V CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO

DOENÇA AZUL DO ALGODOEIRO - DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO PARA DIAGNOSE MOLECULAR

Régis Lopes Corrêa (UFRJ / regislcorrea@yahoo.com.br), Tatiane da Silva Franca (UFRJ), Paulo Augusto Vianna Barroso (Embrapa Algodão), Ely Pires (Coodetec), Pierre Silvie (Cirad), Márcia Soares Vidal (Embrapa Algodão), Maite Vasln de Freitas Silva (UFRJ)

RESUMO - Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de ensaios diagnósticos para a identificação da Doença azul ou Azulão, ou ainda Virose do algodoeiro, baseados em técnicas de biologia molecular. A partir do sequenciamento de parte do genoma do vírus responsável pela Doença azul do algodoeiro foram desenhados oligonucleotideos capazes de amplificar regiões altamente conservadas do genoma viral. Tais pares de oligos foram testados em plantas doentes do Mato Grosso infectadas com a mesma estirpe viral primeiramente seqüenciada e também em plantas do Paraná nas quais esta mesma estirpe foi repassada por mais de dois anos. Os resultados demonstraram uma amplificação altamente específica em todas as plantas doentes analisadas. O aparecimento de bandas especificas ocorreu em 100% das plantas avaliadas mostrando ser este método muito robusto e reprodutível. As bandas amplificadas foram seqüenciadas e o resultado desta analise confirmou tal robustez. Além do diagnóstico através de RT-PCR, foi também desenvolvido com sucesso o diagnóstico via Northern blot utilizando-se a CP viral como sonda. De posse destes dois novos métodos diagnósticos para a Doença azul do algodoeiro será possível de agora em diante uma identificação precoce e segura desta enfermidade que tantos prejuízos causa à cultura do algodão.
Palavras-chave: doença azul do algodoeiro, diagnóstico, RT-PCR

DEVELOPEMENT OF A DIAGNOSTIC MOLECULAR ASSAY FOR COTTON BLUE DISEASE IDENTIFICATION

ABSTRACT - Here we describe the developing of molecular diagnose assays for Cotton blue disease. Previously we sequenced part of the genome of its casual agent. Based in alignment analysis of this sequence we designed oligonucleotids pairs that specifically will amplify this virus in infected plants. We tested these pairs of primers in two independent infected plants, a lot coming from Mato Grosso and another lot from Paraná, both of them infected with the same virus isolate. The results obtained showed that the primers were able to amplify virus specific bands in a robust and reproductively manner. Besides the development of this RT-PCR based method we also developed a northern blot assay for this disease using virus CP as probe. Using one or both methods it is now possible to identify precociously Cotton blue disease in fields conditions what may reduce importantly the lost associated with the dissemination of this important disease in Brazilian and others producer countries fields.
Key words: cotton blue disease, molecular assay, RT-PCR

INTRODUÇÃO

A Doença azul do algodoeiro foi inicialmente observada na República Central Africana em 1949 e em seguida foi relatada também em diferentes regiões da África, Ásia e Américas (CAUQUIL, 1977). No Brasil, uma doença similar denominada Mosaico das Nervuras var Ribeirão Bonito foi descrita em 1962 no estado de São Paulo e em seguida observada também nos estados de Mato Grosso e Goiás.

Baseado em estudos sobre sintomatologia e modo de transmissão a doença azul e o mosaico das nervuras foram consideradas a mesma doença. A doença é transmitida de forma circulativa e persistente pelo pulgão *Aphis gossypii* e os sintomas são caracterizados por nanismo, enrolamento foliar e amarelecimento das nervuras (CAUQUIL e VAISSAYRE, 1971) (Fig. 1). Sintomas são mais forte quando as plantas são infectadas em uma fase inicial do desenvolvimento e a transmissão mecânica não é capaz de reproduzir os sintomas (TAKIMOTO, 2003).

No Brasil, diversas variedades de algodão são cultivadas, incluindo genótipos desenvolvidos por instituições brasileiras públicas e privadas e genótipos introduzidos dos Estados Unidos e Austrália. Entretanto, essas variedades se mostraram altamente susceptíveis à doença Azul. Freire (1998) relatou perdas de até 1500 kg.ha-1 de capulhos em alguns estados do Brasil. Portanto, a doença azul é um importante problema patológico em algodão no Brasil.

Recentemente foi verificado que a doença azul está associada com um novo vírus *Cotton leafroll dwarf virus (CLRDV)* que pertence à família *Luteoviridae* (CORREA *et al*., 2005). Nesse trabalho nós mostramos o desenvolvimento de um ensaio molecular para a identificação e diagnóstico do CLRDV por RT-PCR, usando primers desenhados para amplificar toda a região do capsídeo, e por Northern blot.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de duas procedências forma utilizadas: plantas de algodão da variedade CNPA ITA 90 apresentando sintomas característicos da doença azul coletadas em uma plantação em Primavera do Leste, no estado de Mato Grosso; e plantas das variedades CD401 e Fiber Max 966 coletadas em casa de vegetação no campo experimental da Coodetec, em Cascavel, Paraná. Estas ultimas foram inoculadas com uma estirpe viral oriunda de Primavera do Leste em 2002 e que sofreu varias passagens no Paraná. Para as análises foram utilizadas 3 plantas CNPA ITA 90, 3 plantas de CD401 e 3 plantas Fiber Max 966.

RNA total de plantas infectadas e saudáveis foi obtido por extração com fenol seguido de precipitação com cloreto de lítio (RAGUEH *et al*., 1989) e através do kit RNASe da Quiagen Co.. Cerca de 2,5 µg de RNA foram utilizados para a síntese de cDNA. A transcrição reversa foi realizada com Superscript II (Gibco BRL) 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, 45 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto, com extensão final de 10 minutos a 72°C. Como sonda utilizada para a realização de northern blot fragmento da CP do CLRDV marcada radioativamente com P^{32}. Norhern blot foram realizados segundo Sambrook *et al*. (1988).)

Seqüências das espécies de *Luteoviridae* foram obtidas no Genbank para comparação. Alinhamentos foram realizados com o programa Multalin e analisados através do programa GeneDoc.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Plantas de algodão com sintomas típicos da doença azul (Fig. 1) foram transferidas para casa de vegetação. A caracterização inicial do vírus foi realizada com oligonucleotídeos degenerados desenhados para amplificar diferentes partes do genoma viral (CORREA *et al*., 2005). Inicialmente foram desenvolvidos oligos que amplificam parte do capsídeo viral (CP) e da polimerase (RdRp) e toda

a região intergênica. Após a obtenção da seqüência do fragmento amplificado, foi possível desenvolver novos pares de oligos degenerados para a amplificação e posterior sequenciamento de toda a CP.

A partir análise do alinhamento da seqüência da proteína do capsideo foi possível a elaboração de um par de oligos específico para o CLRDV nas extremidades 5` e 3` da CP (Fig. 2). Análise com o programa Blast confirmou a especificidade dos oligos desenhados, pois não foram encontradas similaridades significativas com outros membros da família *Luteoviridae* e nem com seqüências de algodão.

Figura 1. Plantas de algodão em campo mostrando sintomas típicos da doença azul. A e B – Comparação entre plantas saudáveis e infectadas apresentando sintomas severos. C – Plantas infectadas. (Fotos fornecidas pelo Dr. Nelson Suassuna - Embrapa Algodão).

Utilizando os pares de primers PLR e PLF e PL4F e o3R foi possível obter a amplificação de bandas específicas nas plantas infectadas em gel 0,8% de agarose (Fig. 3). Para uma confirmação de que tais bandas correspondiam a seqüências virais, os fragmentos amplificados foram transferidos para membrana de nylon e hibridizaram-se tais membranas com uma sonda correspondente a CP viral marcada radioativamente. Além disso, a seqüência da CP foi utilizada como sonda para a detecção viral através de Northern blot do CLRDV em plantas com a Doença azul. Cerca de 15 µg de RNA foram transferidos para membranas de nylon e a hibridação com fragmento correspondente a capa viral revelou a existência de duas bandas nas plantas que apresentavam sintomas da doença azul (Fig. 4). A banda superior corresponde ao RNA genômico e a inferior, provavelmente ao RNA subgenômico, freqüentemente observado em membros da família *Luteoviridae* (MAYO e ZIEGLER-GRAFF, 1996).

Atualmente, o diagnóstico da doença azul é realizado somente através da sintomatologia. Como os sintomas não são muito claros no início da doença, os produtores não são capazes de eliminar plantas infectadas nesse estágio, o que pode resultar em grandes perdas. Nesse trabalho nós relatamos o uso de RT-PCR e Northern blot para identificar plantas infectadas com a doença azul. O diagnóstico precoce poderá prevenir a disseminação da doença através da eliminação no campo de cultivo de plantas infectadas.

Os oligos desenvolvidos estão sendo testados em plantas infectadas de diferentes partes do Brasil para confirmar a reprodutibilidade e a especificidade do ensaio de diagnóstico desenvolvido. Até o momento pudemos comprovar sua eficácia e reprodutibilidade através do sucesso na amplificação de bandas em plantas doentes oriundas de Cascavel no Paraná infectadas com uma estirpe viral vinda de Mato Grosso (Fig. 5). As bandas amplificadas forma seqüenciadas e o sequenciamento comprovou serem bandas correspondentes ao CLRDV.

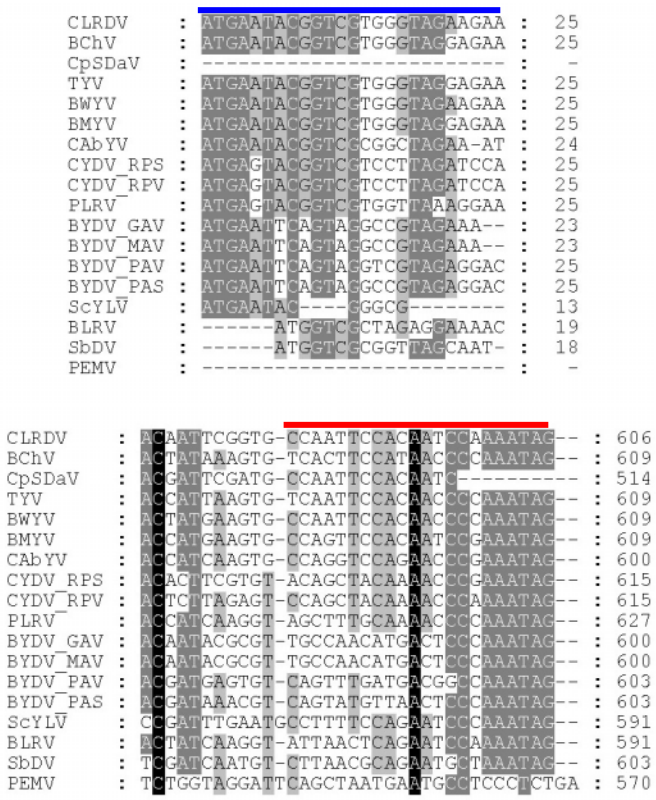

Figura 2. Alinhamento da CP do CLRDV com CPs de outros membros da família *Luteoviridae*. Regiões em preto representam resíduos presentes em todos os membros no alinhamento. Regiões em cinza representam resíduos com conservação entre 60% e 100% entre membros. Alinhamento foi realizado com o programa Multalign e analisado no GeneDoc. As regiões usadas para desenhar os oligos de ida e volta específicos para o CLRDV estão marcados em azul e vermelho, respectivamente.

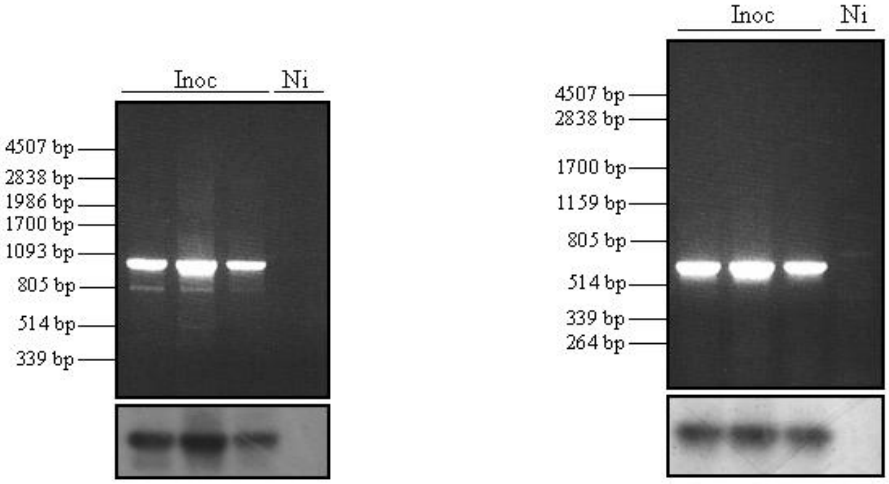

Figura 3. Amplificação por RT-PCR de partes do genoma do CLRDV usando dois diferentes pares de oligos. A - Amplificação com os oligos PLF e PLR. Os fragmentos amplificados, correspondendo à parte da polimerase e capsídeo e a região intergênica inteira foram separados em gel de agarose (painel superior), transferidos para membranas de nylon e hibridados com sondas específicas (painel inferior). B – Amplificação da CP inteira com oligos PL4F e o3R. Produtos da RT-PCR foram separados em géis de agarose (painel superior), transferidos para membranas de nylon e hibridados com sondas específicas (painel inferior). Inoc – Três plantas inoculadas apresentando sintomas típicos da doença azul do algodoeiro. Ni – plantas não inoculadas. Marcadores moleculares de λDNA digerido com *Pst*I estão mostrados na esquerda de cada gel.

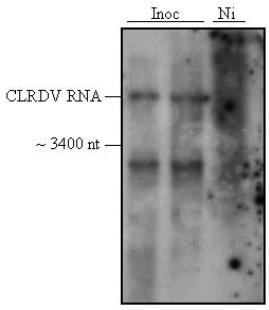

Figura 4. Detecção do CLRDV por northern blot. Inoc – Duas plantas infectadas. Ni – Planta não inoculada usada como controle negativo. 15 µg de RNA total foram hibridados com o fragmento da CP marcado radioativamente.

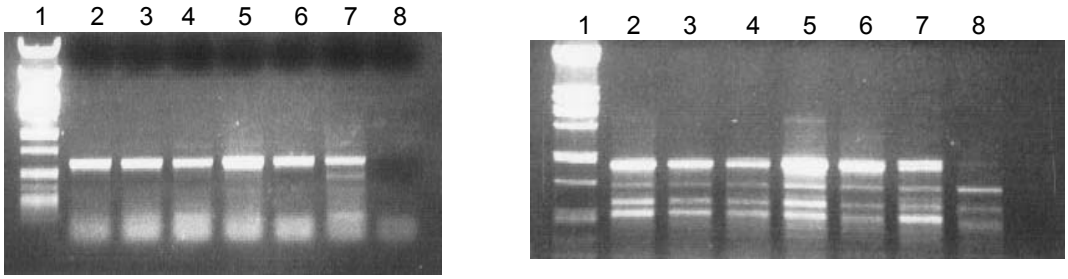

Figura 5. A - Amplificação por RT-PCR da CP viral em plantas doentes do Paraná. 1- Lambda DNA digerido com *Pst*I; 2 a 7- Plantas sintomáticas para doença azul do algodoeiro; 8- Controle negativo (planta sadia). B: Amplificação do fragmento correspondente a parte da polimerase, do capsído e de toda a região intergênica do vírus, usando primers PL e PR em plantas oriundas do Paraná. 1- λ DNA digerido com *Pst*I; 2 a 8- plantas sintomáticas. Observa-se a presença algumas bandas inespecíficas, porém a banda correspondente ao tamanho esperado apresente-se mais forte. 9-Controle negativo (planta sadia).

CONCLUSÕES

1. Os pares de oligos desenhados permitiram a amplificação específica de fragmentos do genoma do vírus responsável pela doença azul do algodoeiro. Tais oligos mostraram uma alta especificidade e o método diagnostico mostrou-se reprodutivo e confiável uma vez que foi capaz de amplificar material doente oriundo de um inoculo do Mato Grosso propagado por mais de 2 anos no Paraná;
2. Além do diagnóstico através de RT-PCR, foi desenvolvido com sucesso neste trabalho o diagnóstico via Northern blot. De posse destes dois novos métodos diagnósticos para a Doença azul do algodoeiro, será possível de agora em diante uma identificação precoce e segura desta enfermidade que tantos prejuízos causa à cultura do algodão.
3. Os resultados aqui obtidos geram a possibilidade de responder em futuras pesquisas a importantes perguntas como quem são as plantas reservatórias na entressafra do algodão, e se é possível a ocorrência de plantas infectadas de algodão sem manifestação dos sintomas da doença, entre outras..

V CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

CAUQUIL, J. Etudes sur une maladie d' origine virale du cotonnier: la maladie bleue. **Cot. Fib. Trop.**, volume ou número? 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. **Cot. Fib. Trop.**, volume ou número? 26, p. 463-466. 1971.

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

Freire, E. C. Doença azul tem solução. **Cultivar**, no. 1, p. 64-65. 1998.
MAYO, M. A.; ZIEGLER-GRAFF, V. Molecular biology of luteoviruses. **Adv. Virus Res.,** vol. 46, p. 413 – 460. 1996.

RAGUEH, F.; FESCURE, N.; ROBY, D.; MARCO, Y. Gene expression in *Nicotiana tabacum* in response to compatible and incompatible isolates of *Pseudomonas solonaciarum.* **Physiol. Mol. Plant Pathol.** no. 35, p. 23–33. 1989.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. ; MANIATS, T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

TAKIMOTO, J. K **Estudo da relação vetor-patógeno-hospedeiro para a doença azul do algodoeiro**. Dissertação de mestrado, Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo, Brazil, 97 pp