



IDENTIFICAÇÃO DE *Cucumber mosaic virus* EM PIMENTA NO ESTADO DO PARÁ.

Taise Pereira Carvalho¹, Alessandra de Jesus Boari², Evelyn Anly Ishikawa Hayashi³

¹ Bolsista Pibic Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, TaiseCarvalho_proswin@hotmail.com

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

³ Estagiária supervisionada, UFRA, evelynanly@hotmail.com

Resumo: A pimenta (*Capsicum chinense* e *C. frutescens*) é bastante cultivada no estado do Pará, mas algumas doenças podem limitar sua produção. É comum observar plantas com sintomas de viroses. Assim, este trabalho tem o objetivo de identificar os vírus que ocorrem em plantios de pimenta. Foram coletadas amostras de plantios no município de Santa Izabel e em Belém. Para isso, foi realizada a inoculação em plantas indicadoras, extração de ácido nucleico, os testes de RT-PCR e sequenciamento nucleotídico. Foram analisadas quatro amostras provenientes de Santa Izabel e duas de Belém. Os isolados virais foram transmitidos mecanicamente para plantas indicadoras de vírus *Nicotiana tabacco* cv. TNN e *N. tabacum* cv. Turkish que apresentaram mosaico foliar. A partir de folhas infectadas de fumo foi feita a extração do ácido nucléico total. Posteriormente, foi feito o teste de RT-PCR, utilizando os pares de primers CMV-CPR e CMV-CPF para detecção de *Cucumber mosaic virus* – CMV e PV1 e WCIEN para espécies do gênero *Potyvirus*. As amostras foram positivas para o CMV, pois amplificaram o gene da capa proteica de aproximadamente 700pb. O produto PCR de dois isolados (Belém e Santa Izabel) foram sequenciados e analisados utilizando os programas Blast e ClustalW. Os dois isolados apresentaram identidade de aminoácido de 98% quando comparados com acessos disponíveis no *GenBank*. Este foi o primeiro relato de *Cucumber mosaic virus* no estado do Pará. Até o momento foi identificado apenas o CMV em pimentais no Pará, sendo este considerado um dos principais vírus relatados no Brasil no gênero *Capsicum* sp.

Palavras-chave: CMV, *Capsicum chinense*, vírus

Introdução

As pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* (Solanaceae) são originárias do continente americano. Dentre as 25 espécies descritas, cinco são domesticadas e amplamente utilizadas (*Capsicum annum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens*) e três são semi-domesticadas (*C. annum* var. *glabriusculum*, *C. baccatum* var. *praetermissum*, *C. baccatum* var. *baccatum*) (CARVALHO e BIANCHETTI, 2004; REIFSCHNEIDER, 2000).



Entretanto, uma das limitações para *Capsicum spp.* é o aparecimento de doenças de origem viral. Entre os principais vírus do gênero *Potyvirus* pode-se citar *Potato virus Y* (PVY), *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Tobacco etch virus* (TEV), *Pepper veinial mottle virus* (PVMV) e *Chilli veinial mottle virus* (ChiVMV) e *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (INOUE-NAGATA, 2002), sendo que até o momento seguinte o PVY e PepYMV são descritas no Brasil. O PVY no Brasil foi observado em pimentão pela primeira vez na década de 50 (COSTA e ALVES, 1950) e o PepYMV em 2002 (INOUE-NAGATA et al. 2002). Ambos os vírus são sorologicamente relacionados (CUNHA et al. 2004), e causam sintomas de mosaico indistinguíveis, tornando-os de difícil identificação visual. No Brasil, outros gêneros de vírus já foram relatados em *Capsicum spp.*, como o Cucumovirus (*Cucumber mosaic virus* – CMV), Tobamovirus (*Pepper mild mottle virus* – PMMoV, *Tomato mosaic virus* – ToMV), Begomovirus (*Tomato severe rugose virus*) e Luteovirus, Tospovirus (*Tomato spotted wilt virus* -TSWV, *Tomato chlorotic spot virus* - TCSV e *Groundnut ringspot virus* – GRSV (BRIOSO, 1996). Com exceção do gênero Begomovirus os demais vírus são constituídos de RNA.

A identificação das espécies virais em pimenta é de suma importância para a elaboração de estratégia de manejo bem como para auxiliar no programa de melhoramento da cultura visando resistência ao vírus.

Em lavouras de hortaliças no estado do Pará é comum observar plantas de pimenta apresentando sintomas de mosaico, redução de limbo e deformação foliar.

Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar os vírus causadores dessa doença realizando os testes RT-PCR, sequenciamento nucleotídico e inoculação em plantas indicadoras.

Material e Métodos

Foram coletadas amostras de pimenta *Capsicum chinense* cv. Cheiro e Biquinho Vermelho do município de Santa Isabel e da região metropolitana de Belém, que apresentavam sintomas característicos de viroses e mantidas via inoculação em plantas de pimentas e fumo cv. TNN. As mesmas foram analisadas no laboratório de fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. Todos os isolados virais foram armazenados por meio do congelamento de folhas infectadas em freezer -80°C. Também foram mantidos *in vitro* por meio do processo de dessecação em sílica gel a 4°C seguido do armazenamento a -20°C.

Os isolados obtidos foram inoculados em plantas indicadoras de vírus como: *Nicotiana clevelandii*, *N. rustica*, *N. tabacum* cv. Xanthi, *N. tabacum* cv. Turkish, *N. tabacum* cv. TNN. Sabe-se



que a detecção vírus diretamente de folhas de pimenta é dificultada por causa de inibidores. Assim, se procedeu a inoculação em plantas de *Nicotiana* sp. que geralmente são hospedeiros de vírus que infectam pimentas.

Inicialmente o ácido nucléico total (DNA e RNA) foi extraído a partir de folhas de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* cv. TNN) inoculado pelo vírus da pimenta, utilizando o protocolo de Gibbs e Mackenzie (1997). Os ácidos nucléicos totais das amostras com virose foram mantidos em freezer - 80° 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' ATG GAC AAA TCT GAA TCA AC 3') que amplifica a região genômica codificadora para a proteína capsidial (700 nts.). Para detecção de espécies do gênero *Potyvirus* foram utilizados os primers universais PV1 e WCIEN.

Foi feita a transcrição reversa a partir do ácido nucléico total para síntese do cDNA. Em seguida, foi realizado o teste de PCR e para isso foram utilizados 5µl do cDNA, 6µL 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 (CMV-CPR e CMV-CPF ; PV1 e WCIEN) e 34,7uL de água ultra-pura. A reação consistiu de 30 ciclos de 94°C, 53.4°C e 72°C, com duração de um minuto além de uma extensão de 72 °C por 5 minutos. 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 72 °C/3 minutos. Fragmentos de DNA foram observados e fotografados sob luz UV após a corrida eletroforética em gel de agarose (0,8%) e coloração com GelRed. As amostras positivas enviadas para o sequenciamento nucleotídico. As sequências nucleotídicas foram avaliadas utilizando os programas Blast e ClustalW.

Resultados e Discussão

Seis amostras de plantas de pimenta apresentando sintomas de viroses, provenientes de Belém e Santa Izabel, estado do Para, foram positivas para o CMV, pois apresentaram a banda de 700pb. A avaliação das sequências de aminoácido da capa proteica de dois isolados provenientes de Belém e Santa Izabel mostrou 98% de identidade quando comparados com acessos disponíveis no GenBank.



Não foi detectada a presença de potyvirus nas amostras avaliadas, o que evidencia a predominância do CMV.

Em lavouras de pimenta visitadas em Santa Izabel-PA foram observadas incidências de 100% de plantas com sintomas de viroses. O plantio escalonado pode estar propiciando a alta incidência de plantas com virose nas lavouras. Além disso, foram observadas bandejas com mudas de pimenta apresentando sintomas de mosaico foliar. Mudas infectadas servem de fonte de inoculo para o pulgão disseminar o vírus no campo. Quanto mais cedo uma planta é infectada maiores serão os danos na produção.

Conclusão

Foi identificado o *Cucumber mosaic virus* – CMV em seis amostras analisadas no estado do Pará. Este foi o primeiro relato de CMV no estado do Para.

Agradecimentos

Ao FINEP e CNPq.

Referências Bibliográficas

- BRIOSO, P. S. T. Doenças causadas por vírus em pimentão. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 184, p.74-80, 1996.
- CARVALHO, S.I.C; BIANCHETTI, L.B. Botânica e recursos genéticos. In: RIBEIRO,C.S.C de **Pimentas-Capsicum**. Embrapa Hortaliças, Brasília, p. 39-54,2008.
- COSTA, A.S., ALVES, S. Mosaico do pimentão. **Bragantia**, Campinas, v.10, p.95-96, Campinas, 1950.
- CUNHA, L.C.V. DA, RESENDE,R DE O., NAGATA, T., INOUE-NAGATA, A.K. Distinct features of *Pepper Yellow mosaic virus* isolates from tomato and sweetpepper. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.6, p.663-667, 2004.
- 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.
- INOUE-NAGATA, A. K., FONSECA, M.E.N., RESENDE, R.O.; BOITEUX,L.S.; MONTE, D.C.; DUSI, A.N.; ÁVILA, A.C. de; VLUGT, R.A.A. van der. *Pepper yellow mosaic virus*, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annum*. **Archives of Virology**, Vienna, v.147, p.849-855,2002.