

ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE PARTÍCULAS DO *CUCUMBER MOSAIC VIRUS* ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO EM DIFERENTES HOSPEDEIRAS

T. Miyai<sup>1,3</sup>, P.A. Farias<sup>2</sup>, M. Eiras<sup>2</sup>, S.R. Galleti<sup>1</sup>, A.L.R. Chaves<sup>2</sup>, A. Colariccio<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidade Laboratorial de Referência em Microscopia Eletrônica, Instituto Biológico, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: galleti@biologico.br

RESUMO

O *Cucumber mosaic virus* (CMV) é um dos fitovírus de maior importância mundial, tanto pelo grande número de hospedeiras que infecta e pelos insetos vetores que o transmite, como pela diversidade evidenciada pelo elevado número de estirpes. Testes empregados na diagnose e caracterização de fitovírus apresentam melhores resultados quando a fonte de vírus possui uma concentração de partículas virais satisfatória. Visando avaliar a concentração de partículas do CMV em diferentes hospedeiras e em diferentes períodos após a inoculação, utilizou-se a contagem de partículas através de microscopia eletrônica de transmissão. A hospedeira *Nicotiana debneyi* apresentou as maiores concentrações quando comparada com *Datura stramonium* e *Chenopodium amaranticolor*.

PALAVRAS-CHAVE: *Cucumovirus*, Bromoviridae, Sorologia, CMV.

ABSTRACT

EVALUATION OF *CUCUMBER MOSAIC VIRUS* PARTICLE CONCENTRATION BY TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY IN DIFFERENT HOSTS. The *Cucumber mosaic virus* (CMV) is one of the most important plant virus in the world, with a large host range and great number of insect vectors and strains. The best results for diagnosis and characterization are obtained when the plant source of the virus has a satisfactory concentration. In order to evaluate the virus concentration in different hosts and periods of inoculation, electron microscopy of transmission was used the counting of particles. *Nicotiana debneyi* showed a higher particle concentration than *Datura stramonium* and *Chenopodium amaranticolor*.

KEY WORDS: *Cucumovirus*, Bromoviridae, Serology, CMV.

INTRODUÇÃO

O vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) pertencente à família *Bromoviridae*, gênero *Cucumovirus* (VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000), apresenta um grande número de espécies hospedeiras, que segundo BOARI *et al.* (2000), é superior a 1.000. O CMV é um vírus isométrico com diâmetro entre 28 e 30 nanômetros, composto por 180 subunidades protéicas idênticas que formam o capsídeo. Seu genoma é composto por três segmentos de RNA de fita simples positiva, além de um quarto segmento subgenômico, que codifica a proteína capsidial. Além disso, apresenta ampla distribuição mundial sendo encontrado em diversos países tanto nas zonas temperadas como tropicais (GIBBS & HARRISON, 1970; PALUKAITIS *et*

*al.*, 1992). No Brasil, a primeira ocorrência do CMV foi descrita em São Paulo, ocasionando mosaico, necrose e morte de bananeira (SILBERSCHMIDT & NÓBREGA, 1941). Posteriormente, outros autores caracterizaram isolados de CMV tanto de bananeira como de outras espécies vegetais (ARAÚJO *et al.*, 2001; COLARICCIO *et al.*, 1996; DUARTE *et al.*, 1994; EIRAS *et al.*, 2001; FRANGIONI *et al.*, 2001).

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) é uma ferramenta de extrema importância para a virologia, auxiliando no diagnóstico e na caracterização de vírus, além de possibilitar estudos de interação entre espécies de vírus, da concentração de partículas virais no tecido infectado e de aspectos ultraestruturais. Além disso, a MET aliada à sorologia tem sido utilizada no diagnóstico de fitovírus, indexação de materiais

<sup>2</sup>Centro de Sanidade Vegetal, Instituto Biológico, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Bolsista CNPq/PIBIC.

vegetais e em estudos de interação vírus-hospedeiro e vírus-vetor (HALL, 1964; ADAM *et al.*, 1987; MILNE & LUISIONI, 1977; MIYAI *et al.*, 2001).

O diagnóstico de uma doença de etiologia viral envolve uma série de técnicas para a sua comprovação. Essas visam a caracterização e identificação ou somente a detecção do vírus em plantas doentes, apresentam melhores resultados quando o tecido da planta, utilizado como amostra, apresenta uma elevada concentração de partículas virais (BEDENDO, 1995).

Este trabalho teve como objetivo realizar estudos sobre a concentração de partículas do *Cucumber mosaic virus*, isolado de bananeira (CMV-B), em hospedeiras experimentais com reação local e sistêmica em diferentes períodos após a inoculação, por meio de MET.

## MATERIAL E MÉTODOS

O isolado de vírus utilizado no presente trabalho foi coletado no Município de Registro, em bananeira, apresentando mosaico em faixas, e caracterizado, através de círculo de hospedeiras, DAS-ELISA, RT-PCR e seqüenciamento de parte da capa protéica, como sendo o *Cucumber mosaic virus* (CMV) do subgrupo I (dados não publicados). A manutenção do vírus foi feita por meio de repicagens sucessivas em plantas de *Nicotiana glutinosa* mantidas em casa-de-vegetação.

Plantas de *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn (Chenopodiaceae), *Nicotiana debneyi* L. e *Datura stramonium* L. (Solanaceae) foram inoculadas mecanicamente de acordo com COLARICCIO *et al.* (1996) com o auxílio de pistilos e almofarizes, previamente esterilizados, em presença de solução de sulfito de sódio 0,5% na proporção de 1:5 (g:mL) utilizando-se carbureto de silício (400 mesh) como abrasivo. Após a inoculação, as folhas foram lavadas com água e as plantas mantidas em casa-de-vegetação para observação dos sintomas. Plantas sadias de cada uma das três espécies utilizadas foram mantidas como controle sob as mesmas condições das plantas inoculadas.

Fragmentos foliares de *C. amaranticolor*, *N. debneyi* e *D. stramonium*, inoculados mecanicamente com o CMV-B foram coletados 15 e 30 dias após a inoculação (DAI) e processados através da técnica de contração negativa com acetato de uranila 2% e observados ao microscópio eletrônico de transmissão EM-208 (Philips) (COLARICCIO *et al.*, 1996). Nesta técnica o extrato obtido pela maceração de fragmentos foliares infectados em presença de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 foi depositado sobre uma telinha de cobre revestida com filme de colódio reforçado com carvão. Após 5 minutos foram contrastadas com acetato de uranila 2% em água. Para a comparação da concentração de partículas virais, tanto nos tecidos das espécies

empregadas quanto nos diferentes períodos após a inoculação foi utilizada a técnica de decoração com o antissoro contra o CMV. Inicialmente, as telinhas de cobre foram depositadas sobre uma gota do extrato da amostra, obtido da mesma maneira descrita para a contração negativa. Após 10 minutos, a telinha foi lavada com tampão fosfato 0,1M pH 7,0 e colocada sobre uma gota do antissoro policlonal diluído 1:50, obtido a partir de preparação purificada do isolado do CMV proveniente de bananeira - AS-CMV-Mir (COLARICCIO *et al.*, 1996). Após 15 minutos, realizou-se a contração com acetato de uranila 2% e visualização ao microscópio eletrônico de transmissão (CANER *et al.*, 1990; COLARICCIO *et al.*, 1996; MILNE & LUISIONI, 1977). Esta técnica permite que seja observada a reação do antígeno (partícula viral) com o anticorpo que deposita-se ao redor do vírus devido à afinidade com a sua capa protéica do. Desta forma, a visualização das partículas do CMV, que são isométricas, com cerca de 30 nm de diâmetro, tornam-se mais evidentes. Foram visualizados 20 campos por amostra e realizada a contagem do número de partículas virais por campo. O delineamento do ensaio foi inteiramente casualizado com dois fatores (hospedeiras x DAI) e 20 repetições. Os dados obtidos foram submetidos aos testes F e Tukey a 5% de probabilidade para a comparação das médias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O CMV apresenta um grande número de estirpes que infectam centenas de espécies de plantas, induzindo sintomas que variam de acordo com a hospedeira. Ensaio biológicos, utilizando diferentes plantas indicadoras, têm sido úteis para a diferenciação de espécies e estirpes de *Cucumovirus*, podendo-se citar como exemplo o comportamento de plantas de *Vigna unguiculatae* *Nicotiana glutinosana* diferenciação dos subgrupos I e II do CMV (DANIELS & CAMPBELL, 1992; EIRAS *et al.*, 2001). Estudos estatísticos e biológicos também têm sido utilizados para o entendimento da especificidade do vírus às diferentes espécies de plantas hospedeiras nos mecanismos relacionados à infecção (replicação e movimento) (MATTHEWS, 1992).

Visando a realização de estudos da concentração de partículas do CMV-B, em diferentes hospedeiras experimentais e em diferentes períodos de inoculação, realizou-se a contagem de partículas virais ao MET de preparações submetidas à decoração com antissoro específico, contrastadas negativamente, sendo, posteriormente, empregada análise estatística. Estes estudos possibilitam a determinação da concentração de partículas virais, o que permite o estabelecimento tanto do período de maior concentração do vírus na hospedeira, como a determinação da espécie mais

adequada para ser utilizada na manutenção do isolado. A determinação do pico de concentração do vírus é de fundamental importância para os processos que visam um maior rendimento na purificação, bem como uma maior eficiência tanto nos testes biológicos e sorológicos quanto na extração de ácidos nucléicos (BEDENDO, 1995; MATTHEWS, 1992).

Tabela 1 - Comparação entre diferentes plantas hospedeiras, quando inoculadas com o Cucumber mosaic virus isolado de bananeira (CMV-B). A contagem de partículas foi realizada aos 15 e 30 dias após a inoculação (DAI).

Hospedeiras	Dias após inoculação	
	15	30
<i>Nicotiana debneyi</i>	38,3* aA	10,9 aB
<i>Datura stramonium</i>	2,3 bA	0,2 bA
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	0 bA	1,4 bA

\*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas (hospedeiras) e maiúsculas nas linhas (DAI) não diferem significativamente (P=0,05%) entre si pelo Teste de TUKEY

As médias e análises estatísticas resultantes da contagem de partículas do CMV-B encontram-se na Tabela 1. Observou-se que em *N. debneyi* houve diferença significativa no número de partículas quando comparado com as hospedeiras *D. stramonium* e *C. amaranticolor* nos dois períodos após a inoculação. A média do número de partículas presente nas preparações de *N. debneyi* também mostrou diferença significativa quando comparados os dois períodos avaliados (15 e 30 DAI). Pode-se observar que o número médio de partículas apresenta-se maior aos 15 DAI. Este resultado indica que a replicação do CMV-B em *N. debneyi* é maior na primeira quinzena da infecção, diminuindo após esse período. Plantas de *D. stramonium* e *C. amaranticolor* não apresentaram este comportamento, ou seja, não foi observada diferença estatística para as médias dos números de partículas do CMV-B entre essas espécies e entre os períodos após a inoculação.

É importante ressaltar que *C. amaranticolor* é uma hospedeira que reage com lesão local para o CMV, ou seja, as partículas virais encontram-se limitadas às folhas inoculadas (GIBBS & HARRISON, 1970; PALUKAITIS *et al.*, 1992). Este fato faz com que o número de partículas de vírus seja reduzido, principalmente, quando comparado com uma hospedeira em que o vírus manifesta-se de modo sistêmico, conforme foi observado quando confrontaram-se as médias desta espécie com *N. debneyi*. Porém, a mesma diferença significativa não foi observada entre *C. amaranticolor*, hospedeira de lesão local, e *D. stramonium* que desenvolve sintomas sistêmicos quando inoculada com o CMV. Neste caso,

os resultados obtidos demonstraram que *D. stramonium* apresentou um comportamento similar ao de uma hospedeira de lesão local para este isolado de CMV, limitando a replicação do vírus.

É interessante observar que em *C. amaranticolor* não se notou a presença de partículas virais aos 15 DAI, mesmo apresentando lesões locais, uma vez que é de conhecimento que esta hospedeira apresenta uma maior concentração de vírus 3 a 4 DAI (COLARICCIO, comunicação pessoal). Pode-se pressupor que a não visualização de partículas neste estágio de infecção, mesmo com a presença de sintomas, se deva ao fato do número de vírus estar reduzido ao ponto de não ser suficiente para ser visualizado, mesmo tomando como critério o número de 20 campos observados. A distribuição e concentração dos vírus nas plantas depende da combinação vírus-hospedeira, sendo que alguns vírus são limitados a lesões locais, enquanto em outras hospedeiras onde sintomas sistêmicos são observados, as partículas virais são encontradas em baixa concentração podendo também estar confinadas a determinados tecidos vegetais. Citam-se, como exemplos, vírus pertencentes aos gêneros *Luteoviruse* *Nepovirus*, confinados ao floema e xilema, respectivamente (MATTHEWS, 1992).

A diferença, nos dois períodos, do número de partículas virais em *N. debneyi* e *D. stramonium*, que são espécies que desenvolvem sintomas sistêmicos para o CMV, indicou um comportamento distinto deste vírus, nestas plantas hospedeiras. Essa diferença de comportamento pode estar relacionada tanto ao modo de translocação quanto ao modo de replicação do vírus. Vale lembrar que as bases moleculares das interações entre as hospedeiras e a maioria dos fitovírus, tanto para a replicação como para a translocação, ainda não são bem compreendidas (MATTHEWS, 1992), sendo que em estudos realizados com diferentes isolados de CMV em espécies de solanáceas, observaram-se reações distintas das hospedeiras à infecção com relação ao movimento do vírus a longa distância bem como à virulência dos isolados (CARRÈRE *et al.*, 1999).

Concluiu-se que *N. debneyi* é uma hospedeira indicada para a multiplicação do CMV, principalmente, quando se visa a purificação do vírus. *D. stramonium* e *C. amaranticolor* não apresentaram elevada concentração de partículas virais, provavelmente, devido às restrições intrínsecas apresentadas por estas hospedeiras. Na Fig. 1A, observam-se, em micrografia eletrônica de transmissão, partículas de CMV contrastadas negativamente, por meio de extrato bruto de *N. debneyi* infectada. Na Figura 1B podem ser observadas, em contrastação negativa, partículas decoradas com antissoro contra o CMV. Esta técnica tem sido utilizada para a identificação não só do CMV (COLARICCIO *et al.*, 1996), como também de diferentes

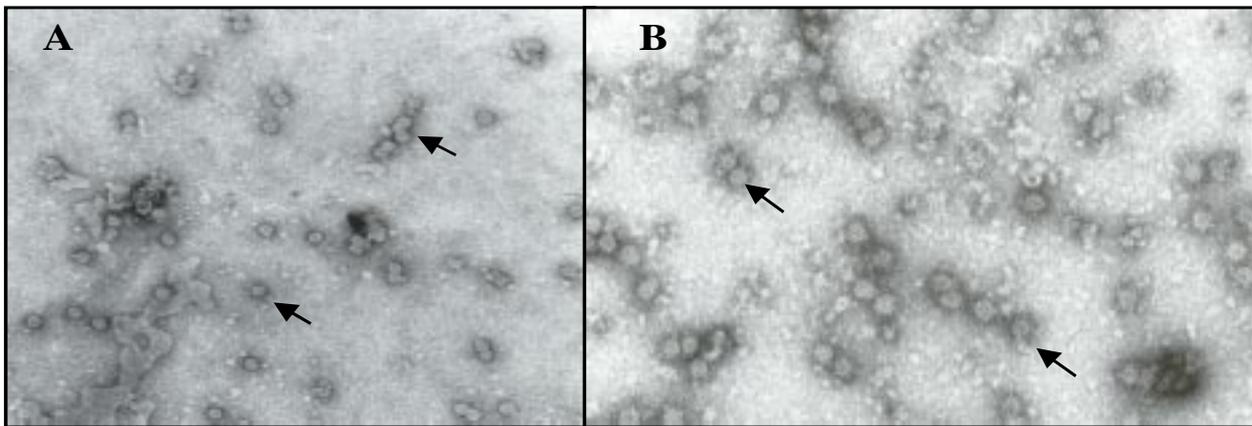


Fig. 1 - (A) Micrografia eletrônica de partículas de *Cucumber mosaic virus* contrastadas negativamente (setas); (B) Partículas decoradas com antissoro contra o CMV. (Barras = 100 nm).

espécies de fitovírus cujos antissoros são produzidos contra as respectivas proteínas da capa, podendo-se citar como exemplo o *Tomato mosaic tobamovirus* (ToMV) (CANER *et al.*, 1990) e o *Turnip mosaic potyvirus* (TuMV) (COLARICCIO *et al.*, 2000). A MET aliada à sorologia (decoração) também tem sido utilizada no diagnóstico de fitovírus, indexação de materiais vegetais e nos aspectos relacionados às interações vírus-hospedeiro e vírus-vetor, apresentando especificidade e sensibilidade (ADAM *et al.*, 1987; MILNE & LUISIONI, 1977).

Outras plantas hospedeiras experimentais deverão ser avaliadas quanto à multiplicação do CMV, principalmente, aquelas que apresentam sintomas sistêmicos, pois as de lesões locais, como foi confirmado neste trabalho, serão utilizadas apenas como controle. Outros intervalos de tempo após a inoculação deverão ser avaliados e além disso *Northern blot* para análise da concentração de RNAs virais transcritos deverá ser efetuado para monitoramento e acompanhamento da infecção e confirmação dos resultados obtidos através da microscopia eletrônica de transmissão.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, G.; CHAGAS, C.M.; LESEMANN, D.E. Comparison of three plant rhabdovirus isolates by two different serological techniques. *J. Phytopathol.*, v.120, n.1, p.31-43, 1987.
- ARAÚJO, J.; EIRAS, M.; COLARICCIO, A.; CHAVES, A.L.R.; HARAKAVA, R.; BRAUN, M.R.; CHAGAS, C.M. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Cucumber mosaic virus* passion-fruit isolates in São Paulo State, Brazil. *Virus Rev. Res.*, v.6, n.2, p.151-152, 2001.
- BEDENDO, I.P. Vírus. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.) Manual de fitopatologia. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1 p.132-160: Princípios e conceitos.
- BOARI, A.J.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Caracterização biológica e molecular de isolados do *Cucumber mosaic virus* provenientes de oito espécies vegetais. *Fitopatol. Bras.*, v.25, n.1, p.49-58, 2000.
- CANER, J.; COLARICCIO, A.; CHAGAS, C.M.; ALBA, A.P.C.; VICENTE, M. Identificação de um isolado do vírus do mosaico do tomateiro (ToMV) ocorrendo no Estado de São Paulo. *Fitopatol. Bras.*, v.15, n.4, p.347-350, 1990.
- CARRÈRE, I.; TEPPER, M.; JACQUEMOND, M. Recombinants of *Cucumber mosaic virus* (CMV): determinants of host range and symptomatology. *Arch. Virol.*, v.144, n.2, p.365-379, 1999.
- COLARICCIO, A.; CHAVES, A.L.R.; EIRAS, M.; FRANGIONI, D.S.S.; CHAGAS, C.M. Identificação dos tipos I e II do *Turnip mosaic virus* em couve. *Summa Phytopathol.*, v.26, n.3, p.455-459, 2000.
- COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; VICENTE, M.; CHAGAS, C.M.; HARAKAVA, R. Caracterização parcial de um isolado do vírus do mosaico do pepino de *Musa* sp. "nanicão". *Fitopatol. Bras.*, v.21, n.2, p.268-274, 1996.
- DANIELS, J. & CAMPBELL, R.N. Characterization of *Cucumber mosaic virus* isolates from California. *Plant Dis.*, v.76, n.10, p.1245-1250, 1992.
- DUARTE, L.M.L.; RIVAS, E.B.; ALEXANDRE, M.A.V.; FERRARI, J.T. Detection of CMV isolates from commelinaceae species. *Fitopatol. Bras.*, v.19, n.2, p.248-253, 1994.
- EIRAS, M.; COLARICCIO, A.; CHAVES, A.L.R. Isolado do vírus do mosaico do pepino obtido de bananeira no Estado de São Paulo pertence ao subgrupo Ia. *Fitopatol. Bras.*, v.26, n.1, p.53-59, 2001.
- FRANGIONI, D.S.S.; PAVAN, M.A.; COLARICCIO, A. Identification of CMV subgroup I in plants of *Capsicum annuum* L. 'Magali R' in São Paulo State, Brazil. *Virus Rev. Res.*, v.6, n.2, p.155-156, 2001.
- GIBBS, A.J. & HARRISON, B.D. *Cucumber Mosaic Virus*. *Descr. Plant Viruses*, set 1, 1970.
- HALL, C.E. Electron microscopy: principles and application to virus research. In: CORBETT, M.K. & SISLER, H.D. (Eds.) *Plant Virology*. Florida: University of Florida Press, 1964. p.253-266.
- MATTHEWS, R.E.F. *Fundamentals of plant virology*. San Diego: Academic Press, 1992, 403p.

- MILNE, R.G. & LUISIONI, E. Rapid immune electron microscopy of virus preparations. In: MARAMOROSCH, K. & KOPROWSKI, H. (Eds.). *Methods in Virology*. New York: Academic Press, 1977, v.6, p.265-281.
- MIYAI, T.; FARIAS, P.; EIRAS, M.; GALLETI, S.R.; CHAVES, A.L.R.; COLARICCIO, A. Estudo da concentração de partículas do *Cucumber mosaic virus*, através de microscopia eletrônica de transmissão em diferentes hospedeiras. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 14., 2001, São Paulo, SP. Resumos. *Arq. Inst. Biol.*, v.68, p.46, 2001. Suplemento. ISSN 0020-3653.
- PALUKAITIS, P.; ROOSSINCK, M.J.; DIETZGEN, R.G.; FRANCKI, R.I.B. *Cucumber mosaic virus*. *Adv. Virus Res.*, v.41, n.2, p.281-341, 1992.
- SILBERSCHMIDT, K.M. & NÓBREGA, N.R. Sobre uma doença de vírus em bananeira. *Biológico*, São Paulo, v.7, n.2, p.216-219, 1941.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. (Eds.) *Virus Taxonomy: Classified Nomenclature of Viruses; Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press, 2000. 1162p.

Recebido em 4/3/02  
Aceito em 17/7/02