AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO VIRUS RESPONSÁVEL PELA DOENÇA AZUL DO ALGODOEIRO, *COTTON LEAFROLL DWARF VIRUS* (CLRDV), ENTRE ISOLADOS PROVENIENTES DE MATO GROSSO, GÓIAS E SÃO PAULO (*)

RESUMO - A doença azul do algodoeiro é uma importante patologia do algodão do cerrado brasileiro, acarretando grandes perdas econômicas. Trata-se de uma virose transmitida pelo pulgão *Aphis gossypii,* de forma persistente e circulativa. Em um trabalho recente,Corrêa *et al*. obteve parte da seqüência genômica do vírus responsável pela doença azul no estado de Mato Grosso. A análise da seqüência indicou a presença de um *Polerovirus* (família *Luteoviridae*) associado à doença, recebendo o nome de *Cotton leafrol dwarf virus* (CLRDV). Este trabalho analisou a diversidade genética de diversos isolados virais utilizando a sequência do capsídeo do CLRDV de plantas oriundas do estado do Mato Grosso, São Paulo e Goiás, e de parte da polimerase e região intergênica de plantas oriundas do estado do Mato Grosso. Uma vez amplificadas as regiões nos genomas virais foram sequenciadas e as seqüências obtidas comparadas ao isolado de Mato Grosso originalmente descrito. Os resultados obtidos até o momento revelaram uma alta taxa de conservação entre todos os isolados analisados.

Palavras-chave: doença azul do algodoeiro, CLRDV, diversidade genética, *Cotton blue disease.*

INTRODUÇÃO

O Algodão (*Gossypium* spp.) é um dos produtos agrícolas mais antigos e importantes no mundo. A Doença azul do algodoeiro (DA) foi inicialmente descrita na África em 1949 e em seguida foi encontrada também na Ásia e nas Américas (CAUQUIL, 1977). A doença é transmitida pelo pulgão *Aphis gossypii* de forma circulativa e persistente e os sintomas são caracterizados por nanismo devido ao encurtamento dos entrenós, enrolamento e escurecimento foliar e amarelecimento das nervuras (CAUQUIL e VAISSAYRE, 1971). Em um trabalho recente Corrêa *et al*. (2005) , pela primeira vez, amplificou e sequenciou parte do genoma de um vírus associado a esta doença. A seqüência obtida corresponde à parte da polimerase, toda a região intergênica e ao capsídeo viral. Análises filogenéticas das seqüências posicionaram o vírus como membro do gênero *Polerovirus* da família *Luteoviridae*. Este se mostrou putativamente como um novo vírus, denominado como *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV).

Uma vez dispondo da seqüência deste isolado do CLRDV do estado do Mato Grosso, partiu-se para uma análise do vírus nos demais estados produtores de algodão com o objetivo de caracterizar as infecções ocorrentes no Brasil. Para tanto, diferentes isolados de várias regiões produtoras foram enviados durante as safras 2004/2005 e 2005/2006. Os genomas virais foram parcialmente amplificados por RT-PCR com oligos específicos para o capsídeo e parte da polimerase e região intergênica viral, respectivamente. Em seguida, os fragmentos obtidos foram seqüenciados e analisados quanto à similaridade genética. A caracterização da seqüência do capsídeo de isolados do CLRDV dos estados de São Paulo, Goiás e Mato Grosso foi concluída. Por enquanto, a caracterização da diversidade de parte da polimerase e região intergênica ficou restrita a isolados do Mato Grosso. Porém, a extensão da análise aos isolados dos demais estados encontra-se em andamento, assim como a caracterização dos dois fragmentos em novos isolados.

METODOLOGIA

Plantas de algodão das variedades CNPA ITA 90, Delta Opal, BRS Cedro, ST474, FM966, CD406, e CD401 apresentando sintomas típicos da doença azul e, em alguns casos, apresentando também sintomas atípicos (folhas avermelhadas) foram enviadas dos estados de Mato Grosso (cidade de Primavera do Leste), Goiás (cidades de Santa Helena de Goiás, Acreuna e Ipameri) e São Paulo (cidade de Piracicaba).

OBTENÇÃO E ANÁLISE DE RNA POR RT-PCR

Extraiu-se o RNA total destas plantas utilizando a combinação do "kit" da Quiagen Rneasy (Quiagen Co.) com um tampão de extração a base de Borato (YINGRU, 2002). Cerca de 2,5 µg de RNA foram utilizados para a síntese de cDNA usando os oligonucleotídeos o oligo O5R2 (5`-GCAACCTTTTATAGTCTCTCCAAT -3`). Nas amostras de Piracicaba (SP), Primavera do Leste (MT) e Santa Helena de Goiás (GO) as seqüências inteiras dos capsídeos virais foram sintetizadas a partir de uma reação de PCR utilizando a combinação de oligonucleotídeos CPF (5`-ATGAATACGGTCGTGAGAAGA-3`) e CPR (5`-CTATTTGGATTGTGGAATTGGCAC-3`) resultando na amplificação de um fragmento de aproximadamente 650 nucleotídeos. Nas amostras de Acreuna (GO) e de Ipameri (GO), adotou-se a técnica de Nested PCR para a obtenção de ambos os fragmentos virais. Na primeira reação de polimerização foi empregada a combinação de oligonucleotídeos O5R2 e PL2F(Corrêa *et al*.,2005). A seqüência isolada do capsídeo foi amplificada na segunda reação de PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos CPR e CPF. O fragmento correspondente à parte da polimerase e região intergênica (aproximadamente 468 nucleotídeos) foi amplificado utilizando combinações de oligosnucleotídeos PLF,PLR e PL2F, PL2R (Corrêa *et al*., 2005) na primeira e segunda reação de síntese, respectivamente. O mesmo procedimento foi utilizado para a obtenção das seqüências de parte da polimerase e região intergênica dos isolados de Piracicaba (SP). Nas amostras de Primavera do Leste (MT), estas seqüências foram amplificada através da combinação dos oligonucleotídeos degenerados PLF e PLR, resultando em um fragmento de 1058 nucleotídeos, correspondente à parte da polimerase viral, toda região intergênica e parte do capsídeo.

A transcrição reversa foi realizada com a enzima *MMLV* (Gibco BRL Co.) por 2 horas a 45 °C. Reações de PCR foram realizadas com desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, seguido de quarenta ciclos a 95 °C por 1 minuto, 51,5 °C (para oligos O5R2/ PL2F), 65 °C (para oligos CPF/CPR e PLF/PLR) ou 50°C (para a combinação PL2F/PL2R) por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto com extensão final de 10 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram, em seguida, purificados com PEG e enviados para sequenciamento.

TRANSFORMAÇÃO DE *ESCHERICCHIA COLI*

Em alguns casos a quantidade de material amplificado não era suficiente para um sequenciamento direto da reação de PCR, sendo necessária a clonagem de tais fragmentos antes do sequenciamento. Foi o caso dos fragmentos amplificados nas amostras do Mato Grosso utilizando os oligonucleotídeos PLF e PLR que foram ligados, utilizando a enzima T4 ligase, ao plasmídeo pGem-T Easy (Promega). Bactérias *Eschericchia coli* eletrocompetentes foram transformadas com o vetor, ligado ao produto de PCR. Em seguida, foi realizada a extração do DNA plasmidial e a análise dos clones positivos através do padrão de digestão promovido pela enzima de restrição *EcoR*I.

SEQUENCIAMENTO

De modo a ter uma análise estatisticamente representativa do vírus presente nas plantas infectadas, foram seqüenciadas, nos dois sentidos, triplicatas das reações de PCR ou três clones de cada um dos dois fragmentos amplificados em cada planta. Para o sequenciamento dos fragmentos clonados foram utilizados os oligonucleotídeos universais T7 e M13, enquanto para os produtos de PCR foram utilizados os oligonucleotídeos específicos. As reações de sequenciamento foram feitas através do seqüenciador automático Mega Bace.

ANÁLISE COMPARATIVA DAS SEQÜÊNCIAS

As duas seqüências depositadas no GenBank, com número de acesso AY758560 e AY758561, referentes a parte do genoma do CLRDV, foram utilizadas para comparação com as seqüências obtidas. Estas foram alinhadas utilizando o programa MultAlign (CORPET, 1988) e as identidades foram calculadas através do programa GenDoc (http://www.psc.edu/biomed/genedoc).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para determinar a diversidade genética entre diversos isolados virais do vírus responsável pela DA foram utilizadas duas regiões alvo do genoma viral, o capsídeo e a polimerase. Para análise da diversidade ao nível do capsídeo foram realizadas reações de RT-PCR em seis plantas oriundas de Primavera do Leste (MT), seis de Piracicaba (SP), uma de Santa Helena de Goiás (GO), onze de Acreuna (GO) e quatro de Ipameri (GO). Eletroforese em gel de agarose revelou a amplificação do fragmento do correspondente ao capsídeo com 650 nucleotídeos (Fig. 1) em todas as amostras analisadas. Até o momento, foram seqüenciados e caracterizados somente os isolados de Primavera do Leste (MT), Santa Helena de Goiás (GO) e Piracicaba (SP). Nesta análise preliminar, a comparação entre as seqüências consenso das diferentes plantas revelou alta identidade com a seqüência do CLRDV depositada no GenBank , assim como alta identidade foi observada dentro de cada isolado (Tab. 1).

A polimerase viral foi amplificada em seis plantas de Primavera do Leste (MT), seis de Piracicaba (SP), nove de Acreuna (GO). Para plantas oriundas de Primavera do Leste foram utilizados os oligodegenerados PLF/PLR. Embora as reações de RT-PCR tenham apresentado bandas inespecíficas (Fig. 2A), a banda com o tamanho esperado de 1058 nucleotídeos, foi obtida. Os fragmentos foram clonados e pelo menos três clones de cada planta foram seqüenciados. Foram mais uma vez observadas altas taxas de identidade entre os diversos isolados mostrando que são todos muito similares (Tab. 2). Os resultados de amplificação e alta identidade confirmaram a existência de apenas um vírus associado à DA nos isolados analisados, uma vez que por ser degenerado este par de oligos poderia amplificar outros vírus do mesmo gênero. Um fragmento menor correspondente a parte da polimerase e a região intergênica foi amplificado nas amostras de Piracicaba (SP), Acreuna (GO) e Ipameri (GO) (Fig. 2). Em duas amostras de Acreuna (GO), uma da variedade BRS Cedro e a outra da variedade Delta Opal, ainda não foi possível obter a amplificação deste fragmento. A avaliação da diversidade genética utilizando a polimerase para estas amostras está em andamento.

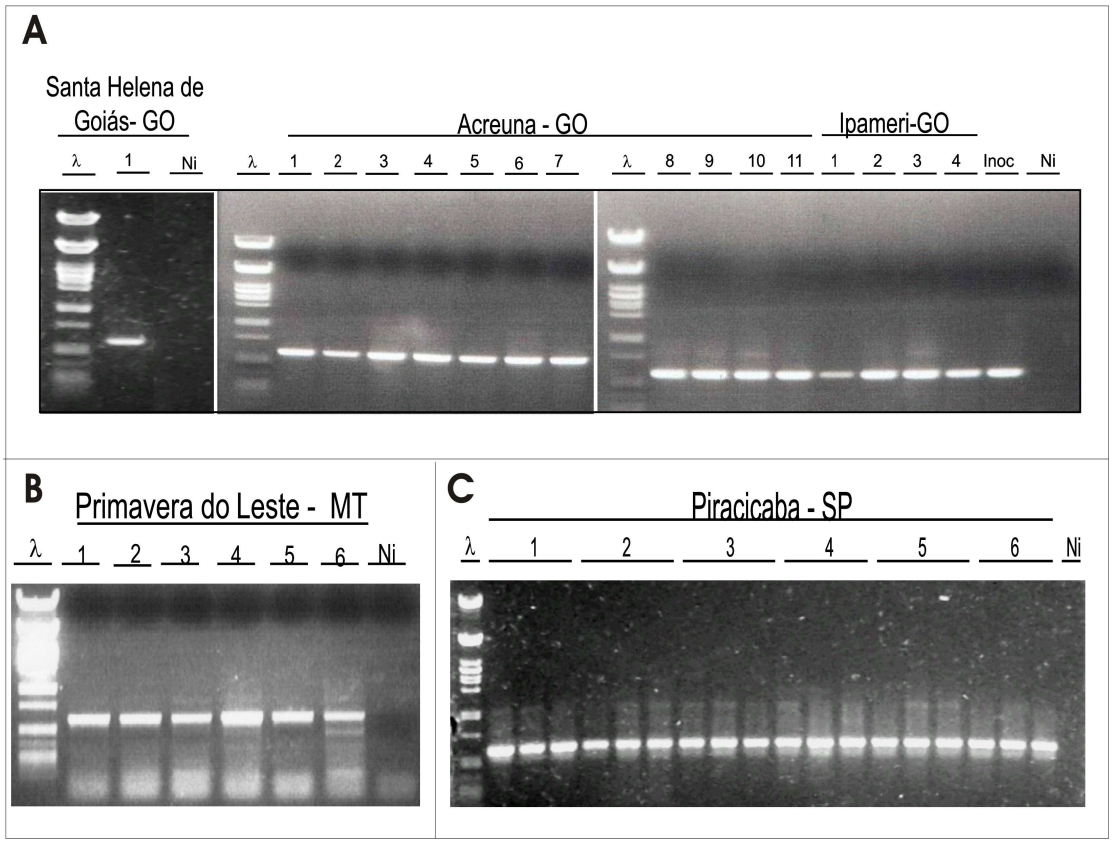

Figura 1: Amplificação da CP viral em diferentes isolados do CLRDV em gel de agarose 0,8% λ - Lambda DNA digerido com *Pst*I; Ni - Planta não infectada (C-); Inoc- Planta Inoculada (C+) **A** – amplificações em amostras de Santa Helena de Goiás (GO): 1 – planta da variedade CNPA ITA90. Acreuna:1 a 3- plantas da variedade BRS Cedro; 4, 6, 9 e 10 – plantas da variedade CD 406; 5, 7 e 8 – plantas da variedade Delta Opal; 11 - planta da variedade ST 474. **B** – amplificações em amostras de Primavera do Leste (MT).1 a 3 – plantas da variedade CD 401; 3 a 6- plantas da variedade FM 966 ; **C** – amplificações em amostras de Piracicaba (SP). 1 a 6 – plantas da variedade CNPA ITA 90. Foram realizadas três amplificações para cada planta.

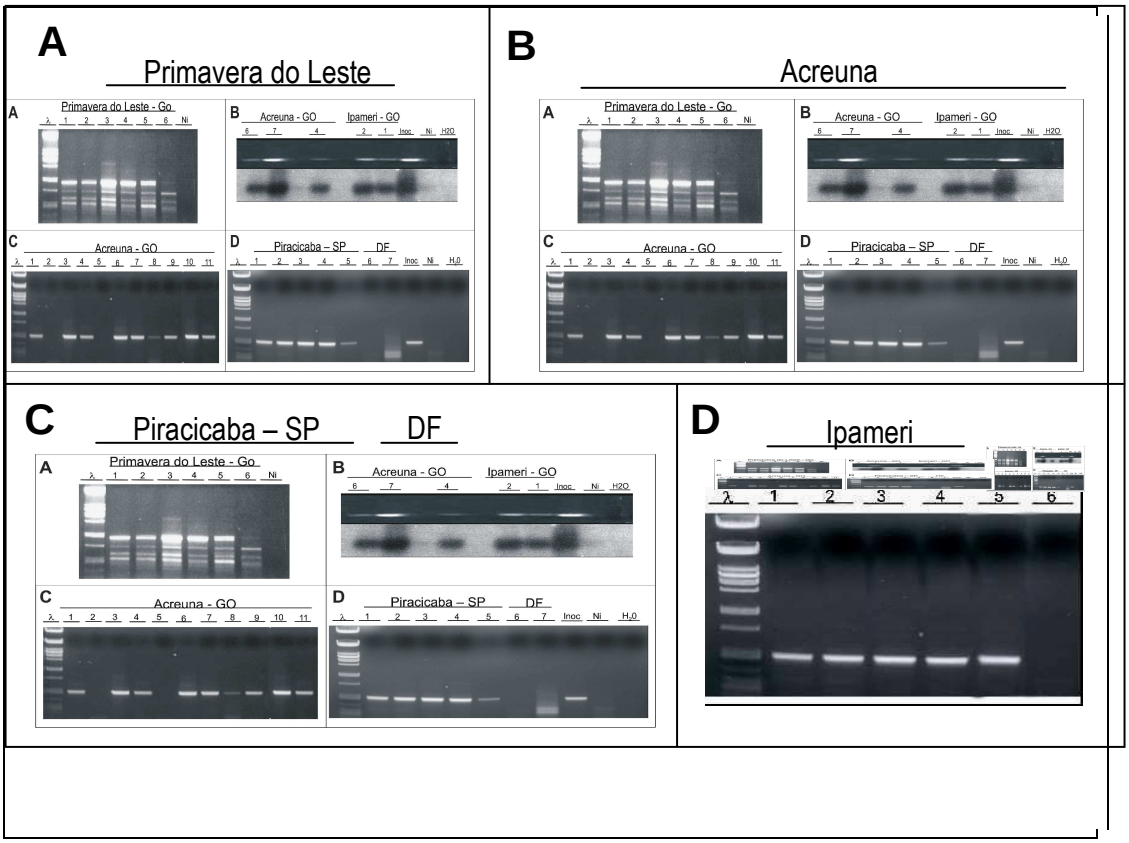

Figura 2: Amplificação do fragmento (468 nucleotídeos) em gel de agarose 0,8% correspondente à parte da polimerase e de toda a região intergênica do vírus. λ - DNA digerido com *Pst*I.; Ni - Planta não infectada; Inoc – planta não inoculada. **A** – amplificações nas amostras de Primavera do Leste (MT) usando oligonucleotídeos PLF e PLR (fragmento esperado de aproximadamente 1058 nucleotídos, incluindo parte do capsídeo). 1 a 3 – plantas da variedade CD 401; 3 a 6- plantas da variedade FM 966. **B -** amplificações em amostras de Acreuna : 1 a 3- plantas da variedade BRS Cedro; 4, 6, 9 e 10 – plantas da variedade CD 406; 5, 7 e 8 – plantas variedade Delta Opal; 11- planta da variedade ST 474. **C**– amplificações em amostras de Piracicaba (SP): 1 a 5 – plantas da variedade CNPA ITA 90. DF - Tentativa de amplificação de amostras do Distrito Federal: 6 e 7 – plantas de algodão da espécie *Gossypium Barbadense.* **D** – amplificação em amostras de Ipameri: 1 a 4 – plantas da variedade Delta Opal.

Tabela 1: Valores de identidade entre seqüências do capsídeo do CLRDV. MT2 a MT6 - amostras de Primavera do Leste (MT). MT1 a seqüência inicialmente obtida do CLRDV; SP1 a SP6 - amostras de Piracicaba (SP);GO - amostras de Santa Helena de Goiás (GO).

	MT 1	MT2	MT4	MT5	MT6	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5	SP6	GO
MT1	100%											
MT2	99%	100%										
MT4	99%	100%	100%									
MT5	99%	99%	99%	100%								
MT6	99%	100%	100%	99%	100%							
SP1	99%	99%	99%	99%	99%	100%						
SP2	99%	98%	98%	99%	98%	99%	100%					
SP3	98%	98%	98%	98%	98%	99%	98%	100%				
SP4	98%	99%	99%	98%	99%	99%	98%	99%	100%			
SP5	99%	99%	99%	99%	99%	99%	98%	99%	99%	100%		
SP6	99%	99%	99%	99%	99%	99%	98%	99%	99%	99%	100%	
GO	98%	97%	97%	98%	97%	98%	97%	97%	97%	97%	97%	100%

Tabela 2: Valores de identidade entre seqüências de parte da polimerase de isolados de Primavera do Leste (MT). MT1 – seqüência do CLRDV obtida no GeneBank.

	MT1	MT2	MT3	MT4	MT5	MT6
MT1	100%					
MT2	98%	100%				
MT3	100%	98%	100%			
MT4	99%	98%	99%	100%		
MT5	100%	98%	100%	99%	100%	
MT6	99%	98%	99%	98%	99%	100%

Tabela 3: Valores de identidade entre as seqüências de toda a região intergênica de isolados de Primavera do Leste (MT). MT1 – seqüência do CLRDV obtida no GeneBank

	MT1	MT2	MT3	MT4	MT5	MT6
MT1	100%					
MT2	97%	100%				
MT3	98%	99%	100%			
MT4	97%	99%	99%	100%		
MT5	97%	99%	99%	99%	100%	
MT6	97%	99%	99%	99%	99%	100%

CONCLUSÕES

A alta identidade entre as seqüências obtidas revela populações de vírus bastante homogêneas entre si. Todos os isolados analisados até o momento mostraram-se muito similares ao primeiro isolado analisado, oriundo do estado do Mato Grosso.

CONTRIBUIÇÃO PRÁTICA E CIÊNTÍFICA DO TRABALHO

Estes resultados, embora preliminares, iniciam o mapeamento da Doença Azul no Brasil, e começam a revelar o quão variável ou não são os isolados aqui encontrados. Até o momento tem sido observada pouquíssima variação entre os diversos isolados virais encontrados nos diferentes estados brasileiros. Estes dados são de grande importância para os programas de melhoramento do algodão visando à resistência à DA pois podem orientar suas diretrizes e planos de ação de modo a tornar a resistência mais eficiente e difícil de ser quebrada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAUQUIL, J. . Etudes sur une maladie d'origine virale du cotonnier: la maladie bleue. **Cot. Fib. Trop.,** v.32, p. 259–278, 1977.

CAUQUIL, J. ; VAISSAYRE, M. . La "Maladie Bleue" du cotonnier en Afrique : Transmission de cotonnier à cotonnier par Aphis Gossypii glover. **Coton Et Fibres Tropicales,** v.6, p.463 – 466, 1971.

CORPET, F.. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucl. Acids Res.,** v.16, p.10881-10890, 1988.

CORRÊA, R. L.; SILVA, T. F.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BARROSO, P. A.; VIDAL, M. S. E VASLIN, M. F. S. Molecular characterization of a virus from the family Luteoviridae associated with cotton blue disease. **Arch Virol. ,** v. 150, p.1357–1367, 2005.

TAKIMOTO, J. K. **Estudo da relação vetor- patógeno - hospedeiro para a doença azul do algodoeiro.** Dissertação (Mestrado) - Instituto Agronômico de Campinas, SP.

YINGRU, W.U. A Quick and Easy Method for Isolating Good-Quality RNA From Cotton (Gossypium hirsutum L.). **Plant Molecular Biology Reporter,** v. 20, p. 213–218, 2002.

*** Agências Financiadoras: FACUAL e CNPq.**
Colaboração: EMBRAPA CNPA, COODETEC