

# Purificação de *Potyvirus* de ocorrência natural em *Hypochaeris brasiliensis*

SILVA, J. A.<sup>1</sup>.; BRIZOLA, D. C.<sup>2</sup>.; DIAS, L. A. F.<sup>2</sup>.; POLICAN, P. M.<sup>2</sup>.; ALMEIDA, A. M. R.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Centro Universitário Filadélfia, <sup>2</sup>Embrapa Soja, . Londrina, Paraná, e-mail: alvaro.almeida@embrapa.br

## Introdução

O gênero *Potyvirus* é o responsável por causar a maior parte das viroses em plantas. Cerca de 30% de todas as viroses conhecidas são causadas por *Potyvirus* (WARD; SHUKLA, 1991). Esses vírus têm forma de partículas flexuosas, apresentando de 11 nm a 15 nm de largura e 680 nm a 900 nm de comprimento (DOUGHERTY; CARRINGTON, 1988). Uma característica interessante desse gênero, segundo Edwardson (1974), é o fato de apresentarem inclusões proteicas em forma de catavento, no citoplasma das células infectadas, sendo um critério importante na sua identificação. A maior parte da transmissão desses vírus é feita por afídeos. Esses vírus possuem RNA, fita simples e senso positivo.

O Almeirão do campo (*Hypochaeris brasiliensis*) é uma planta daninha encontrada rotineiramente na cultura da soja, sendo hospedeira de

patógenos, nas áreas cultivadas da América do Sul (MITUTI et al. 2006).

A purificação de vírus para se determinar a característica físico-química consiste em utilizar um método específico para a obtenção de vírus livre de qualquer tipo de contaminante proteico. Várias etapas são necessárias para a obtenção de extrato puro de partículas virais, onde se faz uso de centrifugações diferenciais, com combinação de baixas e altas centrifugações. Existem diversos métodos específicos para cada tipo de planta e vírus, sendo às vezes necessárias adaptações para a purificação do vírus desejado, caso o mesmo não tenha um método totalmente definido. Normalmente trata-se de um processo demorado.

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de uma solução viral, a mais pura possível, livre de contaminantes, podendo ser utilizada em outros trabalhos, como a produção de antissoro e o estudo dos componentes estruturais dos vírus (RNA e DNA).

## **Materiais e métodos**

Foi realizada a coleta de 100 g de folhas de *Hypochoeris brasilienses*, quando estas apresentaram sintoma nítido da doença. As folhas foram trituradas em um liquidificador na presença de tampão resfriado de fosfato de sódio 0,2M, pH 7,0, com adição de EDTA 0,01M e 0,5% de sulfito de sódio, e em seguida o extrato foi filtrado em gaze dupla. O filtrado foi submetido a adição de 7% de álcool butílico e agitado no agitador magnético, durante a noite. A precipitação das impurezas resultantes foi obtida através de uma centrifugação com baixa rotação (10.000 g) por 10 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 0,5% de detergente Triton x-100 e deixado em agitação por 10 minutos, e em seguida realizada uma centrifugação com alta rotação (118.000 g) por 3 horas.

Na centrifugação foram utilizados tubos de 38 mL, sendo 30 mL do extrato e 8,0 mL de sacarose 20%, essa última foi adicionada cuidadosamente no fundo dos tubos, formando um “colchão” de sacarose. O precipitado formado após a centrifugação foi

ressuspendido em 3 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5, EDTA 0,01 M e 0,5% de Triton X-100. Uma nova centrifugação com baixa rotação foi efetuada para a precipitação de impurezas. A verificação da pureza do vírus foi determinada através de um espectro com uma faixa de comprimento de onda entre 220 nm e 400 nm, fazendo-se uma relação entre as absorbâncias em 260/280nm. Um novo ciclo de centrifugações foi realizado para se obter uma concentração maior de vírus e com maior pureza. A segunda centrifugação com alta rotação se deu com solução tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0, num total de aproximadamente 12 mL, e centrifugado com rotação de 106.000 g por 2 horas e meia. O precipitado formado foi ressuspendido novamente em 600  $\mu$ L de tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0, fazendo-se a leitura final no espectrofotômetro, na diluição de 1:20.

Para a determinação da massa molecular da proteína, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

## Resultados e discussão

Para cada 100 g de folha, obteve-se 600  $\mu$ L de suspensão de vírus purificado. A relação de absorbância entre 260 nm e 280 nm foi de 1,38, número considerado próximo ao característico de *Potyvirus*. De acordo com Stevens (1983), uma relação ideal de proteína capsidial e impureza é de 1,2. O coeficiente de extinção utilizado foi de 2,3, concluindo-se que 100 g de tecido infectado de *H. brasiliensis* tinha ao final 1 mg de vírus  $\text{ml}^{-1}$ .

Na Figura 1, as amostras referentes à proteína do capsídeo do vírus mostraram uma massa molecular de 34 kDa. Segundo Alisson et al. (1985), espécies de *Potyvirus* apresentam uma massa molecular por volta de 33 kDa, valores que estão muito próximos.

## Conclusão

Esse método apresentou uma quantidade satisfatória de suspensão de vírus purificado. A pureza da solução viral ficou próxima do ideal para *Potyvirus*.

Com base no peso molecular da proteína capsidial de aproximadamente 34 kDa, conclui-se que o vírus pertence ao gênero *Potyvirus*.

## Referências

ALLISON, R.F., SORENSON, J.C., KELLY, M.E., ARMSTRONG, F.B. ; DOUGHERTY, W.G. Sequence determination of the capsid protein gene and flanking regions of Tobacco etch virus: evidence for synthesis and processing of a polyprotein in potyvirus gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, p.3969-3972, 1985.

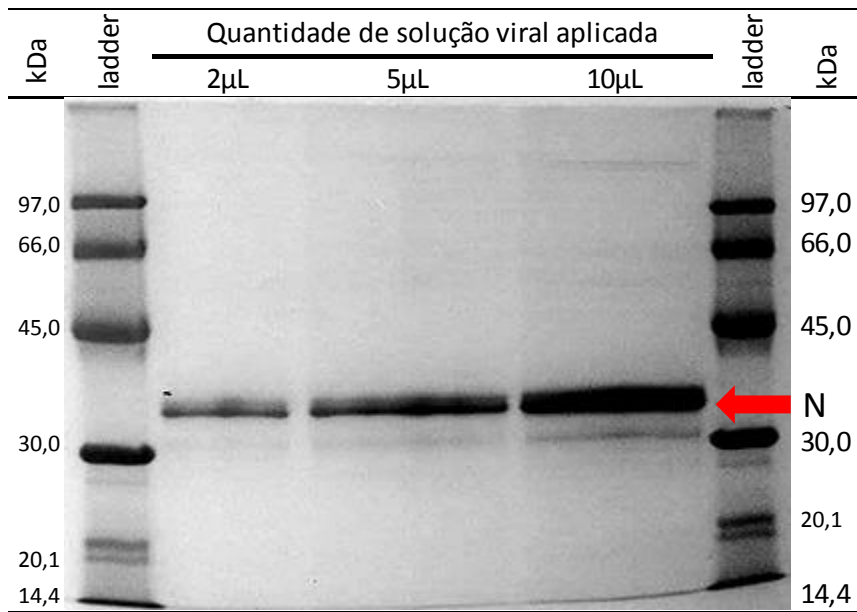
DOUGHERTY, W. G.; CARRINGTON, J. C. Expression and function of potyviral gene products. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 123-143, 1988.

EDWARDSON, J. R. **Some properties of the potato virus Y-group**. Florida Agricultural Experimental Station, (1974). 225 p. (Monograph Series 4).

MITUTI, T. ; KITAJIMA, E.W. ; ALMEIDA, A. M. R . Natural occurrence of a potyvirus on *Hypochoeris brasiliensis*. In: Encontro Nacional de Virologia, 17., 2006, Campos de Jordão **Virus Reviews and Research**. Supplement. São Paulo: Multibeat Estúdio de Mídias, 2006. v. 11. p. 187-187

STEVENS. W.A. **Virology of flowering plants**. New York: Chapman & Hall, 1983.183 p.

WARD, C. W.; SHUKLA, D. D. Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. **Intervirology**, v. 32, p. 269-296, 1991.



**Figura 1.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page). N = Nucleoproteínas.