

ESTUDOS SEROLÓGICOS COM DOIS VÍRUS DE PLANTA

DARCY MARTINS SILVA, (1) (2)

Seção de Virologia, Instituto Agronômico — Campinas

INTRODUÇÃO

O “teste de absorção” é um processo usado há muito tempo pelos serologistas; no entanto, sua importância como elemento de análise serológica não foi ainda superada (BAWDEN, 1950). Consiste, em suma, na absorção de determinados anticorpos pela adição de sucos ou suspensões dos antígenos correspondentes, ao soro imunizado, restando neste o anticorpo com que se deseja trabalhar.

Em trabalhos com Serologia realizados no laboratório da Seção de Virologia do Instituto Agronômico teve-se a atenção voltada para os resultados de alguns testes, que fizeram suspeitar duma possível relação serológica entre o TMV (vírus mosaico comum do fumo) e o VMQ (vírus do mosaico do quenópódio). Assim, o objetivo visado neste trabalho foi o de estudar e esclarecer a relação apontada. Esta possibilidade, mais tarde afastada pelos resultados obtidos em outros ensaios, não pareceu de início muito remota, pois, estudos realizados por A. S. COSTA e C. W. BENNETT (3) sôbre algumas das propriedades do VMQ, davam-no como um vírus bastante resistente aos processos de inativação, muito concentrado na planta, provocando sintomas do tipo “mosaico” no *Chenopodium murale* L., embora com círculo de hospedeiras diverso do TMV. A primeira vista, ao menos, êste poderia ser um caso semelhante ao da relação existente entre o “Cucumber Viruses 3 e 4” e o TMV, que apresentam grupos antigênicos comuns, mas com comportamento diverso em relação às plantas hospedeiras (BAWDEN & PRICE, 1937).

(1) Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

(2) Agradecemos aqui a colaboração dos Drs. A. S. Costa e M. Meneghini.

(3) Comunicação pessoal.

Os resultados apresentados e discutidos neste trabalho demonstraram satisfatoriamente não haver o mencionado parentesco mas, que o sôro era bivalente, isto é, fôra preparado contra vírus do mosaico do quenopódio, contaminado pelo vírus do mosaico comum do fumo. Tal contaminação aliás, é muito fácil de se dar, e a constatação do fato não pode ser feita pela sintomatologia do *C. murale* afetado pelos vírus citados.

MATERIAL E MÉTODO

Preparação do antígeno: fôlhas de *Chenopodium murale* infeccionadas em estufa e exibindo forte mosaico foram colhidas, esmagadas e comprimidas em tecidos de malhas largas. O suco assim obtido foi centrifugado a mais ou menos 4.000 r.p.m. (na International Centrifuge SBV Sise 1), durante 15 a 20 minutos. Depois, foi dializado durante 24 horas contra água destilada, para separar possível substância tóxica aos animais tratados. Na diluição dos sucos para aplicações de injeções usou-se Na Cl a 0,85%. Os antígenos para as reações sofreram igual tratamento, sem a diálise. Usou-se, neste caso, o vírus do mosaico do quenopódio do R. G. do Sul, que estava livre de contaminações e que reagia bem nos "testes".

Injeções em cobaias: 3 cobaias de tamanho médio foram separadas e injeções intraperitoniais de 1 a 3 cc foram aplicadas de 3 em 3 dias até um total de 12 injeções.

Coleta do sôro: Uma vez aplicada a série de injeções deixaram-se as cobaias em descanso durante 10 dias, findo os quais elas foram sangradas. O sangue foi deixado coagular na temperatura ambiente, centrifugado, e o sobrenadante guardado na geladeira, após absorvido com suco de plantas sadias.

Para estes testes foram usados tubos de vidro com 5 mm de diâmetro por 10 cm de altura, levando cada um 0,2 ml de antígenos em diversas diluições e 0,2 ml de sôro com o anticorpo. Os antígenos foram diluídos com solução salina de Na Cl a 0,85%. Após a mistura do sôro e suco das plantas, os tubos foram colocados em estufa mais ou menos a 37° C, durante 1 ou 2 horas. Duas leituras foram feitas: uma, logo ao sair da estufa, outra, após 12 horas de repouso na geladeira.

TESTES DE PRECIPITINA

Em primeiro lugar procedeu-se à sangria de prova para apurar a presença do anticorpo para o vírus do mosaico do quenopódio. Neste caso foi pôsto paralelamente aos tubos com suco de plantas afetadas com mosaico do quenopódio, o suco com vírus do "strain" aucuba do mosaico do fumo. O teste, natural-

mente, foi testemunhado com suco de plantas sadias cultivadas nas mesmas condições das doentes; e com soro normal de coaba.

O primeiro ensaio conforme já se mencionou pareceu revelar parentesco entre o vírus do mosaico do quenopódio e o "strain" aucuba do TMV, pois a reação foi positiva nas duas séries de sucos diluídos, sendo negativa na série sadia e na série testemunha com soro de sangue normal. Dado o interesse que o resultado deste ensaio despertou, passou-se a estudar o fenômeno com mais pormenores. Realizamos então um "teste de absorção", conforme o quadro 1.

Quadro 1 — Resultados das reações obtidas com a combinação do soro bivalente anti VMQ e anti "strain aucuba do TMV", absorvido com um ou dois vírus de plantas infectadas em estufa com os vírus em estudo

Soro bivalente absorvido com	Suco de plantas infectadas		
	Quenopódio com VMQ e com strain aucuba do TMV	Fumo com «strain» aucuba do TMV	Quenopódio com VMQ do R. G. Sul
"Strain" aucuba TMV	+++ (1)	—	+++ (3)
Suco c/ VMQ e strain aucuba do TMV	— (2)	—
Suco c/ VMQ do R. G. do Sul	+++	+++

(1) +++ significa forte precipitação

(2) — significa resultado negativo

(3) significa testes não realizados

(*) As reações com suco de plantas sadias, e a testemunha com soro normal e antígenos do quadro acima, foram negativas

Neste processo, lançou-se mão do vírus do mosaico do quenopódio proveniente do R. G. do Sul, porquanto constituía, no momento, um vírus seguramente livre de contaminação.

Além deste resultado, obtiveram-se outros com as mesmas indicações, acrescentando agora, um teste com hospedeiras diferenciais.

Estas plantas eram o *Chenopodium murale* (1), *C. amaranticolor*, *Nicotiana tabacum* e *Phaseolus vulgaris*. Foram inoculadas mecânicamente com suco de 4 plantas de *C. murale*, com mosaico, e escolhidas para este fim. Os resultados foram os constantes no quadro 2:

(1) O *C. murale* foi introduzido apenas para observação da atividade e sintoma do vírus.

Quadro 2 — Resultados das inoculações em plantas de sucos de *C. murale* infectado naturalmente com vírus de mosaico, escolhidos e numerados de 1 a 4. Ao lado, os resultados correspondentes dos testes serológicos de absorção

Suco das plantas naturalmente infectadas com mosaico	PLANTAS INOCULADAS			TESTES SEROLÓGICOS		
	<i>Chenopodium murale</i>	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	SORO BIVALENTE ABSORVIDO COM "strain" aucuba do TMV	VMQ do R. G. Sul
Planta N. 1	m.	l.n.	m.	l.n.	—	+
Planta N. 2	m.	l.n.	m.	l.n.	—	+
Planta N. 3	m.	l.c.	—	—	+	—
Planta N. 4	m.	l.c.	—	—	+	—

m. significa mosaico nas folhas inoculadas
 + significa precipitação nos testes serológicos
 — significa resultado negativo
 l.n. significa lesões necróticas
 l.c. significa lesões cloróticas

Sabe-se que o vírus VMQ não infecta o feijoeiro nem o fumo, dando no *C. murale* um mosaico intenso e no *C. amaranticolor* lesões cloróticas muito leves, ao passo que o TMV vai bem para o *C. murale*, *N. tabacum* e dá, de uma maneira geral, lesões necróticas em *Phaseolus vulgaris*. Finalmente, repetiram-se e ampliaram-se as investigações conforme o Quadro 3, levando-se em linha de conta a hospedeira do "strain" aucuba que até então provinha de fumo.

Quadro 3 — Resultado dos “testes de absorção” do sôro bivalente com o “strain” Aucuba do TMV procedente de dois hospedeiros (*N. tabacum* e *C. murale*) e suco das mesmas plantas do quadro 2, numeradas de 1 a 4. O “strain” Aucuba do TMV usado como antígeno da reação proveio do *N. tabacum* e os demais do *C. murale*.

Sôro bivalente absorvido com	SUCO DO							Fumo com “strain” Aucuba do TMV
	<i>C. murale</i> N. 1	<i>C. murale</i> N. 2	<i>C. murale</i> N. 3	<i>C. murale</i> N. 4	<i>C. murale</i> com o VMQ	<i>C. murale</i> sadio		
1. “strain” Aucuba do TMV (provindo do fumo)	—	—	+	+	+	—	—	—
2. “strain” Aucuba do TMV (provindo do <i>C. murale</i>)	—	—	+	+	+	—	—	—
3. Vírus do mosaico do <i>C. murale</i> (proviniente do R. G. do Sul)	+	+	—	—	—	—	—	+
4. Suco de planta n. 1	—	—	+	+	+	—	—	—
5. Suco de planta n. 2	—	—	+	+	+	—	—	—
6. Suco de planta n. 3	+	+	—	—	—	—	—	+
7. Suco de planta n. 4	+	+	—	—	—	—	—	+

+ significa precipitação nos testes serológicos

— significa resultado negativo

Os resultados das reações dos sucos das plantas numeradas, VMQ tipo Riverside, quenopódio sadio e “strain” de aucuba do TMV de 2 hospedeiros (sendo um do *C. murale*) com o sôro absorvido de diversas maneiras, ratificam outros ensaios serológicos e demonstram que os resultados, como se esperava, de-

pendem exclusivamente do vírus (antígeno). Quando se trabalhou com "strain" aucuba do TMV a partir do *C. murale* não houve como se pode ver neste quadro qualquer alteração.

CONCLUSÕES

Conforme se pode ver pelos resultados experimentais, tudo conduz a crer que o VMQ do tipo Riverside provocou formação de anticorpo e que o anti-soro obtido e estudado era bivalente, pois dando reação negativa com o vírus com que havia sido absorvido, ainda dava reação positiva com o outro. A bivalência se deveu, como era natural, à presença dos dois vírus assinalados, nos sucos injetados nas cobaias.

Além disso, as reações dos testes realizados em laboratório com VMQ do R. G. Sul indicou parentesco serológico com o VMQ tipo Riverside e não com o TMV.

Observou-se também que as plantas marcadas para os testes estavam infectadas com um vírus apenas.

SUMMARY

Preliminary investigation with precipitin test seemed to indicate that the VMQ virus from *Chenopodium murale* mosaic showed antigenic groups similar to TMV virus from *Nicotiana tabacum* mosaic. A number of other observations showed, however, that the serum was bivalent, giving reaction to VMQ and TMV simultaneously, the last one being the contaminator.

From the observations presented in this paper the following conclusions can be drawn: a) the Riverside virus promotes development of antibodies in injected animals; b) the VMQ virus from R. G. do Sul is serologically related to the Riverside virus, as indicated by reaction when the antiserum was absorbed with Aucuba "strain" of TMV; c) the developed serum was bivalent with reaction against VMQ and against Aucuba "strain" of TMV.

LITERATURA CITADA

- BAWDEN, F. C., 1950 — *Plant viruses and virus diseases*. 3a. ed., Chronica Botanica Co., Waltham, Mass., U.S.A.
- BAWDEN, F. C. & N. W. PRICE, 1937 — The relationships between liquid crystalline preparations of cucumber viruses 3 and 4 and strains of tobacco mosaic virus. *British Journal Experimental Pathology* 18: 275-290.