

Begomovírus infectando a cultura de pimentão no Estado de São Paulo**

Denise Nakada Nozaki^{1*}, Renate Krause-Sakate¹ & Marcelo Agenor Pavan¹

¹Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Departamento de Produção Vegetal, Setor Defesa Fitossanitária, CP 237, CEP 18.603-970, Botucatu, SP. *Bolsista CAPES.

**Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Trabalho financiado pela FAPESP

Autor para correspondência: Denise Nakada Nozaki (denozaki@hotmail.com)

Data de chegada: 07/05/2007. Aceito para publicação em: 10/09/2010.

1487

RESUMO

Nozaki, D.N.; Krause-Sakate, R. & Pavan, M.A. Begomovírus infectando a cultura de pimentão no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.3, p.244-247, 2010.

Vírus do gênero *Begomovirus* são transmitidos por mosca-branca *Bemisia tabaci* G., e constituem um dos problemas fitossanitários sérios em diversas culturas. Plantas de pimentão coletadas em oito regiões do Estado de São Paulo, foram submetidas a extração de DNA total e PCR com primers universais e degenerados para begomovírus, que amplificam parte da região codificadora para a proteína capsial. Os dados indicam a presença de begomovírus em pimentão nas cinco

regiões coletadas. Análise das seqüências do DNA viral e análise filogenética revelaram identidade com dois begomovírus nativo da América. *Tomato severe rugose virus* – ToSRV (AY029750) e com Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV, AY829113), espécies descritas infectando tomateiro no Brasil. A presença de begomovírus em pimentão foi verificada nas regiões de Alvinlândia, Ubirajara, Botucatu, Elias-Fausto, Paulínia, Mogi Guaçu, Paranapanema e Pirajú.

Palavras-chave adicionais: *Capsicum annuum*, *Tomato severe rugose virus*, Tomato yellow vein streak vírus.

ABSTRACT

Nozaki, D.N.; Krause-Sakate, R. & Pavan, M.A. Begomovirus infecting pepper crops in São Paulo State. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.2, p.244-247, 2010.

Virus to the genus *Begomovirus* transmitted by whiteflies *Bemisia tabaci* G., and considered one of the most important fitossanitary problems for several cultures. Pepper plants were collected in eight the regions of São Paulo State, the extraction of total DNA and PCR were submitted with universal and degenerate primers was used to amplify partial sequences of the begomovírus coat protein gene. The data indicated the presence of begomovírus in five collected regions.

DNA viral sequence analysis and phylogenetic analysis revealed identity with two native begomovírus of America. *Tomato severe rugose virus* - ToSRV (AY029750) and with Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV, AY829113), described species infecting tomateiro in Brazil. The begomovírus presence in pepper plant was verified in the areas of Alvinlândia, Ubirajara, Botucatu, Elias-Fausto, Paulínia, Mogi Guaçu, Paranapanema and Pirajú.

Keywords: *Capsicum annuum* L, *Tomato severe rugose virus*, Tomato yellow vein streak virus

Os vírus pertencentes à família *Geminiviridae* são caracterizados pela morfologia de partículas icosaédricas geminadas e genoma composto por DNA de fita simples circular (4, 09). A família é dividida nos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*, com base no número de componentes do genoma, tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros e relacionamento filogenético (09). Os vírus do gênero *Begomovirus*, são transmitidos por moscas brancas (*Bemisia tabaci* Genn.) e infecta dicotiledôneas, de uma maneira geral, causando grande prejuízo em várias culturas em todo mundo. Possui o genoma bipartido ou monopartido (DNA-A ou DNA-B), sendo cada um dos componentes (DNA-A e DNA-B) responsável por etapas distintas do processo de infecção. O DNA-A é responsável pela replicação viral e formação da capa protéica enquanto que o DNA-B é responsável pela disseminação (célula-a-célula e longa distância) do vírus na planta (4).

Em pimentão o primeiro relato de begomovírus no Brasil foi feito por Lima et al. (5), que verificou um total de 43,8% de infecção nas

amostras da cultivar S-59 e o híbrido Tango coletadas nos municípios de Curaçá (Bahia) e Petrolina (Pernambuco) no Submédio do Vale São Francisco, causando, em média, 20% de perda na produção (6). Bezerra et al. (1) observaram em Petrolina de Goiás (estado de Goiás) sintomas de mosaico amarelo e distorção de folha em pimenta dedo-de-moça, tendo sido verificada a espécie ToSRV (AY029750). No estado de São Paulo foi verificada a mesma espécie ocorrendo em pimentão no ano de 2005 (6).

O objetivo deste trabalho foi determinar os possíveis locais de ocorrência de begomovirus na cultura de pimentão no estado de São Paulo e identificar as espécies predominantes nesta cultura.

Plantas de pimentão, com sintomas de amarelecimento e distorção foliar, foram coletadas para verificar a presença de begomovírus, no período compreendido entre novembro de 2004 a maio de 2006 em 16 propriedades produtoras nas oito regiões. Plantas de pimentão cultivado em casa-de-vegetação, foram usados como controle negativo. Em campo de produção de pimentão em cultivo aberto, foram coletadas

119 amostras de plantas de pimentão ‘Magali R’, ‘Ikeda Casca Dura’, ‘P36R’ e ‘Nathalie’ distribuídos nos municípios de Elias Fausto, Botucatu, Paulínia e Mogi Guaçu. Sob estufa foram coletadas 43 amostras de híbridos de pimentão ‘P36’, ‘Lilac’ e ‘Mandarin’ nos municípios de Paranapanema e Piraju, e 66 amostras de pimenta Dínamo e híbridos de pimentão ‘Atlantic’ e ‘Máximo’ na região de Marília, municípios de Alvinlândia e Ubirajara (Tabela 1).

O DNA total foi extraído individualmente de cada planta usando o método descrito por Dellaporta et al. (1983). A diagnose inicial foi realizada via “Polymerase Chain Reaction” (PCR) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores “universais” PALIV1978/PAR1c496, desenvolvidos para detecção de *Begomovirus* (08). Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos obtidos após PCR indicou a presença de um único fragmento com cerca de 1100 pares de bases. O termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf) foi programado para uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos a 94°C por 1 minuto, 57°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. O DNA das amostras positivas para begomovírus foram amplificados novamente por PCR para obtenção de um fragmento correspondente à região do gene que codifica a proteína capsidial com o par de oligonucleotídeos PrV324 e PrC889 (10).

O produto de PCR foi diretamente seqüenciado. As seqüências de cada isolado foram comparadas entre si e com outras seqüências do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) como: *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV, número de acesso AF291705), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV, AF490004), *Sida mottle virus* (SiMoV, AY090555), *Tomato golden vein virus* (ToGVV, AY751742), *Bean golden mosaic virus* (BGMV, M88686-7), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV, AY029750 e DQ207749) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV, DQ3559770) e alinhadas e construída a árvore filogenética com o programa MEGA v.3.1, utilizando o método de “neighbor-joining”, com valor de “bootstrap” 2000.

Nos municípios de Paulínia, Botucatu e na primeira coleta em Elias Fausto nenhuma das amostras coletadas mostraram-se infectadas

por begomovírus. De fato, não foram observadas moscas brancas nos locais de coleta, e provavelmente a incidência estava muito baixa, ou mesmo nula. No município de Paranapanema sete das 13 amostras foram positivas correspondendo a 53,8% das amostras coletadas. Em Piraju, das 30 amostras coletadas, nove foram positivas (30%). Em Alvinlândia, região de Marília, das 40 plantas coletadas apenas uma mostrou-se infectada (2,5%) e em Ubirajara, região de Bauru, das 26 amostras, uma era positiva (3,8%). Em Mogi Guaçu foram coletadas 38 plantas de pimentão sendo que seis mostraram-se positivas por PCR (15,8%) e, em Elias Fausto, de 23 plantas coletadas apenas seis mostraram-se infectadas ou positivas por PCR (26,1%). Em todas as regiões onde foram encontradas amostras positivas, encontravam-se populações de mosca-branca. Nas regiões de Paranapanema, Piraju, e Marília a área de cultivo de pimentão havia sido anteriormente utilizada com tomateiro.

As amostras positivas para begomovírus foram em seguida submetidas a re-amplificação com os oligonucleotídeos PrV324/PrC889 para estudo da diversidade genética e identificação das prováveis espécies presentes. Este par de oligonucleotídeos amplificou um fragmento de aproximadamente 576 nucleotídeos correspondente ao gene que codifica a proteína capsidial (CP), localizado no DNA-A dos begomovírus, correspondendo a região do nucleotídeo 377 ao 826 da capa protéica de *Tomato severe rugose virus* (DQ207749) de Petrolina de Goiás, Brasil.

Segundo Brown et al. (2001), o sequenciamento da porção 5’ da região codificadora para a proteína capsidial permite uma classificação provisória da espécie de begomovírus infectando a amostra, porém com a ressalta já alertada por Padidam et al. (1999) da ocorrência de frequentes recombinações entre isolados de begomovírus e o problema de se utilizar uma pequena região genômica para classificar o isolado em espécie. Deste modo, os oligonucleotídeos PrV324 e PrC889 amplificam a porção 5’ do genoma dos begomovírus e foram utilizados para classificação provisória dos isolados coletados.

Foram sequenciados 23 isolados, sendo oito da região de Piraju, cinco de Paranapanema, um de Alvinlândia, um de Ubirajara, cinco de

Tabela 1. Localização onde plantas de pimentão foram coletadas para análise no período compreendido entre 2004 a 2006.

Localidade	Cultivar	Sistema de cultivo ^a	População de Mosca-branca	Nº de amostras		% de infecções
				coletadas	Infectadas	
Elias Fausto	Magali R	Cca	Ausente	29	0	0
Paulínia	Ni	Cca	Ausente	24	0	0
Botucatu	Ikeda Casca Dura	Cca/ Ce	baixa	5	0	0
Paranapanema	P36R	Ce	alta	13	7	53,8
Piraju	Lilac	Ce	Alta	30	9	30
	Mandarin	Ce	Alta			
Alvinlândia	Atlantic	Ce	Baixa	40	1	2,5
	Pimenta Dínamo	Ce	Baixa			
Ubirajara	Máximo	Ce	baixa	26	1	3,8
	Pimenta Dínamo	Ce	Baixa			
Mogi Guaçu	P36R	Cca	Baixa	38	6	15,8
	Nathalie	Cca	Baixa			
	Magali R	Cca	Alta			
	P36R	Cca	Alta			
Elias Fausto	Nathalie	Cca	Alta			
	Magali R	Cca	Alta	23	6	26,1

^a Cca= cultivo em campo aberto; Ce= cultivo em estufa e Ni= não identificada

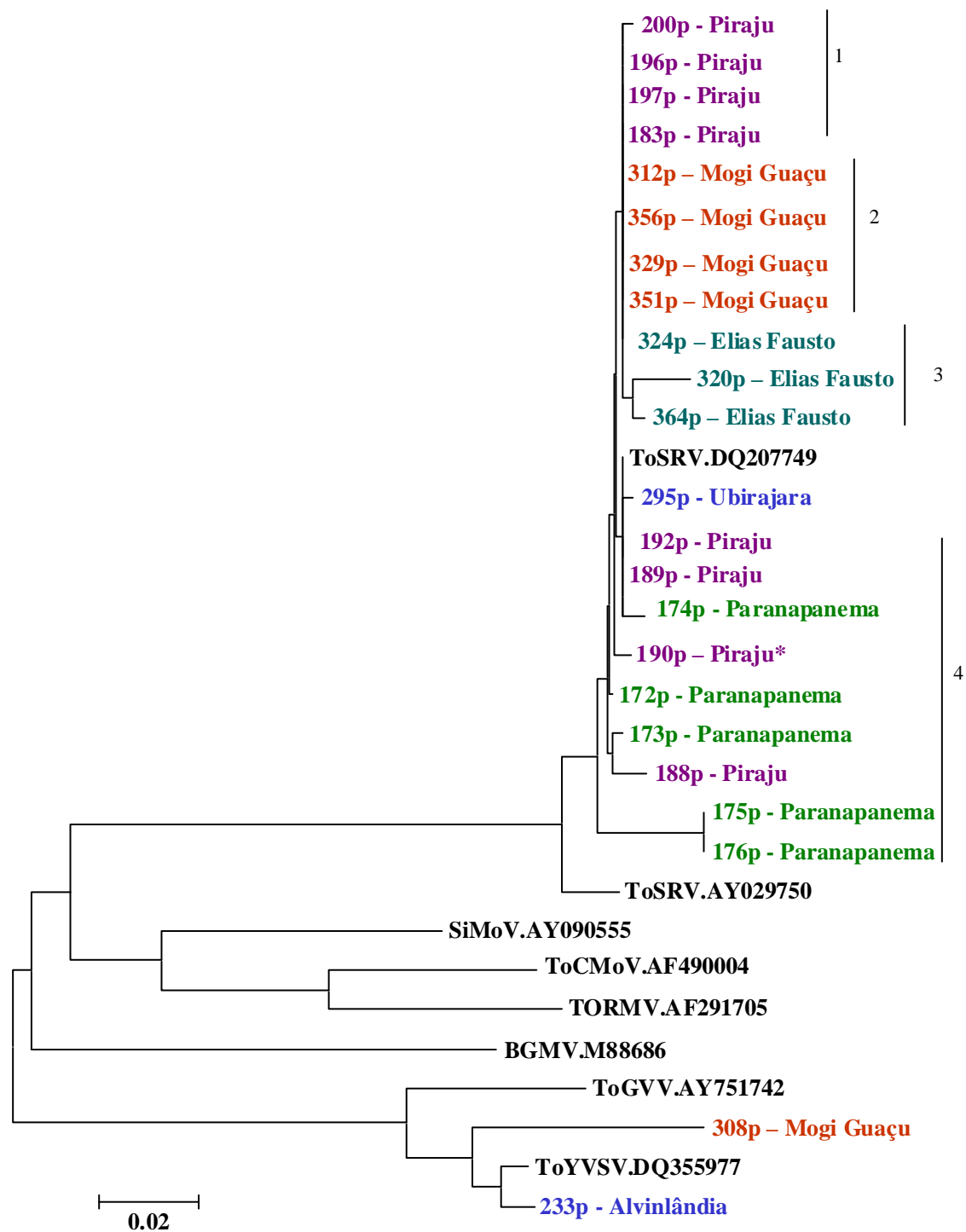


Figura 1. Análise filogenética de begomovirus infectando pimentão no Estado de São Paulo e outros begomovirus do GenBank, baseado no alinhamento de nucleotídeos referente à parte da região codificadora para a capa protéica obtida com o oligonucleotídeo PrV324. Valor de Bootstrap 2000, Programa Mega Versão 3.1.

Mogi Guaçu e três de Elias Fausto. Comparação das seqüências obtidas com as demais seqüências disponíveis no GenBank, demonstrou duas espécies distintas de begomovirus ocorrendo em pimentão. A análise permitiu a separação de dois ramos filogenéticos (Figura 1). O primeiro ramo compreendendo isolados de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV-AY029750 e DQ207749), foi constituído por todos os isolados oriundos das regiões de Paranapanema, Piraju, Ubirajara, Elias Fausto

e três de Mogi Guaçu. No segundo ramo, foram agrupados o isolado de Alvinlândia (233p), e um isolado de Mogi Guaçu (308), a espécie tentativa Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) e o Tomato golden vein virus (ToGUVV). A maioria dos isolados apresentaram identidade variando de 98 a 100% com o ToSRV, seqüenciado de pimenta na região de Petrolina de Goiás, indicando predominância desta espécie nos campos analisados no Estado de São Paulo. O isolado 233p de

Alvinlândia e o 308p de Mogi Guaçu apresentaram identidade de 98 e 95% com ToYVSV respectivamente.

A análise das seqüências de begomovirus obtidas neste trabalho com demais disponíveis no GenBank identificaram a ocorrência das espécies *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) nas regiões de Paranapanema, Piraju e Marília e do *Tomato golden vein virus* (ToGVV, AY751742) ou *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV, AY829113) em Alvinlândia e Mogi Guaçu.

Os resultados aqui obtidos revelaram que as espécies ToSRV e ToYVSV/ToGVV que haviam sido relatadas até então no Brasil em tomateiro, estão infectando também o pimentão e utilizando esta planta como possível hospedeira alternativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bezerra-Agasie, I.C.; Ferreira, G.B.; Ávila, A.C.; Inoue-Nagata, A.K. First report of Tomato severe rugose virus in chili pepper in Brazil. **Plant Disease**, v.90, p.114, 2006.
2. Brown, J. K.; Idris, A. M.; Torres-Jerez, I.; Banks, G. K.; Wyatt, S. D. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. **Archives of Virology**, Springer Wien, v.146, n. 8, p.1581-1598, 2001.
3. Dellaporta, S.L.; Woods, J.; Hicks, J.B. A plant minipreparations, version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.1, p.19-21, 1983.

4. Hanley-Bowdoin, L.; Settlage, S.B.; Orozco, B.M.; Nagar, S.; Robertson, D. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, p. 71-106, 1999.
5. Lima, M.F.; Bezerra, I.C.; Ribeiro, S.G. De Ávila, A.C. Distribuição de geminivírus nas culturas do tomate e pimentão em doze municípios do Submédio do Vale de São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p. 81-85, 2001.
6. Nozaki, D.N.; Krause-Sakate, R.; Hasegawa, J.M.; Cezar, M.A.; Dziuba, P.H.; Pavan, M.A. **First report of Tomato severe rugose virus infecting pepper plants in Brazil. Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n3, p.5040, 2006.
7. Padidam, M.; Sawyer, S. & Fauquet, C. M. Possible emergence of new geminivirus by frequent recombination. **Virology**, v.265, p.218-225, 1999.
8. Rojas, M.R.; Gilbertson, R.L.; Russell, D.R.; Maxwell, D.P. Use of degenerate oligonucleotídeos in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v. 77, p. 340-347, 1993.
9. Stanley, J.; Bisaro, D.M.; Briddon, R.W.; Brown, J.K.; Fauquet, C.M.; Harrison, B.D.; Rybicki, E.P.; Stenger, D.C. Family *Geminiviridae*. IN: Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball, L.A. (eds). **Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, San Diego, CA, USA/London, Elsevier/Academic Press; p.301-326, 2005.
10. 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, p.1288-1293, 1996.