

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

ANNA CAROLINE BRINCO ROCHA

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Pipper yellow
mottle virus* (PYMoV) EM PLANTAS DE PIMENTA-
DO-REINO CULTIVADAS NO NORTE DO ESPÍRITO
SANTO**

SÃO MATEUS – ES

MARÇO DE 2017

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

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Pipper yellow
mottle virus* (PYMoV) EM PLANTAS DE PIMENTA-
DO-REINO CULTIVADAS NO NORTE DO ESPÍRITO
SANTO**

ANNA CAROLINE BRINCO ROCHA

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.

Orientadora: Prof. Dr. Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo

SÃO MATEUS – ES

MARÇO DE 2017

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Pipper yellow
mottle virus* (PYMoV) EM PLANTAS DE PIMENTA-
DO-REINO CULTIVADAS NO NORTE DO ESPÍRITO
SANTO**

ANNA CAROLINE BRINCO ROCHA

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.

Aprovada: 26 de março de 2017

Enilton Nascimento Santana

INCAPER

(Membro Externo)

Marcelo Barreto da Silva

Universidade Federal do Espírito Santo

(Membro Interno)

Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo

Universidade Federal do Espírito Santo

(Orientador)

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| RESUMO | iii |
| ABSTRACT | iii |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 3 |
| 2.1 Pimenta-do-reino | 3 |
| 2.1.1 Botânica..... | 3 |
| 2.1.2 Importância Econômica | 4 |
| 2.1.3 Propagação | 5 |
| 2.2 Víruses | 5 |
| 2.2.1 <i>Piper yellow mottle virus</i> - PYMoV | 6 |
| 2.2.2 Transmissão e Controle..... | 6 |
| 2.3 Métodos para identificação | 7 |
| 2.3.1 Amplificação em cadeia do DNA | 9 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS | 10 |
| 3.1 Diagnóstico visual e coleta..... | 10 |
| 3.2 Extração de DNA | 10 |
| 3.2.1 Protocolo 1..... | 10 |
| 3.2.1 Protocolo 2..... | 11 |
| 3.3 Identificação molecular | 12 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 15 |
| 5. CONCLUSÕES | 21 |
| REFERÊNCIAS..... | 22 |

RESUMO

ROCHA, Anna Caroline Brinco, M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; Março de 2016; Padronização de metodologia para identificação molecular de *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) em plantas de pimenta-do-reino cultivadas no Norte do Espírito Santo.; Orientador: Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo.

A pimenta-do-reino é uma das especiarias mais comercializadas no Brasil, sendo o estado do Espírito Santo considerado o segundo maior produtor dessa iguaria. Existem problemas quanto a disseminação de doenças viróticas já que a pimenta-do-reino é comercializada por meio de estacas e/ou mudas. Tanto no Brasil quando no estado do Espírito Santo já foram relatadas a presença do vírus *Piper yellow mottle virus* (PYMoV). O objetivo deste subprojeto foi padronizar uma metodologia de detecção do vírus através de folhas jovens de pimenta-do-reino da variedade Bragantina. Para isso foram testados diferentes métodos de extração de DNA utilizando folhas sintomáticas e folhas assintomáticas e diferentes protocolos para adequar o teste de PCR (reação em cadeia da Polimerase) utilizando primers específicos para amplificação do fragmento de DNA do vírus PYMoV. Os resultados da PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose corado com GelRed ou Blue Juice. Sendo que não foram obtidas bandas de fragmentos específicos do PYMoV, pois os primers utilizados amplificaram bandas inespecíficas.

Palavras chave: Pimenta-do-reino, PYMoV, PCR

ABSTRACT

ROCHA, Anna Caroline Brinco, M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; Março de 2016; Standardization of methodology for molecular identification of *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) in pepper plants cultivated in North of Espírito Santo.; Orientador: Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo.

Black pepper is one of the most commercialized spices in Brazil, and the state of Espírito Santo is considered the second largest producer of this delicacy. There are problems with the spread of viral diseases since pepper is marketed by cuttings and / or cuttings. Both in Brazil and in the state of Espírito Santo have already been reported the presence of *Piper yellow mottle virus* (PYMoV). The objective of this subproject was to standardize a virus detection methodology through young leaves of

Bragantina pepper. For this, different methods of DNA extraction using symptomatic sheets and asymptomatic sheets and different protocols to adapt the PCR (Polymerase chain reaction) test using specific primers to amplify the DNA fragment of the PYMoV virus were tested. PCR results were analyzed by agarose gel electrophoresis stained with GelRed or Blue Juice. Since it was not obtained bands of specific fragments of the PYMoV, because the primers used amplifacaram nonspecific bands.

Key words: pepper nigrum; PYMoV; PCR

1. INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Piper* apresenta mais de 1.000 espécies, entre as quais, nas regiões tropicais, se destaca *P. nigrum* L., de origem indiana. É uma especiaria altamente valorizada em todo o mundo. Devido ao seu sabor único, é frequentemente utilizada como condimento alimentar, sendo a mais importante das especiarias usadas principalmente no preparo e processamento de alimentos (PRABHAKARAN, 2011).

Nas décadas de 80, o Brasil chegou a atingir o nível de maior produtor mundial, porém, com a queda do valor da pimenta-do-reino na década de 90 e problemas com doenças como a fusariose, fizeram com que caísse de posição. Mesmo assim, continua como um dos maiores produtores e exportadores mundiais, respondendo por cerca de 28% da produção mundial. A partir de 2000, com o aumento de preço da pimenta-do-reino, a produção voltou a subir. No Espírito Santo, a cultivar Cingapura, ao que parece, foi introduzida primeiramente em Linhares, com mudas originárias do Pará e, posteriormente, novas introduções foram efetuadas a partir do Estado da Bahia. Atualmente, no Espírito Santo, cultiva-se área superior a 3.500 há. (CONAB, 2015).

As contaminações na cultura da pimenta-do-reino podem ser ocasionadas por vários agentes, por exemplo, o químico que é a eventual contaminação por resíduos agrotóxicos, ultrapassando limites legalmente permitidos. O físico é imprescindível para a aceitabilidade do produto no mercado, é considerado um programa de segurança e qualidade. Dar-se mais ênfase ao agente biológico, pois é um problema fitossanitário mais frequente e restrita na planta, que leva sua delimitação na produtividade (DUARTE et al., 2005).

A doença mosqueado-amarelo em pimenta-do-reino, causada pelo vírus PYMoV, se caracteriza pelo aparecimento de pontos cloróticos brilhantes dispersos na folha ou entre as nervuras. As folhas são deformadas com bordas onduladas.

Também ocorre folhagem raleada e, conseqüentemente, redução no tamanho e número de frutos por espiga (BOARI 2008).

Técnicas moleculares como a técnica de PCR (amplificação em cadeia do DNA) tem sido utilizada como ferramenta para o diagnóstico molecular de viroses em pimenteiras (SILVA et al., 2002). A PCR é utilizada para amplificar um fragmento preciso de DNA a partir de uma mistura complexa de material de partida normalmente denominado DNA molde (WILSON & WALKER, 2010).

Com o aumento da incidência de viroses em plantações de pimenta-do-reino, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias para a identificação desses vírus. Assim, o intuito desse trabalho foi padronizar um método de identificação para vírus PYMoV, adequando os testes de PCR para detecção do mesmo na região de São Mateus-ES, dando subsídios ao desenvolvimentos de estratégias de controle da doença.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pimenta-do-reino

2.1.1 Botânica

A espécie *Piper nigrum* L., conhecida mundialmente por pimenta preta, e no Brasil como pimenta-do-reino, é uma das diversas espécies pertencentes à família Piperaceae, representada por quatro gêneros e cerca de 500 espécies (MAGEVSKI et al., 2011). As Piperaceae apresentam inflorescência em espigas simples, mas em alguns casos podem ser compostas do tipo umbelas ou racemo. As suas espécies podem se apresentar como ervas, arbustos, sub-arbustos ou lianas. (Souza & Lorenzi, 2008).

O gênero *Piper* inclui grande número de espécies que se caracterizam pelo uso medicinal popular e pela importância econômica e comercial, em virtude da produção de óleos essenciais utilizados pela indústria de condimentos, farmacêutica e também de inseticidas (SILVA & MACHADO, 1999).

Classificada como uma planta perene, a pimenta possui caule liso, redondo, nodoso e ramificado, cujas folhas são inteiras, laminadas, ovaladas, com ápice agudo e coria com sete nervuras principais. Suas flores são pequenas, brancas e dispostas em espigas, ao passo que seus frutos são globulares, vermelhos quando maduros, e ao secarem passam a apresentar uma superfície grossa, rugosa e escurecida (PISSINATE, 2006). É considerada como a única especiaria cujos frutos podem ser comercializados em quatro diferentes versões de grãos, sendo estas, preta, branca, verde ou vermelha; embora a sua forma mais comum de comercialização seja a preta (EMBRAPA, 2004).

A pimenta-do-reino é caracterizada também por ser uma planta exótica, herbácea, trepadeira, de utilização mundial como condimento, sendo tempero de excelência no preparo dos mais diversos pratos. (EMBRAPA, 2010) Além de que

pode possuir diferentes atividades biológicas, como antiapoptótica, antibacterial, antitoxina do colon, antidepressante, antifúngica, analgésico, antidiarréia, antiinflamatória, antimutagênica, antimetástica, antioxidativa, imunomodulatório, antiespasmódico, obesidade, asma, sinusite, antiespermatogênica, antitireóide, antitumor, potencializador ciprofloxacina, cólica, doenças gástricas, hepatoprotetiva, aumento de plasma, aumento de enzimas pancreáticas, inibe o citocromo, inibe a transcrição, inseticida, febre intermitente, larvicida, pesticida (AHMAD et al., 2012).

2.1.2 Importância Econômica

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é considerada uma das principais especiarias no mundo, sendo o Vietnã o maior produtor e exportador, seguido da Índia, Indonésia e Brasil (LEMOS et al., 2011). Na década de 50 o Brasil tornou-se auto suficiente na produção de pimenta-do-reino, pois o sucesso dos pipericultores de Tomé Açu, no estado do Pará, incentivou a implantação de lavouras comerciais em municípios de outros estados como o Espírito Santo, Bahia, Maranhão, Ceará e Paraíba (EMBRAPA, 2013).

O Espírito Santo é o segundo maior produtor de Pimenta do Reino do país, perdendo apenas para o estado Pará. Mas ainda assim, é o que tem a maior produtividade com 2,82 toneladas por hectare, enquanto a média brasileira é de 2,22 toneladas por hectare. (SEAG, 2016). Possui 7.162 hectares de área plantada de pimenta-do-reino segundo (IBGE 2015). Os plantios concentram-se no Norte do Estado, tendo como destaque os municípios de São Mateus e Jaguaré, com mais de 75% da área cultivada e da produção (CONAB, 2015). Porém essa produtividade vem diminuindo, principalmente devido às doenças, como as viroses que atingem as lavouras. As cultivares comercialmente mais produzidas no Espírito Santo são a Cingapura-BRA-19, laçarará, Guajarina e Bragantina-BRA-124 (CEDAGRO, 2012).

Por ser uma especiaria que apresenta grande produtividade, é um dos condimentos mais valorizados no mundo apresentando grande valor econômico, permitindo que a atividade desenvolvida pelos pipericultores proporcione alta rentabilidade (LIMA et al., 2010).

2.1.3 Propagação

A espécie *P. nigrum* pode ser propagada por estacas, sendo que para a utilização das mudas em lavouras comerciais o ideal seria a estaquia, por iniciar a produção mais cedo e manter as características da planta matriz (LEITE; INFORZATO, 1966). A propagação vegetativa é a multiplicação de um vegetal a partir de tecidos que possuem capacidade de reassumir suas atividades meristemáticas. É a maneira mais rápida e segura de se obter uma nova planta com características iguais da planta matriz que a originou (SILVA, 1984). A estaquia é considerada a principal técnica de propagação vegetativa. Pois tem a capacidade de reproduzir, as características genéticas de qualquer planta individual (HARTMANN et al., 2011).

A Propagação através de estacas enraizadas consiste em enraizar estacas de pimenteiras com um, dois ou três nós providos de folha, deixando apenas o nó superior com folha correspondente, ou estacas com três a cinco nós desprovidos de folhas. As estacas são colocadas para enraizar e o início da emissão das raízes se dá aos 12-20 dias, época em que as mudas são transplantadas (VELOSO & ALBUQUERQUE, 1989).

No entanto, a comercialização de estacas e/ou mudas contribui para disseminação das viroses. Questões fitossanitárias, apoio técnico, acesso a material genético, redução do custo de produção da pimenta-do-reino no Brasil e a agregação de valor ao produto são apontados pelo Ministério da Agricultura (MAPA), como maiores desafios para o setor (MAPA, 2012).

2.2 Viroses

No mundo, quatro vírus foram relatados infectando a pimenteira do reino, o Cucumber mosaic virus (CMV), Piper yellow mottle virus (PYMoV), um Closterovirus e um isométrico ainda não identificado (WAHID et al., 1992; SARMA et al., 2001; BHAT et al., 2003). Já foram realizados trabalhos que mostram a ocorrência desses vírus, mais especificamente nos estados do Pará, Amazonas, Espírito Santo (amostras oriundas de Linhares) e Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2010).

Verificou-se que é comum no campo a planta estar assintomática e mesmo assim apresentar a doença, mostrando que não se deve confiar apenas na sintomatologia para seleção de plantas saudáveis. As viroses podem causar elevadas perdas de produção se ocorrerem em alta incidência no pimental e, sobretudo, se associadas à fusariose (BOARI, 2014).

2.2.1 *Piper yellow mottle virus* - PYMoV

Em 1997, o vírus do mosqueado amarelo da pimenta (*Piper yellow mottle virus*, PYMoV) foi reconhecido como patógeno de pimenteira-do-reino. O PYMoV pertencente à família Caulimoviridae, gênero Badnavirus, é constituído de partículas baciliformes de 125 x 30nm de dimensão, com DNA de fita dupla (BOARI, 2014).

As principais diferenças na manifestação dos sintomas das duas viroses (CMV e PYMoV) são observadas nas raízes, nas hastes e ramos, na folhagem, no desenvolvimento da planta, no modo de transmissão e na espécie de vetor. Os sintomas nas inflorescências e espigas são semelhantes. Ambas as viroses reduzem drasticamente a produção (DUARTE et al., 2000).

Os sintomas causados pelo vírus PYMoV são, necrose dos tecidos interno na haste da planta; descoloração dos vasos e pontos necróticos nos tecidos internos dos ramos; mancha de coloração amarelo limão brilhantes, dispersas no limbo ou em faixas transversais e faixas cloróticas ao longo da nervura principal das folhas. Folhas com numerosas manchas cloróticas tornam-se completamente amareladas; ocorre malformação foliar e aparecimento de ondulações em uma ou em ambas margens da folha. Em folhas severamente infectadas podem surgir bolhas no limbo. Causa esterilização parcial das flores e redução no número de frutos por espiga. Por fim, causa redução do crescimento da planta, e após a podagem surgem brotações fracas com folhas pequenas, mal formadas e com clorose intensa; pode surgir lesões necróticas. E as plantas apresentam crescimento lento, permanecendo por longo tempo como fonte do vírus (DUARTE, 2000).

2.2.2 Transmissão e Controle

A transmissão pode ocorrer de diferentes maneiras, por enxertia onde as partículas infectivas do PYMV se localizam nos tecidos do mesófilo, multiplicando-se

e distribuindo-se sistemicamente pela seiva vegetal. Através da enxertia de material infectado em tecido sadio, o vírus pode ser transmitido logo que ocorra a soldadura dos tecidos do enxerto e do porta-enxerto. Por transmissão do inseto-vetor, sendo que o vírus PYMoV já foi relatado como sendo disseminado pelas cochonilhas *Planacoccus citri*, *Diconocoris distanti*, *Ferrisia virgata*, *Pseudococcus elisae* Borchsenius, pelo percevejo de renda *Corythucha ciliata* por enxertia e mecanicamente, mas não por sementes (BHAT et al., 2003; SILVA et al., 2002; DUARTE 200).

Pode ocorrer ainda a transmissão do vírus por material vegetativo, onde o vírus pode ser transmitido, à longa distância, por estacas de propagação retiradas de plantas infectadas. E por sementes apesar das mesmas, na maioria das viroses vegetais, impedem que patógenos se perpetuem através das novas gerações de plantas. (DUARTE, 200).

Para se controlar a ocorrência de viroses em pimenteira-do-reino deve se utilizar mudas sadias para implantar tal espécie, que foram obtidas a partir de estacas de plantas livres de vírus. Deve ser feito o controle de plantas invasoras pois algumas espécies podem atuar como hospedeiras alternativas do vírus, sendo assim fonte de inoculo para novas infecções. E quando for identificado a presença do vírus recomenda-se a erradicação e queima das plantas infectadas para se controlar a disseminação para novas plantas (TREMACOLDI & DUARTE, 2006). O estabelecimento de medidas racionais é essencial, a exemplo do monitoramento do vetor em campo para detecção dos focos de infestação (BOTTON; FAJARDO, 2003).

2.3 Métodos para identificação

O diagnóstico pode ser realizado de diversas maneiras, tanto no campo quanto em laboratório. O diagnóstico visual, leva em consideração o aparecimento e as características sintomáticas das plantas. Porém, dependendo da época do ano, do estágio de desenvolvimento da planta e outros fatores, torna-se difícil identificar os sintomas característicos e diferenciar o mosaico do mosqueado amarelo, principalmente no início da infecção. (TREMACOLDI & DUARTE, 2006). A

sintomatologia apresentada por plantas doentes no campo pode ser complexa; pode envolver diversos agentes virais e não ser característica de uma doença em particular. Além disso, plantas infectadas e sem sintomas aparentes, podem propiciar a disseminação desses patógenos quando utilizadas como matrizes; e sintomas semelhantes aos de viroses apresentados pela planta podem não ter sido propiciados por vírus, mas por outros patógenos ou mesmo por fatores abióticos (LIMA, 2009).

O método biológico é realizado a partir da transmissão do vírus que ocorre por meio da união de tecidos ou por inoculação mecânica. Para isso, é necessário plantas indicadoras, ou seja, espécies vegetais capazes de demonstrar os sintomas causados pelos vírus, via inoculação dos mesmos. O uso de plantas indicadoras para realizar diagnóstico requer instalações apropriadas e principalmente tempo, desde a produção das mudas das plantas indicadoras, até a visualização dos sintomas após a inoculação dos vírus (DUARTE, et al., 2002). Além do tempo de crescimento da planta, esse método necessita de uma confirmação que pode ser realizada por sorologia ou por técnicas moleculares (LIMA, 2009)

As técnicas sorológicas constituem uma ferramenta de grande valor, pois são imprescindíveis no diagnóstico e na detecção de fitopatógenos. Desta maneira, a disseminação de vírus pode ser monitorada e controlada (EIRAS & CHAVES 2011). sendo o mais comum o ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), depende da produção de anticorpos contra a proteína capsidial de um determinado vírus e que são utilizados para detecção do mesmo. De grande utilidade, devido sua praticidade e rapidez; e por ser utilizado para avaliação de um grande número de amostras. Porém, há uma incapacidade de detectar baixas concentrações de vírus no tecido vegetal; e em alguns casos, não há anticorpos produzidos para a identificação dos vírus (LIMA, 2009).

Outro método são as técnicas moleculares que tem sido utilizadas como ferramenta para o diagnóstico molecular de viroses, a técnica de PCR (amplificação em cadeia do DNA); e a técnica RT-PCR (reação de transcrição reversa, seguida da reação da polimerase em cadeia). Que possui como vantagem a alta sensibilidade, pois mesmo que o patógeno esteja presente na amostra vegetal em pequenas quantidades, a amplificação pela PCR propicia a sua detecção (LIMA, 2008).

2.3.1 Amplificação em cadeia do DNA

É um procedimento que possibilita a amplificação de fragmentos de DNA específicos, partindo-se de uma quantidade mínima de DNA. Essa técnica de biologia molecular consiste na síntese enzimática de cópias de ácidos nucleicos (COSTA, 2010). Vírus que possuem RNA genômico podem ser identificados pela técnica de RT-PCR, reação de transcrição reversa, seguida da reação da polimerase em cadeia, que possui como molde inicial a molécula de RNA e gera cDNA, a partir de desoxirribonucleotídeos trifosfatados. Uma alíquota desta amostra de cDNA então é utilizada para a reação de amplificação por PCR (NASCIMENTO, et al., 2010).

A PCR permite que uma sequência do genoma seja amplificada um bilhão de vezes, purificando-a do restante do DNA (ALBERTS, 2005). Requer o conhecimento de alguma informação da sequência de DNA, que flanqueia o fragmento de DNA a ser amplificado (DNA alvo). A partir desta informação dois iniciadores oligonucleotídicos podem ser sintetizados quimicamente, um oligonucleótido para cada uma das duas cadeias de DNA (WILSON & WALKER, 2010). Para isso, deve-se escolher um sítio de ligação confiável para os primers, atentando para possíveis polimorfismos ou mutações (BUSTIN & MUELLER, 2005).

A PCR é um desenvolvimento notável que está mudando a abordagem de muitos cientistas para a análise de ácidos nucleicos e continua a ter um profundo impacto sobre as principais biociências e biotecnologia (WILSON & WALKER, 2010).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Diagnóstico visual e coleta

O material vegetal utilizado para as análises se constituiu de folhas jovens (tecido vegetal fresco) da espécie *Piper nigrum* da variedade Bragantina, coletado em lavoura de pimenta do reino localizada no km 16, em uma propriedade particular do município de São Mateus – ES. As folhas foram colocadas em sacolas plásticas com sílica em gel para melhor conservação e guardadas em caixa de isopor.

Com o auxílio do virologista as plantas foram identificadas quantos aos sintomas que apresentavam e marcadas com fitas de cores diferentes. Dessa maneira foram identificadas plantas sintomáticas para o vírus PYMoV e plantas sintomáticas tanto para o vírus PYMoV quanto para o vírus CMV.

Os procedimentos laboratoriais foram desenvolvidos nos laboratórios de Genética e Microbiologia; e Genética e Conservação Animal do Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES).

3.2 Extração de DNA

As folhas foram selecionadas e lavadas em água corrente e secadas ao ambiente. Para testar a eficiência da extração do DNA em termos de concentração e qualidade do DNA, foi utilizado o kit comercial GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit, e protocolos retirados da literatura. Para a maceração do tecido foram testados dois procedimentos: trituração utilizando “sonda” e ependof; e trituração rápida com nitrogênio líquido usando cadinho e pistilo de porcelana.

Além do protocolo fornecido pelo kit comercial GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit, foi testado o protocolo 1 (OLIVEIRA et al., 2010) e protocolo 2 (BOARI, 2012) modificados.

3.2.1 Protocolo 1

Cem miligramas do tecido foliar foi macerado em almofariz gelado com 1,6 mL do tampão de lavagem (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0; 2 M NaCl e BSA a 0.05%) com 10 µL do antioxidante β-mercaptoetanol. Após centrifugação a 13.000 rpm, descartar sobrenadante. Adicionados 800 µL do Tampão CTAB (2% CTAB (cetyltrimethylammoniumbromide); 1.4 M NaCl; 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 e 0,5% de β-mercaptoetanol). Levar a banho maria a 55° C por 15-30 minutos. Então homogeneizar com 800 µL de clorofórmio:isoamílico (24:1) e centrifugar a 13.000 rpm. Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo aonde repetiu-se uma vez a clarificação do extrato. Coletou-se 600 µL da fase aquosa e foram adicionados 600 µL de isopropanol e 60 µL de acetato de amônio 7,5M e então incubados por uma noite no freezer. Após centrifugação o sedimento foi lavado com álcool 70% e posteriormente secados, ressuspendido com 50 µL de água ultrapura autoclavada e armazenados a -20°C.

3.2.1 Protocolo 2

Cem miligramas de folha jovem foram macerados com 900 µL de tampão de lavagem (Tris-HCl, EDTA, 2M NaCl, BSA e 2-Me) centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. O sedimento foi ressuspendido com 900 µL de tampão CTAB (2 % CTAB, Tris-HCl, 1.2 M de NaCl, 2-Me). Incubado em banho-maria a 55°C por 15 minutos. Adicionou-se 500 µL de clorofórmio e homogeneizou-se por 2 minutos. Após centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, a fase aquosa (700 µL) foi recolhida, transferida para novo microtubo e novamente clarificada com clorofórmio. Posteriormente a centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, 400 µL da fase aquosa foram transferidos para um novo microtubo, onde foram adicionados 400 µL de isopropanol e 40 µL de acetato de amônio (7.5 M). Homogeneizados e mantidos a -20°C por uma noite. Por fim, as amostras foram levadas a centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos e o sedimento de ácido nucléico foi lavado com álcool 70 % e, posteriormente, seco e ressuspendido com 50 µL de água ultrapura.

As amostras de DNA obtidas foram avaliadas quanto a sua concentração e grau de pureza por meio de espectrometria utilizando o aparelho Nanodrop, para esse procedimento utilizou-se 1µl do DNA de cada amostra. A qualidade do DNA foi observada por meio da eletroforese em gel de agarose (1%) com coloração com Gel Red e Blue Juice e após a corrida fotodocumentado no Transluminador Lpix Loccus.

Para tal procedimento utilizou-se 2µl da amostra de DNA e 1µl do Gel Red e Blue Juice.

3.3 Identificação molecular

Para as reações de PCR foram utilizados DNAs ditos como “controles positivos e negativos” do vírus, gentilmente disponibilizados pela Dra. Alessandra de Jesus Boari, pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental. Foram testados vários protocolos de PCR com diferentes concentrações de seus constituintes básicos, a partir de modificações encontradas em trabalhos realizados por Sousa et al. (2011) e Oliveira et al. (2010) Os protocolos estão representados na tabela abaixo.

Tabela 1. Diferentes Protocolos testados nas reações de PCR.

| Protocolos | | | | | | | |
|------------|------|------------------------|--------------------------|---------|-------------|----------------------|-----------------------|
| | DNA | Tampão de reação (10x) | MgCl ₂ (25mM) | Taq DNA | dNTP (10mM) | <i>Primer Foward</i> | <i>Primer Reverse</i> |
| 1 | 10ng | 2.5µL | 3.0 mM | 0.5 µL | 0.2 mM | 2 µM | 2 µM |
| 2 | 10ng | 2.5 µL | 1.5 mM | 0.5 µL | 0.2 mM | 2 µM | 2 µM |
| 3 | 10ng | 2.5 µL | 3.0 mM | 0.5 µL | 0.4 mM | 2 µM | 2 µM |
| 4 | 10ng | 2.5 µL | 3.0 mM | 0.5 µL | 0.8 mM | 2 µM | 2 µM |
| 5 | 10ng | 2.5 µL | 3.0 mM | 1.0 µL | 0.2 mM | 2 µM | 2 µM |
| 6 | 10ng | 2.5 µL | 1.5 mM | 1.0 µL | 0.2 mM | 2 µM | 2 µM |
| 7 | 10ng | 2.5 µL | 3.0 mM | 1.0 µL | 0.4 mM | 2 µM | 2 µM |
| 8 | 10ng | 2.5 µL | 3.0 mM | 1.0 µL | 0.8 mM | 2 µM | 2 µM |
| 9 | 10ng | 2.5 µL | 3.0 mM | 1.0 µL | 0.2 mM | 4 µM | 4 µM |
| 10 | 10ng | 2.5 µL | 1.5 mM | 1.0 µL | 0.2 mM | 4 µM | 4 µM |
| 11 | 10ng | 2.5 µL | 3.0 mM | 1.0 µL | 0.4 mM | 4 µM | 4 µM |
| 12 | 10ng | 2.5 µL | 3.0 mM | 1.0 µL | 0.8 mM | 4 µM | 4 µM |

O par de *primers* utilizado foram o PYMoV (F) 5' TAA CAG GAC TAG GGA TGG 3' e PYMoV (R) 5' CAG CTG GTC TTC TTG ATA ATA 3' foi adquirido através da Bioneer Oligo Synthesis Report. Esses mesmos oligonucleotídeos foram utilizados para a detecção do vírus PYMoV por Sousa et al. (2011).

Outros primers utilizados foram desenhados a partir da ORF3 do DNA do vírus. PYORF31 (F) 5' CTG CAC AGG AAG GAA GAA GG 3' e PYORF31 (R) 5' AGT GAG GGG GTC GAA ATT CT 3'; e outro par de primers foi o PYORF32A (F) 5' ACC TCG CTG ACA ACT GGA CT 3' o PYORF32A (R) 5' TGG GTC ATG GTT GCA ATA GA 3'.

E por fim, um conjunto de primers retirados da literatura foram testados, BADNA-T, BADNA-1R E SCBV-R1.

A reação de amplificação consistiu de 30 ciclos de 94 °C, 49,5 °C e 72 °C, com duração de um minuto as duas primeiras etapas (desnaturação do DNA e anelamento dos primers), e um minuto e meio a terceira etapa (extensão dos iniciadores). Essas condições foram as mesmas utilizadas por Sousa et al. (2011) e Oliveira et al. (2010) com uma modificação no tempo na terceira etapa. Em todas as reações de PCR foram utilizadas amostras de DNA controle positivo e negativo, além das amostras a serem testadas.

Após a amplificação, as amostras foram observadas por meio de eletroforese em gel de agarose (1%) com coloração GelRed e Blue Juice e o gel foi fotodocumentado.

Após as primeiras análises, alguns dos protocolos foram novamente modificados (temperatura de anelamento dos *primers* e concentração de constituintes). Esses protocolos estão representados na tabela 2.

Tabela 2. Novos protocolos testados nas reações de PCR

| Protocolos | | | | | | | |
|------------|-------|------------------------|--------------------------|---------|-------------|-----------------------|-----------------------|
| | DNA | Tampão de reação (10x) | MgCl ₂ (25mM) | Taq DNA | dNTP (10mM) | <i>Primer forward</i> | <i>Primer Reverse</i> |
| 1 | 10 ng | 2.5 µL | 3.0 mM | 1.0 µL | 0.2 mM | 2 µM | 2 µM |
| 2 | 10 ng | 2.5 µL | 1.5 mM | 1.0 µL | 0.2 mM | 2 µM | 2 µM |
| 3 | 10 ng | 2.5 µL | 3.0 mM | 1.0 µL | 0.4 mM | 2 µM | 2 µM |

| | | | | | | | |
|----|-------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|-------------|
| 4 | 10 ng | 2.5 μ L | 3.0 mM | 1.0 μ L | 0.8 mM | 2 μ M | 2 μ M |
| 5 | 10 ng | 2.5 μ L | 1.5 mM | 1.0 μ L | 0.2 mM | 2 μ M | 2 μ M |
| 6 | 10 ng | 2.5 μ L | 3.0 mM | 1.0 μ L | 0.2 mM | 2 μ M | 2 μ M |
| 7 | 10 ng | 2.5 μ L | 4.0 mM | 1.0 μ L | 0.2 mM | 2 μ M | 2 μ M |
| 8 | 10 ng | 2.5 μ L | 3.0 mM | 1.0 μ L | 0.4 mM | 2 μ M | 2 μ M |
| 9 | 10 ng | 2.5 μ L | 3.0 mM | 1.0 μ L | 0.8 mM | 2 μ M | 2 μ M |
| 10 | 10 ng | 2.5 μ L | 3.0 mM | 1.0 μ L | 0.4 mM | 5.0 μ M | 5.0 μ M |

A reação de PCR utilizada nos protocolos da tabela 2, consistiu em 30 ciclos de 94 °C, 45 °C e 72 °C, com duração de um minuto as duas primeiras etapas (desnaturação do DNA e anelamento dos primers), e um minuto e meio a terceira etapa (extensão dos iniciadores). Foram utilizadas amostras de DNA controle positivo e negativo, além das amostras a serem testadas. Após as reações de amplificação também foi realizada uma eletroforese em gel de agarose (1%) e os géis fotodocumentados.

Após confirmação da amplificação em gel de agarose, amostras foram enviadas para o Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa para a realização do seqüenciamento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A etapa básica para estudos moleculares desta natureza é a extração do DNA. A partir dos resultados obtidos nos ensaios-piloto percebeu-se que o melhor método para maceração das amostras vegetais frescas foi aquele com cadinho e pistilo, visto que a quantificação por espectrofotometria mostrou uma relação de absorbância A260/A280 de 1,79 a 1,85, dentro dos padrões laboratoriais aceitáveis. Já utilizando a maceração dos tecidos em microtubos com bastão de vidro a relação de absorbância A260/A280 mostrou valores inferiores (1,54), indicando possível contaminação na amostra. Foi observado que durante os processos de extração do DNA as amostras mostravam-se escurecidas, refletindo a oxidação dos tecidos. Além disso, em alguns casos, a análise do gel mostrava DNA com leve padrão de degradação como ilustrado na figura 2. Relatos da literatura já mostram que, dependendo da espécie em estudo e das condições laboratoriais, são necessárias algumas modificações e adaptações nos protocolos de extração para obtenção de padrões nítidos e reprodutíveis de bandas de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

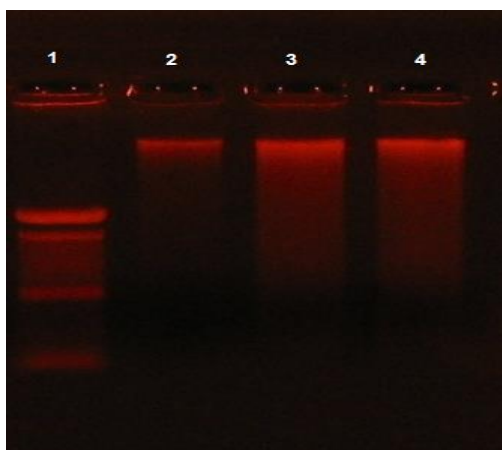


Figura 2. Gel fotodocumentado após extração do DNA utilizando dois métodos para maceração. 1. DNA ladder; 2. DNA obtido por maceração dos tecidos em microtubos com bastão de vidro; 3 e 4. DNA obtido por maceração utilizando cadinho e pistilo.

Com isso no segundo experimento realizado para padronizar o método de extração de DNA, o método utilizado para maceração das amostras vegetais frescas foi aquele com cadinho e pistilo. Quando as amostras foram avaliadas por meio da espectrofotometria, a relação de absorbância A260/280 foi de 1,87 a 2,17. Na realização da extração de DNA foi também utilizado o PVP (polivinilpirrolidona) no tampão de extração como forma de minimizar o efeito oxidativo e também aprimorar o método de maceração do tecido foliar visando obter DNA de melhor qualidade. As amostras então foram avaliadas quanto a qualidade através do gel de agarose (1%) com coloração GelRed ou Blue Juice como ilustra a figura 3. Após a análise, foram selecionadas para a reação de PCR aquelas amostras de DNA que não se mostravam degradadas.

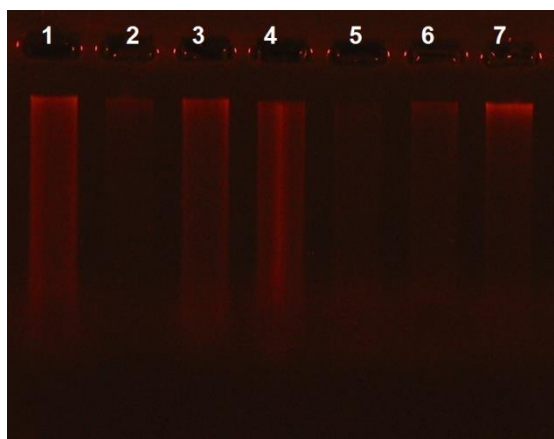


Figura 3. Gel fotodocumentado após extração do DNA, onde o método utilizado para maceração foi por meio de cadinho e pistilo.

Para técnica de PCR foi desenvolvido com base na literatura, vários protocolos com algumas diferenças nas concentrações de seus componentes como visto nas tabelas 1 e 2.

Nos quatro primeiros protocolos testados (tabela 1) foi possível observar o aparecimento de bandas no gel, porém sem resultados conclusivos quanto ao seu peso molecular. Segundo informações da literatura, o par de *primers* utilizado deveria amplificar um fragmento de cerca de 450pb (Sousa et al. (2011)).

Além disso, observou-se o aparecimento de bandas somente nas amostras do controle positivo e não nas amostras de DNA de indivíduos sabidamente infectados com o vírus (plantas sintomáticas).

Nos protocolos cinco ao oito da tabela 1, não houve aparecimento de bandas amplificadas. Por isso nos protocolos nove ao doze aumentou-se a concentração dos *primers* e o tempo da corrida do gel também foi aumentado. Porém também não observou-se aparecimento de bandas amplificadas. Os testes de PCR foram repetidos com os protocolos cinco ao oito, sendo que no momento da eletroforese o tempo da corrida foi aumentado. Com isso nos controles positivos houve aparecimento de banda amplificada, porém não a banda específica do vírus, que seria de 450pb segundo Sousa et al. (2011).

Em função desses últimos resultados foi realizadas uma modificação na temperatura de anelamento dos *primers*, a mesma foi reduzida de 49,6°C para 45°C. Os protocolos foram testados novamente como mostrado na tabela 2. Nos protocolos um ao quatro como mostra a figura 4, observou-se aparecimento de bandas amplificadas nos controles positivos do protocolo três, porém não amplificou a banda específica do vírus. Com os resultados obtidos dos protocolos cinco ao sete, não foi observado aparecimento de bandas nos DNAs controles. Porém houve aparecimento de diversas bandas nos DNAs de pimenta-do-reino infectada e sadia, em todos os três protocolos em questão como pode ser observado na figura 5. Nos protocolos oito ao dez houve o aparecimento de bandas apenas no protocolo dez, onde a concentração de *primers* era maior. Porém, houve aparecimento de uma mesma banda tanto nos controles positivo, negativo e nos DNAs de pimenta-do-reino infectada e sadia. Além de ter amplificado várias outras bandas nas amostras de DNA de pimenta-do-reino, mas nenhuma específica e correspondete ao do vírus PYMoV.

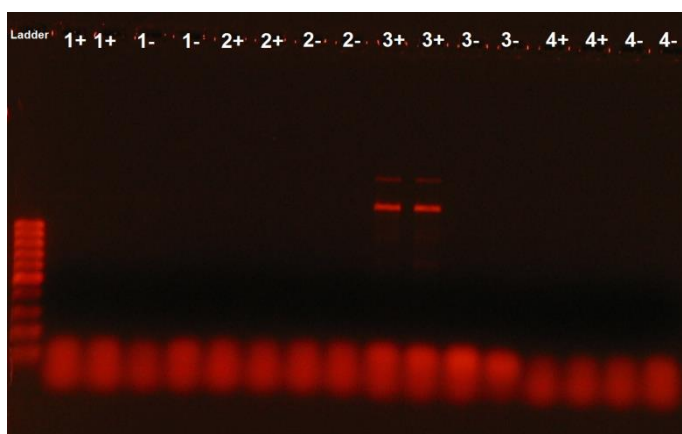


Figura 4. Gel fotodocumentado após PCR utilizando protocolos um ao quatro, explícitos na tabela 2. + são os DNAs ditos positivos para o vírus, e – DNAs ditos negativos para o vírus. Observa-se bandas amplificadas nos controles positivos do protocolo três.

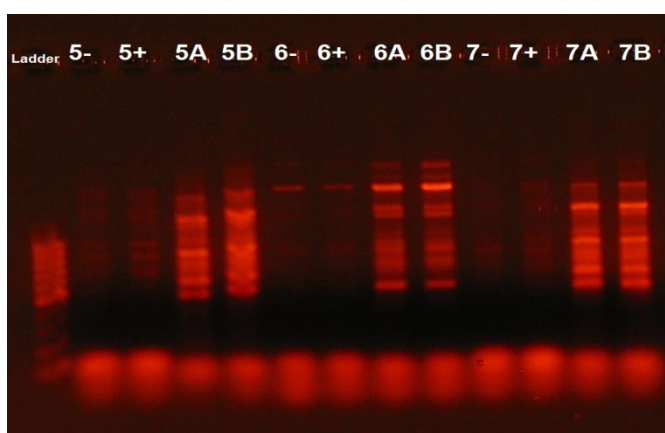


Figura 5. Gel fotodocumentado após PCR utilizando protocolos cinco ao sete explícitos na tabela 2. +) DNAs ditos controles positivos para o vírus; -) DNAs ditos controles negativos para o vírus; A) DNA de pimenta-do-reino infectada e B) DNA de pimenta-do-reino sadia.

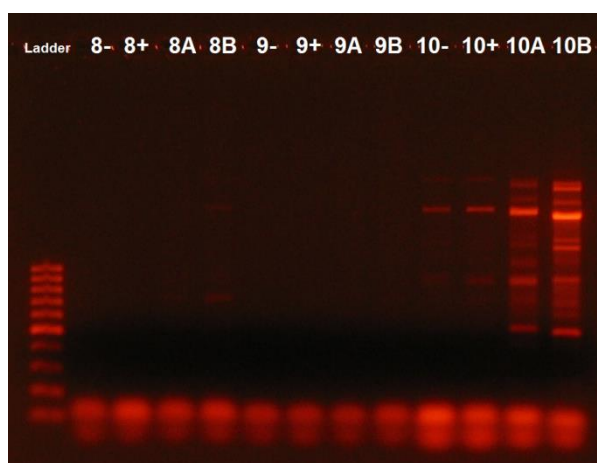


Figura 6. Gel fotodocumentado após PCR, utilizando protocolos oito ao 10 explícitos na tabela 2. +) DNAs ditos controles positivos para o vírus; -) DNAs ditos controles negativos para o vírus; A) DNA de pimenta-do-reino infectada e B) DNA de pimenta-do-reino sadia.

Uma das dificuldades de se trabalhar com primers específicos que precisam ser complementares a sequências únicas, é justamente a obtenção desses primers pois segundo Reddy et al. (2001) não deve haver no primer seqüências repetitivas para evitar anelamento inespecífico. O que está sendo observado nos resultados apresentados acima. Pois não é qualquer seqüência do DNA que deve ser utilizada para obtenção do mesmo. Uma outra causa desses anelamentos inespecíficos pode ter sido a temperatura de anelamento, que mesmo havendo modificação não mostrou resultados positivos, sendo assim posteriormente pode ser feito um teste de gradiente de temperatura, para que se obtenha a temperatura ideal pois segundo Carmargo (2014) é necessário a determinação da temperatura de anelamento ideal para que o marcador apresente um produto amplificado o mais próximo do específico.

Os protocolos retirados da literatura não foram tão eficientes quanto ao kit comercial utilizado. E com a utilização de nitrogênio líquido obteve-se um DNA de melhor qualidade, não degradado. Os primers utilizados retirados da literatura não amplificaram como esperado. E o primer desenhado PYORF31 amplificou bandas específicas de aproximadamente 950pb, como observado na figura abaixo.

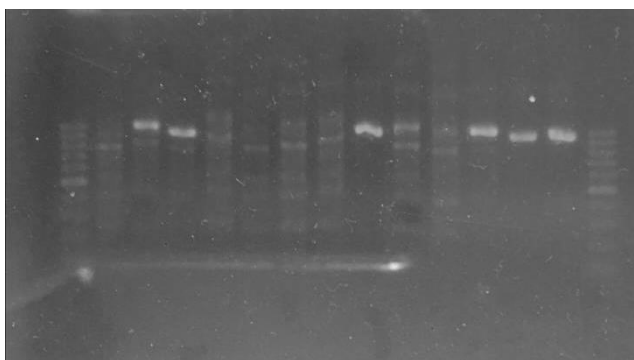


Figura 7. Gel fotodocumentado após PCR, bandas amplificadas de indivíduos sintomáticos para o vírus PYMoV.

Amostras de DNA foram enviadas para seqüenciamento na Universidade Federal de Viçosa. A partir do seqüenciamento, é possível comprovar que a banda amplificada durante a PCR é parte do DNA do PYMoV. O resultado obtido pode ser observado na figura abaixo.

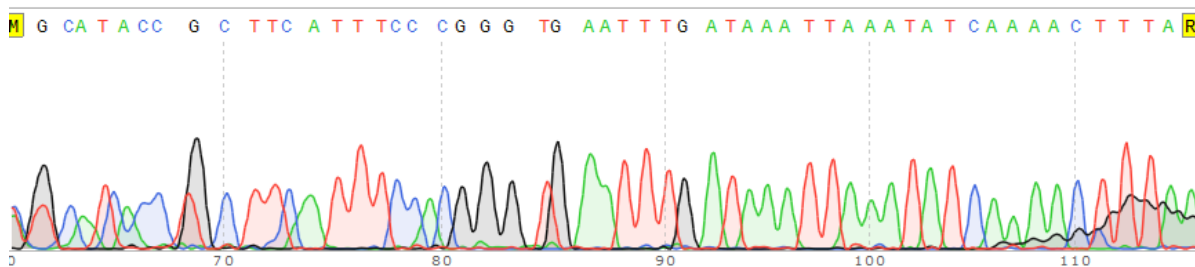


Figura 8. Sequenciamento de uma das amostras da amplificação do DNA do PYMoV.

5. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos, percebeu-se que na maioria dos protocolos testados houve surgimento de bandas amplificadas não específicas do vírus, sendo que foi utilizado o mesmo primer da bibliografia estudada. O que pode ser justificado pelo primer adquirido não ser específico do vírus PYMoV e por isso o mesmo estar amplificando outros fragmentos de DNA.

Por fim, foi possível a padronização de um protocolo para detecção de vírus nas amostras de pimenteira testadas com os primers PYORF31. A extração foi mais eficiente quando foi utilizado o kit comercial de extração com adição do nitrogênio líquido da maceração do tecido foliar.

Como a pimenta do reino é de grande importância econômica e a mesma possui propagação vegetativa, e isso contribui para disseminação do vírus por meio da comercialização de estacas e/ou mudas, o trabalho acima é de grande importância para auxiliar os produtores no controle dessa virose, evitando assim disseminação desse vírus.

REFERÊNCIAS

AHMAD, N.; FAZAL, H.; ABBASI, B.H.; FAROOQ, S.; ALI, M.; KHAN, M.A. Biological role of *Piper nigrum* L. (black pepper): a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v.1, p.1-10, 2012.

ALBERTS, B, et al. *Biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Artmed; 2004. p.470-512.

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 mosqueado da pimenteira-do-reino (Piper yellow mottle vírus - PYMoV) no Brasil*. *Summa Phytopathologica*. 1999.

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 mealbug*. *Current Science*. 2003.

BOARI, A. D. J.; OLIVEIRA, A. C. S. D. *Viroses de Pimenteira do Reino*. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/43560/1/Viroses-recomendacoes.pdf>. Acesso em: 1 de Agosto de 2014.

BOTTON, M.; FAJARDO, T. V. M.; MORANDI FILHO, W. J.; GRUTZMACHER, A. D.; PRADO, E. Vetor encoberto, cochonilhas algodonosas em uva. *Revista Cultivar Hortalíças e Frutas*, Pelotas, v. 7, p. 28-29, 2003.

BRASIL.Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA -. 37ª Reunião da Comunidade Internacional da Pimenta (CIP). Disponível Acesso em 25/07/2012.

BUSTIN, S. A, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci*. 2005;109:365-79.

CAMARGO, G. S. D. O. Ajuste das Condições de Amplificação de Marcadores Microsatélites Derivados de Sequências Gênicas e Genômicas em Feijão Comum e Análise de Segregação na População de Mapeamento BAT93 x JALO EEP558. Disponível em: file:///C:/Users/NB/Downloads/ajuste_das_condicoes_de_amplificacao.pdf. Acessado em: 10 de Agosto de 2016.

CEDAGRO, Centro de Desenvolvimento do Agronegócio. *Coeficientes técnicos e custos de produção na agricultura do estado do Espírito Santo*. Disponível em: http://www.cedagro.org.br/?page=pg_coeficientes_planilhas. Acesso em: 1 de Agosto de 2014.

COSTA, R. J. *Técnica de Biologia Molecular: PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)*. Disponível em: <http://www.portaleducacao.com.br/farmacia/artigos/8577/tecnica-de-biologia-molecularpcr-reacao-em-cadeia-da-polimerase>. Acessado em de 1 Agosto de 2016.

DIAS, A. G. *O cultivo da pimenta-do-reino: produção de especiarias de qualidade*. 1 ed. Sementes. Vitória, 2006.

DUARTE, M.L.R.; ALBUQUERQUE, F.C.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Cap. 58 Doenças da Pimenteira-do-Reino (*Piper nigrum*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, JA.M. et al. (Eds.) Manual de Fitopatologia. v. 2. 4ª Ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. p.507-516.

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, 2000. 20p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 62).

EIRAS, M.; CHAVES, A. L. R. Fundamentos em Virologia Vegetal. Apostila do IV Curso Teórico-Prático de Virologia Vegetal. Instituto Biológico. São Paulo, julho de 2011.

EMBRAPA. Manual segurança e qualidade para a cultura da pimenta-do-reino. Brasília: Embrapa, 2004.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa de Pesquisa Agropecuária. *Sistema de produção da pimenteira-do-reino*. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/index.htm>. Acesso em: 1 de Agosto de 2016.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 1995.

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

INCAPER, Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural. Disponível em: <http://www.incaper.es.gov.br/http>. Acesso em 1 de Agosto de 2016.

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

LIMA, M. F. Detecção e Controle de Viroses em Videira. *Circular Técnica*, Embrapa. Petrolina, PE, 2009.

LIMA, L. M. Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular. *Embrapa*, Centro Nacional de Pesquisa de Algodão. Campina Grande, PB. 2008

LIMA, J. S. S.; OLIVEIRA, R. B.; ROCHA, W.; OLIVEIRA, P. C.; QUARTEZANI, W. Z. Análise espacial de atributos químicos do solo e da produção da cultura pimentado-reino (*Piper nigrum*, l.). *IDESIA* (Chile), v.28, nº 2, p. 31-39, Maio - Agosto, 2010.

MAGEVSKI, G. C.; CZEPAK, M. P.; SCHMILDT, E. R.; ALEXANDER, R. S.; Fernandes, A. A. Propagação vegetativa de espécies silvestres do gênero *Piper*, com potencial para uso como porta enxertos em pimenta-do-reino (*Piper nigrum*). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2011.

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: 50º Congresso Brasileiro de Olericultura, 2010. Guarapari. Anais..., 2010.

PISSINATE, K. Atividade citotóxica de *Piper nigrum* e *Struthanthus marginatus*. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados sintéticos. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2006.

PRABHAKARAN NAIR, K.P. Agronomy and economy of black pepper and cardamom. The "King" and "Queen" of Spices. London, Elsevier Science Publishing, 2011. 366p.

REDDY, O. U. K.; Pepper, A. E.; Abdurakhmonov, I. Saha, S.; Lenkins, J. N.; Brooks, T.; Bolek, Y.; El-zik, M. New dinucleotide and Marcadores trinucleotide microsatellite marker resources for cotton genome research. *Journal of Cotton Science*. 2001.

SARMA, Y. R.; KIRANMAI, G.; SREENIVASULU, P.; ANADARAJ, M.; HEMA M.; VENKATRAMANA, M.; MURTHY, A. K.; REDDY, D. V. R. Partial characterization and identification of a virus associated with stunt disease of black pepper (*Piper nigrum*) in South India. *Current Science*. 2001.

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

SILVA, E. M. J.; MACHADO, S. R. *Revista Brasileira de Botânica*. v. 22, p. 117-24, 1999.

SILVA, D. P. P. de; JONES, P.; SHAW, M. W. Identification and transmission of *Piper yellowmottle virus* and *Cucumber mosaic virus* infecting black pepper (*Piper nigrum*) in Sri Lanka. *Plant Pathology*, v.51, n.5, 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.

SOUSA, C. M. D.; PANTOJA, K. D. F. D. C.; BOARI, A. D. J. *Detecção de Piper yellow mottle vírus em Espécimes de Cochonilhas de Pimenteira-do-Reino por Meio de PCR*. In: 15º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA. Belém, Pará. 2011.

SOUZA, V. C & LORENZI, H. 2008. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado no APGII* 2ª edição

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-

Superman, D.) Agency for Agricultural Reasearch and Development, Research Institute for Spices and Medical Crops, Bogor, Indonésia, 1992.