



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



IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Groundnut ringspot virus* EM ALFACE NO MUNICÍPIO DE ALTAMIRA

Izabel Cristina Alves Batista¹, Alessandra de Jesus Boari², Ayane Fernanda Ferreira Quadros³

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

Resumo: A alface (*Lactuca sativa* L.), pertencente a família Asteracea, é uma das principais hortaliças folhosas cultivadas no Brasil. Em um cultivo de alface no município de Altamira, Estado do Pará, observou-se plantas apresentando manchas necróticas e bronzeamento das folhas, sintomas característicos de Tospovirus. O objetivo do trabalho foi identificar a espécie viral através dos testes de RT-PCR e sequenciamento do DNA. Para isso, amostras das plantas doentes foram levadas ao laboratório de fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental para realizar a extração do DNA e RT-PCR utilizando primers universais para o gênero *Tospovirus* (BR60/BR65). O produto do RT-PCR foi purificado e enviado para sequenciamento. As sequências foram avaliadas utilizando os programas Blastn, ClustalW e MEGA 7.0. Os isolados de alface provenientes do município de Altamira-PA foram identificados como *Groundnut ringspot virus* (GRSV).

Palavras-chave: *Lactuca sativa* L., filogenia, Tospovirus.

Introdução

A alface (*Lactuca sativa* L.) pertencente à família Asteraceae, é uma das hortaliças folhosas mais populares, sendo consumida em todo mundo (FILGUEIRA, 2003). No entanto, uma das limitações para a cultura da alface é ser susceptível ao ataque de vários patógenos, principalmente os vírus.

Entre as doenças virais mais importantes na cultura da alface, destacam-se o *Lettuce mosaic virus* (LMV) do gênero *Potyvirus*, causador da doença conhecida como mosaico da alface, o *Lettuce mottle virus* (LeMoV) e as três espécies do gênero *Tospovirus*, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), causando a doença conhecida como vira-cabeça da alface (PAVAN et al., 2005).



Em uma visita realizada a áreas de produção de hortaliças no município de Altamira no Estado do Pará, foram observadas plantas com mancha necrótica e bronzeamento das folhas, sintomas característicos de *Tospovirus*.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar a espécie viral de amostras de alface do município de Altamira, PA.

Material e Métodos

Duas amostras de plantas doentes provenientes de áreas produtoras de hortaliças no município de Altamira-PA foram levadas para o Laboratório de Fitopatologia na Embrapa Amazônia Oriental em Belém-PA. Em seguida, foi feita a extração de ácido nucleico total a partir de folhas de alface, 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 foram utilizados primers universais para o gênero *Tospovirus*: BR60 (5' AGAGCAATCGTGTCA 3') e BR65 (5' ATCAAGCCTTCTGAAAG TCAT 3') que permitem a amplificação de um fragmento e 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 BR60. Em seguida, realizou-se a técnica de PCR, e para isso, foram utilizados 2 μL do cDNA, 5 μL do tampão de reação 5X, 3 μL de MgCl_2 (25 mM), 0,5 μL de dNTP (10mM), 0,15 μL da Taq DNA Polimerase, 0,25 μL dos primers (BR60 e BR65) e 13,85 μL 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 30 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 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 452 pb para o par de primers BR60/BR65. A análise das sequências dos dois isolados de alface provenientes do município de Altamira-PA foram identificados como *Groundnut ringspot virus* (GRSV). No Estado do Pará já foi relatado a espécie GRSV em amostras de alface provenientes do município de Jacundá estado do Pará (HAYASHI et al., 2013). No Brasil, GRSV foi relatado em alface na Região Nordeste, com maior destaque para o Estado de Pernambuco e São Paulo.

Conclusão

O vírus que infecta o alface nos plantios do município de Altamira é o *Groundnut ringspot virus* (GRSV).

Referências Bibliográficas

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.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 2003. 402 p.

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.

HAYASHI, E. A. I.; BOARI, A. J.; CARVALHO, T. P. First report of Groundnut ringspot virus on hydroponic lettuce in the state of Pará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 46.; REUNIÃO BRASILEIRA DE CONTROLE BIOLÓGICO, 11., 2013, Ouro Preto. **CBfito sustentável**. Ouro Preto: UFV, 2013. 1 CD-ROM.

PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R.; KUROZAWA, C. Doenças da alface. In: KIMATI, H.; AMORIM, L. A.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Org.). **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 27-34.