



20º Seminário de
Iniciação Científica e
4º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2016

21 a 23 de setembro

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



20º Seminário de
Iniciação Científica e
4º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2016

21 a 23 de setembro

Embrapa Amazônia Oriental
Belém, PA
2016



DETECÇÃO DE *Cucumber mosaic virus* DO SUBGRUPO- IB EM FEIJÃO-DE-METRO NO ESTADO DO PARÁ

Ayane Fernanda Ferreira Quadros¹, Alessandra de Jesus Boari², Izabel Cristina Alves Batista³

¹Graduanda do curso de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia; Bolsista da Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: ayanefernanda@hotmail.com.

² Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia. E-mail: alessandra.boari@embrapa.br.

³ Graduanda do curso de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia. E-mail: izabel.alvs@hotmail.com.

Resumo: O feijão-de-metro é uma hortaliça amplamente cultivada nos municípios da região metropolitana de Belém. Diversas doenças podem comprometer a sua produtividade, dentre elas as viroses. Recentemente, foi detectado o *Cucumber mosaic virus* (CMV) em vagens de feijão-de-metro provenientes do município de Castanhal-PA. Este trabalho teve como objetivo identificar o subgrupo do CMV detectado em vagens de feijão-de-metro, por meio de RT-PCR, sequenciamento do ácido nucléico e análise utilizando o programa Blast, ClustalW e MEGA 7.0. Para isso, foi feita a extração de ácidos nucleicos total a partir de folhas de fumo inoculado com o isolado. Posteriormente, foi realizado o RT-PCR utilizando os *primers* específicos (CMV-CPR e CMV-CPF). A partir da análise da filogenia foi observado que o isolado formou um clado com os acessos do subgrupo IB de CMV.

Palavras-chave: CMV, subgrupo, *Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata* cultigrupo *sesquipedalis*.

Introdução

O feijão-de-metro (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. ssp. *unguiculata* Verdc. cultigrupo *sesquipedalis* Westphal) é uma hortaliça da família *Fabaceae*, bastante cultivada em todo o mundo. Tem como país de origem a África Central, e foi cultivado inicialmente no sudeste asiático. No Brasil foi introduzido no Nordeste pelos colonizadores europeus, posteriormente, disseminou-se para regiões Norte e Centro-oeste. Na região Norte, seu consumo é expressivo, e a demanda é atendida principalmente por pequenos produtores que têm nele uma de suas principais fontes de renda surgindo como uma opção ao cultivo de feijão vagem por ser rústico e tolerar altas temperaturas (SILVA, 2011).



Rodrigues et al. (2015) relataram em feijão-de-metro, por teste sorológico, a presença dos vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) em 32 amostras, *Cucumber mosaic virus* (CMV) em 1 amostra, e um vírus do gênero *Comovirus* em 4 amostras. Segundo os autores o CABMV é o vírus predominante no estado do Pará.

Por apresentarem uma grande variabilidade as estirpes do CMV são classificadas em dois subgrupos, CMV-I (que se subdivide em IA e IB) e CMV-II. Esta identificação do subgrupo, a que pertence um isolado, é de suma importância para a realização da escolha de medidas de controle a serem realizadas. Esta variabilidade de estirpes é um fator que interfere na eficiência da transmissão do vírus pelo afídeo e na resposta das plantas à infecção (GERA et al., 1979). Até o momento, foi detectado no Brasil apenas o subgrupo I.

Em uma horta do município de Castanhal, Estado do Pará, foi identificado o *Cucumber mosaic virus* (CMV) em vagens de feijão-de-metro. Assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar o subgrupo do CMV detectado em vagens de feijão-de-metro, por meio de RT-PCR, sequenciamento do ácido nucléico e análise utilizando o programa Blast, ClustalW e MEGA 7.0.

Material e Métodos

Amostras de plantas doentes de feijão-de-metro, com sintoma de mosaico foliar, foram levadas para análise no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental em Belém-PA. O isolado viral foi transmitido mecanicamente para plantas indicadoras de vírus, *Nicotiana tabacco* cv. TNN, que apresentaram mosaico foliar. A partir de folhas infectadas de fumo foi feita a extração do ácido nucléico total, utilizando o protocolo de Gibbs e Makenzie (1997). O ácido nucléico extraído da amostra foi mantido em freezer a -20° C.

Para a realização do RT-PCR foram utilizados *primers* específicos para a espécie *Cucumber mosaic virus*: CMV-CPR (5' TCAAAGTGGGAGGACCC 3') e CMV-CPF (5' ATGGACAAATCTGAATCAAC 3') que amplificam a região genômica codificadora para a proteína capsial.

Para a síntese do cDNA a partir do ácido nucléico total foi realizada a RT utilizando o primer CMV-CPR. Em seguida, realizou-se a técnica de PCR, e para isso, foram utilizados 2µl do cDNA, 5µL do tampão de reação 5X, 3 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,5µL de dNTP (10mM), 0,15µL da Taq DNA Polimerase, 0,25µl dos primers (CMV-CPR e CMV-CPF) e 13,85µL de água ultra-pura. O ciclo utilizado



para esse par de primers consistiu de desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 40 ciclos a 94 °C por 1 min, 53,5 °C por 1 min e 72 °C por 1 min, com uma extensão final de 10 min a 72 °C. O tamanho do fragmento de DNA foi observado e fotografado sob luz UV após a corrida eletroforética em gel de agarose (1,0%) e coloração em GelRed.

Posteriormente, foi realizada a limpeza do produto do PCR utilizando o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega), seguida da quantificação de DNA. O produto do RT-PCR foram sequenciados pela empresa MYLEUS Biotecnologia (Belo Horizonte-MG). A sequência foi avaliada utilizando os programas Blastn, ClustalW e MEGA 7.0.

Resultados e Discussão

Foi amplificado um fragmento de DNA de cerca de 700 pb a partir do par de *primers* CMV-CPR e CMV-CPF para o isolado avaliado. A sequência obtida a partir do isolado foi comparada com acessos do CMV de diferentes subgrupos, disponíveis no *GenBank* para análise de identidade para nucleotídeos. O isolado apresentou identidade nucleotídica de 98 a 99 % com acessos do subgrupo IB, de 91 a 92 % do subgrupo IA e de 72 a 73 % do subgrupo II.

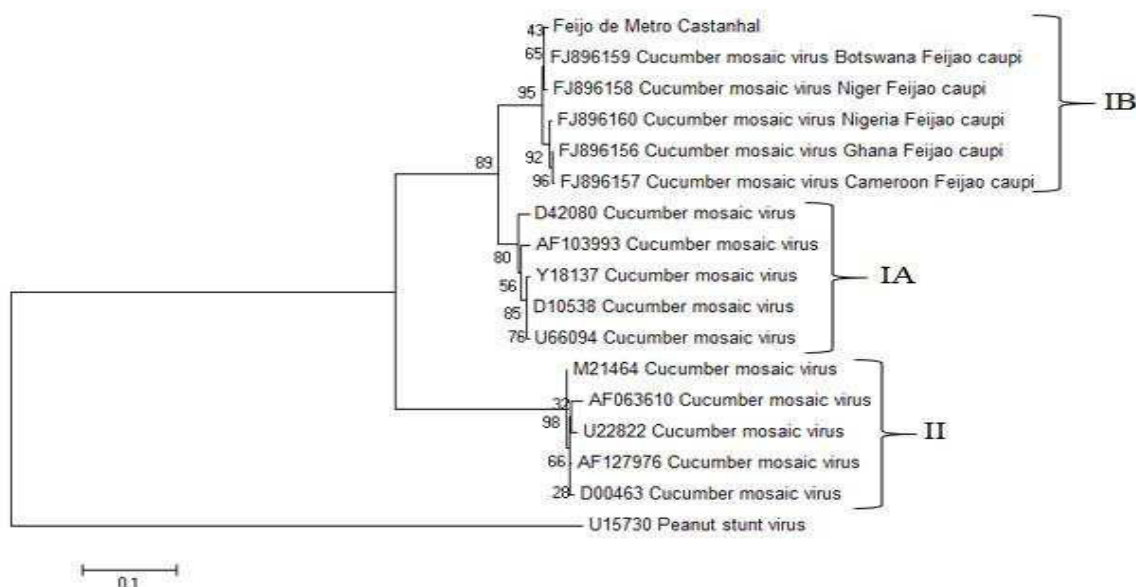


Figura 1. Árvore filogenética utilizando *neighbour-joining* construída baseada no alinhamento das sequências de nucleotídeos de parte do gene da proteína capsidial do *Cucurbitur mosaic virus* (CMV) de acessos dos subgrupos IA, IB e II. A árvore foi gerada utilizando o software MEGA 7, *bootstrap* de 2000 repetições.



Após a análise filogenética da sequência nucleotídica foi possível observar na árvore ao se utilizar o método *Neighbor-Joining*, através de uma análise de *bootstrap* feita com 2000 repetições, que o isolado formou um clado com os isolados de *Cucumber mosaic virus* – CMV do subgrupo IB (Figura 1), apresentado maior identidade com os isolados de feijão caupi provenientes de Botswana (FJ896159) e Niger (FJ896158) (SALEM et al., 2010). Indicando que o isolado brasileiro foi introduzido no Brasil via sementes provenientes da África.

Este foi o primeiro relato de *Cucumber mosaic virus* do subgrupo IB infectando feijão-de-metro no Brasil.

Conclusão

O subgrupo do isolado de CMV do feijão-de-metro proveniente de Castanhal, Estado do Pará, é IB

Referências Bibliográficas

GERA, A.; LOEBENSTEIN, G.; RACCAH, B. Protein coats of two strains of *Cucumber mosaic virus* affect transmission by *Aphis gossypii*. **Phytopathology**, v. 69, p. 396-399, 1979.

GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of virology methods**, v. 63, n. 1/2, p. 378-392, Jan. 1997.

RODRIGUES, E. C. S.; BOARI, A. J.; PONTES, N. H. T. Detecção e caracterização molecular de vírus em feijão-caupi no estado do Pará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 48.; CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA PÓS-COLHEITA, 2., 2015, São Pedro. **Fitopatologia de precisão: fronteiras da ciência: anais**. Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2015. 1 CD-ROM.

SALEM, N. M.; EHLERS, J. D.; ROBERTS, P. A.; NG, J. C. K. Biological and molecular diagnosis of seedborne viruses in cowpea germplasm of geographically diverse sub-Saharan origins. **Plant Pathology**, v. 59, n. 4, p. 773-784, 2010.

SILVA, W. G. **Manejo da irrigação para o feijão-de-metro cultivado em ambiente protegido**. 2011. 97 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.