

# DETECÇÃO DE *CARLAVIRUS* EM *SENNA MACRANTHERA*<sup>1</sup>

PATRICIA V. SEABRA<sup>2,4</sup>; ELIANA B. RIVAS<sup>2</sup>; LIGIA M. LEMBO DUARTE<sup>2</sup>;  
SILVIA R. GALLETI<sup>3</sup> e M. AMELIA V. ALEXANDRE<sup>2,4</sup>

## RESUMO

Um *Carlavirus* foi associado a plantas de *Senna macranthera* apresentando porte reduzido, folhas com mosaico e manchas necróticas, além de vagens com necrose. Com círculo de hospedeiros restrito, o vírus foi mecanicamente transmitido a partir de folhas e de vagens, mas não de sementes. Ao microscópio eletrônico de transmissão observaram-se partículas alongadas, flexuosas, com cerca de 640 nm de comprimento e uma das extremidades arredondada; o exame de cortes ultrafinos revelou a presença de agregados de partículas virais no citoplasma. As propriedades “in vitro” e a presença de um só tipo de proteína no capsídeo com 30 KDa estão de acordo com o esperado para *Carlavirus*. Apesar de não ter sido possível a identificação da espécie de *Carlavirus*, os dados sugerem tratar-se de *Cassia mild mosaic virus* e o uso de espécies infectadas na ornamentação de cidades brasileiras pode constituir importante fonte de disseminação de vírus.

**Palavras-chave:** *Cassia macranthera*, *C. speciosa*, fitovírus, citopatologia.

## ABSTRACT

### *Carlavirus* in *Senna macranthera*

A *Carlavirus* has been found associated with *Senna macranthera* showing reduced development, foliar mosaic and necrotic spots, and pod necrosis. The virus could be mechanically transmitted from infected leaves and pods, but it is not seed borne,

showing restricted host range. In negatively stained preparations, electron microscopic observations revealed flexuous, elongated particles with one of their ends rounded, measuring ca. 640 nm; in the thin sections, foliar mesophyll cells contained particles aggregates in cytoplasm. The “in vitro” properties and the presence of only one protein capsid with 30 KDa are correspondent those reported for *Carlavirus*. The data obtained so far suggest that this isolate is *Cassia mild mosaic virus*, a virus widespread in the urban ornamental areas planted with *Cassia* species in Brazilian cities.

**Key-words:** *Cassia macranthera*, *C. speciosa*, plant virus, cytopathology.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui a flora arbórea mais diversificada do mundo; entretanto, a maioria das árvores cultivadas é exótica. Entre as nativas, utilizadas na arborização de áreas urbanas, podem-se citar espécies de ipês, sibipirunas e coqueiro-jerivá, embora muitas outras sejam adequadas (LORENZI, 1992).

*Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn. (sin. *Cassia macranthera*, *C. speciosa*) é uma árvore nativa, de pequeno porte, com crescimento rápido e florescimento abundante de dezembro a abril. Em razão dessas características e da beleza das flores, de coloração amarela, são plantas ideais para utilização na arborização urbana (LORENZI, 1992), sendo cultivadas em todo o Brasil, principalmente nos seguintes Estados: Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo e São Paulo.

<sup>1</sup> Parcialmente financiado pela FAPESP.

<sup>2</sup> Centro de Sanidade Vegetal, Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia,

<sup>3</sup> Centro de Biotecnologia, Laboratório de Microscopia Eletrônica, Instituto Biológico, Av. Cons. Rodrigues Alves 1252, 04014-002. E-mail: alexand@biologico.br

<sup>4</sup> Bolsista do CNPq.

Com relação ao aspecto fitossanitário dessa espécie arbórea, poucos estudos têm sido realizados e, em relação à infecção por vírus, apenas *Potyvirus* e *Carlavirus* foram relatados no Brasil (LIN et al., 1978; PAGUIO & KITAJIMA, 1981; SOUTO et al., 1988 e LIMA NETO, 1995).

No presente trabalho, realizaram-se estudos com o objetivo de identificar o agente responsável pelo desenvolvimento anormal de árvores de *S. macranthera*, utilizadas na arborização de ruas da região metropolitana de São Paulo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de *S. macranthera*, naturalmente infectadas, constituídas de folhas com mosaico e manchas necróticas (Figura 1), vagens com manchas necróticas (Figura 2) e sementes aparentemente sem sintomas foram empregadas, isoladamente, como fonte de inóculo. Os extratos foram preparados com sulfito de sódio 0,5% ou solução tampão fosfato de sódio e de potássio (TF) 0,05 M, pH 7,4, na proporção 1g:5mL (amostra:solução tampão). Testes de transmissão mecânica foram realizados em espécies pertencentes às famílias Amaranthaceae (*Gomphrena globosa*), Chenopodiaceae (*Chenopodium amaranticolor*, *C. murale*, *C. quinoa*), Cucurbitaceae (*Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*), Fabaceae (*Cassia occidentalis*, *Glycine javanica*, *G. max*, *Phaseolus vulgaris* 'Preto', 'Branco' e 'Jalo') e Solanaceae (*Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. debneyi*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* 'Samsun NN', 'White Burley' e *Petunia x hybrida*).



Figura 1. Folhas de *Senna macranthera* apresentando mosaico e manchas necróticas

A fim de determinar a possível transmissão do vírus isolado de *S. macranthera* por sementes, cerca de duzentas foram semeadas em caixas contendo terra esterilizada. As plântulas obtidas foram transferidas, individualmente, para vasos e mantidas em casa de vegetação para avaliação com base nos sintomas e teste de recuperação do vírus para plantas indicadoras.

Para a visualização da morfologia da partícula viral, utilizou-se a técnica de contrastação negativa: consistiu em triturar fragmentos de folhas e de vagens de *S. macranthera* infectadas em presença de TF 0,1 M, pH 7,0, e contrastar negativamente com acetato de uranila a 2%. Além disso, com base no método descrito por MARTELLI & RUSSO (1984), fragmentos foliares de *S. macranthera*, naturalmente infectados, foram fixados em glutaraldeído 2,5%, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, desidratados em série cetônica crescente e incluídos em resina Spurr. A partir desse material, obtiveram-se secções ultrafinas, contrastadas com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo e examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão.

O ponto final de diluição foi determinado a partir do extrato de folhas infectadas de *S. macranthera* preparado na proporção 1:5 (1 g de folha: 5 mL de sulfito de sódio 0,5%), e o extrato foi diluído de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ . Na determinação do ponto de inativação térmica, aqueceram-se alíquotas do extrato inicial a 50, 55, 60, 65 e 70°C em banho-maria por 10 min, e depois resfriaram-nas em água corrente antes da inoculação. A longevidade *in vitro* do vírus foi determinada, empregando-se o extrato inicial mantido à temperatura ambiente, avaliando-se a infectividade, diariamente, por sete dias.



Figura 2. Vagens de *S. macranthera* com manchas necróticas

Avaliou-se, também, a infectividade do vírus mantido em folhas naturalmente infectadas de *S. macranthera* acondicionadas em papel alumínio e conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Todos os testes foram realizados em *G. globosa*, utilizando-se três plantas por tratamento e duas folhas por planta.

No ensaio sorológico, utilizaram-se anti-soros contra quatro espécies de *Carlavirus*: *Cowpea mild mottle* (CPMMV), *Carnation latent* (CLV) e *Passiflora latent* (PLV) em ELISA - indireto, e *Lily symptomless* (LSV) (ADGEN-SAC) em DAS-ELISA. O antígeno foi preparado com base em folhas, vagens e sementes de *S. macranthera*, naturalmente infectadas, na proporção 1:10, sendo 1 g da amostra para 10 mL de solução tampão carbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6 em ELISA-indireto ou de solução tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4 + 0,8% NaCl + 0,02% KCl + 0,05% "Tween-20" + 2% polivinil-pirrolidona em DAS-ELISA (CLARK & ADAMS, 1977; ALMEIDA, 1995).

A purificação, adaptada do método descrito por STEERE (1959), consistiu em triturar as folhas de *S. macranthera* em presença de TF 0,1 M, pH 7,0 (1:2). O extrato obtido foi filtrado em gaze e centrifugado a 5.900 g por 10 min. Ao sobrenadante, adicionaram-se 4% de PEG e 0,6% de NaCl e, após agitação por 16 horas, centrifugou-se novamente a 5.900 g por 15 min. O sedimento resultante foi dissolvido em TF 0,01 M, pH 7,0 e centrifugado a 6.040 g por 15 min. O sobrenadante foi, então, centrifugado a 80.000 g por 60 min e, o sedimento, submetido a uma baixa centrifugação de 5.900 g por 10 min. O sobrenadante foi cuidadosamente colocado sobre um gradiente linear de sacarose 0-50%, em TF 0,01 M, pH 7,0, e centrifugado a 80.000 g por 30 min. Aliquotas da última fase da purificação foram analisadas espectrofotometricamente, nos comprimentos de onda entre 200 e 300 nm (luz ultravioleta), para determinação da qualidade e concentração da preparação viral. Aliquotas de cada etapa da purificação foram inoculadas em *G. globosa*, para a avaliação do método empregado. Outros dois processos de purificação foram testados, empregando-se TF 10 mM pH 8,0 + DIECA 10 mM + 2% de tioglicerol (1:3) como tampão de extração, clorofórmio 10% na clarificação e tampão borato fosfato 100 mM pH 8,3 + 200 mM de uréia (BPU) para ressuspender o vírus. Colocou-se a preparação em colchão de sacarose 30% em BPU e gradiente de cloreto de cézio 10-40% (NAIDU et al., 1998). No

método descrito por VEERISSETTY & BRAKKE (1978), o tampão de extração empregado foi constituído por TF 0,165 M + citrato de sódio 0,018 M, pH 9,0 + 0,1% de DIECA + 0,5% de mercapto-etanol, o colchão de sacarose 20% sendo preparado com Triton X-100.

Analisou-se a proteína do capsídeo viral em eletroforese vertical, em sistema descontínuo utilizando géis desnaturantes de poliacrilamida com SDS (PAGE-SDS – 10%-6%) (LAEMMLI, 1970) e o gel corado com "Coomassie-blue". Aplicaram-se 15  $\mu\text{L}$  da preparação semipurificada obtida a partir de material infectado e sadio e estimou-se o peso molecular da amostra usando-se marcadores de baixo peso molecular da BIO RAD (Fosforilase B = 97,4 KDa, soroalbumina = 66,2 KDa, ovalbumina = 45 KDa, anidrase carbônica = 31 KDa, inibidor de tripsina = 21,5 KDa e lisozima = 14,4 KDa).

### 3. RESULTADOS

Das vinte espécies de plantas inoculadas, *G. globosa* reagiu à infecção com lesões locais necróticas, *C. amaranticolor* com lesões locais cloróticas, e *N. benthamiana* apresentou latência local e sistêmica. Todas as demais espécies não foram hospedeiras para esse vírus, fato constatado após retroinoculação em *G. globosa*. Convém salientar que o vírus foi igualmente transmitido quando se empregaram vagens como fonte de inóculo. Contudo, não houve transmissão do vírus a partir de sementes, provenientes de plantas de *S. macranthera* naturalmente infectadas, pois estas, ao germinar, deram origem a plantas sadias, e a recuperação em *G. globosa* foi negativa.

Observações ao microscópio eletrônico de transmissão revelaram a presença de partículas alongadas, flexuosas, com uma das extremidades arredondada, tanto a partir de material foliar como de vagens (Figura 3). Exame dos cortes ultrafinos mostraram a presença de agregados de partículas flexuosas no citoplasma de células de folhas infectadas (Figura 4).

Com relação às propriedades *in vitro*, o vírus perdeu a infectividade quando o extrato foi diluído a  $10^{-3}$ , aquecido a  $60^{\circ}\text{C}$  por 10 min e mantido à temperatura ambiente por 24 horas. Além disso, a infectividade do vírus, mantido em folhas de *S. macranthera* armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 45 dias, foi perdida.

O vírus isolado de *S. macranthera* não apresentou reação sorológica com nenhum dos antisoros utilizados contra espécies de *Carlavirus*.

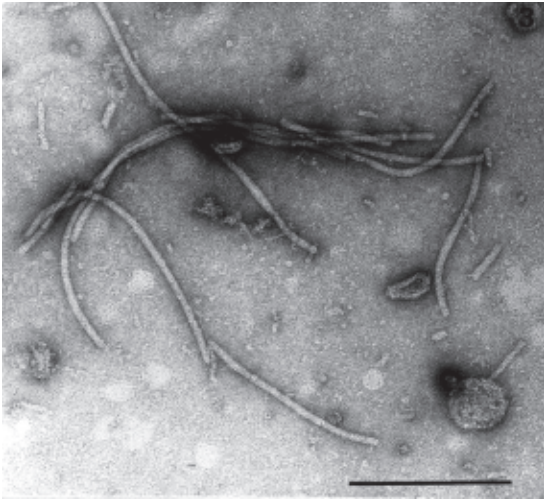


Figura 3. Micrografia eletrônica de partículas virais alongadas, flexuosas, contrastadas negativamente, em preparação de extrato foliar de *S. macranthera* (barra = 300nm)

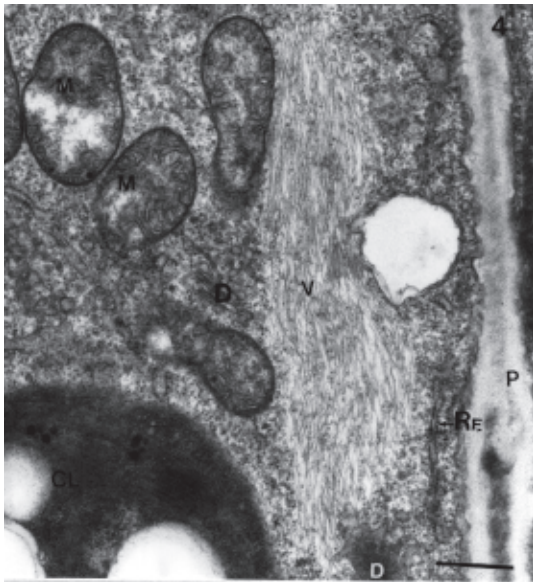


Figura 4. Micrografia eletrônica de célula de mesofilo de *S. macranthera* infectada, mostrando inclusão citoplasmática de partículas alongadas (V); cloroplasto (CL); mitocôndrios (M); parede celular (P); retículo endoplasmático (RE), e dicitossomo (D) (barra = 500 nm)

Os métodos de purificação adotados mostraram-se pouco adequados para o vírus em questão, uma vez que não foram visualizadas bandas opalescentes após gradiente. Apesar disso, as preparações semipurificadas foram analisadas ao espectrofotômetro, verificando-se que as curvas não foram típicas de nucleoproteína, indicando a presença de material celular e baixa concentração de vírus. Entretanto, testes biológicos em *G. globosa* mostraram que nas etapas iniciais as preparações continham partículas virais infectivas.

Através da eletroforese em gel de poliacrilamida, pôde-se comparar o padrão de bandas de proteínas da amostra infectada e sadia, observando-se apenas na preparação semipurificada do material infectado uma banda com peso molecular estimado em 30 Kda, correspondente ao capsídeo viral.

#### 4. DISCUSSÃO

*Senna macranthera*, proveniente da região metropolitana de São Paulo, apresentando manchas cloróticas, mostrou-se infectada por um vírus alongado, flexuoso, conforme observação ao microscópio eletrônico de transmissão. De acordo com a literatura, *Potyvirus* e *Carlavirus* são os dois gêneros de vírus alongado-flexuosos que mais freqüentemente infectam o gênero *Senna* (LIMA NETO, 1995).

Os dados de microscopia sugerem não se tratar de *Potyviridae*, uma vez que não se notaram inclusões do tipo cata-vento, características dessa família de fitovírus. A observação de partículas alongadas, flexuosas, com uma de suas extremidades arredondada (FRANCKI et al., 1985) e a presença de agregados de partículas virais no citoplasma de células infectadas (CHRISTIE & EDWARDSON, 1977) são um indicativo de *Carlavirus*. Além disso, os dados de estabilidade *in vitro*, a não-transmissão por sementes e o peso da capa protéica estão de acordo com os esperados para espécies de *Carlavirus* (LIN et al., 1980, LIMA NETO, 1995).

O círculo de hospedeiros do vírus em estudo é bastante restrito, infectando experimentalmente apenas *G. globosa*, *C. amaranticolor*, *N. benthamiana* e *S. macranthera* e, nesse aspecto, é semelhante ao *Carlavirus* descrito por LIN et al. (1979) e LIMA NETO (1995), diferindo de *Alfalfa latent virus*,

*Cassia ringspot virus*, *Cowpea mild mottle virus*, *Pea streak virus* e *Red clover vein mosaic virus* que infectam sistemicamente *C. quinoa*, *P. vulgaris* e *G. max* (LIMA NETO, 1995).

Em vista da dificuldade na obtenção de uma preparação viral purificada, provavelmente pela baixa concentração de vírus nos extratos da planta e a tendência de agregação das partículas, não foi possível a produção de anti soro.

Os dados obtidos sugerem tratar-se de *Cassia mild mosaic virus*, já relatada em espécies de *Senna* em Brasília, Rio de Janeiro e Minas Gerais (LIN *et al.*, 1980). Cabe ressaltar que espécies de cássias são importantes reservatórios de vírus (LIMA & GONÇALVES, 1988), e o uso de espécies infectadas na ornamentação de cidades brasileiras pode constituir importantes fontes de disseminação de viroses.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.M.R. **Noções de sorologia aplicadas à fitovirologia**. Londrina: EMBRAPA – CNPSo, 1995. 105p.
- CHRISTIE, R.G. & EDWARDSON, J.R. **Light and electron microscopy of plant virus inclusions**. Gainesville : Florida Agricultural Experiment Station, 1977. 155p. (Monograph series, n. 9)
- CLARK, M.E. & ADAMS, A.N. Characteristics of microplates methods of Enzyme linked Immunosorbent Assay for detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v. 34, p. 475-483, 1977.
- FRANCKI, R.I.B.; MILNE, R.G. & HATTA, T. *Carlavirus* group. In: FRANCKI, R.I.B.; MILNE, R.G. & HATTA, T.(Eds.). **Atlas of plant viruses**. Boca Raton, C.R.C. Press, 1985. p. 173-182.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LIMA, J.A.A. & GONÇALVES, M.F.B. *Cassia occidentalis*, potencial reservatório de potivírus que infectam caupi. **Fitopatol. Bras.**, v. 13, n.4, p. 365-368, 1988.
- LIMA NETO, V.C. **Caracterização de dois vírus isolados de *Cassia bicapsulares* L.** Curitiba, 1995. 82p. Tese (Prof.Titular) – Faculdade de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Paraná.
- LIN, M.T.; KITAJIMA, E.W. & COSTA, C.L. Association of Cassia Mild Mosaic Virus With Dieback of *Cassia macranthera* in Central Brazil. **Plant Dis. Rept.**, v. 64, p. 587-589, 1980.
- LIN, M.T.; KITAJIMA, E.W. & COSTA, C.L. Ocorrência e propriedades de vírus do mosaico da Cassia em árvores de *Cassia macranthera* DC. **Fitopatol. Bras.**, v. 3, p. 94, 1978.
- LIN, M.T.; KITAJIMA, E.W.; CUPERTINO, F.P. & COSTA, C.L. Properties of a possible carlavirus isolated from a cerrado native plant, *Cassia sylvestris*. **Plant Dis. Rept.**, v. 63, p. 501-505, 1979.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo das plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa : Edit. Plantarum, 1992. 352p.
- MARTELLI, G.P. & RUSSO, M. Use of thin sectioning visualization and identification of plant viruses. **Methods Virol.**, v. 8, p. 143-224, 1984.
- NAIDU, R.A.; GOWDA, S.; SATYANARAYANA, T.; BOYKO, V.; REDDY, A.S.; DAWSON, W.O & REDDY, D.V.R. Evidence that whitefly-transmitted cowpea mild mottle virus belongs to the genus *Carlavirus*. **Arch. Virol.**, v. 143, p.769-780, 1998.
- PAGUIO, O.R. & KITAJIMA, E.W. Constatação de um *Potyvirus* de *Cassia hoffmannseggii*. **Fitopatol. Bras.**, v. 6, n.2, p. 187-191, 1981.
- SOUTO, E.R.; KITAJIMA, E.W.; MARINHO, V.L.A. & COSTA, A.F. Estudos adicionais sobre o vírus de manchas amarelas da Cássia. **Fitopatol. Bras.**, v. 13, n.2, p. 145, 1988.
- STEERE, R.L. The purification of plant viruses. **Adv. Virus Res.**, v. 6, p. 1-73, 1959.
- VEERISSETTY, V. & BRAKKE, M.K. Purification of some legume Carlaviruses. **Phytopathology**, v. 68, p. 59-64, 1978.