

PURIFICAÇÃO DO VÍRUS DO ENROLAMENTO-DA-FOLHA-DA-BATATA (PLRV) PARA OBTER ANTI-SORO ESPECÍFICO¹

ANDRÉ NEPOMUCENO DUSI² e PETER EDWARD THOMAS³

RESUMO - Um isolado do vírus do enrolamento-da-folha-da-batata (PLRV) foi purificado segundo procedimento envolvendo extração enzimática, clarificação com Triton X - 100, clo-rofórmio e butanol, precipitação com PEG, centrifugações diferenciais e gradiente congelado de sacarose. A preparação purificada foi submetida a uma centrifugação isopícnica em gradiente de CsCl, estabilizada com formaldeído e injetada em coelho para produção de anti-soro. Este foi avaliado por DAS-ELISA no CNPH/EMBRAPA e por diversas instituições públicas e privadas. Os resultados indicam que o anti-soro produzido é específico e adequado ao uso em sistemas de indexação de batata-semente e para fins de pesquisa. Este trabalho concluiu o programa de produção de anti-soros para diagnose de vírus em batata, do CNPH/EMBRAPA, que também conta com anti-soros para detecção de APMV, PVS, PVX e PVY.

Termos para indexação: batata-semente, soro-diagnose, ELISA.

PURIFICATION OF POTATO LEAF ROLL VIRUS (PLRV) FOR ANTISERUM PRODUCTION

ABSTRACT - An isolate of potato leaf roll virus (PLRV) was purified through enzymatic extraction, Triton X-100 and chloroform:butanol clarification, PEG precipitation, differential centrifugations, frozen and thawed sucrose gradient and a CsCl isopnic centrifugation. The antiserum produced was tested at CNPH/EMBRAPA and at other public and private institutes. The results showed a specific serum suitable for indexing programs as well as research. This concludes the potato viruses antisera production program at CNPH/EMBRAPA which also have antisera for APMV, PVS, PVX and PVY.

Index terms: seed-potato, ELISA, Serum diagnosis.

INTRODUÇÃO

O enrolamento da folha, provocado pelo vírus do enrolamento-da-folha-da-batata (Potato Leafroll Virus-PLRV, luteovírus), é uma das principais doenças da batata no Brasil. Esta virose, juntamente com o mosaico, provocado pelo PVY, é responsável pela degenerescência da batata-semente. O uso de sementes certificadas, livres de vírus, é uma das abordagens no controle desta virose. Para um programa de produção de sementes pré-básicas oriundas de cultura de meristemas, conforme adotado no Centro Na-

cional de Pesquisa de Hortaliças (CNPH/EMBRAPA), há necessidade de testar as matrizes com técnicas bastante seguras e específicas, bem como um efetivo controle de qualidade do processo produtivo. A sorologia por ELISA tem sido rotineiramente empregada para este fim em todo o mundo, inclusive no Brasil. Até o presente, não havia, no País, tecnologia disponível para produção deste anti-soro. Os programas nacionais dependiam da importação de anti-soros comerciais, muitas vezes dispendiosa e demorada.

O CNPH já contava com tecnologia disponível para a produção de anti-soros contra outras viroses de importância econômica em batata, como o APMV, PVS, PVX e PVY (Dusi 1990).

Com referência ao PLRV, os primeiros trabalhos foram iniciados no CNPH/EMBRAPA com suporte do CIP, Agriculture Canada, Uni-

¹ Aceito para publicação em 12 de junho de 1992.

² Eng. - Agr., M.Sc., EMBRAPA/CNPH, Caixa Postal 0218, CEP 70359 Brasília, DF.

³ Eng. - Agr., Ph.D., IAREC/USDA, P.O. Box 30, Prosser, WA, USA, 99350.

versidade de Wageningen e outras instituições, compreendendo diversas etapas em capacitação do quadro do CNPH e apoio financeiro (Dusi & Ávila 1990).

O objetivo deste trabalho foi produzir um anti-soro específico ao PLRV para completar o sistema de indexação por ELISA, em uso no CNPH/EMBRAPA, sem a dependência da importação deste insumo.

MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento de purificação segue basicamente o adotado por Hassan & Thomas (1989) para o luteovírus "Tomato Yellow Top Virus", com algumas modificações, como a seguir.

Plantas de *Datura stramonium* com duas folhas verdadeiras foram infectadas com o vírus do enrolamento-da-folha-da-batata (PLRV) por afídeos. Após a inoculação do vírus, as plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura controlada entre 18 e 25°C. Cerca de 20 dias após a inoculação do vírus, quando foram notados os primeiros sintomas de infecção, as plantas (folhas, hastes e raízes) foram trituradas em dois volumes de tampão citrato 0,1 M pH 6,0 contendo 0,01% de EDTA, 0,3% DIECA (p/v) e 2% celuclast (v/v). O extrato foi inoculado sob agitação lenta por duas horas e meia ao ambiente. Adicionou-se então 1% (v/v) de triton X-100 e agitou-se por mais 30 min. O extrato foi filtrado em gase. Adicionou-se ao filtrado 15% (v/v) de mistura 1 n-butanol: 1 clorofórmio (v/v), emulsificou-se por 30 segundos sob forte agitação e centrifugação a 4.500 g por 10 min a 15°C. Recolheu-se a fase aquosa. Adicionou-se 8% (p/v) de PEG 6.000 e 1% (p/v) de NaCl. Agitou-se vigorosamente até a dissolução do PEG e incubou-se por uma hora ao ambiente sob agitação lenta. Centrifugou-se a 4.500 g por 20 min a 15°C. O sedimento foi ressuspenso em 25% (v/peso de tecido) de tampão citrato 0,1 M pH 6,4 contendo 0,01 M EDTA. A mistura foi agitada lentamente durante a noite, ao ambiente, após centrifugação a 10.000 g, por 10 min, e 72.000 g, por duas horas, a 15°C. O sedimento foi ressuspenso em 0,9% (v/peso de tecido) de tampão citrato 0,05 M pH 6,4 contendo 0,005 M EDTA, e centrifugado a 10.000 g, por 10 min. O sobrenadante foi submetido a um gradiente de sacarose obtido por três ciclos de congelamento de uma solução de sacarose a 25% (p/v) (Baxter-Gabbard 1972), centrifugado a 5.500 x 10⁷ rad²/seg (para o rotor SW 50.1). A banda foi recolhida através de um fracionador de gradientes com filtro, a 260 nm, e

submetido imediatamente a um gradiente de CsCl preparado da seguinte forma: 0,9 ml 75% CsCl (p/v), 0,9 ml 65% CsCl (p/v), 0,9 ml 55% CsCl (p/v), 0,7 ml 45% CsCl (p/v) e 1,5 ml da amostra em sacarose, em tubo de 5 ml de capacidade. O gradiente foi centrifugado a 45.000 g por dezoito horas, a 15°C, sendo importante não aumentar a velocidade angular, para que não haja rompimento de partículas. A banda viral foi recolhida, dializada contra tampão citrato 0,05M pH 6,4 para eliminação do CsCl, e fixada com 3,7% de formaldeído diretamente na preparação (Hollings & Stone 1969).

A preparação foi avaliada qualitativa e quantitativamente por espectrofotometria antes da estabilização com formaldeído.

Um coelho foi imunizado com a preparação assim obtida no seguinte esquema: 0,1 mg subcutânea emulsificada em adjuvante completo de Freund, e, 45 dias após, um reforço de 0,1 mg de subcutânea emulsificada em adjuvante incompleto de Freund. O anti-soro assim obtido foi purificado segundo Curling (1980), conjugado segundo Avrameas (1969) e testado por DAS-ELISA (Clark & Adams 1977) com IgG a 1:500 e conjugado a 1:2000. O suco da planta infectada foi preparado em diluições subseqüentes até 1:512 em suco de planta sadia (v/v). A mistura foi diluída 1:10 em PBS-T-PVP +OA para a execução do teste. Foi avaliada também a sensibilidade do teste a diluições do suco infectado em tampão.

Amostras deste anti-soro foram enviadas para diversas instituições públicas e privadas para avaliação (Tabela 1).

TABELA 1. Instituições que avaliaram o anti-soro e respectivas avaliações.

Instituição	Avaliação ¹
Cooperativa Agrícola de Cotia - CAC	Ótimo
Instituto Agronômico de Campinas - IAC	Excelente
Universidade Federal de Viçosa - UFV	Reação fraca
Universidade de Sapporo - Japão	Muito bom e específico
Serviço de Produção de Sementes Básicas - SPSB/EMBRAPA	Reação nítida
Sociedade Brasileira de Sementes - SBS	Positiva

¹ Expressões das instituições que resumem a avaliação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A preparação purificada conforme método acima descrito apresentou espectro de absorção típico de PLRV (Fig. 1) com relações de absorção $A_{260/280}$ de 1,98 e $A_{\text{max/min}}$ de 1,5 e rendimento de 600 ng por kg de tecido.

A Tabela 2 apresenta os resultados de DAS-ELISA com detecção do vírus em diluições de até 1:512 (média de cinco repetições).

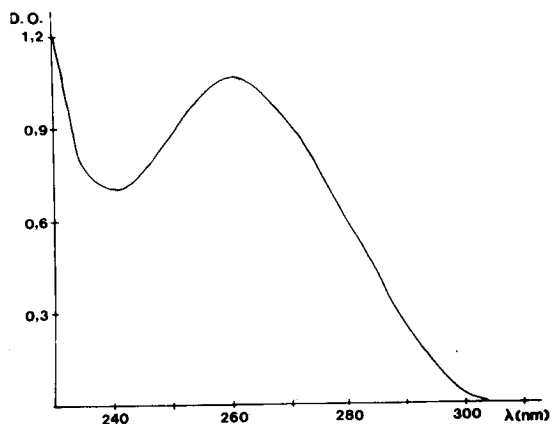


FIG. 1. Espectro de absorção da preparação purificada, antes da estabilização com formaldeído.

TABELA 2. Sensibilidade do anti-soro em DAS-ELISA (Diluição do suco 1:10; média de cinco repetições).

Diluição do suco infectado em suco sadio (v/v)	D.O. 405 nm
0 (sadio)	0
1	>2
1:2	1,997
1:4	0,718
1:8	0,261
1:16	0,119
1:32	0,038
1:64	0,027
1:128	0,010
1:256	0,014
1:512	0,004

O teste respondeu linearmente entre as diluições 1:40 e 1:320 com tampão, com r^2 de 0,99 (Fig. 2), numa média de duas repetições (Tabela 3).

As instituições que foram solicitadas a testar o anti-soro avaliaram de forma subjetiva ou quantitativa. A Tabela 1 apresenta as observações feitas pelos avaliadores, com expressões que resumem a idéia das suas avaliações.

O procedimento de purificação adotado, modificado de Hassan & Thomas (1989), para o

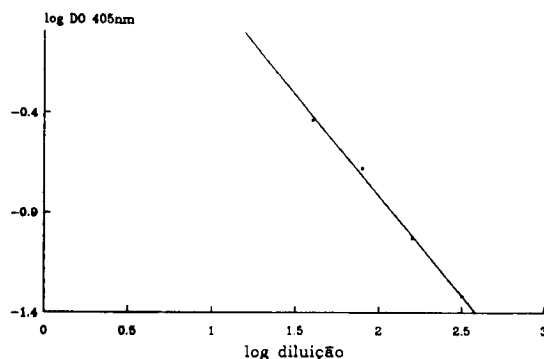


FIG. 2. Sensibilidade de detecção do PLRV em DAS-ELISA com IgG 1:500 e conjugado 1:2000. Suco infectado diluído em tampão ($r^2 = 0,99$).

TABELA 3. Sensibilidade do anti-soro em DAS-ELISA com diluições do suco em tampão (média de duas repetições).

Diluição		D.O. 405 nm
Infectado	1:10	>2
	1:20	0,899
	1:40	0,370
	1:80	0,210
	1:160	0,094
	1:320	0,048
Sadio	1:640	0,091
	1:10	0,066
	1:20	0,049
	1:40	0,011
	1:80	0
	1:160	0

TYTV, mostrou-se adequado aos nossos trabalhos. Resultados utilizando a multiplicadora *Datura stramonium* com idade mais avançada não foram satisfatórios. Apesar de uma maior concentração de vírus (estimada pelos picos de absorção no fracionador de gradiente de sacarose), plantas maiores contêm uma substância (não determinada) que dá uma consistência gelatinosa muito acentuada à amostra durante a purificação, o que dificulta a obtenção de uma preparação final com concentração adequada.

Cuidado especial deve ser dado à centrifugação em CsCl. O uso de velocidades angulares mais altas que o determinado no protocolo de purificação leva ao rompimento das partículas virais.

O anti-soro obtido segundo esta preparação mostrou-se específico, não apresentando reação com o extrato de plantas sadias, e vem sendo rotineiramente utilizado no programa de produção de batata-semente da EMBRAPA.

A leitura da D.O. a 405 nm do extrato diluído 1:512 em suco de planta sadia foi superior a duas vezes a leitura do extrato sadio, o que significa que uma amostra infectada, em 512, é detectada.

A linearidade da resposta entre as diluições 1:40 e 1:320 em tampão (Fig. 2) indica que estas concentrações devem ser preferencialmente utilizadas por ocasião de análises quantitativas.

Com relação às avaliações feitas nas diversas instituições, vale ressaltar dois dos comentários recebidos:

1. Universidade de Sapporo: o anti-soro nos apresentou reação cruzada com o "Beet Western yellows virus" (BWYV), um luteovírus que comumente contamina preparações purificadas de PLRV;

2. Universidade Federal de Viçosa: a reação fraca observada pode ter sido causada pelo manejo do teste ou do título do controle positivo utilizado. A quantidade de anti-soro enviada foi limitada, e não houve oportunidade de repetição do teste.

CONCLUSÃO

O anti-soro obtido é adequado ao uso em programas de indexação.

AGRADECIMENTOS

Às entidades que testaram o anti-soro, representadas pelas pessoas dos Drs. Satoru Ogawa (Cooperativa Agrícola de Cotia), José Alberto Caram de Souza Dias (Instituto Agronômico de Campinas), Rosa Maria Barbosa Matos (Sociedade Brasileira de Sementes - SBS), Alice Kazuko Inoue (Un. Sapporo - Japão), Francisco Murilo Zerbini Jr. (Universidade Federal de Viçosa) e Sra. Maristela A. Sorato (SPSB/EMBRAPA).

Agradecem também a colaboração nos trabalhos de purificação, do Sr. William P. Dutra, assistente de pesquisa do CNPH/EMBRAPA.

REFERÊNCIAS

- AVRAMEAS, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. *Immunochemistry*, v.6, p.43-52, 1969.
- BAXTER-GABBARD, K.L. A simple method for the large-scale preparation of sucrose gradients. *FEBS Letters*, v.20, p.117-119, 1972.
- CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. Characteristic of the microplate methods of enzyme linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, v.34, p.475-483, 1977.
- CURLING, J.M. Albumin purification by ion exchange chromatography. In: **METHODS of Plasma Protein Fractionation**. London: Acad. Press. 1980. 326p.
- DUSI, A.N. The Brazilian Approach. In: **INTERNATIONAL POTATO CENTER. Control of virus and virus-like diseases of potato and sweet potato**. Lima, 1990. 228p. Report of the 3rd Planning Conference, Lima, Peru, 20-22 November, 1989.
- DUSI, A.N.; ÁVILA, A.C. Anti-soro para detecção do vírus do enrolamento-da-folha-da-batata (PLRV): uma conquista da pesquisa. *Horticultura Brasileira*, v.8, n.2, p.5, 1990.
- HASSAN, S.; THOMAS, P.E. Purification and some properties of Tomato Yellow Top Virus. *Sarhad J. of Agriculture*, v.5, p.507-519, 1989.
- HOLLINGS, M.; STONE, O.M. Use of formalin-treated antigen in the production of antiserum to a plant virus. *Nature*, v.194, p.607, 1969.