PURIFICAÇÃO SIMPLIFICADA DO VÍRUS DO ENROLAMENTO
DA FOLHA DA BATATA COM TRITON X-100

LUÍS OTÁVIO SAGGION BERIAM
Biólogo

Orientador:

Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiróz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de con-
centração: Fitopatologia.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
dezembro - 1985

Aos meus pais

LUIZ e VALI

A minha esposa

TERE

As minhas filhas

CAMILA E CAROLINA

DEDICO

A G R A D E C I M E N T O S

O autor deseja expressar seus agradecimentos a todos aqueles que auxiliaram na execução deste trabalho. Deseja ainda agradecer de forma especial as seguintes pessoas e instituições:

ao Prof.Dr. AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA, orientador deste trabalho, exemplo de pesquisador, pela orientação recebida desde os primeiros anos de universidade até o presente.

ao DR. ÁLVARO SANTOS COSTA, pela atenção dispensada desde o início deste trabalho e pelos preciosos ensinamentos recebidos.

ao MS. JOSÉ OSMAR GASPAR, pela colaboração indispensável na parte de microscopia eletrônica e pela ajuda constante.

Ao MS. JORGE VEGA, pelas críticas e sugestões recebidas.

ao DR. GERD WALTER MULLER, Chefe da Seção de Virologia Fitotécnica, por permitir o uso das dependências de Seção para realização deste trabalho.

ao MS. JOSÉ ALBERTO CARAN DE SOUZA DIAS, pelo fornecimento de material e pelas sugestões recebidas.

ao Prof.Dr. DARCY MARTINS DA SILVA, pelas excelentes críticas e sugestões recebidas desde o projeto de pesquisa até a defesa desta dissertação.

ao Prof. Dr. ARMANDO BERGAMIN FILHO, pelas sugestões recebidas -
por ocasião da defesa deste dissertação.

à FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO, pela
concessão de bolsas de estudo.

aos ESTAGIÁRIOS do Departamento de Bioquímica-IB/UNICAMP.

aos PROFESSORES DO DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"- ESALQ/USP

aos TÉCNICOS E FUNCIONÁRIOS da Seção de Virologia do IAC .

ao Sr. AURÉLIO e a D. BENEDITA, pelo incentivo e ajuda.

Finalizando, gostaria de agradecer a colaboração e
a compreensão de meus PAIS e a paciência e carinho de minha ESPOSA.

Í N D I C E

	página
RESUMO.	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
3. MATERIAIS E MÉTODOS.	11
3.1. Fontes de vírus	11
3.2. Purificação do vírus.	12
3.2.1. Emprego de solventes orgânicos e poli- etilenoglicol	12
3.2.2. Emprego de Triton X-100	13
3.3. Serologia	17
4. RESULTADOS	18
5. DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÕES	31
7. LITERATURA CITADA.	33

RESUMO

Várias metodologias foram empregadas para purificação do vírus do enrolamento da folha da batata ("Potato Leaf-roll Virus - PLRV"). Purificações com o emprego de clorofórmio / butanol, polietilenoglicol e Triton X-100 foram efetuadas. A técnica de Triton X-100 se mostrou mais eficiente para purificação do VEFB. Tal técnica consistiu no tratamento de plantas infectadas com uma solução de Triton X-100 a 2,5% em tampão fosfato (KH_2PO_4) 0,5M pH 7, seguido de um ciclo de centrifugações diferenciais e gradiente de densidade em sacarose. Os precipitados resultantes foram observados ao microscópio eletrônico, revelando a presença de partículas do VEFB. O uso de Triton X-100 abre uma nova perspectiva para a purificação de fitovírus. É importante ressaltar que se trata de purificação do VEFB com o uso exclusivo de Triton X-100, sem o emprego de solventes orgânicos ou quaisquer outras substâncias comumente empregadas no processo de purificação de vírus. Antissoro para o VEFB foi obtido através da técnica de imunização via linfonódulo, apresentando um título de 1:2.

ABSTRACT

Some purification methods were employed to purify the Potato Leafroll Virus (PLRV). Purifications utilizing chloroform/butanol, polyethyleneglicol and Triton X-100 were made. The Triton X-100 technique was efficient to purify the PLRV. The infected plants were treated with Triton X-100 at 2,5% in buffer KH_2PO_4 pH 7 and submitted to a cycle of differential centrifugations and density sucrose gradient. The pellets were observed in electron microscopy and virus particles were seen. The use of Triton X-100 opens up a new perspective for the purification of fitovirus. It's important to note that this deals with the purification of PLRV with the exclusive use of Triton X-100 , without the use of organic solvents or other substances normally employed in the virus purification. Antiserum to PLRV were prepared by the lymph node technique immunization, showing a titre of 1:2.

1. INTRODUÇÃO

Diversas técnicas podem ser empregadas na purificação dos fitovírus. Tanto os métodos físicos como a ultracentrifugação, gradiente de densidade, congelamento e descongelamento, cromatografia, etc., como os métodos químicos, com o emprego de substâncias quelantes, anti-oxidantes, sistemas tampão, emprego de solventes orgânicos, enzimas, etc. vêm sendo empregados na purificação de fitovírus.

De maneira genérica, pode-se dizer que as técnicas atualmente utilizadas na purificação de fitovírus estão baseadas em técnicas descritas há aproximadamente 30 anos. Porém, várias modificações foram introduzidas, objetivando-se maximizar os resultados obtidos.

Várias metodologias foram empregadas para purificação do vírus do enrolamento da folha da batata - VEFB ("Potato Leafroll Virus - PLRV"), a principal virose da batata do Estado de São Paulo e do Brasil. Na procura de metodologia simples e rápida para a purificação do VEFB, utilizou-se da técnica do Tri -

ton X-100. Os resultados obtidos evidenciam o potencial da técnica para purificação do VEFB, facilitando os trabalhos de caracterização bioquímica e serológica da partícula viral.

O presente trabalho de dissertação descreve e discute o método do Triton X-100, uma substância detergente utilizada na purificação do VEFB, sem a necessidade do emprego de solventes orgânicos ou de outras substâncias comumente empregadas na purificação de fitovírus. Esta técnica poderá ser utilizada não só na purificação de vírus pertencentes ao grupo dos LUTEOVIRUS, como também na purificação de outros fitovírus.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O vírus do enrolamento da folha da batata - VEFB- ("Potato Leafroll Virus - PLRV") é o responsável pela principal das chamadas moléstias de degenerescência da batata (Solanum tuberosum L), acarretando perdas não somente de tubérculos utilizados como semente (batata-semente), como também da batata destinada ao consumo. Embora exista um grande número de viroses que atacam a batata, seguramente para o Brasil e particularmente, para o Estado de São Paulo, as moléstias de degenerescência são as principais responsáveis pelas perdas de produção, chegando, em alguns casos, a inviabilizar a produção para o comércio. Batata-semente, inicialmente isenta de vírus, após o 2º ou 3º plantio, sob as nossas condições, apresenta uma taxa de infecção da ordem de 80%. As viroses da batata, principalmente aquelas causadas pelo VEFB, são responsáveis pela importação anual de batata-semente européia. Países como a Alemanha e a Holanda detêm um esquema altamente organizado para produção de batata-semente isenta de vírus. Além disso, as condições ecológicas destes países permi -

tem um maior controle de fitoviroses transmitidas por afídeos-vetores, como é o caso do VEFB (COSTA, 1965; CUPERTINO, 1972; MALOZZI, 1982; SOUZA DIAS e COSTA, 1983; SOUZA-DIAS, 1984; SOUZA-DIAS e COSTA, 1984).

O VEFB está enquadrado no grupo dos LUTEOVIRUS(LUTEOS - latim: amarelo), que tem como membro representativo do grupo o vírus do nanismo amarelo da cevada ("Barley Yellow Dwarf Virus - BYDV"). O vírus do nanismo da soja ("Soybean Dwarf Virus SDV"), o vírus do enrolamento da folha do feijoeiro ("Bean Leaf-roll Virus- BLVR"), o vírus do enrolamento da folha da batata - ("Potato Leafroll Virus - PLRV") são alguns representantes dos LUTEOVIRUS. Este grupo está constituído de vírus isométricos, com diâmetro da ordem de 25 a 30 nm, transmitidos através de afídeos vetores, não transmitidos mecanicamente para plantas, sendo localizados em células do floema das plantas hospedeiras. São vírus de baixa concentração, possuindo RNA fita simples como material nucleico. Apresentam partículas altamente imunogênicas, com um peso molecular da ordem de 2×10^6 d, não apresentando lipídios ou carboidratos em sua composição (HARRISON, 1984).

O VEFB apresenta partículas com diâmetro da ordem de 27 nm, infectando tecido de floema da planta hospedeira. Possui um círculo de hospedeiras limitado, ocorrendo praticamente em todos os locais onde se cultiva a batata (HARRISON, 1984). Aproximadamente 20 espécies de solanáceas, como também uma série de plantas cultivadas ou da vegetação espontânea são hospedeiras do VEFB, Dentre estas solanáceas, Datura stramonium L e Physalis sp são espécies comumente empregadas para propagação do vírus e

para obtenção de material para purificação. O VEFB é transmitido por enxertia ou através de afídeos-vetores (aproximadamente 10 espécies de afídeos transmitem o VEFB), porém o pulgão verde Myzus persicae Sulzer (STEGWEE e PETERS, 1961) é o principal vetor do VEFB. O vírus não é transmitido pela semente verdadeira da batata.

A literatura relata alguns trabalhos de purificação dos LUTEOVIRUS. Em todos estes trabalhos fica explícito que existem dois problemas básicos na purificação de vírus deste grupo. Em primeiro lugar, existe baixa concentração do vírus nos tecidos da planta hospedeira e em segundo lugar, ocorre alta especificidade de tecido, dificultando a liberação de partículas virais durante o processo de purificação.

ROCHOW e BRAKKE (1964) trabalharam com a purificação do vírus do nanismo amarelo da cevada ("Barley Yellow Dwarf Virus - BYDV"), um vírus transmitido pelo afídeo Macrosiphum avenae Fabricius, não transmitido mecanicamente, limitado ao floema. O vírus foi purificado a partir de plantas de aveia (Avena byzantina Kock) através do emprego de solventes orgânicos (cloroformio/álcool amílico), gradiente de densidade em sacarose e ultracentrifugações diferenciais. As partículas do vírus apresentaram boa estabilidade, resistindo a tratamentos enzimáticos (RNase e DNase, etc.), porém a maior limitação do processo foi a baixa concentração do vírus, aliada a alta especificidade de tecido na planta hospedeira.

PETERS (1967) foi o primeiro autor a purificar o VEFB a partir do afídeo vetor M. persicae, utilizando a técnica

de clorofórmio/butanol, seguida de partição da suspensão viral em butoxietano e etoxietano.

KOJIMA et alli (1968, 1969) purificaram o VEFB a partir de plantas de Physalis floridana Rydb., utilizando clorofórmio/butanol. Os autores citam que o VEFB é um vírus de baixa concentração e no processo de purificação, grande parte do material constituinte da planta hospedeira é detectado nas frações finais do purificado. Foi verificada a precipitação do vírus em gradiente de densidade. Esta precipitação deve estar relacionada com o fenômeno da agregação de partículas do vírus durante o processo de purificação. A ausência de bandas visíveis no gradiente de densidade provavelmente é devida à baixa concentração do vírus.

KOJIMA e TAMADA (1976) purificaram o vírus do nanismo da soja ("Soybean Dwarf Virus - SDV"), um vírus transmitido pelo afídeo Aulacorthum solani Kahemback, a partir de plantas de soja (Glycine max L), através da técnica de clorofórmio / butanol, seguida de precipitação com polietilenoglicol. A dificuldade encontrada durante o processo de purificação estava relacionada com a baixa concentração do vírus nos tecidos da planta hospedeira.

SARKAR (1976) purificou o VEFB a partir de plantas de Physalis floridana, utilizando material congelado e fresco, com o emprego de clorofórmio/butanol, polietilenoglicol e Triton X-100. Este autor trabalhou com a extração do ácido nucleico do VEFB, utilizando de duas metodologias: (a) tratamento da partícula viral com ácido perclórico a 0,5N e (b) extração do -

ácido nucleico com uma mistura de fenol e sódio duodecil sulfato. Os testes realizados permitiram concluir ser o VEFB um vírus que possui DNA como material nucleico, de fita dupla e com um peso molecular da ordem de $0,56 \times 10^6$. Posteriormente, ROWHANI e STACE-SMITH (1979) trabalhando com caracterização bioquímica do VEFB, mostraram ser o VEFB um vírus do tipo RNA, o que permitiu sua inclusão no grupo dos LUTEOVIRUS.

GUGERLI (1978) purificou e caracterizou serologicamente o VEFB. As purificações foram efetuadas com o emprego de clorofórmio, polietilenoglicol e Triton X-100, seguida de filtração molecular. O principal problema durante a purificação do VEFB foi a dificuldade de se extrair o vírus dos tecidos da planta hospedeira, dada a alta especificidade de tecido apresentada pelo VEFB.

MEHARD et alli (1978) purificaram o VEFB a partir de plantas de batata (S. tuberosum) através da técnica de clorofórmio/butanol, precipitação da partícula viral com polietilenoglicol, centrifugações diferenciais e gradiente de densidade em sacarose. Produziram antissoros contra o VEFB, que foram posteriormente utilizados em testes serológicos.

HEPP e ZOETLEN (1978) purificaram o VEFB a partir de plantas de D. stramonium e P. floridana, empregando duas metodologias: na primeira, extraiu-se o exsudato de plantas infectadas, que foi tratado com tampão fosfato e EDTA, seguido de filtração em milipore, centrifugação, tratamento com formaldeído e diálise; a segunda purificação consistiu no emprego de material congelado (D. stramonium e P. floridana). O material foi ma-

cerado em nitrogênio líquido, com tampão fosfato de sódio, 2-mercaptoetanol e clorofórmio/butanol, seguido de ultracentrifugação diferencial e gradiente de densidade. Empregaram Triton X-100 no processo, que apresentou como vantagem a capacidade de eliminar contaminantes da própria planta hospedeira, durante o processo de purificação. Recomendam que, para se evitar perda de material viral, o processo de purificação deve ser realizado no menor tempo possível. O tratamento com formaldeído, além de estabilizar a estrutura do capsídeo, também aumenta a imunogenicidade da partícula viral, segundo observações de FRANCKI e HABILI (citado por HEPP e ZOETLEN, 1978). Foram notadas diferenças a nível de microscopia eletrônica quando preparações tratadas e não tratadas com formaldeído foram comparadas. As preparações não tratadas apresentavam um diâmetro próximo de 28nm, não apresentando contorno regular da superfície viral. O rendimento da purificação a partir de plantas de D. stramonium foi da ordem de 0,4mg de vírus purificado por quilograma de tecido infectado. Segundo estes autores, a utilização de plantas de D. stramonium é preferível, devido a maior facilidade de obtenção de grandes partidas de material.

TAKANAMI e KUBO (1979) purificaram o VEFB e o vírus do nanismo necrótico do fumo ("Tobacco Necrotic Dwarf Virus-TNDV"), um outro membro dos LUTEOVIRUS, obtendo resultados satisfatórios com o emprego da enzima driselase. Esta enzima atua na parede celular das plantas hospedeiras, rompendo-a e liberando o protoplasto. A enzima age principalmente diminuindo a quantidade de componentes da própria planta hospedeira, nos estágios

iniciais do processo de purificação.

ROWHANI e STACE-SMITH (1979) purificaram e caracterizaram o VEFB. Usaram como fonte de vírus plantas de Solanum tuberosum, Physalis floridana e Nicotiana clevelandii Gray. As purificações foram realizadas a partir da técnica de clorofórmio butanol, precipitação com polietilenoglicol e gradiente de densidade em sacarose. Várias modificações no sistema de tampão, de solventes orgânicos, etc., foram efetuadas, incluindo o emprego de Triton X-100, concluindo-se que o emprego de clorofórmio/butanol (V/V) na concentração de 10% maximizava os resultados obtidos. Os autores determinaram que o VEFB possui RNA como material nucleico e não DNA, como havia sido proposto por SARKAR (1976). O ácido nucleico viral foi sensível ao tratamento com RNase e orcinol. Segundo estes autores, se se considerar que o VEFB é um vírus que tem DNA como ácido nucleico, ele passa a ser enquadrado no grupo dos CAULIMOVIRUS, de acordo com o sistema de classificação proposto por TREMAINE (1977), porém as evidências indicam tratar-se de um vírus RNA, o que permite seu enquadramento no grupo dos LUTEOVIRUS. É levantada a hipótese de que como SARKAR usou metodologia diferente de purificação, utilizando material congelado, possa ter ocorrido uma modificação na partícula viral ou então existe mais uma classe de vírus que causa sintomas de enrolamento em batata.

TAMADA e HARRISON (1980) purificaram o VEFB a partir de plantas de batata (S.tuberosum), com o emprego da enzima driselase, descrita por TAKANAMI e KUBO (1979). A utilização de driselase aumentou em cinco vezes a concentração do vírus purifi

cado, auxiliando na remoção de tecido da planta hospedeira. Os autores consideram que a introdução de metodologia utilizando driselase pode auxiliar na obtenção de antissoros com um bom título, para utilização em testes serológicos, uma vez que a técnica de TAKANAMI e KUBO permite a obtenção de quantidades substanciais de vírus purificado.

CLARKE (1981) purificou o VEFB seguindo a técnica descrita por ROWHANI e STACE-SMITH (1979), introduzindo modificações na proporção de clorofórmio/butanol, aumentando a razão de 3:1 (clorofórmio/butanol) e não 1:1, como vinha sendo empregado. O aumento da concentração de solventes orgânicos promoveu uma diminuição na concentração de componentes normais da planta hospedeira, quando o material foi submetido a gradiente de densidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Fontes de vírus

Várias plantas hospedeiras foram empregadas como fonte de vírus para fins de purificação. Folhas e hastes de plantas de Datura stramonium, Physalis sp, Solanum tuberosum e Nicotiana tabacum L cv. Turkish, com fator necrótico que localiza o vírus do mosaico do fumo ("Tobacco Mosaic Virus - TMV") foram inoculadas através do afídeo vetor (Myzus persicae) ou por enxertia, mantidas em casas de vegetação da Seção de Virologia Fito-técnica do Instituto Agrônomo de Campinas.

Nas inoculações com o afídeo vetor, foram utilizados cinco afídeos por planta. Os afídeos permaneceram por um período aproximado de 48h em plantas infectadas com o VEFB. Em seguida, foram colocados nas diversas hospedeiras (D.stramonium, Physalis sp e N.tabacum), alimentando-se nestas hospedeiras por aproximadamente 48h. Posteriormente, as plantas foram pulverizadas com inseticida e mantidas em casas de vegetação até que se

pudesse observar os primeiros sintomas de infecção pelo VEFB.

Para enxertia foram utilizadas hastes de plantas de batata com sintomas de enrolamento secundário como enxerto. Como porta-enxerto empregou-se plantas de D. stramonium. As enxertias foram efetuadas através da técnica de garfagem. As plantas foram mantidas em casas de vegetação até o aparecimento dos primeiros sintomas de infecção.

3.2. Purificação do vírus

3.2.1 Emprego de solventes orgânicos e polietilenoglicol

Folhas e hastes de D. stramonium e Physalis, mantidas em congelador a -20°C , foram maceradas em tampão fosfato de potássio 0,5M pH 6 (TF-0,5), contendo 0,1% de dietiltiocarbamato de sódio (DIECA-Na) e 0,1% e 2-Mercaptoetanol (2-ME). Acertou-se o pH do suco para 7 com uma solução de fosfato dibásico de sódio 0,2M. O material foi mantido sob agitação por 120min a temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se clorofórmio/butanol (CB) - (V/V) na concentração de 10%. O material foi centrifugado a 8500g por 10min. Descartou-se o precipitado (P-1) e o sobrenadante (SN - 1) foi tratado com polietilenoglicol (PEG) a 7% e mantido sob agitação por 60min a temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi centrifugado a 134000g por 300min. O sobrenadante (SN-2) foi descartado e o precipitado (P-2) foi ressuspenso em tampão fosfato 0,07M (TF-0,07), contendo 0,75M de uréia. O mate

rial permaneceu por 18h em câmara fria, sendo em seguida centrifugado a 8500g por 10min. O precipitado (P-3) foi descartado e o sobrenadante (SN-3) foi centrifugado a 85500g por 150min. O precipitado (P-4) foi ressuspendido em TF-0,07, centrifugado a 8500g por 10min. Descartou-se o precipitado (P-5) e o sobrenadante (SN-5) foi centrifugado a 104000g por 90min. O precipitado final (P-6) foi ressuspendido em TF-0,07 e após ter sido fixado com uma solução de glutaraldeído a 2,5%, foi contrastado negativamente com uma solução de ácido fosfotúngstico a 2% e observado ao microscópio eletrônico (ESQUEMA 1).

3.2.2. Emprego de Triton X-100

Folhas e hastes de plantas de D.stramonium, Phy-salis sp e N. tabacum infectadas com o VEFB e mantidas em congelador a -20°C , foram maceradas numa solução de fosfato monobásico de potássio (TP) 0,5M pH 7, acertado com uma solução 5N de hidróxido de potássio, contendo 0,75% de sulfito de sódio (S) e 2,5% de Triton X-100 (TX) (TPSTX), na razão de 2ml de TPSTX por grama de tecido infectado. O material permaneceu sob agitação por 18h em câmara fria (2°C). Em seguida, foi centrifugado a 10800g por 15min. Tanto o líquido sobrenadante (SN-1) como o precipitado (P-1) foram processados.

O líquido sobrenadante (SN-1) foi centrifugado a 85500g por 180 min. Descartou-se o sobrenadante (SN-2) e o precipitado (P-2) foi ressuspendido em tampão fosfato 0,01M pH 7 (TF-0,01M), centrifugado a 10800g por 15min. O sobrenadante

ESQUEMA 1 - Purificação do VEFB com solventes orgânicos
e polietilenoglicol

foi centrifugado a 105000g por 180min. O precipitado (P-6) foi ressuspendido em TF-0,01M e submetido a gradiente de densidade. O sobrenadante (SN-6) foi descartado. O precipitado (P-3) foi tratado com Triton X-100 em tampão fosfato 0,1M pH 7 (TPTX-0,1), mantido sob agitação por 18h em câmara fria. Em seguida, foi centrifugado a 10800g por 15min. Descartou-se o precipitado (P-4) e o sobrenadante (SN-4) foi centrifugado a 105000g por 180min. Descartou-se o sobrenadante (SN-5), sendo o precipitado (P-5) ressuspendido em TF-0,1M e submetido a gradiente de densidade.

O precipitado 1 (P-1) foi tratado com TPTX, mantido sob agitação por 18h em câmara fria. Em seguida, foi centrifugado a 10800g por 15min. O precipitado (P-7) foi descartado e o sobrenadante (SN-7) centrifugado a 105000g por 180min. Descartou-se o sobrenadante (SN-8) e o precipitado foi ressuspendido em TF 0,01 e submetido a gradiente de densidade em solução de sacarose (ESQUEMA 2).

As frações P-5, P-6 e P-8 foram submetidas a gradiente de densidade (BRÄCKE, 1960) em solução de sacarose de 10 a 30% dissolvida em tampão fosfato de sódio 0,01M pH 7, centrifugadas a 83000g por 180min. Diversas bandas foram coletadas e ressuspendidas em tampão fosfato 0,01M pH 7, centrifugadas a 105000g por 180min. Os líquidos sobrenadantes foram descartados e os precipitados ressuspendidos em água destilada. Alíquotas destes precipitados foram observadas ao microscópio eletrônico, após terem sido fixadas com glutaraldeído a 2,5% (em alguns casos não foi feita a fixação), contrastadas negativamente com ácido fosfotúngstico a 2% e observadas ao microscópio eletrônico (ESQUEMA 2).

ESQUEMA 2 - Purificação do VCFB com Triton X-100

3.3. Serologia

O precipitado PB-5 (ESQUEMA 2) foi utilizado como antígeno imunizante, injetado em coelhos com peso aproximado de 2kg, através de injeção via linfonódulo (OLIVEIRA, 1975). Antes da primeira injeção, os animais foram sangrados (soro normal) para fins de controle. Foram efetuadas duas injeções de antígeno.

Os antissoros (AS-VEFB) foram obtidos através de sangrias na veia marginal da orelha. A cada sangria eram retirados 10ml de sangue, que permaneciam a temperatura ambiente por 60min. Em seguida, o sangue era mantido em geladeira por um período aproximado de 18h, submetido a baixa centrifugação (15000g-15min). Os sobrenadantes eram armazenados em pequenos frascos, contendo 0,5% de azida sódica.

Alíquotas purificadas, suco bruto de D.stramonium infectada com o VEFB e sadia e demais frações dos purificados foram testados contra o AS-VEFB e um antissoro importado da Holanda (AS-PLVR*), através dos testes de dupla difusão em ágar (dda) e da técnica de microscopia eletrônica imuno-específica (DERRICK 1973) ou da microscopia eletrônica imuno-específica decorada (MILNE e LUISIONI, 1977).

* O uso das siglas AS-VEFB e AS-PLRV tem a finalidade exclusiva de diferenciar o antissoro produzido pela técnica do Triton X-100 daquele originário da Holanda.

4. RESULTADOS

As purificações realizadas através da metodologia com Triton X-100 apresentaram resultados positivos. Alíquotas dos precipitados de alta centrifugação (frações P-5, P-6 e P-8 - ESQUEMA 2), quando observadas ao microscópio eletrônico apresentaram um número razoável de partículas do VEFB. Estas frações foram submetidas a gradiente de densidade e diversas bandas foram coletadas a uma altura entre 30 e 40mm do fundo do tubo. Estas bandas foram precipitadas a alta centrifugação (105000g-180min) e alíquotas destes precipitados foram observadas ao microscópio eletrônico. As alíquotas PB-2, PB-5 e PB-8 (ESQUEMA 2) apresentaram partículas do VEFB, sendo que a maior concentração do vírus foi detectada na fração PB-5 (FIGURA 1).

Nas purificações onde se empregou a metodologia do Triton X-100, as plantas de D. stramonium e Physalis sp, coletadas 30 e 45 dias após a inoculação respectivamente, foram as que apresentaram as melhores concentrações do vírus para fins de purificação, quando comparadas com as plantas de S.tuberosum e

FIGURA 1 - Microscopia eletrônica das frações do gradiente de densidade resultantes da purificação com Triton X-100. A - fração PB-2 (72000x); B - fração PB-5 (115000x); C - fração PB-8 (66000x); D - detalhe da fração PB-5 (295000x).

N. tabacum. Plantas de D. stramonium, após as primeiras coletas, permitiram reutilização, após terem sido adubadas e podadas.

Foi possível a obtenção de antissoros contra o VEFB (AS-VEFB) a partir da utilização da fração PB-5 (ESQUEMA 2) como antígeno imunizante. Tanto dos testes de dupla difusão em ágar como os testes de microscopia eletrônica imuno-específica apresentaram resultados positivos.

Nos testes de dupla difusão em ágar foi possível a obtenção de reação positiva entre o AS-VEFB e frações purificadas, obtidas do gradiente de densidade. Não se detectou reação positiva entre o AS-VEFB e extrato bruto de plantas de D. stramonium sadias e/ou infectadas com o VEFB, extraído em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7. O título do AS-VEFB foi de 1:2. Os resultados das reações de dupla difusão em ágar foram confirmados quando alíquotas do mesmo antígeno foram testadas com o AS-PLRV. Os resultados das reações obtidas nos testes de dupla difusão em ágar estão esquematizados na FIGURA 2.

Nos testes de microscopia eletrônica imuno-específica, além dos resultados obtidos entre o AS-VEFB e várias alíquotas do gradiente de densidade, que deram teste positivo, também foi possível a detecção de reação positiva entre o AS-VEFB e suco bruto extraído de D. stramonium infectadas com o VEFB. Alíquotas das frações do gradiente de densidade e suco bruto extraído de D. stramonium infectada pelo VEFB apresentaram teste de decoreção positivo, tanto para o AS-VEFB como para o AS-PLRV. Não foi detectada reação entre o AS-VEFB e suco de D. stramonium sadia. Os resultados dos testes de microscopia eletrônica imuno es

FIGURA 2 - Esquema representativo das reações de dupla difusão em ágar. A- antissoro AS-VEFB (puro); B- antissoro AS-PLVR (puro); 1. Fração PB-3; 2. Fração PB-4; 3. Fração PB-8; 4. Fração PB-9; 5. Fração PB-2; 6. Fração PB-5 (ESQUEMA 2); 7. Suco extraído de plantas de Datura stramonium infectadas com o VEFB; 8. Suco bruto de Datura stramonium sadia.

pecífica entre AS-VEFB , AS-PLRV, frações purificadas do VEFB e suco bruto de D. stramonium infectada pelo VEFB podem ser observados nas FIGURAS 3 e 4.

Nas purificações realizadas com clorofórmio/butanol e polietilenoglicol (ítem 3.2.1) detectou-se a presença de partículas do VEFB em baixa concentração na fração P-6 (ESQUEMA 1), porém quando este material foi submetido a gradiente de densidade, não foi observada a formação de bandas nas regiões onde comumente são detectadas bandas do VEFB. Mesmo assim, diversas frações do gradiente foram coletadas e as respectivas alíquotas foram observadas ao microscópio eletrônico, não se detectando a presença do VEFB.

Além das duas metodologias aqui descritas (clorofórmio/butanol - polietilenoglicol e Triton X-100), foram utilizadas as técnicas descritas por ROWHANI e STACE-SMITH (1979) e TAKANAMI e KUBO (1979) e os resultados obtidos não foram satisfatórios, não sendo possível a obtenção de antissoros contra o VEFB.

FIGURA 3 - Microscopia eletrônica imuno-específica
A- fração P-6 (ESQUEMA 2) em presença
de AS-PLRV diluído 1 : 500 (75600x);
B- suco extraído de *Datura stramonium*
em presença do AS-VEFB diluído 1 : 500
(65000x).

FIGURA 4 - Microscopia eletrônica imuno-específica decorada
A- decoração de duas partículas do VEFB com AS-
PLRV (diluição do antissoro ligado à telinha:
1:500; diluição do antissoro para decoração- 1:64
(158000x); B-partícula do VEFB decorada com AS -
VEFB (diluição do antissoro ligado à telinha :
1:500; diluição do antissoro para decoração: 1:64)
(180000x); C - detalhe em maior aumento do VEFB
decorado com AS-VEFB (290000x).

5. DISCUSSÃO

É importante considerar que existem duas metodologias básicas para purificação do VEFB. A primeira delas consiste na utilização de solventes orgânicos, precipitação da partícula viral com polietilenoglicol e ultracentrifugações diferenciais, seguida de gradiente de densidade em sacarose. Vários autores (KOJIMA et alli, 1968; KOJIMA et alli, 1969; GUGERLI, 1979; MEHARD et alli, 1978; ROWHANI e STACE-SMITH, 1979; CLARKE, 1981) vêm empregando tal metodologia para purificação do VEFB. A segunda metodologia, descrita por TAKANAMI e KUBO (1979) está baseada na utilização de uma enzima que atua na parede celular (driselase), facilitando a liberação da partícula viral, uma vez que libera o protoplasto das células infectadas, além de diminuir a quantidade de componentes normais, constituintes da própria planta hospedeira. Embora possam ser detectadas pequenas variações nestas duas metodologias, de forma geral, para o VEFB as purificações são realizadas ou com solventes orgânicos e polietilenoglicol ou com driselase.

A purificação do VEFB utilizando Triton X-100 baseou-se numa metodologia descrita por HAMILTON et alli (1981) para purificação do vírus do mosaico dourado do tomateiro, com modificação do autor desta dissertação. A detecção de partículas virais nas frações P-1 e P-3 (ESQUEMA 2) fez com que tais precipitados fossem processados e submetidos a gradiente de densidade separadamente. No exame das frações PB-3 e PB-8 ao microscópio eletrônico, foi possível a detecção de um número razoável de partículas do VEFB. Com um segundo tratamento com Triton X-100 foi possível a recuperação de vírus de frações que até então vinham sendo descartadas, resultando num aumento de vírus purificado sem a necessidade de se aumentar o número de plantas hospedeiras empregadas no processo de purificação.

Embora na literatura sejam encontrados trabalhos que utilizam Triton X-100 (HEPP e ZOETLEN, 1978; ROWHANI e STACEE SMITH, 1979) na purificação do VEFB, em todos os casos o emprego deste detergente sempre foi combinado com solventes orgânicos, polietilenoglicol ou driselase. Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho onde se tenha feito o uso exclusivo de Triton X-100 para purificação do VEFB.

O emprego de Triton X-100 permitiu um maior rendimento do método de purificação e uma provável explicação para isto pode estar relacionada com o fato de que, as partículas do VEFB ficam aderidas às membranas das células da planta hospedeira, mais especificamente às células do parênquima floemático. Quando se faz o tratamento com Triton X-100, que é uma substância detergente, grande parte das partículas do vírus é liberada, porém

uma parte destas partículas ainda permanece aderida às membranas celulares. Quando se faz o segundo tratamento com Triton X-100 , grande parte das partículas que ainda permaneciam ligadas às membranas são liberadas.

É interessante ressaltar que, por motivos ainda não conhecidos, parece ter havido um acúmulo de membranas de células do floema nos precipitados de baixa rotação (P-1 e P-3, ESQUEMA 2). Embora este fenômeno não possa ser devidamente explicado, as evidências levam a crer que, em virtude da razoável quantidade de vírus detectada nestas frações, certamente estão presentes nestes precipitados restos de membranas ou mesmo células do parênquima floemático, que estão infectadas pelo VEFB.

Quando se considera a quantidade de tecido floemático e a massa total da planta hospedeira, pode-se inferir que a relação entre tecido floemático/massa total da planta é baixa. Este fato explica, em parte, o motivo pelo qual os LUTEOVIRUS e especificamente o VEFB, apresentam baixa concentração de vírus no material purificado. Se fosse possível isolar o tecido floemático do restante do tecido da planta hospedeira, provavelmente o rendimento da purificação do VEFB seria aumentado significativamente. Neste caso, o problema central do processo de purificação passaria a ser a liberação de partícula viral do interior das células do floema das plantas hospedeiras.

O processo de perda de partículas virais nos precipitados de baixas centrifugações não é fenômeno exclusivo do VEFB. Em qualquer processo de purificação de fitovírus sempre há perda de material nas diversas frações do processo de purifica-

ção. Naqueles casos em que se trabalha com vírus de média ou alta concentração na planta, facilmente liberados dos tecidos da hospedeira, esta perda de material é desprezível. Porém, quando se trabalha com a purificação de fitovírus que apresentam alta especificidade de tecido, baixa concentração na planta e difícil liberação das partículas virais dos tecidos da planta hospedeira, estas perdas passam a ser significativas. O aproveitamento destas frações pode aumentar a quantidade final de vírus purificado. No caso do VEFB, além do reaproveitamento dos precipitados resultantes de baixa centrifugação, a utilização da planta inteira como fonte de vírus também é uma alternativa que não deve ser descartada. CASPER (1977) cita que a concentração do VEFB em raízes de Solanum tuberosum e Physalis floridana é maior que a concentração do vírus nas partes aéreas da planta. Em batata, a concentração do vírus chega a ser dez vezes maior na raiz por ocasião da colheita. Com base nestes dados, em purificações posteriores do VEFB pretende-se utilizar também raízes de plantas hospedeiras infectadas com o VEFB.

A técnica do Triton X-100, por facilitar a liberação de partículas virais dos tecidos da planta hospedeira, poderá ser aplicada na purificação de outros LUTEOVIRUS ou mesmo na purificação de vírus pertencentes a outros grupos, que sejam de difícil liberação dos tecidos da planta hospedeira. BERIAM et alli (dados não publicados) aplicaram a metodologia do Triton X-100 na purificação do vírus da tristeza do citros ("Citrus Tristeza Virus-CTV") a partir de material de raiz, obtendo resultados positivos.

Os purificados obtidos pela técnica do Triton X-

100 foram utilizados como antígeno imunizante. Foram produzidos antissoros com apenas duas injeções de antígeno via linfonóculo (OLIVEIRA, 1975). Isto vem revelar que o emprego desta substância não acarretou modificações dos determinantes antigênicos do VEFB. Tal fato foi comprovado a partir da obtenção de reações positivas tanto com antissoros produzidos pela técnica do Triton X-100 como para o AS-PLRV. Foram obtidas reações positivas para o material purificado, originário do gradiente de densidade e para suco bruto de D. stramonium infectada com o VEFB, realizados com o AS-VEFB e AS-PLRV.

A técnica de microscopia eletrônica imuno-específica mostrou ser altamente sensível na detecção do VEFB em suco bruto extraído de D. stramonium infectada com o VEFB, apresentando melhores resultados quando comparados àqueles obtidos pelas reações de dupla difusão em ágar. O emprego da técnica de decoração confirmou a identidade do VEFB, utilizando-se antissoro (AS-PLRV) recebido da Holanda (Dr. D.Z. Maat, Wageningen, Holanda) . A confirmação da identidade da partícula viral pela referida técnica dispensou o emprego dos testes biológicos.

As purificações efetuadas pelos métodos de ROWHANI e STACE-SMITH (1979) e TAKANAMI e KUBO (1979) originaram purificados insuficientes para provocar a produção de anticorpos em coelhos, dado o baixo rendimento da purificação. Como os precipitados das baixas centrifugações não foram reutilizados nas referidas técnicas, é bem provável que quantidades significativas do VEFB tenham sido descartadas no início do processo de purificação.

A literatura cita (HARRISON, 1984) que o VEFB apresenta boa imunogenicidade. Isto foi comprovado no presente trabalho. O animal imunizado recebeu apenas duas injeções de vírus purificado e aproximadamente 50 dias após foi possível a detecção de anticorpos no soro, com um título de 1:2.

Nos testes de microscopia eletrônica imuno-específica, o exame das fotomicrografias (FIGURA 4) mostra que o número de partículas aderidas às telinhas tratadas com o AS-PLRV é bem maior quando comparado com o número de partículas aderidas nas telinhas tratadas com o AS-VEFB. Esta diferença deve estar relacionada com a diferença de título apresentada pelos dois antissoros. (AS-VEFB- 1:2; AS-PLRV-1:256). Tudo indica que, em imunizações posteriores, com o aumento da dose de antígeno utilizada, seja obtido maior título para o AS-VEFB.

Apesar do baixo título do AS-VEFB, este antissoro pode ser utilizado na técnica de microscopia eletrônica imuno-específica para detecção do vírus em plantas suspeitas de infecção. Logicamente, um teste desta natureza não pode ser empregado como rotina, para testar grandes partidas de material, por não ser exequível, porém a obtenção de um antissoro com um título mais elevado possibilitará o emprego de técnicas serológicas que permitam testar um número elevado de amostras em curto período de tempo, como é o caso do teste ELISA, que já vem sendo empregado na detecção do VEFB.

6. CONCLUSÕES

1. Das várias plantas doadoras do VEFB, Datura stramonium e Physalis sp foram as melhores entre o material colhido, para a purificação do VEFB.

2. A manutenção de plantas de D. stramonium e Physalis sp em congelador, a -20°C , até a ocasião da purificação não causou problemas na conformação morfológica ou nas propriedades imunogênicas e antigênicas do VEFB.

3. A utilização exclusiva do Triton X-100 apresentou resultados satisfatórios na purificação do VEFB.

4. A técnica de imunização via linfonódulo mostrou-se eficiente na produção de antissoros contra o VEFB.

5. As técnicas de microscopia eletrônica imuno-específica podem ser utilizadas na detecção do VEFB, apresentan-

do resultados positivos com antissoros de baixo título, que não apresentaram reações positivas nos testes de dupla difusão em ágar.

7. LITERATURA CITADA

- BRAKKE, M.K. 1960. Density gradient centrifugation and its application to plant viruses. Advanc.Virus Res. 7 : 193-224.
- CASPER, R. 1977. Detection of Potato Leafroll Virus in Potato and Physalis floridana by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Phytopath.Z. 90 : 364 - 368.
- CLARKE, R. G. 1981. Potato Leafroll Virus: Purification and antiserum preparation for enzyme-linked immunosorbent assay. Am. Potato J. 58 : 291 - 298.
- COSTA, A.S. 1965. Moléstias de vírus de batata. Tudo sobre batata. Boletim de Campo 190 : 68 - 83.
- CUPERTINO, F. P. 1972. Disseminação do vírus do enrolamento da folha da batata em multiplicações sucessivas de batata-semente em São Paulo. Piracicaba - ESALQ/USP 59p (Tese de Doutorado).

- DERRICK, K.J. 1973. Quantitative assay for viruses using serologically specific electron microscopy. Virology 56 : 652-653.
- GUGERLI, P. 1979. Potato Virus A and Potato Leafroll: Purification, antiserum production and serological detection in potato and test plants by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Phytopath. Z. 96 : 97 - 107.
- HAMILTON, W.D.O; R.C.SANDERS; R.H.A. CUTTS e K.W. BUCK. 1981. Characterization of Tomato Golden Mosaic Virus as a geminivirus. FEMS Microbiology Letters 11 : 263 ÷ 267
- HARRISON, B.D. 1984. Potato Leafroll Virus. Commonweath Agricultural Bureau/Association of Applied Biologists 291
- HEPP, R.F. e G. A. ZOETLEN. 1978. Purification of Potato Leafroll Virus and an evaluation of methods for its diagnosis. Am. Potato J. 55 : 125 - 139.
- KOJIMA, M.; E. SHIKATA; M. SUGAWARA e D. MURAYAMA. 1968. Isolation and electron microscopy of Potato Leafroll Virus from plants. Virology 35 : 612 - 615.
- KOJIMA, M.; E. SHIKATA; M. SUGAWARA e D. MURAYAMA. 1969. Purification and electron microscopy of Potato Leafroll Virus. Virology 39 : 162 - 174.

- KOJIMA, M. e T. TAMADA. 1976. Purification and serology of Soy-bean Dwarf Virus. Phytopath.Z. 85 : 237 - 250.
- MALLOZZI, P. 1982. Disseminação e controle de viroses. Correio-Agrícola Bayer 3 : 464 -466.
- MEHRAD, M.; H.LAPIERRE e Y. MAURY. 1978. Le virus de l'Enroulement da la Pomme de Terre: purification, détection sérologique et dosage dans la plant. C.R.Acad.Sc.Paris D 286 :1179-82
- MILNE, R.G. e E.LUISONI. 1977. Rapid Immune Electron Microscopy of virus preparations. In: MARAMOROSCH, K e H. KOPROVSKI(eds) Methods in Virology. Vol. VI New York.Academic Press . pp. 265 - 281.
- OLIVEIRA,A.R. 1975. Considerações sobre antissoros obtidos pela técnica de injeção via linfonódulo. Summa Phytopathologica 1 : 61 - 64.
- PETERS,D. 1967. The purification of Potato Leafroll Virus from its vector Myzus persicae. Virology 31 : 46 - 54.
- ROCHOW,W.F. e MYRON K. BRAKKE. 1964. Purification of Barley Yellow Dwarf Virus. Virology 24 : 310 - 322.
- ROWHANI,A. e R. STACE-SMITH. 1979. Purification and characterization of Potato Leafroll Virus. Virology 98 : 45 -54.

- SARKAR, S. 1976. Potato Leafroll Virus contain a double-stranded DNA. Virology 70 : 265 - 273.
- SOUZA-DIAS, J.A.C. e A.S.COSTA. 1983. Vias de abordagem para o desenvolvimento de medidas de controle do enrolamento da folha da batata no Brasil. Summa Phytopathologica 9 : 83 - 84.
- SOUZA-DIAS, J.A.C. 1984. Manutenção de estoque básico de variedades nacionais aproveitando a avaliação dos campos de produção. Piracicaba - ESALQ/USP. 82p (Dissertação de Mestrado).
- SOUZA-DIAS, J.A.C. e A.S.COSTA. 1984. Método "Cova/pré-plantio" na seleção da batata semente. Fundação Cargil. 68p.
- STEGWEE, D. e D.PETERS. 1961. The isolation of Potato Leafroll Virus from its vector. Virology 15 : 202 - 203.
- TAKANAMI, Y. e S. KUBO. 1979. Enzyme-assisted purification of two phloem-limited plant viruses: Tobacco Necrotic Dwarf and Potato Leafroll. J. gen. Virol. 44 : 153 - 159.
- TAMADA, T. e B. D. HARRISON. 1980. Factor affecting detection of Potato Leafroll Virus in potato foliage by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Ann. appl. Biol. 95 : 209 - 219.
- TREMAINE, J. H. 1977. A dendogram of plant viruses. Canad. J. Microbiol. 23 : 1307 - 1310.