

Detecção do *Sugarcane mosaic virus* no Paraná e Limpeza Somaclonal por Cultura de Tecidos

Antônio A.L. Barboza, Hélio M. Silva Júnior, Eliezer R. Souto, Cláudio M. Silva,
Fernanda S. Marcuz & Rafael A. Vieira

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

Autor para correspondência: Eliezer R. Souto

BARBOZA, A.A.L., SILVA JÚNIOR, H.M., SOUTO, E.R., SILVA, C.M., MARCUZ, F.S. & VIEIRA, R.A. Detecção do *Sugarcane mosaic virus* no Paraná, e limpeza somaclonal por cultura de tecidos. *Fitopatologia Brasileira* 32:345-348. 2007.

RESUMO

Um isolado do *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) causando sintomas de mosaico em plantas de cana-de-açúcar do clone RB925268 foi identificado no estado do Paraná. Gemas axilares extraídas de colmos infectados, medindo de 4 a 8 mm, foram utilizadas como explantes e regeneradas em plântulas em meio de cultura MS, suplementado ou não com o antiviral ribavirina, nas concentrações variando de 10-60 mg/L. O efeito fitotóxico da ribavirina foi constatado, resultando na morte dos explantes em concentrações iguais ou superiores a 30 mg/L. Após seis meses de aclimação das plantas em estufa plástica, o vírus não foi detectado nas plantas provenientes do meio MS contendo ribavirina na concentração de 25 mg/L, confirmado através dos ensaios de inoculação mecânica em sorgo 'Rio' e de RT-PCR.

Palavras-chave adicionais: micropropagação, virazole.

ABSTRACT

Detection of *Sugarcane mosaic virus* in Paraná state and virus elimination by tissue culture

An isolate of *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) associated with mosaic symptoms in the RB925268 sugarcane clone was identified in Paraná state. Axillary buds of 4 to 8 mm used as explants were regenerated into plantlets using MS medium with and without ribavirin antiviral, at concentrations of 10 to 60 mg/L. Ribavirin was toxic to sugarcane at all concentrations, resulting in plant death at concentrations of 30 mg/L or higher. The complete elimination of SCMV was obtained in MS medium with 25 mg/L ribavirin concentration, confirmed by sap inoculation into *Sorghum bicolor* cv. Rio and by RT-PCR.

Additional keywords: micropropagation, virazole.

A cana-de-açúcar (*Saccharum* L. híbridos interespecíficos) é vulnerável a diversas doenças disseminadas pelo uso de colmos contaminados, sendo que a monocultura em extensas áreas favorece o surgimento de epidemias. A planta matriz pode se mostrar infectada sem apresentar qualquer sintoma externo, aumentando os riscos de disseminação de doenças para novas áreas (Chatenet *et al.*, 2001).

Um complexo de vírus está associado ao mosaico em diferentes espécies de Poacea, do qual fazem parte o SCMV, o *Sorghum mosaic virus* (SrMV), o *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), o *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) (Shukla *et al.*, 1994), e o *Zea mosaic virus* (ZeMV) (Seifers *et al.*, 2000), pertencentes ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*. O mosaico da cana-de-açúcar ocorre em mais de 70 países, sendo que apenas o SCMV e o SrMV podem infectar cana-de-açúcar em condições naturais (Alegria *et al.*, 2003).

A eliminação de vírus de plantas de material propagativo tem sido obtida através de três métodos principais: termoterapia, quimioterapia e cultura de tecidos (Grout, 1999). A cultura de tecidos da cana-de-açúcar tem sido utilizada pelos programas de melhoramento devido à

redução no tempo de multiplicação de clones e de variedades promissoras, facilitando a rápida obtenção de grandes quantidades de material propagativo do genótipo de interesse, além da eliminação de um grande número de patógenos (Hendre *et al.*, 1983). A ribavirina (1- β -D-ribofuranosil-I, 2,4-triazole-3-carboxamida), análogo da guanossina, é um composto antiviral de amplo espectro que interfere na rota biossintética da guanossina 5'-fosfato, interrompendo a síntese do RNA e de DNA nas células infectadas, inibindo desse modo a replicação viral nos tecidos infectados (Sidwell *et al.*, 1972). No presente trabalho é relatada a detecção de um isolado do SCMV no clone RB925268, e a sua eliminação de plantas micropropagadas em meio de cultura MS, suplementado ou não com o antiviral ribavirina.

Folhas de plantas de cana-de-açúcar do clone RB925268 cultivadas numa área experimental do município de São Tomé, Paraná, e com sintomas de mosaico, foram utilizadas em inoculações mecânicas de mudas de sorgo 'Rio' para manutenção do isolado viral. Posteriormente, o inóculo obtido dessas plantas foi utilizado em inoculações mecânicas de espécies de *Brachiaria*, cultivares de sorgo e milho, *Avena strigosa*, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Datura stramonium* e *Nicotiana tabacum*. Plantas dessas

mesmas espécies também foram inoculadas com um isolado do SCMV da variedade RB72454, proveniente do Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba, São Paulo (CTC). Após a manifestação de sintomas, folhas de sorgo 'Rio' foram examinadas por microscopia eletrônica de imunoadsorção (ISEM) com um anti-soro policlonal produzido para um isolado americano do SrMV. Foram extraídos RNAs totais de 100 mg de folhas de sorgo 'Rio' conforme o protocolo descrito por Yang e Mirkov (1997) com modificações, a partir de plantas submetidas à inoculação com os isolados de SCMV do clone RB925268 e da variedade RB72454. Para a síntese de cDNA, foram utilizados 10 µL de RNAs totais obtidos nas extrações foliares, adicionados a 4 µL da solução (10 µg/µL) do oligonucleotídeo hexamero randômico pd(N)6, seguido de um aquecimento a 80°C por 3 min, e resfriamento em gelo. A seguir foram adicionados 6 µL do tampão de transcrição reversa 10x (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 2 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL da mistura de dNTPs (10 mM de cada), 2 µL de DTT (0,1M) e 2 µL da enzima transcriptase reversa do M-MLV (Invitrogen®) (50 U/µL). Finalmente foram adicionados 6 µL de água tratada com DEPC. As amostras foram incubadas a 25°C por 10 min e a 42°C por 50 min. As soluções de PCR foram preparadas em um volume total de 40 µL, contendo 1 µL da mistura de dNTPs (10 mM cada), 0,5 µL de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen®) (5 U/µL), 5 µL de tampão PCR 10x (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 0,5 M KCl), 3 µL de MgCl₂ (25 mM), 5 µL do produto da síntese de cDNA, 21,5 µL de água destilada e deionizada, e 2 µL de cada oligonucleotídeo (10 µM). Foram utilizados os oligonucleotídeos SCMV-F (5'-CCCTCTAGATTTYCACCAAGCTGGAA-3', senso) e SCMV-R (5'-CCCAAGCTTAGCTGTGCTCTCTCTGTAATTCTC-3', anti-senso), utilizados no CTC para detecção do SCMV, e os oligonucleotídeos SrMV-F3 (senso) e SrMV-R3 (anti-senso), para detecção do SrMV (Yang & Mirkov, 1997). Estes oligonucleotídeos amplificam as ORFs (open reading frames) correspondentes às proteínas capsidiais desses vírus. Quarenta ciclos de reação foram conduzidos com desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C e extensão a 72°C, seguido de um ciclo de 72°C por 15 min. Alíquotas de 10 µL dos produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1,2%, corado com brometo de etídio (10 mg/mL).

Na cultura de tecidos foram utilizadas gemas axilares obtidas de colmos de cana-de-açúcar do clone RB925268, germinadas em bandejas com vermiculita e substrato Plantimax®. Meristemas com quatro folhas primárias foram extraídos e colocados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), e meio MS suplementado com 10-60 mg/L de Ribavirina®. Os ápices meristemáticos foram estabelecidos em tubos de ensaio mantidos a 25°C com fotoperíodo de 12 horas, e após trinta dias transferidos para frascos de cultivo mantidos nas mesmas condições. As plântulas crescidas (3-4 cm) foram transferidas para meio indutor de enraizamento contendo 0,1 mg/L do ácido α -naftalenoacético. Após 6 meses desde o início do processo, as plântulas com raízes

formadas foram transferidas para vasos plásticos, para desenvolvimento e aclimação em estufa plástica. Folhas dessas plantas foram utilizadas nos ensaios de transmissão mecânica experimental em sorgo 'Rio' e nos ensaios de RT-PCR, para confirmação da eliminação do vírus.

Foi observado que das espécies botânicas submetidas à inoculação, somente as poáceas apresentaram sintomas, sendo que o isolado da variedade RB72454 causou sintomas mais severos e com manifestação mais rápida em cana-de-açúcar, em comparação com o isolado do clone RB925268. Recentemente, um número expressivo de isolados do SCMV, obtidos de cana-de-açúcar, milho e sorgo, no Estado de São Paulo, foram identificados, sendo observado que um deles foi capaz de quebrar a resistência da variedade RB72454 (Gonçalves *et al.*, 2007), causando sintomas severos, semelhantes aos induzidos pelo isolado proveniente de São Paulo, utilizado neste trabalho. Os exames de ISEM com adsorção de anti-soro para o SrMV mostraram uma reação fraca contra o isolado da variedade RB72454 e contra o isolado do clone RB925268 (Figura 1B). Todavia, com base apenas neste resultado não foi possível concluir que os isolados testados são da espécie SrMV, uma vez que os relacionamentos sorológicos baseados na proteína da capa de potyvírus são complexos, sendo comum a ocorrência de relacionamentos sorológicos entre espécies distintas e ausência de reações cruzadas entre estirpes (Shukla *et al.*, 1994). No entanto, as reações de RT-PCR amplificaram consistentemente, bandas de aproximadamente 940 pb, apenas com o par de oligonucleotídeos para o SCMV (Figura 2 e 3).

As plântulas regeneradas nos meios contendo 10 a 25 mg/L de ribavirina se mostraram raquíticas, amareladas e deformadas. Ao final de 5 meses de cultivo *in vitro*, uma quantidade reduzida de plântulas sobreviveu, sendo necessária uma nova repicagem final para a obtenção de mudas, que foram aclimatadas em estufa plástica durante 6 meses (Tabela 1, A-E).

Foi constatada a eliminação do SCMV de 97 a 100% das plantas micropropagadas no meio MS

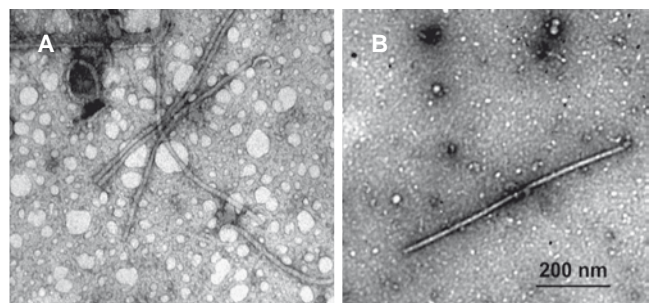


FIG. 1 - Eletrofotomicrografia de folhas de *Sorghum bicolor* cv Rio infectadas, contrastadas negativamente com acetato de uranila a 1%. **A.** Partículas alongadas e flexuosas em sorgo inoculado com o isolado da variedade RB72454; **B.** Microscopia eletrônica de imunoadsorção (ISEM), com anti-soro para o SrMV em sorgo inoculado com o isolado do clone RB925268.

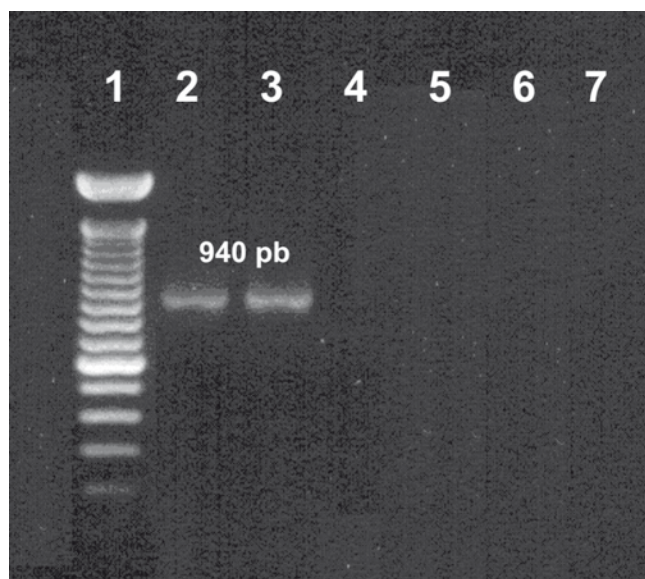


FIG. 2 - Resultados das reações de RT-PCR: **(2) e (3)** - Amplificações com os oligonucleotídeos SCMV-F e SCMV-R, para o SCMV, em amostras de sorgo 'Rio' inoculadas com os isolados da variedade RB72454 e do clone RB925268. **(4) e (5)** - Ausência de amplificações com os oligonucleotídeos SrMV-F3 e SrMV-R3, para o SrMV. **(6) e (7)** - Sorgo sadio testado com os pares de oligonucleotídeos para o SCMV e SrMV. **(1)** - DNA marcador de 100 pb.

suplementado com ribavirina nas concentrações de 20-25 mg/L. Nas concentrações de 10-15 mg/L, a porcentagem de plantas saudáveis ficou próxima à do controle, 60%, e as plântulas mantidas em meio MS contendo ribavirina nas

concentrações superiores a 25 mg/L não sobreviveram (Tabela 1). Hendre *et al.* (1983) relataram a eliminação do SCMV de plantas de cana-de-açúcar infectadas partindo-se de ápices meristemáticos medindo de 0,3 a 1 mm em meio de cultura, sem a adição de ribavirina. Neste experimento foram utilizados meristemas medindo de 5 a 8 mm, com o objetivo de facilitar a regeneração de um maior número de explantes, assegurando-se a eliminação viral com a adição de ribavirina ao meio de cultura.

Existem relatos de sucesso na eliminação de um número expressivo de vírus de plantas com o uso de ribavirina, incluindo o *Potato virus X* (PVX) e o *Potato virus Y* (PVY) (Klein & Livingston, 1983) na concentração de 10 mg/L, e na eliminação do *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) (Toussaint *et al.*, 1993) na concentração de 35 mg/L. Neste experimento o antiviral mostrou-se eficiente na eliminação do SCMV na concentração de 25 mg/L, porém seu efeito tóxico resultou em distúrbios fisiológicos que se refletiram na morte de um expressivo número de plântulas. Utilizando diferentes métodos de micropropagação *in vitro*, com e sem a adição de ribavirina, Parmessur & Saumtally (2001) não obtiveram sucesso na eliminação do *Sugarcane bacilliform virus* (SCBV), gênero *Badnavirus*, família *Caulimoviridae*, de explantes de cana-de-açúcar. Todavia, conseguiram eliminar o *Sugarcane yellow leaf virus*, gênero *Polerovirus*, família *Luteoviridae*, em meio MS sem ribavirina. Estes resultados poderiam reforçar a hipótese de que a alta concentração hormonal possa interferir no metabolismo das células meristemáticas em cultura, com reflexos na taxa de replicação viral, resultando até na eliminação completa de determinados vírus (Barlass & Skene, 1982).

TABELA 1 - Efeito de diferentes concentrações de ribavirina em meio MS, na sobrevivência *in vitro* de plântulas de cana-de-açúcar do clone RB925268, e porcentagem de eliminação do SCMV. (A,B,C,D e E) – Número final de plântulas após a repicagem dos sobreviventes para meio de enraizamento e aclimação em estufa plástica

Meio MS + Ribavirina (mg/L)	Nº de explantes estabelecidos	Sobreviventes após 1 mês	Sobreviventes após 2 meses	Sobreviventes após 3 meses	Sobreviventes após 4 meses	Plântulas obtidas após 5 meses
10	59	19	19	10	07	185 ^A
15	60	19	17	09	07	170 ^B
20	66	16	11	08	06	42 ^C
25	53	14	10	07	06	35 ^D
30	57	09	04	-	-	-
Meio MS sem Ribavirina	10	10	9	9	9	275 ^E
		Meio MS + Ribavirina (mg/L)	Plantas com mosaico / Total de plantas *	Número de plantas saudáveis e % de Eliminação do SCMV		
		10	79/175	96 – 55% ^F		
		15	62/153	91 – 60% ^G		
		20	2/37	35 – 97% ^H		
		25	0/29	29 – 100% ^I		

(*) – Total de plantas sobreviventes após seis meses de aclimação em estufa plástica

(F, G, H) – Comprovação mediante a ausência de sintomas em mudas de sorgo 'Rio' submetidas à inoculação com o extrato foliar das plantas de cana-de-açúcar sobreviventes.

(I) – Comprovação mediante resultados negativos das reações de RT-PCR utilizando extratos foliares de plantas de cana-de-açúcar e inoculação em mudas de sorgo.

Embora a possibilidade de eliminação de fitopatógenos de tecidos meristemáticos seja uma vantagem da propagação vegetal *in vitro*, instabilidades fenotípicas são observadas em várias espécies micropropagadas, inclusive na cana-de-açúcar (Taylor *et al.*, 1995). Neste trabalho, conseguiu-se a eliminação do SCMV adicionando-se ou não ribavirina ao meio MS. Deste modo, a utilização de ribavirina na micropropagação da cana-de-açúcar não se mostra recomendável, considerando o seu efeito tóxico. Também, levando-se em conta a possibilidade do surgimento de variação somaclonal, comum nos procedimentos *in vitro*, a ribavirina poderia ser um fator extra a contribuir para o surgimento de variações fenotípicas na cana-de-açúcar, inviabilizando o seu uso.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. E.W. Kitajima (NAPA, ESALQ, Universidade de São Paulo), pelo auxílio nos exames de microscopia eletrônica, ao Dr. M.C. Gonçalves (Instituto Biológico de São Paulo) pela cessão do anti-soro para o SrMV, ao Dr. Álvaro Sanguinio (CTC), pelo fornecimento do isolado do SCMV da variedade RB72454 e à Dra. G. Correa (Blausiegel) pelo fornecimento de Ribavirina®.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEGRIA, O.M., ROYER, M., BOUSALEM, M., CHATENET, M., PETERSCHMITT, 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* 148:357-372. 2003.
- BARLASS, M. & SKENE, K.G.M. *In vitro* plantlet formation from *Citrus* species and hybrids. *Scientia Horticulturae* 17:333-341. 1982.
- CHATENET, M., DELAGE, C., RIPOLLES, M., IREY, M., LOCKHART, B.E.L. & ROTT, P. Detection of *Sugarcane yellow leaf virus* in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. *Plant Disease* 85:1177-1180. 2001.
- 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* 30:32-39. 2007.
- GROUT, B.W. Meristem tip culture for propagation and virus elimination. *Methods in Molecular Biology* 111:115-125. 1999.
- HENDRE, R.R., IVER, R.S., KOTWAL, M., KHUSPE, S.S. & MASCARENHAS, A.F. Rapid multiplication of sugarcane by tissue culture. *Sugar Cane* 1:5-8. 1983.
- KLEIN, R.E. & LIVINGSTON, C.H. Eradication of potato viruses X and S from potato shoot tip cultures with ribavirin. *Phytopathology* 73:1049-1050. 1983.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497. 1962.
- PARMESSUR, Y. & SAUMTALLY, A. Elimination of *Sugarcane yellow leaf virus* and *Sugarcane bacilliform virus* by tissue culture. AMAS 2001. Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius. 2001. pp. 127-133.
- 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 isolate from maize in Israel. *Phytopathology* 90:505-513. 2000.
- SHUKLA, D. D., WARD, C. W. & BRUNT, A. A. The Potyviridae. Centre for Agriculture and Biosciences International. Cambridge. Cambridge University Press. 1994. pp. 360-371.
- SIDWELL, R.W., HUFFAMN, J.H., KHARE, G.P., ALLEN, L.B., WITKOWSKI, J.T. & ROBINS, R.K. Broad-spectrum antiviral activity of virazole: 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* 177:705-706. 1972.
- TAYLOR, P.W.J., GEIJSKES, J.R., KO, H-L., FRASER, T.A., HENRY, R.J. & BIRCH, R.G. Sensitivity of random amplified polymorphic DNA analysis to detect genetic change in sugarcane during tissue culture. *Theoretical and Applied Genetics* 90:1169-1173. 1995.
- TOUSSAINT, A., KUMMERT, J., MAROQUIN, C., LEBRUN, A. & OGGEMS J. Use of virazole to eradicate *Odontoglossum* ringspot virus from *in vitro* cultures of *Cymbidium* sp. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 32:305-309. 1993.
- 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 strain discrimination. *Phytopathology* 87:932-939. 1997.

Recebido 12 Dezembro 2006 - Aceito 15 Junho 2007 - FB 6133