



17^o Seminário de Iniciação Científica e 1^o Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 21 a 23 de agosto de 2013, Belém-PA

DETECÇÃO DE POTYVIRUS EM BUCHA (*Luffa cylindrica* (L.) Roem.) NO ESTADO DO PARÁ

Evelyn Anly Ishikawa Hayashi¹, Alessandra de Jesus Boari², Taise Pereira Carvalho³

¹Estagiária na Embrapa Amazônia Oriental I, Universidade Federal Rural da Amazônia, evelynanly@hotmail.com

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

³Bolsista Pibic da Embrapa Amazônia Oriental, Universidade Federal Rural da Amazônia, taisecarvalho_proswin@hotmail.com

Resumo: A bucha (*Luffa cylindrica* (L.) Roem.) é uma trepadeira da família das cucurbitáceas cultivada especialmente pelas fibras do fruto seco, que tem vários usos principalmente como esfregão de banho. Folhas de plantas apresentando mosaico amarelo no município de Baião foram coletadas levadas para proceder a diagnose no laboratório de fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. Para a identificação do vírus foi realizado o teste sorológico PTA-ELISA onde se testou a amostra da bucha contra os antissoros específicos para *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e *Squash mosaic virus* (SMV). Extrato da folha da bucha com mosaico reagiu positivamente com o antissoro do ZYMV indicando se tratar de potyvirus.. Assim, a comprovação de que o mosaico da bucha é causado por potyvirus foi feita via RT-PCR utilizando primers específico para o gênero. Além da sorologia foi realizada a purificação parcial do vírus, extração de RNA viral seguido do RT-PCR onde utilizou o par de primers universal (WCIEN e PV1) para espécies virais do gênero Potyvirus. Após eletroforese para análise do produto da RT-PCR observou-se a presença do fragmento de DNA do tamanho esperado de aproximadamente 800 pb confirmando a presença de potyvirus. Plantas de bucha infectadas podem servir de fonte de inóculo para outras plantas cultivadas como abóbora e pepino.

Palavras-chave: mosaico, diagnose, vírus

Introdução

O cultivo da bucha (*Luffa cylindrica* (L.) Roem.), pertencente a família *Cucurbitaceae* vem sendo cada vez mais freqüente devido as várias maneiras de utilizá-la como produto final. Atualmente a bucha vegetal é utilizada no setor cosmético, no ramo de limpeza doméstica, indústria automotiva e na construção civil.



Diversas doenças atacam espécies da família das cucurbitáceas prejudicando a produtividade e a qualidade do produto final. De acordo com Provvidenti (1996), a incidência e a severidade dessas doenças podem variar segundo a interação patógeno - hospedeiro - vetor - meio ambiente. Os vírus são um dos principais fitopatógenos causadores de doenças em espécies da família *Cucurbitaceae*. Os principais vírus que atacam cucurbitáceas são: *Cucumber mosaic virus* – CMV (Cucumovirus); os Potyvirus *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e *Papaya ringspot virus* – PRSV, e o Comovirus *Squash mosaic virus* (SqMV) (KUROSAWA et al. 2005).

Todas as espécies de vírus citadas acima são transmitidas por várias espécies de afídeos exceto o SqMV que é transmitido por coleóptero.

No município de Baião no estado do Pará, foi observada a presença de plantas de bucha com mosaico amarelo característico de infecção por vírus.

Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar o vírus causal do mosaico da bucha.

Material e Métodos

As amostras coletadas de tecido foliar com sintoma viral foram armazenadas em freezer -80°C. A partir das folhas armazenadas procedeu-se a purificação parcial do vírus seguido da extração de ácidos nucleicos e RT-PCR. Também foi realizada a inoculação em indicadoras de vírus e teste sorológico PTA-ELISA.

O teste sorológico de ELISA-PTA indireto foi realizado segundo protocolo de Mowat e Dawson (1987). Extrato de bucha com vírus foi testado contra os antissoros SqMV, CMV e ZYMV. Foram considerados resultados positivos os valores iguais ou superiores ao dobro da média das leituras de absorvância para os controles sadios (bucha sadia).

Para a purificação parcial foi utilizado o protocolo de Lane (1993). O vírus parcialmente purificado foi armazenado a 4°C.

Da preparação purificada foi realizada a extração do genoma viral (RNA). Para 100ul de vírus purificado, adicionou-se 100 ul de água, 50 ul de tampão de extração (glicina a 0,2M, NaCl a 0,2M, EDTA a 20 uM e pH 9,5), 20 ul de SDS (20%) e 2,7 ul de proteinase K. Após agitação a amostra foi incubada à 37°C por 1h. Após a incubação adicionou-se um volume de fenol-clorofórmio e agitado por 30 segundos. Em seguida, submeteu-se a amostra a centrifugação por 15 minutos à 13.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para um tubo fresco e adicionou-se 1/20 de volume de NaOAc (3M), pH 5,5 e 2,5 volume de álcool absoluto que foram misturados e incubados por 1 hora a -20°C. Após esse



período a amostra foi centrifugada por 30 minutos a 13.000 rpm. O pellet foi lavado com 1mL de álcool à 70% e centrifugado por 2 minutos. Depois de seco o pellet (RNA viral) foi ressuscitado com 20ul de água estéril e estocado a -80°C.

Para a Transcrição Reversa - Reação da Polimerase em Cadeia RT-PCR foi utilizado um par de primer universal para potyvírus, PV1 (5'GATTTAGGTGACACTATAGTTTTTTTT) e WCIEN (5'ATGGTTTGGTGVATYGARAAT 3') que permite a amplificação de um fragmento de DNA de cerca de 800 pb que abrange parte do gene que codifica a proteína da capa e região não traduzida. Inicialmente foi feita a transcrição reversa a partir do ácido nucléico total para síntese do cDNA utilizando o primer PV1. Em seguida, foi realizado o teste de PCR e para isso foram utilizados 5µl do cDNA, 6uL do tampão de reação 5X, 3µL de MgCl₂ (25 mM), 0,5µL de dNTP (10mM), 0,3 uL da Taq DNA Polimerase, 0,5µl dos primers (PV1 e WCIEN) e 34,7uL de água ultra-pura. O ciclo utilizado para o par de primer WCIEN e PV1 consistiu em 30 minutos a 42 °C, 95 °C durante 5 minutos, 94 °C/2 minutos, 94 °C/30 segundos, 60 °C/45 segundos, 72 °C/55 segundos, 94 °C/30 segundos, 57 °C/45 segundos, 72 °C/55 segundos, 94 °C/30 segundos, 54 °C/45 segundos, 72 °C/55 segundos, 35 ciclos de 94 °C/30 segundos, 54 °C/45 segundos, 72 °C/55 segundos, e polimerização final de 68 °C durante 7 minutos. Após eletroforese do produto do PCR o gel de agarose (0,8%) corado com GelRed foi fotodocumentado.

Resultados e Discussão

No teste ELISA a amostra da bucha reagiu positivamente contra o anticorpo de ZYMV e negativo para os demais anticorpos. A média das absorbâncias obtidas para as amostras sadias foi 0,294 e para as amostras de bucha infectada 0,744 mostrando a presença de vírus do gênero potyvírus. Para confirmar a espécie ZYMV que infecta a bucha será realizado o sequenciamento nucleotídico do vírus da bucha.

No teste de RT-PCR foi obtido o fragmento de DNA de 800pb, confirmando a presença de vírus do gênero *Potyvirus*. Este fragmento de DNA será sequenciado para identificação da espécie viral.

Plantas de bucha podem servir de fonte de inoculo para outras plantas cultivadas com abóbora e pepino. Os pulgões são os insetos vetores das espécies de potyvirus das cucurbitáceas.

Este foi o primeiro relato de potyvirus infectando plantas de bucha naturalmente no estado do Pará.



Conclusão

O vírus que infecta a bucha amostrada no município de Baião pertence ao gênero Potyvirus.

Agradecimentos

Ao FINEP e CNPq.

Referências Bibliográficas

- KUROSAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. **Doenças das cucurbitáceas**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas, 4. ed., São Paulo, Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 293-310.
- LANE, L. **A general method for detecting plant viruses**. In: Maramorosh, K. (Ed.) Plant diseases of viral, viroid, mycoplasma and uncertain origin. New Delhi. Oxford & IBH Publishing. 1992. Pp. 1-15.
- MOWAT, W.P.; DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. **Journal of Virology Methods**, v. 15, p. 233-247. 1987.
- PROVVIDENTI, R. Cucumber mosaic. In: ZITTER, A.; HOPKINS, D. L.; THOMAS, C.E. **Compendium of cucurbit diseases**. APS PRESS: St. Paul. 1996. p. 438-39.