

## Identificação de um isolado de carlavirus em *Arachis pintoi* Krap & Greg.

Tatiana Mituti<sup>1</sup>; Daniele Cortezi<sup>1</sup>; Camila L. Nunes<sup>1</sup>; Elliot W. Kitajima<sup>2</sup>; Priscila Belintani<sup>3</sup>; José O. Gaspar<sup>3</sup>; Álvaro Manoel Rodrigues Almeida<sup>4</sup>. <sup>1</sup>Graduanda da UNIFIL; <sup>2</sup>ESALQ; <sup>3</sup>IBILCE/UNESP; <sup>4</sup>Embrapa Soja.

### Introdução

*Arachis repens* Handro, planta da família Fabaceae ([http://scisun.nybg.org:8890/searchdb/owa/wwwcatalog.detail\\_list?this\\_id=4062504At](http://scisun.nybg.org:8890/searchdb/owa/wwwcatalog.detail_list?this_id=4062504At)) tem sido utilizada em jardinagem como cobertura de solo. A planta é cultivada como forração à maneira de gramado, apresentando folhagem sempre verde que lhe confere notável efeito decorativo.

Algumas plantas de jardins localizados na área urbana de Londrina, PR e em áreas rurais, protegendo curvas de nível, apresentavam folhas reduzidas e com sintomas de mosaico (Fig. 1A). Esses sintomas sugeriam a presença de vírus.

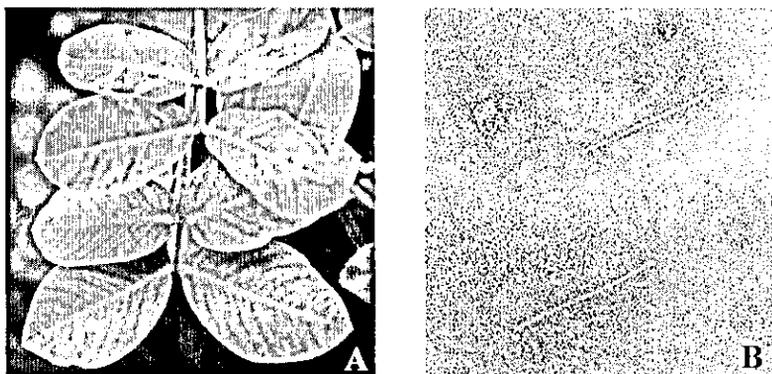


Figura 1. (A) Sintomas de mosaico observados em plantas de *Arachis repens* Handro naturalmente infectadas. (B) Fotomicrografia de partícula do vírus identificado em plantas de *Arachis repens* Handro, com sintomas de mosaico.

Como essas plantas também aparecem próximas a campos de soja, procurou-se identificar a possível ocorrência de vírus em *Arachis repens* através de ensaios de estudos de gama de hospedeiras, transmissão mecânica, microscopia eletrônica, purificação e sorologia.

## Material e Métodos

**Coleta de plantas e multiplicação.** Hastes de plantas com sintomas de mosaico foram retiradas das plantas e transplantadas para solo estéril. Após cerca de 30-45 dias, folhas com sintomas foram utilizadas como fonte de inóculo para estudos de hospedeiras diferenciais.

**Microscopia eletrônica.** Amostras de folhas com sintomas de mosaico foram analisadas em microscopia eletrônica de transmissão ("leaf dip") segundo Kitajima & Nome (1999)

**Gama de hospedeiras.** Plantas da espécie *Phaseolus vulgaris* (variedades Jalo, Manteiga, IAPAR 144, Carnaval, Rosinha e Tibagi) e *Glycine max* cv. CD 206 foram inoculadas com suspensão viral obtida a partir da maceração de tecido foliar sintomático, na presença de tampão fosfato de potássio 0,01M, pH7, utilizando carvão vegetal finamente moído como abrasivo. Após a inoculação, as plantas foram lavadas e mantidas em casa-de-vegetação. As avaliações foram feitas aos 14 e 21 dias após a inoculação.

**Purificação.** Folhas de plantas infectadas foram coletadas e moídas em tampão fosfato de potássio 0.5 M, pH 7.0, contendo 0,005M EDTA e sulfito de sódio 0,1%, na proporção 1:2 (g/v) segundo Gaspar & Costa (1993). O macerado foi filtrado em gaze e, em seguida, clarificado com ½ volume da mistura de clorofórmio e tetracloreto de carbono (1:1), sob agitação por 30 min. Após a clarificação, o material foi submetido à centrifugação de 10.950 g por 15 min. O sobrenadante foi coletado, adicionando Triton X-100 0.5% e PEG 8000 6% e mantendo sob agitação constante por duas horas a 4°C. Após esse período, o material foi centrifugado por 15 min a 10.950 g e o precipitado ressuspendido em 10% do volume inicial (tampão fosfato de potássio 0,5M, 0,02M EDTA, Triton X-100 0,1% e DTT 1M

0,1%) e ficando sob agitação por aproximadamente 12 horas. O material foi novamente submetido à centrifugação por 15 minutos (10.950 g). O sobrenadante foi coletado e ultracentrifugado a 110.000 g por 90 min. A preparação semipurificada do vírus foi submetida a gradiente de sulfato de céσιο (50%-10%), o qual foi ultracentrifugado a 110.000 g por duas horas. A banda resultante foi recolhida e submetida a uma nova ultracentrifugação nas mesmas condições anteriores.

**Eletroforese de proteína capsidial.** A massa molecular da proteína capsidial foi determinada através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com SDS, descrito por Laemmli, 1970. A análise foi realizada à temperatura ambiente, com utilização do tampão Tris-Glicina pH8.3, a 120v, durante uma hora. Após a eletroforese, o gel foi retirado da placa e corado com Comassie Blue R 250. O cálculo da massa molecular da proteína capsidial foi determinado pela regressão linear obtida com a distância migrada pelos padrões de proteínas utilizadas e as respectivas massas moleculares.

**ELISA indireto.** O teste de ELISA indireto (Koenig, 1981) foi feito utilizando anti-soro obtido pela imunização de coelhos com preparações purificadas do *Cowpea mild mottle virus* (CMMV), um membro do gênero carlavirus. A imunoglobulina G (IgG) foi obtida após purificação do anti-soro. Utilizaram-se duas diluições da IgG (1:500 e 1:1000). O extrato vegetal foi utilizado nas diluições de 1:300, 1:500 e 1:1200. Duas outras espécies vegetais, infectadas pelo CMMV foram utilizadas além de *A. repens*. A amostra de folhas de feijão 'Jalo' sadio foi utilizada como controle negativo.

## Resultados e Discussão

A análise de microscopia eletrônica demonstrou a presença de partículas alongadas, com cerca de 650 nm, típicas de vírus do grupo carlavirus (Fig. 1B). Os sintomas induzidos em diferentes plantas hospedeiras e a reação de plantas infectadas demonstraram que o vírus possui estreita gama de hospedeiras.

Sintomas de clorose nas plantas de feijão inoculadas apareceram cerca de 16 dias após a inoculação, e todas as variedades inoculadas apresentaram resposta positiva à infecção do vírus, comprovando a ocorrência de um agente infeccioso.

Eletroforese feita a partir de suspensão purificada do vírus mostrou banda com massa molecular de 33 kDa, similar àquela observada com o CMMV (Fig. 2).

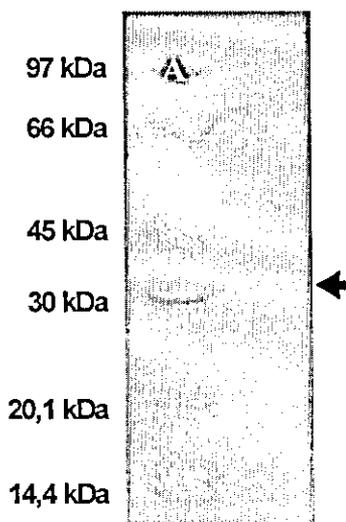
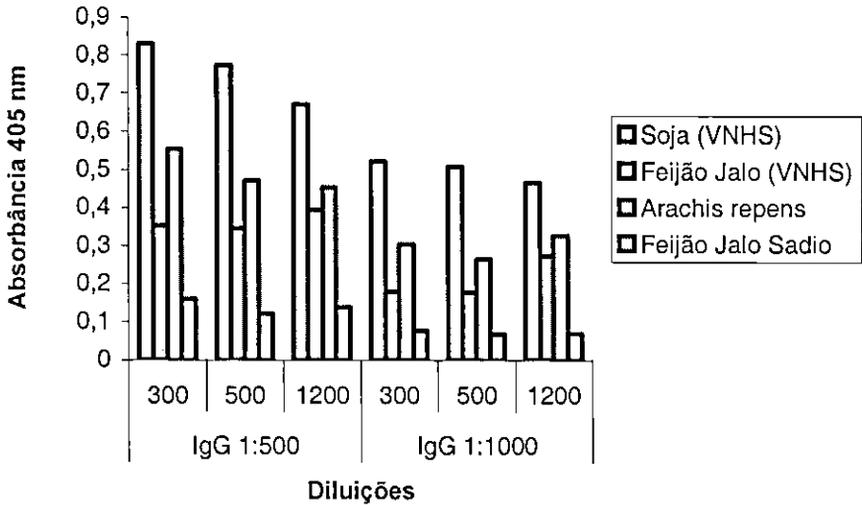


Figura 2. Eletroforese de proteína capsidial do vírus isolado de *Arachis repens* Handro.

Os resultados obtidos por ELISA indireto demonstram que o anti-soro reagiu com todas as amostras infectadas, incluindo a amostra de *A. repens*, o que demonstra ser o vírus estudado, o CMMV. Todas as diluições utilizadas de IgG e de antígeno (extrato foliar infectado) apresentaram resultados positivos (Fig. 3).

O vírus isolado de *A. repens* infectou apenas plantas da família Fabaceae. *Arachis repens* é normalmente multiplicado por estacaquia, o que deve colaborar para sua disseminação. Embora não tenha sido testado, acredita-se que sua disseminação seja através de mosca branca, similar à transmissão do CMMV.



**Figura 3.** Absorbância observada entre amostras infectadas e sadias por ELISA indireto, utilizando IgG purificada contra o *Cowpea mild mottle vírus*. Amostras diluídas em 1:300, 1:500 e 1:1200.

## Referências

- GASPAR, J.O.; COSTA, A.S. **Vírus do mosaico angular do feijoeiro: purificação e ultraestrutura dos tecidos infectados**, 1993. 534-540 p. (Fitopatologia brasileira, 18).
- KITAJIMA, E.W.; NOME, C. F. Microscopia electronica em virologia vegetal. In Docampo, D.M. & Lenardón, S.L. eds. **Métodos para detectar patógenos sistêmicos**. Córdoba, IFFIVE/INTA-JICA, 1999. 59-87 p.
- KOENIG, R. **Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses**, 1981. 53-62 p. (Journal of Geneneral Virology, 55).
- LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**, 1970. 680-685 p. (Nature 227).