



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agrônômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

AVALIAÇÃO DA PRESERVAÇÃO DO *Cucumber mosaic virus* EM TECIDO FOLIAR DESIDRATADO

Gustavo Francisco dos Santos*, Alyne de Fátima Ramos, Eliana Borges Rivas,

Addolorata Colariccio

Instituto Biológico, colariccio@biologico.sp.gov.br; *Bolsista PIBIC/CNPq.

RESUMO - A coleção de fitovírus Karl Silberschmidt (CoFiKS) vem sendo mantida, pelos pesquisadores do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico, em folhas desidratadas com CaCl₂, armazenadas a -18°C. Atualmente, a CoFiKS conta com cerca de 1300 isolados de vírus. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a viabilidade de 35 amostras infectadas com *Cucumber mosaic virus* (CMV), mantidas em folhas desidratadas, provenientes de diferentes regiões do país e de diferentes hospedeiras naturais, em PTA-ELISA. Os resultados mostraram que 16 amostras foram positivas nos testes sorológicos, confirmando a preservação da viabilidade do CMV nos tecidos foliares desidratados, mesmo após um longo período de tempo.

Palavras-chave: *Cucumovirus*, PTA-ELISA, CoFiKS.

INTRODUÇÃO

A manutenção de coleções de patógenos, entre eles os fitovírus é de extrema importância, tanto para a realização de estudos comparativos, quanto para pesquisa, ensino e preservação ao longo dos anos, a fim de manter as características de patogenicidade e condições básicas, empregando diferentes métodos de preservação, para evitar a ocorrência de mutações (SOLA et al., 2012). Dessa forma, a escolha do método de manutenção mais adequado deve-se basear nas características do agente em estudo, considerando as vantagens, desvantagens e viabilidade das técnicas disponíveis (SOLA et al., 2012). Por esta razão, para a conservação de amostras biológicas não se aplica uma única fórmula ideal ou universal que determine a eficiência de sua estocagem e preservação por longos períodos (ABREU & TUTUNJI, 2004).

Dentre as doenças que afetam as plantas, destacam-se os fitovírus, causadores de danos a diversas culturas de importância econômica para a agricultura. Em alguns países existem coleções de fitovírus, preservados em tecidos liofilizados ou em nitrogênio líquido; destas coleções, a DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) em Brunsvique, Alemanha, é uma das mais completas e importantes. Tal importância se deve ao



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agrônomo - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

fato de ser um banco de material genético que contribui para a preservação da biodiversidade durante várias décadas, com materiais provenientes de diferentes países.

A coleção de fitovírus do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia, mantida no Instituto Biológico (BARRADAS, 1992), foi iniciada pelo Dr. Karl Martin Silberschmidt em 1972, com o *Tobacco mosaic virus* (TMV – Bahia 10) (BARRADAS & SILBERSCHMIDT, 1973) e, em homenagem a ele, a coleção recebeu o seu nome de “Coleção de Fitovírus Karl Silberschmidt (COFIKS)” (MORAIS et al., 2003). A coleção possui, aproximadamente, 1300 isolados de diferentes espécies de vírus, provenientes de diferentes culturas e regiões do país, mantidos pela preservação de tecidos foliares desidratados com CaCl₂ e baixas temperaturas. Os materiais são registrados em fichas informatizadas, por ano de armazenamento, compondo o acervo da coleção.

A avaliação da infectividade dos isolados pertencentes a CoFiKS é realizada anualmente, pela transmissão mecânica para plantas indicadoras, possibilitando a manutenção dos isolados pelo armazenamento das novas amostras foliares. Os resultados obtidos tem sido positivos para diferentes espécies de vírus, entre eles o *Potato virus Y* (PVY), o *Turnip mosaic virus* (TuMV) e o *Eggplant mosaic virus* (EMV), mantendo a infectividade por um período de 4 e 3 anos, respectivamente (FERREIRA & COLARICCIO, 2016). Entretanto, algumas amostras podem perder a infectividade ao longo do tempo; neste caso, os isolados podem ser avaliados em ensaios imunoenzimáticos e podem ser empregados como controle positivo em ELISA.

As amostras mantidas na CoFiKS podem ser empregadas tanto como controle positivo em ensaios biológicos, imunoenzimáticos e moleculares, como para a produção de antissoros policlonais. Essa forma de manutenção do isolado viral possibilita o intercâmbio com outras Instituições nacionais e internacionais, a fim de realizar estudos comparativos para determinação da classificação dos vírus e possibilitam também, preservar as características do isolado original do vírus, evitando as possíveis mutações que podem ocorrer na transmissão experimental dos vírus para plantas hospedeiras.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar 45 diferentes isolados do CMV pertencentes à CoFiKS, em PTA-ELISA, para que estes possam ser empregados como controle positivo, no diagnóstico imunoenzimático do CMV, em materiais provenientes do campo.

MATERIAL E MÉTODOS



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agrônomo - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

As amostras de tecidos foliares infectados com CMV utilizadas neste trabalho são pertencentes à CoFiKS. As condições em que as amostras infectadas foram preparadas para serem adicionadas à CoFiKS são descritas a seguir. Tecidos foliares infectados foram cortados em pequenos fragmentos, pesados e acondicionados sobre uma tela plástica, em placa de Petri, contendo CaCl_2 , na proporção de 1 g tecido/ 1,6 g CaCl_2 . As placas foram vedadas com fita adesiva, identificadas e mantidas a -18°C . Periodicamente, a intervalos de seis meses, os materiais são examinados e, ao apresentar condições satisfatórias de desidratação, são transferidos para tubos plásticos.

As amostras infectadas foram avaliadas em PTA-ELISA, para serem empregados como controle positivo.

A preservação dos 45 isolados do CMV armazenados na CoFiKS foi avaliada pela “*Plate-trapped antigen – Enzyme linked immunosorbent assay*” (PTA-ELISA) com antissoro policlonal para CMV. O procedimento foi realizado de acordo com Clark & Bar-Joseph (1984). As leituras de absorvância a 405 nm foram realizadas em um colorímetro *Microplate reader* 3550-UV. Os resultados foram considerados positivos quando a relação da média das leituras (triplicata) das amostras infectadas, sobre a média da leitura das amostras sadias (I/S) foi maior ou igual a três.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica da desidratação por CaCl_2 é empregada principalmente, para a preservação dos vírus transmitidos mecanicamente pela inoculação do extrato bruto em plantas indicadoras (BARRADAS & SILBERSCHMIDT, 1973; BARRADAS, 1978; MORAIS et al., 2003). Entretanto, pode ser empregada também, para os vírus transmitidos por vetores (SALAS & BARRADAS, 1999) e pode também, preservar os epítomos imunogênicos dos vírus, possibilitando o seu uso, como controle positivo no diagnóstico sorológico.

O CMV é um vírus que infecta um amplo círculo de hospedeiras naturais e cuja severidade dos sintomas varia de acordo com a hospedeira (PALUKAITIS & GARCÍA-ARENAL, 2003), podendo ocorrer mosaico, manchas anelares sistêmicas, redução do limbo foliar, distorção foliar e sintomas de redução dos frutos em pimentão, cucurbitáceas e banana. O CMV pode causar sintomas mais severos quando ocorre em infecções mistas.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agrônomo - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

Das 35 amostras de CMV armazenadas na CoFiKS, em material foliar desidratado, procedentes de diferentes hospedeiras e regiões do país e avaliadas em PTA-ELISA, 16 amostras foram positivas e 19 negativas (Tabela 1). Dentre as amostras, a CoFiKS 73, CMV isolado de maracujá, armazenado por 11 anos na planta hospedeira *Nicotiana debneyi*, teve uma leitura A_{405nm} de 1,9925, valor excelente para ser empregado como controle positivo do CMV em testes imunoenzimáticos. A avaliação periódica das amostras pertencentes a CoFiKS permite manter somente os isolados cujos resultados são positivos, e tornar a coleção um banco genético vivo dos principais vírus fitopatogênicos das principais culturas do país.

Tabela 1. Avaliação da preservação da viabilidade do CMV em amostras foliares desidratadas por $CaCl_2$ mantidas na CoFiKS.

| Amostra | Planta original/hospedeira | Origem | Tempo de Armazenamento | A_{405nm} |
|-------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------|-------------|
| CoFiKS 67 | <i>Vinca rosea</i> / <i>Nicotiana sylvestris</i> | São Paulo, SP | 11 anos | 0,501 |
| CoFiKS 68 | <i>Vinca rosea</i> / <i>N. sylvestris</i> | São Paulo, SP | 11 anos | 0,960 |
| CoFiKS 69 | <i>Brassica oleracea</i> / <i>N. sylvestris</i> | Jau, SP | 11 anos | 0,085 |
| CoFiKS 70 | <i>Brassica oleracea</i> / <i>Nicotiana glutinosa</i> | Jau, SP | 11 anos | 0,059 |
| CoFiKS 71 | <i>Commelina</i> sp. / <i>N. sylvestris</i> | Vale do Ribeira, SP | 11 anos | 0,445 |
| CoFiKS 72 | <i>Commelina</i> sp./ <i>Nicotiana debneyi</i> | Vale do Ribeira, SP | 11 anos | 0,099 |
| CoFiKS 73 | <i>Passiflora edulis</i> / <i>N. debneyi</i> | Botucatu, SP | 11 anos | 1,992 |
| CoFiKS 74 | <i>Vinca rosea</i> / <i>N. tabacum</i> 'Samsun' | São Paulo, SP | 11 anos | 0,178 |
| CoFiKS 75 | <i>Vinca rosea</i> / <i>N. sylvestris</i> | São Paulo, SP | 11 anos | 1,724 |
| CoFiKS 76 | <i>Momordica charantia</i> / <i>Datura stramonium</i> | Bahia | 11 anos | 0,072 |
| CoFiKS 82 | <i>Eustoma grandiflorum</i> / <i>E. grandiflorum</i> | Cotia, SP | 12 anos | 0,134 |
| CoFiKS 83 | <i>Impatiens walleriana</i> / <i>I. walleriana</i> | São Paulo, SP | 12 anos | 0,064 |
| CoFiKS 84 | <i>Asclepias curassavica</i> / <i>D. stramonium</i> | Vale do Ribeira, SP | 12 anos | 0,086 |
| CoFiKS 85 | <i>Agerathum</i> sp. / <i>D. stramonium</i> | Vale do Ribeira, SP | 12 anos | 0,091 |
| CoFiKS 86 | <i>Agerathum</i> sp. / <i>D. stramonium</i> | Vale do Ribeira, SP | 12 anos | 0,090 |
| CoFiKS 88 | <i>P. edulis</i> / <i>P. edulis</i> | São Paulo, SP | 12 anos | 0,901 |
| CoFiKS 233 | <i>Solanum americanum</i> / <i>N. sylvestris</i> | Elias Fausto, SP | 12 anos | 1,751 |
| CoFiKS 234 | <i>S. americanum</i> / <i>S. americanum</i> | Elias Fausto, SP | 12 anos | 0,053 |
| CoFiKS 235 | <i>Capsicum annuum</i> 'Magali - R' / <i>C. annuum</i> 'Magali - R' | Elias Fausto, SP | 12 anos | 0,499 |
| CoFiKS 236 | <i>C. annuum</i> 'Magali - R' / <i>C. annuum</i> 'Magali - R' | Elias Fausto, SP | 12 anos | 0,147 |
| CoFiKS 237 | <i>C. annuum</i> 'Magali - R' / <i>C. annuum</i> 'Magali - R' | Elias Fausto, SP | 12 anos | 0,421 |
| CoFiKS 238 | <i>P. edulis</i> / <i>P. edulis</i> / | Sao Paulo, SP | 12 anos | 0,193 |
| CoFiKS 433 | <i>Musa</i> sp. / <i>Musa</i> sp. | Registro, SP | 13 anos | 0,883 |
| CoFiKS 474 | <i>Pisum sativum</i> / <i>P. sativum</i> | Dourados, MG | 13 anos | 0,409 |
| CoFiKS 477 | <i>Musa</i> sp. / <i>Musa</i> sp. | Pernambuco | 13 anos | 0,109 |
| CoFiKS 1196 | <i>Zingiber officinale</i> / <i>Z. officinale</i> | Rio Grande do Sul | 22 anos | 1,812 |
| CoFiKS 1198 | <i>P. edulis</i> / <i>P. edulis</i> | Parapuã, SP | 22 anos | 0,139 |
| CoFiKS 1202 | <i>P. edulis</i> / <i>P. edulis</i> | Bauru, SP | 22 anos | 0,209 |
| CoFiKS 1204 | <i>Musa</i> sp. / <i>Musa</i> sp. | São José do Rio Preto, SP | 22 anos | 0,585 |
| CoFiKS 1208 | <i>Musa</i> sp. / <i>Musa</i> sp. | Marília, SP | 22 anos | 0,395 |
| CoFiKS 1209 | <i>Musa</i> sp. / <i>Musa</i> sp. | Itápolis, SP | 22 anos | 1,006 |



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agrônômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

| | | | | |
|-------------|----------------------------------------|-------------------------|---------|-------|
| CoFiKS 1213 | <i>Musa sp. / Musa sp.</i> | Itápolis, SP | 22 anos | 1,532 |
| CoFiKS 1227 | <i>P. edulis / P. edulis</i> | Vale do Ribeira, SP | 22 anos | 0,121 |
| CoFiKS 1424 | <i>A. curassavica / A. curassavica</i> | São Paulo, SP | 31 anos | 0,126 |
| CoFiKS 1426 | <i>P. edulis / N. glutinosa</i> | Feira de Santana, BA | 28 anos | 0,642 |

A405- Absorbância a 405 nm; média dos controles positivos: $A_{405} = 0,883$; Média dos controles negativos: $A_{405} = 0,0870$.

CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o método de armazenamento é adequado e que o CMV pode ser armazenado por longos períodos. O isolado de CMV da amostra CoFiKS 1426, por exemplo, permaneceu viável por 28 anos, isso pode indicar a estabilidade do vírus em questão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M.M.V.; TUTUNJI, V.L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. *Universitas: Ciências da Saúde*, Brasília, v.02 n.2, p.236-25, 2004.

BARRADAS, M.M. IB mantém coleção de fitovírus. *Comunicação da Pesquisa Agropecuária*, v.10, n.1, p.9, 1992.

BARRADAS, M.M. Organização de uma coleção de vírus fitopatogênicos em tecidos foliares desidratados em cloreto de cálcio. *O Biológico*, v.44, n.9, p.221-230, 1978.

BARRADAS, M.M.; SILBERSCHMIDT, K.M. Conservação de vírus vegetais em tecidos secos de folhas. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.40, n.4, p.375-379, 1973.

CLARK, M.F.; BAR-JOSEPH, M. Enzyme immunosorbent assays in plant virology. *Methods in Virology*, v.7, p.51-85, 1984.

FERREIRA, C. F.; COLARICCIO, A. Preservação de vírus de plantas pela desidratação por cloreto de cálcio. *Summa Phytopathologica*, v.42, supl., 2016.

MORAIS, C.A.P.; PALLAZZO, S.R.L.; MOREIRA, S.R.; CILLI, A.; BERGMANN, J.C.; TOZETTO, A.R.P.; RIVAS, E.B.; DUARTE, L.M.L.; ALEXANDRE, M.A.V.; GONÇALVES, M.C.; SALAS, F.J.S.; CHAVES, A.L.R.; EIRAS, M.; COLARICCIO, A. Apresentação da coleção de fitovírus "Karl Martin Silberschmidt" (COFIKS). *Arquivos do Instituto Biológico*, v.70, supl.2, p.17-56, 2003.

PALUKAITIS, P.; GARCÍA-ARENAL, F. Cucumoviruses. *Advances in Virus Research*, v.62, p.241-323, 2003.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA
Instituto Agrônomo - Campinas, SP
7 a 9 de Fevereiro de 2017

SALAS, F.J.S.; BARRADAS, M.M. Transmissão de Potyvirus por afídeos através da técnica de aquisição por membrana utilizando-se material foliar desidratado. *Ecosistema*, v.24, p.88-92, 1999.

SOLA, M.C.; OLIVEIRA, A.P.; FEISTEL, J.C.; REZENDE, C.S.M. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia*, v.8, n.14; p.1398-1418, 2012.