

5º Simpósio de Iniciação Científica - SICFIC

AVALIAÇÃO DA GAMA DE HOSPEDEIROS DE UM ISOLADO DO CHRYSANTHEMUM STUNT VIROID

OLIVEIRA, L. A de (IC)¹; EIRAS, M (O)²

1. Acadêmico de Eng. Agrônoma – FIC. Bolsista de Iniciação Científica do CNPq
2. Prof.º Doutor, Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia, Centro de Pesquisa de Sanidade Vegetal, Instituto Biológico/São Paulo – SP. email: eiras@biologico.sp.gov.br

RESUMO: Os viroides são os menores agentes fitopatogênicos. Constituídos por um RNA circular de fita simples com tamanho que varia de 248 a 401 nucleotídeos, são classificados, de acordo com propriedades biológicas e moleculares, em duas famílias: *Pospiviroidae* e *Avsunviroidae*. O chrysanthemum stunt viroid (CSVd), família *Pospiviroidae*, gênero *Pospiviroid*, é um patógeno de importância crescente nos cultivos de crisântemo (*Dendranthema* spp.), devido à sua elevada incidência e por causar quebra de produção. O CSVd é transmitido mecanicamente e pode induzir, em crisântemo, sintomas de quebra de coloração das flores e nanismo, o que afeta a comercialização. Porém, na maioria das vezes, as infecções transcorrem sem a indução de sintomas, contribuindo para a sua perpetuação e disseminação. O CSVd possui ampla gama de hospedeiros. Entretanto, pouco se conhece sobre as espécies de plantas que podem atuar como reservatórios do viroide no campo. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a gama de hospedeiros de um isolado brasileiro de CSVd por meio do desafio por inoculação mecânica das seguintes espécies da vegetação espontânea: *Bidens pilosa*, *Xanthium strumarium*, *Melampodium perfoliatum*, *Sonchus oleraceus*, *Solanum americanum*, *Nicandra physalodes*, *Raphanus raphanistrum* e *Portulaca oleracea*. As espécies semeadas foram inoculadas 15 dias após o transplante para acompanhamento da expressão de sintomas durante 30 dias. Os ácidos nucleicos foram extraídos, submetidos à RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para amplificação do genoma completo do CSVd e sequenciamento. As plantas inoculadas não expressaram qualquer tipo de sintoma e os resultados de RT-PCR foram negativos. Esses resultados confirmam que essas espécies de plantas, embora presentes nos cultivos de crisântemo, não constituem potenciais reservatórios do CSVd.

INTRODUÇÃO: Os viroides são sistemas genéticos constituídos por um RNA de fita simples, circular, com tamanho que varia de 248 a 401 nucleotídeos. Estes agentes sub-virais, até o presente momento, estão restritos ao Reino Vegetal. Diferentemente dos vírus de plantas, os viroides não codificam proteínas, o que os torna completamente dependentes da maquinaria de transcrição da célula hospedeira para cumprir as etapas do seu ciclo infeccioso (GOBATTO; EIRAS, 2017; EIRAS *et al.*, 2006).

Os viroides são classificados de acordo com suas propriedades biológicas e moleculares, critérios estabelecidos pelo ICTV (“Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus”), em duas famílias, *Pospiviroidae* e *Avsunviroidae*, distribuídas em oito gêneros e 32 espécies (GOBATTO; EIRAS, 2017). Os viroides da família *Pospiviroidae* replicam-se no núcleo das células hospedeiras e possuem estrutura secundária do tipo bastonete com cinco domínios: **C**- porção da molécula que abriga a região central conservada (CCR); **V**- região com a maior variabilidade genética entre viroides do mesmo gênero; **P**- porção da molécula associada à patogenicidade e indução de sintomas; **TR** (terminal direito) e **TL** (terminal esquerdo) - associados à replicação (EIRAS *et al.*, 2006). Os membros da família *Avsunviroidae* replicam-se nos cloroplastos, possuem estruturas ribozimáticas que permitem a auto-catálise das moléculas de ambas as polaridades e apresentam, normalmente, uma estrutura secundária bastante ramificada (EIRAS *et al.*, 2006).

Em geral, os sintomas induzidos pelos viroides são similares àqueles induzidos por vírus de plantas. Inclusive, inicialmente, algumas doenças que foram atribuídas a vírus, tiveram posteriormente seus agentes etiológicos identificados como viroides, a exemplo da exocorte dos citros, do afilamento do tubérculo da batatinha, do *cadang-cadang* do coqueiro e do nanismo do crisântemo (DIENER; RAYMER, 1967; HADIDI *et al.*, 2003; EIRAS *et al.*, 2006; 2009; SEMANCIK; WHEATHERS, 1972). Os viroides, portanto, podem induzir sintomas nas folhas como deformação, manchas cloróticas ou necróticas, epinastia, malformações e rugosidades, além de caneluras e necrose nos ramos e troncos de plantas perenes. Em função de estabelecerem uma íntima relação com o hospedeiro (parasitismo obrigatório), podem afetar o desenvolvimento das plantas, traduzidos em redução do crescimento (nanismo), queda prematura de flores, frutos e folhas e, em último caso, na morte da planta. Muitas vezes, porém, as infecções transcorrem sem a indução de sintomas perceptíveis, o que auxilia a perpetuação nos cultivos e o trânsito desses patógenos entre regiões, estados e países (HADIDI *et al.*, 2003). O trânsito informal de material propagativo infectado constitui-se como causa de disseminação

5º Simpósio de Iniciação Científica - SICFIC

dos viroides mundialmente. A enxertia e a transmissão mecânica são as principais vias de infecção no campo, principalmente por meio de instrumentos de poda e ferramentas utilizadas durante a execução de técnicas de manejo (HADIDI *et al.*, 2003).

O chrysanthemum stunt viroid (CSVd), família *Pospiviroidae*, gênero *Pospiviroid*, tem uma molécula de RNA com tamanho que varia de 354 a 356 nucleotídeos. Sua gama de hospedeiros é bastante ampla, englobando espécies de famílias botânicas de interesse econômico como: *Solanum tuberosum* (batatinha), *S. lycopersicum* (tomate), *Capsicum annuum* (pimentão), *Cucumis sativus* (pepino), bem como os gêneros *Dendranthema*, *Dahlia* e *Petunia* (plantas ornamentais) (GOBATTO; EIRAS, 2017; VERHOEVEN; HAMMOND; STANCANELLI, 2017). Contudo, ainda não se conhecem as espécies de plantas de vegetação espontânea que poderiam atuar como fontes de inoculo para disseminação do CSVd no campo. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a gama de hospedeiros de um isolado brasileiro de CSVd, por meio do desafio por inoculação mecânica das seguintes espécies da vegetação espontânea: *Bidens pilosa*, *Xanthium strumarium*, *Melampodium perfoliatum*, *Sonchus oleraceus* (Asteraceae), *Solanum americanum*, *Nicandra physalodes* (Solanaceae), *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae) e *Portulaca oleracea* (Portulacaceae).

MATERIAL E MÉTODOS:

OBTENÇÃO DAS PLANTAS E INOCULAÇÕES MECÂNICAS: As sementeiras foram realizadas em bandejas com substrato previamente esterilizado e, 15 dias após a emergência, as plântulas foram transplantadas para vasos contendo o mesmo substrato. Os extratos foliares foram preparados em almofariz previamente esterilizado em presença de tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,4, mais sulfito de sódio 0,5% e carborundum (abrasivo). Folhas de crisântemo infectadas por um isolado de CSVd [previamente caracterizado por Gobatto (2018)] foram utilizadas como fonte de inoculo. Foram inoculadas seis plântulas de cada espécie com cerca de 30 dias após a germinação, sendo duas mantidas como testemunhas, inoculadas apenas com o tampão e abrasivo. As plantas foram mantidas em casa de vegetação para o acompanhamento da expressão dos sintomas.

EXTRAÇÃO DE RNA: Trinta dias após as inoculações, folhas de cada espécie de planta avaliada foram coletadas e submetidas à extração de RNA utilizando reagente Trizol, de acordo com as recomendações do fabricante.

TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR): Cerca de 1 µg de RNA extraído (1 µL) foi transferido para um microtubo de 0,6 µL, acrescido de 1 µL (50 pmoles) do oligonucleotídeo antisense (RF-74) e água estéril e submetido a uma temperatura de 95°C durante 5 minutos seguido de imediato resfriamento em gelo. Posteriormente, foram adicionados 5 µL de tampão de enzima transcriptase reversa, 1 µL de dNTP (2,5 mM), 1 µL de enzima transcriptase reversa e 8 µL de água livre de RNases, sendo a mistura incubada por 60 minutos a 37°C. Após síntese do cDNA, a PCR foi realizada pela adição de 0,15 µL de enzima *Taq* DNA polimerase, 0,5 µL dNTP (2,5 mM), 0,5 µL de cada um dos oligonucleotídeos específicos para o CSVd (RF-74 e RF-75), além de 14,35 µL de água. A solução foi submetida a 30 ciclos em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc). Os oligonucleotídeos foram específicos para anelamento na região central conservada do viroide (CCR) para amplificação de 354 pb que correspondem ao seu genoma completo. Controles positivos e negativos foram empregados nas reações. Os fragmentos de DNA amplificados foram submetidos a uma eletroforese a 75 mA e 80 v por cerca de 1,5 h, em presença de brometo de etídeo, sendo o resultado visualizado sob luz ultravioleta.

RESULTADOS: Os resultados de RT-PCR foram negativos (Figura 1), ou seja, o viroide não foi detectado, sendo considerado incapaz de infectar as espécies de plantas avaliadas neste trabalho.



Figura 1- Resultado de análise eletroforética dos produtos de PCR para detecção do CSVd. M: marcador de DNA (100 pb); C (+): controle positivo constituído de RNA total extraído de planta infectada; C (-): controle negativo.

5º Simpósio de Iniciação Científica - SICFIC

As plantas inoculadas foram acompanhadas durante 30 dias e constatou-se que nenhuma delas expressou qualquer tipo de sintoma.

Plantas de vegetação espontânea afetam diretamente os cultivos de crisântemo por meio da competição por água, luz, nutrientes e gás carbônico. Algumas espécies possuem capacidade alelopática que inibe quimicamente o desenvolvimento de plantas adjacentes. Além disso, estas plantas podem atuar como hospedeiras de pragas e doenças de forma a facilitar sua disseminação no cultivo (TOMBOLATO, 2004). Recentemente, Gobatto (2018) avaliou, experimentalmente, por meio de inoculação mecânica e RT-PCR, as espécies *Oxalis latifolia* (trevo) e *Cardamine bonariensis* (agriãozinho) como potenciais hospedeiras do CSVd. Além disso, em coletas realizadas na região de Rio Negro, Antioquia, Colômbia, encontraram-se plantas de trevo apresentando mosaico e deformação foliar. Quando submetidas a RT-PCR e sequenciamento, confirmou-se que as plantas de agriãozinho inoculadas e os trevos, tanto inoculados quanto coletados no campo, são hospedeiros do CSVd. Esses resultados indicaram que essas espécies podem ter um importante papel como reservatório do viroide no campo (GOBATTO, 2018).

CONCLUSÕES: Embora algumas das plantas avaliadas neste trabalho sejam comuns nos cultivos de crisântemo, nenhuma delas atua como reservatório do CSVd. Isto é, para as estratégias de manejo da doença, as espécies avaliadas, em termos epidemiológicos, não desempenham papel importante como reservatório e fonte de inoculo do CSVd.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

DIENER, Theodor O.; RAYMER, W.B. Potato spindle tuber 'virus': a plant virus with properties of a free nucleic acid. **Science**, Washington DC, USA, v. 158, p. 378-381, 1967.

EIRAS, Marcelo et al. Viroides e Virusoides: Relíquias do Mundo de RNA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n.3, p. 229-246, maio. 2006.

EIRAS, Marcelo et al. Viroides em Citros. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 34, n. 5, p. 275-296, out. 2009.

EIRAS, Marcelo. Classes de non-coding RNAs. ncRNAs genômicos e parasitas: viroides, virusoides e satélites. In: PEREIRA, Tiago Campos (Organizador) **Introdução ao universo dos non-coding RNAs**. Ribeirão Preto, SP: Editora da Sociedade Brasileira de Genética, Capítulo II, Seção 9, p. 66-70. 2017.

GOBATTO, Danielle. **Chrysanthemum stunt viroid: diversidade genética, hospedeiras alternativas, interações viroide-hospedeiro e estudo do impacto no rendimento do crisântemo**. 2018. 131 p. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio)- Instituto Biológico, São Paulo, SP, 2018.

GOBATTO, Danielle; EIRAS, Marcelo. Viroides em ornamentais. In: V. ALEXANDRE, M. Amélia et al. **Plantas ornamentais: Doenças e Pragas**. 2. ed. São Paulo, SP: Devir, 2017. cap. 4, p. 171-199.

HADIDI, Ahmed et al. **Viroids**. Collingwood: Csiro Publishing, 2003. 370 p.

SEMANCIK, Joseph S.; WEATHERS, L. G. Exocortis disease: Evidence for a new species of "infectious" low molecular weight RNA in plants. **Nature New Biology**, Londres, Reino Unido p. 242-244, jun. 1972.

TOMBOLATO, Antonio Fernando C. **Cultivo Comercial de Plantas Ornamentais**. Campinas, SP: Instituto Agrônomo, 2004. 211 p.

VERHOEVEN, Jacobus T.H.J; HAMMOND, Rosemarie W.; STANCANELLI, Giuseppe. Economic Significance of Viroids in Ornamental Crops. In: HADIDI, Ahmed et al. (Org.). **Viroids and Satellites**. 1. ed. Oxford: Elsevier, 2017. p. 27-38.