

DETECÇÃO RT-PCR DE ESTIRPES DO *Cotton leafroll dwarf virus* EM CULTIVARES DE ALGODOEIRO AGROINFILTRADAS COM CLONES INFECCIOSOS VIRAIS

Thatiane Suzana Alves Pereira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Eliezer Rodrigues de Souto (Orientador), e-mail: ersouto@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Agrárias/Maringá-PR.

Área: Ciências Agrárias, subárea Agronomia

Palavras-chave: *Gossypium hirsutum*, *Polerovirus*, RT-PCR

Resumo:

A doença azul do algodoeiro (DA) causada pelo *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV) tem provocado perdas consideráveis na cultura do algodoeiro, em todas as regiões produtoras do mundo. O CLRDV é transmitido exclusivamente através do inseto vetor *Aphis gossypii*, o que dificulta os estudos das interações planta/patógeno, e a avaliação de cultivares. Porém, a produção de clones infecciosos tem facilitado a transmissão desse patógeno. Neste trabalho foram testados primers específicos para detecção via RT-PCR do gene codificador da capa proteica (CP) do CLRDV e do CLRDV-at, este último, causador da DA atípica, em plantas agroinfiltradas a vácuo, com clones infecciosos do CLRDV e do CLRDV-at. Sintomas característicos da DA e DA atípica foram observados em 90% das plantas agroinfiltradas, e a infecção viral confirmada através da amplificação da CP via RT-PCR, em 94% das plantas selecionadas, apresentando sintomas da doença azul.

Introdução

A cultura do algodão está distribuída em todo o mundo, sendo *Gossypium hirsutum* L., a espécie mais cultivada. No Brasil o cultivo de algodão se concentra principalmente nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Bahia (CONAB, 2017). Pelo fato da grande expansão da cultura no nosso país, novas cultivares foram introduzidas nas regiões produtoras, visando melhor adaptação às áreas de cultivo e à produtividade. Porém, muitas dessas cultivares apresentaram suscetibilidade a viroses, causando a expansão da doença azul do algodoeiro (DA) nas décadas de 1980/90, acarretando perdas de produtividade de até 80% (Freire, 1999). A doença azul do algodoeiro é causada pelo *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV) pertencente à família *Solemoviridae*, gênero *Polerovirus*, apresentando genoma composto de RNA de aproximadamente 6 kb (Silva et al., 2008). O vírus é transmitido pelo pulgão *Aphis gossypii* (Cauquil, 1977, Cauquil & Follin, 1983), inseto da ordem Hemiptera, sendo a relação vírus-vetor do tipo persistente (Costa & Carvalho, 1962). Em 2006, sintomas semelhantes à DA, contudo mais severos, foram

identificados em plantas resistentes em regiões produtoras (Miranda et al., 2008). O sequenciamento parcial do genoma de um isolado desse novo patógeno, revelou tratar-se de um novo genótipo de CLRDV, denominado de CLRDV-at (Silva et al., 2015). Neste trabalho foram testados primers específicos para o gene da capa proteica do CLRDV e CLRDV-at (Corrêa et al., 2005), através da RT-PCR, visando a detecção viral em cultivares previamente agroinfiltrados com clones infecciosos do CLRDV e CLRDV-at, os quais foram anteriormente produzidos (Manenti et al., 2020, não publicado), com o objetivo de confirmar a eficiência do método de agroinfiltração a vácuo utilizado.

Materiais e métodos

Em vasos plásticos de 400 ml, foram plantadas 20 sementes de algodão, e posteriormente, sendo 10 plantas inoculadas com o clone infeccioso do CLRDV (clone 8), e outras 10, com o clone infeccioso CLRDV-at (clone 32), sendo testadas 33 linhagens de algodoeiros. Quando as plantas atingiram o estágio vegetativo (V0 para V1) foi realizada a agroinfiltração a vácuo dos clones infecciosos virais. Antes deste procedimento, as plantas foram mantidas durante cerca de 12 horas em câmara úmida, numa caixa plástica fechada, com água até 1 cm de altura (Figura1).



Fonte: arquivo pessoal.

Figura 1 – Câmara úmida onde foram mantidas as plantas antes da agroinfiltração dos clones infecciosos.

Os clones infecciosos do CLRDV foram preparados em meio de cultivo líquido, em béqueres de 500 ml, nos quais as folhas das plantas de algodão foram imersas. Antes da agroinfiltração retirou-se uma pequena quantidade dos cultivos para ser medida a densidade óptica (OD) a 600 nm. Após, as células bacterianas foram precipitadas por centrifugação a 4500 rpm por 10 min, e ressuspensas em 200 mL de meio MES contendo 1 mL de $MgCl_2$, 10 mL de MES (0,1 M, pH 5,6) e 200 μL de acetosyringone. Em seguida, foram colocadas para crescer por 2 horas, a 28 °C e rotação de 220 rpm. Após esse

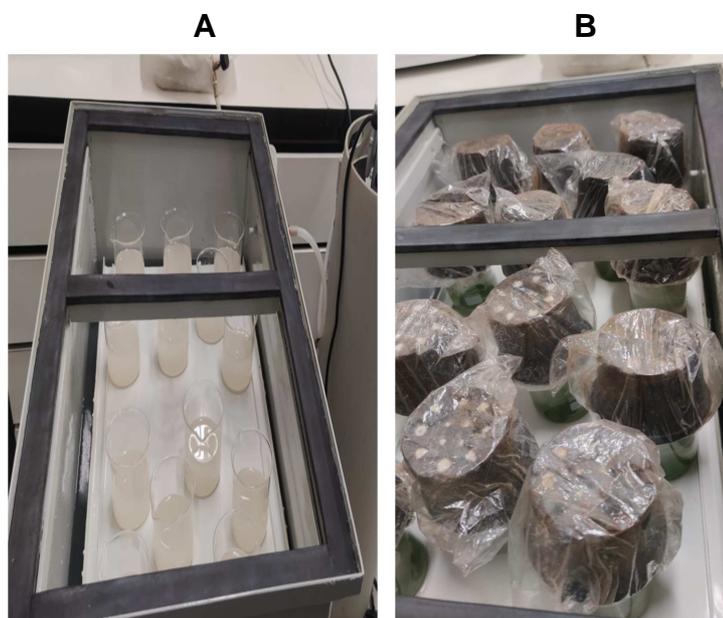
tempo, transferiu-se os inóculos para 13 béqueres de 250 mL, os quais foram colocados na câmara de vácuo de metal (Figura 2).



Fonte: arquivo pessoal.

Figura 2 – Câmara de vácuo de metal utilizado na agroinfiltração, conectada à bomba de vácuo.

Os vasos contendo as plantas de algodão foram inteiramente cobertos por sacos plásticos, e as plantas foram mergulhadas de cabeça para baixo nas suspensões de *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 3).



Fonte: arquivo pessoal.

Figura 3 – Béqueres contendo inóculo dos clones infecciosos do CLRDV e CLRDV-at (A). Distribuição das plantas para agroinfiltração, com folhas imersas no inóculo (B).

A câmara foi conectada por uma mangueira a uma bomba de vácuo. Quando esta atingiu -600 mm Hg foi cronometrado um minuto, desligando-a ao atingir o

tempo. O procedimento foi realizado a cada 10 plantas de cada linhagem de algodoeiro. Após a agroinfiltração as plantas foram mantidas em casa de vegetação até o aparecimento de sintomas e posterior confirmação da infecção viral via RT-PCR, utilizando protocolo conforme descrito por Corrêa et al., (2005).

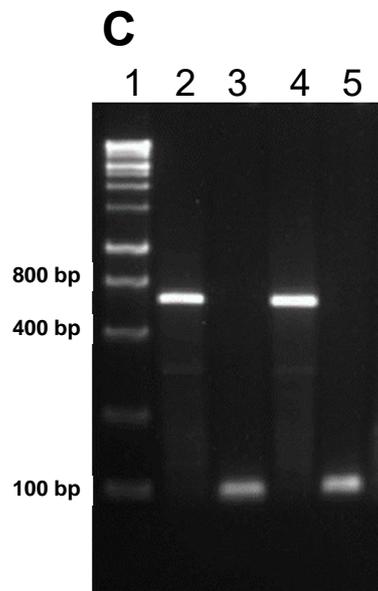


Figura 4 – Amplificação de 600 pb via RT-PCR do gene codificador da capa proteica (CP) do CLRDV e CLRDV-at em plantas agroinfiltradas a vácuo com o clone 8 do CLRDV (2) e clone 32 do CLRDV-at (4). Amplificação de 100 pb do gene codificador da enzima RuBisCo, subunidade menor, controle interno (3 e 5). Marcador molecular *low mass DNA ladder* (Invitrogen) (1).

Resultados e Discussão

Depois de 45 dias após a agroinfiltração a vácuo, amostras foliares foram submetidas a extração de RNA por adsorção em sílica (Rott e Jelkmann, 2001) para a síntese de cDNA, e confirmação da presença do vírus por RT-PCR. Plantas infectadas pelo CLRDV e CLRDV-at geralmente apresentam fenótipo caracterizado pelo encurtamento dos internódios, enrolamento foliar, amarelecimento nas nervuras e intensiva coloração verde escura nas folhas (Cauquill & Vaissayre, 1971). De um total de 33 linhagens infiltradas com o clone 8 (CLRDV), 29 manifestaram os sintomas anteriormente descritos, e 4 permaneceram assintomáticos. E das 33 linhagens infiltradas com o clone 32 (CLRDV-at), 28 manifestaram sintomas, e 5 permaneceram assintomáticas. A presença do vírus em amostras de plantas sintomáticas, foi detectada devido à amplificação de fragmentos de 600 pb da capa proteica correspondente, pertencente à CP do CLRDV ou ao CLRDV-at (Figura 4).

Conclusões

O método de agroinfiltração a vácuo utilizado foi eficiente para a transmissão dos clones infecciosos do CLRDV e CLRDV-at.

A infecção viral foi confirmada pela amplificação da capa proteica do CLRDV e CLRDV-at (600 pb) via RT-PCR, em plantas com sintomas.

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica, à UEM pelo programa PIBIC, ao meu orientador, e àqueles que contribuíram com a realização desse trabalho.

Referências

CAUQUIL, J.; VAISSAYRE, M. La maladie bleue du cotonnier en Afrique: transmission de cotonnier _a cotonnier par Aphis gossypii Glover. **Coton et Fibres Tropicales**, 1971.

CAUQUIL, J. Etudes sur une maladie d'origine virale du cotonnier: la maladie bleue. **Cotton et Fibres Tropicales**, 1977.

CAUQUIL, J.; FOLLIN, J.C. Presumed virus and mycoplasma-like organism diseases in subsaharan Africa and the rest of the world. **Coton et Fibres Tropicales**, 1983.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira - grãos. **Monitoramento agrícola – safra 2016/17**.

CORRÊA, R.L.; SILVA, T.F.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; BARROSO, P.V.; VIDAL, M.S.; VASLIN, M.F.S. Molecular characterization of a virus from the family Luteoviridae associated with cotton blue disease. **Archives of Virology**, 2005.

COSTA, A.S.; CARVALHO, A.M.B. Moléstia e vírus do algodoeiro. **Bragantia**, 1962.

FREIRE, E.C.; FARIAS, F.J.C.; ARAÚJO, A.E.; AGUIAR, P.H. Efeitos da virose – Mosaico das Nervuras f. Ribeirão Bonito sobre plantas da cultivar CNPA ITA 90. **Congresso Brasileiro do Algodão**. Ribeirão Preto SP. Campina Grande PB. Embrapa Algodão, 1999.

MIRANDA, J.E.; SUASSUNA, N.D.; SILVA, M.V.F. **Doença Azul do Algodoeiro: Novos aspectos a serem considerados no manejo**. Embrapa, Circular Técnica 121. 12 p, 2008.

ROTT, M. E.; JELKMANN, W. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. **European Journal of Plant Pathology**, 2001.

SILVA, T. F, CORRÊA, R. L.; CASTILHO, Y.; SILVIE, P.; BÉLOT, J; VASLIN,

M. F. S. Widespread distribution and a new recombinant species of Brazilian virus associated with cotton blue disease. **Virology Journal**, 2008.

SILVA, A.K.; ROMANEL, E.; SILVA, T. da F.; CASTILHOS, Y.; SCHRAGO, C.G.; GALBIERI, R.; BÉLOT, J.L.; VASLIN, M.F. Complete genome sequences of two new virus isolates associated with cotton blue disease resistance breaking in Brazil. **Archives of Virology**, 2015.