

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



18º Seminário de  
Iniciação Científica e  
2º Seminário de Pós-graduação  
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2014

12 a 14 de agosto

**Embrapa**  
Belém, PA  
2014



## DETECÇÃO DE *Pepper yellow mosaic virus* EM *Capsicum chinense* NO ESTADO DO PARÁ

Taise Pereira Carvalho<sup>1</sup>, Alessandra de Jesus Boari<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bolsista Pibic Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, taisepcarvalho@gmail.com

<sup>2</sup> Pesquisadora Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, ajboari@cpatu.embrapa.br

**Resumo:** *Capsicum chinense* é cultivada em larga escala no estado do Pará, porém algumas doenças podem restringir a produção. Nos plantios localizados na região metropolitana de Belém é comum observar plantas com sintomas de viroses como clorose, redução do limbo foliar, nanismo e consequentemente redução da produção de frutos causados por *Cucumber mosaic virus* - CMV. Entretanto, em um plantio no município de Parauapebas, localizado na região sul do estado do Pará, foram observadas plantas de *C. chinense* com sintomas diferentes daqueles observados na região metropolitana de Belém como mosaico foliar forte e deformação foliar. Dessa forma, este trabalho teve o objetivo de identificar a espécie de vírus causador da doença que ocorre em Parauapebas. Amostras de folhas coletadas neste plantio foram preservadas por meio do congelamento à 80° C, dessecadas e armazenadas à -20° C e via enxertia em plantas de pimenta cv. Cheiro. A partir de folhas coletadas fez-se a purificação parcial de vírus, extração de ácido nucleico viral, RT-PCR utilizando primers para detecção do CMV e Potyvirus e sequenciamento de DNA. Observou-se a amplificação de fragmentos de DNA de cerca de 800pb por RT-PCR quando se utilizou os primers específicos para Potyvirus. Após a análise do DNA sequenciado por meio dos programas Blast e ClustalW verificou-se que o agente causal do mosaico da pimenta de Parauapebas é o Potyvirus *Pepper yellow mosaic virus* - PepYMV. Este é o primeiro relato do PepYMV na região Amazônica.

**Palavras-chave:** *Capsicum*, PepYMV, vírus

### Introdução

No estado do Pará a pimenta (*Capsicum* spp.) é cultivada pela agricultura familiar em larga escala por ser uma das principais hortícolas apreciadas pela população paraense.

As pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* (Solanaceae) são originários do continente americano. Dentre as 25 espécies descritas, cinco são domesticadas e amplamente utilizadas (*Capsicum annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens*) e três são semi-domesticadas (*C. annuum* var. *glabriusculum*, *C. baccatum* var. *praetermissum*, *C. baccatum* var. *baccatum*) (CARVALHO; BIANCHETTI, 2008).



Porém, uma das limitações na produção de *Capsicum* spp. é o aparecimento de doenças viróticas. Dentre as principais doenças estão as causadas pelo vírus do gênero *Potyvirus*: *Potato virus Y* (PVY), *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Tobacco etch virus* (TEV), *Pepper veinal mottle virus* (PVMV), *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV) e *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (INOUE-NAGATA; VLUGT, 2002), sendo que até o momento somente o PVY e PepYMV são descritos no Brasil. O PVY no Brasil foi observado em pimentão pela primeira vez na década de 50 (COSTA; ALVES, 1950) e o PepYMV em 2002 (INOUE-NAGATA; VLUGT, 2002). Ambos os vírus são sorologicamente relacionados (CUNHA et al., 2004) e causam sintomas de mosaico indistinguíveis, tornando-se 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 *Tospovirus* (*Tomato spotted wilt virus* - TSWV, *Tomato chlorotic spot virus* - TCSV e *Groundnut ringspot virus* – GRSV) (NOZAKI et al., 2006). A identificação dos vírus em pimenta é importante para a elaboração de estratégias de manejo, seja cultural, químico ou via uso de cultivares resistentes.

Tem sido comum a observação de plantas de pimentas com sintomas característicos de viroses no estado do Pará, sendo já relatado o CMV em cultivos na região metropolitana de Belém-PA (CARVALHO; BOARI, 2013). No município de Parauapebas, localizado no sul do Pará, foi observado um plantio de pimenta (*C. chinense*) com sintomas diferentes dos observados na região metropolitana.

O objetivo do trabalho foi identificar o vírus causador da virose que ocorre no plantio de Parauapebas, via teste de RT-PCR e sequenciamento de nucleotídeos.

### **Material e Métodos**

Foram coletadas amostras de folhas de pimenta *Capsicum chinense*, com sintomas de mosaico bem característico de virose, em uma plantação de agricultura familiar, localizada no município de Parauapebas-PA. As amostras foram levadas para o laboratório de fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental, para se proceder à identificação molecular do vírus causador da doença.

Amostras coletadas foram preservadas por meio do congelamento à 80 °C, e dessecadas e armazenadas à -20°C. Também foi mantido em casa-de-vegetação via enxertia de ramos de pimenta infectados em plantas de fumo cv. TNN e de pimenta cv. Cheiro.



Foi realizada a purificação parcial do vírus, a partir de folhas da pimenta com sintoma de virose utilizando o protocolo de Lane (19929). Após a purificação foi feita a extração do RNA viral, que foi mantido em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, procedeu-se o teste de RT-PCR para detecção de vírus do gênero *Potyvirus* utilizando o par de oligonucleotídios iniciadores denominados WCIEN (5' ATG GTT TGG TGY ATY GAR AAT 3') e PV-1 (5' GAT TTA GGT GAC ACY ATA GTT TTT TTT TTT TTT TTT 3') que amplificam parte do gene da capa proteica (CP) e região não-traduzida. Estes primers são específicos para detecção de espécies pertencentes ao gênero *Potyvirus* e permitem a amplificação de fragmentos de cerca de 800pb. Para a detecção do CMV foi utilizado par de oligonucleotídeos: 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 da capa proteica do vírus com aproximadamente 700pb.

Inicialmente, fez-se a transcrição reversa a partir do ácido nucleico viral para síntese do cDNA. Foi utilizado inicialmente  $3\mu\text{L}$  de RNA,  $0,5\mu\text{L}$  de primer reverse (PV-1 e CMV-CPR) e  $8,5\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , seguido de incubação a  $70^{\circ}\text{C}$ / 10 minutos. Após incubação no gelo por 1 minuto adicionou-se  $5\mu\text{L}$  de Tampão 5X (AMV),  $2,5\mu\text{L}$  de dNTP e  $0,25\mu\text{L}$  de RT-AMV (*Avian myeloblastosis virus*). A mistura foi incubada à  $42^{\circ}\text{C}$ / 50 minutos, para síntese de cDNA, seguido de incubação de 10 minutos por  $70^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, realizou-se o teste de PCR separadamente para detecção de cada vírus. Para isso foram utilizados  $5\mu\text{L}$  do cDNA,  $6\mu\text{L}$  do tampão de reação 5X,  $3\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25mM),  $0,5\mu\text{L}$  de DNTP (10mM),  $0,3\mu\text{L}$  da Taq DNA Polimerase,  $0,5\mu\text{L}$  dos primers (CMV-CPR e CMV-CPF; PV-1 e WCIEN) e  $34,7\mu\text{L}$  de água ultra-pura. A reação para detecção de CMV consistiu de 30 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$ ,  $53,4^{\circ}\text{C}$  e  $72^{\circ}\text{C}$ , com duração de um minuto cada etapa, além da extensão final de  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. O ciclo utilizado para o par de primer WCIEN e PV-1 consistiu em 30 min. a  $42^{\circ}\text{C}$ ,  $95^{\circ}\text{C}$  durante 5 min.,  $94^{\circ}\text{C}/2$  min.,  $94^{\circ}\text{C}/30$  seg.,  $60^{\circ}\text{C}/45$  seg.,  $54^{\circ}\text{C}/45$  seg.,  $72^{\circ}\text{C}/55$  seg., 35 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}/30$  seg.,  $54^{\circ}\text{C}/45$  seg.,  $72^{\circ}\text{C}/55$  seg., e extensão final de  $72^{\circ}\text{C}/3$  min. Os fragmentos de DNA amplificados foram observados e fotografados sob luz UV após a corrida de eletroforese em gel de agarose (0,8%) e coloração com GelRed. As amostras que foram positivas foram purificadas utilizando o Kit *Wizard SV Gel and PCR CleanUp Start-Up* (Promega) conforme fabricante, e enviadas para o sequenciamento de nucleotídeo pela empresa Helixxa Bases for life (Campinas-SP). A sequência de DNA foi analisada no programa Blastn.

## Resultados e Discussão



Por RT-PCR observou-se a amplificação de fragmentos de DNA de cerca de 800 pb quando foram utilizados os primers específicos para os Potyvirus (PV1 e WCIEN). Não foi detectada a presença de CMV por RT-PCR. Após a análise da sequência de DNA verificou-se que o agente causal do mosaico da pimenta de Parauapebas - PA é o *Pepper yellow mosaic virus* – PepYMV, pertencente ao gênero *Potyvirus*. O PepYMV foi relatado como uma nova espécie de *Potyvirus* no mundo em 2002 em cultivos localizados no estado de São Paulo e Distrito Federal (INOUE-NAGATA; VLUGT, 2002). Esta espécie vem sendo considerada uma das mais importantes das culturas de pimentão, pimenta e tomate no Brasil por causar grandes perdas aos produtores.

Este é o primeiro relato do PepYMV na região Amazônica.

### Conclusão

O agente causal do mosaico e deformação foliar em plantas de pimenta no município de Parauapebas-PA é o *Pepper yellow mosaic virus* – PepYMV.

### Agradecimentos

À FAPESPA pela bolsa de iniciação científica e à FINEP pelo recurso financeiro.

### Referências Bibliográficas

- CARVALHO, T. P.; BOARI, A. J. Identificação de *Cucumber mosaic virus* em pimenta no estado do Pará. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 17.; SEMINÁRIO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 1., 2013, Belém, PA. Anais. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2013. 1 CD-ROM. CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. de B. Botânica e recursos genéticos. In: RIBEIRO, C. S. da C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Ed.). **Pimentas Capsicum**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2008. p. 39-54.
- COSTA, A. S.; ALVES, S. Mosaico do pimentão. **Bragantina**, Campinas, v. 10, p. 95-96, 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.
- INOUE-NAGATA, 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.
- 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. p. 1-15.



18º Seminário de Iniciação Científica e 2º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 12 a 14 de agosto de 2014, Belém-PA

NOZAKI, D. N.; KRAUSE-SAKATE, R.; HASEGAWA, J. M.; CEZAR, M. A.; DZIUBA, P. H.; PAVAN, M. A. First report of *Tomato severe rugose virus* infecting pepper plants in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 321, 2006.