

Detecção de Mollicutes de Milho Por Testes Serológicos

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC

Antonio A. C. Purcino¹, Anne C. Pinto², Isabel R. P. De Souza¹, Charles M. Oliveiras e Elizabeth Oliveira¹

¹Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, 35.701-970 Sete Lagoas, MG, corsetti@cnpmc.embrapa.br, ²Bolsista BAP FAPEMIG, ³Bolsista Recém-doutor CNPq

Palavras-chave: enfezamentos, *Zea mays*, antissoro

A classe Mollicutes inclui dois patógenos do milho: *Spiroplasma kunkelii* e fitoplasma, que causam as doenças Enfezamentos Pálido ("Corn stunt spiroplasma") e Vermelho ("Maize bushy stunt phytoplasma"), respectivamente. Estes patógenos são procariontes sem parede celular e multiplicam-se no floema das plantas de milho sendo transmitidos por cigarrinhas. No Brasil, a cigarrinha *Dalbulus maidis* é o vetor destes mollicutes (Oliveira et al 2002a). Algumas vezes, a infecção de plantas de milho por espiroplasma e por fitoplasma pode determinar a expressão de sintomas tão típicos que a exata identificação destes patógenos pode ser feita com base apenas nestes sintomas. Entretanto, em geral, a manifestação destes sintomas é muito variável, podendo ser influenciada pela cultivar de milho, pela idade em que a planta foi infectada e pelas condições ambientais. Estes fatores dificultam muito a realização do diagnóstico e, principalmente, a identificação de qual destes patógenos está presente na planta. Além disto, algumas vezes, a planta doente pode estar infectada simultaneamente por fitoplasma e por espiroplasma (Oliveira et al. 2002b). Para a identificação destes mollicutes em milho pode-se recorrer a técnicas laboriosas da microscopia ótica e eletrônica ou mais recentemente, aos testes da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Barros et al. 2000). Especificamente, para a identificação do espiroplasma, têm sido utilizados alguns testes sorológicos como o teste da deformação e o teste ELISA (Eden-Green, 1982). O espiroplasma pode ser multiplicado em cultura axênica, o que facilita a obtenção de antígeno para produção de anticorpos para sua detecção por testes sorológicos (Lee & Davis, 1984). Contudo, não têm sido encontrados na literatura relatos sobre a produção de anticorpos para detecção do fitoplasma do milho, o que provavelmente se deve, em parte, à impossibilidade, até o momento, de multiplicação deste microorganismo em cultura axênica (Lee et al. 1998). Os métodos sorológicos podem ser muitas vezes vantajosos em relação aos métodos moleculares baseados na análise de DNA como o teste de PCR devido, principalmente, ao seu menor custo, facilidade de execução, e possibilidade de análise de grande número de amostras. Anticorpos com título e especificidade adequados são requeridos em testes imunológicos para obtenção de resultados consistentes e interpretáveis. Rotineiramente, anticorpos policlonais têm sido utilizados para detecção de vírus e bactérias em plantas. Estes podem ser obtidos pela imunização de coelhos com injeções do antígeno em emulsão em adjuvante de Freund, e posteriormente purificados do soro sanguíneo do animal. O antissoro policlonal resulta de uma resposta imune generalizada e pode reagir com diferentes determinantes imunogênicos, sendo isto vantajoso quando a população do patógeno a ser detectado é potencialmente variável. Neste caso, embora alguns anticorpos individuais na população possam apresentar baixa afinidade pelo antígeno, a reatividade do antissoro como um todo, não é afetada. Os testes de detecção de patógenos de plantas

podem ser requeridos, por exemplo, para a realização de diagnósticos precisos das doenças que causam, em estudos de resistência genética e de epidemiologia e, são essenciais ao desenvolvimento de estratégias de controle das doenças vegetais. Portanto, os objetivos deste trabalho foram produzir e testar um antissoro específico contra fitoplasma e testar um antissoro contra espiroplasma desenvolvido pela "Pioneer Hi Breed International".

Material e Métodos

Para purificação do fitoplasma e produção de seu antissoro policlonal em coelho, utilizou-se uma planta infectada por este microorganismo. Inicialmente, foi identificada no campo uma planta de milho infectada apenas por fitoplasma. Esta identificação foi feita primeiro com base nos sintomas de Enfezamento Vermelho apresentados pela planta, e em seguida pela confirmação de infecção apenas por fitoplasma, através do teste de PCR multiplex. Neste PCR foram utilizados os iniciadores: CSSF2: 5'-GGC AAA AGA TGT AAC AAA AGT-3' e CSSR6: 5'-GTT TAC TTC AAC AGT AGT TGC G-3' para detecção de espiroplasma (Barros et al. 2001) e R16F2: 5'-ACG ACT GCT GCT AAG ACT GG-3' e R16R2: 5'-TGA CGG GCG GTG GTA CAA ACC CCG-3', para detecção de fitoplasma, e condições de reação descritas por Lee et al. (1993). O DNA foi extraído de uma amostra da folha bandeira coletada nesta planta. O roteiro de purificação do fitoplasma seguiu basicamente o protocolo proposto por Clark (1992). Este protocolo envolve passos de precipitação de proteínas, reação cruzada com antissoro anti-planta, filtração em coluna de proteína A e ultracentrifugação. O fitoplasma obtido foi então utilizado para imunização de coelho conforme o protocolo de Dunbar e Schwoebel (1990).

Resultados

A análise por SDS-PAGE do fitoplasma obtido apresentou uma proteína de aproximadamente 84 kDa, sugerindo que o fitoplasma foi purificado sem rompimento de sua membrana celular (Figura 1, canaletas 1 e 2). A presença de duas proteínas menos intensas, uma com massa molecular próxima de 209 kDa e outra com massa maior que 84 kDa, provavelmente indicam a presença de uma pequena contaminação do fitoplasma com proteínas de origem vegetal.

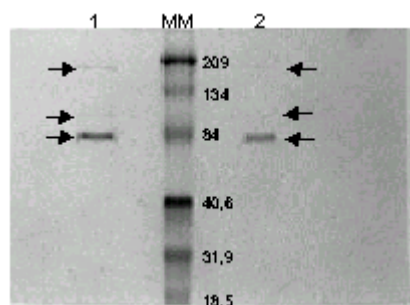


Figura 1. SDS-PAGE de fitoplasma purificado de tecido foliar de milho segundo o protocolo descrito por Clark et al. (1992). Canaletas 1 e 2 carregadas com fitoplasma, MM marcadores de massa molecular conhecida.

Observa-se na figura 2 o padrão de bandas produzidos por este antissoro em plantas sadias, em plantas infectadas com fitoplasma e em plantas infectadas por espiroplasma. Estas proteínas foram separadas por SDS-PAGE, eletrotransferidas para membrana de PVDF e a seguir sondadas com o antissoro contra fitoplasma (Western blot).

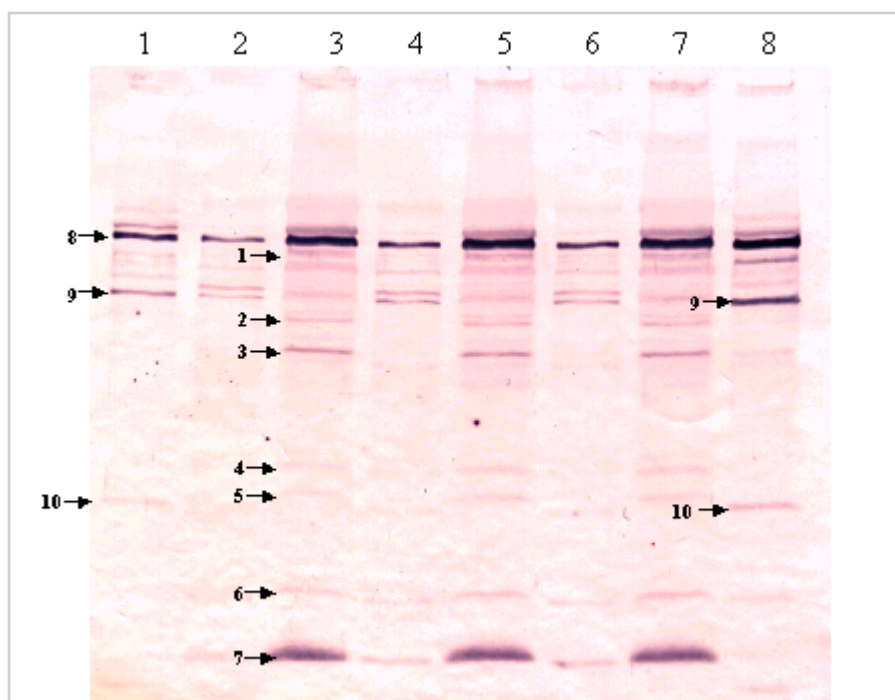


Figura 2. Padrão de proteínas produzido pelo antissoro da quarta sangria do coelho inoculado com fitoplasma. Canaletas 1 e 8 – planta sadia, canaletas 2, 4 e 6 – plantas infectadas com espiroplasma, canaleta 3, 5 e 7 – plantas infectadas com fitoplasma

Verifica-se na figura 2, que este antissoro apresenta algumas proteínas monomórficas para plantas sadias, infectadas por fitoplasma e infectadas por espiroplasma. Isto sugere que estas proteínas monomórficas foram reconhecidas por anticorpos gerados contra proteínas de plantas que ainda contaminavam o extrato contendo fitoplasma que foi injetado no coelho. Entretanto, pode-se observar que este antissoro também reconhece pelo menos sete proteínas (setas 1 a 7 na canaleta 3) capazes de identificar plantas infectadas pelo fitoplasma, já que estas proteínas não estão presentes nos extratos protéicos das plantas sadias ou das plantas infectadas pelo espiroplasma. Na canaleta 1, as setas 9 e 10 indicam proteínas presentes nas plantas sadias mas que desaparecem nas plantas infectadas com fitoplasma. Ainda nesta canaleta, a seta 8 indica uma proteína monomórfica, que aparece tanto nas plantas sadias quanto naquelas infectadas por fitoplasma ou espiroplasma. Para avaliação do antissoro contra espiroplasma conduziu-se experimentos tipo SDS-PAGE/Western Blot visando determinar a capacidade deste antissoro em reconhecer plantas infectadas por espiroplasma e averiguar se o mesmo mostrava alguma reação cruzada com plantas infectadas com fitoplasma. A Figura 3 é representativa dos resultados obtidos nestes experimentos.

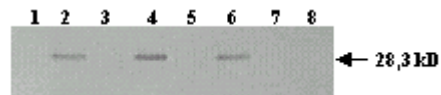


Figura 3- Padrão de proteínas produzido pelo antissoro contra espiroplasma quando utilizado para detecção em plantas infectadas por fitoplasma (canaletas 1, 3 e 5) e por espiroplasma (canaletas 2, 4 e 6) e em plantas saudias (canaletas 7 e 8).

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o antissoro produzido contra fitoplasma pode reconhecer até 7 proteínas associadas com a infecção por fitoplasma em folhas de milho. Entretanto, a possível existência de variabilidade genética entre os fitoplasmas, que infectam o milho no Brasil, dificulta o uso deste antissoro como uma ferramenta prática na identificação de plantas ou cigarrinhas infectadas. A presença de uma proteína de aproximadamente 18,5 kDa parece ser o melhor indicativo da infecção por fitoplasma, uma vez que esta, geralmente, apresenta-se como um sinal bastante forte. Entretanto, como também observado para as demais proteínas polimórficas, ela pode não estar presente em plantas que foram consideradas infectadas pelo teste da reação da polimerase em cadeia. Portanto, o seu uso deve ser feito com cuidado, comparando-se os resultados com os padrões de proteínas obtidos de plantas reconhecidamente sadia e infectadas. Em análises tipo SDS-PAGE/Western blot o antissoro contra espiroplasma mostrou-se específico para este molicute e produziu resultados inequívocos na identificação de plantas infectadas com espiroplasma, reconhecendo uma única proteína com massa molecular aproximada de 28,3 kDa. Observou-se ainda que este antissoro não produz reação cruzada com plantas infectadas com fitoplasma.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Edna P.P. Pinho pela assistência laboratorial. e ao Prodetab, processo 162-01/08 pelo apoio financeiro.,

Literatura Citada

- Barros, T.S.L., Davis, R.E., Resende, R. O.2001. Design of a polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma, *Spiroplasma kunkelii*. **Plant Disease** 85: 475-480
- Clark, M.F. 1992. Immunodiagnostic techniques for plant mycoplasma-like organisms. IN: Duncan, J.M., L. Torrance (eds), Techniques for the rapid detection of plant pathogens. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 34-44
- Dunbar, B., E. Schwoebel. 1990. Preparation pf polyclonal antibodies. IN: M. Deutscher (ed.) Guide to protein purification. **Methods in Enzymology** 182:663-670
- Eden-Green, S.J. 1982. Detection of corn stunt spiroplasma in vivo by ELISA using antisera to extracts from infected corn plants (*Zea mays*). **Plant Pathology** 31: .289-297
- Oliveira, C.M; R.M.S. Molina, R.S. Albres, J.R.S. Lopes. 2002a. Disseminação de molícutes do milho a longas distâncias por *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae).

Fitopatologia Brasileira 27: 91-95

Oliveira, E., C.M Oliveira, I.R.P. Souza, P.C. Magalhães, P.C., I. Cruz, I. 2002b.
Enfezamentos em milho: interações genótipos e mollicutes, expressão de sintomas
foliares e detecção. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo** 1: 1

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC
