

DETECÇÃO DO CsCMV EM MANDIOCA ATRAVÉS DO ELISA-INDIRETO

Natalia Chiareli Rosa (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Eliezer Rodrigues do Souto (Orientador), Danielle Caroline Maneti (Coorientadora) e-mail: ersouto@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Agrárias / Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Agronomia/Fitossanidade

Palavras-chave: *Manihot esculenta*, CsCMV, Elisa-indireto.

Resumo:

Na mandioca, dois vírus são predominantes em áreas de cultivo do Brasil, o vírus do mosaico comum (*Cassava common mosaic virus*, CsCMV), e o vírus do mosaico das nervuras (*Cassava vein mosaic virus*, CsVMV). Para o vírus do mosaico comum, um antissoro já foi produzido (Silva et al., 2011). Para o vírus do mosaico das nervuras não existe antissoro disponível, e a detecção viral tem sido feita exclusivamente por testes PCR (Calvert, 1995). Neste trabalho foram analisados 4 grupos de amostras, totalizando 65 plantas matrizes e micropropagadas de mandioca, fornecidas para a análise, pela empresa Tecnoplanta de Piraquara-PR. A presença do CsCMV foi confirmada em 16 plantas, representando 25% das amostras.

Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é o alimento básico de grande contingente de populações das regiões tropicais. Cultivada em todas as regiões brasileiras, é utilizada na produção de farinha, extração de amido e, uma pequena parte, para consumo *in natura*. A mandioca é vegetativamente propagada, plantando-se pequenos segmentos do caule. Esse tipo de propagação causa inconvenientes, como a disseminação de doenças sistêmicas através das gerações sucessivas, tal como ocorre com as causadas por vírus, que podem acarretar a degenerescência das manivas. Muitos são os vírus detectados na cultura da mandioca, sendo que o mais disseminado em todo mundo é o *Cassava common mosaic virus* (CsCMV), gênero *Potexvirus*, Alphaflexiviridae, e o *Cassava vein mosaic virus* (CsVMV), gênero *Cavemovirus*, Caulimoviridae (Costa e Kitajima, 1972).

No Brasil, presume-se que o CsCMV esteja disseminado em todas as regiões produtoras do Sul e do Sudeste, infectando todas as variedades cultivadas atualmente. Observações de campo indicam que a manifestação severa da doença em variedades suscetíveis pode causar perdas de produção que variam de 10 a 20%, prejudicando a qualidade do produto pela redução de 10 a 50% nos teores de amido (Fukuda, 1993).

Na limpeza viral de material propagativo, a técnica mais utilizada tem sido a cultura *in vitro* de meristemas associada à termoterapia. Todavia, tem sido

observado que para o CsCMV mesmo após o microcultivo, ainda pode ser constatada a presença de vírus através de testes ELISA, mesmo em plantas assintomáticas. A indexação sorológica do CsCMV tem permitido a identificação de material infectado, possibilitando a sua eliminação, o que tem agilizado o processo de produção de plantas matrizes livres de vírus.

O Paraná é o maior produtor de raízes de mandioca do Brasil. Todavia, o material de propagação utilizado nos plantios não passa atualmente por nenhum controle fitossanitário. Neste projeto, plantas de mandioca, utilizadas como matrizes e mudas micropropagadas, foram testadas pelo método Elisa-indireto. A empresa Tecnoplanta Ltda, sediada em Piraquara, no Paraná, é especializada na produção de batata e alho sementes, e recentemente iniciou a produção clonal de mudas de mandioca.

Portanto, este trabalho deu suporte à produção clonal de mudas de alta qualidade fitossanitária, disponibilizando aos produtores, material sadio, livre de patógenos, e indexado para a presença do vírus do mosaico comum. Nas análises realizadas, foi utilizado o método Elisa-indireto com um antissor para o CsCMV produzido na UEM (Silva et al., 2011).

Materiais e métodos

As amostras de mandioca foram encaminhadas à UEM em quatro grupos, sendo que o primeiro grupo continha 13 amostras, o segundo 16 amostras, o terceiro grupo 8 amostras, e o quarto grupo, 27 amostras para serem testadas. Nas análises sorológicas sempre foi incluída uma amostra com o CsCMV, utilizada como controle positivo. Para os testes de Elisa-indireto, 1g de cada amostra foi macerada com auxílio de cadinho e pistilo em 10 mL de tampão de cobertura. Após, aplicou-se 100 µL do macerado em cada orifício da placa de ELISA, sendo utilizadas três repetições para cada amostra.

Colocou-se a placa em um recipiente com tampa e papel toalha umedecido e incubou-se a placa a 4 °C por 18 h (*overnight*). Esvaziaram-se os orifícios e lavou-se com tampão PBS-Tween, deixando a solução por 3 min. Repetiu-se esse mesmo processo por três vezes.

A segunda incubação realizada foi do anticorpo específico para o CsCMV. Para isso, a imunoglobulina G (IgG) específica para o vírus foi diluída em tampão PBS 1X na concentração de 1:5.000, e aplicou-se 100 µL da mesma nos orifícios da placa onde foram inicialmente adicionadas as amostras e os controles. Incubou-se a placa a 37 °C por 2 h, mantendo-se a placa no recipiente com tampa e papel toalha umedecido. Após esse período, repetiu-se a lavagem com tampão PBS-Tween.

A terceira incubação do teste corresponde ao anticorpo anti-IgG conjugado à enzima fosfatase alcalina. Preparou-se uma solução de anti-IgG com PBS 1X na concentração de 1:10.000, e aplicou-se 100 µL da mesma em cada orifício da placa. Incubou-se a 37 °C por 2 h, mantendo-se a placa dentro do recipiente com tampa e papel toalha umedecido. Após o período de incubação foi novamente repetido o procedimento de lavagem com tampão PBS-Tween.

Por último, diluiu-se um comprimido de enzima p-nitrofenilfosfato para cada 5 mL de solução tampão substrato, e aplicou-se 100 µL dessa solução em cada orifício. Colocou-se a placa no escuro e aguardou-se 20 min para revelação do teste,

onde amostras positivas apresentaram coloração amarelo fluorescente pela reação da enzima com o substrato.

Efetuuou-se a leitura em espectrofotômetro a 405 nm e identificou-se as amostras infectadas com o vírus CsCMV. Em cada placa também foi incluída uma amostra negativa. Foram consideradas positivas as amostras cujas médias de leitura foram superiores a duas vezes a média do controle negativo.

Resultados e Discussão

Após a realização do Elisa-indireto nos quatro grupos de amostras, obteve-se os seguintes resultados:

Grupo 1: das 13 amostras testadas, nenhuma continha o CsCMV.

Grupo 2: das 16 amostras, 8 continham o CsCMV.

Grupo 3: das 8 amostras testadas, 4 amostras continham o CsCMV.

Grupo 4: das 27 amostras, 4 continham o CsCMV.

Tabela 1. Resultado das leituras em espectrofotômetro a 405 nm do grupo 2.

AMOSTRA	Leitura	Resultado
Controle -	0,2216	0,4432
Controle +	0,4689	Positivo
1	0,24905	Negativo
2	0,3001	Negativo
3	0,30375	Negativo
4	0,2142	Negativo
5	0,59585	Positivo
6	0,42835	Negativo
7	0,71505	Positivo
8	0,81315	Positivo
9	0,65185	Positivo
10	0,74085	Positivo
11	0,75305	Positivo
12	0,4867	Negativo
13	1,5881	Positivo
14	0,8983	Positivo
15	0,32335	Negativo
16	0,1217	Negativo

Conclusões

Através dos resultados obtidos, foi possível concluir que 25% das amostras testadas estavam infectadas com CsCMV. Portanto, caso as manivas provenientes dessas plantas fossem para o campo, ocorreria uma forte disseminação do vírus na cultura, reduzindo drasticamente a produtividade nas áreas de cultivo.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica.

Referências

Calvert LA, Ospina MD & Shepherd RJ. **Characterization of Cassava vein mosaic virus: a distinct plant pararetrovirus.** J Gen Virol 76: 1271–1278. 1995.

Clark MF, Adams AN. **Characterization of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses,** Journal of General Virology, Great Britain, v.34, p.475-483. 1977.

Costa AS, Kitajima EW. **Studies on vírus and mycoplasma diseases of the cassava plant in Brazil.** Proceedings of cassava mosaic workshop, Ibadan. International Institute for Tropical Agriculture. Ibadan, Nigéria, nº 18. 1972.

Fukuda, C. **Doenças da mandioca.** In: EMBRAPA. Centro Nacional de Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, BA), Instruções práticas para o cultivo de mandioca. Cruz das Almas, pp.53-56. 1993.

Silva JM, Carnelossi PR, Bijora T, Facco CU, Picoli MHS, Souto ER, Braz AJ, Almeida AMR. **Immunocapture-RT-PCR detection of Cassava common mosaic virus in cassava obtained from meristem-tip culture in Paraná state.** Tropical Plant Pathology 36 (5) 271275. 2011.