

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

PROPRIEDADES DE ISOLADOS VIRAIS DE *SACCHARUM* SPP. CAUSADORES DE MOSAICO EM CANA-DE-AÇÚCAR NO PARANÁ E SÃO PAULO

A.A.L. Barboza, E.R. Souto, P.R. Carnellosi, F.S. Marcuz, M.A. Marrafon

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Agronomia, Av. Colombo, 5790, CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil. E-mail: ersouto@uem.br

RESUMO

Os vírus causadores do mosaico da cana-de-açúcar encontram-se disseminados em todas as regiões canavieiras do mundo, podendo infectar culturas de milho, sorgo e outras gramíneas. Este trabalho teve como objetivo determinar as propriedades de isolados paranaenses dos clones de cana-de-açúcar RB925268 e RB945950, e compará-los com isolados das variedades RB72454 e SP86-155 do Estado de São Paulo. Foram observadas variações na severidade, e no tempo necessário para a manifestação dos sintomas nas plantas inoculadas com cada isolado. Através da reação de RT-PCR com oligonucleotídeos para o SCMV, obteve-se a amplificação de fragmentos com aproximadamente 900 pb da ORF codificadora da proteína capsial. O padrão de RFLP resultante do tratamento dos produtos de RT-PCR com a enzima *Hinfl* revelou variações na seqüência de nucleotídeos, indicando que possam existir diferentes estirpes do SCMV entre os isolados.

PALAVRAS-CHAVE: SCMV, *Potyvirus*, RT-PCR.

ABSTRACT

PROPERTIES OF VIRUS ISOLATES FROM *SACCHARUM* SPP. CAUSING MOSAIC IN SUGARCANE IN PARANÁ AND SÃO PAULO STATES, BRAZIL. Viruses associated with sugarcane mosaic are disseminated in all sugarcane producing areas, and also may infect maize, sorghum and other gramineous plants. The objective of this study was to determine some properties of two virus isolates causing mosaic in the sugarcane clone RB925268 and RB945950, from the state of Paraná, compared to those of isolates from sugarcane varieties RB72454 and SP86-155 from the state of São Paulo, Brazil. The symptom severity and the time of their appearance differed for each isolate in the inoculated plants. RT-PCR reactions with SCMV specific primers allowed for the amplification of 900-bp fragments of the virus coat protein open reading frame (ORF). The restriction fragment length polymorphism pattern (RFLP) obtained with *Hinfl* treatment of the RT-PCR products revealed nucleotide sequence variations indicating there could be different SCMV strains among these isolates.

KEY WORDS: SCMV, *Potyvirus*, RT-PCR.

O mosaico é uma das principais doenças da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), podendo ser causado por um subgrupo de quatro espécies distintas de *Potyvirus* que infectam diferentes poáceas: *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), espécie que dá nome ao complexo viral do SCMV; *Sorghum mosaic virus* (SrMV); *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV); e *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV), (SHUKLA *et al.*, 1994). Recentemente, a espécie *Zea mosaic virus* (ZeMV), isolada de milho, foi proposta como um novo membro do subgrupo (SEIFERS *et al.*, 2000).

Como os vírus da cana-de-açúcar podem infectar outras gramíneas como milho (COSTA *et al.*, 1971) e sorgo (PINTO, 1984), a utilização de novas cultivares introduzidas no Brasil, e o plantio na entre safra,

podem contribuir para o aumento da incidência do mosaico nessas culturas (FERNANDES; OLIVEIRA, 1997).

Este trabalho teve como objetivo identificar dois isolados virais de clones de cana-de-açúcar cultivados numa área experimental do Paraná, e compará-los com dois isolados obtidos de um plantio comercial do Estado de São Paulo.

Folhas de cana-de-açúcar dos clones RB925268 e RB945950 cultivados no Município de São Tomé, PR, e folhas das variedades RB72454 e SP86-155, provenientes do Município de Piracicaba, SP, com sintomas de mosaico, foram utilizadas nas inoculações mecânicas de *Sorgo bicolor* cv. Rio, para manutenção e propagação dos vírus. Gramíneas de diferentes espécies foram inoculadas com o inóculo preparado de

folhas de sorgo maceradas e trituradas em um liquidificador, na presença de tampão fosfato de sódio (Na_2HPO_4) e potássio (KH_2PO_4) 0,05 M e pH 7,0, mais 1,3% de sulfito de sódio (Na_2SO_3). As plantas inoculadas foram mantidas em estufa plástica, e observadas durante 10 a 50 dias após a inoculação.

Secções ultrafinas de folhas de sorgo 'Rio' com mosaico foram examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM900, onde também foram observadas as reações de imunoabsorção (ISEM) utilizando anti-soros policlonais para o SCMV e SrMV, segundo procedimentos previamente descritos (KITAJIMA, 1965; MILNE; LESEMANN, 1978).

Para extração dos RNAs totais de plantas infectadas, foram utilizados 100 mg de tecido fresco de sorgo 'Rio' triturado em nitrogênio líquido, conforme o protocolo de extração do RNeasy® Plant Kit (Qiagen®). Para a síntese do cDNA foi utilizado o protocolo descrito por YANG; MIRKOV (1997), com modificações, adicionando-se em um microtubo 4 μL do RNA total obtido de plantas infectadas, 4 μL da solução (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) do oligonucleotídeo hexamero randômico pd(N)₆ - INVITROGEN™, 6 μL do tampão de transcrição reversa 10x (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 2 μL de dNTP mix (10 mM), 3 μL de água tratada com DEPC, seguido de um aquecimento a 65° C durante 5 min, e resfriamento no gelo por 1 min, adicionando-se 4 μL de MgCl_2 (25 mM), 2 μL de DTT (0,1 M) e 1 μL de RNase out, levemente misturados e centrifugados, e incubados a 25° C por 2 min, acrescentando-se 2 μL da enzima transcriptase reversa do M-MLV (Invitrogen®), e 6 μL de água tratada com DEPC com aquecimento a 25° C durante 10 min, e a 42° C por 50 min. Para o PCR foi utilizado 5 μL do cDNA, e adicionado 5 μL de tampão 10X PCR-Buffer (0,5 M Tris-HCl; 0,7 M KCl; 0,1 M MgCl_2 pH 8,0), 3 μL de MgCl_2 (25 mM), 2 μL dNTP mix (10 mM) e, 2 μL dos oligonucleotídeos SCMV-F (5'-CCCTCTAGATTTTCA CCAAGCTGGAA-3') e SCMV-R (5'-CCCAAGCTTAGCTGTGTGTCTCTCTGTAT TCTC-3') (desenvolvidos pelo Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba, SP), cujas seqüências são similares às dos oligonucleotídeos SCMV-F3 e SCMV-R3 de YANG; MIRKOV (1997), e 2 μL dos oligonucleotídeos SrMV-F3 e SrMV-R3 (YANG; MIRKOV, 1997), específicos para amplificação dos genes da capa protéica do SCMV e do SrMV, respectivamente. As reações foram conduzidas em um termociclador BIOMETRA®, programado para um ciclo de 94° C (1 min), quarenta ciclos de 94° C (1 min), 55° C (1 min), e 72° C (1 min), seguido de um único ciclo de 72° C (7 min). Uma alíquota de 10 μL do produto de RT-PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose (1,2%). Os padrões de RFLP gerados pelo tratamento dos produtos de RT-PCR com as enzimas de restrição *TaqI* e *HinfI* foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,7%.

Os sintomas induzidos pelos isolados das variedades RB72454 e SP86-155 foram mais severos, surgindo 5 dias antes dos sintomas causados pelos isolados do Paraná, os quais se manifestaram entre 10 e quinze dias após a inoculação. As cultivares de sorgo 'Rio', 'TX 398B', 'Brandes BR 501', de milho 'K 75', 'AMS 22', e a cultivar de milho pipoca 'IAC 112', mostraram-se susceptíveis aos quatro isolados. Porém, as cultivares de sorgo 'TX632B' e milho 'BR106' apresentaram sintomas de mosaico, apenas quando inoculadas com os isolados de RB72454 e SP86-155 de São Paulo, enquanto a variedade de milho pipoca 'UEL/PRO25' apresentou sintomas apenas quando inoculada com o isolado de RB72454.

Em São Paulo, vários isolados da cana-de-açúcar, milho e sorgo, do SCMV, foram identificados, sendo que um deles quebrou a resistência da variedade RB72454, a mais cultivada no país (GONÇALVES *et al.*, 2007). Neste trabalho, os isolados de RB72454 e de SP86-155, provenientes de São Paulo, mostraram-se mais agressivos que os isolados do Paraná, causando avermelhamento e necrose em sorgo 'Rio' (Tabela 1).

As análises de microscopia eletrônica revelaram partículas alongadas e levemente flexuosas típicas de *Potyvirus*, e nas reações de imunoabsorção (ISEM) o anti-soro para o SCMV não reagiu com material infectado. Por outro lado, houve fraca reação do anti-soro para o SrMV contra todos os isolados testados.

De modo semelhante, nos ensaios realizados por GONÇALVES *et al.* (2007), um isolado do SCMV também não pôde ser detectado nos testes DAS-ELISA com um anti-soro comercial para essa espécie. Segundo HOLLINGS; BRUNT (1981), diferentes estirpes de uma mesma espécie de *Potyviridae* podem ser tão distantemente relacionados sorologicamente quanto elas são de outras espécies da família. Portanto, a inconsistência verificada nos testes sorológicos não é incomum, e a sorologia, muitas vezes, apresenta-se insatisfatória na identificação de membros da família *Potyviridae* (SHUKLA *et al.*, 1994).

Nos ensaios de RT-PCR foram obtidos fragmentos de aproximadamente 900 pb com os oligonucleotídeos SCMV-F e SCMV-R (Fig. 1). E não ocorreram amplificações com os oligonucleotídeos SrMV-F3 e SrMV-R3 nos testes realizados.

Embora o SrMV e o SCMV sejam os mais encontrados nas infecções naturais da cana-de-açúcar, até o momento apenas o SCMV pôde ser identificado no Brasil, e em países africanos (GONÇALVES *et al.*, 2007; ALEGRIA *et al.*, 2003). Todavia, nos Estados Unidos, em levantamentos na Louisiana, mais de 90% das amostras encontradas foram das estirpes I e H do SrMV, demonstrando que naquele país este vírus vem assumindo importância crescente como causador do mosaico da cana-de-açúcar (GRISHAM; PAN, 2003).

Tabela 1 - Reações das hospedeiras à inoculação mecânica dos isolados virais provenientes das variedades RB72454 e SP86-155, e dos clones RB925268 e RB945950 de cana-de-açúcar.

Hospedeiras	Isolados			
	RB925268	RB945950	RB72454	SP86-155
<i>Avena strigosa</i>	-	-	-	-
<i>Brachiaria decumbens</i>	-	-	-	-
<i>Brachiaria brisanta</i>	-	-	-	-
<i>Sorghum bicolor</i>				
cv. Rio	M (*)	M	M, A, N	M, A, N
cv. TX 398B	ML	ML	ML	M
cv. TX 623B	-	-	M	M
cv. Brandes BR 501	ML	M	M	M
cv. SC 283	-	-	-	-
<i>Zea mays</i>				
cv. 30F90	-	-	-	-
cv. IPR 119	-	M	M	M
cv. IPR 114	M	M	M	M
cv. AG 7000	-	-	-	-
cv. BR 106	-	-	M	M
cv. K 75	M	ML	M	M
cv. AMS 22	M	ML	M	M
cv. CMS 39	-	-	-	-
cv. PENTA	-	-	-	-
cv. IAC AL-25	-	-	-	-
cv. Pipoca IAC 112	M	M	M	M
cv. Pipoca UEM J1	-	ML	ML	ML
cv. Pipoca UEL/PRO25	-	-	M	M
cv. Pipoca VIÇOSA	ML	-	ML	ML
cv. Pipoca Beija-flor	-	ML	M	M

(*) M: mosaico sistêmico; ML: mosaico leve; A: avermelhamento; N: necrose (-) ausência de sintomas.



Fig. 1 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação por RT-PCR de aproximadamente 900 pb da região 5'-terminal da capa protéica viral, com os oligonucleotídeos SCMV-F e SCMV-R. (1) Isolado de RB925268; (2) Isolado de RB945950; (4) Isolado de RB72454; (5) Isolado de SP86-155, (3 e 6) Cana-de-açúcar sadia e (M) DNA Ladder 100pb.

O padrão de RFLP gerado pelo tratamento dos produtos de RT-PCR, com as enzimas *TaqI* e *HinI*, confirmou que os isolados de RB72454 e SP86-155 são da mesma estirpe (Fig.2), como indicado pela semelhança na severidade de sintomas em hospedeiras inoculadas com estes isolados (Tabela 1). Foi observado ainda, que os padrões de bandas das enzimas *TaqI* e *HinI* diferiram dos padrões para as estirpes americanas A, B, D e E do SCMV, com base na técnica de RT-PCR-RFLP utilizada por YANG; MIRKOV (1997) com estas enzimas. Com base no polimorfismo de bandas da enzima *HinI*, podemos suspeitar que os isolados do Paraná não sejam da mesma estirpe, embora os sintomas induzidos por ambos tenham sido muito semelhantes.

Isolados do SCMV já seqüenciados no Brasil apresentaram maior proximidade com a estirpe SCMV-Brisbane da Austrália, com identidade variando de 78 a 96% (GONÇALVES *et al.*, 2007). Neste trabalho, a análise por RFLP dos isolados brasileiros com as enzimas de restrição *TaqI* e *HinI* resultaram em padrões de polimorfismo diferentes dos obtidos para isolados americanos do SCMV. Estes resultados evi-

denciam a estreita correlação existente entre as estirpes do SCMV e suas localizações geográficas, o que deve ser considerado nos programas de melhoramento e de biotecnologia, visando a resistência da cana-de-açúcar ao mosaico.

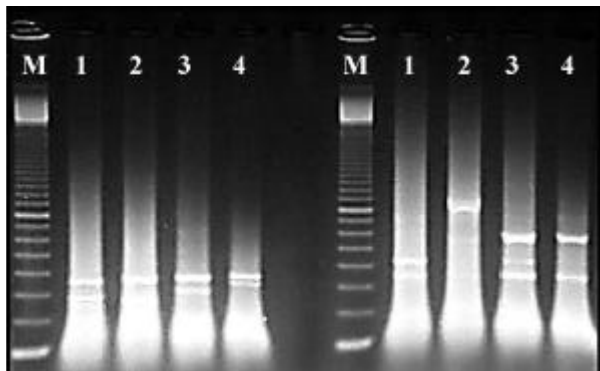


Fig. 2 – Padrões de RFLP obtidos com a digestão enzimática dos produtos de RT-PCR com as enzimas de restrição *TaqI* e *HinI*, de isolados de cana-de-açúcar: (1) isolado de RB925268; (2) isolado de RB945950; (3) isolado de RB72454; (4) isolado de SP86-155. (M) DNA Ladder 100pb.

Isto também reforça a necessidade do uso de medidas quarentenárias para o movimento e troca de germoplasma para evitar a introdução de novas estirpes do SCMV nas áreas de expansão da cana-de-açúcar, e destas para culturas de sorgo e milho.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Elliot W. Kitajima (NAPA-Esalq) por facilitar o uso do microscópio eletrônico. Ao Dr. Marcos C. Gonçalves (Instituto Biológico) pela cessão dos antissoros, e ao Dr. Álvaro Sangüino (CTC) pelo fornecimento dos isolados do SCMV do Estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS

ALEGRIA, O.M.; ROYER, M.; BOUSALEM, M.; CHATENET, M.; PETERCHMITT, M.; GIRARD, J.C.; ROTT, P. Genetic diversity in the coat protein coding region of eighty-six sugarcane mosaic virus isolates from eight countries, particularly from Cameroon and Congo. *Archives of Virology*, v.148, p. 357-372, 2003.

COSTA, A.S.; KITAJIMA, E.W.; ARRUDA, S.C. Moléstias de vírus e de micoplasmas do milho em São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*, v.4, p.39-41, 1971.

FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. *Principais doenças na cultura do milho*. Brasília: EMBRAPA, 1997. (Circular Técnica n.26).

GONÇALVES, M.C.; SANTOS, A.S.; MAIA, I.G., CHAGAS, C.M.; HARAKAVA, R. Caracterização de um isolado do Sugarcane mosaic virus que quebra a resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, p.32-39, 2007.

GRISHAM, M.P.; PAN, Y. Identification of virus isolates causing mosaic of sugarcane in Louisiana. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT PATHOLOGY, 8., 2003, Christchurch, New Zealand. *Abstracts*. Christchurch: 2003. p.308.

HOLLINGS, M.; BRUNT, A.A. Potyviruses. In: KURSTAK, E. (Ed.). *Handbook of plant virus infections: comparative diagnosis*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland, 1981. p.731-807.

KITAJIMA, E.W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. *Journal of Electron Microscopy*, v. 14, p.119-121, 1965.

MILNE, R.G.; LESEMANN, D.E. Na imuno-electron microscope investigation of oat sterile dwarf and related viruses. *Virology*, v.90, p.299-304, 1978.

PINTO, N.F.J.A. *Vírus do mosaico comum da cana-de-açúcar em sorgo (Sorghum bicolor (L.) Moench): caracterização de isolados, reação de cultivares e herança de resistência*. Piracicaba: 1984. 136p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Univ. São Paulo, Piracicaba, 1984.

SEIFERS, D.L.; SALOMON, R.; MARIE-JANE, V.; ALLIOT, B.; SIGNORET, P.; HABER, S.; LOBODA, A.; ENS, W.; SHE, Y.-M.; STANDING, K. G. Characterization of a novel potyvirus isolated from maize in Israel. *Phytopathology*, v.90, p.505-513, 2000.

SHUKLA, D.D.; WARD, C.W.; BRUNT, A.A. The *Potyviridae*. In: CAB International. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. p.360-371.

YANG, Z. N.; MIRKOV, T. E. Sequence and relationships of sugarcane mosaic and sorghum mosaic virus strains and development of RT-PCR-based RFLPs for strains discrimination. *Phytopathology*, v.87, p.932-939, 1997.

Recebido em 6/3/07

Aceito em 14/3/08