

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



SANDRA MARIA MANSUR SCAGLIUSI

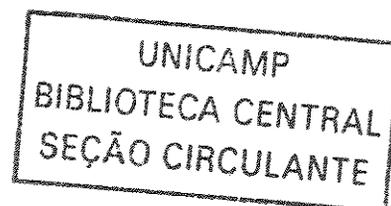
**VÍRUS DO AMARELECIMENTO FOLIAR DA  
CANA-DE-AÇÚCAR: CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO  
COMPARATIVO ENTRE VARIEDADES  
COM DIFERENTES RESPOSTAS À INFEÇÃO VIRAL**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Sandra Maria Mansur Scagliusi e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Jorge Vega

2003



i  
UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TI UNICAMP
	Sca 33v
V	EX
TOMBO BCI	56116
PROC.	16-124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	10/10/03
Nº CPD	

CM00190387-B

Bib. 302495

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA  
DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

<b>Sca33v</b>	<b>Scagliusi, Sandra Maria Mansur</b> Vírus do Amarelecimento Foliar da Cana-de-Açúcar: caracterização e estudo comparativo entre variedades com diferentes respostas à infecção viral / Sandra Maria Mansur Scagliusi. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.
	Orientador: Jorge Vega Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
	1. Cana-de-açúcar. 2. Diagnóstico. 3. Peroxidase. I. Vega, Jorge. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Data da Defesa:** 22/08/2003

**Banca Examinadora**

**Titulares:**

Prof. Dr. Jorge Vega (Orientador)



Prof. Dr. Ladaslav Sodek



Profa. Dra. Cláudia Regina Baptista Haddad



Prof. Dr. José Alberto Caram de Souza-Dias



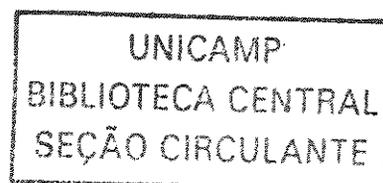
Prof. Dr. Valdir Atsushi Yuki



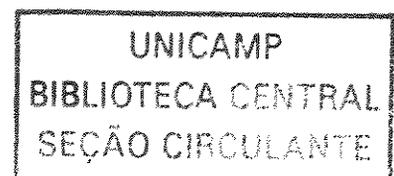
**Suplentes:**

Prof. Dr. Hugo Kuniyuki

Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato



Dedico esta tese à minha mãe, **Laila Mansur Scagliusi**  
e ao meu pai, **Vito Augusto Scagliusi** (*in memoriam*).



## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Jorge Vega, meu agradecimento especial, pela sempre segura orientação, paciência, por todos os conhecimentos transmitidos e pela amizade e incentivo.

Aos meus pais, Vito Augusto Scagliusi (*in memoriam*) e Laila Mansur Scagliusi, e aos meus irmãos, pelo amor, carinho e apoio incondicionais.

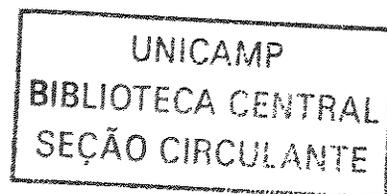
Aos professores Dr. Ladaslav Sodek, Dra. Cláudia Regina Baptista Haddad e Dr. José Alberto Caram de Souza-Dias, pela análise prévia do trabalho e pelas valiosas sugestões.

Aos professores, funcionários e demais colegas do Departamento de Fisiologia Vegetal pela convivência amigável e em especial ao Jorge.

À Universidade de Minnesota e ao professor Dr. Ben Lockhart que me permitiram realizar a primeira parte deste trabalho.

À UNICAMP, pela estrutura, e à agência de pesquisa CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

E em especial ao Dr. Eugênio César Ulian e à COPERSUCAR, pela concessão da bolsa de estudos do RHAEC/CNPq e aos demais funcionários da COPERSUCAR que sempre colaboraram para a realização deste trabalho.



## ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	A Síndrome do Amarelecimento Foliar da Cana-de-Açúcar.....	2
1.2.	Etiologia.....	8
1.3.	Características Gerais da Família <i>Luteoviridae</i> .....	10
1.4.	Métodos de Estudo e Diagnóstico dos Luteovirus.....	20
1.5.	Mecanismos de Resistência das Plantas em Resposta a Infecção por Patógenos.....	25
1.6.	Alterações Fisiológicas Associadas à Infecção Viral.....	29
2.	OBJETIVOS.....	32
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1.	Fonte de Vírus e Material Vegetal.....	33
3.2.	Testes de Transmissão do Vírus.....	34
3.3.	Purificação do Vírus.....	35
3.4.	Determinação da Densidade da Partícula Viral.....	37
3.5.	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	37
3.6.	Produção de Anti-Soro para o ScYLV.....	38
3.7.	Testes Serológicos.....	39
3.8.	RT – PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	41
3.9.	Análises Eletroforéticas da Proteína Viral.....	43
3.10.	Caracterização do Ácido Nucléico Viral.....	44
3.11.	Análises dos Açúcares Solúveis.....	44
3.12.	Determinações Enzimáticas – Atividade de Peroxidases.....	45
4.	RESULTADOS.....	47
4.1.	Caracterização do Vírus.....	47
4.1.1.	Testes de Transmissão do Vírus.....	47
4.1.2.	Purificação e Propriedades da Partícula Viral.....	48
4.1.3.	Caracterização da Proteína Viral.....	50
4.1.4.	Caracterização do Ácido Nucléico Viral.....	53
4.2.	Métodos de Diagnóstico.....	54
4.2.1.	Produção de Anti-Soro para o ScYLV.....	54
4.2.2.	Testes Serológicos.....	54
4.2.3.	Quantificação do ScYLV.....	56
4.2.4.	RT – PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	57
4.3.	Fisiopatologia.....	60
4.3.1.	Concentração do Vírus em Plantas de Cana-de-Açúcar Originadas no Campo.....	60
4.3.2.	Distribuição do Vírus em Folhas com Diferentes Idades em Variedades Sensíveis.....	61
4.3.3.	Açúcares Solúveis.....	64
4.3.3.1	Conteúdo de Açúcares nas Folhas de Diferentes Variedades.....	64
4.3.3.2	Distribuição de Açúcares em Folhas de Variedades Sensíveis com Diferentes Idades.....	67
4.3.4.	Atividade de Peroxidases.....	69
5.	DISCUSSÃO.....	73
5.1.	Etiologia e Caracterização.....	73
5.2.	Métodos de Diagnóstico e Relações Serológicas.....	79
5.3.	Fisiopatologia.....	82
6.	CONCLUSÕES.....	89
7.	LITERATURA CITADA.....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS

ELISA = Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

DAS-ELISA = Double Antibody Sandwich – ELISA

PTA-ELISA = Plate Trapped Antigen – ELISA

ISEM = Immuno Sorbent Electron Microscopy

SAFCA = Síndrome do Amarelecimento Foliar da Cana-de-Açúcar

YLS = Yellow Leaf Syndrome

VAFCA = Vírus do Amarelecimento Foliar da Cana-de-Açúcar

ScYLV = *Sugarcane yellow leaf virus*

BCTV = *Beet curly top virus*

BLRV = *Bean leafroll virus*

BWYV = *Beet western yellows virus*

BYDV = *Barley yellow dwarf virus*

BYV = *Beet yellow virus*

CMoV = *Carrot mottle virus*

PEBV = *Pea-early browning virus*

PLRV = *Potato leafroll virus*

PVX = *Potato virus X*

SbDV = *Soybean dwarf virus*

TMV = *Tobacco mosaic virus*

## RESUMO

A Síndrome do Amarelecimento Foliar da Cana-de-Açúcar é atualmente uma das principais preocupações da cultura canavieira no Brasil e em todos os países produtores desta gramínea. Em função da importância deste problema, muitos estudos foram realizados na tentativa de se descobrir o agente causal desta síndrome, originando controvérsias sobre a sua origem.

A fim de se obter dados que contribuíssem para um melhor conhecimento do problema, foram estudados neste trabalho a caracterização do seu agente causal, as formas de transmissão do agente causador, seu círculo de hospedeiras e alguns aspectos do comportamento fisiológico das variedades infectadas.

Os sintomas típicos da doença, que se iniciam com o amarelecimento da nervura, foram reproduzidos quando um vírus foi transmitido de plantas infectadas para plantas sadias de cana-de-açúcar, pelos afídeos *Melanaphis sacchari* e *Rhopalosiphum maidis*, indicando ser este vírus o agente causador da doença. Das espécies de plantas testadas com estes afídeos, apenas *Saccharum* sp. mostrou-se como hospedeira conhecida do vírus. Uma vez comprovada a etiologia viral desta doença, foi então identificado um luteovírus associado a esta síndrome e identificado como Vírus do Amarelecimento Foliar da Cana-de-Açúcar (*Sugarcane Yellow Leaf Virus* – ScYLV).

Testes de transmissão mecânica do vírus foram negativos. As propriedades das partículas virais foram obtidas através da purificação do vírus, cuja metodologia também foi estudada neste trabalho. Após otimização do método de purificação, as partículas virais mostraram um diâmetro aproximado de 25 a 28 nm, quando observadas ao microscópio eletrônico e contrastadas com ácido fosfotúngstico, pH 5,0, apresentando uma densidade de

1,30 g/cm<sup>3</sup> em gradiente de Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e um genoma de 5,8 kb (ssRNA). A proteína do capsídeo viral apresentou uma massa molecular relativa aproximada de 27 kDa e não era glicosilada.

Anticorpos policlonais contra o ScYLV foram produzidos em coelhos e detectaram eficientemente o vírus homólogo. Este mesmo anti-soro não detectou nenhum dos outros luteovirus utilizados, BYDV (*Barley Yellow Dwarf Virus*), PLRV (*Potato Leafroll Virus*), BWYV (*Beet Western Yellows Virus*) e BLRV (*Bean Leafroll Virus*), através dos testes serológicos de ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) e ISEM (ImmunoSorbent Electron Microscopy). Do mesmo modo, quando anti-soros preparados para estes luteovirus foram testados em plantas de cana-de-açúcar infectadas pelo ScYLV, os resultados também foram negativos. No entanto, além de sua detecção pelo anti-soro homólogo nos testes de ELISA e ISEM, o ScYLV também pôde ser detectado nos testes de Western-blot utilizando-se de anti-soro preparado para o isolado RPV do BYDV, sugerindo um grau limitado de relação serológica entre estes luteovirus. Foi concluído então, que o ScYLV é um luteovirus biologicamente e serologicamente distinto dos outros membros do grupo já descritos. Utilizando-se do anticorpo policlonal aqui produzido, a técnica de DAS-ELISA pôde então ser padronizada e usada rotineiramente para diagnóstico, após a produção específica de conjugado homólogo para este vírus.

Em relação à manifestação dos sintomas induzidos pela doença, foi observado que a expressão destes varia de acordo com a variedade infectada e com fatores climáticos. Foi estabelecido então, uma classificação provisória das variedades estudadas, baseada na manifestação dos sintomas apresentados, sendo: a) susceptíveis ou sensíveis à infecção pelo vírus, exibindo os sintomas da doença, b) tolerantes à infecção, podendo ou não apresentar sintomas e c) resistentes à infecção. Esta última categoria se referiu a plantas nas quais não foram detectadas partículas virais e que não apresentaram os sintomas da doença.

Dois métodos para detecção do vírus foram comparados, um serológico (DAS-ELISA) e outro molecular (RT-PCR), quando se observou que a especificidade e sensibilidade de ambos eram muito semelhantes. Em decorrência disto foi adotado então, o teste de DAS-ELISA, por ser este o de maior simplicidade.

A relação entre a concentração de partículas virais e a manifestação dos sintomas também foi avaliada, onde se verificou a inexistência de uma relação direta entre a primeira e a segunda. Um estudo complementar a este foi feito, para determinar a concentração de partículas virais em duas partes da folha, separando-se a nervura principal da lâmina foliar. O vírus foi detectado nestes tecidos através de DAS-ELISA, mostrando haver uma maior concentração na nervura, onde foram encontrados valores de absorbância até cinco vezes maiores, quando comparados com os valores de absorbância da lâmina foliar.

Os teores de açúcares solúveis foram analisados e observou-se um acúmulo destes, em especial da sacarose, mas somente em folhas de plantas infectadas pelo vírus e que expressavam os sintomas da doença, sendo que em plantas saudáveis ou infectadas sem sintomas este acúmulo não ocorreu. Visando esclarecer em qual parte da folha ocorreu o acúmulo de açúcares, análises cromatográficas da lâmina foliar e da nervura principal também foram feitas, onde foi observado que o acúmulo ocorreu principalmente na nervura.

Algumas alterações fisiológicas induzidas nas plantas pelo vírus, foram determinadas através da comparação da atividade enzimática de peroxidases, grupo de enzimas geralmente envolvido nas reações das plantas após a infecção por patógenos. Os resultados mostraram um claro aumento na atividade de peroxidases em plantas infectadas e exibindo os sintomas da doença, enquanto que as plantas saudáveis ou infectadas sem sintomas não diferiram entre si.

## SUMMARY

### **Sugarcane yellow leaf virus: characterization and comparative analyses between infected and non-infected sugarcane varieties**

A luteovirus was associated with the yellow leaf syndrome (YLS), a widespread disease of sugarcane (*Saccharum* sp.). The virus was named *Sugarcane Yellow Leaf Virus* (ScYLV), and was identified in major sugarcane-producing areas of the world. Typical disease symptoms were reproduced when ScYLV was transmitted by *Melanaphis sacchari* or *Rhopalosiphum maidis* from infected to healthy sugarcane, indicating that this virus is the causal agent of the YLS. The virus was only transmitted between sugarcane plants. Virions of ScYLV were 25 to 28 nm in diameter in sodium phosphotungstate at pH 5,0, had a buoyant density of 1,30 g/cm<sup>3</sup> in Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and contained a 5,8 Kb genomic ssRNA. The capsid protein had an estimated relative molecular mass of 27 kDa and was not glycosylated. A polyclonal rabbit antiserum raised against ScYLV did not detect any of four other luteoviruses by enzyme-linked immunosorbent assay or immunosorbent electron microscopy, but in immunoblot assays, antibodies to the RPV serotype of *Barley Yellow Dwarf Virus* detected the ScYLV. It was concluded that ScYLV is a luteovirus that is biologically and serologically distinct from other members of the group and is the causal agent of the YLS of sugarcane. Levels of soluble sugars, especially sucrose, were significantly increased in the leaves of infected and symptomatic plants but never in symptomless infected ones. Two enzymes, guaiacol-peroxidase and syringaldazine-peroxidase had their activity significantly increased in plants infected by ScYLV and showing the disease symptoms. In contrast, no alterations in peroxidase activities were observed in healthy plants or in infected ones without symptoms.

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) representa produto de significativa importância dentro da produção agrícola do país, constituindo-se em uma atividade de considerável expressão social e econômica. Sua área plantada totaliza aproximadamente 5 milhões de hectares (2% total da área agrícola brasileira), com uma produção de 310 milhões de toneladas anualmente, sendo que 50% deste total se destina à produção de álcool (Censo Copersucar, 2002).

Como a maioria das espécies cultivadas que são multiplicadas vegetativamente, a cana-de-açúcar perpetua patógenos que se acumulam durante as sucessivas propagações, causando grandes perdas à cultura e chegando a comprometer a sobrevivência destas plantas. Na história mundial da cana-de-açúcar existem muitos casos registrados de severos prejuízos causados por doenças.

Os primeiros programas de melhoramento foram desenvolvidos por volta de 1890, em Java, em decorrência da necessidade de se obter variedades resistentes ao Vírus do Mosaico da Cana-de-Açúcar (Abbott, 1961). Na década de vinte, houve a destrutiva epidemia desta doença na região sul do Brasil, que quase causou a ruína de muitas indústrias açucareiras. Essa situação resultou do desconhecimento que havia com relação a essa doença e da susceptibilidade das variedades então largamente cultivadas. No decorrer de apenas cinco anos foi necessária a substituição quase que total das variedades susceptíveis, única medida de controle eficaz (Arruda, 1946).

Posteriormente, no início da década de oitenta, houve a incidência progressiva do carvão, na variedade NA 56-79, determinando sua substituição gradual, a qual chegou a ter mais de 1.000.000 de hectares cultivados na região centro-sul, perfazendo por muitos anos mais de 50% da área plantada com cana-de-açúcar (Sordi, 1996).

Conforme exposto acima, as grandes epidemias ocorrem pela existência de áreas extensas de hospedeiro susceptível, com carga genética uniforme, onde os patógenos encontram condições altamente favoráveis para rápida disseminação.

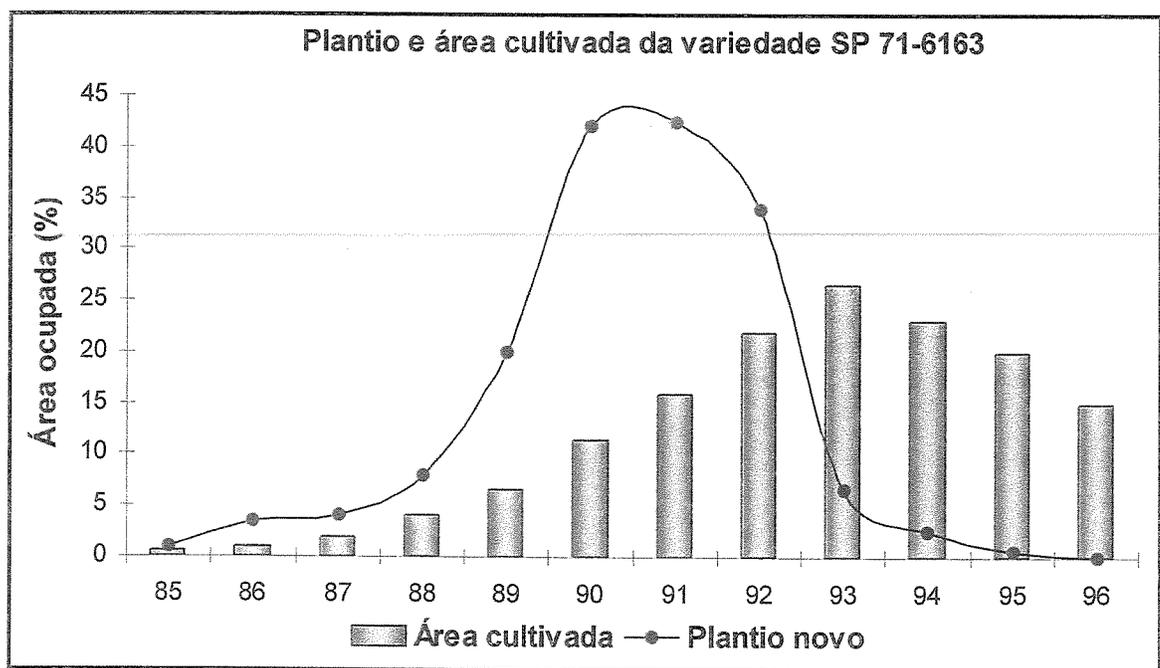
No início da década de 90, foram registrados no Brasil, os primeiros relatos de uma nova epidemia na cultura da cana-de-açúcar e também em muitos países que cultivam essa gramínea, denominada de Síndrome do Amarelecimento Foliar da Cana-de-Açúcar. Na tentativa de se estabelecer o agente causal desta síndrome, várias hipóteses foram levantadas, variando desde fatores edafo-climáticos, até a infestação por patógenos como fungos, nematóides, fitoplasmas e vírus. Desde então, vários trabalhos foram desenvolvidos para um maior conhecimento desta doença, para a caracterização do seu agente causal, e para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico de fundamental importância para a cultura canavieira mundial.

### **1.1. A Síndrome do Amarelecimento Foliar da Cana-de-Açúcar**

A Síndrome do Amarelecimento Foliar da Cana-de-Açúcar (SAFCA) ou “amarelinho” como ficou popularmente conhecida, é atualmente uma das principais preocupações da cultura canavieira no Brasil e em todos os países produtores de cana-de-açúcar. As primeiras observações do amarelecimento foliar foram feitas em 1989, no Estado de São Paulo, associadas principalmente a uma variedade de cana-de-açúcar mais cultivada naquela ocasião, a SP 71-6163 (Sordi, 1996). Esta variedade foi lançada comercialmente pela Copersucar em 1983 e, durante os primeiros anos após o lançamento, o seu plantio ficou em segundo plano devido ao seu aspecto de crescimento vegetativo inicial lento. Mas, a partir de 1987, teve seu plantio expandido, devido ao elevado teor de sacarose a partir do meio de safra, quando sua

multiplicação foi acelerada, alcançando em 1992 cerca de 470.000 hectares ou 22% da área cultivada no Estado de São Paulo (Sordi, 1996).

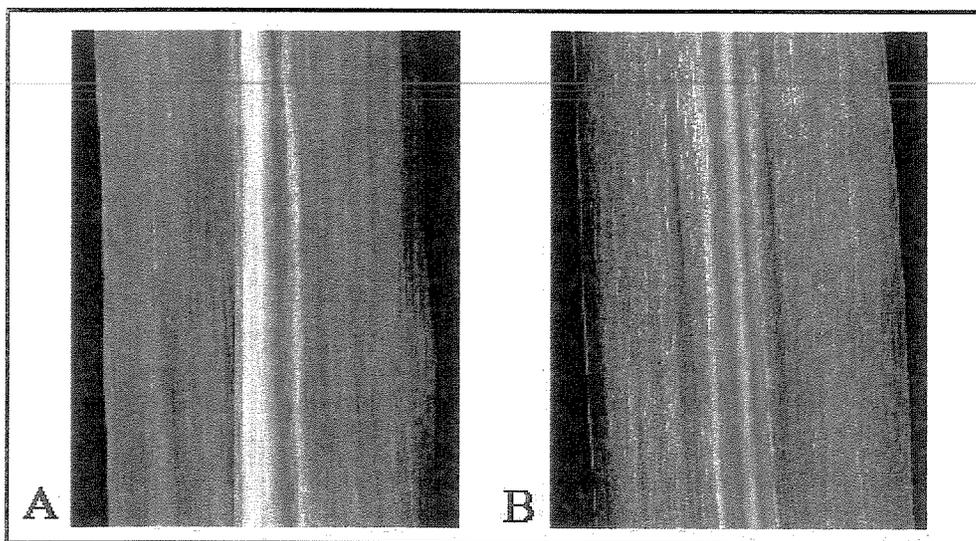
Entretanto, ao longo dos anos, os sintomas de amarelecimento passaram a ser vistos em praticamente todas as áreas de cultivo desta variedade, e esta mostrou ser a variedade comercial mais afetada pela síndrome do amarelinho. Para se ter uma idéia do impacto causado por esta doença, foi registrado o rápido decréscimo no plantio da variedade SP 71-6163, durante 12 anos consecutivos no estado de São Paulo, a partir de sua constatação, conforme mostra o gráfico da Figura 1.



**Figura 1.** Evolução das áreas de plantio e cultivo da variedade SP 71-6163 no estado de São Paulo durante 12 anos consecutivos.

Em 1993 o quadro pôde ser caracterizado como epidêmico, com perdas elevadas de produção, principalmente na SP 71-6163. Houve um aumento rápido e assustador do amarelecimento, tomando áreas extensas dessa variedade. Posteriormente, outras variedades tais como SP 71-1406, SP 71-1632, RB 72-454 e RB 76-5418 também passaram a apresentar os sintomas, porém em menor intensidade (Sordi, 1996).

A sintomatologia apresentada pela planta varia de acordo com as condições climáticas, época do ano e principalmente com a variedade. Os sintomas mais característicos da moléstia se iniciam pelo amarelecimento na face inferior da nervura central, progredindo para um avermelhamento da face superior que com o decorrer do tempo, esses sintomas podem progredir para todo o limbo foliar, seguido da seca progressiva das folhas no sentido da ponta para a base. O avermelhamento ao longo da nervura em direção ao limbo foliar é mais comum nos clones ou variedades mais sensíveis (Figura 2).



**Figura 2.** Folha de cana-de-açúcar da variedade SP 71-6163 com sintomas severos do ScYLV. **A:** Sintoma típico da doença, amarelecimento da nervura central na face inferior da folha. **B:** Sintomas mais avançados da moléstia, com coloração avermelhada da nervura central em sua face superior.

As plantas afetadas geralmente apresentam porte reduzido, colmos mais finos e entrenós mais curtos, chegando a afetar significativamente a produção (Vega *et al.*,1997).

É possível se observar o início dos sintomas na variedade SP 71-6163 em folhas jovens e totalmente expandidas (folha +1 ou +2), mas eles se tornam mais acentuados e evidentes nas folhas mais maduras, porém antes de se tornarem senescentes.

O sistema radicular normalmente apresenta-se subdesenvolvido. É comum o aparecimento inicial dos sintomas em plantas ocorrendo nas bordaduras dos talhões, com touceiras afetadas ao lado de touceiras saudáveis (Figura 3).



**Figura 3.** Plantas de cana-de-açúcar da mesma variedade (sadias e infectadas). As plantas infectadas apresentam os sintomas característicos do amarelecimento foliar, bem como uma drástica redução no porte quando comparadas com as plantas saudáveis, mais altas e sem alteração na cor verde das folhas.

É pertinente lembrar que não foram observados sintomas visuais no interior dos colmos de plantas com sintomas. Este fato difere de uma outra anomalia relatada por Ricaud (1968) onde foi observado um amarelecimento foliar em plantas de cana-de-açúcar no leste do continente africano, o qual foi chamado de “declínio amarelo”, cuja sintomatologia nas folhas se assemelhava em grande parte ao observado na variedade SP 71-6163, mas que diferia desta por apresentar podridão nos colmos.

Condições adversas, tais como compactação do solo, frio ou seca, contribuem para a intensificação dos sintomas.

Sintomas semelhantes aos descritos para a variedade SP 71-6163, também foram relatados em outros países produtores de cana-de-açúcar, como África do Sul (Bailey *et al.*, 1996), Austrália (Smith *et al.*, 1995), Estados Unidos (Comstock *et al.*, 1994), Hawaii (Schenck, 1990) e Ilhas Maurício (Anon, 1996).

Além dos sintomas externos, também foi observado que as folhas de plantas sintomáticas apresentavam metabolismo anormal em relação às folhas de plantas sem sintomas, mostrando um acúmulo de açúcares e um aumento no grau Brix nas folhas com amarelecimento (Irvine, 1993). Outra alteração profunda também observada na SP 71-6163 é o aumento dos teores de fibra dessa variedade, os quais foram sempre baixos, entre 10 a 11 %, passando a partir de então a apresentar níveis de 13 a 14 % em plantas sintomáticas (Sordi, 1996).

Devido à gravidade do problema e baseando-se nas informações obtidas ao longo dos anos, a Copersucar adotou um método visual e preliminar para seleção e caracterização de novos clones, onde são selecionadas as plantas cujas folhas jovens, porém totalmente expandidas, não estejam apresentando sintomas de amarelecimento. Dessa forma, foi adotado o uso da folha + 1, por ser esta a folha mais jovem, recém-saída do cartucho e totalmente expandida. Tendo esta folha como padrão, os sintomas da doença eram classificados usando-

se uma escala subjetiva, atribuindo-se notas de 1 a 4, sendo 1 para clones sem sintomas e 4 para clones com sintomas severos (Marcos Casagrande, Copersucar, comunicação pessoal). Este critério também foi adotado, quando necessário, na execução deste trabalho. Como mencionado anteriormente, este método se baseia a princípio na observação visual dos sintomas. Porém, plantas sem sintomas também podem estar infectadas pelo vírus, as chamadas variedades tolerantes. Como o “amarelinho” é uma doença relativamente nova, este comportamento de tolerância, em algumas variedades, ainda foi pouco estudado, dificultando a afirmação de que tais variedades se comportariam como tolerantes ou até resistentes a doença. Por essa razão, a simples observação dos sintomas não é suficiente para ser utilizada como critério de seleção de novos clones. Daí, a necessidade de métodos sensíveis e eficientes para um diagnóstico seguro e conclusivo. Portanto, em função da importância desta doença, grande parte dos programas de melhoramento na cultura de cana-de-açúcar estão sendo direcionados visando selecionar variedades com características de resistência a este vírus.

Como plano de trabalho, foi proposta então a caracterização do agente etiológico desta síndrome, desenvolvendo métodos de diagnóstico mais rápidos e seguros, os quais são importantes na seleção e produção de material propagativo livre de patógenos. Também foram estudadas as formas de transmissão do agente causal, mecanicamente e por afídeos vetores, contribuindo de maneira significativa para o entendimento epidemiológico da doença. Alguns aspectos fisiológicos específicos, desencadeados após a infecção, também foram estudados, com o objetivo de esclarecer parte dos mecanismos responsáveis na redução dos teores de açúcares em plantas afetadas pela doença.

## 1.2. Etiologia

A partir do surgimento dos primeiros sintomas observados no campo, várias hipóteses foram consideradas a fim de se estabelecer a etiologia do problema, variando desde a possibilidade de distúrbios fisiológicos, estresses ambientais, problemas de manejo fitotécnicos e até deficiências intrínsecas relacionadas à própria variedade. Dentre as possibilidades de distúrbios fisiológicos, Matsuoka & Meneghin (1997) afirmaram que a variedade SP 71-6163 é muito exigente em relação às condições de solo (fertilidade e compactação) e manejo em geral, por isso seria uma variedade instável, sugerindo que a anomalia fosse causada por fatores abióticos.

Também os mais diferentes tipos de patógenos foram relacionados como sendo os agentes causadores desta síndrome tais como fungos, nematóides, fitoplasmas e vírus. Das inúmeras tentativas de isolamento de fungos patogênicos afetando raízes, não foi encontrada uma correlação que pudesse explicar a generalidade dos sintomas. Meneghin & Matsuoka (1995) associaram o amarelecimento à presença do fungo *Hendersonina sacchari* afetando raízes, embora os sintomas descritos na literatura associados a esse fungo oportunista, de seca do limbo e permanência verde da nervura central das folhas sejam bem diferentes dos descritos para a SAFCA. O mesmo raciocínio foi usado no caso do nematóide do gênero *Pratylenchus*, principalmente *P. zae*, constatado na maioria das amostragens de raízes de plantas com sintomas de amarelecimento, porém também presente em plantas da mesma variedade supostamente sadias ou sem sintomas. Além disso, *P. zae* incide preferencialmente sobre raízes já desenvolvidas, em relação às radículas, e sempre teve uma ocorrência generalizada em cana-de-açúcar no Brasil, antes do início de cultivo da SP 71-6163, não se justificando um agravamento somente nos últimos anos, incluindo áreas antes nunca cultivadas com a variedade em questão.

No caso dos fitoplasmas, embora estes estejam relacionados a uma série de sintomas típicos de doenças conhecidas como “amarelos”, as evidências pareciam não apontar para estes organismos no caso da SAFCA. Entre tais evidências, pode-se citar o fato destes organismos serem sensíveis a tratamentos com tetraciclina e termoterapia, que promovem a eliminação dos fitoplasmas presentes no material doente e que promoveriam a conseqüente remissão dos sintomas, fato este que não ocorreu (Shenck & Hu, 1991). Por outro lado, Cronjé *et al.* (1998) relataram que a presença de um fitoplasma foi constantemente demonstrada em folhas de cana de um grande número de variedades com sintomas da síndrome, originadas da África do Sul. Porém, a comprovação da patogenicidade destes (Postulados de Koch) nunca foi demonstrada.

Em 1993, pesquisadores do Hawaii em visita ao Centro de Tecnologia Copersucar, tiveram a oportunidade de conhecer a sintomatologia e relataram ser ela bastante semelhante a da “YLS-Yellow Leaf Syndrome”, que havia ocorrido em uma variedade no Hawaii. A etiologia desta síndrome também não havia sido definida e inicialmente teve a suspeita de ser causada por um patógeno ocorrendo no sistema radicular, pois houve a constatação de RNA de dupla fita associado às raízes de plantas com sintomas do amarelinho (Borth *et al.*, 1994). Entretanto, esta hipótese também foi descartada, por não ter havido consistência de resultados.

Ao longo dos anos, baseando-se em observações visuais, pôde-se afirmar que, os sintomas progrediram de forma radial dentro do estado de São Paulo. Esta suposta disseminação para áreas não afetadas anteriormente, em poucos meses, sugeria um vetor aéreo de alta eficiência, transmitindo um agente infeccioso. Baseado neste conjunto de informações foi que Vega (1994), associou pela primeira vez os sintomas do amarelinho com a presença de alterações nos feixes vasculares do floema que indicavam o envolvimento de um patógeno relacionado aos tecidos floemáticos. Observações feitas em microscopia óptica de epifluorescência mostraram um material fluorescente verde-amarelo anormal no floema, que

não foi observado em plantas sadias ou sem sintomas. Após estas observações, foi então que as primeiras tentativas de purificação de uma partícula viral foram feitas e permitiram a observação ao microscópio eletrônico, de partículas do tipo isométricas com diâmetro aproximado de 25 nm, porém em concentração muito baixa. O exame ao microscópio eletrônico de secções ultrafinas obtidos de folhas com sintomas, de tecidos próximos à nervura central, mostrou que as células-companheiras do floema continham partículas isométricas que se assemelhavam a partículas virais e apresentavam alterações citopatológicas aparentemente conhecidas e características, relacionadas ao desenvolvimento da infecção por vírus (Vega *et al.*, 1997). Testes preliminares de microscopia eletrônica, ISEM, foram feitos com extratos de folhas com sintomas, e mostraram uma fraca reação serológica dessas partículas com o anti-soro para o luteovirus BYDV (*Barley Yellow Dwarf Virus* – PAV) ou Vírus do Nanismo Amarelo da Cevada estirpe PAV (Waterhouse *et al.*, 1988), já que na época desse estudo, ainda não havia disponível um anti-soro homólogo para o vírus do “amarelinho”. Uma outra técnica, baseada na imunolocalização em membranas de nitrocelulose chamada de “Tissue Printing” foi testada, utilizando-se do mesmo anti-soro e mostrou uma reação fraca, porém positiva na região do floema destas plantas. A partir de então, vários trabalhos foram feitos demonstrando ser de etiologia viral esta doença, sendo o vírus inicialmente conhecido como Vírus Associado ao Amarelecimento Foliar da Cana-de-Açúcar (Vega *et al.*, 1997) e depois identificado como *Sugarcane Yellow Leaf Virus*–ScYLV.

### **1.3. Características Gerais da Família *Luteoviridae***

Os primeiros registros de sintomas de infecções provavelmente causadas por luteovirus, foram atribuídos àqueles já relatados na Europa, na segunda metade do século 18,

relacionados a uma doença que ocorria em batata (*Solanum tuberosum* L.) conhecida como enrolamento da folha (Marshall, 1790, citado por Harrison, 1999). Neste estudo foi percebido que a “anomalia” era passada para as plantas-filhas através dos tubérculos, mas nunca através de sementes verdadeiras. Entretanto, a sua natureza infecciosa foi somente estabelecida posteriormente (Quanjer *et al.*, 1916, citado por Harrison, 1999), e em 1920 seu agente causal foi transmitido por afídeos (Oortwijn Botjes, citado por Harrison, 1999).

Uma outra anomalia ocorrendo em cevada, com sintomas de amarelecimento foliar, também foi associada a um luteovirus, quando Oswald & Houston (1951) demonstraram pela primeira vez que a doença era causada por um vírus identificado como *Barley Yellow Dwarf Virus* e que este também era transmitido por afídeos.

Embora as descobertas das doenças causadas por vírus, hoje conhecidas como luteoviroses, datem de alguns séculos atrás, os luteovirus só foram formalmente reconhecidos como um grupo em 1976, pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Virozes (Fenner, 1976). O grupo formado então, compreendia apenas cinco viroses e que compartilhavam características em comum, das quais três, eram as “estirpes” do BYDV (RPV, RMV e SGV) e as outras duas sendo o BWYV e o vírus do nanismo da soja (*Soybean Dwarf Virus* - SbDV). Desta forma, assim como em outros grupos de vírus fitopatogênicos, muitos luteovirus foram e continuam sendo classificados com base nas suas relações serológicas, nas suas propriedades físico-químicas, no círculo de hospedeiras, nas relações com os vetores, na morfologia da partícula viral e sua localização nos tecidos e mais recentemente, nas homologias obtidas através de seqüenciamento do ácido nucléico (Waterhouse *et al.*, 1988; Martin *et al.*, 1990).

Os luteovirus possuem formato isométrico e poliédrico, são fortemente imunogênicos, com diâmetro aproximado de 24–30 nm e, quando contrastados negativamente, possuem um aspecto angular e raramente são penetrados pela solução de contraste. O capsídeo viral é formado por um único polipeptídeo de 22 a 27 kDa e o genoma constituído de uma única

molécula de RNA de fita simples (ss RNA) de senso positivo com 5,5–5,8 kb (Kitajima *et al.*, 1997; Miller & Rasochová, 1997), representando 28–30% do peso da partícula e que codifica entre 5-6 proteínas. As partículas virais são moderadamente estáveis, possuindo um ponto de inativação térmica variando de 45-75 °C.

O nome da família foi derivado do Latim “*Luteus*”, que significa amarelo, já que muitos membros do gênero, anteriormente denominado grupo Luteovirus, causavam sintomas de amarelecimento em suas hospedeiras (Francki *et al.*, 1985).

Os sintomas mais característicos das infecções causadas por luteovirus consistem no amarelecimento, avermelhamento ou enrolamento das folhas geralmente acompanhados de paralisia no crescimento. Sintomas causados por deficiências nutricionais, danos causados por insetos ou até por períodos de queda de temperatura, são muito semelhantes aos sintomas causados por luteovirus e geralmente são difíceis de distinguir, dificultando assim a identificação do agente causador destas anomalias (Miller & Rasochová, 1997).

Assim como com outras doenças causadas por vírus, o controle de luteoviroses pode ser alcançado através da obtenção de material propagativo sadio, através da remoção de plantas que serviriam como fonte de inóculo de vírus e como reservatório para insetos vetores, através da prevenção da dispersão do vírus, controlando seu vetor com inseticidas sistêmicos (Dewar *et al.*, 1990, citado por Harrison, 1999) e pelo uso de variedades resistentes ao vírus. A propagação da cana-de-açúcar e seu plantio são feitos através de toletes. Como muitas variedades de cana já se encontram naturalmente infectadas pelo ScYLV, este método de propagação perpetua o patógeno, originando plantas novamente infectadas. Quando se deseja conhecer os efeitos induzidos pelo vírus em plantas de cana, a utilização de material sadio obtido por sementes (“seedlings”) não é adequada, já que as comparações devem ser feitas dentro de variedades geneticamente idênticas e não entre novos indivíduos distintos.

O emprego de técnicas para obtenção de material propagativo livre de vírus é muito importante, principalmente como no caso da cana-de-açúcar, propagada vegetativamente, pois, além de possibilitar o controle de muitas viroses, dispor-se de clones livres de vírus é de grande valor para outras áreas de pesquisa, como melhoramento genético, nutrição e fisiologia, além de propiciar a "limpeza" de variedades de interesse econômico, que não são obtidas através de sementes. Como exemplos de técnicas de "limpeza" de vírus podemos citar a termoterapia, a regeneração de plantas por meio da cultura *in vitro* de ápices meristemáticos ou por meio da obtenção *in vitro* de tecido caloso, também originado de ápices meristemáticos (Barlass *et al.*, 1982; Fitch *et al.*, 2001).

As doenças causadas por luteovirus ocorrem em um grande número de espécies cultivadas por todo o mundo, ocasionando grandes perdas na produção agrícola. Devido ao tipo de relação com os afídeos vetores e à freqüente presença de plantas invasoras, os luteovirus podem tornar-se difíceis de se controlar (Martin *et al.*, 1990).

Dos exemplos mais importantes economicamente, podemos citar o BYDV, inicialmente considerado como a espécie "tipo" dos luteovirus. Ele infecta uma grande variedade de gramíneas cultivadas, como aveia, cevada, trigo, centeio, ocasionalmente arroz e milho e até muitas espécies de gramas selvagens, como grama seda e capim coloninho, que funcionam como fonte de inóculo do vírus e como reservatório de pulgões. Nos Estados Unidos, este vírus foi considerado como fator limitante para a produção de cereais (Miller & Rasoehová, 1997). A princípio, o BYDV foi separado em cinco sub-grupos, de acordo com a espécie do pulgão vetor, sendo BYDV-RPV transmitido pelo pulgão *Rhopalosiphum padi*, RMV transmitido por *R. maidis*, que coloniza com freqüência cana-de-açúcar, MAV, transmitido por *Sitobion avenae*, SGV transmitido por *Schizaphis graminum*, também muito comum na cultura de cana e PAV, que pode ser transmitido por *R. padi*, *S. avenae* e *S. graminum*. Utilizando-se de técnicas de seqüenciamento molecular foi que Smith *et al.* (2000)

obtiveram importantes informações relacionadas ao genoma do ScYLV, mostrando que isolados deste vírus, originados da Flórida, continham apenas uma parte do seu genoma em comum com o BYDV-PAV, justificando a fraca reação serológica do anti-soro preparado para este vírus com o vírus do ScYLV (Vega *et al.*, 1997).

Um outro exemplo de luteovirus de grande importância econômica, cuja porção do genoma mostrou um pequeno grau de semelhança com o ScYLV (Smith *et al.*, 2000), é o vírus do enrolamento da folha da batata (*Potato Leafroll Virus* – PLRV), transmitido principalmente pelo afídeo vetor *Myzus persicae*. Esse vírus é considerado o principal responsável pela importação de batata-semente no Brasil (Souza-Dias & Costa, 1983).

Os luteovirus são transmitidos por afídeos vetores, de uma maneira persistente, circulativa, mas não propagativa. Como forma persistente e circulativa de transmissão entendemos que, ao se alimentarem dos tecidos floemáticos das plantas hospedeiras, os afídeos adquirem as partículas virais e estas atravessam as paredes do intestino dos afídeos em direção a hemolinfa. Através de processos de endocitoses, as partículas saem da hemolinfa e chegam até as glândulas salivares, liberando-as para dentro do ducto salivar em direção às células da planta (Costa, 1998; Gildow, 1999). O fato de ser não-propagativa significa que o vírus se multiplica exclusivamente nos tecidos do floema das plantas infectadas e não em seus vetores, embora esta possibilidade não deva ser totalmente excluída (Waterhouse *et al.*, 1988). Estudos feitos com o BYDV mostraram que os afídeos que adquirem as partículas virais não param de transmiti-las mesmo depois da ecdise (Gildow, 1999) e que continuam a transmitir por um período de 2–3 semanas, sem haver a necessidade de readquirir o vírus.

Os luteovirus não são transmitidos por inoculação mecânica e nem por sementes. A maioria dos afídeos vetores de luteovirose possui um alto grau de especificidade com cada vírus, sendo eficientemente transmitido por apenas uma ou poucas espécies de afídeos (Rochow & Duffus, 1981). Acredita-se que a especificidade do vetor seja resultado das

interações entre a proteína da partícula viral e a superfície de membrana nos acessórios das glândulas salivares e que estas interações regulam o transporte das partículas virais para o duto salivar (Gildow & Rochow, 1980). Fatores como, variabilidade genética dos afídeos, das partículas virais e idade do afídeo também influenciam na especificidade do vetor e na eficiência de transmissão do vírus.

O círculo de plantas hospedeiras dos luteovirus varia com uma certa limitação. Geralmente, as hospedeiras de infecções causadas por luteovirus tendem a ser restritas a espécies envolvendo uma única família botânica: por exemplo, o PLRV infecta a família *Solanaceae* e o BYDV infecta a *Gramineae*. Entretanto, o BWYV é uma exceção, já que algumas estirpes deste vírus foram encontradas infectando até 11 famílias diferentes de dicotiledôneas (Duffus, 1964).

Mais recentemente, com o desenvolvimento das técnicas de pesquisa moleculares, baseando-se na organização do genoma e em informações obtidas por semelhanças nas seqüências do ácido nucléico, os luteovirus foram classificados dentro de uma família, definida como *Luteoviridae*, compreendendo três gêneros que são *Luteovirus*, *Polerovirus* e *Enamovirus* (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Análises da diversidade genotípica entre os diferentes isolados do ScYLV mostraram que o genoma deste, compreende características em comum com os membros dos três gêneros desta família, sugerindo que o ScYLV é um novo membro da família *Luteoviridae* e que provavelmente surgiu através de recombinações entre espécies (Moonan *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000; Moonan & Mirkov, 2002).

Análises ultraestruturais de células vegetais infectadas por luteovirus confirmam que estes são restritos aos tecidos floemáticos. Exames microscópicos destes tecidos mostraram que o vírus se movimenta rapidamente, através do feixe vascular, entretanto a dispersão lateral é lenta e nem todas as células do floema são infectadas (Jensen, 1969; Murant & Roberts, 1977). Baseando-se nos estudos citopatológicos da ultraestrutura deste tecidos, pôde-se

observar que o vírus se acumula e se replica quase que exclusivamente nos elementos do tubo crivado, nas células companheiras do floema e, ocasionalmente, no parênquima floemático (Mayo & Ziegler-Graff, 1996).

Como mencionado anteriormente, os sintomas causados por luteoviroses se assemelham com os induzidos por várias outras causas, dificultando a sua detecção e atrasando o diagnóstico. Entretanto, os efeitos causados por estes vírus nos tecidos floemáticos foram relatados muito precocemente. Quanjer já em 1913 descreveu sintomas de necrose de floema em folhas de batata com sintomas de enrolamento da folha. Estes sintomas são acompanhados pelo acúmulo de calose nos elementos do tubo crivado, originando reações de coloração bem características (Sheffield, 1943), as quais eram usadas no período pré-serológico, quando ainda se utilizava o corante Azul de Resorcina para detecção em larga escala do PLRV (de Bokx, 1967). O primeiro sintoma da infecção por luteovirus, ao nível celular, é a necrose do floema (Esau, 1957), a qual se espalha inicialmente dos elementos do tubo da folha inoculada para as células adjacentes. A necrose do floema está associada com a resistência na translocação de metabólitos, perda de clorofila, aumento da respiração e uma redução no crescimento (Matthews, 1992).

A rota do movimento de um determinado vírus que infecta uma planta sistemicamente, envolve a passagem através de vários tipos de células e tecidos. Se a infecção começa no tecido epidérmico, o movimento do vírus de célula para célula se inicia entre as células da epiderme, depois para o mesófilo e feixe vascular e daí para o floema parenquimático e células companheiras (Carrington *et al.*, 1996). O movimento do vírus de célula para célula entre todos os tipos de células, ocorre através de canais intercelulares – os plasmodesmas. Este movimento, conhecido como horizontal, é relativamente lento. Entretanto, o transporte a longa distância para outras folhas e tecidos, conhecido como vertical, é facilitado pelo movimento através dos elementos do tubo crivado, onde o vírus se move rapidamente através do fluxo de

massa (Leisner & Turgeon, 1993). Quando um luteovirus é inoculado em uma planta por um afídeo, ele é introduzido diretamente no tecido floemático. A passagem do vírus dos elementos do tubo crivado para outras células provavelmente ocorre via plasmodesmas, mas parece ser limitada às células companheiras, parênquima vascular e muito raramente a umas poucas células do mesófilo. Como exemplo pode-se citar a observação de partículas virais do PLRV nas células do mesófilo, porém adjacentes a pequenos vasos floemáticos, utilizando-se da técnica de imuno-marcação com ouro coloidal (Van den Heuvel *et al.*, 1995). Provavelmente a restrição destes vírus ao floema é devida à capacidade de se movimentar unicamente através dos plasmodesmas desse tecido e não através dos plasmodesmas do tecido parenquimático. Essa capacidade parece estar associada a uma proteína codificada pelo vírus, denominada MP17 (“Movement Protein” 17 kDa), produto da ORF 4, que é capaz de se ligar unicamente aos plasmodesmas do tecido floemático (Schmitz *et al.*, 1997).

Foi observada a presença de partículas do PLRV em células do mesófilo, quando as plantas eram co-inoculadas com outros vírus, que naturalmente ocorrem em tecidos parenquimáticos, como PVX (*Potato Virus X*), PVY (*Potato Virus Y*), TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) e outros (Atabekov *et al.*, 1984; Barker, 1987). Posteriormente, Barker (1989) descreveu invasão de células do mesófilo por outro luteovirus (BWYV), quando observado em infecções mistas com o CMoV (*Carrot Mottle Virus*) e o PEBV (*Pea Early-Browning Virus*). Esses trabalhos mostraram que, a limitação dos luteovirus às células do floema provavelmente não se deve à inabilidade destes em se replicar em outros tipos de células, mas eles sustentam a idéia de que a restrição dos luteovirus nos tecidos floemáticos resulta de uma falha no movimento do vírus. Esta deficiência pode ser parcialmente resolvida pela co-infecção com outros vírus que infectam outros tecidos (parênquima) da planta, e que, portanto produzem proteína de movimento que permite sua passagem (e a do luteovirus co-infectante).

Além da baixa concentração e por sua restrita localização nos tecidos floemáticos, os luteovirus são também difíceis de se observar ao microscópio eletrônico por meio de cortes ultrafinos, pelo fato de se assemelharem a ribossomos citoplasmáticos. Estas dificuldades são parcialmente contornadas quando as partículas virais formam agregados cristalinos ou se localizam em regiões das células que não são típicas de ribossomos (Francki *et al.*, 1985). Uma forma mais eficiente de se evitar este problema pode ser obtida quando o tecido a ser observado é tratado com enzimas (ribonuclease pancreática) que digerem o RNA ribossômico. Após este tratamento, é possível se observar as partículas isométricas, mesmo quando estas estão dispersas no citoplasma e em concentração muito baixa (Hatta & Francki, 1981).

Baseados em estudos ultraestruturais, Gill & Chong (1976) estudaram a citopatologia de diferentes isolados do BYDV, e agruparam pelo menos duas seqüências de eventos completamente distintas entre si, que estão envolvidas na replicação dos luteovirus. No primeiro grupo (BYDV-MAV, PAV, SGV), as partículas virais movem-se aparentemente dos sítios iniciais de inoculação nos elementos do tubo crivado através dos plasmodesmas, em direção às células companheiras adjacentes. Filamentos densos, variando de 2-4 nm e vesículas compostas por uma única membrana (50-230 nm diâmetro) são formados no citoplasma perto dos plasmodesmas. As partículas virais são primeiramente observadas no citoplasma, sugerindo ser este um sítio citoplasmático de montagem de partículas. O núcleo se torna distorcido e ocorre um acúmulo de grandes quantidades de material elétron-denso. Neste momento da infecção, as mitocôndrias, os cloroplastos e os ribossomos começam a se desintegrar. No segundo grupo (BYDV-RPV, RMV), a infecção inicia-se de maneira similar, porém as vesículas produzidas possuem membranas duplas, as quais se ligam ao retículo endoplasmático. Um segundo tipo de sistema de membranas é formado, sendo este composto por túbulos. O núcleo não se deteriora e as partículas virais são primeiramente observadas rodeando o nucléolo, dentro do núcleo. Mudanças ultraestruturais induzidas por BWYV e

PLRV parecem ser similares àquelas causadas pelo BYDV - RPV, RMV (Esau & Hoefert, 1972; Shepardson *et al.*, 1980), entretanto os efeitos citopatológicos podem variar de acordo com a espécie hospedeira e com o isolado do vírus (D'Arcy & De Zoeten, 1979; Gill & Chong, 1979). Os efeitos citopatológicos causados pelo ScYLV ainda não foram estudados.

Existem duas características bem marcantes que separam os luteovirus dos outros vírus fitopatogênicos. Uma delas é a de possuir uma seqüência protéica ligada à proteína capsidial (“coat protein read through domain”), que interage com o produto de uma bactéria endosimbionte do afídeo vetor, conhecida como simbionina. Esta proteína aparentemente estabiliza as partículas virais, enquanto estas ainda se encontram na hemolinfa do inseto (Van den Heuvel *et al.*, 1994). A segunda característica é a capacidade que os luteovirus têm de interagir com outros agentes infecciosos, incluindo os umbravirus, RNA satélites e viróides, de uma maneira que afeta profundamente a sobrevivência e a dispersão de um ou outro. Como exemplo podemos citar o viróide PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*), que como a maioria dos viróides tem sua transmissão quase que exclusiva por meios mecânicos. Porém em plantas co-infectadas pelo PLRV, o PSTVd pôde ser transmitido também pelo afídeo *Myzus persicae* (Salazar *et al.*, 1995). O processo-chave nesta interação é a habilidade que a proteína capsidial dos luteovirus tem de encapsidar RNA de outros agentes infecciosos (Harrison, 1999). Estas características, entre outras mencionadas anteriormente, fazem da família *Luteoviridae* uma das mais importantes famílias de vírus de plantas, tanto economicamente como biologicamente.

#### 1.4. Métodos de Estudo e Diagnóstico dos Luteovirus

Os danos causados nas culturas por luteoviroses foram, durante muitos anos subestimados, devido ao fato de sua sintomatologia ser semelhante à induzida por outros fatores, bióticos ou abióticos, tornando o diagnóstico visual praticamente impossível de ser realizado. Por esta razão, a detecção e o diagnóstico de luteovirus é uma importante área de estudo.

As primeiras técnicas usadas para detecção e diagnóstico de luteoviroses foram baseadas nas propriedades biológicas dos vírus. Estas técnicas baseavam-se na observação dos sintomas em plantas hospedeiras ou 'indicadoras', nas formas de transmissão do vírus por seus afídeos vetores e em alguns casos, na citopatologia dos tecidos infectados utilizando-se de microscopia eletrônica. No entanto, as técnicas biológicas para detecção de luteovirus apresentam uma série de limitações: o diagnóstico baseado apenas na sintomatologia não é confiável e a transmissão por afídeos vetores é onerosa e requer tempo e espaço, tornando-as inapropriadas para o diagnóstico de rotina ou em larga escala.

A microscopia eletrônica surge como uma importante ferramenta, capaz de revelar com adequado detalhamento, informações sobre a morfologia, localização em diferentes tecidos e efeitos citopatológicos dos fitovírus. Em estudos iniciais sobre uma determinada virose, com o intuito de realizar a diagnose, bem como caracterizar a morfologia da partícula viral, algumas técnicas rápidas de microscopia eletrônica podem ser empregadas. Entre elas podemos citar a de imersão foliar rápida ou "leaf dip" (Kitajima & Nome, 1999), que consiste em mergulhar pedaços de folhas afetadas diretamente numa gota de solução contrastante sobre a telinha de microscopia eletrônica. Essas técnicas rápidas de preparação são ideais quando as partículas virais são estáveis e atingem altas concentrações nos tecidos doentes. Entretanto, para as viroses que se apresentam em baixas concentrações, como as causadas por vírus restritos ao

floema, o emprego dessas técnicas isoladamente pode não ser adequado. Além disso, uma identificação precisa da espécie de vírus, baseada somente na morfologia da partícula não é possível, já que vírus taxonomicamente distintos assemelham-se morfologicamente. Assim torna-se necessário o emprego de outras técnicas combinadas com a microscopia eletrônica para torná-la mais específica. A de microscopia eletrônica de imuno-adsorção ou ISEM é uma das técnicas que utiliza a reação antígeno-anticorpo para a detecção e diagnose de fitovírus (Vega *et al.*, 1995). Este método aumenta de 10 a 100 vezes a eficiência de captura de partículas em relação aos procedimentos sem o uso de anti-soro e em virtude disso, é muito utilizada para viroses que se apresentam em baixa concentração nos tecidos infectados. Embora útil por fornecer informação valiosa para caracterizar o vírus, a microscopia eletrônica exige pessoal e equipamentos especializados.

Além do tamanho e da morfologia, revelados pela microscopia eletrônica, outras características das partículas virais podem ser usadas para o estudo de muitos vírus. A estabilidade da partícula viral pode ser estimada conhecendo-se algumas das propriedades físico-químicas, tais como: o seu ponto de inativação térmica, seu ponto final de diluição e a sua longevidade *in vitro*. Tais informações, embora de valor relativo para o diagnóstico, podem contribuir para a caracterização do vírus. Outras propriedades físico-químicas, porém mais precisas, também podem ser usadas na caracterização de um novo vírus. Algumas dessas propriedades são: densidade da partícula viral (“Effective Buoyant Density”), seu coeficiente de sedimentação, seu espectro de absorção no ultravioleta e a sua mobilidade eletroforética.

A fim de se conhecer as propriedades físico-químicas das partículas virais e sua densidade, um método eficiente de purificação é necessário. A densidade da partícula viral pode ser medida através da ultracentrifugação (“Equilibrium Zonal Centrifugation”) em um gradiente de densidade, cuja solução pode ser composta de Sacarose, de Cloreto de Césio (CsCl) ou de Sulfato de Césio (Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Esta técnica consiste em ultracentrifugar a partícula

viral em um gradiente, até que o vírus se sedimente (ou flutue) num nível onde a densidade do meio é igual à densidade do vírus. A densidade da partícula viral é então estimada medindo-se o índice de refração da solução contendo as frações purificadas. Os valores de densidade da partícula viral da maioria dos vírus de plantas estão entre 1,2 e 1,6 g/cm<sup>3</sup> e assim como o coeficiente de sedimentação estão relacionados com o conteúdo do ácido nucléico da partícula viral (Walkey, 1991).

Como exposto acima, estas informações podem contribuir no diagnóstico e no estudo de várias doenças causadas por vírus, no entanto, para avaliar estas propriedades físicas é necessário dispor de preparações altamente purificadas.

Os métodos de diagnóstico utilizados na detecção dos luteovirus tornam-se ainda mais limitados pelo fato de se restringirem às células do floema, resultando numa baixa concentração na planta infectada. Como mencionado anteriormente, os luteovirus não são transmitidos mecanicamente nem por sementes, apenas por afídeos. Este fato gera dificuldades nos estudos biológicos, bioquímicos e no desenvolvimento de métodos para diagnóstico, inviabilizando o uso de testes de formação de lesões locais em plantas hospedeiras, e dificultando a purificação das partículas virais para sua caracterização (Martin *et al.*, 1990).

A escolha do método de diagnóstico deve ser feita em função da sua sensibilidade, especificidade, confiabilidade e capacidade de processamento de grande quantidade de amostras. A diagnose de uma doença viral em bases rotineiras é requerimento essencial para a adoção de medidas de controle.

O uso de algumas técnicas serológicas para diagnóstico de vírus fitopatogênicos tornou-se muito freqüente devido à rapidez, especificidade e simplicidade das mesmas. Elas são largamente utilizadas em diagnóstico de rotina por permitirem testar um grande número de amostras simultaneamente e fornecerem respostas mais rápidas que os métodos biológicos tradicionais.

A introdução da técnica de ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”) para a detecção de vírus de plantas se deveu aos trabalhos pioneiros de Clark & Adams (1977). Esta técnica mostrou-se especialmente útil para detectar vírus, principalmente os que ocorrem em baixíssima concentração. No caso dos luteovirus, por ser restrito ao tecido vascular, sua extração é dificultada e a concentração no extrato final é muito baixa, sendo, portanto ELISA um método especialmente adequado (Souza-Dias, 1999).

A técnica de ELISA se baseia no princípio da serologia onde a proteína viral (antígeno, AG) é reconhecida e liga-se especificamente ao anticorpo (AC) contido na fração de imunoglobulinas do soro sangüíneo de um animal, geralmente coelho, formando o complexo AG-AC. A particularidade dos diversos métodos de ELISA é que um desses reagentes está adsorvido a uma fase sólida, e também que a ocorrência da reação entre AG e AC pode ser posteriormente medida por métodos colorimétricos.

Entre as diversas variações do método, o que tem mostrado maior sensibilidade é o DAS-ELISA (“Double Antibody Sandwich” - ELISA), que tem sido largamente utilizado para a detecção e diagnóstico de luteovirus, tanto nas plantas hospedeiras como nos afídeos vetores (Torrance, 1987). Variações também existem dentro da técnica de DAS-ELISA, como a incorporação de diferentes procedimentos de extração do vírus, o uso de fragmentos de anticorpos no lugar de anticorpos inteiros e até a adição de etapas que envolvem mudanças no protocolo original (Koenig & Paul, 1982). Estas variações são freqüentemente utilizadas para alterar a sensibilidade e ou a especificidade do método. A descoberta de que a antigenicidade dos luteovirus permanece estável em tecidos desidratados (Lister *et al.*, 1985) aumentou a utilidade desta técnica, principalmente quando havia necessidade de se enviar tecidos infectados para que fossem testados em outras regiões.

Apesar da serologia ser a técnica mais amplamente utilizada para a detecção e diagnóstico de luteovirus, a utilização de técnicas moleculares vem se tornando cada vez mais

comum e a tendência é de que seu uso seja crescente. Enquanto na serologia apenas a proteína capsidial é responsável pela detecção e identificação, com o uso de técnicas moleculares pode-se detectar outras porções do genoma viral, diminuindo a chance de erros na diagnose.

Uma técnica molecular bastante simples, versátil e de ampla aplicação conhecida como RT-PCR (“Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction”) ou Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase, vem sendo bastante utilizada para a detecção de luteovirus. Este método revolucionou a genética molecular através da possibilidade de produzir um grande número de cópias (amplificação) de uma seqüência específica do DNA. No caso dos luteovirus, cujo genoma é composto por RNA, há necessidade de um passo anterior ao da amplificação da molécula de DNA, utilizando-se da reação de transcrição reversa (RT), que sintetiza o DNA complementar a partir da fita de RNA viral (Robertson *et al.*, 1991). A técnica é baseada na duplicação, em progressão geométrica, da seqüência de interesse do DNA, limitada por dois oligonucleotídeos (“primers”) específicos, contendo seqüências específicas que ladeiam o trecho amplificado.

Comparando-se os métodos biológicos de diagnóstico, baseados no uso de plantas indicadoras, com a técnica de DAS-ELISA e com técnicas moleculares (RT-PCR), concluiu-se que em geral, o teste de DAS-ELISA é bastante sensível, porém perde em sensibilidade para as técnicas moleculares de diagnóstico (Figueira *et al.*, 1997). O método de ELISA tem ainda a vantagem de requerer reagentes pouco especializados, apresentar grande rapidez e simplicidade e ser adaptado para grande número de amostras. Estas características têm feito desta técnica o principal método de detecção e diagnóstico dos luteovirus (Souza-Dias, 1999).

## 1.5. Mecanismos de Resistência das Plantas em Resposta à Infecção por Patógenos

Em geral, cada espécie de planta é afetada por diferentes tipos de patógenos, tais como fungos, bactérias, fitoplasmas, vírus e nematóides. Embora tais plantas possam sofrer danos de pequena ou grande extensão, muitas delas sobreviverão ao ataque destes patógenos e poderão crescer e completar seu ciclo de maneira eficiente ou satisfatória. Isto se deve ao fato de que, as plantas por meio de diferentes mecanismos de defesa, conseguem se proteger da infecção, tanto em espécies consideradas resistentes como susceptíveis ao patógeno.

Cada interação hospedeiro-patógeno pode ser vista como uma luta entre dois organismos pela sobrevivência (Dianese, 1990). De um lado, o patógeno lança mão de suas armas químicas para atacar o hospedeiro em potencial, a fim de estabelecer a infecção. No caso de infecções causadas por vírus, haverá a necessidade de um vetor ou outros agentes de transmissão, para que o coloque em contato direto com as células da planta. Do outro lado, o hospedeiro, através de mecanismos estruturais e/ou bioquímicos, procura se defender do patógeno (Bostok & Stermer, 1989).

Para que a infecção seja efetivada com sucesso, é necessário que o patógeno vença tais mecanismos. De uma maneira geral, podemos identificar estes mecanismos como uma combinação de dois sistemas: 1) características estruturais que agem como barreiras físicas e que inibem o patógeno desde a sua entrada até a dispersão deste dentro da planta e 2) reações bioquímicas que acontecem nas células e tecidos das plantas, produzindo substâncias que, ou são tóxicas ao patógeno ou criam condições que inibem o crescimento do patógeno na planta. Para facilitar os estudos sobre a natureza dos sistemas de defesa, estes mecanismos são geralmente sub-divididos em duas categorias: pré-formados (passivos; constitutivos) e pós-formados (ativos; induzíveis).

Dentro do primeiro sistema, aparece a primeira linha de defesa das plantas contra patógenos, que é a sua superfície, onde, na maioria das vezes, estão localizadas as barreiras estruturais, pré-existentes, muitas das quais, já se encontram na planta, antes mesmo da infecção pelo patógeno. Tais estruturas compreendem a cutícula, com variações na quantidade e qualidade de ceras que a constituem, e os tricomas que variam em tamanho e quantidade.

Ainda dentro do primeiro sistema de defesa, está um outro tipo de mecanismo, geralmente ativado após a entrada do patógeno dentro da célula. Como exemplos, podemos citar, o espessamento da parede celular ou lignificação, a formação de tiloses, papilas ou halos e até a deposição de gomas.

Embora os mecanismos estruturais possam fornecer à planta vários níveis de defesa contra o ataque de patógenos, as pesquisas científicas mostram que, na maior parte das interações, as substâncias produzidas pelas células do hospedeiro, por meio dos mecanismos bioquímicos de defesa, antes ou após o contato do patógeno, são provavelmente os verdadeiros responsáveis pela resistência à infecção das plantas contra certos patógenos (Pascholati & Leite, 1994).

Inúmeras substâncias pré-formadas que exibem atividade anti-microbiana estão envolvidas na resistência das plantas contra fitopatógenos. Geralmente, essas substâncias estão presentes em altas concentrações nos tecidos saudáveis das plantas e, em alguns casos, como resultado da infecção, podem ser convertidas em substâncias altamente tóxicas (Nicholson & Hammerschmidt, 1992). Dentre as substâncias pré-formadas, podemos citar como alguns exemplos, os compostos fenólicos, os alcalóides, as lactonas, os terpenóides e até mesmo alguns inibidores protéicos.

Os fatores bioquímicos de resistência pós-formados, geralmente mostram-se ausentes ou estão presentes em baixas concentrações nas plantas antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta à presença do patógeno. Como exemplo deste tipo de defesa,

podemos citar o mecanismo de Reação de Hipersensibilidade, cuja reação mostra-se como uma resposta celular extrema por parte da planta, podendo levar a um alto grau de resistência à doença e, por essa razão é considerado um dos mecanismos mais importantes de resistência das plantas. Este tipo de reação ocorre em função do reconhecimento da infecção, por parte do hospedeiro, como consequência da incompatibilidade entre a planta e o patógeno (Doke *et al.*, 1987). Na sua forma clássica, a Reação de Hipersensibilidade mostra-se como uma pequena necrose visível a olho nu, que ocorre em diferentes órgãos da planta, sendo considerada sinônimo de morte celular ou de necrose de tecido (Goodman *et al.*, 1986; Király, 1980). Nas doenças causadas por vírus, esta reação na maioria das vezes, resulta na formação das chamadas lesões locais, às quais as partículas virais ficam restritas, podendo sobreviver por algum tempo, porém, impedidas de invadir outros tecidos.

Além da Reação de Hipersensibilidade, também podemos citar como exemplos importantes de defesa, a produção de fitoalexinas, lignina e proteases, bem como de outras proteínas relacionadas à patogênese (“Pathogenesis Related Proteins” - PR). Nesses processos, existe a participação de várias enzimas, dentre elas, as peroxidases, que participam de inúmeras vias metabólicas (Gaspar *et al.*, 1991).

Dos eventos acima mencionados, será destacado aqui o envolvimento das peroxidases nestes processos. As peroxidases (EC 1.11.1.7) são enzimas largamente distribuídas dentro do Reino Vegetal e fazem parte de um grupo de proteínas não estruturais presentes na parede celular, que atuam nos mecanismos de crescimento da célula vegetal e participam, junto com outras enzimas como a PAL (EC 4.3.1.5 “Phenylalanine Ammonia Lyase”) e a CAD (EC 1.1.1.195 “Cinnamil Alcohol Dehydrogenase”) da biossíntese de lignina. A lignificação tem sido associada com a atividade de peroxidases específicas da parede celular (Lewis & Yamamoto, 1990), sendo considerada um evento tardio na diferenciação da parede celular (Liyama *et al.*, 1993) e está restrita a tecidos que pararam de crescer. Contudo, recentes

estudos sobre interação planta-patógeno têm demonstrado que a parede celular de tecidos jovens pode sofrer lignificação se as células forem danificadas por ferimentos ou sofrerem ataques por fungos (Walter, 1992). Algumas hipóteses foram propostas para explicar como a lignificação atuaria no impedimento da infecção por um determinado patógeno, principalmente por patógenos fúngicos (Ride, 1978). A primeira delas propõe que a lignina aumentaria a resistência mecânica da parede celular dificultando a penetração. A lignificação da parede celular no ponto de entrada do patógeno poderia torná-la mais resistente à dissociação pelas enzimas do fungo. Uma outra hipótese seria que compostos fenólicos precursores da lignina poderiam apresentar atividades antifúngicas, provavelmente através de alterações nas membranas ou enzimas dos fungos.

A infecção por vírus geralmente causa um aumento na atividade das peroxidases, que tem sido relacionado com os mecanismos de defesa associados à Reação de Hipersensibilidade. No entanto, também as infecções com invasão sistêmica, ou seja, sem reação de hipersensibilidade, podem promover um aumento na atividade de peroxidases (Bates & Chant, 1980; Loebenstein & Linsey, 1986; Baptista *et al.*, 1998).

A atividade de peroxidases associada à resistência induzida por vírus pode ser exemplificada através dos trabalhos de Souza *et al.* (1999). Eles verificaram a atividade de peroxidases, em plantas de milho de diferentes linhagens, tanto sadias como infectadas pelo vírus do mosaico comum. Os resultados mostraram que a atividade da enzima aumentou significativamente nas plantas inoculadas com o vírus. E ainda, a maioria das linhagens resistentes ao vírus também apresentou maior atividade peroxidásica quando comparadas com linhagens susceptíveis. Um outro exemplo de aumento da atividade de peroxidases foi observado em plantas de batata infectadas pelo luteovírus PLRV (Schons & Manfroi, 1997). Estes resultados sugerem a participação destas enzimas nos mecanismos de defesa à doença.

Considerando a importância das peroxidases, no processo de lignificação e nos mecanismos de defesa da planta, foram investigadas aqui as mudanças na atividade destas enzimas em plantas de cana-de-açúcar sadias e infectadas pelo ScYLV.

#### **1.6. Alterações Fisiológicas Associadas à Infecção Viral**

Nesta categoria consideram-se aquelas alterações metabólicas ou fisiológicas que, embora não relacionadas diretamente com mecanismos de resistência, são consequência da infecção viral e geralmente estão associadas à manifestação de sintomas ou queda de produtividade.

O estabelecimento de infecções virais em plantas resulta em algumas alterações fisiológicas e bioquímicas que se manifestam principalmente nos processos de fotossíntese, translocação de carboidratos, permeabilidade de membranas e até em alterações dos padrões protéicos (Ladygina & Babosha, 1996).

De uma maneira geral, as alterações metabólicas induzidas por vírus assemelham-se muitas vezes a um processo acelerado de senescência. As alterações na capacidade fotossintética estão, entre outros fatores, associadas com a alteração na morfologia e no metabolismo dos cloroplastos e com a redução do seu número, resultando numa diminuição na taxa de fotossíntese. As infecções causadas por vírus levando à clorose ou necrose dos tecidos infectados, induzem nos cloroplastos destes tecidos, mudanças estruturais e metabólicas relacionadas com a severidade dos sintomas. Embora os cloroplastos não estejam envolvidos diretamente na replicação da maioria dos vírus, tem sido demonstrada, através de microscopia eletrônica, a presença de partículas virais da família *Tymoviridae* em vesículas periféricas dos

cloroplastos de plantas de repolho infectadas, sugerindo que as partículas virais são montadas na superfície destas organelas (Matthews, 1991).

Embora haja exceções, as infecções causadas por vírus geralmente levam a uma redução na taxa de transpiração, redução esta freqüentemente correlacionada com diminuição da abertura do estômato foliar. Em folhas de cevada infectadas pelo BYDV, houve uma diminuição na taxa de transpiração nas folhas sistemicamente infectadas, cuja redução foi ainda mais pronunciada em plantas susceptíveis mostrando severo amarelecimento foliar (Esaú, 1957; Orlob & Army, 1961).

O acúmulo de carboidratos em tecidos foliares é uma característica comum de várias doenças causadas por vírus, como BCTV – Beet Curly Top Virus (Panopoulos *et al.*, 1972), BYV (Watson, 1971), BYDV (Orlob & Army, 1961) e PLRV (Beemster, 1987). Este acúmulo geralmente é acompanhado pela necrose do floema e/ou deposição de gomas, especialmente nos estádios finais de infecção, sugerindo que a dificuldade na translocação de carboidratos seria uma das razões do acúmulo destes nas folhas. Entretanto, um número de observações sugere que a degeneração do floema não é o único fator envolvido. Há exemplos mostrando que o acúmulo de carboidratos precedeu as mudanças detectáveis nos tecidos floemáticos em plantas de batata infectadas pelo PLRV. Foi então proposto que, o acúmulo de carboidratos se deveria principalmente a uma atividade enzimática prejudicada que estaria envolvida na interconversão de carboidratos, mais do que na redução da translocação (Faccioli *et al.*, 1982).

Outros trabalhos também foram relatados mostrando um acúmulo de carboidratos em folhas de tomate infectadas pelo Curly Top Virus e em folhas de *Physalis floridiana* infectadas pelo PLRV. Este acúmulo foi associado ao fato de que a taxa de sacarose foi reduzida nas folhas infectadas, enquanto as taxas das hexoses, glicose e frutose aumentaram. Já que a sacarose é geralmente o principal carboidrato transportado pelo floema, foi sugerido que a não

conversão de hexoses em sacarose seria a causa do reduzido transporte e acúmulo de carboidratos em folhas de plantas infectadas (Panopoulos *et al.*, 1972).

Anos mais tarde, foi então observado pela primeira vez que, a proteína de movimento codificada pelo TMV (MP30) aumenta o limite de exclusão dos plasmodesmas (Wolf *et al.*, 1989). Os luteovirus codificam uma suposta proteína de movimento, denominada MP17, com propriedades similares à MP30 do TMV. A localização desta proteína nos plasmodesmas do floema (Schmitz *et al.*, 1997) e a alteração da estrutura destes plasmodesmas (Herbers *et al.*, 1997) sustentam a idéia do envolvimento desta proteína no movimento do vírus. Essas alterações estruturais dos plasmodesmas provavelmente prejudicam também o transporte de moléculas essenciais para o carregamento de carboidratos no floema (Herbers *et al.*, 1997).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

- Caracterizar o agente causal da Síndrome do Amarelecimento Foliar da Cana-de-Açúcar (SAFCA) quanto à forma de transmissão, círculo de hospedeiras, propriedades físico-químicas e serológicas e alguns aspectos fisiológicos da planta infectada.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Ratificar a etiologia viral da SAFCA e caracterizar o seu agente causal.
- Desenvolver um método de purificação viral mais eficiente para a SAFCA.
- Determinar as propriedades físico-químicas e serológicas das partículas virais associadas à SAFCA.
- Produzir anticorpos policlonais específicos.
- Desenvolver um método serológico eficiente para o diagnóstico.
- Verificar se o agente causal é transmitido por inoculação mecânica para a cana-de-açúcar e outras gramíneas.
- Avaliar diferentes espécies de afídeos quanto a sua eficiência na transmissão do vírus associado à SAFCA.
- Avaliar a possível correlação entre a concentração de vírus nos tecidos e a manifestação dos sintomas em diferentes variedades.
- Avaliar o efeito da infecção viral nos teores de açúcares em variedades de cana-de-açúcar com diferentes níveis de sensibilidade ao vírus.
- Determinar possíveis alterações na atividade de peroxidases por efeito da infecção viral em variedades de cana-de-açúcar sadias e infectadas pelo vírus exibindo os sintomas da doença.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

A parte experimental envolvendo os testes de transmissão, a purificação do vírus, a caracterização da partícula viral e a produção de anti-soro foi feita na Universidade de Minnesota (USA), sendo que os demais experimentos foram realizados no Departamento de Fisiologia Vegetal, do Instituto de Biologia da Unicamp e em colaboração com a Copersucar.

#### **3.1. Fonte de Vírus e Material Vegetal**

Plantas de cana-de-açúcar exibindo os sintomas da doença foram usadas para a purificação das partículas virais associadas à SAFCA. As variedades utilizadas foram SP 70-1143, SP 71-6163, SP 71-1406, RB 72-454 originadas do Brasil; CP 65-357 dos Estados Unidos e H 73-6110 do Hawaii. Os toletes que deram origem a estas plantas foram gentilmente cedidos pela Copersucar. Para fins de diagnose foram utilizadas como controle negativo plantas originadas de semente (“seedlings”) já que o vírus não é transmitido através da semente.

Para estudos fisiopatológicos, que exigem comparação entre materiais geneticamente iguais e de desenvolvimento similares, mas infectado ou não pelo vírus, foram utilizadas duas abordagens para obtenção de materiais adequados. Uma delas foi a obtenção de material livre de vírus através da cultura de micro-meristemas provenientes de material infectado. A segunda abordagem consistiu em procurar no campo, plantas de diferentes variedades, que pudessem estar ainda livres do vírus.

As amostras obtidas da triagem de plantas de campo (sadias e infectadas), foram então testadas por DAS-ELISA e se destinaram ao estudo das alterações resultantes após a infecção viral, relacionadas à manifestação dos sintomas e à concentração do vírus, à atividade de peroxidases e aos teores de açúcares solúveis contidos nas folhas.

### 3.2. Testes de Transmissão do Vírus

Os testes de transmissão do vírus foram feitos por inoculação mecânica e com afídeos. A inoculação mecânica foi feita utilizando-se extratos de folhas de cana com sintomas, parcialmente purificados como descritos por Ahlawat *et al.* (1996). As amostras parcialmente purificadas foram observadas ao microscópio eletrônico para confirmar a presença de partículas do tipo isométricas. Dez plantas de cada espécie foram utilizadas para este experimento. Os extratos foram levemente friccionados sobre a superfície de folhas previamente polvilhadas com carborundum, em plantas saudas de cana-de-açúcar das variedades CP 65-357 e H 73-6110, em plantas de milho (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.), Johnsongrass (*Sorghum halepense* L.) e *Erianthus* sp. As plantas de cana-de-açúcar inoculadas mecanicamente foram mantidas em uma câmara de crescimento por 12 meses para observação dos sintomas e testadas aos 6 e 12 meses por microscopia eletrônica e por DAS-ELISA. As plantas das outras espécies foram mantidas por 6 meses para observação dos sintomas e, ao final deste período foram também testadas por microscopia eletrônica e por DAS-ELISA.

Os testes de transmissão do vírus por insetos foram feitos com três espécies de afídeos que colonizam cana-de-açúcar: *Melanaphis sacchari* (Zehntner), *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) e *Sipha flava* (Forbes). O objetivo destes primeiros testes foi determinar se o vírus associado à SAFCA é transmitido de plantas de cana-de-açúcar com sintomas, para plantas saudas, através destas três espécies de afídeos. Para este teste foram usadas 10 plantas saudas de cana-de-açúcar da variedade CP 65-357. Os afídeos foram mantidos por 48-72 horas em plantas infectadas de diferentes variedades para aquisição do vírus. Após o período de aquisição, porções da folha contendo entre 20 a 30 afídeos foram colocadas em cima das folhas de plantas saudas por 12 horas. Em seguida os afídeos foram exterminados com

inseticida. Os controles consistiram de plantas sadias infestadas com afídeos mantidos em plantas livres de vírus. Após a inoculação, as plantas foram mantidas por 12 meses para a observação dos sintomas, em uma câmara de crescimento, à prova de afídeos e com temperatura controlada (25°C / dia e 20°C / noite), para depois serem indexadas por microscopia eletrônica e DAS-ELISA para a detecção do vírus. Estes experimentos de transmissão por afídeos foram repetidos duas vezes.

Uma segunda série de testes de transmissão por afídeos foi realizada com *M. sacchari* e *R. maidis*. O objetivo destes testes foi determinar se estes afídeos poderiam transmitir as partículas virais associadas à SAFCA, de plantas infectadas de cana-de-açúcar para plantas sadias de milho, sorgo e *Erianthus* sp. Os testes de transmissão com *M. sacchari* e *R. maidis* foram feitos como descrito anteriormente e as plantas foram mantidas por 6 meses após a inoculação para a observação dos sintomas e detecção do vírus por microscopia eletrônica e por DAS-ELISA.

---

### **3.3. Purificação do Vírus**

O vírus foi purificado a partir de plantas cultivadas em casa de vegetação, em função das plantas originadas do campo estarem frequentemente contaminadas por bactérias, dificultando assim, a eliminação destes contaminantes das preparações purificadas.

O protocolo aqui descrito foi baseado em diferentes métodos de purificação do vírus (Takanami & Kubo, 1979; D'Arcy *et al.*, 1983; Waterhouse & Helms, 1984; Matsubara *et al.*, 1985; D'Arcy *et al.*, 1989 e Lockhart *et al.*, 1992) e é o resultado de várias modificações.

Folhas infectadas de plantas mantidas em casa de vegetação foram cortadas em pequenos pedaços, congeladas e mantidas a – 90°C. O tecido congelado foi pulverizado com

gelo seco ou com nitrogênio líquido em um moedor elétrico de café, utilizando-se três volumes (peso/volume) de 250 mM de tampão de extração com NaKPO<sub>4</sub>, pH 6,0, contendo 0,2% (v/v) de 2-mercaptoetanol, 2% (v/v) da enzima Celluclast 1,5 L (Novo Nordisk), 1% (p/v) Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> e 0,01 M DIECA. Esta mistura foi agitada por 4 horas à temperatura ambiente, homogeneizada por 2 minutos em um liquidificador e filtrada em duas camadas de gaze. Ao volume total filtrado foi adicionado Triton X-100 em uma concentração final de 0,8 % (v/v) e esta mistura foi agitada “overnight” (4 °C). O extrato foi clarificado pela adição de um volume igual de clorofórmio/n-butanol (1:1, v/v) seguido de centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos. A fase aquosa foi recuperada e o vírus concentrado pela adição de 10% (p/v) de polietilenoglicol (MW 10.000) e 2% (p/v) de NaCl. O precipitado foi recuperado pela centrifugação a 12.000 x g por 20 minutos e os “pellets” foram ressuspensos em 100 mM de tampão NaKPO<sub>4</sub>, pH 7,0, contendo 0,65% (v/v) de Triton X-100. O extrato parcialmente purificado foi clarificado por centrifugação a 20.000 x g por 15 minutos e o vírus foi então concentrado por ultracentrifugação a 148.000 x g por 90 minutos, sobre um colchão de sacarose de 5,0 mL a 30% em 100 mM de tampão NaKPO<sub>4</sub>, pH 7,0. Os “pellets” formados foram ressuspensos neste mesmo tampão, colocados sobre um gradiente de sacarose de 10 – 40 % e centrifugados a 130.000 x g por 3 horas e 35 minutos, a 6 °C. O gradiente foi fracionado em alíquotas de 1,0 mL, começando pela base do tubo, usando um fracionador de gradiente de densidade (Isco, modelo 185). As frações contendo as partículas virais livres de contaminantes foram coletadas e agrupadas, para concentrar o vírus numa única amostra, centrifugando-as novamente por uma hora e trinta minutos a 223.000 x g a 4 °C. O “pellet” final, contendo as partículas, foi ressuspensão em 500 µL de 10 mM de tampão NaKPO<sub>4</sub>, pH 7,0. A concentração do vírus das preparações purificadas foi estimada em um

espectrofotômetro Beckman (DU-40) usando um coeficiente de extinção de 8,6 (1,0 mg/mL a 260 nm em cubeta de 1,0 cm de caminho óptico) segundo Takanami & Kubo (1979).

A pureza das partículas virais foi monitorada durante as várias etapas do processo de purificação, através de microscopia eletrônica de transmissão.

### **3.4. Determinação da Densidade da Partícula Viral**

O “pellet” final obtido no processo de purificação, já contendo o vírus purificado, foi coletado e utilizado para determinar a densidade da partícula viral.

A densidade do vírus foi então determinada por ultracentrifugação da amostra, em uma solução de Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 31% (p/p) em 100 mM de tampão NaKPO<sub>4</sub>, pH 6,0, por 24 horas a 223.000 x g, à temperatura de 20 °C. O gradiente formado durante a centrifugação foi fracionado em alíquotas de 0,25 mL e observadas ao microscópio eletrônico, para verificar a presença do vírus. O índice de refração das amostras contendo o vírus foi determinado num refratômetro modelo Abbe. A densidade do meio contendo as partículas virais foi então calculada segundo a fórmula:

$\rho^{25} = 10,2402 \eta^{25} - 12,6483$  onde  $\rho^{25}$  = densidade g/c<sup>3</sup> e  $\eta^{25}$  = índice de refração a 25 °C (Bruner & Vinograd, 1965).

### **3.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Amostras purificadas de vírus e parcialmente purificadas foram montadas em grades de cobre para microscopia eletrônica, cobertas com Formvar e carbono e contrastadas com 1% de

ácido fosfotúngstico, pH 5,0 (PTA), contendo 100 µg/mL de Bacitracin como espalhante. A observação das partículas foi feita em um microscópio eletrônico de transmissão Philips modelo CM 12. A calibração do microscópio eletrônico foi feita conforme descrição feita por Wrigley (1968).

### **3.6. Produção de Anti-Soro para o ScYLV**

Anti-soro policlonal foi produzido pela imunização de dois coelhos da raça Branco da Nova Zelândia, com uma injeção subcutânea primária de 50 µg de vírus purificado emulsificado com adjuvante Hunter TiterMax (Sigma-Aldrich). Outras três injeções subcutâneas de vírus de 20 µg cada, emulsificadas com adjuvante incompleto de Freund, foram administradas subsequente em intervalos de duas semanas. Amostras de sangue foram coletadas em intervalos de uma semana, sendo a primeira amostra coletada duas semanas após a última injeção. O sangue coletado foi coagulado por 1 hora a 37 °C e submetido à centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante contendo o soro foi coletado e mantido a 4 °C. O título do anti-soro foi determinado por uma variação da técnica de ELISA, denominada de PTA-ELISA (“Plate Trapped Antigen”) como descrito por Mowat & Dawson (1987). A primeira etapa deste método consiste em incubar na placa de ELISA, amostras contendo o vírus purificado, diluído em tampão carbonato, para avaliar a especificidade do anti-soro para o ScYLV e extrato de folhas de cana-de-açúcar sadias (“seedlings”) como controle, para a possível detecção de anticorpos inespecíficos, também preparado em tampão carbonato, na proporção de 1,0 grama de tecido para 5,0 mL de tampão. Quatro replicações foram usadas para cada amostra. Após lavagem, as amostras de anti-soro a

serem testadas, diluídas de 1:1.000 até 1:40.000 foram colocadas na placa e incubadas. Em seguida, após lavagem, adicionou-se o anticorpo secundário, preparado contra a IgG de coelho (“Goat anti-rabbit immunoglobulin G” - Sigma-Aldrich), conjugado com fosfatase alcalina diluído 1:35.000. Finalmente foi adicionado o substrato PNPP (p-nitrophenylphosphate), na concentração de 0,5 mg/mL e a absorbância a 405 nm determinada após 1 hora da adição do substrato.

A purificação das imunoglobulinas contidas no soro foi feita por precipitação com uma solução de sulfato de amônia, 50% de saturação e separadas através de uma coluna de cromatografia de DEAE-Cellulose. Alíquotas de 1,0 mL eluídas da coluna foram avaliadas no espectrofotômetro em UV (280 nm) e todas aquelas cuja absorbância era superior a 0,500 foram agrupadas e ajustadas para uma concentração final de IgG de 1,0 mg/mL. A conjugação da IgG com a enzima fosfatase alcalina (IgG-AP), foi feita utilizando 0,06% de glutaraldeído, deixando por 4 horas à temperatura ambiente (MacKenzie, 1990). Esta mistura foi então dialisado em tampão 10 mM NaKPO<sub>4</sub>, pH 7,4 contendo 0,85% de NaCl e 0,02% de KCl, para remover o glutaraldeído. À esta solução, foi adicionado BSA (Albumina de Soro Bovino), na concentração de 5,0 mg/mL, para preservar o conjugado.

### **3.7. Testes Serológicos**

O teste ELISA utilizado foi o “Double Antibody Sandwich” ou DAS-ELISA como descrito por Clark & Adams (1977), com algumas modificações. A técnica de DAS-ELISA foi utilizada para o diagnóstico de todas as plantas utilizadas neste trabalho e também para comparações serológicas com outros luteovirus.

As placas de ELISA foram cobertas com 100  $\mu$ L do anti-soro produzido para o ScYLV (AS-ScYLV), na diluição de 1:1.000 ou com IgG purificada desse anti-soro (1,0  $\mu$ g/mL), em tampão carbonato, pH 9,6. Anti-soros preparados contra outros luteovirus foram utilizados, tais como: BYDV-PAV, BYDV-MAV, BYDV-RMV e BYDV-SGV, obtidos da firma Agdia. Anti-soros para o PLRV, BLRV e para o BWYV foram obtidos da American Type Culture Collection.

As amostras testadas foram preparadas triturando 1,0 g de tecido foliar com N<sub>2</sub> líquido e homogeneizadas em 5 volumes de tampão 100 mM NaKPO<sub>4</sub>, pH 6,0, acrescido de 1% (p/v) de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, e 0,05% (v/v) de Tween-20. Os extratos foram centrifugados a 12.000 x g por 15 minutos e 100  $\mu$ L do sobrenadante foram usados para incubar a placa. Para avaliar a especificidade do AS-ScYLV foram utilizadas amostras de plantas infectadas com outros luteovirus. Folhas de aveia infectadas por diferentes estirpes do BYDV, (fornecidas pelo Dr. F. Gilldow, Pennsylvania State University) e folhas de batata infectadas com PLRV, de beterraba com BWYV e de feijão pelo BLRV (fornecidas pelo Dr. E. Bantari, University of Minnesota), foram extraídas seguindo o mesmo método de extração usado para as plantas de cana. Plantas de cana-de-açúcar obtidas por sementes (“seedlings”), foram utilizadas como controle sadio.

O conjugado de imunoglobulina G com fosfatase alcalina (IgG-AP) foi diluído a 1:1.000 em tampão Tris/HCl 20 mM, pH 7,4, contendo 150 mM de NaCl, 0,05% (v/v) de Tween-20 (TTBS), 0,2% (p/v) de BSA (Albumina de Soro Bovino) e 2% de leite em pó desnatado (Bio-Rad). Entre as primeiras etapas, a lavagem das placas foi feita com tampão PBST, sendo as últimas feitas com tampão TTBS. Todas as etapas foram incubadas por 4 horas à temperatura ambiente ou “overnight” a 4 °C. Após a incubação das placas com o conjugado, foi adicionado o substrato PNPP (p-nitrofenil fosfato), na concentração de 0,5

mg/mL. A absorvância foi lida a 405 nm, num leitor de ELISA (BioRad), começando após 1 hora da adição do substrato. As amostras com absorvância maior que duas vezes a média dos controles negativos (“seedlings”) foram consideradas positivas.

A concentração do vírus foi determinada através de DAS-ELISA, baseando-se numa curva padrão feita com diferentes concentrações do vírus purificado (200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 ng/mL).

Os testes de ISEM foram feitos segundo Vega *et al.* (1995), com algumas modificações. Telinhas de cobre para microscopia eletrônica previamente cobertas com Formvar e carbono, foram incubadas com anti-soro preparado para o vírus (AS-ScYLV), diluído a 1:1.000, por 45 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem com tampão 10 mM NaKPO<sub>4</sub>, pH 7,0, as telinhas foram incubadas com extratos de folhas maceradas, conforme descrito para o teste de DAS-ELISA, durante 2-3 horas à temperatura ambiente. Após incubação com o extrato, as telinhas foram novamente lavadas e contrastadas com 1% de ácido fosfotúngstico (PTA), pH 5,0 para observação ao microscópio eletrônico.

### **3.8. RT – PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)**

A técnica de RT-PCR aqui empregada seguiu protocolo descrito por Gonçalves *et al.* (2002), com algumas modificações, utilizando-se “primers” que amplificam um fragmento de 450 pb da região que codifica o capsídeo viral (gentilmente fornecidos pelo Dr. M. C. Gonçalves, Instituto Biológico/SP). As seqüências dos primers foram as seguintes: sense primer – P1 Forward – “SCF” (posição 3660-3882) GCT.AAC.CGC.TCA.CGA.AGG.AAT.GT; antisense primer – P2 Reverse- “SCR” (posição 4091-4109) GAA.GGG.GGC.CGG.GAA.GAC.T. (Pharmacia Biotech, Netherlands).

Para extração do RNA total, amostras de folhas de cana-de-açúcar foram trituradas com N<sub>2</sub> líquido e uma quantidade equivalente a 500 µL do pó obtido homogeneizada em 1,0 mL de Trizol (Gibco). A este volume, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e centrifugados a 12.000 x g por 15 minutos. Após centrifugar, a fase aquosa foi retirada, misturada com igual volume de isopropanol e novamente centrifugada a 12.000 x g por 5 minutos. O “pellet” contendo o RNA foi lavado com etanol 75% e ressuspensão em 50 µL de água milli Q estéril e conservado a -20°C.

Para obtenção da primeira fita de DNA (cDNA), o material foi incubado a 95 °C por 5 minutos, para desnaturação do ácido nucléico e a 40 °C por 10 minutos, para ocorrer o anelamento. O meio de reação da transcriptase reversa continha 1,0 µL de reverse primer antisense (SCR), 3,0 µL do RNA extraído da amostra e 4,0 µL de uma mistura contendo 5 X Strand Buffer (Gibco), 1,0 µL de RNA Guard (Gibco), 1,0 µL de 0.1 M DTT, 1,0 µL de 10 mM dNTP (mix de nucleotídeos) e 200 U da Superscript II (Gibco). As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida por 1 hora a 37 °C.

A mistura para a reação de PCR consistiu de 5,0 µL de 10 X PCR Buffer (Gibco), 1,5 µL de 50 mM Mg Cl<sub>2</sub> (Gibco), 1,0 µL de 10 mM dNTP (mix de nucleotídeos), 2,5 µL de reverse primer antisense (SCR), 2,5 µL de forward primer (SCF), 0,5 µL da enzima Taq polimerase (Amplitaq Gold – Perkin Elmer), 34 µL de H<sub>2</sub>O e 3,0 µL da preparação contendo a primeira fita de cDNA. O marcador de peso molecular (“Ladder” 1 kb) utilizado foi obtido da Gibco. As amplificações foram feitas no termociclador, Perkin Elmer Gene Amp, PCR System 2400, incubando inicialmente por 10 minutos a 94 °C e a seguir 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 60 °C e 2 minutos a 72°C. Foi acrescentada, no final, uma etapa adicional de 7 minutos também a 72°C.

### 3.9. Análises Eletroforéticas da Proteína Viral

Amostras contendo 30  $\mu$ L do vírus purificado foram submetidas à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) num sistema descontínuo (Laemmli, 1970), usando gel concentrador de 5% e gel separador de 12%. A eletroforese foi feita em 110 V por 105 minutos utilizando-se a unidade de eletroforese vertical Mini-Protean (Bio-Rad). As bandas polipeptídicas foram visualizadas pelo contraste com Coomassie-Blue R 250 (Sigma-Aldrich) e a massa molecular relativa ( $M_r$ ) dos polipeptídeos foi estimada por análises de regressão exponencial com marcadores de proteína a cada 10 Kda (GIBCO).

O teste de Western blot foi feito após transferência eletroforética dos polipeptídeos para a membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas por dois minutos em 2% de Tween-20 e incubadas “overnight” a 4 °C com anticorpo primário (AS-ScYLV) diluído a 1:5.000 em TTBS contendo 1% de gelatina (Bio Rad). Após lavagem com TTBS, as membranas foram incubadas por 4 horas à temperatura ambiente com o conjugado “Goat anti-rabbit immunoglobulin G – alkaline phosphatase” (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:30.000 em tampão TTBS contendo 1% de gelatina (Bio Rad). Marcadores de peso molecular biotinizados (Bio-Rad) foram detectados com o conjugado Extravidin-Alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich). As membranas foram incubadas por alguns minutos (5 – 10 minutos) na solução BCIP/NBT contendo 8 mg de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-phosphate) e 16 mg de NBT (nitroblue tetrazolium), até que as bandas de proteínas pudessem ser visualizadas.

Para verificar a possível glicosilação da proteína do capsídeo viral, amostras purificadas do vírus foram submetidas à eletroforese como descrito acima e após transferência para membrana de nitrocelulose, foi utilizado um kit específico para detecção de glicoproteínas (“Immuno-blot Glycoprotein Detection” – Bio Rad), utilizando ovoalbumina como proteína-padrão (1,0 mg/mL).

### **3.10. Caracterização do Ácido Nucléico Viral**

Amostras contendo 80 µg de vírus purificados foram ressuspensas em 50 µL de tampão 10 x DNase Buffer pH 7,5 (Promega) acrescido de 5,0 µL (cinco unidades) da enzima desoxiribonuclease livre de ribonuclease (RQ 1 DNase, Promega) e incubadas a 37 °C por 15 minutos, para digerir resíduos de DNA vegetal. Proteinase K e SDS foram então adicionados a uma concentração final de 1,0 µg/µL e 0,5% (p/v) respectivamente e a mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Esta solução foi extraída duas vezes com um volume igual de fenol/clorofórmio/álcool-isoamílico (25:24:1) e, duas vezes com clorofórmio/álcool-isoamílico (24:1). O ácido nucléico foi precipitado pela adição de 0,1 volume de tampão acetato de sódio 3 M, pH 5,5 e um volume de isopropanol. O precipitado foi coletado por centrifugação a 20.800 x g por 30 minutos, lavado com etanol a 70%, seco a vácuo e ressuspenso em 10 mM de Tris/HCl, pH 7,5, contendo 1 mM de EDTA. O volume final foi dividido em 10 alíquotas de 5,0 µL cada. Este volume foi então usado para estimar o tamanho do ácido nucléico, por eletroforese em gel de agarose 1% com 50 mM de tampão MOPS (3-N-Morpholinopropanesulfonic acid), pH 7,0, contendo 40 mM de acetato de sódio e 5 mM de EDTA. Os marcadores de massa molecular de RNA de fita simples (0,2 a 10 Kb) foram obtidos da Sigma-Aldrich. O tipo de ácido nucléico foi determinado pela digestão com DNase, RNase e S-1-Nuclease, como descrito por Lockhart (1990).

### **3.11. Análises dos Açúcares Solúveis**

Os materiais obtidos por cultura de micro-meristemas e cultivados em casa de vegetação não atingiram a maturidade necessária para as observações relacionadas ao

metabolismo de açúcares. Além disso, ao serem testadas por DAS-ELISA, muitas plantas ainda se encontravam infectadas pelo vírus. Por esse motivo, para esses estudos foram utilizados material sadio e infectado obtidos da triagem de plantas de campo através de testes DAS-ELISA.

Onze variedades de cana-de-açúcar (SP 80-3280, SP 85-3877, SP 80-1842, SP 81-3250, SP 87-344, SP 80-185, SP 80-1816, SP 86-155, SP 87-396, SP 84-2025 e SP 71-6163), foram analisadas quanto ao conteúdo de açúcares solúveis. As análises foram divididas em 2 etapas, sendo a primeira feita com folhas inteiras (nervura + lâmina foliar), da folha + 1 e a segunda, separando-se a nervura central da lâmina foliar (folhas + 1 e + 4). Três plantas (replicações) de cada variedade, com aproximadamente 15 meses de idade foram submetidas à análise de açúcares solúveis. Para isto foi preparado extrato de folhas na proporção de 1,0 g de tecido para 5,0 mL de água deionizada (milli Q), centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C e filtrado através de membrana Millipore (0,45 µm). Aliquotas de 100 µL desse extrato foram injetadas numa coluna de HPLC Shodex KS 801, usando o cromatógrafo Shimadzu (LC 10 AD). Os principais picos de eluição obtidos foram identificados como correspondentes à sacarose, glicose e frutose, por meio de padrões e quantificados com base na área de cada um deles.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística da variância e a comparação das médias feita pelo teste de Tukey.

### **3.12. Determinações Enzimáticas – Atividade de Peroxidases**

As análises para a determinação enzimática de peroxidases (EC 1.11.1.7) foram feitas seguindo protocolo descrito por Peyrano *et al.* (1997) com algumas modificações. Os ensaios

foram feitos através da oxidação de dois substratos, guaiacol e siringaldazina, sendo que o primeiro detecta todas as isoformas de peroxidases e o segundo detecta as peroxidases ligadas à parede celular e associadas à lignificação (Goldberg *et al.*, 1983).

As extrações foram feitas com folhas (folha + 1) obtidas de plantas das variedades SP 84-2025, SP 81-3250 (sadias e infectadas) e de plantas de SP 71-6163 infectadas, mas com ou sem sintomas visíveis.

As amostras de folhas foram trituradas com N<sub>2</sub> líquido e depois maceradas em 50 mM tampão fosfato pH 6,0, na proporção 1,0 g de tecido para 5,0 mL de tampão. O extrato foi centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos, “o pellet” foi descartado e o sobrenadante obtido foi utilizado nos ensaios enzimáticos.

O meio de reação para determinar a atividade da guaiacol-peroxidase foi composto de 5 mM de guaiacol (Sigma), 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) e 50 mM de tampão fosfato (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH 6,0 (NaOH). Para cada 3,0 mL do meio de reação, foram adicionados 30 µL do extrato foliar. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 470 nm e a leitura feita a cada 10 segundos, por um período de 3 minutos.

O meio de reação para determinar a atividade da siringaldazina-peroxidase foi composto de 19 µM de siringaldazina (Sigma), 54 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) e 50 mM de tampão fosfato (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) pH 7,4, e a temperatura foi mantida aos 35 °C. Após acrescentar 120 µL do extrato foliar, foi determinada a absorbância a 530 nm e a leitura feita a cada 10 segundos, por um período de 3 minutos.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística da variância e a comparação das médias feita pelo teste de Tukey.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização do Vírus

#### 4.1.1. Testes de Transmissão do Vírus

Os testes de transmissão do vírus por inoculação mecânica foram negativos. Nenhum sintoma foi observado nas plantas de cana-de-açúcar, milho, sorgo, Johnsongrass e *Erianthus* sp. que foram inoculadas mecanicamente com extratos parcialmente purificados do ScYLV. Nestas plantas não foram detectadas partículas do vírus por microscopia eletrônica nem por DAS-ELISA.

A reprodução dos sintomas de amarelecimento da nervura, característico da SAFCA, foi obtida em plantas de cana-de-açúcar da variedade CP 65-357 através da transmissão do vírus por afídeos. Os sintomas foram observados nas dez plantas inoculadas por afídeos das espécies *M. sacchari* (Figura 4) e *R. maidis*, porém não uniformemente. Algumas plantas desenvolveram os sintomas entre 6-8 semanas após a inoculação, sendo que outras demoraram mais para desenvolver os sintomas (num período de até 8 meses após a inoculação). Os sintomas da doença não foram desenvolvidos nas plantas que haviam sido inoculadas pelo afídeo *S. flava* e também não foram detectadas partículas virais nestas plantas.

As plantas de milho, sorgo, Johnsongrass e *Erianthus* sp. que foram inoculadas da mesma forma e pelos mesmos afídeos (*M. sacchari* e *R. maidis*) não apresentaram os sintomas da doença após inoculação e também apresentaram resultados negativos nos testes serológicos.



**Figura 4.** Início dos sintomas típicos do amarelecimento foliar na variedade CP 65-357, após inoculação por *Melanaphis sacchari* alimentados em plantas infectadas pelo ScYLV.

#### **4.1.2. Purificação e Propriedades da Partícula Viral**

Nas tentativas de purificação do vírus a partir de plantas do campo observou-se frequentemente a contaminação com bactérias flageladas, ficando difícil a eliminação destas durante o processo de purificação. Ao se usar folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação para purificação da partícula viral, este tipo de contaminação não foi observada.

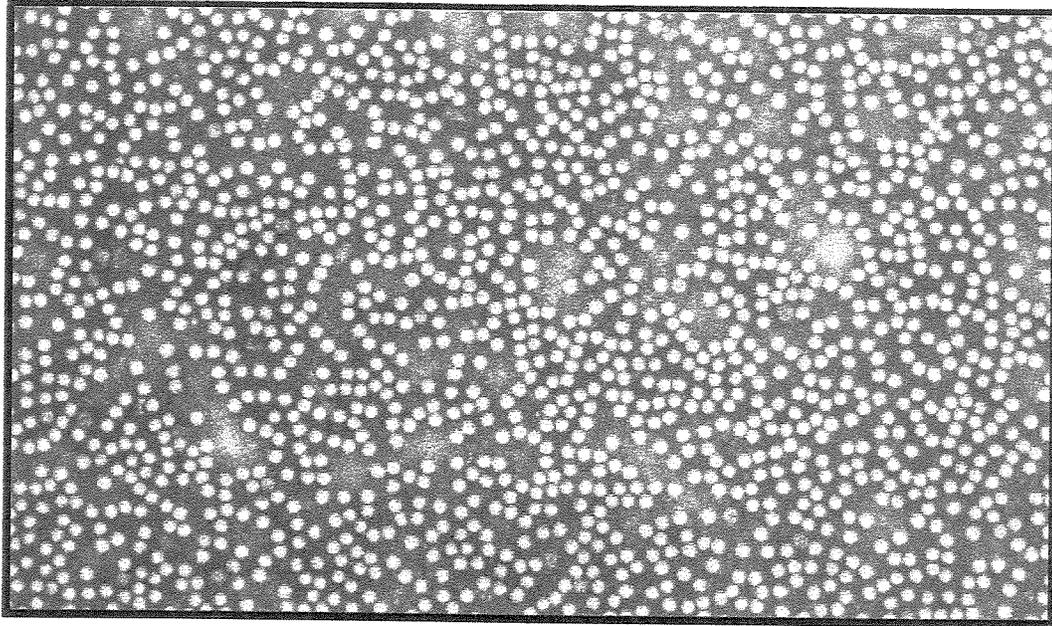
O procedimento aqui adotado para purificação do vírus foi o resultado de várias combinações, sendo que durante a otimização deste procedimento, foram introduzidas modificações quanto aos tampões e enzimas de extração (Celluclast, Driselase, Extractase e

Ultrazym 100), uso de diferentes anti-oxidantes e os diferentes tipos de solventes orgânicos utilizados durante a etapa de clarificação. Das enzimas testadas, os melhores resultados foram obtidos com o uso da Celluclast, sendo que uma quantidade substancialmente menor de partículas virais foi observada quando esta enzima foi omitida do tampão de extração. Também foi observada uma menor concentração de partículas virais quando a extração do vírus foi feita com a mesma enzima, porém em pHs 7,0 ou 8,0, sendo o pH 6,0 o melhor para a atividade da enzima, resultando numa extração com uma maior concentração de partículas. Este protocolo permitiu obter preparações purificadas contendo alta concentração de partículas virais e livres de contaminantes. O rendimento de vírus purificado foi equivalente a 200 µg/kg de tecido foliar. Muitas amostras purificadas, quando observadas ao microscópio eletrônico, estavam contaminadas com estruturas do tipo isométricas, de diâmetro aproximado de 15 nm, interpretadas como proteínas da planta hospedeira. Tais estruturas, somente observadas em alta magnificação, foram eliminadas das preparações com o uso da mistura clorofórmio/n-butanol nas etapas de clarificação.

As partículas virais purificadas observadas ao microscópio eletrônico, contrastadas com 1% de fosfotungstato de potássio pH 5,0, apresentaram um diâmetro aproximado de 25–28 nm (Figura 5). Quando contrastadas do mesmo modo, mas em pH 6,0 ou 7,0, as partículas pareciam deformadas (inchadas) e seu tamanho variava.

O espectro de absorção em UV das amostras purificadas mostrou valores da relação  $A_{260}/A_{280}$  de 1,7 – 1,9. Para se determinar a densidade da partícula, foram feitos testes de estabilidade do vírus utilizando soluções de sulfato de céσιο ( $Cs_2SO_4$ ) e cloreto de céσιο (CsCl) em pH 6,0, 7,0 e 8,0. Após a ultracentrifugação do gradiente, foi verificada uma baixa concentração de partículas virais e a deformação das mesmas por meio da observação ao microscópio eletrônico, quando usado CsCl em pH 7,0 ou 8,0, ao passo que em pH 6,0 com  $Cs_2SO_4$  observou-se grande número de partículas sem deformação. Isto permitiu concluir que

o vírus é mais estável em pH 6,0 em meio contendo  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$ . Nestas condições a densidade das partículas virais mostrou ser de  $1,30 \text{ g/cm}^3$ .



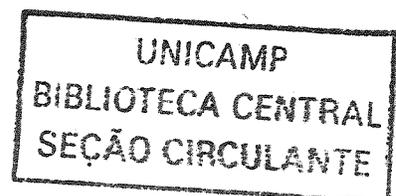
**Figura 5.** Partículas virais purificadas a partir de folhas de cana-de-açúcar infectadas pelo ScYLV. Preparação após a ultracentrifugação em gradiente de sacarose, diluída cinco vezes e contrastada com fosfotungstato de potássio em pH 5,0. Observar a alta concentração de partículas. (Aumento: 80.000 X).

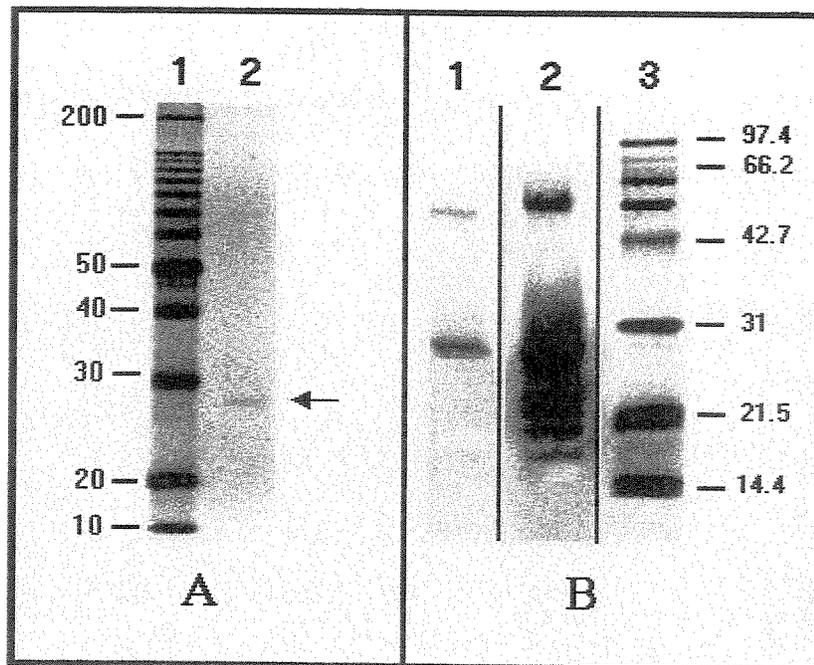
#### 4.1.3. Caracterização da Proteína Viral

Análises eletroforéticas das partículas virais purificadas do ScYLV continham uma proteína principal de aproximadamente 27 kDa a qual demonstrou ser um único polipeptídeo, representado como uma única banda, detectada pelo contraste com Coomassie blue (Figura 6A). Uma proteína migrando na mesma posição foi detectada por testes de Western blot usando o anti-soro para o ScYLV, que provavelmente corresponde à proteína do capsídeo viral. Uma proteína adicional de aproximadamente 58 kDa e quatro menores (25 - 17 kDa)

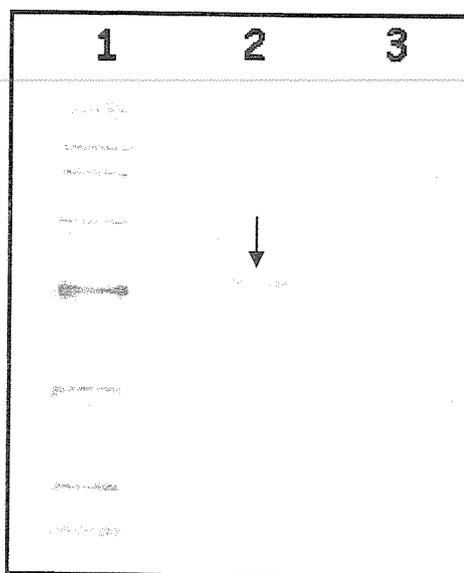
foram detectadas usando o mesmo anti-soro (Figura 6B, linha 2). Anti-soro para BYDV-RPV também detectou duas bandas, a principal de 27 kDa e uma adicional de 58 kDa (Figura 6B, linha 1). Nenhuma das proteínas presentes nas preparações purificadas do ScYLV foram detectadas por anti-soro preparado contra plantas sadias de cana-de-açúcar e o anti-soro para o ScYLV não detectou nenhuma banda em amostras parcialmente purificadas de plantas sadias de cana-de-açúcar.

A proteína do capsídeo viral não era glicosilada (figura 7, linha 3), pois não foi detectada no teste para proteínas glicosiladas. Somente a proteína controle, ovoalbumina, foi detectada neste ensaio (figura 7, linha 2).





**Figura 6.** Análises eletroforéticas e serológicas do ScYLV (SDS-PAGE e Western blot). **A:** Detecção de um único polipeptídeo de 27-kDa (indicado pela seta) contrastado por Coomassie blue (linha 2). Linha 1 contém os marcadores moleculares. **B:** Polipeptídeos detectados por Western blot após SDS-PAGE. Linha 1: polipeptídeos detectados por anticorpos preparados para o BYDV - RPV; linha 2: polipeptídeos detectados por anticorpos contra o ScYLV; linha 3: marcadores biotinizados de peso molecular; os tamanhos estão indicados a direita.

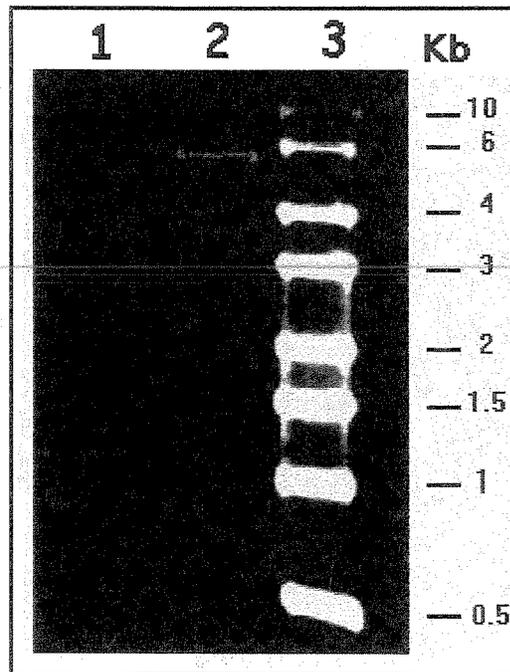


**Figura 7.** Análise eletroforética da proteína viral após transferência para membrana de nitrocelulose. Linha 1 = Marcador Molecular; Linha 2 = Ovoalbumina usada como padrão após contraste com solução de BCIP/NBT; Linha 3 = Amostra purificada do ScYLV.

#### 4.1.4. Caracterização do Ácido Nucléico Viral

Os primeiros ensaios para extração do ácido nucléico a partir de amostras purificadas do vírus foram negativos. No entanto, quando o tratamento com a enzima Proteinase K foi adicionado ao processo de extração, o resultado obtido foi positivo.

O ácido nucléico extraído das partículas virais do ScYLV migrou sob condições denaturantes em gel de agarose, como uma única espécie cujo tamanho foi estimado em 5,8 kb (Figura 8, linha 2). Este componente foi completamente digerido pelas enzimas RNase e nuclease S1 (Figura 8, linha 1), mas não foi afetado pela DNase confirmando a natureza do ácido nucléico do ScYLV, como sendo de RNA de fita simples.



**Figura 8.** RNA genômico do ScYLV visualizado por brometo de etídio em eletroforese de gel de agarose (linha 2). Tratamento com RNase (linha 1). À direita (linha 3) estão os marcadores de peso molecular de RNA.

## **4.2. Métodos de Diagnóstico**

### **4.2.1. Produção de Anti-Soro para o ScYLV**

As primeiras imunizações, feitas em um único coelho originaram anti-soro que reagia positivamente com o extrato de plantas de cana sadias, em testes de PTA-ELISA. Estas preparações purificadas do vírus mostraram estar contaminadas com proteínas da planta hospedeira, visíveis ao microscópio eletrônico como estruturas isométricas, com diâmetro aproximado de 15 nm. Após modificações do protocolo de purificação do vírus, tais contaminações das preparações purificadas não foram mais observadas, eliminando então a reação inespecífica.

Utilizando-se de preparações melhor purificadas, dois coelhos foram imunizados e submetidos à sangria após duas semanas da última injeção com o antígeno. Todas as sangrias, cinco no total, foram testadas por PTA-ELISA para avaliação da produção de anticorpos.

O anti-soro obtido na quarta sangria, após cinco semanas da última injeção de vírus, foi o de maior concentração de anticorpos e mostrou valores em testes PTA-ELISA positivos até para uma diluição de 1:8.000. Houve uma diferença na produção de anticorpos entre os dois coelhos, sendo utilizado para testes futuros o anti-soro do coelho com melhor resposta imunogênica.

### **4.2.2. Testes Serológicos**

O teste de DAS-ELISA com anti-soro policlonal produzido contra o ScYLV detectou eficientemente todos os isolados do vírus, provenientes de diferentes origens (Tabela 1).

Durante os primeiros ensaios do teste DAS-ELISA, foi observada uma reação inespecífica com plantas sadias de cana-de-açúcar, resultando em leituras com valores próximos do controle infectado (background reaction). No entanto, esta reação inespecífica foi contornada adicionando-se 5% de leite em pó desnatado (Non-fat Dry Milk – BioRad) ao tampão de diluição do conjugado. Após a otimização do teste, esta técnica mostrou-se muito eficiente e sensível para detecção do ScYLV e por esta razão foi o método adotado para o diagnóstico das variedades aqui utilizadas.

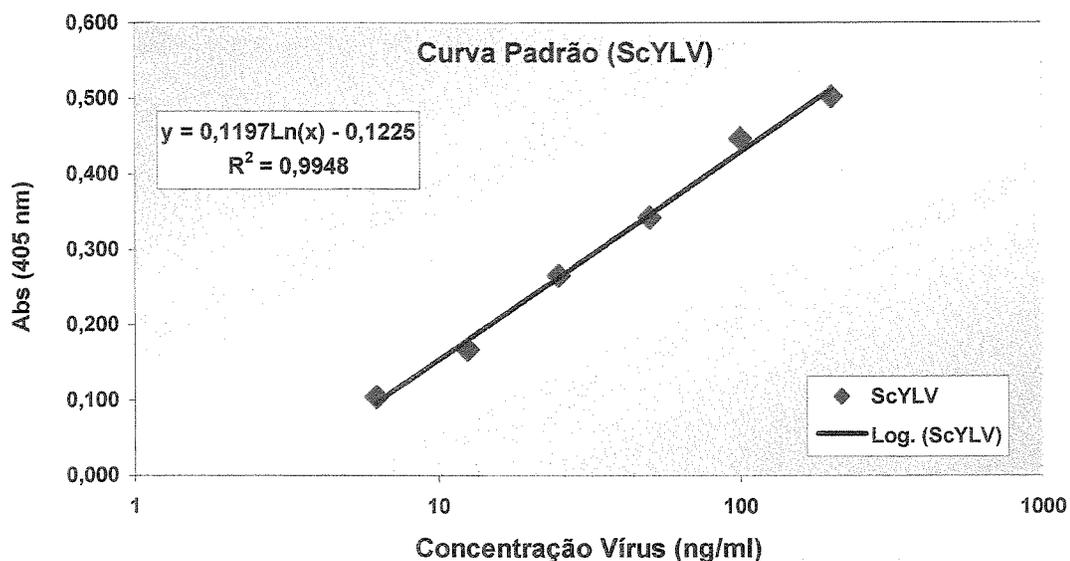
**Tabela 1.** Testes de DAS-ELISA com anti-soro produzido para o ScYLV. Médias de quatro pocinhos após 2 horas da adição do substrato. c/s = com sintomas; s/s = sem sintomas

<u>Amostras</u>	<u>Abs. (405 nm)</u>
<b>Seedlings (controle negativo)</b>	<b>0,084</b>
<b>SP 71-6163 (c/s)</b>	<b>0,765</b>
<b>SP 70-1143 (s/s)</b>	<b>0,832</b>
<b>SP 81-3250 (s/s)</b>	<b>0,090</b>
<b>SP 81-3250 (c/s)</b>	<b>0,873</b>
<b>H 73-6110 (c/s)</b>	<b>0,775</b>
<b>CP 65-357 (c/s)</b>	<b>0,880</b>
<b>Folhas de Batata – Sadia</b>	<b>0,050</b>
<b>Folhas de Batata – PLRV</b>	<b>0,055</b>
<b>Folhas de Beterraba – Sadia</b>	<b>0,048</b>
<b>Folhas de Beterraba – BWYV</b>	<b>0,054</b>
<b>Folhas de Feijão - Sadia</b>	<b>0,043</b>
<b>Folhas de Feijão - BLRV</b>	<b>0,045</b>
<b>Folhas de Aveia – Sadia</b>	<b>0,035</b>
<b>Folhas de Aveia BYDV - PAV</b>	<b>0,046</b>
<b>Folhas de Aveia BYDV – MAV</b>	<b>0,040</b>
<b>Folhas de Aveia BYDV – RPV</b>	<b>0,045</b>
<b>Folhas de Aveia BYDV – RMV</b>	<b>0,050</b>
<b>Folhas de Aveia BYDV – SGV</b>	<b>0,050</b>

O teste DAS-ELISA desenvolvido deu resultados negativos para amostras de plantas infectadas por outros luteovirus (PLRV, BLRV, BWYV e BYDV), mostrando a especificidade do anti-soro para o ScYLV. Do mesmo modo, quando testes comerciais (Agdia) de DAS-ELISA, utilizando-se de anti-soro preparado para outros luteovirus (BYDV, BLRV, PLRV e BWYV) foram feitos com amostras de cana infectadas pelo ScYLV, os resultados foram também negativos. O anti-soro produzido também mostrou-se eficiente nos testes de microscopia eletrônica de imuno-adsorção (ISEM), confirmando os resultados obtidos por DAS-ELISA.

#### **4.2.3. Quantificação do ScYLV**

Para avaliar a possibilidade de empregar o método DAS-ELISA para determinações quantitativas do vírus foram realizados ensaios com concentrações conhecidas do vírus purificado. Os valores de absorvância obtidos com diferentes concentrações de vírus mostraram alto nível de correlação com o logaritmo da concentração viral, permitindo o ajuste de uma reta de regressão com  $R^2 = 0,994$  (figura 9). Considerando que nos experimentos para a quantificação do vírus, a absorvância observada nos testes de material sadio foi em média 0,02 e que para considerar um resultado positivo a leitura deve ser duas vezes esse valor, a sensibilidade do método seria de aproximadamente 4,0 ng/mL (ou 400 pg por pocinho da placa de ELISA usando amostras de 100  $\mu$ L).



**Figura 9.** Curva padrão feita com seis concentrações do vírus purificado para quantificação do ScYLV em testes DAS-ELISA.

#### 4.2.4. RT – PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

A técnica de RT-PCR aqui utilizada apresentou muita sensibilidade e especificidade e detectou eficientemente o vírus em estudo – ScYLV (figura 10). Esta técnica foi capaz de detectar quantidades menores de vírus quando comparada com a de DAS-ELISA, sugerindo sensibilidade relativamente superior, pois como mostra a tabela 2 houve um caso de resultado negativo para ELISA que foi positivo para RT-PCR.

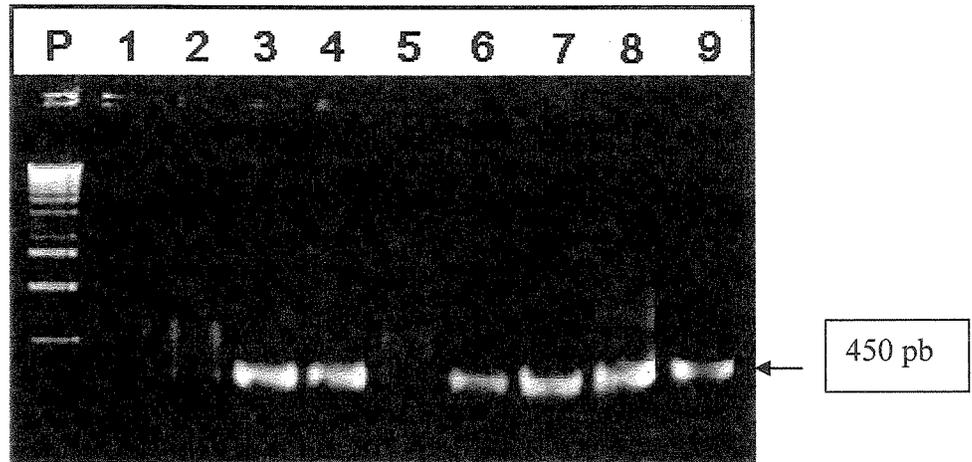
**Tabela 2.** Comparação entre resultados de diagnóstico por DAS-ELISA e RT-PCR.

- = negativo + = indica intensidade da reação.

Variedades	DAS-ELISA	RT-PCR
Seedlings	-	-
SP 81-3250 (micromeristema)	-	+
SP 70-1143 (micromeristema)	++	++
SP 71-6163 (micromeristema)	++	++
SP 80-1842	++	++
SP 80-1816	++	++
SP 86-155	++	++
SP 85-3877	-	-
SP 87-396	-	-

No caso do material de SP 81-3250 proveniente de cultura de micro-meristema, o resultado positivo para RT-PCR (figura 11) e negativo para DAS-ELISA, provavelmente se deve ao fato de que estas plantas, quando testadas eram muito novas e a concentração do vírus nos tecidos, extremamente baixa. Porém, quando as duas técnicas foram comparadas e usadas para detecção do vírus em plantas adultas, ambas mostraram especificidade e sensibilidade similares (figura 10). Em função destes resultados, foi adotado então o uso da técnica DAS-ELISA, por ser esta a mais simples, por permitir testar um grande número de amostras e por ser menos onerosa.

**Figuras 10 e 11:** Testes de RT-PCR em gel de agarose com Brometo de Etídeo com primers específicos para o ScYLV.



**Figura 10.** Amostras obtidas no campo. P = Padrão de peso molecular, 1= Seedlings (controle sadio), 2= SP 81-3250 (sadia), 3= SP 70-1143 (infectada), 4= SP 71-6163 (infectada), 5= SP 80-1842 (sadia), 6= SP 81-3250 (infectada), 7= SP 70-1143 (infectada), 8= SP 71-6163 (infectada) e 9= SP 71-6163 (infectada). A seta indica a posição da banda do produto da amplificação.



**Figura 11.** Amostras obtidas na casa de vegetação. P = Padrão de peso molecular, 1 = Seedlings (controle sadio), 2 = SP 81-3250 (micro-meristema, infectada), 3 = SP 81-3250 (micro-meristema, infectada), 4 = SP 70-1143 (micro-meristema, sadia), 5 = SP 70-1143 (micro-meristema, sadia), 6 = SP 71-6163 (micro-meristema, infectada), 7 = SP 71-6163 (micro-meristema, infectada), 8 = SP 85-3877 (sadia), 9 = SP 81-3250 (infectada), 10 = SP 87-396 (sadia) e 11 = SP 71-6163 (infectada). A seta indica a posição da banda do produto da amplificação.

### 4.3. Fisiopatologia

#### 4.3.1. Concentração do Vírus em Plantas de Cana-de-Açúcar Originadas no Campo

Baseando-se nos resultados obtidos na curva padrão, a técnica DAS-ELISA foi então utilizada para avaliar a concentração do vírus em diferentes variedades de cana-de-açúcar, que apresentam diferenças na manifestação dos sintomas. Para isso foram atribuídas notas de 1 a 4 segundo a intensidade dos sintomas, sendo 1 para variedades sem sintomas e 4 para variedades com os sintomas mais severos. Tanto a dosagem do vírus como a atribuição das notas foram feitas nas folhas + 1 de plantas com 15 meses de idade. Em cada teste de DAS-ELISA foram incluídas algumas concentrações conhecidas do vírus purificado, como padrão para quantificação do vírus.

**Tabela 3.** Conteúdo da concentração viral em variedades de cana-de-açúcar com diferentes níveis de sensibilidade ao vírus. Valores representam a média de quatro pocinhos. As notas das variedades foram atribuídas na ocasião da coleta.

Variedades	Nota de sensibilidade da variedade - sintomas	[Vírus] ng/mL
Controle Sadio	1	Negativo
SP 71-6163	4	9,1129
SP 81-3250	3	8,2436
SP 84-2025	3	7,8406
SP 80-185	2	7,3952
SP 70-1143	1	15,1697
SP 80-1842	1	5,6604
SP 80-3280	1	7,5198
SP 87-344	1	11,1361
SP 80-1816	1	5,6133
SP 86-155	1	6,5242
SP 85-3877	1	Negativo
SP 87-396	1	Negativo

Algumas variedades originadas do campo apresentaram-se livres do vírus, ao passo que outras seis variedades com a mesma nota de sintomas (nota 1= sem sintomas) apresentaram concentrações virais variáveis (tabela 3).

Entre as variedades infectadas pelo ScYLV, a variedade SP 71-6163 foi a mais sensível ao vírus, mostrando sintomas severos da infecção (nota 4). No entanto, quando testada por DAS-ELISA, mostrou concentração viral relativamente baixa, com valores de absorbância entre 4 a 5 vezes maiores que os do controle sadio (tabela 3). As variedades SP 81-3250, SP 84-2025 e SP 80-185 mostram sintomas menos severos, e apresentaram concentração ligeiramente menor de vírus. Porém, as variedades SP 70-1143, SP 80-1842, SP 87-344, SP 80-1816 e SP 86-155, que não apresentam sintomas de infecção pelo vírus (nota 1), quando testadas por DAS-ELISA, mostraram resultados positivos à infecção, sendo que algumas mostraram concentração do vírus bem maior que nas variedades sensíveis, com valores de absorbância entre 6 e 7 vezes maiores que os do controle sadio. As variedades SP 85-3877 e SP 87-396 não apresentaram sintomas de infecção pelo vírus e mostraram estar livres dele, com valores de absorbância semelhantes aos do controle sadio.

Estes resultados mostraram que não há uma relação direta entre a concentração do vírus e a intensidade dos sintomas, quando as comparações foram feitas entre diferentes variedades.

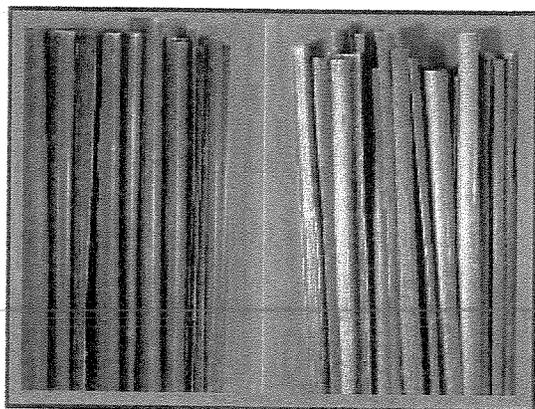
#### **4.3.2. Distribuição do Vírus em Folhas com Diferentes Idades em Variedades Sensíveis**

Um estudo da distribuição do vírus foi feito nas folhas +1 e + 4 de plantas cultivadas em condições de campo com 15 meses de idade, utilizando apenas as variedades mais sensíveis: SP 81-3250 e SP 84-2025 (sadias e infectadas) e SP 71-6163 (infectadas com e sem

sintomas). A concentração do vírus foi determinada na nervura principal e na lâmina foliar separadamente (figura 12), através de DAS-ELISA, incluindo em cada teste concentrações conhecidas do vírus purificado.

As análises feitas com folhas + 1 de plantas infectadas e com sintomas mostraram uma maior concentração do vírus na nervura (figura 13), com concentração viral até nove vezes maior que a concentração detectada na lâmina da mesma folha (SP 71-6163).

Quando as folhas + 4 foram testadas da mesma maneira, observou-se uma drástica redução na concentração viral, nos dois tecidos (lâmina foliar e nervura), diminuindo a diferença da concentração do vírus entre um tecido e outro (figura 13).



**Figura 12.** Nervura central extraída de folhas +1 de cana-de-açúcar, sadias (esquerda) e infectadas pelo vírus ScYLV.

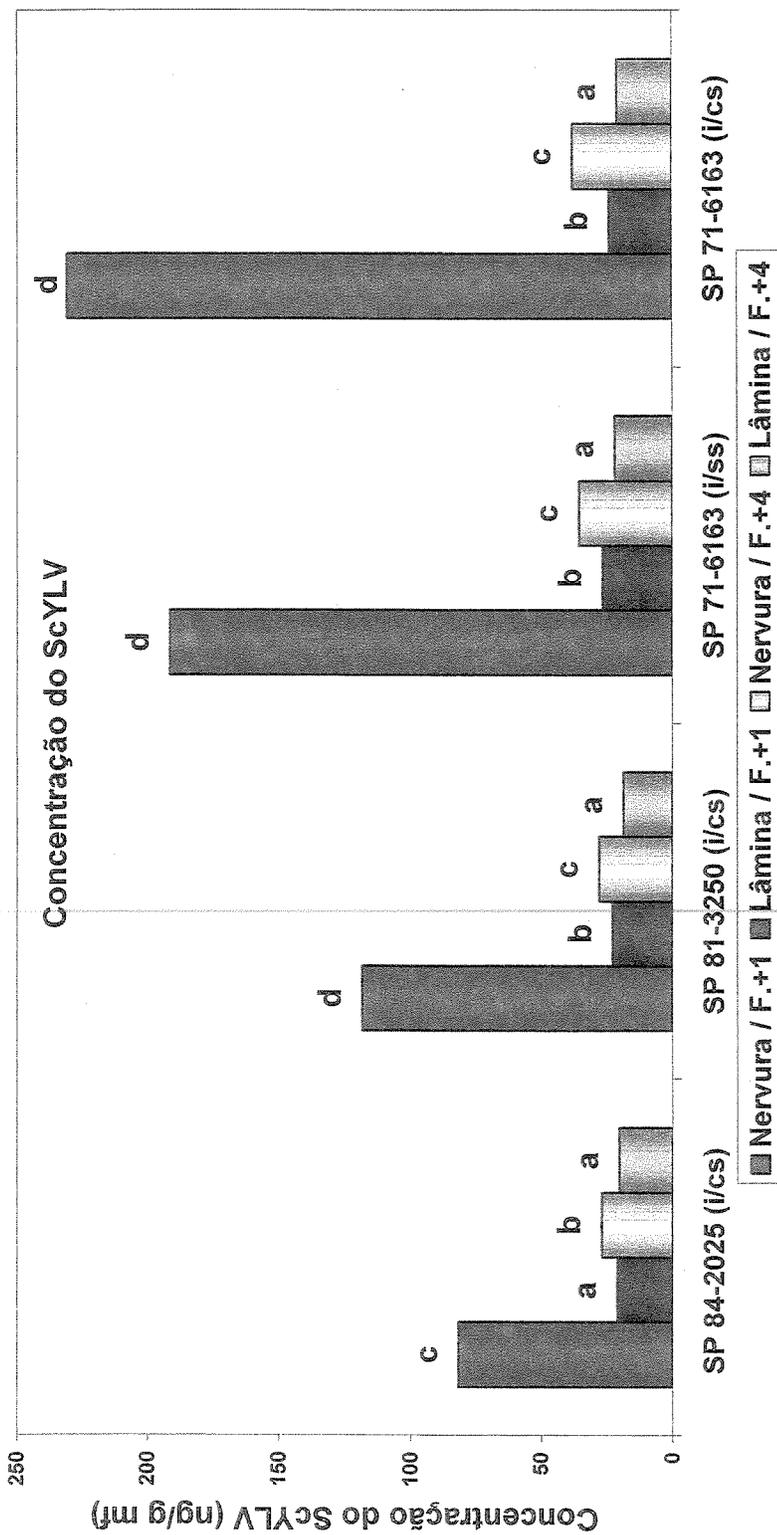
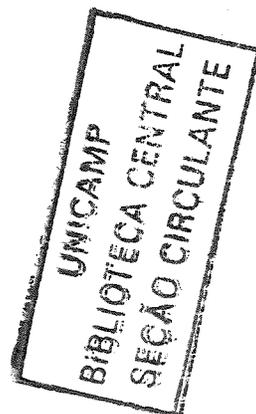


Figura 13. Concentração do ScYLV determinado por DAS-ELISA, na lâmina foliar e na nervura de folhas +1 e + 4 de três variedades de cana-de-açúcar. Médias de três repetições. Tukey 5%. (i/ss=infecteda sem sintomas; i/cs=infecteda com sintomas).



### **4.3.3. Açúcares Solúveis**

#### **4.3.3.1 Conteúdo de Açúcares nas Folhas de Diferentes Variedades**

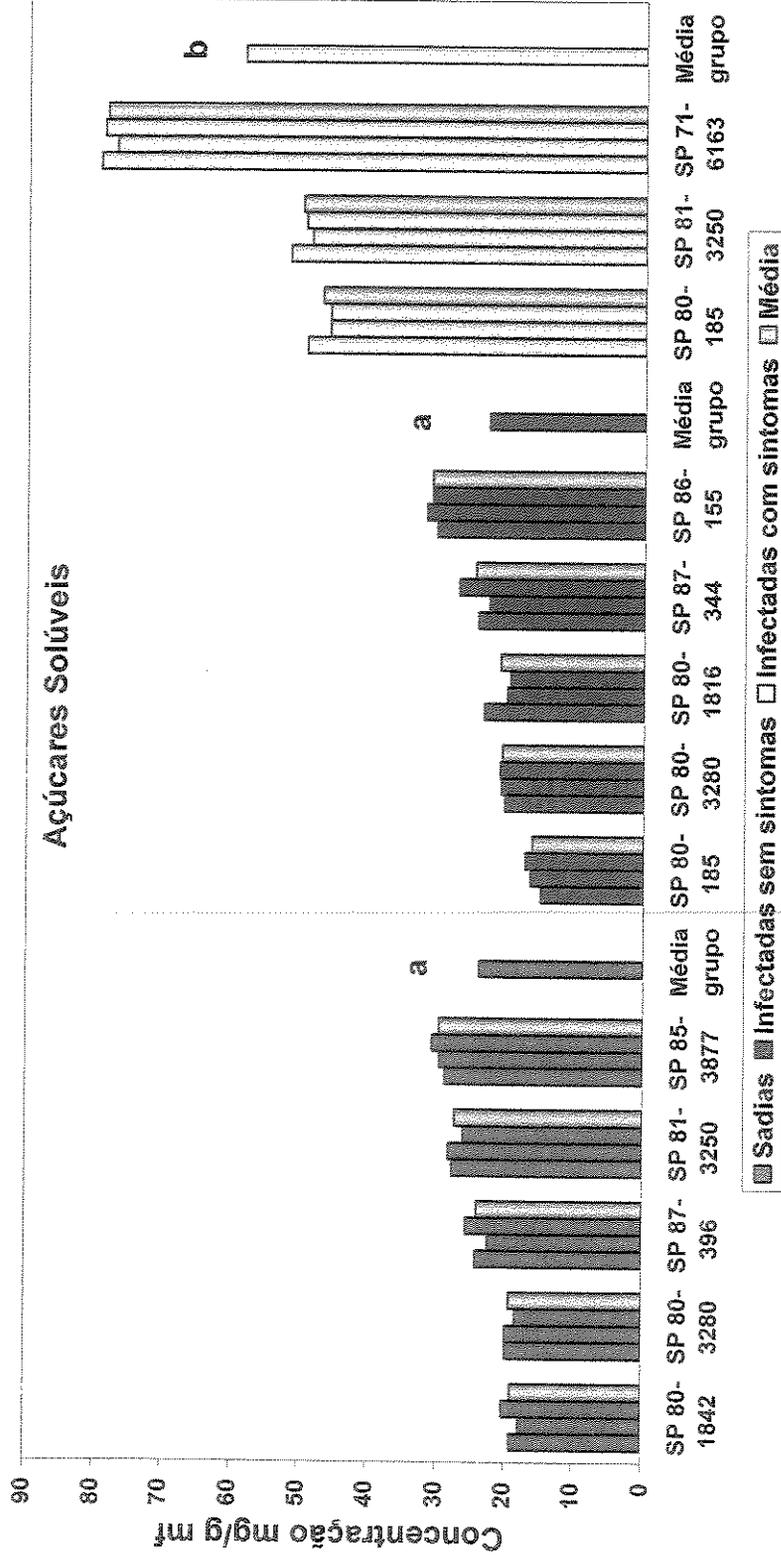
Para o estudo das alterações metabólicas associadas à infecção viral o ideal é fazer comparações entre plantas da mesma variedade (geneticamente idênticas), de mesma idade e crescendo nas mesmas condições. No caso particular dos açúcares solúveis, verificou-se em testes preliminares que unicamente em plantas próximas à maturação (12-15 meses desde o plantio) os açúcares ocorriam em concentrações suficientes para permitir sua dosagem de forma consistente. Por este motivo foram utilizadas plantas de campo, com coletas feitas próximas ao período de colheita (corte) para estas determinações, fato que limitou este estudo às variedades disponíveis em campo com as características requeridas para a comparação. Sendo assim, as diferentes variedades de cana-de-açúcar coletadas no campo foram primeiramente testadas por DAS-ELISA, para avaliar a presença ou ausência do vírus, para que depois pudessem ser submetidas às análises de açúcares.

As dosagens foram realizadas em folhas + 1 (primeira folha totalmente expandida saindo do cartucho), ou em folhas + 4 como indicado em cada um dos experimentos.

Com base nos dados de DAS-ELISA, as variedades testadas para análises dos teores de açúcares foram organizadas em três grupos: 1) sadias; 2) infectadas sem sintomas e 3) infectadas com sintomas.

O conteúdo de açúcares nas folhas das variedades infectadas e com sintomas (grupo 3) foi significativamente maior que o observado em plantas sadias ou sem sintomas representadas pelos grupos 1 e 2 (Figura 14). Na variedade SP 71-6163 infectada e com sintomas, o conteúdo de açúcares na folha + 1 atingiu valores até 4 vezes superior ao observado nos grupos 1 e 2. Não houve diferença significativa entre a média do grupo de variedades sadias e

a média do grupo de variedades infectadas sem sintomas. As diferenças observadas no conteúdo de açúcares, entre as variedades de um mesmo grupo podem ser atribuídas às diferenças genóticas existentes entre elas. No grupo de variedades infectadas e com sintomas chamou a atenção o alto valor alcançado na variedade SP 71-6163 (78,6 mg/g mf) que superou em mais de 50% os valores observados nas outras variedades do mesmo grupo.



**Figura 14.** Concentração de açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose) determinada na folha +1 de plantas de diferentes variedades de cana-de-açúcar, agrupadas em sadias, infectadas (pelo ScYL V) sem sintomas e infectadas com sintomas. As colunas isoladas representam a média de cada grupo, letras diferentes indicam que diferem significativamente (Tukey 5%).

#### 4.3.3.2 Distribuição de Açúcares em Folhas de Variedades Sensíveis com Diferentes Idades

A distribuição dos açúcares solúveis em folhas +1 e + 4 foi examinada separadamente na nervura central e na lâmina foliar, apenas nas variedades sensíveis ao vírus: SP 84-2025, SP 81-3250 e SP 71-6163, sendo que para as duas primeiras variedades as comparações foram feitas entre plantas sadias e infectadas com sintomas, e para a variedade SP 71-6163 a comparação foi feita entre plantas infectadas, porém com e sem sintomas.

Os resultados (figura 15) mostraram que em plantas infectadas e com sintomas ocorreu um grande aumento da concentração de açúcares, principalmente nas folhas novas (+1). Este aumento é evidente na nervura central, com 140 % de aumento em média e em menor medida também na lâmina foliar (100% em média). Nas folhas mais velhas (folhas +4) verificou-se também aumento do conteúdo de açúcares, embora não tão expressivo quanto nas folhas +1. Nestas folhas foi observado um aumento de 85 % na nervura central e de 61 % na lâmina foliar. Embora o efeito da infecção viral, com manifestação dos sintomas, sobre o conteúdo dos açúcares solúveis tenha sido evidente nas três variedades examinadas, na SP 71-6163 e SP 81-3250 o aumento observado na lâmina das folhas +4 não foi estatisticamente significativo.

Neste experimento pôde-se observar que houve uma diminuição significativa da concentração de açúcares das folhas +4 em relação às folhas +1, tanto na nervura quanto na lâmina foliar, efeito este provavelmente associado à senescência foliar. Esta diminuição dos açúcares mostrou ser proporcionalmente mais intensa nas plantas infectadas e com sintomas.

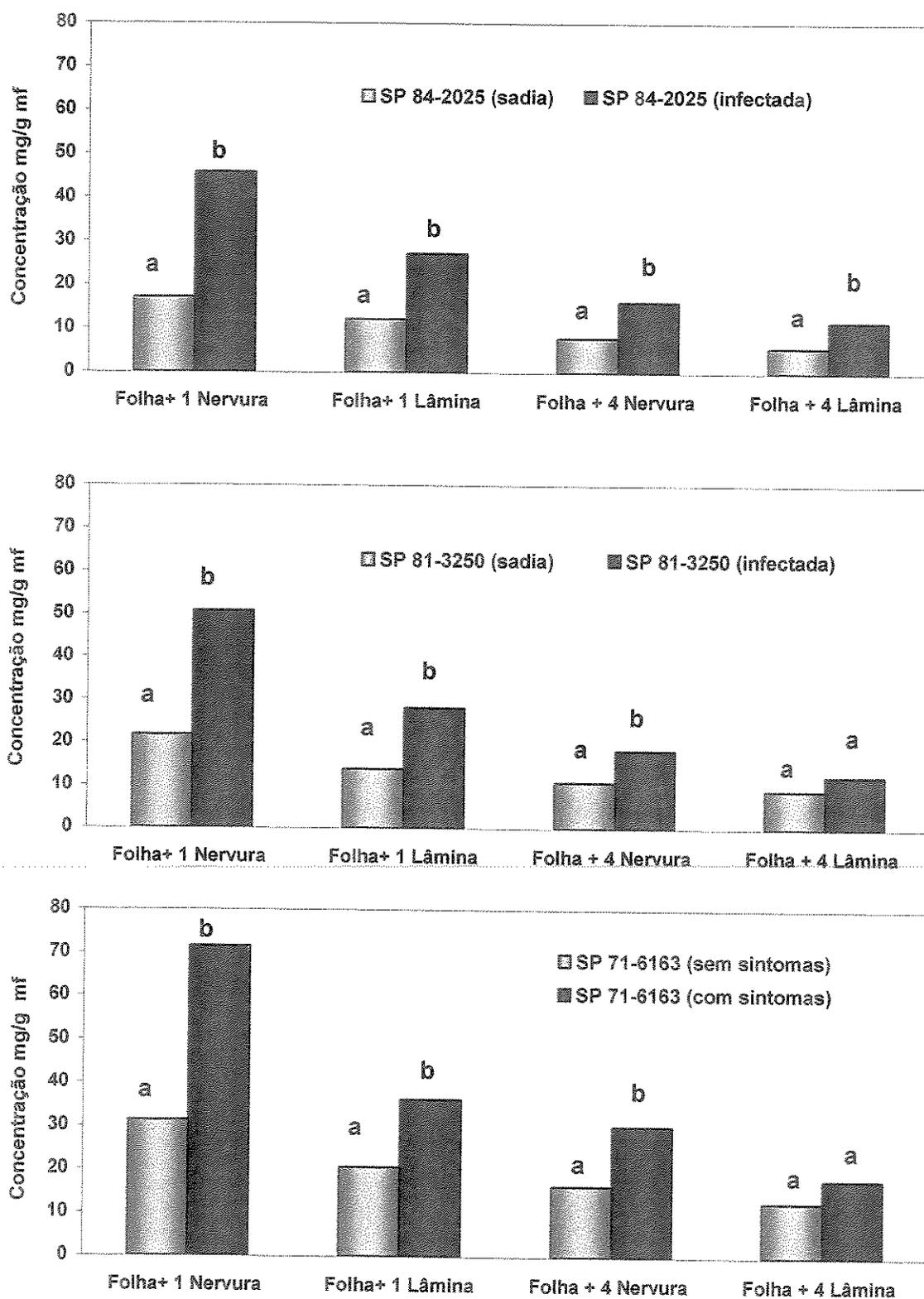


Figura 15. Distribuição de açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose) na nervura central e na lâmina foliar de folhas +1 e + 4 em variedades sensíveis ao vírus. Médias de três plantas. Colunas com letras diferentes diferem significativamente, comparação válida para a mesma folha e mesmo tecido. (Tukey 5%).

#### 4.3.4. Atividade de Peroxidases

Os resultados dos ensaios espectrofotométricos da atividade enzimática da guaiacol-peroxidase estão exemplificados na figura 16. O gráfico mostra a linearidade da reação enzimática com  $R^2$  superior a 0,99 e cujo coeficiente angular ( $\Delta$  Abs por segundo ou inclinação da reta) representa a atividade enzimática presente no tecido examinado. A atividade foi calculada em unidades de  $\Delta$  Abs por minuto por grama de massa fresca e esses dados calculados individualmente para cada uma das três plantas testadas, foram submetidos a análises estatísticas. O resultado deste experimento está resumido na figura 17.

Observou-se a existência de um padrão constante nas alterações da guaiacol-peroxidase associadas à infecção e manifestação dos sintomas causados pelo vírus: as plantas infectadas apresentaram atividade cerca de 50% maior que as sadias, incremento este estatisticamente significativo. O mesmo padrão pôde ser observado comparando plantas infectadas com sintomas da variedade SP 71-6163 com plantas sem sintomas.

No entanto, comparando plantas de SP 71-6163 com sintomas fortes e plantas com sintomas fracos, não houve diferença na atividade das peroxidases examinadas (dados não mostrados).

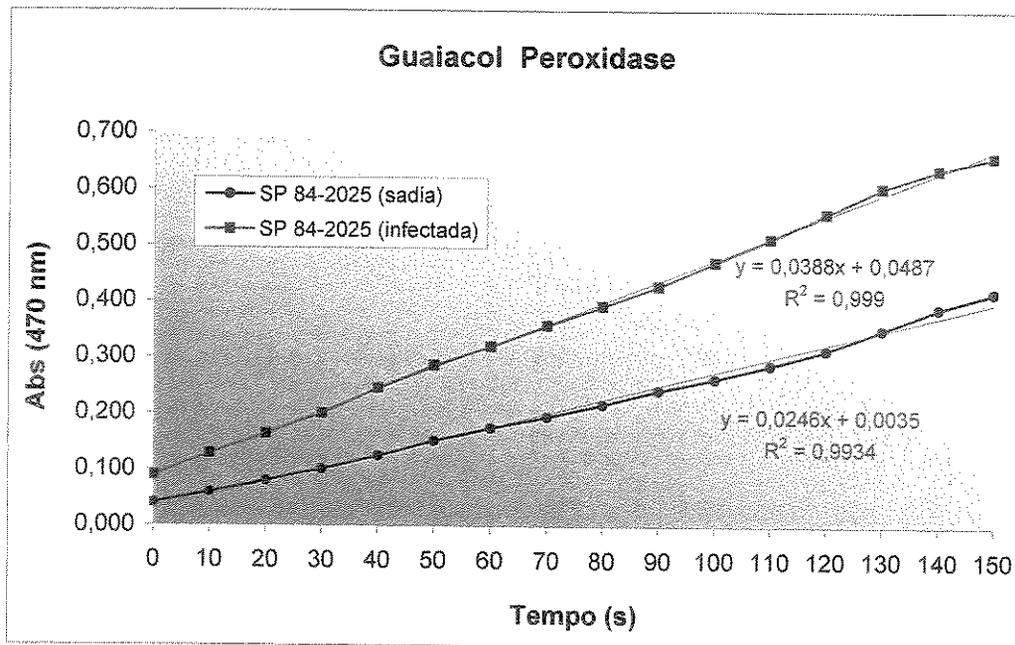


Figura 16. Exemplo de teste de atividade da enzima peroxidase em plantas de cana-de-açúcar, sadias e infectadas pelo ScYLV, utilizando guaiacol como substrato.

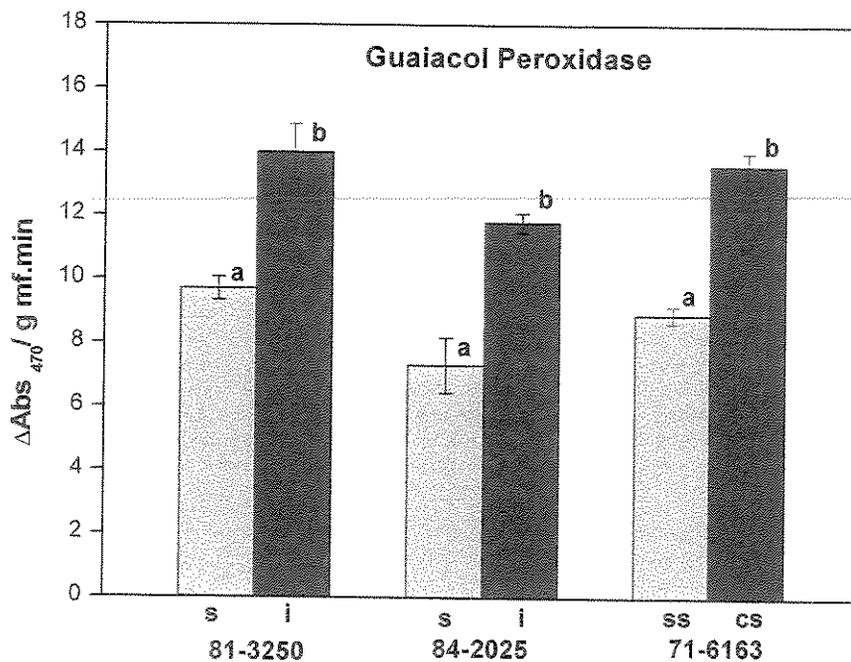


Figura 17. Atividade da guaiacol peroxidase em plantas sadias (s) e infectadas (i) de diferentes variedades de cana-de-açúcar. Para a variedade 71-6163 a comparação foi feita entre plantas infectadas, mas sem sintomas (ss) e com sintomas (cs). Médias de três plantas (repetições) ± erro padrão. Colunas com letras diferentes diferem significativamente, comparação válida para a mesma variedade (Tukey 5%).

Os ensaios espectrofotométricos da atividade da siringaldazina peroxidase estão exemplificados na figura 18. O gráfico mostra a linearidade da reação enzimática, com  $R^2$  próximo a 1 e cujo coeficiente angular (inclinação) representa a atividade da enzima presente no tecido examinado. As atividades em  $\Delta$  Abs por minuto e por grama de massa fresca foram calculadas individualmente para cada uma das três plantas testadas e os dados resultantes submetidos à análise estatística.

A figura 19 representa os resultados de atividade da siringaldazina peroxidase, que mostra um padrão claro de alteração: as plantas infectadas e com sintomas apresentavam uma atividade enzimática cerca de 140% maior que os controles sadios ou sem sintomas. Este incremento da atividade apresenta alta significância estatística ( $p < 0.01$ ).

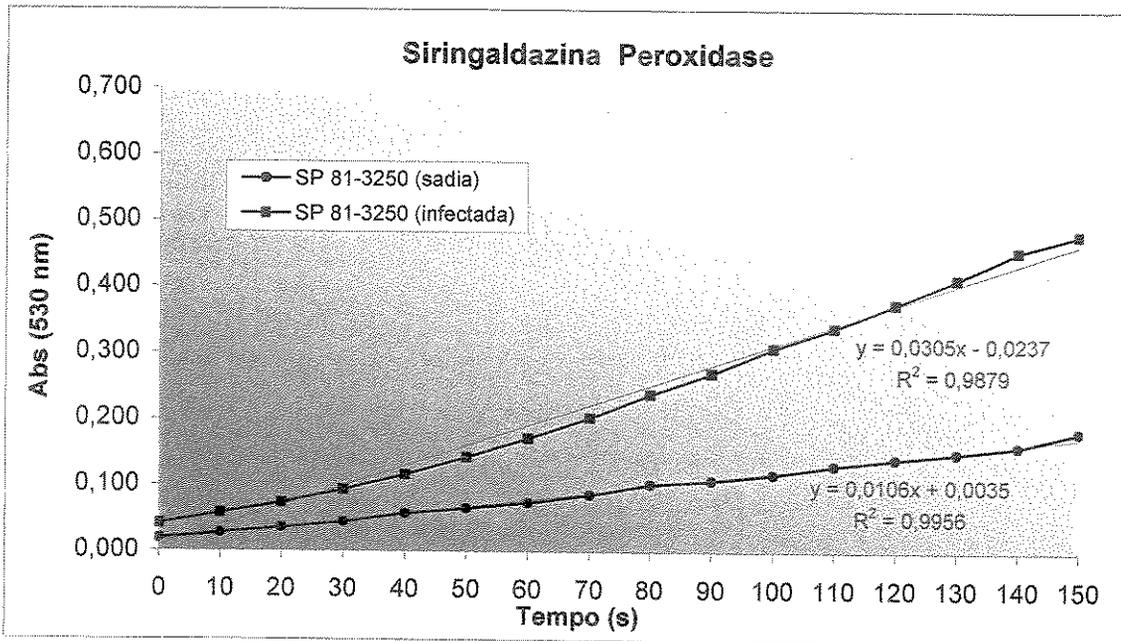


Figura 18. Exemplo de teste de atividade da enzima peroxidase em plantas de cana-de-açúcar, sadias e infectadas pelo ScYLV, utilizando siringaldazina como substrato.

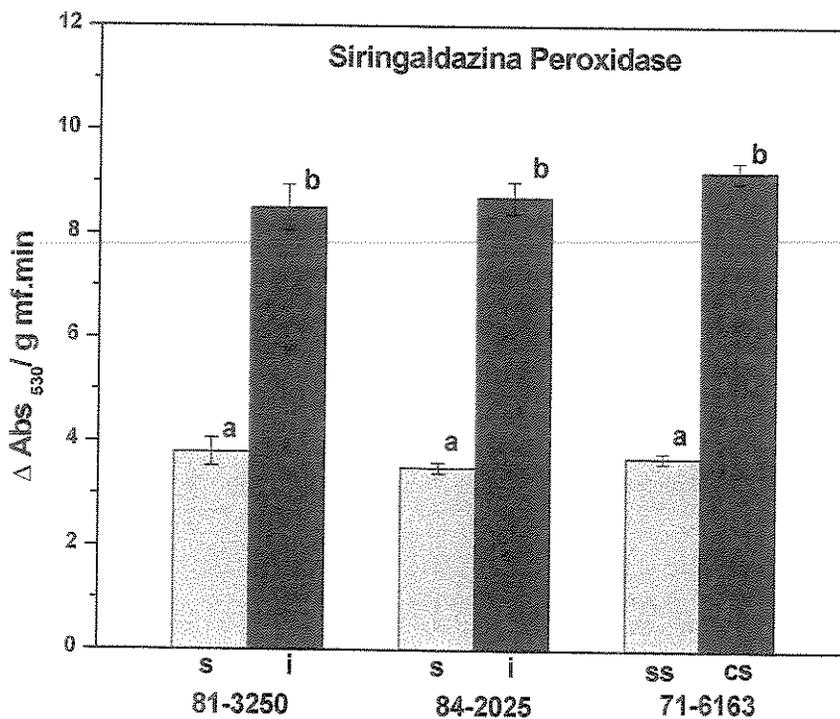


Figura 19. Atividade da siringaldazina peroxidase em plantas sadias (s) e infectadas (i) de diferentes variedades de cana-de-açúcar. Para a variedade 71-6163 a comparação foi feita entre plantas infectadas, mas sem sintomas (ss) e com sintomas (cs). Médias de três plantas (repetições) ± erro padrão. Colunas com letras diferentes diferem significativamente, comparação válida para a mesma variedade (Tukey 5%).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Etiologia e Caracterização

Desde o surgimento dos primeiros sintomas observados no campo em 1990-91, várias hipóteses foram consideradas em relação ao agente causal da Síndrome do Amarelecimento Foliar da Cana-de-Açúcar (SAFCA), gerando controvérsias sobre a etiologia da doença.

Os trabalhos de Vega (1994) e Vega *et al.* (1997) foram os primeiros a relatar uma consistente associação entre partículas do tipo luteovirus e a SAFCA, em tecidos de cana-de-açúcar com sintomas. O trabalho aqui apresentado baseou-se nestas evidências a fim de comprovar (ratificar) a etiologia viral da doença e promover a caracterização do seu agente causal.

Baseando-se nos resultados obtidos neste trabalho, pôde-se concluir que o vírus isolado a partir de plantas de cana-de-açúcar com sintomas de amarelecimento foliar e identificado como *Sugarcane Yellow Leaf Virus* (ScYLV) é um luteovirus que se assemelha com outros membros da família *Luteoviridae* por suas inúmeras propriedades, que serão apresentadas conforme segue.

As tentativas de transmissão mecânica do vírus foram negativas. Estes resultados se encaixam na descrição dos luteovirus, já que estes não são transmitidos mecanicamente. Cada espécie de vírus que pertence à família *Luteoviridae* é transmitida somente por uma ou por poucas espécies de afídeos vetores (Miller & Rosochová, 1997). Os ensaios de transmissão do vírus com insetos vetores mostraram resultados positivos com duas espécies de afídeos: *Melanaphis sacchari* (espécie muito comum nos campos de cana-de-açúcar) e *Rhopalosiphum maidis*. A comprovação da transmissão do vírus pelos insetos vetores foi feita por meio da observação das partículas virais ao microscópio eletrônico, por testes serológicos de DAS-

ELISA e por observação visual dos sintomas típicos do amarelecimento foliar nas plantas inoculadas. Sintomas de amarelecimento foliar também são indicativos de infecções causadas por luteovirus. Resultados negativos foram obtidos quando as tentativas de transmissão foram feitas com um outro afídeo, *Sipha flava*, também bastante comum e cuja população atinge altos níveis nos campos de cana-de-açúcar. Estes resultados referem-se à transmissão do vírus entre plantas de cana-de-açúcar (de plantas infectadas para plantas saudáveis), já que as tentativas de transmissão do vírus para outras gramíneas usando os mesmos afídeos foram negativas. Pôde-se concluir que o vírus tem uma gama de hospedeiras muito estreita, aparentemente restrita às espécies do gênero *Saccharum*. A gama de hospedeiras estreita é também uma característica freqüente entre os luteovirus.

Não foram detectadas partículas virais, nem foi observado o desenvolvimento de sintomas em plantas infestadas com afídeos que tinham se alimentado em plantas sem sintomas e livres de vírus. As partículas virais do ScYLV foram consistentemente detectadas por microscopia eletrônica em extratos parcialmente purificados, unicamente nas amostras de material infectado. Nenhum outro tipo de partícula viral foi observado em microscopia eletrônica nas amostras examinadas durante o presente estudo. Estes resultados demonstram que os sintomas típicos da doença em plantas de cana-de-açúcar estão associados à infecção pelo ScYLV e não têm relação com a infestação por insetos vetores não virulíferos. Estes dados fornecem evidências sobre a patogenicidade do ScYLV, comprovando a hipótese de ser este o agente causal da SAFCA, ratificando a etiologia viral desta síndrome e completando os Postulados de Koch (Scagliusi & Lockhart, 2000).

Testes de transmissão do mesmo vírus também foram feitos por Lopes *et al.* (1997), que relatou a transmissão de partículas do tipo luteovirus de plantas infectadas para plantas saudáveis de cana-de-açúcar. Neste trabalho, a confirmação da transmissão do vírus foi feita por meio de testes serológicos (ELISA) e pela observação de sintomas típicos nas plantas

inoculadas. Entretanto, a transmissão do vírus foi feita pelos afídeos *M. sacchari* e também por *Sipha flava*. A transmissão por este último afídeo difere dos resultados aqui apresentados. Uma possível explicação para tal divergência seria a variação na habilidade de transmissão entre populações de uma mesma espécie de afídeo. Foi observado recentemente (Smyrnioudis *et al.*, 2001) que a eficiência de transmissão do luteovírus BYDV-PAV pelo afídeo *R. padi* variou de 39% a 86%. Estas variações poderiam estar associadas com barreiras de circulação do vírus dentro do inseto vetor ou com uma dificuldade na capacidade de retenção do vírus pelo afídeo, provavelmente devido à interações do tipo “vírus-afídeo” ou “afídeo-planta hospedeira”. Este mesmo trabalho destaca o papel da temperatura na eficiência de transmissão do vírus pelo inseto vetor, já que possivelmente este fator poderia influenciar o conteúdo de vírus presente nos tecidos infectados, a estabilidade do vírus dentro do inseto vetor e os padrões de alimentação dos afídeos.

Os dados aqui obtidos mostraram a transmissão do ScYLV apenas para plantas de híbridos comerciais de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. L.). Entretanto, estudos feitos no Hawaii (Schenk & Lehrer, 2000) mostraram que algumas espécies, como *S. robustum*, *S. spontaneum* e *S. sinensis* são também hospedeiras naturais do vírus. Esses mesmos autores mostraram que o ScYLV pôde ser transmitido experimentalmente por *M. sacchari* para espécies de *Erianthus* (uma gramínea próxima da cana-de-açúcar).

Se a cana de açúcar fosse de fato a principal fonte de inóculo deste vírus, seria factível propor estratégias de controle da doença, baseadas no uso de material propagativo livre de vírus, obtido por termoterapia seguido da cultura do meristema apical. Este procedimento tem sido eficiente no caso do PLRV (Mellor & Stace-Smith, 1977), que é também um luteovírus que ocorre em batata, que assim como a cana-de-açúcar é propagada vegetativamente. Esta estratégia iria permitir o uso comercial contínuo de cultivares de cana-de-açúcar que foram

selecionadas por qualidades agronômicas desejáveis e por serem resistentes a outros patógenos.

Em função da baixa concentração dos luteovirus nos tecidos infectados, muitos trabalhos foram feitos com o objetivo de se comparar e otimizar os métodos de extração e purificação destes vírus (D'Arcy *et al.*, 1983; Waterhouse & Helms, 1984; Matsubara *et al.*, 1985; D'Arcy *et al.*, 1989).

A introdução do uso de enzimas para degradação da parede celular, facilitando a liberação da partícula viral mostrou ser de valiosa utilidade, fazendo com que o rendimento das purificações aumentasse drasticamente (Takanami & Kubo, 1979). Várias enzimas já foram testadas, sendo a driselase a mais comumente usada, pois possui atividades de pectinase e celulase. Inicialmente, a driselase foi usada no nosso trabalho durante as etapas de extração do vírus, mas devido ao seu alto custo tornou-se impossibilitado o seu uso, sendo posteriormente substituída pela enzima Celluclast.

As dificuldades encontradas durante o processo de purificação estavam em sua maioria relacionadas com a característica fibrosa das folhas de cana-de-açúcar e pela baixa concentração do vírus na planta hospedeira, exigindo grande quantidade de tecido foliar para a sua extração. Outras dificuldades encontradas foram solucionadas com as modificações feitas no protocolo original, usado nas preparações preliminares, e se referiram às alterações quanto ao pH dos tampões e enzimas de extração (Celluclast, Driselase, Extractase e Ultrazym 100), ao uso de diferentes anti-oxidantes e aos diferentes tipos de solventes orgânicos utilizados durante a etapa de clarificação. Ao final, o procedimento utilizado para purificação do vírus permitiu um rendimento equivalente a 200 µg de vírus purificado por kg de tecido foliar, resultado considerado excelente para os luteovirus, já que por serem restritos ao floema, estão presentes em baixíssima concentração nos tecidos infectados.

O protocolo adotado permitiu a obtenção de partículas virais purificadas em alta concentração e sem contaminação com fragmentos celulares da planta hospedeira, possibilitando a caracterização do vírus e a produção de anticorpos policlonais específicos, eficientes para uso em métodos de diagnóstico.

O diâmetro das partículas virais purificadas, obtidas de tecidos infectados, quando contrastadas com fosfotungstato de potássio 1% (com pH 5,0) e observadas ao microscópio eletrônico mostrou ser de 24-28 nm. O diâmetro e o formato das partículas corresponde ao observado e descrito para outros luteovirus (Waterhouse *et al.*, 1988), no entanto variações podem ocorrer de acordo com o pH da solução e a substância usada para o contraste (Matsubara *et al.*, 1985).

O espectro de absorção em UV das amostras purificadas mostrou valores da relação  $A_{260}/A_{280}$  de 1,7 – 1,9, que é a faixa de valores esperados para partículas virais isométricas contendo entre 25 e 35 % de ácido nucléico (Gibbs & Harrison, 1976).

A densidade da partícula viral determinada em solução de sulfato de céσιο a 31% e em pH 6,0 mostrou ser de 1,30 g/cm<sup>3</sup>. Comparações feitas com outros luteovirus mostraram valores de densidade ligeiramente diferentes (1,32 – 1,42 g/cm<sup>3</sup>, Waterhouse *et al.*, 1988), no entanto estas determinações foram feitas em soluções de cloreto de céσιο, ao passo que o método aqui adotado utilizou sulfato de céσιο, já que o vírus estudado mostrou ser instável em soluções de cloreto de céσιο.

Análises eletroforéticas (SDS-PAGE) das proteínas presentes nas partículas virais purificadas do ScYLV, utilizando Coomassie Blue mostraram a presença de um único polipeptídeo de aproximadamente 27 kDa. Nos testes de Western blot, utilizando anti-soro para o ScYLV, foram detectadas seis bandas: uma principal de aproximadamente 27 kDa, que corresponde à proteína do capsídeo viral, uma maior com tamanho aproximado de 58 kDa e outras bandas menores variando entre 25 – 17 kDa. Estas pequenas bandas detectadas por

immunoblotting logo acima da banda principal (27 kDa) parecem representar produtos de degradação da proteína do capsídeo. Tal degradação pode ser devida à ação de proteases da planta hospedeira durante os estágios iniciais de purificação do vírus, quando as partículas virais foram expostas por longos períodos a enzimas presentes no extrato. A proteína de aproximadamente 58 kDa detectada por immunoblotting corresponderia à proteína “readthrough” que foi relatada ocorrer nas partículas de outros luteovirus como o BYDV (Waterhouse *et al.*, 1989; Cheng *et al.*, 1994 e Wang *et al.*, 1995) e do PLRV (Bahner *et al.*, 1990), onde mostrou estar presente em proporções variáveis nas preparações purificadas destes vírus e que contém a seqüência da proteína capsidial.

Quando a membrana de nitrocelulose foi tratada com anti-soro para o BYDV (RPV), este detectou duas das seis bandas observadas com o anti-soro homólogo (AS-ScYLV), com tamanho aproximado de 27 e 58 kDa respectivamente. Esta relação serológica observada entre o ScYLV e o BYDV nos testes de Western blot, não foi observada pelas técnicas de DAS-ELISA e ISEM.

Os resultados das análises do ácido nucléico mostraram uma única banda de aproximadamente 5,8 kb, o qual é esperado conforme descrito para outros membros da família *Luteoviridae* (Mayo *et al.*, 1982). Por ter sido completamente digerido pelas enzimas RNase e nuclease S1, foi confirmada a natureza do seu ácido nucléico como sendo de RNA, também de acordo com o esperado para os luteovirus.

## 5.2. Métodos de Diagnóstico e Relações Serológicas

Após a otimização do método de purificação do vírus, uma alta concentração de partículas virais foi obtida, sem contaminantes da planta hospedeira, possibilitando a produção de um anti-soro policlonal específico, útil para fins de detecção e diagnóstico do vírus.

Diferenças nas respostas imunológicas foram observadas nos animais imunizados (coelhos 1 e 2), sendo que do animal número 2 foi obtida uma melhor resposta: anti-soro com maior título em PTA-ELISA. Como os dois animais foram imunizados da mesma forma e com a mesma dose de antígeno, as diferenças na produção de anticorpos devem-se provavelmente às diferenças individuais de cada animal na sua resposta imune.

Os testes preliminares de DAS-ELISA mostraram uma reação inespecífica (reação de background) utilizando-se extratos de plantas sadias de cana-de-açúcar. Estas reações inespecíficas foram eliminadas ao se adicionar leite em pó desnatado (Skim milk – BioRad) durante a etapa de incubação com o conjugado.

O anti-soro aqui obtido mostrou alta especificidade para o ScYLV, não apresentando reação com outros luteovirus (BYDV, BLRV, BWYV, PLRV) nos testes de DAS-ELISA.

Reciprocamente, através de testes de DAS-ELISA utilizando-se anti-soros para outros luteovirus como BYDV, BLRV, BWYV, PLRV, nenhuma reação foi observada frente ao ScYLV.

No entanto, conforme mencionado anteriormente, foi observado nos testes de Western blot que o anti-soro para o BYDV (RPV) reagia com duas bandas protéicas características do ScYLV. Também foi relatada anteriormente (Vega *et al.*, 1997) uma fraca relação serológica do ScYLV com o anti-soro para o BYDV isolado PAV, em testes de tissue printing e ISEM, sendo que nos testes de PTA-ELISA os resultados com o mesmo anti-soro (BYDV-PAV) não foram conclusivos. Estas relações serológicas encontradas entre o ScYLV e o BYDV podem

ser atribuídas à maior sensibilidade das técnicas que concentram ou mantêm o antígeno numa área específica da membrana (como no Western blot), sem que ocorra sua diluição no meio líquido, como ocorre no teste de ELISA. Esta relação serológica deve ser considerada no contexto de dados biológicos e moleculares sobre o ScYLV hoje disponíveis, que indicam majoritariamente que se trata de uma espécie de vírus não descrita anteriormente (Harrison, 1999).

Lister *et al.* (1994) conseguiram infectar experimentalmente plantas de cana-de-açúcar com o BYDV, mas nesse caso os sintomas de amarelecimento foliar nunca foram observados. Por outro lado o ScYLV não foi transmitido de cana-de-açúcar para aveia nem por *M. sacchari* nem por *R. maidis* (Lockhart *et al.*, 1996), contrariamente ao esperado se de fato o ScYLV fosse uma estirpe do BYDV. Estas observações confirmam que o ScYLV e o BYDV são luteovirus biologicamente distintos com um grau limitado de semelhança antigênica.

A comparação entre os resultados obtidos em testes de diagnóstico através de DAS-ELISA e RT-PCR mostrou um alto grau de coincidência, indicando sensibilidades semelhantes para os testes rotineiros. Porém, quando amostras de plantas originadas pela cultura de micro-meristema foram testadas, a técnica de RT-PCR mostrou ser ligeiramente superior, já que detectou a presença do vírus em concentrações muito baixas. Neste caso as bandas observadas no gel de RT-PCR apresentaram fraca intensidade, indicando uma concentração do vírus muito baixa, provavelmente abaixo do limite de sensibilidade do teste de DAS-ELISA.

Diferentes níveis de sensibilidade foram relatados na literatura para detecção de outros luteovirus pela técnica de DAS-ELISA. D'Arcy & Hewings (1986) trabalhando com três luteovirus (BYDV, BWYV e o SDV) conseguiram detectar concentrações de até 1,6 ng/mL, correspondendo à 0,16 ng por pocinho da placa de ELISA, utilizando amostras purificadas dos vírus estudados. Os resultados obtidos no nosso trabalho com amostras purificadas do vírus

mostraram sensibilidade de aproximadamente 4 ng/mL (ou 0,4 ng por pocinho da placa de ELISA usando amostras de 100 µL).

Resultados semelhantes aos nossos foram obtidos para a detecção do BYDV-PAV por Figueira *et al.* (1997) comparando a sensibilidade de diferentes métodos (DAS-ELISA, RT-PCR e hibridização do ácido nucléico). Nesse estudo foi concluído que, apesar da sensibilidade da técnica de RT-PCR ter sido também ligeiramente superior às outras técnicas avaliadas, a adoção deste método impossibilita o seu uso em larga escala, quando grandes quantidades de amostras precisam ser testadas, sendo o seu uso mais adequado em pesquisas na área de biologia molecular onde pequenas quantidades de material geralmente são processadas ou para análises de bancos de germoplasma. Dessa forma, a simplicidade do método de ELISA comparada com seu baixo custo e fácil disponibilidade de reagentes e equipamentos fez desta técnica a mais largamente utilizada na detecção de vírus vegetais e por estas razões foi também adotada como método de estudo e diagnóstico do ScYLV.

Utilizando primers de oligonucleotídeos específicos para os luteovirus, Comstock *et al.*, 1998 obtiveram a amplificação da porção do genoma do ScYLV pela reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR), confirmando que o ScYLV é um membro definitivo da família *Luteoviridae*. Informações adicionais foram obtidas a partir da seqüência dos nucleotídeos e da organização do genoma do vírus, possibilitando sua classificação dentro da família *Luteoviridae*, provavelmente como sendo uma espécie dentro do gênero *Polerovirus* (Maia *et al.*, 2000; Moonan *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000 e Moonan & Mirkov, 2002).

### 5.3. Fisiopatologia

A relação entre a concentração do vírus nos tecidos infectados e a manifestação dos sintomas em diferentes variedades de cana-de-açúcar foi avaliada através da técnica de DAS-ELISA. Os dados mostraram que não houve uma relação direta entre a concentração do vírus e a presença dos sintomas, já que das variedades testadas, a SP 71-6163 que apresenta muita sensibilidade ao vírus e recebeu nota 4 (sintomas mais severos), mostrou concentração viral inferior a algumas variedades que não apresentam sintomas (nota 1).

Os resultados indicam haver características de tolerância em algumas variedades que não apresentaram sintomas de infecção (SP 70-1143, SP 80-1842, SP 80-3280, SP 87-344, SP 80-1816 e SP 86-155), uma vez que ao serem testadas por ELISA mostraram-se infectadas pelo vírus. Em outras variedades (SP 85-3877 e SP 87-396), há indicação de características de resistência já que não apresentaram sintomas e que não estavam infectadas pelo vírus, mesmo tendo sido expostas ao vetor natural do vírus nas mesmas condições que as outras variedades.

O estudo da distribuição do vírus nas folhas de plantas de variedades sensíveis de cana-de-açúcar mostrou que este se acumula em sua maior parte na nervura central de folhas jovens (folhas +1). Em folhas mais velhas (folha +4), a concentração do vírus na lâmina foliar e na nervura central não diferiu significativamente, sendo muito semelhantes. Estes resultados tornam-se valiosamente úteis principalmente na adoção de métodos de diagnóstico de rotina, evitando a obtenção de “falsos” resultados negativos nos testes de DAS-ELISA, já que os valores de absorbância observados nas folhas mais velhas de ambos os tecidos eram apenas ligeiramente superiores aos observados nas plantas sadias. Baseando-se nestes resultados, seria adequado propor a padronização das amostras a serem testadas, utilizando-se folhas mais jovens (folhas +1 ou +2) ao se adotar métodos de diagnóstico de rotina.

Os resultados do estudo sobre o conteúdo de açúcares solúveis nas folhas de diferentes variedades foram organizados em três grupos: 1) sadias; 2) infectadas sem sintomas e 3) infectadas com sintomas, baseando-se nos dados dos testes de DAS-ELISA. Nossos resultados mostraram que o conteúdo de açúcares nas folhas das variedades infectadas e com sintomas (grupo 3) foi significativamente maior que o observado em plantas sadias ou sem sintomas representadas pelos grupos 1 e 2. O conteúdo de açúcares solúveis das variedades representadas pelos grupos 1 e 2 não diferiu significativamente. Estes resultados indicam que a infecção *per se* não alterou a concentração dos açúcares, mas que houve um aumento significativo destes após a manifestação dos sintomas.

Uma diferença significativa no conteúdo de açúcares solúveis também foi observada entre as médias das plantas das variedades representadas pelo grupo 3. Através do gráfico da figura 14 podemos observar que a variedade SP 71-6163 mostrou concentração de açúcares solúveis até 62% maior que as outras duas variedades (SP 81-3250 e SP 80-185) também infectadas e com sintomas. Embora o acúmulo de açúcares nas folhas também tenha sido observado nestas duas variedades, os valores observados na variedade SP 71-6163 mostraram ser muito superiores, justificando o declínio na produtividade desta variedade, fato que aparentemente não ocorreu com a variedade SP 81-3250.

Os dados aqui obtidos confirmam o acúmulo de açúcares solúveis nas folhas de plantas infectadas e sintomáticas, indicativo de uma disfunção do floema associada à infecção desses tecidos pelo ScYLV.

A translocação de açúcares em cana-de-açúcar ocorre através da lâmina foliar, movendo-se dos feixes da folha para a bainha, via floema, e da bainha em direção às raízes. Durante o dia, os açúcares são temporariamente acumulados nos feixes da folha, antes de ser translocados para a bainha, com aproximadamente 80% do carbono fixado durante as primeiras horas do dia, sendo exportado após o meio-dia (Du *et al.*, 2000). Um perfeito

funcionamento do tecido floemático é, portanto um requisito para um apropriado movimento de açúcares dentro da planta.

Os luteovirus são conhecidos por ter sua replicação restrita ao floema, onde estes se acumulam e se replicam quase que exclusivamente nos elementos do tubo crivado, nas células companheiras do floema e, ocasionalmente, no parênquima floemático (Mayo & Ziegler-Graff, 1996).

A quase total ausência de luteovirus nas células do mesófilo e ao redor do feixe vascular, apesar de haver um maior número de conexões de plasmodesmas nas células que saem do complexo floemático do que dentro dele, sugere que estes vírus são restritos ao movimento através dos plasmodesmas especializados das células do floema, provavelmente devido à possíveis diferenças em suas estruturas e ou fisiologia (Nelson & van Bel, 1998).

A distribuição de açúcares para os drenos é necessariamente feita pelos tecidos floemáticos, os quais podem ter a sua função alterada pela infecção do vírus, conforme evidenciado por Vega *et al.* (1997), que observaram a presença de partículas isométricas do ScYLV em cortes ultrafinos, nas células-companheiras do floema de folhas de cana-de-açúcar com sintomas da doença. Tais células apresentavam alterações citopáticas, como a desintegração da membrana nuclear, a presença de material elétron-denso e a formação de numerosas vesículas.

O acúmulo de carboidratos em folhas também foi descrito para o vírus do enrolamento da folha da batata (PLRV), prejudicando o transporte de carboidratos para a formação dos tubérculos (Peters, 1987). Efeitos similares com outros vírus também restritos ao floema foram observados, como no caso do *Abutilon mosaic virus* em folhas de *Abutilon striatum* (Lohaus *et al.*, 2000).

O carregamento de açúcares para o floema em plantas como fumo e batata ocorre pela via apoplástica (Van Bel, 1993), sendo, portanto improvável estabelecer uma relação entre o

tamanho de limite de exclusão (SEL) dos plasmodesmas e a alteração nos processos de transporte de açúcares destas espécies. Por outro lado, alguns trabalhos têm relatado evidências que o carregamento de açúcares para o floema em algumas espécies vegetais pode ocorrer pela via simplástica (Turgeon, 1989; Turgeon, 1995). Dessa forma, seria possível propor que as alterações no metabolismo de plantas infectadas por estes vírus, resultando num acúmulo de carboidratos, estariam relacionadas com uma alteração no diâmetro e na funcionalidade dos plasmodesmas.

As alterações no metabolismo e no transporte de carboidratos em plantas infectadas por luteovirus podem ser mais bem compreendidas quando associamos os mecanismos de replicação dos vírus à estas alterações. O processo de replicação da partícula viral de vírus como os luteovirus (RNA de fita simples e de senso positivo) ocorre no citoplasma da célula hospedeira (Matthews, 1991). Após este processo, as proteínas de replicação e as proteínas de movimento codificadas pelo vírus interagem e dão início ao processo de transporte do genoma viral, direcionando-o aos plasmodesmas, local onde ocorre o transporte destes entre as células (Carrington *et al.*, 1996). As proteínas de movimento (MP) por sua vez, interagem com os plasmodesmas das células alterando sua estrutura e função (Atkins *et al.*, 1991).

Utilizando-se de plantas transgênicas de fumo expressando a proteína de movimento do vírus do mosaico do fumo (TMV-MP), Balachandram *et al.* (1995) estudaram o efeito desta proteína no acúmulo de carboidratos nas folhas. Estes estudos revelaram que a TMV-MP exerce sua influência na alocação de carboidratos por um mecanismo que é completamente independente do mecanismo de alterar o tamanho do limite de exclusão dos plasmodesmas. Eles sugeriram que ocorreria uma interferência no processo de transdução de sinal regulatório nos plasmodesmas das células do mesófilo, porém não foi demonstrado que a expressão da proteína de movimento do vírus nas células da planta hospedeira representaria uma explicação generalizada para o acúmulo de carboidratos nas folhas infectadas.

Utilizando-se também de plantas transgênicas de fumo que expressavam esta mesma proteína (TMV-MP), Lucas *et al.* (1996) sugeriram que estas proteínas de movimento controlam o tráfego de moléculas sinalizadoras pelos plasmodesmas fazendo com que ocorra uma alteração nos mecanismos endógenos de controle de alocação de carboidratos, que resultariam num acúmulo destes.

O trabalho de Herbers *et al.* (1997) mostraram o efeito da proteína de movimento do PLRV (MP17), sobre o metabolismo de carboidratos e nos processos fotossintéticos em plantas transgênicas de fumo. As plantas transformadas, contendo esta proteína de movimento, sofreram um atraso no crescimento e desenvolveram um mosaico clorótico em suas folhas. Neste mesmo trabalho, os autores observaram mudanças nas concentrações de açúcares solúveis. O aumento nos teores de carboidratos, junto com o crescimento reduzido e a descoloração ou até necrose das folhas das plantas transformadas, sugerem que estas plantas sofrem uma limitação na capacidade de exportar açúcares. Secções ultrafinas de folhas de plantas infectadas revelaram alterações nos plasmodesmas do tecido floemático, enquanto que os plasmodesmas das células do mesófilo não sofreram modificações. Estes dados favorecem a hipótese de que o tecido floemático é o sítio primário da ação da proteína de movimento MP17 e que esta contribuiria em alterar o tamanho do limite de exclusão dos plasmodesmas, alterando também o metabolismo de carboidratos.

Como foi mencionado anteriormente, para um perfeito funcionamento do tecido floemático, plasmodesmas funcionais são requeridos. Os resultados do trabalho acima mencionado indicam que a PLRV-MP poderia de alguma forma interferir com o perfeito funcionamento dos plasmodesmas devido à sua afinidade por certos constituintes deste, além de impedir o tráfego, por estas vias, de moléculas sinalizantes que estabelecem a comunicação entre órgãos fonte/dreno.

A célula vegetal possui mecanismos de defesa contra fatores bióticos e abióticos. Este sistema de defesa das plantas inclui mecanismos bioquímicos tais como o acúmulo de compostos fenólicos ligados à parede celular, a síntese de fitoalexinas, a formação de proteínas estruturais da parede celular e a ativação de enzimas envolvidas na lignificação. A lignificação é uma das respostas das plantas ao ataque de patógenos, evento este que conta com a participação das enzimas fenilalaninamonialiasa (PAL) e das peroxidases, cujas atividades servem como indicadoras das respostas celulares das plantas ao estresse (Dixon *et al.*, 1994).

As peroxidases são enzimas largamente distribuídas dentro do Reino Vegetal e estão associadas com diferentes processos fisiológicos incluindo a regulação do crescimento e do alongamento celular, oxidação do ácido 3-indolacético, oxidação de fenóis e uma de suas principais funções, como integrantes do complexo celular é assegurar a desintoxicação das formas ativas de oxigênio (Gaspar *et al.*, 1991). Esta última função teria sua importância na formação das respostas metabólicas das plantas às diferentes formas de estresse. No entanto, ainda não está muito claro quais formas destas isoenzimas são responsáveis pelas várias funções das peroxidases, principalmente nos casos de estresse.

Nossos resultados mostraram um aumento significativo de peroxidases nas plantas infectadas pelo vírus e que mostravam os sintomas da doença, evidenciando um alto grau de correlação entre o aumento da atividade enzimática e a manifestação dos sintomas induzidos pelo vírus, nas variedades testadas. Este aumento foi observado tanto quando utilizamos guaiacol como substrato, como também com siringaldazina, sendo que o primeiro (guaiacol) estaria detectando todas as isoformas de peroxidase, enquanto o segundo (siringaldazina) apenas as peroxidases associadas com a lignificação da parede celular.

Resultados similares aos nossos foram obtidos por Souza *et al.*, 1999 que também observaram uma maior atividade de peroxidases em plantas de milho infectadas pelo vírus do

mosaico comum. Os resultados mostraram um aumento da atividade enzimática em duas situações: nas plantas inoculadas com o vírus (quando comparadas com plantas saudas da mesma linhagem) e em plantas saudas, porém de linhagens resistentes ao vírus.

Um outro exemplo do aumento da atividade de peroxidases também foi observado em plantas de batata de três variedades diferentes, todas infectadas pelo luteovírus PLRV (Schons & Manfroi, 1997), sendo que as plantas saudas das mesmas variedades não apresentaram alteração da atividade desta enzima. Estes resultados sugerem a participação destas enzimas nos mecanismos de defesa à doença.

A atividade da peroxidase também foi estudada para auxiliar na diferenciação entre isolados fracos e severos do Vírus da Tristeza dos Citros – CTV (Baptista *et al.*, 1998). Neste trabalho foi observada uma queda na atividade da peroxidase quando plantas de laranja haviam sido inoculadas com isolados fracos do CTV e um aumento da atividade da mesma enzima em plantas inoculadas com isolados severos do vírus.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a infecção pelo vírus e a conseqüente manifestação dos sintomas nas variedades testadas, são capazes de induzir respostas associadas com mecanismos de defesa, que foram evidenciadas pelo significativo aumento da atividade das peroxidases nestas plantas.

O avanço das pesquisas com ênfase no conhecimento dos mecanismos envolvidos nos efeitos da infecção viral e na fisiologia de suas hospedeiras deverá contribuir em muito para um melhor entendimento das interações planta-patógeno e dos mecanismos de resistência a doenças.

## 6. CONCLUSÕES

- 1) A etiologia viral da doença foi confirmada pela transmissão do vírus pelos afídeos vetores *Melanaphis sacchari* e *Rhopalosiphum maidis* e pela reprodução dos sintomas nas plantas inoculadas, comprovando que o vírus identificado como ScYLV é o agente causal da síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar, ratificando a etiologia viral da SAFCA e completando os Postulados de Koch.
- 2) O ScYLV não é transmitido por inoculação mecânica.
- 3) O ScYLV não é transmitido pelo afídeo *Sipha flava*.
- 4) A transmissão do vírus por insetos vetores ocorre apenas entre plantas de cana-de-açúcar. Tentativas de transmissão do vírus para outras gramíneas foram negativas.

---

- 5) A metodologia de purificação do vírus empregada foi eficiente para a obtenção de partículas virais purificadas em alta concentração e livres de contaminantes da planta hospedeira.
- 6) As propriedades biológicas e físicas das partículas virais (o tamanho e o formato isométrico, transmissão exclusiva feita por afídeos, sintomas de ‘amarelos’ na planta hospedeira, características da proteína do capsídeo viral e do ácido nucléico) em conjunto com a já descrita localização restrita ao floema, permitem concluir que o ScYLV pertence a família *Luteoviridae*.

- 7) Os anticorpos policlonais produzidos e a padronização da técnica DAS-ELISA revelaram-se um instrumento seguro para fins de detecção e diagnóstico do vírus em larga escala.
- 8) A intensidade dos sintomas observados nas variedades mais sensíveis ao vírus não apresenta relação direta com a concentração viral das mesmas.
- 9) As análises do conteúdo de açúcares solúveis feitas nas folhas mostraram um acúmulo destes em plantas infectadas pelo vírus e com sintomas da doença, sendo que em plantas saudáveis ou infectadas sem sintomas, este fenômeno não ocorre.
- 10) Folhas de plantas infectadas pelo vírus e que apresentam os sintomas da doença possuem uma maior atividade de peroxidases em relação às folhas de plantas saudáveis, demonstrando a participação destas enzimas com os mecanismos de defesa das plantas em resposta a doenças.

## 7. LITERATURA CITADA

- Abbot, E.V., Martin, J.P., Abbot, E.B. & G.G. Hughes. 1961. Mosaic: Sugarcane diseases of the world. Elsevier Publishing, 542 p.
- Ahlawat, Y.S., Pant, R.P., Lockhart, B.E.L., Srivastava, M., Chakraborty, N.K. & Varma, A. 1996. Association of a badnavirus with citrus mosaic disease in India. Plant Disease, 80:590-592.
- Anon, A. 1996. Yellow leaf syndrome. Annual Report Mauritius Sugar Industry Research Institute, 35 p.
- Arruda, S.C. 1946. As doenças da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. Mosaico. O Biológico, 13:21-27.
- Atabekov, J.G., Taliansky, M.E., Drampyan, A.H., Kaplan, I.B. & Turka, I.E. 1984. Systemic infection by a phloem-restricted virus in parenchyma cells in mixed infection. Biologicheskie nauki, 10:28-31.
- Atkins, D., Hull, R., Wells, B., Roberts, K., Moore, P. & Beachy, R.N. 1991. The *Tobacco mosaic virus* 30 K movement protein in transgenic tobacco plant is localized to plasmodesmata. Journal of General Virology, 72:209-211.
- Bahner, I., Lamb, J., Mayo, M. A. & Hay, R. T. 1990. Expression of the genome of *Potato leafroll virus* readthrough of coat protein termination codon *in vivo*. Journal of General Virology, 71:2251-2256.
- Bailey, R.A., Bechet, G.R. & Cronjé, C.P.R. 1996. Notes on the occurrence of yellow leaf syndrome of sugarcane in southern Africa. Proceedings of the South African Technologists Association, 70:3-6.
- Balachandran, S., Hull, R., Vaadia, Y., Wolf, S. & Lucas, W.J. 1995. Alteration in carbon partitioning induced by the movement protein of *Tobacco mosaic virus*

- originates in the mesophyll and is independent of change in the exclusion size limit. Plant Cell Environment, 18:1301-1310.
- Baptista, C.R, Müller, G.W. & Vega, J. 1998. Vírus da tristeza dos citros: relação entre severidade de isolados e atividade peroxidásica ligada a lignificação. Fitopatologia Brasileira, 23:317.
- Barker, H. 1987. Invasion of non-phloem tissue in *Nicotiana clevelandii* by potato leafroll luteovirus is enhanced in plants also infected with potato Y potyvirus. Journal of General Virology, 68:1223-1227.
- Barlass, M., Skene, K. & Woodham, R.C. 1982. Regeneration of virus-free grapevines using *in vitro* apical culture. Annals of Applied Biology, 101:291-295.
- Bates, D.C. & Chant, S.R. 1980. Alterations in peroxidase activity and peroxidase isoenzymes in virus-infected plants. Annals of Applied Biology, 65:105-110.
- Beemster, A. 1987. Survey of properties and symptoms. In: Viruses of potatoes and seed potato production. Pudoc, Wageningen, pp. 84-113.
- Bokx, de J.A. 1967. The callose test for the detection of leafroll virus in potato tubers. European Potato Journal, 10:221-234.
- Borth, W., Hu, J. & Schenck, S. 1994. Double-stranded RNA associated with sugarcane yellow leaf syndrome. Sugar Cane, 3:5-8.
- Bostock, R.M. & Stermer, B.A. 1989. Perspectives on wound healing in resistance to pathogens. Annual Review of Phytopathology, 27:343-371.
- Bruner, R. & Vinograd, J. 1965. Evaluation of standard sedimentation coefficients of sodium RNA and sodium DNA from sedimentation velocity data in concentrated NaCl and CsCl solutions. Biochemistry and Biophysics Acta, 108:1-18.

- Carrington, J.C., Kasshaw, K.D., Mahajan, S.K. & Shaad, M.C. 1996. Cell-to-cell and long distance transport of viruses. Plant Cell, 8:1669-1681.
- Cheng, S.L., Dominier, L.L. & D'Arcy, C.J. 1994. Detection of the readthrough protein of *Barley yellow dwarf virus*. Virology, 202:1003-1006.
- Clark, M.F. & Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34:475-483.
- Comstock, J.C., Irvine, J.E. & Miller, J.D. 1994. Yellow leaf syndrome appears on the United States Mainland. Sugar Journal, 12:33-35.
- Comstock, J.C., Irely, M.S., Lockhart, B.E.L. & Wang, Z.K. 1998. Incidence of yellow leaf syndrome in CP cultivars based on polymerase chain reaction and serological techniques. Sugar Cane, 4:21-28.
- Costa, C.L. 1998. Revisão Anual de Patologia de Plantas. Volume 6. Editor: Wilmar da Cório Luz.
- Cronjé, C.P.R., Tymon, A.M., Jones, P. & Bailey, R.A. 1998. Association of a phytoplasma with a yellow leaf syndrome of sugarcane in Africa. Annals of Applied Biology, 133:177-186.
- D'Arcy, C.J. & de Zoeten, G.A. 1979. *Beet yellows western virus* in phloem tissue of *Thlaspi arvense*. Phytopathology, 69:1194-1198.
- D'Arcy, C.J. & Hewings, A.D. 1986. Enzyme –linked immunosorbent assays for the study of serological relationships and detection of three luteoviruses. Phytopathology, 73:755-759.
- D'Arcy, C.J., Hewings, D.A., Burnett, P.A. & Jedlinski, H. 1983. Purification, density and some properties of an isolate of *Barley yellow dwarf virus* from Indiana. Journal of General Virology, 64:667-676.

- D'Arcy, C.J., Martin, R.R. & Spiegel, S. 1989. A comparative study of luteovirus purification methods. Canadian Journal of Plant Pathology, 11:251-255.
- Dianese, J.C. 1990. Patologia vegetal: agressão e defesa em sistemas planta/patógeno. Brasília, Editora Universidade de Brasília.
- Dixon, R.A., Harrison, M.J. & Lamb, C.J. 1994. Early events in the activation of plant defense responses. Annual Review of Phytopathology, 32:479-501.
- Doke, N., Chai, H.B. & Kawaguchi, A. 1987. Biochemical basis of triggering and suppression of hypersensitive cell response. In: Molecular determinants of plant diseases. Eds: Nishimura, Vance & Doke. Tokyo, Springer-Verlag/ Japan. Scientific Societies Press, pp. 75-95.
- Du, Y.C., Nose, A., Kondo, K. & Wasano, K. 2000. Diurnal changes in photosynthesis in sugarcane leaves. II. Enzyme activities and metabolite levels relating to sucrose and starch metabolism. Plant Production and Science, 3:9-16.
- Duffus, J.E. 1964. Host relationships of *Beet western yellows virus* strains. Phytopathology, 54:736-738.
- Esau, K. 1957. Phloem degeneration in the *Gramineae* affected by the *Barley yellow dwarf virus*. American Journal of Botany, 44:245-251.
- Esau, K. & Hoefert, L.L. 1972. Ultrastructure of sugar beet leaves infected with *Beet western yellows virus*. Journal of Ultrastructure Research, 40:556-562.
- Faccioli, G., Panopoulos, N.J. & Gold, A.H. 1982. Kinetics of the carbohydrate metabolism in potato leafroll infected *Physalis floridiana*. Phytopathologia Mediterranea, 10:1-25.
- Fenner, F. 1976. The classification and nomenclature of viruses: Second Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Intervirolgy, 7:1-115.

- Figueira, A.R., Domier, L.L. & D'Arcy C.J. 1997. Comparison of techniques for the detection of *Barley yellow dwarf virus-PAV* - Illinois. Plant Disease, 81/11:1236-1240.
- Fitch, M.M., Lehrer, A.T., Komor, E. & Moore, P.H. 2001. Elimination of *Sugarcane yellow leaf virus* from infected sugarcane plants by meristem tip culture visualized by tissue blot immunoassay. Plant Pathology, 50:676-680.
- Francki, R.I.B, Milne, R.G. & Hatta, T. 1985. Luteovirus Group. In: Atlas of Plant Viruses. Volume I, CRC Press, pp. 137-152.
- Gaspar, T.H., Penel, C., Hagege, D. & Greppin, H. 1991. Peroxidases in plant growth, differentiation and development process. In: Biochemical, molecular and physiological aspects of peroxidases. Eds.: Lobarzevski, Greppin, Pennel, Gaspar. University of Geneva, pp. 249-280.
- Gibbs, A. & Harrison, B. 1976. Plant Virology. The principles. Ed. Edward Arnold, London, 211 p.
- Gildow, F.E. 1999. Luteovirus transmission and mechanisms regulating vector specificity. In: The Luteoviridae. Editors: H.G.Smith & H. Barker, CABI Publishing, NY, pp. 88-112.
- Gildow, F.E. & Rochow, W.F. 1980. Role of accessory salivary glands in aphid transmission of *Barley yellow dwarf virus*. Virology, 104:97-108.
- Gill, C.C. & Chong, J. 1976. Differences in cellular ultrastructural alterations between variants of *Barley yellow dwarf virus*. Virology, 75:33-47.
- Gill, C.C. & Chong, J. 1979. Cytopathological evidence for the division of *Barley yellow dwarf virus* isolates into two subgroups. Virology, 95:59-59.

- Golberg, R., Catesson, A.M. & Czaninski, Y. 1983. Some properties of syringaldazine oxidase, a peroxidase specifically involved in the lignification processes. Zeitschrift Pflanzenphysiologie, 110:267-279.
- Gonçalves, M.C., Klerks, M.M., Verbeek, M., Vega, J. & Van den Heuvel, J.F.J. 2002. The use of molecular beacons combined with NASBA for the sensitive detection of *Sugarcane yellow leaf virus*. European Journal of Plant Pathology, 108:401-407.
- Goodman, R.N., Király, Z. & Wood, K.R. 1986. The biochemistry and physiology of plant disease. University of Missouri Press, Columbia, 435p.
- Harrison, B.D. 1999. Steps in the development of luteovirology. In: The Luteoviridae. Editors: H.G.Smith & H. Barker, CABI Publishing, NY, pp. 1-14.
- Hatta, T. & Francki, R.I.B. 1981. Identification of small polyhedral virus particles in thin sections of plant cells by an enzyme cytochemical technique. Journal of Ultrastructure Research, 74:116-120.
- Herbers, K., Tacke, E., Hajirezaei, M., Krause, K.P., Melzer, M., Rohde, W. & Sonnewald, U. 1997. Expression of a luteoviral movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced photosynthetic capacity in source leaves. Plant Journal, 12:1045-1056.
- Irvine, J.E. 1993. A síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar no Brasil. Texas Agricultural Experiment Station Report, Weslaco, 22p.
- Jensen, S.G. 1969. Occurrence of virus particles in the phloem tissue of BYDV infected barley. Virology, 38:83-91.
- Király, Z. 1980. Defenses triggered by the invader: hypersensitivity. In: How plants defend themselves: an advanced treatise. Eds: Horsfall, & Cowling. New York, Academic Press, Vol. 5., pp. 201-224.

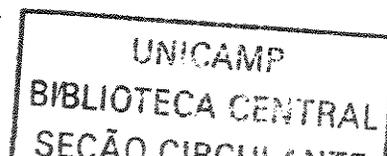
- Kitajima, E.W. & Nome, C.F. 1999. Microscopia electronica en virologia vegetal. In: Métodos para detectar patógenos sistémicos. Eds: Docampo & Lenardón. IFFIVE/INTA-JICA, 59-87.
- Kitajima, E.W., Ávila, A.C. & Resende, R.O. 1997. Taxonomy of plant viruses. Fitopatologia Brasileira, 22:5-24.
- Koenig, R. & Paul, H.L. 1982. Variants of ELISA in plant virus diagnosis. Journal of Virological Methods, 5:113-125.
- Ladygina, M.E. & Babosha, V. 1996. Physiological and biochemical mechanisms governing viral pathogenesis and plant antiviral activity. Russian Journal of Plant Physiology, 43: 636-647.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227:680-685.
- Leisner, S.M. & Turgeon, R. 1993. Movement of virus and photo assimilate in the phloem: a comparative analysis. BioEssay, 15:741-748.
- Lewis, N. & Yamamoto, E. 1990. Lignin, occurrence, biogenesis and biodegradation. Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology, 41:455-496.
- Lister, R.M., Clement, D., Skaria, M. & McFatridge, J.A. 1985. Stability of ELISA activity of *Barley yellow dwarf virus* in leaf samples and extracts. Plant Disease, 69:854-857.
- Lister, R.M., About-Ata, A.E., El-Daoudi, Y.H., Marshall, D., Makkouk, K., Satour, M.M., Ghanem, E. & Burnett, P.A. 1994. Serotyping of *Barley yellow dwarf virus* isolates from Egypt. Phytopathologia Mediterranea, 33:152-157.
- Liyama, K., La., T.B.T., Meikle, P.J., Rhodes, D.I., & Stone, B.A. 1993. Cell wall biosynthesis and its regulation. In: Forage cell wall structure and digestibility.

- Eds: Jung, Buxton & Hatfield. American Society of Agronomy, Madison, pp. 621-683.
- Lockhart, B.E.L. 1990. Evidence for a double-stranded DNA genome in a second group of plant viruses. Phytopathology, 80:127-130.
- Lockhart, B.E.L., Autrey, L.J.C. & Comstock, J.C. 1992. Partial purification and serology of *Sugarcane mild mosaic virus*, a mealy bug-transmitted closterolike virus. Phytopathology, 82:691-695.
- Lockhart, B.E.L., Ireby, M.J. & Comstock, J.C. 1996. Sugarcane baciliform virus, sugarcane mild mosaic virus and sugarcane yellow leaf syndrome. Pages 108-112 in: Sugarcane Germoplasm Conservation and Exchange. Eds.: B. J. Croft, C. M. Piggin, E. S. Wallis, and D. M. Hogarth. Australian Center for International Agricultural Research, Canberra.
- Loebenstein, G. & Linsey, N. 1986. Alteration of peroxidase activity associated with disease symptoms in virus-infected plants. Israel Journal of Botany, 15:163-167.
- Lohaus, G., Heldt, H.W. & Osmond, C.B. 2000. Infection with phloem limited *Abutilon mosaic virus* causes localized carbohydrate accumulation in leaves of *Abutilon striatum*: relationships to symptom development and effects on chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction. Plant Biology, 2:161-167.
- Lopes, J.R.S., Vega, J., Gonçalves, M.C., Krugner, R. & Navas, S.M. 1997. Aphid transmission of a virus associated with Sugarcane Yellow Leaf Disease. Fitopatologia Brasileira, 22:337.
- Lucas, W.J., Balachandran, S., Park, J. & Wolf, S. 1996. Plasmodesmal companion cell-mesophyll communication in the control over carbon metabolism and

- phloem transport: insight gained by viral movement protein. Journal of Experimental Botany, 47:1119-1128.
- MacKenzie, D. 1990. Globulin conjugation methods. In: Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. Eds.: Hampton, Ball & De Boer. American Phytopathological Society, St.Paul/MN, USA, pp. 87-92.
- Maia, I.G., Gonçalves, M.C., Arruda, P. & Vega, J. 2000. Molecular evidence that *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) is a member of the *Luteoviridae* family. Archives of Virology, 145:1-11.
- Martin, R.R., Keese, P.K., Young, M.J., Waterhouse, P.M. & Gerlach, W.L. 1990. Evolution and molecular biology of luteoviruses. Annual Review of Phytopathology, 28:341-363.
- Matsubara, A, Kojima, M., Kawano, S., Narita, M., Hattori, M., Uyeda, I., & Shikata, E. 1985. Purification and serology of a Japanese isolate of *Barley yellow dwarf virus*. Annual Review of Phytopathological Society of Japan, 51:152-158.
- Matsuoka, S. & Meneghin, S.P. 1997. Yellow leaf syndrome of sugarcane: a holistic approach. In: Abstracts of the Pathology & Molecular Biology Workshop in South Africa, 1.
- Matthews, R.E.F. 1991. Plant Virology. Third Edition. San Diego: Academic Press Inc. pp 335- 368.
- Matthews, R.E.F. 1992. Effects on plant metabolism. In: Fundamentals of Plant Virology. Academic Press Inc.pp. 236-239.
- Mayo, M.A. & Ziegler-Graff, V. 1996. Molecular biology of luteoviruses. Advances of Virus Research, 46:416-468.

- Mayo, M.A., Barker, H., Robinson, D.J., Tamada, T., & Harrison, B.D. 1982. Evidence that *Potato leafroll virus* RNA is positive-stranded, is linked to a small protein and does not contain polyadenylate. Journal of General Virology, 59:163-170.
- Mellor, F.C. & Stace-Smith, R. 1977. Virus-free potatoes by tissue culture. In: Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Eds.: J Reinert and Y. P. S. Bajaj. Springer-Verlag, Berlin. pp. 616-635.
- Meneghin, S.P. & Matsuoka, S. 1995. A soil fungus affecting the sugarcane production in Brazil. Universidade Federal de São Carlos. Sugar Journal, 21.
- Miller, W.A. & Rasochová, L. 1997. Barley yellow dwarf viruses. Annual Review of Phytopathology, 35:167-190.
- Moonan, F., Molina, J. & Mirkov, T.E. 2000. *Sugarcane yellow leaf virus*: an emerging virus that has evolved by recombination between Luteoviral and Poleroviral ancestors. Virology, 269:156-171.
- Moonan, F. & Mirkov, T.E. 2002. Analyses of genotypic diversity among North, South and Central American isolates of *Sugarcane yellow leaf virus*: evidence for Colombian origins and for intraspecific spatial phylogenetic variation. Journal of Virology, 76/3:1339-1348.
- Mowat, W.P. & Dawson, S. 1987. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. Journal of Virological Methods, 15:233-247.
- Murant, A.F. & Roberts, I.M. 1977. Virus-like particles in phloem tissue of chervil (*Anthriscus cerefolium*) infected with anthriscus yellows virus. Annals of Applied Biology, 85:403-410.

- Nelson, R.S & Van Bel, A.J.E. 1998. The mystery of virus trafficking into, through and out of the vascular tissue. Progress in Botany, 59:476-533.
- Nicholson, R.L. & Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. Annual Review of Phytopathology, 30:369-389.
- Orlob, G.B. & Arny, D.C.1961. Some metabolic changes accompanying infection by *Barley yellow dwarf virus*. Phytopathology, 51:768-772.
- Oswald, J.W. & Houston, B.R. 1951. A new virus disease of cereals, transmissible by aphids. Plant Disease Reporter, 35:471-475.
- Panopoulos, N.J., Gold, A.H. & Faccioli, G. 1972. Translocation of photosynthate in Curly Top Virus infected tomatoes. Plant Physiology, 50:266-270.
- Pascholatti, S.F. & Leite, B. 1994. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. Revisão Anual de Patologia de Plantas (Vol. 2), pp. 1-51.
- Peters, D. 1987. Spread of viruses in potato crops. In: Viruses of potatoes and seed-potato production. Eds.: Bokx & Vand der Want. Second Edition. Pudoc-Wageningen, pp. 126-145.
- Peyrano, G., Taleisnik, E., Quiroga, M., Forchetti, S. & Tigier, H. 1997. Salinity effects on hydraulic conductance, lignin content and peroxidase activity in tomato roots. Plant Physiology and Biochemistry, 35/5:387-393.
- Ricaud, C. 1968. Yellow wilt of sugarcane in eastern Africa. Sugarcane Pathology Newsletter, 1:45-49.
- Ride, J.P. 1978. The role of cell wall alterations in resistance to fungi. Annals of Applied Biology, 89:302-306.
- Robertson, N.L., French, R. & Gray, S.M. 1991. Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. Journal of General Virology, 72:1473-1477.



- Rochow, W.F. & Duffus, J.E. 1981. Luteoviruses and yellows diseases. In: Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. Editor: E. Kurstak. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp.147-170.
- Salazar, L.F., Querci, M., Bartolini, I. & Lazarte, V. 1995. Aphid transmission of *Potato spindle tuber viroid* assisted by *Potato leafroll virus*. Fitopatologia, 30:56-58.
- Scagliusi, S.M.M. & Lockhart, B.E.L. 2000. Transmission, characterization and serology of a luteovirus associated with yellow leaf syndrome of sugarcane. Phytopathology, 90:120-124.
- Schenck, S. 1990. Yellow leaf syndrome – a new sugarcane disease. Annual Report of Experimental Station Hawaiian Sugar Planters Association, 38p.
- Schenck, S., & Hu, J.S. 1991. Update on the cause of sugarcane yellow leaf syndrome. Page 26. In: Proceedings Hawaiian Sugar Technology. 1991. Hawaiian Sugar Planters Association, Honolulu.
- Schenck, S., & Lehrer, A.T. 2000. Factors affecting the transmission and spread of *Sugarcane yellow leaf virus*. Plant Disease, 84/10:1085-1088.
- Schons, J. & Manfroi, R. 1997. Efeito do *Potato leafroll virus* sobre o metabolismo de plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.). Fitopatologia Brasileira, 22:637.
- Schmitz, J., Stussi-Garaud, C., Tacke, E. Prufer, D., Rhode, W. & Rohfritsch. 1997. *In situ* localization of the putative movement protein (pr17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants. Virology, 235:311-322.
- Sheffield, F.M.L. 1943. Value of phloem necrosis in the diagnosis of *Potato leafroll virus*. Annals of Applied Biology, 30:131-136.

- Shepardson, S., Esau, K. & McCrum, R. 1980. Ultrastructure of potato leaf phloem infected with *Potato leafroll virus*. Virology, 105:379-385.
- Smith, G.R., Fraser, T.A., Braithwaite, K.S & Harding, R.M. 1995. RT-PCR amplification of RNA from sugarcane with yellow leaf syndrome using luteovirus group-specific primers. Proceedings of the 10<sup>th</sup> Australasian Plant Pathology Society Conference, p.84.
- Smith, G.R., Borg, Z., Lockhart, B.E.L., Braithwaite, K.S. & Gibbs, M. J. 2000. *Sugarcane yellow leaf virus*: a novel member of the *Luteoviridae* that probably arose by inter-species recombination. Journal of General Virology, 81:1865-1869.
- Smyrnioudis, N., Harrington, R., Hall, M., Katis, N., & Clark, S.J. 2001. The effect of temperature on variation of a BYDV PAV-like isolate by clones of *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae*. European Journal of Plant Pathology, 107:167-173.
- Sordi, R. 1996. Relatório Anual Copersucar.
- Souza, I.R.P., Oliveira, E., Purcino, A.C., Gama, E.G. & Paiva, E. 1999. Atividade da peroxidase em linhagens de milho resistentes e susceptíveis ao mosaico causado por potyvirus. Fitopatologia Brasileira, 24:355.
- Souza-Dias, J.A.C. 1999. Serviço de imunodiagnose de vírus da batata no Instituto Agrônomo de Campinas atinge o marco de 300 mil testes. O Agrônomo, 51:2-3.
- Souza-Dias, J.A.C. & Costa, A.S. 1983. Vacinação contra enrolamento poderá cortar a importação de batata-semente. Revista Casa da Agricultura, 5:1-3.

- Takanami, Y. & Kubo, S. 1979. Enzyme-assisted purification of two phloem-limited plant viruses: Tobacco necrotic dwarf and potato leafroll. Journal of General Virology, 44:153-159.
- Torrance, L. 1987. Use of amplification in an ELISA to increase sensitivity of detection of *Barley yellow dwarf virus* in oats and in individual vector aphids. Journal of Virological Methods, 15:131-138.
- Turgeon, R. 1989. The sink-source transition in leaves. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 40:119-138.
- Turgeon, R. 1995. The selection of raffinose oligosaccharides as translocates in higher plants. In: Carbon partitioning and Source-Sink Interactions in Plants. Madore & Lucas Editors, pp. 195-203. American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA.
- Van Bel, A.J.E. 1993. Strategies of phloem loading. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 44:397-411.
- Van den Heuvel, J.F.M., Verbeek, M. & van der Wilk, F. 1994. Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of *Potato leafroll virus* by *Myzus persicae*. Journal of General Virology, 75:2559-2565.
- Van den Heuvel, J.F.M., de Blank, C.M., Peters, D., & van Lent, J.W.M. 1995. Localization of *Potato leafroll virus* in leaves of secondarily infected potato plants. European Journal of Plant Pathology, 101:567-571.
- Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H., Carstens, E.B., Estes, M.K. & Mayo, D.J. 2000. Virus taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, New York, NY.
- Vega, J. 1994. Sugarcane leaf yellowing syndrome: Evidence for association with virus. Summa Phytopathologica, 20-50.

- Vega, J., Rezende, J.A.M., Yuki, V.A. 1995. Detecção do vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita no Brasil: caracterização parcial de um isolado encontrado em São Paulo. Fitopatologia Brasileira, 20/1:72-79.
- Vega, J., Scagliusi, S.M.M., & Ulian, E.C. 1997. Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: Evidence of association with a luteovirus. Plant Disease, 81:21-26.
- Walkey, D. 1991. Virus Identification. In: Applied Plant Virology. Chapman & Hall, London. pp.133-167.
- Walter, M.H. 1992. Regulation of lignification in defense. In: Genes involved in plant defense. Eds.:Boller & Meins. Springer, Wien, pp. 327-352.
- Wang, J.Y., Chay, C., Gildow, F.E. & Gray, S.M. 1995. Readthrough protein associated with virions of Barley yellow dwarf luteovirus and its potential role in regulating the efficiency of aphid transmission. Virology, 206:954-962.
- Waterhouse, P.M. & Helms, K. 1984. Purification of particles of *Subterranean clover red virus* using an industrial-grade cellulase. Journal of Virological Methods, 8:321-329.
- Waterhouse, P.M., Gildow, F.E. & Johnstone, G.R. 1988. Luteovirus Group. Description of Plant Viruses No. 339. AAB, Wellsbourne, Warwick, England.
- Waterhouse, P.M., Martin, R.R. & Gerlach, W.L. 1989. BYDV-PAV virions contain readthrough protein. Phytopathology, 79:1215.
- Watson, M.A 1971. The effect of infection with beet yellows and beet mosaic viruses on the carbohydrate content of sugar beet leaves and on translocation. Annals of Applied Biology, 38:276-288.
- Wolf, S., Deom, C.M., Beachy, R.N. & Lucas, W.J. 1989. Movement protein of *Tobacco mosaic virus* modifies plasmodesmatal size exclusion limit. Science, 246:377-379.

Wrigley, N.G. 1968. The lattice spacing of crystalline catalase as an internal standard of length in electron microscopy. Journal of Ultrastructure Research, 24:454-464.