrou sensível para amplificar fragmentos específico do genoma viral tanto em plantas sintomáticas quanto em plantas assintomáticas para a doença.

7. REFERÊNCIAS

- ALLARANGAYE M. et al. Evidência de não transmissão do vírus do mosquito amarelo do arroz através de sementes de espécies hospedeiras selvagens, **Journal of Plant Pathology**, 88, p.309-315, 2006.
- AMORIM, L. PASCHOLATI, S. F. Ciclo das relações patógeno-hospedeiro. In BERGAMIN FILHO, A. et al. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. Piracicaba: 2011. V.1, cap.4, p.59-99.
- ARAUJO, A. L. R. Desempenho agrônômico de genótipos de tomateiro e reação a Geminivirus. **Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas)**, Universidade Federal Rural do Pernambuco, Recife, PE: 58f, 2014.
- ATZMON, G.; Van OSS, H.; CZOSNEK, H. PCR - amplification of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) DNA from squashes of plants and whitefly vectors: Application to the study of TYLCV acquisition and transmission. **European Journal of Plant Pathology**. 104, p.189–194, 1998.
- BAKKER C. Caracterização e aspectos ecológicos do vírus da mancha amarela do arroz, Quênia, **Relatório de Pesquisa Agrícola** 829:1-152, 1974.
- BAT, Balai Tanaman; PELAJAR, Jalan Tentara. DETEKSI CMV DAN PYMoV PADA BENIHLADA (*Piper nigrum*) DENGAN TEKNIK ELISA Detection of CMV and PYMoVon black pepper seedlings (*Piper nigrum*) using ELISA technique. **Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat**, Indonésia, ano 16111, n.3, 2016.
- BELL, V. A.; BONFIGLIOLI, R. G. E.; WALKER, J. T. S.; LO, P. L.; MACKAY, J.G.; MCGREGOR, S. E. Grapevine leafroll associated virus 3 persistence in vitis vinífera remnant roots. **Journal of Plant Pathology**, v.91, n.3, p.527-533, 2009.
- BHAT A I; BIJU C N; SRINIVASAN V; ANKEGOWDA S J; KRISHNAMURTHY K S. Current status of viral diseases affecting black pepper and cardamom. **Journal of Spices and Aromatic Crops**, [S. l.], v.27(1), p.1-16, 2018.
- BHAT, A. I.; DEVASAHAYAM, S.; SARMA, Y. R.; PANT, Y. R.; PANT, R. P. Association of a Badnavirus in black pepper (*Piper nigrum* L.) transmitted by meal bug. **Current Science**. 2003.
- BOARI, A.J.; PANTOJA, K.F.C.; SOUSA, C.M.; BARRETO, M.; SECUNDINO, W. Evaluation of black pepper clonal gardens/mother plants for the presence of Piper yellow mottle virus in the state of Espírito Santo. **XXXV Congresso Paulista de Fitopatologia**. Jaguariúna, 2012.
- BOARI, ALESSANDRA DE DE JESUS; KAUFFMAN, CATERYNNE MELO; CORDOVIL, GABRIELA D'ASSUNÇÃO; PANTOJA, KÉSSIA DE FÁTIMA CUNHA; GAVINHO, BRENDA ESTEFANY SILVA. DETECÇÃO DE UM Fabavirus EM MATRIZEIROS DE PIMENTEIRADO- REINO. **23º seminário PIBIC Embrapa Oriental**, Amazônia, p. 263-264, 25 set. 2019.

BOTELHO, L. DA S. et al. Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean seeds by conventional and quantitative PCR techniques. **Journal of Seed Science**, v.37, n.1, p.55–62, 2015.

BROWN, A. E.; MUTHUMEENAKSHI, S.; SREENIVASAPRASAD, S., et. al. A PCR primer-specific to heteronema for detection in apple wood. **FEMS Microbiology Letters**. 108, p.117-120, 1993.

CARMO, M.G.F. do; JÚNIOR, F.M.Z.; MAFFIA, L.A. Principais doenças da cultura da pimenta. Belo Horizonte: **Informe Agropecuário 27 - EPAMIG**, 108p, 2006.

COSTA, Yanna Karoline Santos da; SANTOS, Helane Cristina Aguiar; RIBEIRO, Nagilla Moraes; OLIVEIRA, Sabrina Juvenal de; CESARIN, Vinicius; CARVALHO, Leonardo Bianco de. Cultivo de pimenta-do-reino. **Revista Agronomia Brasileira** Jaboticabal, ano 2020, v. 4, p. 1-10, 14 dez. 2020.

CONAB, Superintendência Regional do Espírito Santo. **Conjuntura Pimenta-do-reino no Espírito Santo**, Agosto/2015. Disponível em: < http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_08_26_16_06_06_conjuntura_de_pimenta-do-reino_2015_.pdf >. Acesso em: 02 de ago. 2021.

COSTA, C. C. da; GUILHOTO, J. J. M.; IMORI, D. Importância dos setores agroindustriais na geração de renda e emprego para a economia brasileira. **Revista de Economia e Sociologia Rural**. Brasília, v.51, n.4, p.787-814, 2013.

DE BOER, S. H. & WARD, L. J. PCR Detection of *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* associated with potato tissue. **Phytopathology**. 85, p.854-858, 1995.

DENG, S. & HIRUKI, C. Genetic relatedness between two nonculturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. **Phytopathology**. 81, p.1475-1479, 1991.

DONG, L. C.; SUN, C. W.; THIES, K. L., et. al. Use of polymerase chain reaction to detect pathogenic strains of *Agrobacterium*. **Phytopathology**. 82, p.434-439, 1992.

DOYLE, J.J. & DOYLE; J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, 19, p.11-15, 1987.

DUARTE, M. L. R. (Ed.). **Doenças de plantas no Trópico Úmido brasileiro**. I. Plantas industriais. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 296p., 1999.

DUARTE, M. L. R. **Cultivo da pimenteira-do-reino na Região Norte**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 185p., 2004 (Embrapa Amazônia Oriental. Sistemas de produção, 1).

DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; HAMADA, M.; COSTA, A. P. Murcha causada por *Fusarium Oxysporum*, uma nova doença da pimenta-do-reino no Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, n.2, p.178-181,1999.

DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, 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, 20p., 2000. (Embrapa Amazônia Oriental Documentos, 62).

DUARTE, M.L.R.; Boari, A.J.; Benchimol, R.L. Doenças da pimenta-do-reino. In: Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamim Filho, A.; Camargo, L.E.A. & (Eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres. 583p., 2016.

DUARTE, Maria et al. **A cultura da pimenta-do-reino**. Área de Informação da Sede-Colec Criar, Plantar, ABC, 500P/500R (INFOTECA-E), 2006.

EMBRAPA. **Cultivo da Pimenta-do-reino em Rondônia: Formação de Mudanças**. 2005. Disponível em: https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/CultivoPimentaDoReinoRO/muda_s.htm. Acesso em: 14 mai. 2021.

EMBRAPA. **Melhoramento de plantas, variabilidade genética, ferramentas, 2018**. Disponível em: <<https://ainde-plantas.pdf>>. Acesso em: 15 mai. 2021.

FAUQUET, C.; THOUVENEL J.C. Isolamento do vírus do mosquito amarelo do arroz na Costa do Marfim, **Repórter de doenças de plantas** 61, p.443-446, 1977.

FELICIANA, A. M. C.; MORAIS, E. G.; REIS, E. S.; CORRÊA, R. M.; GONTIJO, S. A.; VAZ, G. H. B. **Influência de auxinas e tamanho de estacas no enraizamento de azaleia** (Rhododendron simsii Planch) Gl. SciTechnol, Rio Verde: v.10, n.1, p.43-50, 2017.

FLIS, B.; HENNIG, J.; STRZELCZYK-ŻYTA, D. et al. The Ry-f sto gene from Solanum stoloniferum for extreme resistant to Potato virus Y maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122718 in PVY resistant potato cultivars. **Mol Breeding**. 15, p.95–101, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Food safety risk analysis. A guide for national food safety authorities**. Rome. FAO. 2006. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0822e/a0822e00.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2015

FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L. & FERRAZ, S. **Nematoides como patógenos de plantas**. In: ZAMBOLIN, L.; JESUS JR, W.C. & PEREIRA, O.L. (ed). O essencial da fitopatologia. Editora Suprema, Viçosa, 2012. P.89- 128.

GOMES, W. S.; BORÉM, **A biotecnologia: novo paradigma do agronegócio brasileiro**. 2013. 22p.

GILBERTSON, R. L.; ROJAS, M. R.; RUSSELL, D. R., et al. Use of the asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability of bean golden mosaic virus in the Dominican Republic. **J. Gen. Virol.** 72, p.2843-2848, 1991.

HANY, U.; ADAMS, I.P.; GLOVER, R. et al. A sequência completa do genoma do Piper yellow mottle virus (PYMoV). **Arch Virol** 159, 385-388, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00705-013-1824-2>>. Acesso em: 24 de jun.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**, 8.ed., 915p., 2011.

HENSON, J. M. & FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annu. Rev. Phytopathol.** 31, p.81-109, 1993.

HENSON, J. M.; GOINS, T.; GREY, W., et. al. Use of polymerase chain reaction to detect *Gaeumannomyces graminis* DNA in plants grown in artificially and naturally infested soil. **Phytopathology.** 83, p.283-287, 1993.

HU, M.X.; ZHUO, K.; LIAO, J.L. Multiplex PCR for the simultaneous identification and detection of *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii*, and *M. javanica* using DNA extracted directly from individual galls. **Phytopathology**, v.101, n.11, p.1270-7, 2011.

ICTVdb. **The Universal Virus Data base of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/> Acesso em: data set. 2002.

INOUE-NAGATA, A. K.; FONSECA, M.E.N.; RESENDE, R. O.; BOITEUX, L. S.; MONTE, D. C.; DUSI, A. N.; AVILA, A. C.; VLUGT, R. A. A. van der. Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annum*. **Archives of Virology**, Vienna, v.147, p.849-855, 2002

INNIS, M.A.; GELFAND, D.H. PCR protocols: A guide to **Methods and applications.** Academic press, 1990. Cap.1, p.3-12.

KAUFFMANN, Caterynne Melo; CORDOVIL, Gabriela D'assunção; PANTOJA, Késsia de Fátima Cunha; GAVINHO, Késsia de Fátima Cunha; BOARI, Alessandra de Jesus. DETECÇÃO DE UM Fabavirus EM MATRIZEIROS DE PIMENTEIRADO-REINO. **Embrapa Amazônia oriental, Amazônia**, p.1-4, 2019.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal.** 2.ed. 2008.

KONATÉ, G.; SARRA S.; TRAORÉ O. O vírus da mancha amarela do arroz é transmitido pela semente, mas não é transmitido pelas sementes de arroz, **European Journal of Plant Pathology**, 107, p.361-364, 2001.

LEHTONEN, M. J.; RANTALA, H.; KREUZE, J. F. et al. Occurrence and survival of potato scab pathogens (*Streptomyces* species) on tuber lesions: quick diagnosis based on a PCR-based assay. **Plant Pathology.** 53, p.280-287, 2004.

LEITE, J. R.; INFORZATO, R. Enraizamento de estacas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*L.). **Bragantia**, 1966.

LEKE W.N.; Mignouna, D.B.; Brown, J.K.; Kvamheden, A. Begomovims disease complex: einerging threat to vegetable production systemas of West and Central África. **Agriculture & Food Security.** 4, p.1-14, 2015.

LEKE, W.N.; MIGNOUNA, D.B.; BROWN, J.K.; KVAMHEDEN, A. Begomovirus disease complex: emerging threat to vegetable production systems of West and Central África. **Agriculture & Food Security**. 4, p.1-14, 2015.

LEMOS, O. F. de; TREMACOLDI, C. R.; POLTRONIERI, M. C. Boas práticas agrícolas para aumento da produtividade e qualidade da pimenta-do-reino no estado do Pará. **Embrapa Amazônia Oriental - Fôlder/Folheto/Cartilha** (INFOTECA-E), 2014.

LIMA, A.O.; DUARTE, M.L.R. **Biologia e controle da antracnose da pimenta-do-reino**. In: Seminário de Iniciação Científica da FCAP, 12.; Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental, 6., 2002, Belém, PA. Anais. Belém, PA: FCAP, 2002.

LIMA, M. F. Detecção e Controle de Víroses em Videira. **Circular Técnica - EMBRAPA**. Petrolina, PE, 2009.

LIMA, M.F.; MELO, W.F.; VALE, L.S.R.; MORGADO, H.S.; INOUE-NAGATA, K.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Detecção e incidência de vírus em 89 acessos de pimenta (*Capsicum* spp.) no Município de Ceres, Goiás. **Horticultura Brasileira** 28, p.1187-1194, 2010.

LÓPEZ, M. M; LLOP, P.; OLMOS, A. et al. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Curr. Issues. Mol. Biol.** 11, p.13-46, 2009.

LUCCHI, N.; GHELARDINI, L.; BELBAHRI, L.; QUARTIER, M.; SANTINI, A. **Rapid Detection of *Ceratocystis platani* Inoculum by Quantitative Real-Time**. 2013.

MIFTAKHUROHMAH, N. F. N.; MARIANA, M.; WAHYUNO, D. Deteksi Piper Yellow Mottle Virus (PYMoV) penyebab penyakit kerdil pada tanaman lada secara Polymerase Chain Reaction (PCR). **Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat**. 27, p.77-84, 2016.

MILLS, P. R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**. 98, p.137-144, 1992.

NAVOT, N.; ZEIDAN, M.; PICHERSKY, E., et. al. Use of the polymerase chain reaction to amplify tomato yellow leaf curl virus DNA from infected plants and viruliferous whiteflies. **Phytopathology**. 82, p.1199-1202, 1992.

OLIVEIRA, A. C. S.; BOARI, A. J.; SOUSA, C. M.; PANTOJA, K. F. C.; SOUZA, C. A. **Detecção de piper yellow mottle vírus da pimenteira do reino nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Amazonas**. In: 50º Congresso Brasileiro de Olericultura. Guarapari. Anais. 2010.

OLIVEIRA, L. C. de et al. Bactérias endofíticas e a promoção de crescimento de plantas de pimenta-do-reino. **Embrapa Amazônia Oriental - Artigo em periódico indexado**. 2020.

ORTIZ, Emiro et AL. Histopathological features of infections caused by *Fusarium oxysporum* and *F. solani* in purple passion fruit plants (*Passiflora edulis* Sims). **Summa Phytopathologica**, v.40, n.2, p.134-140, 2014.

PALLÁS, V.; NAVARRO, J.A.; JAMES, D.. Recent Advance sonthe Multiplex Molecular Detection of Plant Viruses and Viroids. **Frontiers Media SA**, [S. I.], 9:2087, p.1-16, 2018.

PALLÁS, V.; SÁNCHEZ-NAVARRO, J. A.; JAMES, D. **Recent advances on the multiplex molecular detection of plant viruses and viroids**. *Frontiers in Microbiology*, v.9, article 2087, 2018.

PANTOJA, K. D. F.; BOARI, A. de J.; OLIVEIRA, A. C. S. de; SOUSA, C. M. de; SOUZA, C. Levantamento de viroses em pimenteira-do-reino no Estado do Pará. In: SEMINÁRIO CIENTÍFICO DA UFRA, 7.; SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 13; SEMINÁRIO DE PESQUISA DA UFRA, 1. **Pesquisa e desenvolvimento tecnológico na formação do jovem cientista: anais**. Belém, PA: UFRA: Embrapa Amazônia Oriental, 2009.

PANTOJA, K. F. C.; BOARI, A. J.; OLIVEIRA, A. C. S.; SOUSA, C. M. **Avaliação de matrizeiros de pimenta do reino quanto às viroses no estado do Pará**. In: **14º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA**, Belém, PA. Anais. 2010.

POLTRONIERI, M. C.; TREMACOLDI, C.R.; LEMOS, O.F. De. **Boas práticas agrícolas para aumento da produtividade e qualidade da pimenta-do-reino no Estado do Pará – Brasília, DF: Embrapa, 2014.**

RAKOTOMALALA, M.; VRANCKEN, B.; PINEL-GALZI A.; RAMAVOVOLOLONA, P.; HÉBRARD, E.; RANDRIANANGALY, J. E.; DELLICOUR, S.; LEMEY, P.; FARGETTE D. Comparando padrões e escalas de filogeografia de vírus de plantas: *Rice, vírus de manchas amarelas* em Madagascar e na África continental. **Virus Evolution**. V.5, Issue 2, vez023, July 2019.

RAMOS, A. L. R. CONAB: **Conjuntura pimenta-do-reino no Espírito Santo**. Espírito Santo: CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento, 7p., 2015.

RAMOS, Gleyce Kelly de Sousa et al. IDENTIFICATION AND MICROPROPAGATION OF VIRUS-FREE BLACK PEPPER GENOTYPES (*Piper nigrum* L.). **Ciência Agrícola**, Rio Largo, v.18, p.57-64, 2020.

ROCHA, A. C. B. **Padronização de metodologia para identificação molecular de piper yellow mottle virus (PYMoV) em plantas de pimenta- do-reino cultivadas no norte do Espírito Santo**. Dissertação - Universidade Federal do Espírito Santo, 32p., 2017.

RYBICKI, E. P. & HUGHES, F. L. Detection and typing of maize streak virus and other distantly related geminiviruses of grasses by polymerase chain reaction amplification of a conserved viral sequence. **J. Gen. Virol.** 71, p.2519-2526, 1990.

SARMA, Y. R.; KIRANMAI, G.; SREENIVASULU, P.; ANADARAJ, M.; HEMA M.; VENKATRAMANA, M.; MURTHY, A. K.; REDDY, D. V. R. Partial characterization andi

dentification of a vírus associated with stunt disease of black pepper (*Piper nigrum*) in South India. **Current Science**. 2001.

SARRA S.; PETERS, D. O vírus da mancha amarela do arroz é transmitido por vacas, burros e ratos de grama em lavouras de arroz irrigadas, **Doença de planta**, 87, p.804-808, 2003.

SASI, SHINA; BHAT, A. I. In vitro elimination of piper yellow mottle virus from infected black pepper through somatic embryogenesis and meristem-tip culture. **Crop Protection**, 103, p.39-45, 2018.

SILVA, Marcelo Barreto da; VITÓRIA, Edney Leandro da; CAMPANHARO, Alex. **Cultura da Pimenta-do-reino**. 1. ed. São Mateus: Gráfica Araça-ME, 2018. 128 p. v. 1.

SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. (Editors). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. **American Phytopathological Society Press**, St. Paul, Minn. 3.ed. 2001.

SCHEANA, L. et al. Development of quantitative PCR detection methods for phytopathogenic fungi and oomycetes. **Journal of Plant Pathology**, v.95, n.1, p.7-24, 2013.

SCHEANA, L. et al. Development of quantitative PCR detection methods for phytopathogenic fungi and oomycetes. **Journal of Plant Pathology**, v. 95, n. 1, p.7-24, 2013.

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

SILVA, I.C. Propagação vegetativa de *Ocotea puberula* Benth & Hook e *Ocotea Pretiosa* Nees pelo método de estaquia. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)** Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 109p., 1984.

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

TREMACOLDI, C. R. **Principais doenças fúngicas da pimenteira-do-reino no Estado do Pará e recomendações de controle**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2010.

TRIPATHI, AK; JAIN, D.C.; KUMAR, S. Secondary metabolites and their biological and medical activities of Piper species plants. **Journal of Medicinal and Aromatic Plants Sciences** 18, p.302-321, 1995.

VENTURA, J. A.; COSTA, H. **Manejo da fusariose da pimenta-do-reino no Estado do Espírito Santo**. Vitória: INCAPER, 2004. 18p.

VIDAL, M. F. **Evolução do cultivo de pimenta-do-reino na área de atuação do BNB**. 2020.

VINCELLI, P.; TISSERAT, N. Detecção de patógenos baseada em ácido nucléico em patologia vegetal aplicada. **Plant Dis.** 92, p.660–669. doi: 10.1146 / annurev-phyto-080508-081916, 2008.

WAHID, P.; SITEPU, D.; DECIYANTO, S.; UJANG-SUPERMAN, D. In. **Proceedings of the international Workshop on Black Pepper Diseases** (eds Site per, P. and Ujanp- 25 Superman, D.) Agency for Agricultural Reasearch and Development, **Research Institute for Spices and Medical Crops**, Bogor, Indonésia, 1992.

WARD, E.; FOSTER, S.J.; FRAAIJE, B.A.; MCCARTNEY, H.A. **Diagnóstico de patógenos de plantas:** abordagens imunológicas e baseadas em ácido nucléico. *Ann. Appl. Biol.* 145, p.1-16. doi: 10.3109 / 1040841X.2010.489892, 2004.