

Identificação e caracterização de um isolado de *Hydrangea ringspot virus* em hortênsia no Estado de São Paulo.

Karolina Marie Alix Benedictte Van Sebroeck Dória^{1*}; Denise Nakada Nozaki¹; Marcelo Agenor Pavan¹; Valdir Atsushi Yuki¹, Renate Krause Sakate¹

¹Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, CP 237, 18603-970, Botucatu-SP.
²Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade, Instituto Agrônomico, CP 28, 13020-902, Campinas, SP. *Parte da dissertação da primeira autora.

Autor para correspondência: Renate Krause Sakate (renatekrause@fca.unesp.br)

Data de chegada: 17/02/2009. Aceito para publicação em: 18/02/2011.

1644

RESUMO

Dória, K.M.A.B. Van S.; Nozaki, D.N.; Pavan, M.A.; Yuki, V.A.; Krause-Sakate, R. Identificação e caracterização de um isolado de *Hydrangea ringspot virus* em hortênsia no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, v.37, n.2, p.125-128, 2011.

Plantas de hortênsia apresentando folhas com anéis cloróticos e necróticos, provenientes de Arujá, estado de São Paulo foram analisadas para identificação da espécie viral. Partículas alongadas filamentosas, medindo cerca de 490 nm, foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão. Oligonucleotídeos para *Hydrangea ringspot virus* (HdRSV), um potexvirus encontrado comumente na Europa e Estados Unidos da América, foram testados utilizando-se o RNA total extraído de hortênsia e amplificaram um fragmento em torno de 250 e 550 nucleotídeos. Os fragmentos apresentaram identidade de 88% e 96%, respectivamente com o HdRSV (número de acesso AJ 707100.1), indicando tratar-se desta espécie viral. Para avaliar a disseminação deste vírus foram analisadas 17 matrizes comerciais de hortênsia, da

região de Arujá – SP. Em oito variedades foi constatada a presença do HdRSV sendo elas: ‘Azul Rendado’, ‘Azul LZR’, ‘Renat Blue’, ‘Rosa Japonesa’, ‘Rosita’ e ‘Vermelho Comum’. Os isolados provenientes das variedades ‘Azul LZR’, ‘Rosita’, ‘Renat Blue’ e ‘Vermelho Comum’ não diferiram entre si em suas seqüências de aminoácidos na porção da replicase viral. Os isolados encontrados em ‘Azul Rendado’ e ‘Rosa Japonesa’ apresentaram pouca variabilidade na região analisada. Estas sequencias estão depositadas no GenBank sob número de acesso AY 707100 e NC_006943. Um anti-soro foi obtido para o HdRSV e pode ser eficientemente utilizado para detecção do vírus a partir de hortênsia e *Primula malacoides*, outra ornamental infectada pelo HdRSV.

Palavras-chave adicionais: *Hydrangea macrophylla*, *Potexvirus*, RT-PCR, Saxifragaceae

ABSTRACT

Dória, K.M.A.B. van S.; Nozaki, D.N.; Pavan, M.A., Yuki, V.A.; Krause-Sakate, R. Identification and characterization of a *Hydrangea ringspot virus* isolate infecting hydrangea in São Paulo State. *Summa Phytopathologica*, v.37, n.2, p.125-128, 2011.

Hydrangea plants showing leaves with chlorotic and necrotic rings from Arujá Municipality, São Paulo State, were analyzed for the identification of the viral species. Elongated filamentous particles of 490 nm were visualized under transmission electron microscope. Oligonucleotides for *Hydrangea ringspot virus* (HdRSV), a potexvirus commonly found in Europe and in the United States, were tested using total RNA from hydrangea plants, amplifying two fragments, one around 550 and another one of 250 nucleotides. Nucleotide identity with HdRSV (accession number AJ 707100.1) was 96% and 88% for the longest and shortest fragment, respectively, indicating the presence of this virus. To evaluate its dissemination in the matrices

of hydrangea used in the commercial production, 17 samples were collected in the region of Arujá, and eight were infected by HdRSV. For the analyzed viral replicase portion, the isolates from the varieties ‘Azul LZR’, ‘Rosita’, ‘Renat Blue’ and ‘Vermelho Comum’ did not differ in their amino acid sequences from isolates with sequences deposited in the GenBank (accession numbers AY 707100 and NC_006943). The isolates from ‘Azul Rendado’ and ‘Rosa Japonesa’ showed few differences but were related to the remaining isolates. An antiserum was obtained for HdRSV and can be efficiently used to detect such virus in hydrangea and *Primula malacoides*, another ornamental plant also infected by HdRSV.

Keywords: *Hydrangea macrophylla*, *Potexvirus*, RT-PCR, Saxifragaceae

A hortênsia é uma ornamental muito apreciada no Brasil e pertence ao gênero *Hydrangea* (família *Saxifragaceae*). É um arbusto semi-lenhoso, originário da China e Japão, de 1 a 2,5 m de altura, de folhagem e florescimento decorativos. A hortênsia é cultivada em vasos ou a pleno sol e em solos alcalinos as flores tornam-se róseas, enquanto em solos ácidos as flores tornam-se azuis. Costuma ser podada

drasticamente no fim do inverno, para florescer na primavera (9).

Para a produção comercial da hortênsia, efetua-se a multiplicação mediante estacas de ponta de ramos podados no outono-inverno e cultivados em local protegido até enraizar (10). A propagação vegetativa proporciona inúmeros benefícios, dentre eles a conservação de características genotípicas, e é uma alternativa para a produção de

mudas em menor tempo e durante todo o ano. Porém, uma desvantagem da propagação vegetativa é a perpetuação de patógenos, principalmente os vírus, para as plantas filhas.

A primeira suspeita da ocorrência de vírus em hortênsia no Brasil foi feita em 2005, na região de Arujá (11). Existem pelo menos quatro espécies de vírus associadas a hortênsias. Dentre estes o mais comumente encontrado é o HdRSV pertencente ao gênero *Potexvirus* e descrito por Brierley (2) e Brierley & Lorentz (3). Trata-se de um vírus com partículas filamentosas com comprimento em torno de 490 nm. Assim como os demais potexvirus, o HdRSV possui o CAP (7 metil guanosina) no terminal 5' e uma cauda poliadenilada no terminal 3' do RNA. O genoma completo consiste em 6.185 nucleotídeos, excluindo a cauda poli A, e contém seis ORFs (open reading frames ou fases abertas de leitura) que codificam proteínas com 156, 26, 12, 8, 24 e 16 kDa, respectivamente (5).

O HdRSV já foi relatado nos Estados Unidos, Europa e Nova Zelândia, mas provavelmente esteja em todas as áreas de cultivo da *Hydrangea macrophylla* (8). Experimentalmente, o vírus infecta mais de 20 espécies de 12 famílias de dicotiledôneas e é transmitido por extrato vegetal a partir de plantas infectadas. Em *Gomphrena globosa*, causa lesões locais necróticas com bordos avermelhados entre 3 a 5 dias após a inoculação. Em *Chenopodium quinoa* e *C. amaranthicolor*, também são visualizadas lesões locais entre 5 a 7 dias após a inoculação (7). Além de hortênsias, o HdRSV infecta sistemicamente a planta ornamental *Primula malacoides*, mas sem causar o aparecimento de sintomas (4). Não há o conhecimento da transmissão do vírus por vetor. Tentativas utilizando os afídeos *Myzus persicae* e *Macrosiphum euphorbiae* falharam na transmissão do vírus (4), bem como não há relato da transmissão por sementes (3).

O objetivo deste trabalho foi identificar a espécie viral presente em hortênsia da região de Arujá, realizar a caracterização molecular parcial por meio do sequenciamento da região codificadora para a replicase viral, obter um anti-soro para diagnose viral e avaliar a incidência do vírus em matrizes utilizadas para produção comercial.

MATERIALE MÉTODOS

Isolados. A amostra inicialmente estudada e caracterizada foi proveniente de hortênsia variedade Renat Blue exibindo sintomas típicos de anéis circulares cloróticos e necróticos provenientes de Arujá – SP (Figura 1). O isolado foi denominado HdRSV-RB. Para a preservação deste vírus, realizou-se a desidratação do tecido foliar na presença de cloreto de cálcio anidro. Também foram coletadas amostras de diferentes matrizes de hortênsia na região de Arujá-SP utilizadas na produção comercial de mudas, como Azul LZR, Azul Rendado, Branco com renda, Branco Comum, Esconia, Kumiko, Lav-bla, Leuch, Lk-49, Renat Blue, Rosa Japonesa, Rosita e Vermelho Comum provenientes da AFLORD e Elbtal, Leuch, Red Baron e Renata Stuniger, provenientes da FLOREMA.

Detecção molecular. A extração do RNA total foi realizada segundo Bertheau et al. (1). Para a detecção do vírus foi utilizada a técnica de transcrição reversa e reação de polimerização em cadeia em uma só etapa (RT-PCR). As sequências dos oligonucleotídeos específicos desenhados para esta espécie viral foram: Hyd_senso 3098 (5' GGA GAC AAT CAA GGC TAG GC 3') e Hyd_anti_senso 3634 (5' TGG GAT TGG TCG AAG GCG G 3') para amplificação de um fragmento em torno de 536 nucleotídeos na porção codificadora para



Figura 1. Sintomas de infecção pelo *Hydrangea ringspot virus* (HdRSV) em hortênsia da variedade Renat blue.

a replicase viral do HdRSV. A RT-PCR com os oligonucleotídeos Hyd_senso e Hyd_anti_senso foi efetuada em volume de 25 µl, utilizando-se 2,5 µl de tampão da enzima 10X (Tris – HCl 100mM, pH 8,3 e KCl 500mM); 3,5mM de MgCl₂; 0,17% de Triton X-100; 1mM de cada oligonucleotídeo; 0,25 mM de dNTPs; 0,5 U de Taq DNA Polimerase; 0,75 U da transcriptase reversa AMV (*Avian myeloblastosis virus*); 2,5 µl de RNA molde e quantidade suficiente de água DEPC para completar 25 µl. A RT-PCR foi realizada a 42°C por 30 minutos, desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 52°C por 1 minuto e polimerização a 72 °C por 1 minuto e polimerização final a 72 °C por 10 minutos.

A análise das seqüências foi realizada utilizando-se os programas BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), e a seqüência do HdRSV comparadas com demais seqüências disponíveis no GenBank.

Transmissão via extrato vegetal. Foi avaliada a transmissão do isolado HdRSV-RB para espécies de plantas pertencentes às famílias *Amaranthaceae*: *Gomphrena globosa*; *Chenopodiaceae*: *Chenopodium quinoa*, *C. amaranthicolor* e *C. murale*; *Primulaceae*: *Primula malacoides*, e *Solanaceae*: *Nicandra physaloides*, *Nicotiana clevelandii*, *N. occidentalis*, *N. rustica*, *N. tabacum* 'Havana', e *N. tabacum* 'Turkish'. Dez plantas de cada espécie foram inoculadas com folhas de hortênsia infectadas (1:3 peso volume) com o HdRSV-RB, maceradas em tampão fosfato 0,05 M pH 7,0 contendo 0,01 M de sulfito de sódio utilizando o abrasivo carborundum 600 mesh. A infecção foi avaliada por meio de análise visual dos sintomas e por RT-PCR.

Purificação do vírus e produção de anti-soro. O HdRSV foi purificado de acordo com o protocolo de Kendall et al. (6) a partir de folhas de *C. quinoa* aos 21 dias após a inoculação via extrato vegetal tamponado. Um total de 1 mg de vírus foi injetado em coelha da raça "Nova Zelândia" com aproximadamente 4 meses de idade. Foram administradas no total cinco injeções intramusculares, cada uma contendo 0,2 mg de vírus.

Teste de adsorção. Para a adsorção do anti-soro ao tecido de planta sadia, folhas de plantas de *C. quinoa* sadias foram maceradas em tampão 0,2 M Tris-HCl pH 7,2 na proporção 1/10 (p/v). O extrato obtido foi filtrado e acrescentou-se o anti-soro na diluição 1:10 (anti-soro/extrato de planta), utilizando-se em seguida procedimento padrão do teste PTA-ELISA.

RESULTADOS

As plantas de hortênsia Renat Blue foram positivas por RT-PCR utilizando-se os oligonucleotídeos específicos para o HdRSV. O sequenciamento do fragmento amplificado confirmou que se tratava do HdRSV, obtendo-se 96% de identidade respectivamente com o HdRSV (número de acesso AJ 707100.1). Como se tratou da primeira constatação do HdRSV no Brasil, foi efetuada a notificação de praga exótica ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), número do processo 21052.015361/2007-08, obtendo-se um parecer favorável para publicação destas informações.

Também foram encontradas amostras positivas para o HdRSV nas seguintes matrizes: Azul LZR, Azul Rendado, Renat Blue, Rosa Japonesa, Rosita, Vermelho Comum, Renata Stuniger e Elbtal. A árvore filogenética obtida com base nas seqüências de aminoácidos deduzidas do fragmento viral (Figura 2) indica que, para a região analisada, não houve diferenças para a maioria dos isolados brasileiros encontrados nas diferentes matrizes quando comparados à seqüência de HdRSV depositada no Genbank (números de acesso NC006943 e AY707100), indicando possível introdução de material vegetal infectado pelo vírus.

Para melhor caracterizar o isolado de HdRSV coletado em Renat Blue, diferentes espécies vegetais foram inoculadas com extrato vegetal infectado. Foram observados sintomas de lesão local em *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *C. murale* e *G. globosa*. Em *Primula malacoides* foi observado um leve clareamento das nervuras aos 40 dias após a inoculação. Em *Nicandra physaloides* foi verificado um leve amarelecimento das folhas e as espécies *N. clevelandii*, *N. tabacum* "Havana", *Nicotiana tabacum* "Turkish", *N. occidentalis* e *N. rustica*, permaneceram assintomáticas. A presença do vírus foi confirmada por RT-PCR em todas as hospedeiras testadas acima.

O HdRSV causa lesões locais em *Gomphrena globosa*, *Chenopodium amaranticolor* e *C. quinoa*, não sendo sistêmico nestas plantas (8). Em *Primula malacoides* o vírus é assintomático, porém infecta sistemicamente (8). Não há relato de outras hospedeiras suscetíveis na literatura. Desta forma, para o isolado HdRSV-RB, foi observada infecção nas mesmas espécies citadas acima, porém de

acordo com os resultados obtidos pela detecção por RT-PCR, verificou-se que o vírus também é capaz de replicar em *Nicotiana tabacum* "Turkish", *N. clevelandii*, e *N. occidentalis* e *N. physaloides* porém sendo assintomático nestas espécies de plantas. Foi verificada ainda a detecção do vírus em folhas de *C. quinoa*, *C. amaranticolor* e *C. murale* assintomáticas, emitidas após a inoculação por extrato vegetal, indicando infecção sistêmica nestas plantas. Estes resultados podem estar relacionados com a sensibilidade da técnica de RT-PCR em detectar o vírus.

O protocolo descrito para o *Narcissus mosaic virus* (6), um potexvirus, permitiu a obtenção de uma preparação purificada com rendimento de 259 mg de vírus por quilo de material processado. Hughes et al. (5), purificando HdRSV a partir de *C. quinoa*, obtiveram rendimentos de 920 mg/Kg de tecido, porém o mesmo protocolo não pôde ser testado pela falta de alguns reagentes específicos utilizados neste protocolo. Utilizando-se o ELISA indireto (PTA-ELISA), sem a adsorção do anti-soro obtido a partir deste purificado viral, não foi possível obter reações específicas, indicando que no processo de purificação do vírus foram co-purificadas proteínas vegetais. Após a adsorção do anti-soro com extrato de *C. quinoa* sadia, os valores de absorbância para os extratos de hortênsia e primula infectada com o HdRSV foram pelo menos três vezes superiores aos da hortênsia e primula sadia, respectivamente, confirmando que a adsorção permitiu tornar o anti-soro específico (Figura 3). A diluição 1:150 (pós-adsorção) do anti-soro foi a que melhor permitiu a detecção do vírus.

Verificou-se que o HdRSV é melhor detectado por PTA-ELISA a partir de primulas infectadas, quando comparada à hortênsia, possivelmente por atingir maior concentração viral nesta planta. Verificou-se também que mesmo em hortênsias podem ocorrer resultados falso-negativos em plantas sabidamente infectadas.

Apesar do HdRSV ocorrer no Brasil e se encontrar presente em diferentes matrizes de hortênsia hoje utilizadas para produção comercial, o vírus possui uma limitação quanto a sua dispersão, pois até o momento se desconhece transmissão por vetores bem como por contato entre plantas doentes.

Recentemente foi lançada pela Aflord, juntamente com o Instituto Agrônomo de Campinas, uma matriz da hortênsia Renat Blue livre

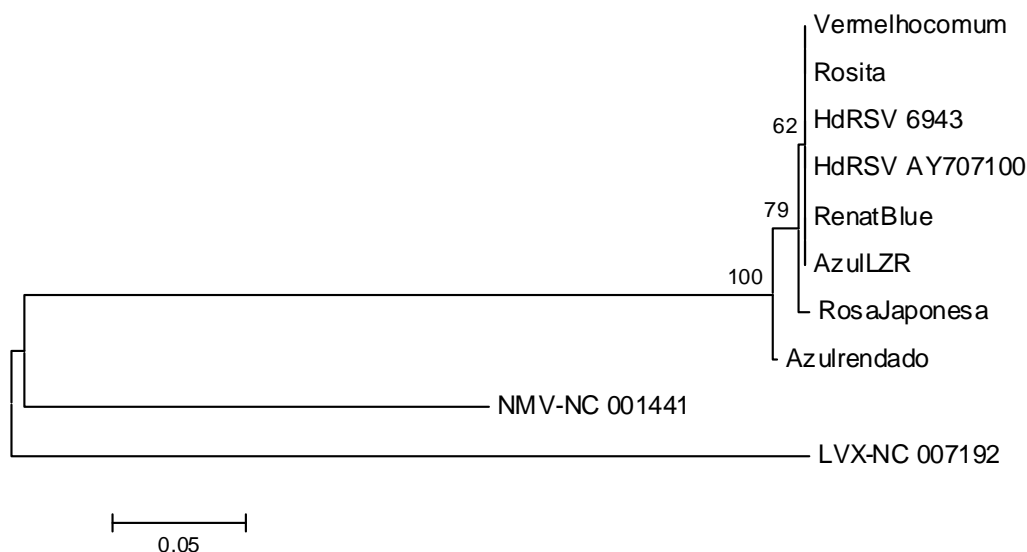


Figura 2. Árvore filogenética obtida com base na seqüência de aminoácidos correspondente aos 479bp na região codificadora para a replicase viral entre os isolados brasileiros de *Hydrangea ringspot virus* provenientes das matrizes de hortênsias (Azul LZR; Azul rendado; Vermelho comum; Rosita; Renat blue; Rosa japonesa); HdRSV-AY707100; HdRSV-NC_006943 com a região correspondente do NMV-NC_001441 e LVX-NC_007192 (outgroups). Programa Mega versão 3.1, utilizando-se Neighbor-Joining e valor de Bootstrap 2000.

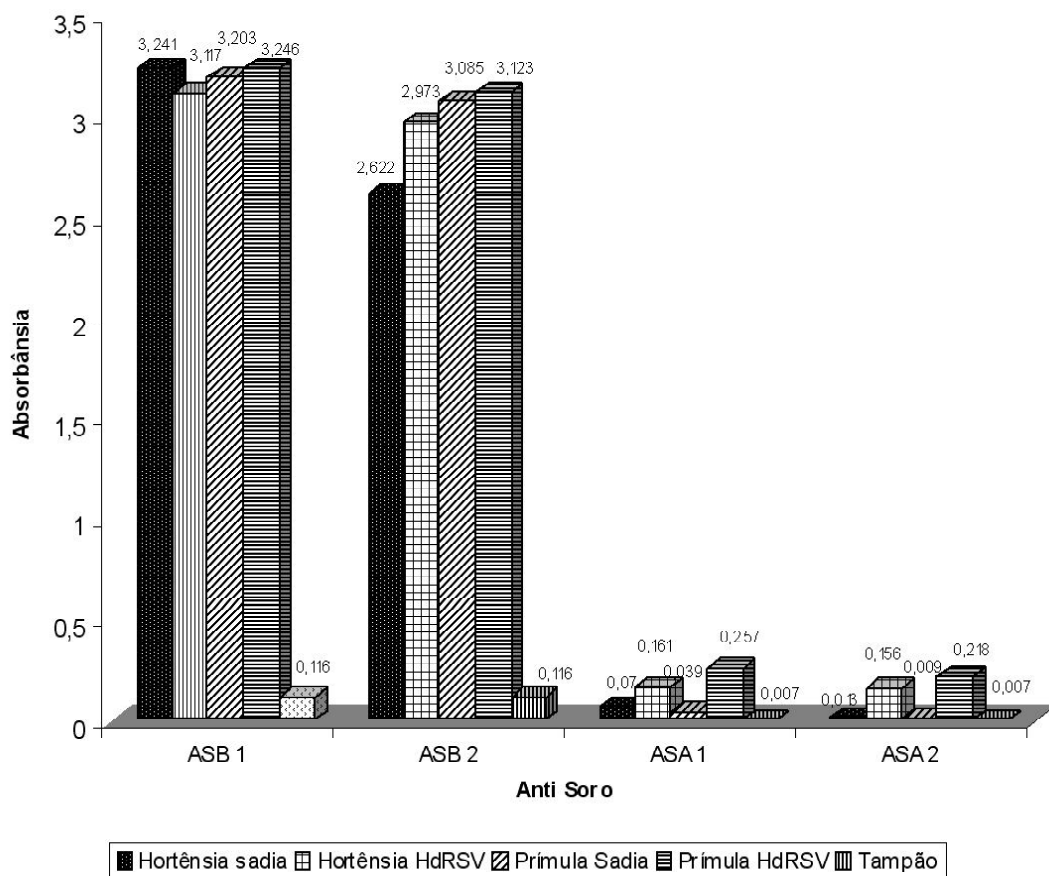


Figura 3. Avaliação através de PTA-ELISA do anti-soro produzido para o *Hydrangea ringspot virus*. (ASB 1: anti-soro bruto 1 – protocolo NMV; ASB 2: anti-soro bruto 2 – combinação de protocolos para PVX; ASA 1: anti-soro adsorvido protocolo NMV; ASA 2: anti-soro adsorvido (combinação de protocolos para PVX). Absorbância a 405 nm.

de vírus, com a certificação dos órgãos competentes e inclusive testada por RT-PCR com os oligonucleotídeos desenvolvidos neste trabalho. Este é o primeiro passo para o processo de erradicação do vírus. Cuidados adicionais como o isolamento dessas matrizes em locais adequados, assepsia das tesouras utilizadas na obtenção das estacas (uma vez que a hortênsia é propagada vegetativamente) serão essenciais para manutenção e propagação do material sadio.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos. À AFLORD e FLOREMA pelas matrizes de hortênsia analisadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bertheau, Y.; Frechon, D.; Toth, I.K.; Hyman, L.J. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). In: Perombelon, M. C. M.; van der Wolff, J. M. (eds). **Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes**. Dundee, Scotland: Scottish Crop Research Institute Occasional Publication, 1998.
- Brierley, P. Symptom in the florists hydrangea caused by tomato ringspot virus and an unidentified sap-transmissible virus. **Phytopathology**, St. Paul, v.44, p.696-699, 1954.
- Brierley, P. & Lorentz, P. *Hydrangea ringspot virus*, the probable cause of 'running out' of the florist's hydrangea. **Phytopathology**, St. Paul, v.47, p.39-43, 1957.
- Hollings, J. Hydrangea ringspot in Britain. **Journal of Horticultural Science**, Warwick, v.33, p.275-281, 1958.
- Hughes, P.L.; Lawrence, J.E.; Scott, S.W. The complete nucleotide sequence of *Hydrangea ringspot virus*. **Archives of Virology**, Heidelberg, v.150, n. 150, p.2339-2345, 2005.
- Kendall, A.; Bian, W.; Junn, J.; McCullough, I.; Gore, D.; Stubbs, G. Radial density distribution and symmetry of a *Potexvirus*, narcissus mosaic virus. **Virology**, Amsterdam, v. 357, n.2, p.158-164, 2007.
- Koenig, R. Anomalous behavior of the coat proteins of potato virus X and cactus virus X during electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-containing polyacrylamide gels. **Virology**, Amsterdam, v.50, n.1, p. 263-266, 1972.
- Koenig, R. **Hydrangea ringspot virus**, 1973. Disponível em: <<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=114>> Acesso em 23 Aug. 2008.
- Lorenzi, H.; Souza H. M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3. ed. rev. e ampl. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2001. 1088p.
- Plantas e flores. São Paulo, Abril Cultural, 1988. 159 p.
- Yuki, V.A ; Chagas, C.M. ; Hojo, H. ; Kato, S.M. ; Yabase, M.K. ; Kuniyuki, H. Provável ocorrência de um Potexvirus em *Hydrangea macrophylla*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP. V. 31, p. 97-98, 2005. (Resumo).