

Crotalaria paulinea, Novo Hospedeiro Natural do Vírus do Mosaico Severo do Caupi

J. Albersio A. Lima^{1*}, Aline Kelly Q. Nascimento^{1*}, Gilson Soares Silva²,
Rosa Felícia E. A. Camarço^{1*} & M. Fátima B. Gonçalves¹

¹Laboratório de Virologia Vegetal, UFC, Campus do Pici, Fortaleza-CE, e-mail: albersio@ufc.br;

²Universidade Estadual do Maranhão, São Luiz, MA

(Aceito para publicação em 08/06/2005)

Autor para correspondência: J. Albersio A. Lima

LIMA, J.A.A., NASCIMENTO, A.K.Q., SILVA, G.S. & CAMARÇO, R.F.E.A. *Crotalaria paulinea*, novo hospedeiro natural do vírus do mosaico severo do caupi. *Fitopatologia Brasileira* 30:429-433. 2005.

RESUMO

Amostras foliares de *Crotalaria paulinea* apresentando mosaico foram coletadas em São Luiz, MA, e enviadas ao Laboratório de Virologia Vegetal da UFC. As amostras foram testadas por Elisa indireto, contra anti-soros para *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV) e por dupla difusão em ágar contra anti-soro para *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV). As amostras reagiram somente com o anti-soro para CPSMV, indicando ser *C. paulinea* mais um hospedeiro natural do vírus. Extratos das folhas de *C. paulinea* foram inoculados em plantas de caupi (*Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata*) mantidas em casa de vegetação. Dez dias após a inoculação, as plantas passaram a exibir sintomas de mosaico e a presença do CPSMV foi confirmada por sorologia. Nos estudos de gama de hospedeiros, envolvendo oito espécies botânicas, o isolado de CPSMV obtido de *C. paulinea* (CPSMV-Cp) infetou sistemicamente somente cultivares de caupi. Estudos de reações de RT-PCR revelaram a presença de uma banda no gel de agarose de 594 pb para o CPSMV-Cp semelhante às de outros isolados de CPSMV. O CPSMV-Cp foi multiplicado em caupi cv. Pitiúba e purificado por clarificação com *n*-butanol, precipitação viral com PEG e ultracentrifugação. A preparação purificada apresentou um espectro de absorção ultravioleta típico de nucleoproteína com uma razão A_{260}/A_{280} de 1,7. Coelho da raça Nova Zelândia Branca imunizado com a preparação viral purificada, produziu anti-soro policlonal reativo com CPSMV em dupla difusão em ágar. Este é o primeiro relato sobre a infecção natural de CPSMV em *C. paulinea*.

Palavras-chave adicionais: *Comovirus*, CPSMV, caupi, *Vigna unguiculata*.

ABSTRACT

Crotalaria paulinea, a new natural host of *Cowpea severe mosaic virus*

Leaf samples from *Crotalaria paulinea* showing mosaic were collected in the city of São Luiz, MA and sent to the Plant Virus Laboratory at the UFC. The leaf samples were tested by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) against antisera specific to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV) and by gel double-diffusion against antiserum to *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV). The samples reacted only with the antiserum to CPSMV indicating that *C. paulinea* is one more natural host of the virus. Leaf extracts from infected *C. paulinea* were mechanically inoculated in cowpea (*Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata*) plants maintained in greenhouse. Ten days after inoculation, the plants started to exhibit mosaic and the presence of CPSMV was confirmed by serology. In a host range study involving eight plant species, the CPSMV isolate obtained from *C. paulinea* (CPSMV-Cp) infected only cowpea cultivars. The results of RT-PCR revealed a band in the agarose gel of 594 pb for CPSMV-Cp similar to those of other CPSMV isolates. The CPSMV-Cp was increased in cowpea cv. Pitiúba and purified by clarification using *n*-butanol, virus particle precipitation with polyethylene glycol (PEG) and ultra centrifugation. The purified virus preparation presented an ultraviolet light absorption spectrum typical of nucleoprotein, with a ratio A_{260}/A_{280} equal to 1.7. A White New Zealand rabbit immunized with the purified virus preparation produced polyclonal antiserum reactive to CPSMV in agar double-diffusion. This is the first report about natural infection of *C. paulinea* by CPSMV.

Additional keywords: *Comovirus*, CPSMV, cowpea, *Vigna unguiculata*.

O primeiro relato do vírus do mosaico severo do caupi (*Cowpea severe mosaic virus* CPSMV), família *Comoviridae*, gênero *Comovirus*, no Brasil foi realizado por Oliveira (1947) no Rio Grande do Sul. Desde então, a distribuição deste vírus alcançou todas as regiões produtoras de caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *unguiculata*,

no país (Lima *et al.*, 2005).

O caupi, também conhecido como feijão de corda e feijão macassar é uma leguminosa bem adaptada às condições brasileiras de clima e de solo, assumindo grande relevância social para o Nordeste. Existem vários fatores que podem implicar na redução da produtividade desta leguminosa em seus campos de cultivo, sendo as doenças ocasionadas por vírus, consideradas os principais fatores

*Bolsistas do CNPq

responsáveis pelos prejuízos. Dentre os vírus importantes que infetam caupi, destaca-se o CPSMV transmitido por mais de dez espécies de coleópteros (Lima *et al.*, 2005).

O CPSMV infeta naturalmente várias espécies da família Leguminosae entre as quais: *Canavalia brasiliensis* Mart. Ex.Benth (Caner *et al.*, 1969; Vasconcelos & Lima, 1981), *C. ensiformis* DC. (Vasconcelos & Lima, 1981), *C. rosea* (sw) DC (Caner *et al.*, 1969), *Centrosema pubescens* Benth (Lin *et al.*, 1982), *Crotalaria juncea* L. (Lin *et al.*, 1982), *Glycine max* (L.) Merrill (Anjos & Lin, 1984; Souto *et al.*, 2002), *Lupinus albus* L. (Caner *et al.*, 1969), *Macroptilium atropurpureum* L. (Caner *et al.*, 1969; Vasconcelos & Lima, 1981), *M. lathyroides* (L.) Urban (Lima & Nelson, 1977) *M. panduratum* Mart. Ex Benth., (Caner *et al.*, 1969), *Phaseolus lunatus* L. (Caner *et al.*, 1969), *P. vulgaris* L. (Cupertino *et al.*, 1981), *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. (Kitajima *et al.*, 1979), *Pueraria* sp. (Lin *et al.*, 1982), *Sesbania* sp. (Caner *et al.*, 1969), *Vigna mungo* L. (Lin *et al.*, 1982), *V. radiata* (L.). R Wilezek (Brioso *et al.*, 1994).

Crotalaria é um dos gêneros da família Leguminosae com cerca de 600 espécies distribuídas nas regiões trópicos e sub-trópicos. Na América do Sul, o Brasil é o país que apresenta a maior concentração de espécies do gênero, com aproximadamente 30 nativas. Dentre estas *C. juncea* é apontada como hospedeiro natural do CPSMV (Lin *et al.*, 1982). O presente trabalho teve como objetivo isolar, identificar e caracterizar um vírus encontrado infetando *C. paulinea* Schrank no estado do Maranhão.

Identificação sorológica

Amostras foliares de *C. paulinea* apresentando sintomas de mosaico (Figura 1) provenientes do estado do Maranhão, foram testadas por “enzyme-linked immunosorbant assay” (Elisa) indireto contra anti-soros específicos para *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus* e *Cucumber mosaic virus* (CMV), família *Bromoviridae*, gênero *Cucumovirus*. As amostras foram, também, testadas por dupla difusão em ágar contra anti-soro para CPSMV, no Laboratório de Virologia Vegetal da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Estudo de gama de hospedeiros

Foram realizados estudos de gama de hospedeiros envolvendo oito espécies vegetais e 19 cultivares de caupi. Sementes de cada espécie ou cultivar foram plantadas em solo esterilizado, com quatro plantas por vaso, sendo quatro mantidas como testemunha. As inoculações foram realizadas seis a oito dias após o plantio, usando-se como inóculo extrato de plantas infetadas, preparado em solução tampão 0,05 M de fosfato de potássio pH 7,5. A sintomatologia foi observada por um período de 25 dias após a inoculação. Decorrido o período de observação foi realizado teste em dupla difusão em agar para todas as plantas inoculadas.



FIG. 1 - Sintomas induzidos pelo isolado de *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) obtido de *Crotalaria paulinea* (CPSMV-Cp). A- Folhas de *C. paulinea* naturalmente infetada com CPSMV-Cp exibindo mosaico típico; B- Plantas de caupi (*Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata*) cv. Pitiúba artificialmente inoculadas com CPSMV-Cp exibindo mosaico severo e bolhosidade.

Purificação do vírus e produção de anti-soro

O vírus foi inoculado em 160 plantas sadias de caupi cv. Pitiúba e, decorrido um período de 18 dias, o material foliar foi coletado e usado para a purificação do vírus, seguindo o método usado por Lima & Nelson (1974), com algumas adaptações. As partículas do vírus foram extraídas do material foliar na presença de tampão de fosfato de potássio pH 7,5 e, em seguida, o extrato foi clarificado com 8% de *n*-butanol, seguido de baixa centrifugação. O vírus foi precipitado com polietilenoglicol 6.000 (PEG) na presença de sulfato de sódio, seguido de centrifugações a 5.000 g por 60 min. As partículas virais da preparação final foram submetidas a uma ultracentrifugação de 120.000 g durante 90 min e o precipitado foi ressuscitado em tampão de fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,5. A infetividade da preparação purificada do vírus foi testada através de inoculação em plantas sadias da cv. Pitiúba.

O vírus purificado foi utilizado para obtenção de anti-soro policlonal em coelho da raça Nova Zelândia Branca, com aproximadamente seis meses de idade. A primeira sangria para obtenção do anti-soro foi realizada 30 dias após a primeira injeção e, a partir daí, o animal passou ser sangrado semanalmente.

Reação em cadeia de polimerase

Para extração de RNAs totais, 100 µg de tecido foliar fresco de planta de caupi infetada com o vírus isolado de *C. paulinea* foram triturados em nitrogênio líquido, conforme o método de extração RNeasy® Plant Kit protocol (Qiagen®). O RNA do vírus foi retro-transcrito para a produção de seu respectivo cDNA. Para tanto, 5 µl de RNAs totais foram adicionados a 2 µl de solução de primer antisense: 5'-YTCRAAWCCVYTRTTKGGMCCACA-3' e 7 µl de água ultra pura tratada com DEPC. A mistura foi submetida ao seguinte tratamento: aquecimento inicial a 42 °C por 2 min e resfriamento em gelo para adição dos componentes da reação: 5 µl do tampão de transcrição reversa 5 x (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 1,25 µl da mistura de dNTPs (10 mM de cada), 2 µl de DTT (0,1 M), e 0,75 µl da enzima transcriptase reversa (Gibco BRL, 50 U/ µl). A mistura foi incubada a 50 °C por 42 min e, em seguida, a 70 °C por 15 min.

Os cDNAs foram submetidos a reação em cadeia de polimerase ("polymerase chain reaction", PCR) usando-se o "primer" antisense e o primer senso: 5'-GCATGGTCCAC WCAGGT-3', correspondentes às seqüência de aminoácidos conservados presentes na sub-unidade do capsídeo dos vírus do gênero *Comovirus* (Souto *et al.*, 2002). Para reação de PCR foi preparada uma solução contendo 0,5 µl da mistura de dNTPs, 1 µl de cada oligonucleotídeo, 0,5 µl da *Taq* DNA polimerase (Gibco-BRL 5 U/µl), 2,5 µl de tampão 10 x (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 0,5 M KCl), 1,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µl do cDNA produzido e 15,5 µl de água ultra pura. A mistura foi submetida a um ciclo inicial de 94 °C/5 min, 4 °C/2 min e 72 °C/ 3 min, seguido de 25 ciclos de 94 °C/1min, 41 °C/2 min e 72 °C/3 min, e um ciclo final de 72 °C/7 min. Alíquotas do produto da PCR foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corados com brometo de etídio (10 µg/µl). De forma semelhante foram realizadas as reações de RT-PCR da estirpe CPSMV-Ce, comum no Estado do Ceará (Lima & Nelson, 1977; Lima *et al.*, 2005).

De acordo com os resultados dos testes sorológicos, as amostras reagiram somente com o anti-soro para CPSMV, indicando ser *C. paulinea* (Figura 1) mais um hospedeiro natural deste vírus. A ausência de reação com qualquer um dos outros anti-soros revelou, também, a inexistência da possibilidade de infecção mista com outros vírus.

Nos estudos de gama de hospedeiros, o vírus infetou 18 das 19 cultivares de caupi testadas, as quais apresentaram sintomas, variando de mosaico leve a mosaico severo, com bolhosidade (Tabela 1). As infecções virais e as ausências de infecção foram confirmadas por sorologia. O vírus não infetou a cv. Macaibo de caupi, e nem as seguintes espécies vegetais: *Cassia occidentalis* L., *Clitoria ternateae* L., *Leucaena* sp., *M. lathyroides*, *M. atropurpureum* e *Phaseolus membranescens* L. Semelhantemente às demais estirpes do CPSMV, o isolado obtido de *C. paulinea* (CPSMV-Cp) ocasionou lesões locais em *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn (Tabela 1). Mesmo infetando a maioria das

TABELA 1 - Reações sintomatológicas e resultados sorológicos por dupla difusão em ágar apresentados por oito espécies vegetais e 19 cultivares de caupi (*Vigna unguiculata*) inoculadas com *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) obtido de *Crotalaria paulinea* (CPSMV-Cp)

Espécie vegetal / cultivar	CPSMV - Cp	
	Sintoma*	Sorologia
<i>Cassia occidentalis</i>	S/S	-
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LCL	nao testado
<i>Clitoria ternateae</i>	S/S	-
<i>Leucaena</i> sp.	S/S	-
<i>Macropitium atropurpureum</i>	S/S	-
<i>M. lathyroides</i>	S/S	-
<i>Phaseolus membranescens</i>	S/S	-
<i>Vigna unguiculata</i>		
'BR poty'	Ml	+
'CE 12'	Ms	+
'CE 36'	Ms, Bo	+
'CE 40'	Ms, Bo	+
'CE 43'	Ms, Bo	+
'CE 44'	M	+
'CE 45'	Ms, Bo	+
'CE 46'	Ms, Bo	+
'CE 46'	Ms, Bo	+
'CE 49'	M, Bo	+
'CE 95'	M	+
'CE 315'	M	+
'CE 670'	M, Bo	+
'Epace 92'	M	+
'Macaibo'	S/S	-
'Oflia'	Ms, Bo	+
'Pitúba'	Ms, Bo	+
'Roxinho'	M, Bo	+
'Setentão'	Ml, S/ Bo	+

*Bo - Bolhosidade; LCL - Lesões cloróticas locais; Ml - Mosaico leve; M - Mosaico; Ms - Mosaico severo; S/S - Sem sintomas

cultivares de caupi, observou-se uma grande diversidade de sintomas, indicativo da variabilidade genética do caupi ao CPSMV (Lima *et al.*, 1992), o que facilitará o controle através do uso de genótipos resistentes (Lima *et al.*, 2005).

Os resultados das reações de RT-PCR revelaram a presença de bandas predominantes no gel de agarose, correspondentes a 594 pb para o CPSMV-Cp e a 596 pb para o CPSMV-Ce (Figura 2), confirmando a identidade do CPSMV-Cp e sua similaridade genômica com o CPSMV-Ce. Segundo Brioso *et al.* (1996), com a utilização dos respectivos "primers", o tamanho do fragmento esperado para as estirpes de CPSMV é de, aproximadamente, 593 pb. Outros fragmentos observados no gel podem estar relacionados com as degenerescência dos "primers" ou com a temperatura de anelamento utilizada (Brioso *et al.*, 1996).

A preparação purificada do vírus apresentou um espectro de absorção ultravioleta típico de núcleo proteína com uma razão A_{260}/A_{280} de 1,7, característico de vírus do gênero *Comovirus*. O rendimento final da preparação purificada foi estimado em 32,50 mg de vírus por Kg de tecido foliar infetado. A infetividade das partículas virais purificadas foi confirmada em plantas sadias de caupi. O

coelho imunizado com a preparação viral purificada produziu anti-soro policlonal reativo com CPSMV-Cp e outros isolados de CPSMV em dupla difusão em agar, apresentando fraca reação com extrato de plantas saudias, que deixou de ocorrer após sua diluição na proporção de 1:8 (Figura 3). O título do anti-soro em dupla difusão em agar foi estimado em 1:1024. Em testes de reciprocidade, o CPSMV-Cp mostrou-se sorologicamente relacionado aos demais isolados do CPSMV, pertencente ao banco ativo de vírus do Laboratório de Virologia Vegetal da UFC, inclusive à estirpe que infeta a cv. Macaibo (CPSMV-Mc). Este constitui o primeiro relato sobre a infecção natural de CPSMV em *C. paulinea*.

O CPSMV apresenta uma larga variabilidade biológica (Lima *et al.*, 1998; Lima *et al.*, 2005), possuindo uma ampla gama de espécies hospedeiras, especialmente dentro da família Leguminosae, incluindo plantas nativas e cultivadas (Lima *et al.*, 2005). Não constituindo as sementes

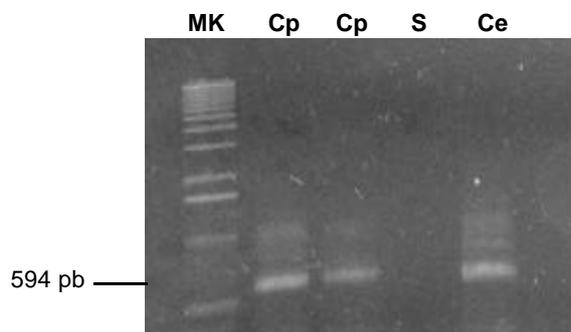


FIG. 2 - Produtos da transcrição reversa e reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) de fragmentos do RNA-2, correspondentes às seqüências de aminoácidos conservados do capsídeo de um isolado de *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) obtido de *Crotalaria paulinea* (CPSMV-Cp) e de um isolado do Ceará (CPSMV-Ce). MK - Marcadores de DNA 1,0 kb; Cp - Extrato de plantas de caupi (*Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata*) infetada com CPSMV-Cp; Ce - Extrato de caupi infetado com CPSMV-Ce e S - Extrato de plantas de caupi saudias.

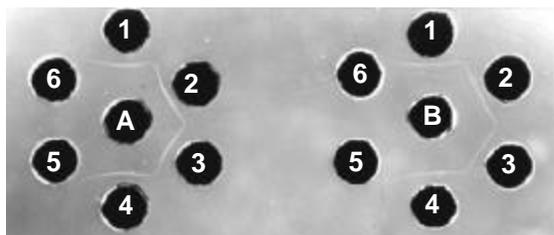


FIG. 3 - Teste de dupla difusão em agar com anti-soro para o isolado de *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) obtido de *Crotalaria paulinea* (CPSMV- Cp). A) anti-soro para CPSMV-Cp; B) anti-soro para CPSMV isolado no Ceará (CPSMV-Ce); 1,2 extrato de plantas infetadas com CPSMV-Cp; 3,4 extrato de plantas infetadas com CPSMV-Ce; 5,6 extrato de planta sadia.

de caupi fontes de inóculo do CPSMV (Assis Filho *et al.*, 1992), as leguminosas hospedeiras nativas do Nordeste brasileiro, inclusive *C. paulinea*, devem desempenhar importante papel na sobrevivência e epidemiologia do vírus, funcionando como reservatórios naturais do mesmo, durante os períodos de estiagem.

Vários isolados de CPSMV, obtidos a partir de plantas de caupi naturalmente infetadas já foram caracterizados, destacando-se entre eles o CPSMV-Ce, do Ceará, estudado no início da década de 1970 (Lima & Nelson, 1974, 1977), o CPSMV-Pi, do Piauí (Lima *et al.*, 1998), o CPSMV-Pe, de Pernambuco (Lima *et al.*, 1998) e o CPSMV-Mc obtido da cv. Macaibo imune a todos os outros isolados até o então avaliados no Laboratório de Virologia Vegetal da UFC (Lima *et al.*, 1992).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANJOS, J.R.N. & LIN, M.T. Bud Blight of soybeans caused by cowpea severe mosaic virus. *Plant Disease* 68:405- 407. 1984.
- ASSIS FILHO, F.M., LIMA, J.A.A., PIO-RIBEIRO, G. & MARIANO, R.L.R. Ausência de transmissão por sementes do vírus do mosaico severo de caupi. *Caderno Ômega* 4:9-17. 1992.
- BRIOSO, P.S.T., SANTIAGO, L.J.M., ANJOS, J.R.N. & OLIVEIRA, D.E. Identificação de espécies do gênero *Comovirus* através de "polymerase chain reaction". *Fitopatologia Brasileira* 21:219-225. 1996.
- BRIOSO, P.S.T., DUQUE, F.F., SAYÃO, F.A.D., LOURO, R.P., KITAJIMA, E.W & OLIVEIRA, D.E. Vírus do mosaico severo do caupi - infecção natural em mungo verde, *Vigna radiata*. *Fitopatologia Brasileira* 19: 420-429. 1994.
- CANER, J., SILBERSCHMIDT, K.M. & FLORES, E. Ocorrência do vírus do mosaico do *Vigna* no estado do São Paulo. *O Biológico* 35:13-16. 1969.
- CUPERTINO, F.P., COSTA, C.L., LIN, M.T. & KITAJIMA, E.W. Infecção natural do feijoeiro pelo vírus do mosaico severo do caupi no Centro-Oeste do Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 6:529. 1981. (Resumo).
- KITAJIMA, E.W., NODA, H., LIN, M.T. & COSTA, C.L. Um mosaico em feijão-de-asa (*Psophocarpus tetragonolobus*) causado por um isolado do subgrupo severo do vírus do mosaico da *Vigna*. *Fitopatologia Brasileira* 4:519-528. 1979.
- LIMA, J.A.A. & NELSON, M.R. Etiology and epidemiology of mosaic of cowpea in Ceará, Brazil. *Plant Disease* 63:864-867. 1977.
- LIMA, J.A.A. & NELSON, M.R. Purificação e identificação sorológica de "cowpea mosaic virus" em *Vigna sinensis* Endl., no Ceará. *Ciência Agrônômica* 3:5-8. 1974.
- LIMA, J.A.A., LIMA, R.C.A., GONÇALVES, M.F.B. & SITTOLIN, I.M. Biological and serological characteristics of a genetically different cowpea severe mosaic virus strain. *Virus: Reviews and Research* 3:57-65. 1998.
- LIMA, J.A.A., SITTOLIN, I.M. & LIMA, R.C.A. Diagnose e estratégias de controle de doenças ocasionadas por vírus. In: Freire Filho, F.R., Lima, J.A.A., Silva, P.H.S & Ribeiro, V.Q. (Eds.) *Feijão caupi: Avanços tecnológicos*. Embrapa Informação Tecnológica. 2005. pp.404-459.

- LIMA, J.A.A., SITTOLIN, I.M., GONÇALVES, M.F.B. & BRITO, E.M. Isolado do vírus do mosaico severo do caupi capaz de infectar a cultivar Macaibo. *Fitopatologia Brasileira* 17:186. 1992. (Resumo).
- LIN, M.T., ANJOS, J.R.N. & RIOS, G.P. Cowpea severe mosaic virus in five legumes in Central Brazil. *Plant Disease* 66:67-70. 1982.
- OLIVEIRA, M.A. Contribuição ao estudo dos vírus causadores de mosaico no feijão macassar (*Vigna* spp). Instituto Agronômico do Sul (Pelotas). *Boletim Técnico* 1:1-36. 1947.
- SOUTO, E.R., ALMEIDA, A.M.R, ANÉSIO, B., FÁBIO, S. & ÉBERSON S.C. Análise molecular de segmento do RNA-2 de *Comovirus* isolado de soja no estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira* 27:525-527. 2002.
- VASCONCELOS, M.F.R. & LIMA, J.A.A. Purificação e sorologia de raças de "cowpea severe mosaic virus" isoladas de 4 espécies de leguminosas. *Fitopatologia Brasileira* 6:534-534. 1981. (Resumo).