



## V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

### Identificação de Hospedeiros Alternativos da Família Fabaceae ao Mosaico Dourado do Feijoeiro.

**Daniel Mazziari Walz<sup>1</sup>, Aline Taiane de Freitas<sup>2</sup>, Tanara Garcia de Novaes<sup>2</sup>, Rubia de Oliveira Molina<sup>2</sup>, Anésio Bianchini<sup>2</sup> e Jurandir Bussulo<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>Instituto Agronômico do Paraná - Área de Proteção de Plantas: Laboratório de Virologia.  
Caixa Postal 481 – CEP 86001-970, Londrina, PR - E-mail: daniel\_walz@hotmail.com

<sup>2</sup>Instituto Agronômico do Paraná - Área de Proteção de Plantas: Laboratório de Virologia.  
Caixa Postal 481 – CEP 86001-970, Londrina, PR

#### RESUMO

*O feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) representa uma espécie vegetal de suma importância na agricultura brasileira. Essa cultura é afetada por inúmeras doenças, entre as quais destaca-se a virose conhecida como mosaico dourado, causada pelo Bean golden mosaic virus (BGMV), pertencente ao gênero Begomovirus, que representa uma das principais fitoviroses na cultura do feijão. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a reação de diversas espécies da família Fabaceae ao BGMV. Os testes de reação de espécies de fabáceas foram realizados em casa de vegetação, por meio da transmissão via mosca branca (Bemisia tabaci), seguida de avaliação visual dos sintomas e posteriormente a confirmação através da análise de PCR. Entre as quinze espécies testadas, seis delas foram suscetíveis ao BGMV. Os dados obtidos neste trabalho auxiliam no desenvolvimento de técnicas de tratamentos culturais mais eficientes para o controle da virose, identificando plantas que atuam como fonte de inóculo da doença.*

**Palavras-chave:** *Bean golden mosaic virus*, Mosaico dourado, Feijão, Hospedeiros Alternativos.

#### INTRODUÇÃO

O cultivo do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é comprometido por inúmeras doenças, sendo que as principais são causadas por vírus. A enfermidade causada pelo *Bean golden mosaic virus* (BGMV), conhecida como mosaico dourado do feijoeiro, é considerada a mais importante e danosa para esta cultura nas regiões tropicais e subtropicais das Américas (COSTA, 1987), ocasionando diminuição na produção e na qualidade dos grãos; aumento no custo de produção e danos ambientais.

O BGMV pertence ao gênero *Begomovirus* e a família *Geminiviridae*. Caracterizam-se por apresentar “partículas geminadas” com morfologia icosaédrica e genoma composto, na maioria das vezes, por duas moléculas de DNA circular de fita simples (LAZAROWITS, 1992).

A transmissão na natureza ocorre através da mosca-branca [*Bemisia tabaci* (Genn.) biótipos A e B] de maneira persistente-circulativa. Os sintomas expressados pela planta quando infectada com BGMV são agrupados em dois tipos: encarquilhamento (deformações severas) e mosaico.

Além das plantas de interesse agrônomo, uma diversidade de espécies de plantas invasoras foi relatada como hospedeiras de *Begomovirus* em vários países. As espécies relatadas geralmente pertencem a Malvaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae (Morales & Anderson, 2001).



## V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

Dentre as medidas de controle para esta virose, cita-se o uso de variedades com resistência ao BGMV; escolha de períodos e regiões com menor probabilidade de ocorrência da mosca-branca; eliminação de plantas daninhas em áreas próximas à lavoura e o controle químico via tratamento de sementes e/ou pulverizações com inseticidas sistêmicos (YOKOYAMA, 1995; BIANCHINI et al., 2005).

O presente trabalho teve como objetivo identificar diferentes hospedeiros alternativos do *Bean golden mosaic virus*, utilizando-se espécies da Família Fabaceae, a fim de se obter resultados para um manejo mais eficiente da doença.

### MATERIAL E MÉTODOS

Um isolado de *Begomovirus*, oriundo da cidade de Londrina-PR, foi mantido em plantas hospedeiras sob condições protegidas de casa de vegetação na Estação Experimental do IAPAR em Londrina, PR.

Quinze espécies de plantas da família Fabaceae (*Phaseolus vulgaris*, *Vigna mungo*, *Glycine max*, *Canavalia eschiformis*, *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Crotalaria spectabilis*, *Lathyrus sativus*, *Crotalaria ochroleuca*, *Crotalaria incana*, *Macroptilium* sp., *Crotalaria juncea*, *Macroptilium atropurpureum*, *Vicia sativa* e *Mucuna atterina*) foram avaliadas quanto à reação ao isolado de BGMV. Estas plantas foram inoculadas com o isolado de BGMV por meio da transmissão por mosca branca.

A transmissão do *Begomovirus* foi feita via mosca branca (*Bemisia tabaci*), onde plantas recém-emergidas com sete dias de semeadura foram expostas a colônias de insetos virulíferos por 48 horas. As moscas foram previamente infectadas com um isolado do vírus proveniente do feijoeiro (cultivar Carioca) coletado a campo e sintomático para BGMV. Após este período as plantas foram pulverizadas com inseticida e avaliadas.

A avaliação foi feita de forma visual, com base nos sintomas característicos da virose (mosaico e encarquilhamento) (BIANCHINI, 1998).

Para a detecção do vírus na planta foram realizadas técnicas moleculares, tais como a técnica de extração de DNA total e a técnica de PCR ('Polymerase Chain Reaction').

Para a extração do DNA viral foi realizada a extração do DNA total das plantas pelo método do CTAB (MURRAY e THOMPSON, 1980), com algumas alterações.

O DNA extraído foi amplificado através da técnica de PCR, utilizando o par de oligonucleotídeos PAL1v1978/PAR1c496 para o DNA-A (ROJAS et al., 1993; WYATT e BROWN, 1996). A reação foi preparada em um volume final de 25µL, contendo 1µL da amostra de DNA extraído, 0,25µL de oligonucleotídeos (20pmoles/µL), 1µL de dNTP (5mM), 1µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,5µL de Taq DNA Polymerase (5U/µL) e 2,5µL de 10X Taq Buffer with KCl. A reação ocorreu em aparelho termociclador passando por um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos, finalizando com uma extensão a 72°C por 5 minutos.

Para a amplificação das bandas o produto da PCR foi aplicado em gel de agarose 1% em tampão TBE [Tris base 10,8g, ácido bórico 5,5g e 4mL de EDTA 0,5mol.L<sup>-1</sup>(pH 8,0)], sendo que para a coloração do gel, se adicionou 3 µL de tampão contendo azul de bromofenol e SYBR® Gold DNA Gel Stain em cada amostra; o marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder Plus foi empregado como padrão. O tempo de corrida do gel foi de 1 hora, a 90 de voltagem e 150

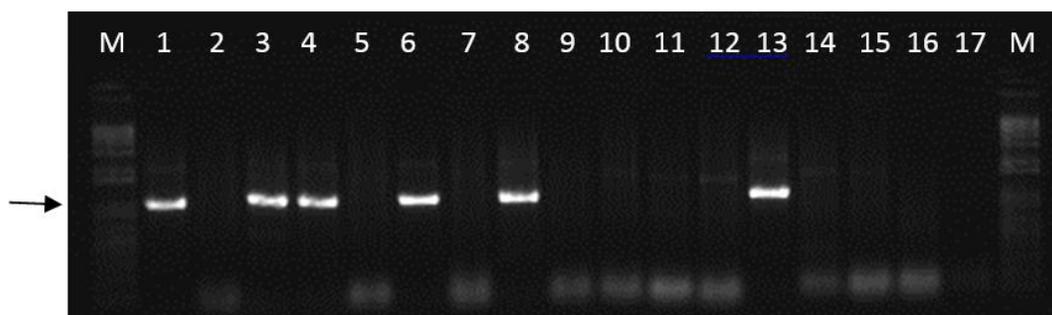
miliampères. A eletroforese foi visualizada através do fotodocumentador L-PIX Molecular Imaging (Loccus).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados da reação de espécies da família Fabaceae ao isolado de BGMV, oriundo da cidade de Londrina-PR foram detectados a partir de técnicas moleculares (PCR) para o *Begomovirus*. Como esses oligonucleotídeos degenerados reconhecem regiões altamente conservadas do DNA do vírus, essa técnica é utilizada apenas para detecção e confirmação do gênero desses vírus.

As reações foram positivas para Feijão Carioca (*Phaseolus vulgaris*), Soja (*Glycine max*), Feijão de porco (*Canavalia eschiformis*), Feijão lima (*Phaseolus lunatus*), Chicharo (*Lathyrus sativus*) e Siratro (*Macroptilium atropurpureum*), ou seja, foram infectados pelo vírus (Figura 1). Estas plantas também apresentaram sintomas visuais positivos para mosaico o que corrobora para o dados confirmado com a técnica de PCR.

De acordo com o PCR, as espécies *Vigna mungo*, feijão de corda (*Vigna unguiculata*), *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria ochroleuca*, Guizo cascavel (*Crotalaria incana*), *Macroptilium* sp.; Ervilhaca comum (*Vicia sativa*), *Mucuna-preta* (*Mucuna aterrina*) não foram hospedeiras do BGMV (Figura 1).



**Figura 1.** Produto da PCR das plantas da família Fabacea testadas quanto à reação ao BGMV, amplificadas com os oligonucleotídeos PAL1v1978/PAR1c496 e visualizadas em gel de agarose 1%, onde: M- marcador molecular 1 Kb plus; 1- Feijão Carioca (*Phaseolus vulgaris*); 2- *Vigna mungo*; 3- Soja (*Glycine max*); 4- feijão de porco (*Canavalia eschiformis*); 5- feijão de corda (*Vigna unguiculata*); 6- feijão lima (*Phaseolus lunatus*); 7- *Crotalaria spectabilis*; 8- Chicharo (*Lathyrus sativus*); 9- *Crotalaria ochroleuca*; 10- Guizo cascavel (*Crotalaria incana*); 11- *Macroptilium* Sp.; 12- *Crotalaria juncea*; 13- Siratro (*Macroptilium atropurpureum*); 14- Ervilhaca comum (*Vicia sativa*); 15- *Mucuna-preta* (*Mucuna aterrina*); 16- Planta sadia; 17- Controle negativo PCR.



## V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

### CONCLUSÕES

Quinze espécies pertencentes à família Fabaceae foram avaliadas quanto à reação ao BGMV, das quais seis delas foram infectadas.

Plantas pertencentes ao mesmo gênero (*Macroptilium*) se comportaram de maneiras diferentes, demonstrando a especificidade do BGMV.

Este trabalho permitiu identificar plantas que atuam como fonte de inoculo do *Bean Golden mosaic virus*, sendo estes dados de extrema importância no desenvolvimento de técnicas de tratamentos culturais mais eficientes para o controle da virose.

**Agências de Fomento:** Capes, CNPq, Fundação Araucária, IAPAR.

### REFERÊNCIAS

- BIANCHINI, A. MOSAICO DOURADO DO FEIJOEIRO: CRESCIMENTO DO HOSPEDEIRO, PROGRESSO DA DOENÇA E PRODUÇÃO. FEV/1998. 93 FOLHAS. **TESE – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**. PIRACICABA-SP.1998
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. DOENÇAS DO FEIJOEIRO (PHASEOLUSVULGARIS). IN: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. MANUAL DE FITOPATOLOGIA. SÃO PAULO: **AGRONÔMICA CERES**, 2005. V.2 DOENÇAS DAS PLANTAS CULTIVADAS, CAP.37, P.333-349.
- COSTA, A.S. FITOVIROSES DO FEIJOEIRO NO BRASIL. IN: BULISANI, E.A. (ED.). FEIJÃO: FATORES DE PRODUÇÃO E QUALIDADE. CAMPINAS: **FUNDAÇÃO CARGILL**, 1987. P.173-256.
- LAZAROWITZ, S.G. GEMINIVIRUS: GENOME STRUCTURE AND GENE FUNCTION. CRITICAL REVIEWS IN **PLANT SCIENCES**, V. 11, P. 327-349. 1992.
- MORALES, F. J.; ANDERSON, P. K. THE EMERGENCE AND DISSEMINATION OF WHITEFLY-TRANSMITTED GEMINIVIRUSES IN **LATIN AMERICA**. **ARCH. VIROL.**, V. 146, N. 3, P. 415-441, 2001.
- MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. RAPID ISOLATION OF HIGH MOLECULAR WEIGHT PLANT DNA. **NUCLEIC ACIDS RESEARCH**, V.8, N.19, P.4321-4325, 1980.
- 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**, V.77, P.340-347, 1993.
- WYATT, S.D.; BROWN, J.K. DETECTION OF SUBGROUP III GEMINIVIRUS ISOLATES IN LEAF EXTRACTS BY DEGENERATE PRIMERS AND POLYMERASE CHAIN REACTION. **PHYTOPATHOLOGY**, V.86, N.12, P.1288-1293, 1996.
- YOKOYAMA, M. MOSCA-BRANCA NO FEIJOEIRO COMUM: ASPECTOS BIOLÓGICOS E CONTROLE. **CORREIO AGRÍCOLA**, SÃO PAULO, N.1, P.8-9, 1995.