



DETECÇÃO POR ELISA-INDIRETO DE UM ISOLADO DO PRSV-W DE MELANCIA

Danielle Karynne Teixeira da Costa (PIBIC/CNPq-UEM), Eliezer Rodrigues de Souto (Orientador), e-mail: ersouto@uem.br

Universidade Estadual de Maringá /Departamento de Agronomia/Maringá,PR.

Ciências Agrárias/Agronomia

Palavras-chave: *Papaya ringspot vírus* (PRSV-W), Transmissão mecânica experimental, ELISA-indireto.

Resumo

As espécies da família *Curcubitaceae* são afetadas por diversas doenças, e as viroses podem causar perdas na produção e afetar a qualidade dos frutos produzidos, principalmente quando a infecção ocorre no estágio inicial de desenvolvimento das plantas. O objetivo deste trabalho foi testar o método Elisa-indireto para detecção de um isolado viral da cultivar 'Charleston Gray' de melancia, o qual foi previamente identificado através da RT-PCR, como *Papaya ringspot virus* - tipo W. Nos testes de transmissão mecânica experimental foram inoculadas quatro espécies pertencentes à família *Cucurbitaceae* (pepino, melão, melancia e abóbora 'Caserta'). Quinze dias após as inoculações foram observados sintomas sistêmicos, com predominância de amarelecimento entre as nervuras, mosaico severo, bolhosidades e deformações foliares. Amostras foliares foram utilizadas nos testes de Elisa-indireto com um antissoro policlonal para *Potyvirus*, confirmando a presença do PRSV-W em todas as cucurbitáceas testadas.

Introdução

O cultivo de plantas da família *Curcubitaceae* representa 20% da produção total de olerícolas em todo o mundo. Apesar de não apresentarem um alto valor nutricional, as cucurbitáceas desempenham um importante papel na alimentação, sendo bastante consumidas nas regiões tropicais. As viroses situam-se no grupo das principais doenças que afetam cucurbitáceas, causando sérios prejuízos pela redução no desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente, causando queda de produção. Três dos oito principais vírus relatados no Brasil em cucurbitáceas pertencem ao gênero *Potyvirus* (REZENDE & PACHECO, 1998), sendo que a mancha



anelar do mamoeiro, causada pela estirpe W do PRSV é a principal virose dos plantios comerciais de cucurbitáceas do Brasil. O PRSV-W é restrito a cucurbitáceas podendo infectar 40 espécies de plantas distribuídas em 11 gêneros (PROVVIDENTI, 1996). Os sintomas iniciais são observados nas folhas, ocorrendo amarelecimento entre as nervuras, mosaico, bolhosidade, deformação foliar e baixo desenvolvimento. A produção e a qualidade dos frutos também são severamente afetadas, com frutos mal formados e com mudança de coloração. Neste trabalho, um isolado do PRSV-W infectando naturalmente melancia '*Charleston Gray*' foi experimentalmente transmitido para outras cucurbitáceas, e detectado também, através do teste Elisa-indireto.

Materiais e métodos

Plantas de pepino, melão, melancia e abóbora '*Caserta*' semeadas em 5 vasos (3 plantas/vaso), foram inoculadas com um isolado do PRSV-W proveniente de uma planta de melancia '*Charleston Gray*' apresentando sintomas de mosaico, que para a preparação do inóculo, teve suas folhas maceradas em tampão fosfato de sódio 0,02M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{SO}_3$), pH 7,0, na diluição 1:10 (p:v). O extrato vegetal obtido foi inoculado na superfície foliar de cucurbitáceas, previamente polvilhadas com carvão ativado em pó (Synth[®]) utilizado como abrasivo. Após a inoculação, as folhas foram lavadas com água corrente para retirada do excesso de inóculo e abrasivo, e estas plantas permaneceram em casa de vegetação até a manifestação de sintomas. Como controle negativo foi mantida uma planta testemunha de cada espécie, sem inoculação.

Teste sorológico - ELISA- indireto

Folhas sintomáticas de cada espécie testada foram coletadas, e maceradas em tampão de cobertura 0,05 M (1,59 g de Na_2CO_3 , 2,93 g de NaHCO_3 , 0,2 g de NaN_3 , pH 9,8) na proporção de 1/10. Em seguida foram aplicados 100 μl do extrato vegetal nos orifícios da placa, com 3 repetições por amostra, e depois, a placa foi incubada na geladeira a 4 °C por 18 h. Após, a placa foi lavada com tampão PBS 1X-Tween (8,0g de NaCl, 0,2g de KH_2PO_4 , 1,1g de NaH_2PO_4 , 0,2g de KCL, pH 7,4 com Tween 20%) por três vezes com intervalos de 3 min. Posteriormente, adicionou-se 100 μl do anticorpo (Agdia[®]) para o gênero *Potyvirus*, com diluição de 1/200 em tampão PBS 1X, seguido de incubação em estufa a 37 °C por 2 h. Após, realizaram-se os procedimentos de lavagem conforme descrito anteriormente. Foram adicionados aos orifícios 100 μl do conjugado enzimático (anti-IgG, Agdia[®]), diluído na proporção 1/200 em tampão PBS 1X, com incubação a 37 °C por 2 h, seguido das lavagens. Após, adicionou-



se 100 µl do substrato nitrofenil fosfato (Sigma[®]) preparado na concentração de 1 mg/ml em tampão de substrato (97 ml de dietanolamina e 0,2 g de NaN₃, pH 9,8). Por fim, a placa permaneceu em temperatura ambiente por 60 minutos e realizou-se a leitura em leitor de ELISA (*ELISA VERSA Max tunable, Microplate reader (Molecular Devise[®])* no comprimento de onda de 405 nm.

Resultados e Discussão

Quinze dias após as inoculações foram observados os sintomas de mosaico severo, amarelecimento de nervuras, bolhosidades e deformação foliar nas cucurbitáceas inoculadas. Os resultados do teste ELISA-indireto confirmaram a presença do PRSV-W em todas as plantas inoculadas, sendo obtido um valor de leitura de absorvância duas vezes superior ao valor obtido para plantas saudáveis, como observado na Figura 1.

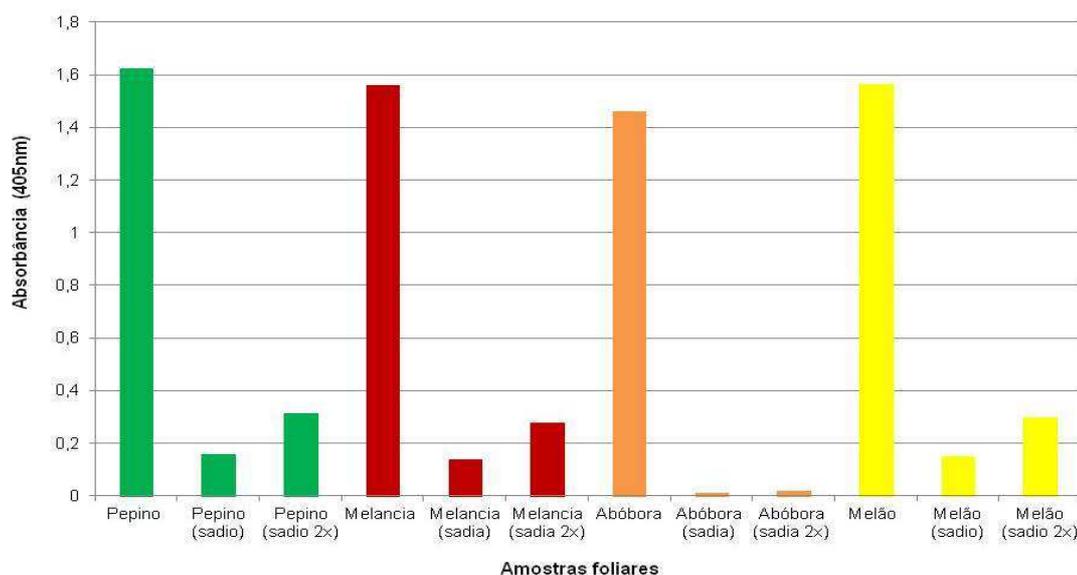


Figura 1 - Valores de absorvância das leituras do teste sorológico ELISA-indireto em amostras foliares das espécies de cucurbitáceas na diluição de 1/10, com o antissoro para o gênero *Potyvirus*, na diluição 1/200. Como controle negativo foram utilizadas plantas saudáveis das respectivas amostras foliares.

Conclusões

Os sintomas de mosaico severo e deformação foliar observados nas plantas de melão, melancia, pepino e abóbora 'Caserta' mecanicamente inoculadas, foram associados à presença do PRSV-W na cultivar de melancia 'Charleston Gray' utilizada como fonte de inóculo, e confirmado através do teste Elisa-Indireto realizado.



Agradecimentos

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), e ao CNPq pela concessão da bolsa de IC.

Referências

PROVVIDENTI, R. 1996. **Papaya ringspot-W**. In: ZITTER, A.; HOPKINS, D. L.; THOMAS, C. E. Compendium of cucurbit diseases. APS PRESS: St. Paul. p. 40.

REZENDE, J. A. M., & PACHECO, D. A. 1998. Control of papaya ringspot virus–type W in zucchini squash by cross-protection in Brazil. Plant Dis. 82:171-175.