

DETECÇÃO, CLONAGEM PARCIAL E SEQÜENCIAMENTO DE UM BEGOMOVIRUS DE SOJA PERENE SEMELHANTE AO *BEAN GOLDEN MOSAIC VIRUS*

JOSIAS CORRÊA DE FARIA ¹, ROBERTA MARTINS VILARINHO²

INTRODUÇÃO: Geminivírus, especialmente *Begomovirus*, constitui um dos gêneros de vírus de plantas (família *Geminiviridae*) considerados emergentes devido a sua crescente incidência. A severidade das geminiviroses nas lavouras de diversas culturas de valor econômico, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, vem causando grandes perdas de produção nas últimas três décadas (Faria *et al.*, 2000). No Brasil as principais culturas de valor econômico afetadas são o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), o feijão de vagem (*P. lunatus* L.) e o tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill). Há, ainda, citações de ocorrências de geminivírus em caupi (*Vigna unguiculata* Walp), pimentão (*Capsicum annum*) e soja (*Glycine max* Merrill) além de inúmeras plantas daninhas, as quais podem estar infectadas por geminivírus diferentes dos encontrados nas espécies cultivadas, ou funcionarem como hospedeiras de geminivírus das plantas cultivadas (Faria & Zerbini, 2000). O objetivo deste trabalho foi caracterizar molecularmente um isolado de geminivírus encontrado naturalmente infectando soja perene (*Neonotonia wightii* L), e analisar a sua posição filogenética em relação a outros geminivírus do Novo e Velho mundo, utilizando as seqüências de DNA disponíveis em bases de dados públicos.

MATERIAL E MÉTODOS: Foram coletadas amostras de folha de soja perene, apresentando sintomas de possível infecção por geminivírus, na área experimental da Embrapa Arroz e Feijão, localizada no município de Santo Antônio de Goiás. O DNA de origem geminiviral, de ambos os componentes genômicos, foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se oligonucleotídeos degenerados universais para geminivírus transmitidos por mosca branca (Faria & Maxwell, 1999). Os fragmentos de DNA obtidos foram clonados em pGEM-T easy (Promega, Inc, Madison, WI, EUA) ou em pCR2.1 (T.A Cloning Kit versão T) seguindo instruções do fabricante. Os clones foram parcialmente seqüenciados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: As reações de PCR resultaram na amplificação dos fragmentos esperados (Figura 1). Não foram observadas amplificações não específicas. Estas amplificações, usando primers degenerados específicos para geminivirus e obtendo os produtos esperados, em comparação com o BGMV-BR

¹Engenheiro Agrônomo, Pesquisador, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO (0xx62) 533-2130, josias@cnpaf.embrapa.br

²Bióloga, Estagiária, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO (0xx62) 533-2130, robertavilarinho@hotmail.com

leva a crer que a soja perene encontra-se infectada por um geminivirus. Em uma busca feita na internet e na revisão de literatura não se encontrou relato de geminivirus, ou de BGMV-BR infectando soja perene (Chagas, 1981). Os sintomas encontrados podem ser descritos como manchas cloróticas localizadas, presença de rugosidade e amarelecimento do limbo foliar formando um mosaico ligeiramente semelhante aos sintomas induzidos por geminivirose. No caso de ser hospedeira de um vírus de uma cultura economicamente importante, e por se tratar de espécie perene, contribuirá anualmente para o início de epidemias daquela virose a cada safra. A reação da polimerase em cadeia (PCR) é uma técnica específica e extremamente sensível e vem sendo utilizada para detecção e estudo da variabilidade genética de geminivirus (Faria & Maxwell, 1999). Foram obtidos nove clones cobrindo todo o componente A e de três cobrindo o componente B em cerca de 2450 pb de um total aproximado de 2600 pb. Foram obtidas sete seqüências de DNA com número de nucleotídeos variável. Os resultados das comparações usando a base de dados do NCBI, indicaram homologies significativas apenas com o *Bean golden mosaic virus* - BGMV. Estas homologies estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Identidades (%) entre seqüências obtidas de clones de geminivirus de soja perene e vírus do mosaico dourado do feijoeiro – BGMV.

Clone/primer	Nº nt ¹	Ident (%) ²	Posição em BGMV-A	Clone/primer	Nº nt	Ident (%)	Posição em BGMV-B
Bs20/T7	523	96	1417-1940	Tbs1/T7	480	80	2105-2575
Ts5-2/M13-F	580	98	1946-2524	Tbs1/SP6	480	80	2105-2575
				Tbs2/M13-R	363	85	2112-2472
				Tbs2/M13R F	372	98	
				tbs1/SP6			
				Tbs16/M13-R	488	93	868-1355

1- Número de nucleotídeos sequenciados; 2- ident= identidade expressa em percentagem em relação ao clone de BGMV componente A

As homologies das seqüências obtidas em relação ao BGMV, para o componente A indicam que pode se tratar do mesmo vírus, tendo em vista que este nível de divergência não qualifica para uma nova estirpe ou isolado do vírus. Os critérios estabelecidos para diferenciação entre espécies foram revisados por Fauquet (2002) que indica que a percentagem de identidade menor que 90% no componente A qualifica uma nova espécie. Do componente B uma seqüência de 480 nucleotídeos apresentou 80% de homologia com parte da *mp* e a região intergênica entre *mp* e RC de BGMV-BR. Outra seqüência de 361 nucleotídeos, correspondente ao clone de aproximadamente 700pb, também apresentou elevada homologia (85%) com parte da região amino terminal do gene *mp* e parte da região intergênica. As duas últimas seqüências (tbs2/M13R e tbs1/SP6) foram comparadas apresentando 98% de homologia entre si, indicando que correspondem ao componente B de um mesmo vírus. Este fato leva a crer que havia apenas um componente B dentro da planta, tendo em vista as seqüências homólogas e que os clones foram gerados em

reações de PCR independentes. As análises levaram à conclusão de que os fragmentos clonados do componente B possuem aproximadamente 1950 pb e que, baseado nos primers utilizados corresponde á parte da região intergênica, toda a região *mp* e parte da região carboxi terminal do gene *ns*. As homologias apresentadas no componente B – 80 a 93 % - são menores que as encontradas para o componente A. Observando-se as seqüências obtidas, nota-se que regiões codificantes têm homologia maior ao BGMV do que as regiões não codantes, como poderia ser esperado e anteriormente relatado por Rojas et al (1993).

CONCLUSÕES: Baseando-se nas seqüências analisadas, acredita-se que o geminivirus encontrado em soja perene é o vírus do mosaico dourado do feijoeiro do Brasil, previamente seqüenciado. Este fato reveste-se de especial importância para a epidemiologia do mosaico dourado, porque estas plantas infectadas, sendo de natureza perene, funcionam como reservatórios naturais de reposição do vírus a cada início de safra do feijoeiro, além de servirem também como potenciais de recombinações entre geminivirus no caso de infecções múltiplas, ainda não detectadas. Este trabalho representa o primeiro relato de ocorrência de um geminivirus infectando soja perene.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAGAS, C.M. Espécies hospedeiras do vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF). **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo** v.48, p.123-127, 1981.
- FARIA, J. C.; BEZERRA, I. C.; ZERBINI, F. M.; RIBEIRO, S. G.; LIMA, M. F. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 125-137, 2000
- FARIA, J. C.; MAXWELL, D. P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. In Brazil. **Phytopathology**, v.89, p.262-268, 1999.
- FARIA, J. C.; ZERBINI, F. M. Família Geminiviridae - Taxonomia, replicação e movimento. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, RS, v.8, p.27-57, 2000.
- FAUQUET, C.M.; MAXWELL, D.P.; GRONENBORN, B. STANLEY, J. Revised proposal for naming geminiviruses. **Arch Virol** 145/8 1743-1761. 2000.
- ROJAS, M. R.; GILBERTSON, R. L.; RUSSELL, D. R.; MAXWELL, D. P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**. 77:340-347. 1993.

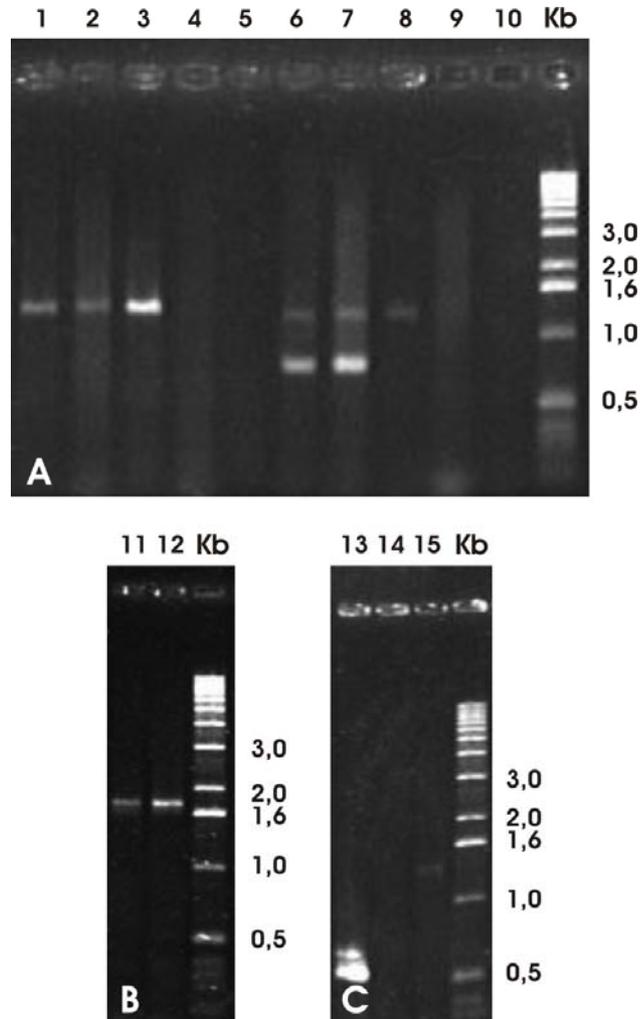


Figura 1. Produtos da amplificação por PCR, dos componentes A e B de geminivirus de soja perene. Parte A: Poços 1, 2 e 3- fragmento correspondente a parte 5' do gene *rep*, região comum até parte 5' do gene *cp*; 4- não houve amplificação; 5- controle usando água; 6-7- controle positivo: fragmento correspondente a parte 3' do gene *rep*, até parte 3' do gene *cp* de planta de feijoeiro; 8- fragmento correspondente a parte 3' do gene *rep*, até parte 3' do gene *cp*; 9- não houve amplificação; 10- controle usando água; Parte B: Poços 11-12- fragmento correspondente à parte de região intergênica, todo o gene *mp* e à parte 3' do gene *ns.*; Parte C: Poços 13- fragmento correspondente à parte da região intergênica e 5' do gene *mp*; 14- não houve amplificação.