



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



PRIMEIRO RELATO DE *Tomato chlorotic spot virus* EM ALFACE NO ESTADO DO PARÁ

Ayane Fernanda Ferreira Quadros¹, Alessandra de Jesus Boari², Leiliane Nazaré Silva do Nascimento³,
Izabel Cristina Alves Batista⁴

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

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

³Graduanda do curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal Rural da Amazônia. Email: leilianenascimento20@hotmail.com.

⁴Graduanda do curso de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia. E-mail: izabel.alvs@hotmail.com.

Resumo: A alface é uma hortaliça folhosa de grande importância econômica e social no Brasil, pois bastante cultivada por pequenos produtores e em hortas familiares. Isto ocorre principalmente pela facilidade que a cultura apresenta em se adaptar às mais diferentes condições. As doenças causadas por vírus são as principais responsáveis pelas perdas na produção na cultura, entre elas destacam-se as causadas por vírus do gênero *Tospovirus*. Durante visitas realizadas a áreas produtoras de hortaliças localizadas na região metropolitana de Belém-Pará, foi observada a alta incidência de plantas com sintomas de viroses. Assim, o trabalho teve como objetivo identificar o agente causal do vira cabeça da alface, por meio de RT-PCR e sequenciamento do ácido nucléico. Para isso, foi feita a extração de ácidos nucleicos total a partir de folhas de alface com sintoma de vira-cabeça e, posteriormente foi realizado o RT-PCR utilizando os *primers* universais para o gênero *Tospovirus*. O produto do PCR foi sequenciado e avaliado nos programas Blast, ClustalW e Mega 7.0. A partir da análise da filogenia foi observado que os isolados formaram um clado com os acessos da espécie *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV). Este foi o primeiro relato de TCSV em alface no Estado do Pará.

Palavras-chave: *Lactuca sativa* L., RT-PCR, vira cabeça.

Introdução

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das hortaliças mais plantadas por pequenos produtores e em hortas domésticas em todo o Brasil. Tem grande importância econômica e social pois a mesma é bastante cultivada e consumida no Brasil. Seu plantio ocorre em todo o Brasil, pois possui



características de fácil adaptação as diversas condições climáticas encontradas no país e por seu cultivo ser possível durante todo o ano (LUCAS, 2014).

A ocorrência de viroses nas principais regiões produtoras são apontadas como a principal responsável pelas danos na produção e aos prejuízos econômicos dos produtores. 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* que causa a doença conhecida como vira-cabeça da alface (BORGES, 2006).

No Brasil há uma grande diversidade de tospovírus, com a presença de isolados de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Chrysanthemum stem necrosis tospovirus* (CSNV), *Iris yellow spot virus* (IYSV) e *Bean necrotic mosaic virus* (BeNMV), identificados em diversas culturas em todo território nacional (LIMA, 2014).

Durante visitas a plantios de hortaliças na região metropolitana de Belém-PA foi observada alta incidência de plantas de alface com sintomas característicos do vira-cabeça da alface. Assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar o agente causal do vira cabeça da alface, por meio de RT-PCR e sequenciamento do ácido nucléico.

Material e Métodos

Três amostras de plantas doentes, com sintomas de vira-cabeça, provenientes de áreas produtoras de hortaliças localizadas nos municípios e Benevides, Santa Izabel e Marituba, Estado do Pará, foram levadas para análise no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental em Belém-PA. Em seguida, foi feita a extração de ácido nucléico total a partir de folhas novas, utilizando o protocolo de Gibbs e Makenzie (1997). O ácido nucléico extraído das amostras foi mantido em freezer a -20° C.

Para a realização do RT-PCR (Transcrição Reversa – Reação da Polimerase em Cadeia) foram utilizados *primers* universais para o gênero *Tospovirus*: BR60 (5' AGAGCAATCGTGTC 3') e BR65 (5' ATCAAGCCTTCTGAAAGTCAT 3') que permitem a amplificação de um fragmento que abrange parte do gene da proteína da capa (N) e região não-traduzida do terminal 3' do S RNA (EIRAS et al., 2002).



Para a síntese do cDNA a partir do ácido nucléico total foi realizada a RT utilizando o primer BR 60. 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 (BR60 e BR65) e 13,85µL de água ultra-pura. O ciclo utilizado para o par de primer BR 60 e BR65 consistiu de desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 48 °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 (0,8%) 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. Os produtos do RT-PCR foram sequenciados pela empresa *Helixxa base for Life*. As sequências foram avaliadas utilizando os programas Blastn, ClustalW e MEGA 7.0.

Resultados e Discussão

Foram amplificados fragmentos de DNA de cerca de 453 pb a partir do par de primers BR60 e BR65 nas três amostras. As sequências obtidas a partir dos isolados foram comparadas com acessos das espécies do gênero *Tospovirus*, disponíveis no *GenBank* para análise de identidade para nucleotídeos. Os três isolados apresentaram identidade nucleotídica de 92 a 98 % com acessos da espécie de *Tomato chlorotic spot virus* – TCSV.

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 três isolados formaram um clado com os isolados de TCSV, apresentando maior identidade com os isolados provenientes de *Bouvardia* sp. (Estado de São Paulo) e jiló (Estado de São Paulo).

Os vírus do gênero *Tospovirus* são transmitidos por insetos vetores conhecidos como tripses (Thysanoptera: Thripidae). Sua transmissão ocorre de maneira persistente e circulativa-propagativa. O tripses adquire o tospovirus apenas no estágio larval e através de sua alimentação, não ocorrendo a transmissão por insetos adultos e o mesmo não é transmitido para sua prole (LIMA, 2014).

No Estado do Pará, o TCSV já foi identificado em tomate (CARVALHO et al., 2015). Este foi o primeiro relato de *Tomato chlorotic spot virus* infectando plantas de alface no Estado do Pará.

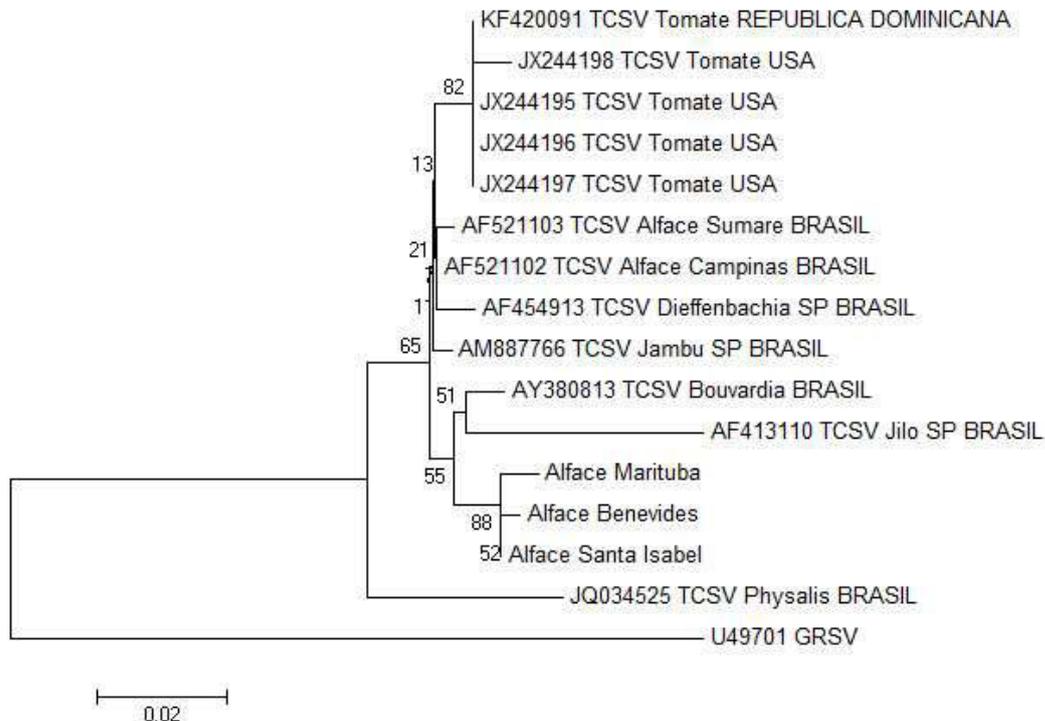


Figura 1: Árvore filogenética utilizando *neighbour-joining* construída baseada no alinhamento das sequências de nucleotídeos de parte do gene da proteína da capa (N) e região não-traduzida do terminal 3' do S RNA. A Árvore foi gerada utilizando o software MEGA 7, *bootstrap* de 2000 repetições.

Conclusão

O agente causal do vira cabeça de alfaces provenientes de Benevides, Santa Izabel e Marituba, Estado do Pará, é o *Tomato chlorotic spot virus*.

Referências Bibliográficas

BORGES, L. M. **Controle de viroses em alface por meio de métodos integrados de manejo da cultura**. 2006. Tese (Doutor em Agronomia – Horticultura). Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP - Campus de Botucatu, Botucatu.

CARVALHO, T. P.; BOARI, A. de J.; QUADROS, A. F. F. Primeiro relato de *Tomato chlorotic spot virus* em tomate 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.



20º Seminário de Iniciação Científica e 4º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental
21 a 23 de setembro de 2016, Belém, PA.

EIRAS, M.; CHAVES, A. L. R.; COLARICCIO, A.; HARAKAVA, R.; ARAUJO, J.; CHAGAS, C. M. Caracterização do *Tomato chlorotic spot virus* isolado de jiló no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 285-291, maio/jun. 2002.

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.

LIMA, R. N. **Estudo das interações entre proteínas de *Groundnut ringspot virus* (Bunyaviridae: Tospovirus)**. 2014. 47 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

LUCAS, M. A. **Seguenciamento genômico parcial de um isolado atípico do *Lettuce mosaic virus* (LMV)**. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.