

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



18º Seminário de
Iniciação Científica e
2º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2014

12 a 14 de agosto

Embrapa
Belém, PA
2014



18º Seminário de Iniciação Científica e 2º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 12 a 14 de agosto de 2014, Belém-PA

DETECÇÃO DE *Cucumber mosaic virus* EM ALFACE NO ESTADO DO PARÁ

Nara Helena Tavares da Ponte¹, Alessandra de Jesus Boari², Taise Pereira Carvalho³

¹Estudante de mestrado do programa de pós-graduação em Biotecnologia aplicada à agropecuária, nara_ponte@hotmail.com.

² Pesquisador Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, ajboari@gmail.com

³ Bolsista Pibic Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, taisepcarvalho@gmail.com

Resumo: A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta anual, originária de clima temperado, pertencente à família Asteracea, e certamente uma das hortaliças mais populares e consumidas no Brasil e no mundo. Diversas viroses podem causar danos à cultura da alface. O objetivo deste trabalho foi detectar a presença do *Cucumber mosaic virus* (CMV) na cultura da alface, utilizando o teste RT-PCR. Foram coletadas 50 amostras de alface aparentemente sem sintomas característicos de viroses no município de Ananindeua-PA e na horta da UFRA campus Belém-PA. O ácido nucléico total foi extraído a partir de folhas de alface. Para a detecção do CMV por meio do RT-PCR utilizou-se um par de iniciadores denominados CMV-CPR e CMV-CPF que permitem a amplificação do fragmento de cerca de 700 pb do DNA do gene da capa proteica. O CMV foi detectado em três amostras analisadas. Este foi o primeiro relato de CMV em alface no estado do Pará.

Palavras-chave: CMV, *Lactuca sativa* L., viroses

Introdução

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta anual, originária de clima temperado, pertencente à família Asteracea, e certamente uma das hortaliças mais populares e consumidas no Brasil e no mundo (HENZ; SUINAGA, 2009). No entanto, uma das limitações para a cultura da alface é o aparecimento de doenças de origem viral. A alface pode ser infectada por diversos vírus, dentre os mais importantes destacam-se o *Lettuce mosaic virus* (LMV) causador da doença conhecida como mosaico da alface, o *Lettuce mottle virus* (LeMoV) e o complexo de vírus do gênero *Tospovirus* causando a doença conhecida como vira-cabeça da alface (BORGES, 2006).

Outros vírus relatados no Brasil são: o *Lettuce big-vein virus* (LBVV), *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MLBVV) (PAVAN et al., 2008), *Lettuce necrotic yellows virus* (LNYV) (CALLAGHAN; DIETZGEN, 2005), *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Bidens mosaic virus* (BiMV) (PAVAN et al., 2008).



18º Seminário de Iniciação Científica e 2º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 12 a 14 de agosto de 2014, Belém-PA

Nos plantios de alface na região metropolitana de Belém-PA não se observa plantas com sintomas de mosaico, que é comum nas regiões de temperaturas mais amenas. Entretanto, o CMV já foi relatado em plantios de pimenta e alfavaca nesta mesma região em altas incidências.

Assim, o objetivo deste trabalho foi detectar a presença do CMV vírus na cultura da alface cultivada na região metropolitana de Belém-PA utilizando os testes RT-PCR.

Material e Métodos

Foram coletadas 50 amostras de alface assintomáticas em plantios localizados no município de Ananindeua-PA e horta da Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA campus Belém-PA, as quais foram analisadas no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental.

O ácido nucléico total foi extraído de folhas de alface utilizando o protocolo de Gibbs e Mackenzie (1997). Os controles utilizados foram: folhas de alface sadia como controle negativo e folhas de alfavaca com CMV como controle positivo. Os ácidos nucléicos totais das amostras foram mantidos em freezer -20° C.

Para a detecção do CMV por meio do RT-PCR utilizou-se um par de oligonucleotídeos iniciadores denominados CMV-CPR (5' TCA AAC TGG GAG GAC CC 3') e CMV-CPF (5' ATGGAC AAA TCT GAA TCA AC 3') que permite amplificação de DNA da região genômica codificadora para a proteína capsial (700 pb). Foi feita a Transcrição Reversa (RT) a partir do ácido nucléico total para síntese do cDNA. Para o RT foram utilizados 0,25 µL de primer CMV-CPR, 6,75µL de água destilada, 5µL de RNA, tampão RT buffer 5µL, 0,5 µL de dNTP e 0,15 µL de transcriptase reversa AMV. A mistura foi incubada por 10 minutos à 70° C, 1 minuto no gelo, 50 minutos à 37° C e 15 minutos à 70° C.

Para o teste de PCR foram utilizados 5µl do cDNA, 5uL do tampão de reação 5X, 1,5µL de MgCl₂ (25 mM), 0,5µL de dNTP (10mM), 0,15uL da Taq DNA Polimerase, 0,25µl dos primers (CMV-CPR e CMV-CPF) e 12,35uL de água ultra-pura. A reação consistiu de 30 ciclos de 94°C, 50°C e 72°C, com duração de um minuto além de uma extensão de 72° C por 5 minutos.

Os fragmentos de DNA amplificados foram observados e fotografados sob luz UV após a corrida de eletroforese em gel de agarose (0,8%) e coloração com GelRed.



18º Seminário de Iniciação Científica e 2º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 12 a 14 de agosto de 2014, Belém-PA

Resultados e Discussão

Três amostras de plantas de alface, duas provenientes da horta da UFRA e uma do município de Ananindeua-PA foram positivas para o CMV, pois apresentaram a banda de DNA esperada de aproximadamente 700 pb.

O CMV já foi relatado nos cultivos de pimentas e alfavaca da região metropolitana de Belém-PA (CARVALHO; BOARI, 2013), e estes cultivos podem se tornar reservatórios deste vírus para outras culturas como a da alface, que também é suscetível.

As plantas amostradas aparentemente não apresentavam sintomas característicos de virose, o que representa um problema, pois estas infectadas pelo CMV podem se constituir em fonte de inóculo para outras culturas (pimenta, alfavaca, cucurbitáceas, agrião e feijão-de-metro) e dificultar o manejo através da eliminação de plantas doentes nos cultivos.

Conclusão

O *Cucumber mosaic virus* (CMV) foi detectado em plantas de alface no estado do Pará.

Agradecimentos

À FAPESPA pela bolsa de mestrado, FINEP pelo apoio ao projeto SIPI e EMATER-PA pela colaboração na coleta das amostras.

Referências Bibliográficas

- BORGES, L. M. **Controle de viroses em alface por meio de métodos integrados de manejo da cultura**. 2006. 118 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu.
- CARVALHO, T. P.; BOARI, A. J. First report of *Cucumber mosaic virus* infecting *Ocimum campechianum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 46.; REUNIÃO BRASILEIRA DE CONTROLE BIOLÓGICO, 11., 2013, Ouro Preto. **CBfito sustentável**. Ouro Preto: UFV, 2013. CALLAGHAN, B.; DIETZGEN, R. G. Nucleocapsid gene variability reveals two subgroups of *Lettuce necrotic yellows virus*. **Archives of Virology**, v. 150, p. 1661-1667, 2005.
- GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 63, p. 9-16, 1997.
- HENZ, G. P.; SUINAGA, F. **Tipos de alface cultivados no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2009. 7 p. (Embrapa Hortaliças. Comunicado técnico, 75).
- PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R.; SILVA, N.; ZERBINI, F. M.; LE GALL, O. Virus diseases of Lettuce of in Brazil. **Plant Viruses**, v. 2, p. 35-41, 2008.