

Universidade do Algarve
Unidade de Ciências e Tecnologias Agrárias

**Técnicas Biomoleculares no Diagnóstico e
Tipificação em Virologia Vegetal**

Gustavo Nuno Barbosa Nolasco

Faro, 1994

Agradecimentos

Várias pessoas, directa ou indirectamente, contribuíram para tornar possível este trabalho. Um papel muito importante coube a todos os que, individualmente referidos no segundo capítulo, me enviaram amostras de anticorpos e de isolamentos de vírus.

Para além de Materiais, também foram importantes os Métodos que aprendi, principalmente com investigadores da Estação Agronómica Nacional e do Laboratório de Virologia Vegetal do CIT-INIA (Madrid).

Especialmente, quero agradecer ao meu orientador, Professor Oscar Amaro de Sequeira, pelo apoio científico e logístico, pela disponibilidade que sempre manifestou e pelo seu entusiasmo contagiante.

Desejo também agradecer ao Dr. Fernando Ponz, do CIT-INIA (Madrid) o apoio científico e a possibilidade de ter estagiado no seu laboratório, onde aprendi muitas das técnicas de biologia molecular.

Também estou particularmente agradecido a Carmen de Blas, companheira de bancada de laboratório no CIT-INIA, sempre incansável para ensinar e ajudar durante os meses que aí permaneci.

Queria agradecer também às seguintes Instituições:

À Universidade do Algarve, nomeadamente ao Presidente do Conselho Directivo da Unidade de Ciências e Tecnologias Agrárias, Professor Eugénio Faria, por ter possibilitado a criação das condições necessárias à execução de grande parte deste trabalho na própria Universidade.

À Fundação Calouste Gulbenkian por ter financiado a minha estadia no CIT-INIA em Madrid.

Resumo

O diagnóstico é um dos principais meios de protecção de plantas em virologia vegetal. Muito frequentemente seria vantajoso poder ainda complementar o diagnóstico com informação sobre as estirpes que estão presentes num dado contexto epidemiológico. Na maior parte dos casos isto não é possível devido à inexistência de métodos apropriados de tipificação viral. Esta limitação tem também dificultado estudos de âmbito mais teórico que envolvem a identificação de estirpes presentes em populações naturais e que permitiriam melhor delinear as estratégias protecção. Num pequeno número de casos tem sido possível obter esta informação pela análise dos perfis electroforéticos obtidos pelo fracionamento de RNA bicatenário de origem viral ou, mais recentemente, a partir da análise dos genomas virais amplificados por PCR.

Neste trabalho estudam-se métodos capazes de serem aplicados em condições de rotina ao diagnóstico viral e à identificação de isolamentos de vírus, desenvolvendo-se em três partes.

No primeiro capítulo estuda-se a aplicabilidade da análise de RNA bicatenário ao diagnóstico viral, empregando para tal diversos vírus e hospedeiros. Verifica-se que este método é muito dependente do hospedeiro e desenvolvem-se protocolos de extracção de ácidos nucleicos que podem ser empregues com hospedeiros considerados difíceis, tais como a videira. Não são contudo protocolos que possam ser empregues em condições de rotina. Outras limitações provêm ainda da existência de RNA bicatenários endógenos que foram encontrados em vários hospedeiros. Para além destes problemas, a possibilidade de identificar estirpes depende ainda da estratégia de expressão genómica do vírus e do hospedeiro estar a vegetar em condições apropriadas para a manifestação do perfil completo de bandas. Em comparação com outros métodos que vieram a ser desenvolvidos neste trabalho, a análise de RNA bicatenário apresenta um interesse limitado quer no diagnóstico quer na tipificação viral. Poderá ter interesse como método exploratório no estudo de doenças de etiologia presumivelmente viral ainda não esclarecida, como por exemplo o mosaico da figueira, tratado neste trabalho. Esta doença aparece relacionada com um perfil electroforético composto de várias bandas de que sobressaem duas correspondentes a fragmentos de RNA bicatenário com cerca de 10-12 Kbp e 2,2 Kbp. Estas moléculas poderão estar relacionadas com a replicação de vírus de RNA possivelmente envolvido(s) na patogénese.

Na segunda parte estudam-se os métodos de diagnóstico baseados na amplificação *in vitro* de determinadas partes do genoma viral. Deste estudo resultou um método de diagnóstico (IC/RT-PCR) de elevada sensibilidade que evita a extracção de ácidos nucleicos, o que não acontecia na metodologia até então disponível. Os viriões são capturados directamente do extracto da planta mediante anticorpos adsorvidos sobre a superfície de uma fase sólida, provavelmente sofrendo uma distorção que possibilita a

extracção e transcrição do genoma pela RTase, seguindo-se a sua amplificação por PCR e quantificação dos resultados por fluorimetria. Todo o processo pode ser efectuado numa placa de microtitulação, sendo concebível um grau de automatização equivalente ao da técnica ELISA. Este método foi objecto de um pedido de patente (Nolasco *et al.*, 1992). A sua validade foi verificada com vírus de diversos grupos (Potyvirus, Nepovirus, Cucumovirus, Closterovirus, Luteovirus, Tobamovirus, Tospovirus) e com RNA satélites de CMV e GFLV. Num pequeno rastreio de CTV e GFLV, comprovou-se a incapacidade da técnica ELISA em detectar o vírus em várias amostras positivas por IC/RT-PCR. Por outro lado, no caso do GFLV não foi possível amplificar alguns isolamentos positivos por ELISA. Este facto foi atribuído a uma inesperada variabilidade genómica e reforça a necessidade de se efectuarem estudos de variabilidade genómica de vírus. Alternativamente à captura por anticorpos específicos, é possível capturar os genomas virais por meio de anticorpos para RNA bicatenário, o que permite alargar o âmbito desta metodologia a patogéneos desprovidos de proteína estrutural.

Na terceira parte estudou-se a conjugação da amplificação genómica por IC/RT-PCR com métodos de análise mutacional com vista ao desenvolvimento de métodos de tipificação genómica de vírus. Dois destes métodos, a análise de polimorfismos conformacionais monocatenários (SSCP) e de polimorfismos de locais de restrição (RSP) empregam como técnica preparativa a amplificação específica por IC/RT-PCR e foram objecto de um pedido de patente (Nolasco *et al.*, 1993a). Um terceiro método, a Síntese Aleatória de cDNA (SAcDNA), baseia a tipificação no aproveitamento das condições pouco restritivas da transcrição reversa para iniciar, por jusante, mediante um iniciador inespecífico, um conjunto de moléculas característico do isolamento viral, que é em seguida amplificado em condições normais de restritividade. Este método foi também objecto de um pedido de patente (Nolasco *et al.*, 1994b). São características gerais dos métodos apresentados poderem ser aplicados directamente ao extracto da planta a analisar, serem independentes do hospedeiro e, comparativamente com outros métodos, serem muito pouco laboriosos. Como modelo de aplicação empregou-se uma série de isolamentos de GFLV e CTV, grande parte mantidos em condições naturais. Obteve-se o melhor poder discriminante com SAcDNA. Para além da discriminação, a análise por RSP permitiu ainda o estudo de relações entre isolamentos e a avaliação quantitativa da diversidade genética de populações de GFLV e CTV, o que não havia sido feito previamente. Verificou-se que o gene da proteína do capsídeo do GFLV é altamente variável e que o distanciamento genético entre isolamentos não se relaciona com o distanciamento espacial entre as plantas, mesmo quando lado a lado. A diversificação do CTV segue um modelo distinto, relacionando-se a proximidade geográfica com a proximidade genética entre os isolamentos e não se atingindo diversidades tão elevadas como para o GFLV.

Summary

Diagnosis is one of the major components of disease control in plant virology. Frequently, it would be beneficial to be able to complement diagnosis with the information about the strains that are present in a given epidemiological context. In most of the cases this is not achieved due to the lack of adequate methods of viral typing. This limitation has also made it difficult to extend on a theoretical basis the studies involving the identification of strains present in natural populations in order to conceive better protection strategies. In a few cases, this kind of information has been obtained through analysis of electrophoretic profiles of double stranded RNA (ds-RNA) of viral origin, or more recently, from analysis of viral genomes amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR).

Reliable methods that can be applied in routine conditions to viral diagnosis and identification of virus isolates are studied in three chapters.

In the first chapter, the use of double stranded RNA analysis in viral diagnosis is studied with several virus - host systems. This method was found to be very host reliant and nucleic acid extraction procedures were developed that can be applied to recalcitrant hosts such as grapevine. However these procedures can not be used in routine conditions. Further limitations were found due to endogenous ds-RNA present in some hosts. The possibility of strain identification was dependent on the strategy of genome expression and of suitable conditions required for host growth in order to reveal all ds-RNA fragments. Comparing with other methods that have been developed in this study, ds-RNA analysis has a limited benefit for diagnosis or viral typing. This technique is of interest as an exploratory tool in the study of diseases of putative viral etiology, as is exemplified in this thesis for fig mosaic. In several isolates studied, this disease appears to be related with to ds-RNA fragments, two of which (10-12 Kbp and 2.2 Kbp) were conspicuous in the electrophoretic profiles. These molecules may be involved with possible RNA virus replication related with pathogenicity.

In the second chapter, methods of diagnosis based on *in vitro* amplification of the viral genome were studied. A very sensitive method was found, Immunocapture Reverse Transcriptional Polymerase Chain Reaction (IC/RT-PCR) that avoids nucleic acid extraction. Viral particles are captured directly from plant extracts using solid phase adsorbed antibodies. This probably results in capsid distortion, enabling coordinated genome extraction and transcription by reverse transcriptase followed by PCR amplification and DNA quantification by fluorometry. All this process can be accomplished in an ELISA plate and an equivalent degree of automatization to that

obtained in ELISA is conceivable. A patent application for this method has been submitted (Nolasco *et al.*, 1992). The method was validated with viruses from diverse groups (Potyvirus, Nepovirus, Cucumovirus, Closterovirus, Luteovirus, Tobamovirus and Tospovirus) as well as with satellite RNAs of CMV and GFLV. A small survey of CTV and GFLV demonstrated the inability of conventional ELISA methods to detect the virus in several samples that were positive by IC/RT-PCR. On the other hand it was not possible to amplify some GFLV isolates that were positive by ELISA. This was assigned to unexpected genome variability (see chapter three) and reinforces the necessity of studies on genomic variability. As an alternative to specific viral immunocapture, antibodies against ds-RNA can also be used, enlarging the scope of this methodology to pathogens devoid of structural proteins.

In the third chapter methods of genome typing of viruses were developed using a combination of genomic amplification and mutational analysis. Two of these methods, analysis of Single Stranded Conformation Polymorphisms (SSCP) and analysis of Restriction Site Polymorphisms (RSP) utilize as a preparatory technique the specific amplification of parts of the viral genome by IC/RT-PCR, and were the subject of a patent application (Nolasco *et al.*, 1993a). A third method, cDNA Aleatory Synthesis (SAcDNA) benefits from the low stringency conditions of reverse transcription to arbitrarily prime a set of discrete cDNA strands that are specifically amplified by PCR. This set of bands constitutes a genomic fingerprint of the virus isolate. A patent application was also submitted for this method (Nolasco *et al.*, 1994b). These methods can be directly applied to plant extracts, are host independent and compared to other available typing methods are much less tedious. As an application model these methods were used to type natural populations of GFLV and populations of distinct geographic origin of CTV. The best discriminating method was SAcDNA. Furthermore, RSP analysis allows the relatedness of isolates to be studied and enables the quantification of genomic diversity of the coat protein gene of GFLV and CTV populations, which has not been previously reported. The coat protein gene of GFLV was found to be highly variable and the genetic distance between isolates does not correlate with geographic distribution, even with isolates collected from nearby plants. The diversification of CTV follows a different model. The genetic proximity is related to geographic vicinity and overall diversity was not as high as with GFLV.

Abreviatura utilizadas

3SR	"Self Sustained Sequence Replication"
AMV RTase	Transcritase reversa de Avian Myeloblastosis Virus
CTAB	"hexadecyltrimethylammonium bromide"
DIBA	"Dot Immunobinding Assay"
ds-RNA	"double stranded RNA"
EAN	Estação Agronómica Nacional
ELISA	"Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
ELISA-DAS	"Enzyme Linked Immunosorbent Assay-Double Antibody Sandwich"
HPRI	"Human Placental Ribonuclease Inhibitor"
hsp	"heat shock protein"
IC/RT-PCR	"Immunocapture Reverse Transcriptional Polymerase Chain Reaction"
LCR	"Ligase Chain Reaction"
MMLV RTase	Transcritase reversa de Moloney Murine Leukemia Virus
Mr	Massa molecular relativa
ORF	"Open Reading Frame"
PBS	"Phosphate Buffered Saline"
PCR	"Polymerase Chain Reaction"
RF	"Replicative Form"
RFLP	"Restriction Fragment Length Polymorphism"
RI	"Replicative Intermediate"
RSP	"Restriction Site Polymorphism"
SACDNA	Síntese Aleatória de cDNA
SDA	"Strand Displacement Amplification"
SDI	"Serological Differentiation Index"
SSCP	"Single Stranded Conformation Polymorphism"
Taq Pol	DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
UAL	Universidade do Algarve
UPGMA	"Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Average"
VPg	"Virus protein, genome linked"

Acrónimos, nomes de vírus e grupos.

AILV	Artichoke Italian Latent Nepovirus
AMV	Alfafa Mosaic Virus (grupo AMV)
ArMV	Arabis Mosaic Nepovirus
BLMV	Blueberry Leaf Mottle Nepovirus
BWYV	Beet Western Yellows Luteovirus
BYMV	Bean Yellow Mosaic Potyvirus
BYV	Beet Yellows Closterovirus
CaMV	Cauliflower Mosaic Caulimovirus
CarMV	Carnation Mottle Carmovirus
CCMV	Cowpea Chlorotic Mottle Bromovirus
CLRv	Cherry Leaf Roll Nepovirus
CMV	Cucumber Mosaic Cucumovirus
CTV	Citrus Tristeza Virus
FDV	Fiji Disease Fijivirus
GBLV	Grapevine Bulgarian Latent Nepovirus
GCMV	Grapevine Chrome Mosaic Nepovirus
GFLV	Grapevine Fanleaf Virus
GLRaV III	Grapevine Leafroll associated Closterovirus III
GTRV	Grapevine Tunisian Ringspot Nepovirus
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus 1
MRDV	Maize Rough Dwarf Fijivirus
MSV	Maize Streak Geminivirus I
PLRV	Potato Leaf Roll Luteovirus
PMMV	Pepper Mild Mottle Tobamovirus
PPV	Plum Pox Potyvirus
PRMV	Peach Rosette Mosaic Nepovirus
PSbMV	Pea Seed-borne Mosaic Potyvirus
PVX	Potato X Potexvirus
RRV	Raspberry Ringspot Nepovirus
SbDV	Soybean Dwarf Luteovirus
SBMV	Southern Bean Mosaic Sobemovirus
SLRV	Strawberry Latent Ringspot Nepovirus
SoMV	Sowbane Mosaic Sobemovirus
TBRV	Tomato Black Ring Nepovirus
TBSV	Tomato Bushy Stunt Tombusvirus
TMGMV	Tobacco Mild Green Mosaic Tobamovirus
TMV	Tobacco Mosaic Tobamovirus
ToRSV	Tomato Ringspot Nepovirus
TRSV	Tobacco Ringspot Nepovirus
TRV	Tobacco Rattle Tobavirus
TSWV	Tomato Spotted Wilt Tospovirus
TYMV	Turnip Yellow Mosaic Tymovirus
ZYMV	Zucchini Yellow Mosaic Potyvirus

Índice

Introdução e Objectivos

1. A Importância e os Principais Meios de Diagnóstico em Virologia Vegetal.	1
2. A Importância da Tipificação no Diagnóstico e na Epidemiologia Virais.	3
3. Estado actual dos conhecimentos sobre os principais modelos virais utilizados.	4
3.1. O vírus do Urticado da videira, ("Grapevine Fanleaf Virus", GFLV).....	5
3.2 O vírus da Tristeza dos citrinos ("Citrus Tristeza Virus", CTV).....	9
4. Objectivos	13

Capítulo 1. A Pesquisa do RNA Bicatenário Aplicada ao Diagnóstico Viral.

1. Introdução	15
2. Materiais e métodos	
2.1- Materiais	
2.1.1. Patogéneos virais.....	19
2.1.2. Soluções tampão.....	19
2.2. Métodos	
2.2.1. Extração de ácidos nucleicos totais.	20
2.2.2. Purificação e Concentração do ds-RNA.....	21
2.2.3. Tratamentos enzimáticos da preparação de ds-RNA	22
2.2.4 Fracionamento electroforético do ds-RNA e registo dos perfis	23
3. Resultados	
3.1. Estudo e adaptação da metodologia de pesquisa e análise de RNA bicatenário em sistemas experimentais.....	24
3.2. Resultados obtidos com vírus e hospedeiros de origem diversa.....	29
3.3. Variação do perfil electroforético entre isolamentos de um vírus	31
3.4. RNA bicatenário associado a doenças de etiologia presumivelmente viral. Caso do Mosaico da Figueira.....	31
4. Discussão	33

Capítulo 2. Diagnóstico de Vírus e Patogéneos Sub-Virais com Base na Amplificação de Ácidos Nucleicos *in vitro*

1. Introdução	
1.1. Técnicas de Amplificação de Ácidos Nucleicos <i>in vitro</i>	37
1.1.1. "Self sustained sequence replication", 3SR.....	38
1.1.2. "Polymerase Chain Reaction", PCR.....	39
1.2. Aplicação ao Diagnóstico Viral	42
1.2.1. "Self sustained sequence replication", 3SR.....	42
1.2.2. "Polymerase Chain Reaction", PCR.....	43
2. Materiais e métodos	
2.1. Materiais	
2.1.1 Patogéneos virais e sub-virais.	47
2.1.2 Imunoreagentes	47
2.1.3 Clone de cDNA do gene da proteína do capsídeo do GFLV.	48
2.1.4 Soluções e Tampões.	48

2.1.5 Enzimas e alguns outros produtos empregues em técnicas de biologia molecular.....	49
2.1.6. Equipamento de uso específico.....	50
2.2. Métodos	
2.2.1. Fraccionamento da fracção IgG de antisoros para GFLV	50
2.2.2. Marcação enzimática de anticorpos	50
2.2.3. Técnica imunoenzimática ELISA-DAS.....	50
2.2.4. Extracção de ácidos nucleicos de tecidos foleares de videira.....	51
2.2.5. Transcrição reversa com nucleótidos marcados com ³² P.....	51
2.2.6. Análise das sequências nucleotídicas.....	52
2.2.7. Amplificação do genoma viral por PCR.....	52
2.2.8. Ensaio efectuado com vista a esclarecer o processo de libertação do RNA viral.	56
2.2.9. Marcação de sondas de DNA com Digoxigenina.....	58
2.2.10. Hibridação com sondas para GFLV e GFLV sat RNA.....	59
Anexo 2.1. Protocolo de IC/RT-PCR.....	60
3. Resultados	
3.1. Desenvolvimento de um Método de Detecção de GFLV em Videira.....	61
3.1.1. Avaliação da eficiência dos iniciadores e optimização da concentração de mágnesio.....	61
3.1.2. Transcrição reversa e amplificação a partir de preparações de ácidos nucleicos totais extraídos de folhas de videira	62
3.1.3. Emprego de anticorpos para efectuar uma prévia purificação de GFLV: "Immunocapture Reverse Transcriptional Polymerase Chain Reaction" (IC-RT/PCR).....	62
3.1.4. Optimização das condições de transcrição reversa e amplificação.....	65
3.1.5. Influência de alguns factores no processo de imunocaptura de GFLV	66
3.1.6. Ensaio efectuado com vista a compreender o processo de libertação do RNA viral.	70
3.2. Generalização da Metodologia IC/RT-PCR a outros Vírus e Patogéneos Sub-virais.	71
3.3. Outras Variantes do Método de Enriquecimento Selectivo de Vírus.....	73
3.3.1. Imunocaptura com anticorpos específicos para RNA bicatenário.....	73
3.3.2. Captura sem anticorpos.....	74
3.3.3. IC/RT-PCR em alvéolos em que foi realizado o teste ELISA.....	74
3.4. Quantificação Fluorimétrica do DNA Amplificado como Alternativa ao Fraccionamento Electroforético.	75
3.5. Fiabilidade da Técnica IC/RT-PCR Relativamente à Técnica ELISA.....	75
3.5.1. Ensaio com GFLV.....	75
3.5.2. Ensaio com CTV.....	78
3.6. Detecção do RNA Satélite de GFLV.....	80
Anexo 3.1. Origem dos isolamentos de GFLV e resultados comparativos do diagnóstico por IC/RT-PCR e ELISA.....	82
Anexo 3.2. Origem dos isolamentos de CTV e resultados comparativos do diagnóstico por IC/RT-PCR e ELISA.....	85

4. Discussão	
4.1. Características do diagnóstico de patógenos virais e sub-virais por IC/RT-PCR	93
4.2. Processo de libertação do RNA viral.....	95
4.3. Uso de IC/RT-PCR na elucidação de relações serológicas distantes.	98
4.4. Rastreamento de patógenos virais e sub-virais por IC/RT-PCR	98
Capítulo 3 Tipificação Genómica de Vírus com Base na Amplificação de Ácidos Nucleicos <i>in vitro</i>	
1. Introdução	
1.1 A estrutura de "quasi-espécie" e a tipificação genómica.....	103
1.2 Métodos de tipificação.....	104
1.2.1 Análise do polimorfismo de locais de restrição ("Restriction Site Polimorphisms", RSP)	104
1.2.2 Análise de polimorfismos conformacionais monocatenários ("Single Stranded Conformation Polimorphisms", SSCP).....	105
1.2.3 Síntese aleatória de cDNA (SAcDNA).....	106
2. Materiais e Métodos	
2.1. Materiais.....	109
2.2 Métodos	
2.2.1 Amplificação específica por IC/RT-PCR.....	109
2.2.2 Análise de Polimorfismos de Locais de Restrição (RSP)	110
2.2.3 Análise de Polimorfismos Conformacionais Monocatenários (SSCP).....	110
2.2.4 Tipificação molecular por Síntese Aleatória de cDNA (SAcDNA).....	111
2.2.5 Estimativa do distanciamento genético.....	111
3-Resultados	
3.1 Tipificação Genómica de GFLV	
3.1.1 Polimorfismos conformacionais monocatenários (SSCP)	108
3.1.2. Síntese Aleatória de cDNA (SAcDNA).....	110
3.1.3 Polimorfismos de locais de restrição (RSP).....	115
3.1.4 Estudo quantitativo da variabilidade genómica do GFLV	121
3.2 Tipificação Genómica do CTV	
3.2.1 Polimorfismos conformacionais monocatenários (SSCP).....	128
3.2.2 Síntese Aleatória de cDNA.....	129
3.2.3 Polimorfismos de locais de restrição(RSP).....	131
3.2.4 Estudo quantitativo da variabilidade genómica do CTV.....	137
4. Discussão	
4.1 Métodos de Tipificação Genómica.....	160
4.2 Variabilidade Comparativa de GFLV, CTV e outros Vírus.....	155
4.2.1 Variabilidade genómica do GFLV	156
4.2.2 Epidemiologia Molecular de GFLV.....	156
4.2.3 Variabilidade genómica e epidemiologia molecular do CTV	158
Conclusões Gerais	163
Bibliografia	167

1. A Importância e os Principais Meios de Diagnóstico em Virologia Vegetal.

Na ausência de meios de luta curativos, o controle das doenças causadas por vírus nas plantas baseia-se na aplicação integrada de medidas de diversa ordem, de que sobressaiem as que permitem minimizar as fontes de inóculo e que assentam no diagnóstico precoce. São porém raros os casos em que no campo é possível resumir o diagnóstico à observação da sintomatologia. Neste contexto, os métodos de diagnóstico capazes de serem empregues em condições de rotina pelas pessoas ou organismos estreitamente relacionados com a produção agrícola têm um papel de primordial importância em virologia vegetal.

A avaliação comparativa do mérito das várias técnicas de diagnóstico prende-se, segundo Matthews (1991), com seis pontos: sensibilidade, reproducibilidade, quantidade de amostras processáveis por unidade de tempo e operador, custo, grau de treino do operador e possibilidade de adaptação a condições de campo.

A técnica imunológica ELISA, "Enzyme Linked Immunosorbent Assay", cujas possibilidades de utilização em virologia vegetal foram realçadas por Clark e Adams (1977), difundiu-se rapidamente e preencheu a lacuna da inexistência até então de uma técnica de diagnóstico capaz de preencher pelo menos os cinco primeiros parâmetros apontados. Na modalidade de "Double Antibody Sandwich", ou em alguma outra das variantes (Koenig e Paul, 1982), é actualmente a técnica de diagnóstico mais utilizada em virologia vegetal. As principais limitações são a impossibilidade de detecção de viróides e RNA satélites, de vírus para os quais não haja anticorpos disponíveis, ou aplicações particulares que requeiram uma muito elevada sensibilidade.

Outras técnicas baseiam o diagnóstico na detecção do genoma viral. Estão neste caso as técnicas de hibridação em membrana que começaram a ser utilizadas em virologia vegetal no caso dos viróides (Owens e Diener, 1981), precisamente para superar a inexistência de um método expedito de diagnóstico, tendo pouco tempo depois começado a ser empregues na detecção de RNA satélites e vírus (Rosner *et al.*, 1983a). Baseiam-se na fixação do genoma viral a um suporte sólido (membrana de nitrocelulose

ou de Nylon), que é em seguida testado por meio de um segmento de ácido nucleico (sonda) complementar do genoma viral, com o qual se une (hibridação). Na maior parte dos casos a sonda é obtida de cDNA clonado, a partir do genoma viral. A hibridação é detectada através da prévia marcação da sonda. A marcação radioactiva por ^{32}P é o método que geralmente permite maior sensibilidade, várias dezenas de vezes superior à do ELISA em diversos casos analisados (De Blas, 1992), mas o seu uso é bastante problemático, em condições de rotina, em unidades de diagnóstico não vocacionadas para a investigação. Para ultrapassar estes problemas, surgiram diversos métodos de marcação bioquímica em que a presença do marcador é indirectamente revelada através de um conjugado enzimático; estes métodos, que podem em condições ideais originar uma sensibilidade semelhante à marcação radioactiva, ficam na prática bastante aquém, devido à interferência de componentes da planta nas reacções de detecção enzimática (Hull e Al-Hakim, 1988). Esta interferência pode afectar também directamente a hibridação, originando reacções inespecíficas com plantas sãs, como no caso da detecção do TSWV em tomateiro (Ronco *et al.*, 1989), ou originar uma sensibilidade inferior à do ELISA na detecção do CMV em plantas de tabaco (De Blas, 1992). Para eliminar estes inconvenientes, e poder explorar a sensibilidade potencial destas técnicas, torna-se então necessário partir de uma preparação mais ou menos purificada de ácidos nucleicos, o que envolve protocolos bastante complicados em certas plantas ricas em polisacáridos ou em compostos fenólicos, como por exemplo na videira (Fuchs *et al.*, 1991a). As possibilidades do método de hibridação em membrana vir a substituir com vantagem o diagnóstico pela técnica ELISA são assim limitadas.

A pesquisa do RNA bicatenário (Morris e Dodds, 1979) é outro método de diagnóstico que visa a detecção do genoma viral e baseia-se na detecção de moléculas de RNA associadas ao processo de replicação viral. Em comparação com as técnicas anteriores, este método é menos sensível; o seu interesse reside em dispensar o recurso a reagentes específicos para os agentes a detectar e na possibilidade de distinção entre isolamentos de alguns vírus. Esta técnica é tratada em pormenor no Cap. 1, empregando-se como modelo diversos vírus e hospedeiros.

Recentemente desenvolveram-se diversas técnicas que possibilitam a multiplicação de ácidos nucleicos *in vitro* e que têm vindo a revolucionar praticamente todos os campos em que intervem a Biologia Molecular. O traço comum a estas técnicas é terem uma sensibilidade potencial bastante mais elevada que as técnicas ELISA ou de hibridação em membrana. No entanto, dada a sua recente introdução, a aplicabilidade em condições de rotina é ainda limitada por protocolos complicados, principalmente na preparação das amostras. O estudo destas questões será objecto do Cap. 2, em que se procuram ultrapassar essas limitações.

2. A Importância da Tipificação no Diagnóstico e na Epidemiologia Virais.

Há muito que se reconhece que um mesmo vírus se pode manifestar por efeitos biológicos distintos, que, de um ponto de vista prático, podem ser mais ou menos graves. Para além dos factores hospedeiro e ambiental, parte desta variabilidade é intrínseca ao vírus, que pode existir sob diversos tipos ou estirpes. Do ponto de vista prático é extremamente importante saber atempadamente, não só que uma cultura está infectada com um vírus, mas também poder identificar a estirpe, e assim, melhor prever a evolução da doença e decidir sobre os meios de luta a tomar. Um exemplo desta importância pode-se retirar da citricultura (Zaragoza, 1986): em Espanha, a ocorrência do CTV é endémica em muitas regiões, mas a reconversão dos pomares passando a empregar variedades e porta enxertos tolerantes às estirpes existentes na região Mediterrânica tem permitido manter os prejuízos a um nível mínimo. Recentemente, uma importação clandestina de material de propagação vegetativa exótico introduziu uma estirpe de vírus relativamente à qual os pomares não são tolerantes (Ballester-Olmos *et al.*, 1988). Para detectar esta estirpe com vista à sua erradicação é então necessário distingui-la das outras normalmente presentes nos pomares, o que tem sido feito recorrendo à análise de perfis electroforéticos de preparações de RNA bicatenário (Moreno *et al.*, 1990).

O diagnóstico viral requer então meios complementares que permitam efectuar a tipificação, isto é, distinguir entre os diversos tipos do mesmo vírus. No entanto, até há pouco tempo, os métodos de tipificação disponíveis eram biológicos, com os graves inconvenientes da morosidade e do espaço de estufa necessário à sua realização. O método ELISA, efectuado na versão "Double Antibody Sandwich", pode revelar-se bastante específico para algumas estirpes (Clark, 1981), especificidade que também pode ser obtida com anticorpos monoclonais. Mas tirando casos pontuais, a tipificação de um isolamento por ELISA implica a utilização de uma bateria de anticorpos de diferentes especificidades (ver por exemplo o trabalho de Huss *et al.* (1987)) e tem estado limitada à análise de proteínas estruturais. A hibridação em membrana com sondas de cDNA permitiu a distinção entre isolamentos de CaMV que diferiam, por deleção, numa extensão significativa do genoma (Hull e Al-Hakim, 1988). Mas na maior parte dos casos as diferenças são pontuais, dispersas pelo genoma (Matthews, 1991), e esta técnica não se tem revelado suficientemente discriminatória como atestam os exemplos do CTV (Rosner e Bar-Joseph, 1984) e GFLV (Fuchs *et al.*, 1991a) referidos adiante. Até há pouco tempo tem sido principalmente a análise de RNA bicatenário, discutida em pormenor no Cap. 1, que mais tem sido, de modo sistemático, empregue na tipificação de isolamentos de alguns vírus. Mais recentemente, com a aplicação dos métodos de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* ao diagnóstico viral, abre-se também a

possibilidade de vir a empregar o produto amplificado para tipificar o genoma viral. Como se verá no Cap. 3, esta abordagem conduz a métodos bastante expeditos e eficientes de tipificação genómica.

Embora as interacções entre o vírus, hospedeiro e vectores sejam extremamente complexas, certos aspectos, com grandes consequências económicas, têm-se relacionado em alguns casos, com variações genómicas pontuais, conduzindo a marcadores genéticos altamente informativos e com grande utilidade prática. Por exemplo, uma mutação de U para C em determinada posição do gene da proteína de movimento do TYMV, origina uma variante com maior capacidade invasiva do hospedeiro, resultando em acrescida severidade (Tsai e Dreher, 1993). Com maior frequência, a atenção tem recaído antes sobre o gene da proteína do capsídeo: alterações de um ou dois aminoácidos têm-se relacionado com variações de transmissibilidade por afídeos no caso do ZYMV (Gal-On *et al.*, 1992) ou do CTV (Mawassi *et al.*, 1993). No caso do PVX foi demonstrado que a capacidade de não desencadear a reacção de hipersensibilidade em batateiras contendo os genes de resistência Nx ou Nb se relacionava com o gene da proteína do capsídeo (Kavanagh *et al.*, 1992). Também com o CMV (Rizos *et al.*, 1992), PPV (Bousalem *et al.*, 1994), e CTV (Pappu *et al.*, 1993a) (embora este último caso seja ainda discutível) se têm encontrado marcadores genéticos com grande significado biológico no gene da proteína do capsídeo. O aproveitamento deste tipo de marcadores poderá conferir à tipificação genómica a possibilidade adicional de predizer algumas propriedades de isolamentos desconhecidos

Dispondo de meios eficientes de tipificação pode-se, para além do aspecto prático e imediato que é a identificação de determinadas estirpes potencialmente mais destrutivas, abordar a um nível teórico aspectos diversos do âmbito epidemiológico, de interacção com o hospedeiro e evolucionário, que contribuem para o melhor delineamento da estratégia de controlo da doença. Alguns destes aspectos são também abordados no Cap.3, pela primeira vez para o GFLV e CTV.

3. Estado Actual dos Conhecimentos sobre os Modelos Virais Utilizados.

Escolheram-se como principais modelos de aplicação da metodologia desenvolvida neste trabalho, dois vírus muito distintos causadores de doenças de grande importância económica: o vírus do Urticado da videira, ("Grapevine Fanleaf Vírus", GFLV) e o vírus da Tristeza dos citrinos ("Citrus Tristeza Vírus", CTV).

3.1. O vírus do Urticado da videira, ("Grapevine Fanleaf Vírus", GFLV)

O GFLV pertence ao grupo dos Nepovírus, cujo membro típico é o Tobacco Ringspot Vírus (TRSV). Estes vírus possuem partículas poliédricas com cerca de 30 nm de diâmetro e genoma de RNA com dois componentes (designados por RNA 1 e RNA 2) com actividade mensageira. Vários destes vírus têm associados RNA satélites. São transmitidos em condições naturais por nemátodos *Xiphinema* spp. e *Longidorus* spp..

Na Europa e Região Mediterrânica a cultura da vinha pode se afectada para além do GFLV, por outros Nepovírus: ArMV, TBRV, RRV, SLRV, GCMV, AILV, GBLV e GTRV; no continente Americano encontram-se antes o ToRSV, TRSV, PRMV e BLMV (Bovey e Martelli, 1992).

3.1.1 Aspectos gerais da doença causada pelo GFLV

O GFLV causa, em praticamente todas as zonas vitícolas, entre as quais Portugal, o mais grave problema sanitário de natureza viral desta cultura (Bovey e Martelli, 1992). Os prejuízos tanto podem ser resultantes da quebra de produção, que pode atingir os 75% devido a um enfraquecimento progressivo da planta, como da desvalorização dos cachos no caso da uva de mesa (De Sequeira, 1983).

O GFLV origina sintomatologia bastante variável na videira, o que se traduz nos diversos nomes por que a doença é conhecida, pelo menos em Portugal: Urticado, Nó Curto, Clorose Infecciosa, Mosaico deformante, Fasciação, Vassoura de Bruxa, (Dias, 1963). Em condições naturais a sintomatologia assemelha-se à causada por outros Nepovírus (Bovey e Martelli, 1992). Estão tipificados três síndromas em videira (Hewitt *et al.*, 1970): 1) Urticado, Nó curto ou "Fanleaf", 2) Clorose infecciosa ou "Yellow Mosaic" e 3) "Vein Banding" que se podem manifestar isoladamente ou misturados (Hewitt *et al.*, 1970), neste caso totalmente misturados ou segregados em diversas partes da planta (Fresno, 1992). Em alguns casos são atribuídas ainda ao GFLV enações nas nervuras (Hewitt *et al.*, 1970). É também reconhecida a existência de variações no grau de severidade dos isolamentos (Huss *et al.*, 1989; Legin *et al.*, 1993).

Em condições naturais o único hospedeiro conhecido é *Vitis* spp. (Martelli, 1986), incluindo a maior parte das variedades de *V. vinifera* L. e diversos porta enxertos americanos (Bovey e Martelli, 1992). A nível local, a transmissão pode ocorrer através do solo pelo nemátodo vector *Xiphinema index* Thorne e Allen, tanto no continente Americano (Hewitt *et al.*, 1958) como no Europeu (De Sequeira, e Dias, 1964). A velocidade de disseminação é da ordem de 1,5 m por ano (Martelli, 1986). É entre os

primeiros 30 cm a 60 cm de solo que a quantidade de nemátodos que adquire o vírus é maior, sendo também a esta profundidade que o título do vírus nas raízes é mais elevado (Silva *et al.*, 1989). A longas distancias, o principal modo de transmissão é através do material de propagação vegetativa. O vírus é transmissível mecânicamente a uma série de hospedeiros experimentais bem como através das sementes destes (Dias, 1963). Em videira, a transmissão seminal é discutível (Bovey e Martelli, 1992), embora o vírus seja detectado por ELISA nas sementes (Fresno, 1992).

O diagnóstico da virose é habitualmente feito pela técnica ELISA já há bastante tempo (Bovey *et al.*, 1980; Jimenez e Goheen, 1980; Tanne, 1980; Vuittenez, 1980) e também em Portugal (Nolasco, 1982). No campo, o vírus é facilmente detectável pela técnica ELISA no início do ciclo vegetativo, mas com o Verão, a concentração viral baixa demasiado e torna-se difícil a detecção. Para melhorar o limite de detecção Fuchs *et al.* (1991a) desenvolveram a hibridação em membrana com sondas radioactivas, mas comparativamente ao ELISA apenas conseguiram melhorar a sensibilidade em cerca de 10 vezes quando a detecção era feita em tecidos de um hospedeiro herbáceo experimental, *Chenopodium quinoa*. Os próprios autores concluíram que o método não seria adequado para o diagnóstico de rotina a partir de videira, devido ao complicado processo de extracção de ácidos nucleicos a que era necessário recorrer.

O principal meio de controlo da doença é a utilização de material de propagação vegetativa certificado, isento de vírus. O combate ao vector por fumigação do solo tem eficácia reduzida e efeitos ecológicos bastante negativos, pelo que é proibido nalguns países. Mesmo depois de a vinha ser arrancada o vector mantém-se no solo, infeccioso, alimentando-se das raízes que permanecem, e compromete por vários anos a viabilidade de novas replantações. Estudos efectuados em Portugal (Silva *et al.*, 1989; Bravo e De Sequeira, 1991), mostraram que isto pode ser evitado matando a vinha por meio de aplicação de herbicidas antes do arranque.

A protecção cruzada, fenómeno pelo qual uma estirpe atenuada do vírus confere protecção contra a posterior infecção por outras estirpes eventualmente mais agressivas, foi estudada em *C. quinoa* (Huss *et al.*, 1989) e posteriormente em videira (Legin *et al.*, 1993), tendo sido seleccionadas estirpes de ArMV e GFLV com alguma capacidade protectora. Os ensaios em vinhas viróticas altamente infestadas pelo vector não permitiram ainda tirar conclusões definitivas mas parecem indicar a possibilidade de atrasar a reinfecção; uma das dificuldades destes estudos tem sido a impossibilidade de distinguir serológicamente os isolamentos de GFLV (Walter *et al.*, 1993). A possibilidade de obter protecção pela expressão do gene da proteína do capsídeo em

plantas transgênicas está ainda em estudo em *Nicotiana* spp. transformadas (Spielman *et al.*, 1993; Steinkellner *et al.*, 1993).

3.1.2 Constituição das partículas virais, organização e expressão do genoma,

Os viriões têm cerca de 30 nm e são constituídos por um único tipo de proteína com Mr aproximadamente 54 K (Quacquarelli *et al.*, 1976). Em preparações purificadas encontram-se três tipos de partículas virais designadas por T (Top), M (Middle) e B (Bottom) com distintos coeficientes de sedimentação, respectivamente 50, 86 e 120 S; as partículas T são desprovidas de genoma, as M contêm apenas o RNA 2 e não são infecciosas e as partículas B são infecciosas e contêm o RNA 1 e RNA 2 (Quacquarelli *et al.*, 1976). Em alguns isolamentos (ex. estirpe F13N) é adicionalmente encapsidado em partículas idênticas às restantes um terceiro RNA com características de satélite (Pinck *et al.*, 1988).

As sequências dos RNA 1 (7342 nt), RNA 2 (3774 nt) e RNA satélite (1114 nt) apenas são conhecidas na totalidade para a estirpe F13 (Fuchs *et al.*, 1989; Serghini *et al.*, 1990; Ritzenthaler *et al.*, 1991). Os três RNAs têm na extremidade 5' uma VPg e um troço poli-A na extremidade 3' (Pinck *et al.*, 1988). As regiões não codificantes 5' e 3' terminais dos RNA 1 e RNA 2 apresentam grande homologia nucleotídica (Ritzenthaler *et al.*, 1991). Pelo contrário, o RNA satélite apenas tem em comum com os outros RNAs um pequeno troço de cerca de 10 nt na região 5' terminal (Ritzenthaler *et al.*, 1991), que é essencial para a sua replicação (Hans *et al.*, 1993).

Tal como para os restantes nepovírus, (Matthews, 1991) a expressão do genoma faz-se mediante a tradução de cada RNA genómico numa poliproteína que é em seguida cortada em proteínas funcionais por uma protease. O RNA 1 apresenta um único ORF entre os nucleótidos 243-7101, codificando uma proteína de Mr 253 K que por proteólise origina a partir da extremidade N terminal, o cofactor da protease, a proteína de ligação a nucleótidos tri-fosfatados ("NTP binding protein"), a VPg (Mr 2.9 K), a protease (Mr 25 K) e a RNA polimerase (Mr 92 K), (Ritzenthaler *et al.*, 1991). O RNA 2 apresenta um ORF entre os nt 232-3562 codificando uma poliproteína de Mr 122 K, que engloba a presumível proteína de movimento e a proteína do capsídeo. O RNA satélite apresenta também um único ORF entre os nt 15-1037 correspondente a uma proteína de Mr 37 K (Fuchs *et al.*, 1989), detectável *in vivo* (Moser *et al.*, 1992).

3.1.3 Variabilidade Serológica e genómica

Serològicamente o GFLV é considerado um vírus com grande uniformidade. Dias e Harrison (1963) mostraram com anticorpos policlonais que as diferenças de SDI entre diversos isolamentos nunca iam além de um, e que, em testes de imunodifusão não havia a formação de esporão ("spur") no entrecruzamento das linhas de precipitação homólogas e heterólogas. Tem sido geralmente aceite que as estirpes de GFLV têm em comum a maioria dos determinantes antigénicos e que estão todas serològicamente relacionadas com o ArMV (Dias e Harrison, 1963; Hewitt *et al.*, 1970). Contudo, foi referida uma variante serológica (considerada GFLV) que originava a formação de esporão em testes de imunodifusão tanto com ArMV como com outro isolamento de GFLV (Savino *et al.*, 1985).

Com o emprego de anticorpos monoclonais, Huss *et al.* (1987) puderam evidenciar claramente a existência de variantes serológicas. Mesmo assim, com um painel de 8 anticorpos monoclonais, apenas conseguiram distinguir 6 padrões diferentes de reacção entre 36 isolamentos do vírus. Por outro lado, embora tal não tivesse sido concluído por aqueles autores, o padrão de reacção mais frequente, que se verificou com dois terços dos isolamentos testados, era a reacção com todos os 8 anticorpos, o que está de acordo com a pequena variabilidade serológica já referida anteriormente.

A variabilidade genómica do GFLV está ainda pouco estudada. Para além da estirpe F13, parte da sequência do RNA 2 correspondente ao gene da proteína do capsídeo é também conhecida para um isolamento de Davis (Sanchez *et al.*, 1991), e para outro oriundo da Suíça (sequencia não publicada), havendo uma homologia de 90 % entre os três isolamentos (Spielman *et al.*, 1993).

Fuchs *et al.* (1991a) efectuaram a comparação de diversos isolamentos de GFLV e ArMV por meio de hibridação com sondas de cDNA obtidas da estirpe F13, específicas para os RNA genómicos 1 e 2. Estas sondas tiveram um comportamento idêntico e não permitiram distinguir entre a maioria dos isolamentos, pois hibridaram com 9/10 dos isolamentos de GFLV e 7/8 dos isolamentos ArMV, embora se observasse alguma variação na intensidade do sinal.

À semelhança do que se tem verificado para outros vírus, foi sugerido que a presença do RNA satélite poderia ter um efeito modelador na sintomatologia do GFLV (Fuchs *et al.*, 1991b). Tentativas de detecção do satélite por meio de sondas obtidas da estirpe F13 mostraram a sua presença em apenas 2/10 (Fuchs *et al.*, 1991a) ou 5/34 (=15%) (Saldarelli *et al.*, 1993) dos isolamentos testados, mas não foi possível associar a

presença do satélite a variações sintomatológicas (Fuchs *et al.*, 1991a; Saldarelli *et al.*, 1993).

3.2 O vírus da Tristeza dos citrinos ("Citrus Tristeza Vírus", CTV)

O CTV é um membro do grupo Closterovírus. As fronteiras deste grupo com o grupo Capillovírus não estão ainda bem definidas pela falta de suficientes conhecimentos para além dos morfológicos (Coffin e Coutts, 1993). Os Closterovírus têm partículas virais com comprimentos entre 600 nm e 2000 nm, com diâmetro de 12 nm e são extremamente flexuosas. O genoma é constituído por uma única cadeia de RNA, monocatenário, com actividade mensageira. São geralmente limitados aos tecidos do floema e transmissíveis por afídeos.

Podem encontrar-se revisões sobre o CTV em Nolasco (1988) e Bar-Joseph *et al.* (1989).

3.2.1 Aspectos gerais da Tristeza dos Citrinos.

A Tristeza (*Sensu lato*, englobando vários síndromas) é considerada a mais grave doença de natureza viral dos citrinos. Quer em condições epidémicas quer endémicas, estima-se que nos últimos sessenta anos o número de árvores que ficaram inutilizadas para a produção tenha ultrapassado os 50 milhões (Bar-Joseph *et al.*, 1989), metade dos quais durante um período de dez anos na América Latina (Bar-Joseph *et al.*, 1980). A estes prejuízos directos há que somar outros resultantes da necessidade de reconverter variedades e porta-enxertos tradicionalmente empregues em certas zonas cítricas. O CTV está presente em todas as importantes regiões cítricas do mundo, estando largamente disseminada em Espanha. Em Portugal, no Algarve, o vírus tem sido detectado, e erradicado, esporadicamente em pomares estabelecidos a partir de material importado clandestinamente de Espanha. No entanto, o rastreio feito com carácter sistemático apenas abrangeu uma área muito limitada (Faustino, 1989), pelo que não é garantida a inexistência de focos isolados.

A doença causada pelo CTV pode apresentar-se sob três síndromas, Tristeza *sensu stricto*, "Stem-Pitting" e "Seedling Yellows", cuja particular manifestação depende da estirpe do vírus, do hospedeiro e das condições ambientais. Existem numerosas variantes do vírus que a nível biológico diferem qualitativa e quantitativamente, tanto nos sintomas que causam como na transmissibilidade por vectores. Um estudo bastante completo sobre a diversidade biológica dos isolamentos espanhóis de CTV foi efectuado por

Ballesterolmos *et al.* (1993). Para a comparação das variantes do vírus Garnsey *et al.* (1987) propuseram um sistema de caracterização biológica baseado na avaliação das reacções em 5 espécies de plantas indicadoras que permite o cálculo de um coeficiente, que quantifica a severidade dos três síndromas. O uso deste sistema tem tido aceitação em vários laboratórios.

A grande maioria senão a totalidade dos citrinos, e algumas outras Rutáceas não cítricas, pode ser infectada pelo CTV. Fora das Rutáceas apenas se conhece como hospedeiro *Passiflora gracilis*. Não há portanto hospedeiro experimental herbáceo, facto que, conjuntamente com a dificuldade de transmissão mecânica, por ser um vírus restrito ao floema, tem dificultado a aquisição de conhecimentos bioquímicos sobre o CTV. Em condições naturais o principal meio de transmissão a longas distancias é através do material de propagação vegetativo (Bar-Joseph *et al.*, 1989). Regionalmente a transmissão pode também ser feita de modo semi-persistente através de diversas espécies de afideos (Bar-Joseph *et al.*, 1980). *Toxoptera citricida* Kirk. é o vector com maior eficiência de transmissão mas não existe na região Mediterrânica, onde a vecção é assegurada principalmente por *Aphis gossypii* Glover. Não há evidência de transmissão do vírus através de semente.

O diagnóstico em larga escala do CTV é já há bastante tempo feito pela técnica ELISA, com anticorpos policlonais (Bar-Joseph *et al.*, 1979; Cambra *et al.*, 1979) ou monoclonais de largo espectro (Vela *et al.*, 1986). Porém, alguns casos de falsos-negativos ocorridos num programa de erradicação em Israel chamaram a atenção para o facto de esta técnica poder não ser tão fiável quanto se supunha (Ben-Ze'Ev *et al.*, 1989). O diagnóstico em plantas mãe de material de propagação vegetativa continua a ser feito frequentemente por indexagem biológica em Limeira Mexicana (*Citrus aurantifolia*).

As possíveis medidas de controlo relacionam-se com as estirpes de vírus presentes e com características regionais da citricultura. Na região Mediterrânica, há globalmente uma baixa taxa de infecção, as estirpes do vírus presentes não provocam danos em variedades enxertadas sobre os porta-enxertos chamados "tolerantes" e grande parte dos pomares estão enxertados em Larangeira Azeda (*Citrus aurantium*), combinação que é muito sensível à infecção. Nestas condições, o controlo passa pela progressiva substituição dos porta enxertos acompanhada de rastreios sistemáticos, esforços de erradicação nas zonas de mais baixa taxa de infecção e medidas de quarentena que evitem a introdução de estirpes exóticas. Uma situação oposta pode-se encontrar na América Latina. Aí, a presença do vírus é endémica e existem estirpes capazes de afectar directamente a variedade enxertada, independentemente do tipo de porta-enxertos. Nestas

condições a medida que se tem mostrado mais eficaz tem sido a protecção cruzada através de estirpes atenuadas, como no caso do Brasil (Costa e Muller, 1980).

3.2.2 Constituição das partículas virais, organização e expressão do genoma,

As partículas virais do CTV, com um diâmetro de 11 nm e comprimento de 2000 nm (Bar-Joseph *et al.*, 1980), são das mais compridas que se conhecem entre os vírus de plantas. O capsídeo é constituído apenas por uma proteína com Mr cerca de 25 K (Bar-Joseph *et al.*, 1972) o que foi confirmado por sequenciação do respectivo gene (Sekiya *et al.*, 1991). Em preparações semi-purificadas foi detectada ainda uma segunda proteína com menor Mr, que foi interpretada como produto de degradação da proteína do capsídeo (Lee *et al.*, 1984; Guerri *et al.*, 1990).

O genoma do CTV é estimado em cerca de 20 Kb (Bar-joseph e Lee, 1989) e não foi ainda sequenciado na totalidade. É o maior genoma de RNA monocatenário com actividade mensageira entre os vírus de plantas (Bar-joseph e Lee, 1989), que na sua grande maioria não ultrapassam os 10 Kb (Matthews, 1991). Até há pouco tempo, apenas se conhecia a sequência do gene da proteína do capsídeo (Sekiya *et al.*, 1991), mas muito recentemente foi sequenciado um pouco mais de um terço do genoma junto à extremidade 3' terminal, revelando oito ORFs, entre as quais a correspondente à proteína do capsídeo (Pappu *et al.*, 1994). Diversos aspectos peculiares da organização genómica puderam ser observados (Pappu *et al.*, 1994): começando pela extremidade 5' terminal, as duas primeiras ORF correspondem a proteínas com Mr cerca de 65 K e 61 K, relacionadas com proteínas de choque térmico ("heat shock proteins", =hsp) de origem celular, estando possivelmente a proteína de 65 K envolvida no transporte intercelular do vírus; as duas ORF seguintes correspondem a proteínas de Mr 27K e 25 K (proteína do capsídeo) e surpreendentemente estão relacionadas entre si; as funções correspondentes às 4 restantes ORF não estão esclarecidas; finalmente, a região não codificante 3' terminal de 277 nt não está relacionada com as de outros vírus. Ainda segundo os mesmos autores, estas ORFs exprimir-se-iam através de um conjunto de RNA sub-genómicos cuja extremidade 3' terminal seria coincidente com o início da região não codificante. Este modo de expressão genómico, que poderá não ser o único nos closterovírus (Coffin e Coutts, 1993), é também suportado pela presença de RNAs bicatenários de comprimento inferior ao genoma (ver adiante) nos tecidos infectados. Um destes segmentos, de 0,8 Kbp, originou por tradução *in vitro* uma proteína que reagia com anticorpos para a proteína do capsídeo (Dulieu e Bar-Joseph, 1990).

3.2.3 Variabilidade serológica e genómica

Serològicamente o CTV é um vírus bastante homogéneo. A maioria dos anticorpos policlonais e monoclonais que têm sido produzidos reage com a totalidade dos isolamentos com que foi ensaiada, incluindo isolamentos de origem geográfica muito diversa ou originando sintomatologia distinta dos isolamentos que foram empregues como imunogéneos, aspectos que foram revistos por Nolasco (1988). Foi sugerido que existiriam vários epítomos na proteína do capsídeo, alguns dos quais seriam comuns a todos os isolamentos de CTV (Vela *et al.*, 1988). A existência de epítomos específicos de algumas estirpes foi evidenciada por Permar *et al.* (1990) que produziram um anticorpo monoclonal (MCA-13) que reagiu especificamente com algumas estirpes classificadas como severas no sistema de Garnsey *et al.* (1987). Outros anticorpos monoclonais com reactividade diferencial relativamente a alguns isolamentos de CTV foram também referidos (Tsai, *et al.*, 1989; Cambra *et al.*, 1992; Mawassi *et al.*, 1992; Zebzami *et al.*, 1992), mas não foi clara a existência de uma relação entre o comportamento dos anticorpos e as propriedades biológicas dos isolamentos analisados.

Nas plantas infectadas com o CTV encontram-se, para além de um RNA bicatenário de comprimento correspondente ao genoma, diversos outros, menores, que originam um perfil electroforético com várias bandas (Dodds e Bar-Joseph, 1983). A comparação destes perfis foi o primeiro método laboratorial que, no final da década passada, permitiu evidenciar de modo claro que a larga diversidade biológica era acompanhada pela variabilidade da expressão genómica do vírus (Lee, 1984; Dodds, *et al.*, 1987; Dodds, *et al.*, 1987; Moreno *et al.*, 1990, 1991; Guerri *et al.*, 1991). Com base nesta série de trabalhos, foi possível passar a identificar algumas estirpes do vírus, bem como demonstrar a existência de misturas de estirpes na mesma planta (Moreno *et al.*, 1990). Guerri *et al.* (1991) verificaram ainda, ao analisar algumas populações naturais de Espanha, que a maior diversidade de perfis ocorria nas regiões onde a taxa de infecção era mais elevada e os pomares mais antigos. Contrariando as expectativas iniciais (Dodds, *et al.*, 1987), a relação de determinada sintomatologia mais severa ("Seedling Yellows") com a presença de dois fragmentos sub-genómicos de Mr $1,7 \times 10^6$ e $0,5 \times 10^6$ não se veio a mostrar correcta (Albertini *et al.*, 1988).

Rosner *et al.* (1983b) prepararam duas sondas de cDNA a partir de uma estirpe de CTV que foram utilizadas em ensaios de hibridação com RNA genómico de 15 estirpes originárias de Israel (Rosner e Bar-Joseph, 1984) e Flórida (Rosner *et al.*, 1986). Estes ensaios não se mostraram suficientemente discriminatórios devido à reacção das sondas com a maior parte dos isolamentos.

Recentemente, a publicação simultânea de várias sequências de aminoácidos da proteína do capsídeo (Pappu *et al.*, 1993b) e várias sequências nucleotídicas do gene da proteína do capsídeo de isolamentos de Israel (Mawassi *et al.*, 1993), originou opiniões divergentes quanto à possibilidade de relacionar (Pappu *et al.*, 1993b), ou não (Mawassi *et al.*, 1993), a severidade dos isolamentos com a proteína do capsídeo. A comparação entre os genes da proteína do capsídeo de diversos isolamentos foi também efectuada por análise de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição ("Restriction Fragment Length Polymorphisms", RFLP) por Gillings *et al.* (1993). Estes autores analisaram os padrões de digestão com Hinf I de um conjunto de 51 isolamentos, tendo deduzido 7 diferentes mapas de restrição. A relação com as propriedades biológicas não foi clara, embora as estirpes consideradas suaves no sistema de caracterização biológica de Garnsey *et al.* (1987) se concentrassem num menor número de mapas de restrição. Por outro lado, Mawassi *et al.* (1993) referiram que um isolamento de Israel não transmissível por *A. gossypii* diferia, em dois aminoácidos, de todos os outros isolamentos transmissíveis.

4. Objectivos

O objectivo central deste trabalho é contribuir para a melhoria do diagnóstico e tipificação viral. Pretende-se desenvolver metodologias simplificadas que possam ser utilizadas em cenários de baixa ou mediana sofisticação tecnológica por organismos directamente ligados à produção agrícola, nomeadamente laboratórios dos serviços oficiais de agricultura (quarentena, certificação, direcções regionais) ou associações de produtores.

Neste enquadramento considerou-se inicialmente a pesquisa de RNA bicatenário, contemplando-se vários aspectos:

- Estudar as condições que possibilitem eliminar a influência do metabolismo secundário do hospedeiro (nomeadamente a produção de compostos fenólicos e polisacáridos) na executabilidade da técnica.
- Estudar a possibilidade de diagnosticar agentes de etiologia presumivelmente viral, mal caracterizados, que não podem ser diagnosticados por outros métodos que necessitem de reagentes específicos. É o caso da doença do Mosaico de figueira, largamente difundida em Portugal e com grande importância económica para a produção de figo para o consumo em fresco.
- Aplicar esta metodologia à tipificação viral.

Outro grupo de métodos de diagnóstico que se consideraram foram os baseados na amplificação de ácidos nucleicos *in vitro*, nomeadamente na reacção em cadeia da

polimerase ("Polymerase Chain Reaction", PCR), procurando ultrapassar-se as actuais limitações. Tomaram-se como modelos para um estudo mais aprofundado do diagnóstico baseado na PCR duas doenças de grande importância para Portugal: o Urticado da videira e a Tristeza dos citrinos. Para além do desenvolvimento laboratorial da metodologia, efectuou-se em paralelo com a técnica ELISA um pequeno rastreio de populações naturais do GFLV bem como de outros isolamentos de origem geográfica distinta de GFLV e CTV, para avaliar as suas potencialidades em condições que se aproximassem de rotina e verificar até que ponto a diversidade genómica dos vírus poderia influir na aplicabilidade da metodologia. Durante o desenvolvimento laboratorial surgiram inovações que levaram a alargar o estudo a outros vírus com vista a avaliar a possibilidade da sua generalização.

Dada a simplicidade laboratorial e generalidade do método desenvolvido de amplificação do genoma viral, procurou-se ver até que ponto esse método seria aplicável à análise da variabilidade genómica, dada a importância crescente deste tema. Para tal consideraram-se métodos de análise mutacional que se pudessem basear na amplificação genómica:

- Análise de polimorfismos de locais de restrição ("Restriction Site Polymorphisms", RSP).
- Análise de polimorfismos conformacionais monocatenários ("Single Stranded Conformation Polymorphisms", SSCP), que não havia ainda sido empregue na tipificação viral.
- Síntese Aleatória de cDNA (SAcDNA), método inédito de tipificação viral desenvolvido neste trabalho.

Como modelos de aplicação empregaram-se populações de GFLV e CTV. Nestes estudos, procurou-se avaliar a possibilidade de tipificar números elevados de isolamentos, o poder discriminante de cada método e obter dados acerca da variabilidade genética daqueles vírus.

A Pesquisa do RNA Bicatenário Aplicada ao Diagnóstico Viral.

1. Introdução

A multiplicação de vírus cujo genoma é constituído por RNA envolve a formação, em diversas etapas do processo replicativo, de cadeias complementares de RNA que se encontram em grande parte emparelhadas. Em condições de elevada salinidade que tendem a estabilizar o emparelhamento entre as bases, estas moléculas são resistentes à acção de RNAses. Embora por razões de ordem prática sejam globalmente designadas por RNA bicatenários, ("double stranded RNA", ds-RNA), correspondem a entidades que têm estrutura, origem e função biológica diversa dentro do processo replicativo (Fig. 1-1): formas intermediárias de replicação, formas replicativas ou o próprio genoma viral no caso de alguns vírus (ex: Fijivírus). Este assunto é revisto, por exemplo, por Marsh *et al.* (1991). Na Fig. 1-1 estão resumidas as principais etapas do processo replicativo, focando-se em especial as instâncias em que são originados ds-RNAs

No caso de vírus que têm uma estratégia de expressão sub-genómica, é frequente encontrar também para além de ds-RNA correspondente ao genoma, segmentos de ds-RNA sub-genómicos. Alguns autores consideram estas moléculas a consequência directa de um processo de replicação autónoma dos RNAs sub-genómicos (por um processo análogo à replicação genómica). Contudo há também evidência de que os RNAs sub-genómicos podem ser originados por transcrição parcial da cadeia de polaridade negativa, a partir de um ponto de iniciação interno. Este assunto é discutido em maior pormenor por Mandahar (1989).

O isolamento do ds-RNA é uma operação simples e que requiere metodologias pouco sofisticadas. É, além do mais, facilitada pela relativa estabilidade das moléculas. Após extracção dos ácidos nucleicos dos tecidos a analisar, a fracção de ds-RNA pode ser purificada com base na sua adsorção diferencial à celulose CF 11 na presença de determinada proporção de etanol (Franklin, 1966). Aproveitando este facto, Morris e Dodds (1979) propuseram utilizar a pesquisa do ds-RNA como método de diagnóstico viral.

Teòricamente, só os vírus cujo genoma é constituído por DNA, o que representa cerca de 6 % dos vírus de plantas conhecidos (Matthews, 1991), estariam fora das possibilidades desta metodologia.

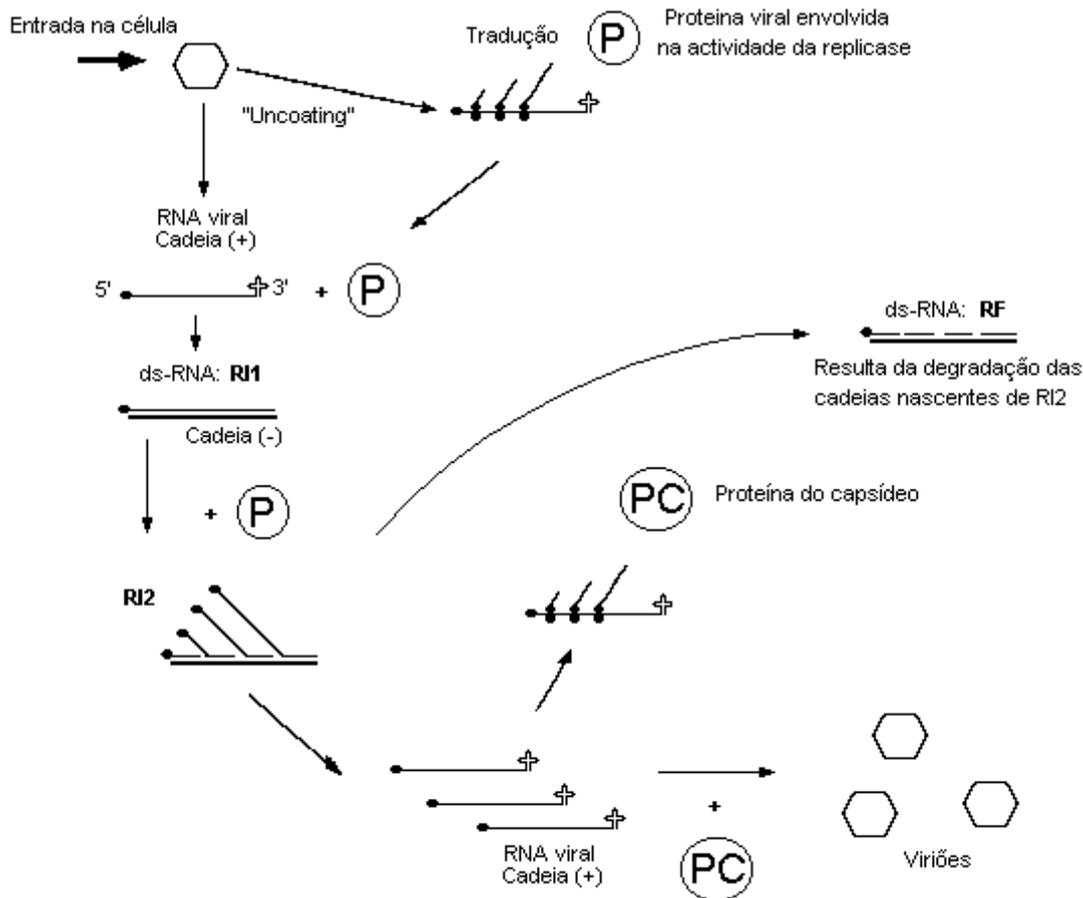


Fig. 1-1. Envolvimento de ds-RNA na multiplicação de vírus com genoma deRNA monocatenário. Considerou-se, sem perda de generalidade, o caso de um Bromovírus (Marsh *et al.*, 1991). Para melhor clareza não se entrou em conta com o facto de ser um vírus de genoma dividido. Distinguem-se três formas compostas por RNA bicatenário.

RI1: Intermediário de replicação inicial, resultante da síntese de uma cadeia de polaridade negativa. Ambas as cadeias estão totalmente emparelhadas. A estrutura (ds-RNA) é semelhante à da forma replicativa (RF).

RI2: Corresponde à forma designada habitualmente apenas por Intermediário de Replicação (RI). Intervem na produção de cadeias de polaridade positiva. As cadeias nascentes positivas conferem a esta forma algumas propriedades de RNA monocatenário.

RF: Forma Replicativa. É um produto de degradação de RI2. Apresenta propriedades de RNA bicatenário.

É claro que a validade desta metodologia depende da ausência nas plantas sãs de ds-RNA, o que nem sempre se verifica. Estudos efectuados nos últimos anos têm posto em evidência a presença de ds-RNA em plantas não inoculadas com vírus. Geralmente estes ds-RNAs caem em dois grupos (Fukuhara *et al.*, 1993). Um primeiro grupo é constituído por moléculas de 1,2 a 2,5 Kbp associadas a proteínas em partículas semelhantes a viriões, constituindo os vírus crípticos. No outro grupo, consideram-se as moléculas maiores de 10 Kbp que não estão associadas a partículas virais e que por vezes

se relacionam com alterações fenotípicas (Lefebvre *et al.*, 1990). Contudo, a presença de moléculas de ds-RNA de elevada Mr em extractos de plantas é geralmente considerada um forte indício de infecção de natureza viral (Dodds *et al.*, 1984; Dodds, 1986).

Atendendo a que o ds-RNA de origem viral ou polinucleótidos de síntese são imunogénicos, têm sido feitas tentativas esporádicas de desenvolver sistemas de diagnóstico baseados na detecção serológica de ds-RNA. Assim, foram empregues anticorpos policlonais (Francki e Jackson, 1972; Gould e Francki, 1981; Aramburu *et al.*, 1991) ou monoclonais (Powell, 1991) produzidos contra polinucleótidos sintéticos (In-Cn). Estes anticorpos foram, nos ensaios mais recentes, empregues em técnicas imunoenzimáticas ELISA (Aramburu *et al.*, 1991; Powell, 1991) ou DIBA (Aramburu *et al.*, 1991), com sensível melhoria do limiar de detecção. No entanto, esta aproximação não se revelou válida em diversos hospedeiros, devido à existência em extractos de plantas sãs de reacções de fundo inespecíficas demasiado intensas. Por outro lado, na prática, a detecção imunoenzimática de ds-RNAs tal como apresentada, não constitui uma simplificação metodológica, pois não dispensa a extracção de ácidos nucleicos e purificação parcial de ds-RNAs. Recentemente foi desenvolvida uma metodologia que conjuga a imunocaptura de ds-RNA directamente nos extractos de plantas com a subsequente amplificação por PCR, e que não apresenta os inconvenientes apontados (Nolasco *et al.*, 1993b). Este assunto será abordado mais em pormenor no Cap. 2.

O método geralmente empregue para detectar e estudar o tipo ds-RNAs presente é o fraccionamento electroforético. Uma importante vantagem relativamente à detecção imunoenzimática é fornecer informação sobre o tamanho dos ds-RNAs. Tal permite, desde que se incluam contrólitos negativos apropriados, distinguir os RNA eventualmente constitutivos da planta dos resultantes de infecção viral.

O número e tamanho dos segmentos de ds-RNA presentes numa planta supostamente infectada permite ainda tirar conclusões sobre o tipo genómico do vírus e assim possibilitar pistas para a sua identificação ou inclusão num grupo. Para além disso, alguns vírus exibem ainda variação no número e tamanho dos ds-RNAs, principalmente nos correspondentes aos segmentos sub-genómicos. Com base nesta variação tem sido possível com alguns vírus chegar mesmo à identificação de determinadas estirpes, como nos casos do SbDV (Smith, *et al.*, 1991), CMV (Pares *et al.*, 1992), ou CTV (Moreno *et al.*, 1990). Nos dois últimos casos, a análise do ds-RNA permitiu abordar o estudo de problemas epidemiológicos relacionados com a variabilidade do vírus (Guerra *et al.*, 1991; Pares *et al.*, 1992).

Outro aspecto que torna a pesquisa de ds-RNA atractiva é não se basear em reagentes específicos (anticorpos específicos de vírus, sondas de ácido nucleico) e portanto, não se resumir à pesquisa e confirmação da presença de vírus de que já é necessário ter uma suspeita de identidade *à priori*. É portanto um excelente meio de detecção de infecções latentes, de vírus crípticos (Abou-Elsnar *et al.*, 1985) ou de vírus defectivos em que não se forme a proteína do capsídeo. Dada a escassez de informação que requer à partida, é uma das abordagens possível no estudo de problemas fitossanitários de etiologia pouco clara. Com este objectivo tem sido empregue, por exemplo no caso da videira, no estudo do enrolamento foliar (Monette *et al.*, 1989b; Rezaian *et al.*, 1991) e de "Rupestris Stem-Pitting (Monette *et al.*, 1989a).

Alguns aspectos desta metodologia descritas neste trabalho foram já referidos por (Nolasco e De Sequeira, 1991b).

2. Materiais e Métodos

2.1- Materiais

2.1.1. Patogéneos virais

Alguns dos vírus estudados foram mantidos em condições de estufa na EAN e na UAL, em hospedeiros apropriados:

- CMV, diversos isolamentos mantidos em *Nicotiana glutinosa*, pimenteiro (*Capsicum annum* L.) e pepino (*Cucumis sativus*).
- GBLV, mantido em *Chenopodium quinoa*.
- GFLV, mantido em *Chenopodium quinoa* e *Vitis vinifera*.
- ZYMV, mantido em Courgette (*Cucurbita pepo*).
- CarMV, mantido em *Chenopodium quinoa*
- TYMV, mantido em Couve da China (*Brassica pekinensis*)
- GLRaV III, mantido em *Vitis vinifera*.

As amostras de figueira (*Ficus carica* L) afectadas de mosaico foram colhidas no campo e numa colecção de variedades mantida na UAL. Diversas outras plantas com sintomas de infecção viral foram colhidas no campo.

2.1.2. Soluções tampão.

- STE: 0,1 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, 1 mM NaEDTA, pH 6,8
- Tampão de extracção (método A): 2x STE contendo 3% de SDS, 0,3% de bentonite e 0,5% de 2-mercaptoetanol
- Tampão de extracção (método B): 0,2 M Tris-HCl, 5 M NaClO₄ (pH 7,5), contendo 5% SDS, 8,5% de PVP insolúvel (Policlar AT) e 0,1% de 2-mercaptoetanol
- Tampão de extracção (método C): 100 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM Na acetato, 10 mM MgCl₂ (pH 8,5), contendo 2% PVP insolúvel (Policlar AT), 1% SDS, 1% Bentonite, 0,2% DIECA, 0,1% 2-mercaptoetanol
- Tampão de Nuclease S1: 30 mM Na acetato (pH 4,5), 0,3 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM ZnCl₂ (Smith, *et al.*, 1991)
- Outras soluções tampão cuja composição não está indicada explicitamente, são referidas em Sambrook *et al.* (1989).

2.2. Métodos

2.2.1 Extracção de ácidos nucleicos totais.

Geralmente empregavam-se cerca de 1 a 5 g de tecido foliar por amostra, que eram homogeneizados com o respectivo tampão num almofariz de porcelana.

-Método A (clássico, fenol-clorofórmio)

No essencial o método seguido resultou da aplicação com modificações da metodologia apresentada por diversos autores (Morris e Dodds, 1979; Jordan, 1986; Valverde *et al.*, 1986).

Os tecidos vegetais eram homogeneizados na presença de dois volumes de tampão de extracção e adicionados de dois volumes fenol saturado com 2x STE, contendo 0,3% de 8-hidroxiquinoleína, e um volume de mistura de clorofórmio-isopentanol, 24:1. A mistura era agitada à temperatura ambiente durante cerca de 30 minutos e, findo este período, a fase aquosa contendo os ácidos nucleicos totais era separada da fase fenólica por centrifugação (5000 g ou 8000 g durante 30 minutos ou 10 minutos respectivamente). O ds-RNA era em seguida purificado por cromatografia em celulose. (ver mais adiante).

-Método B (Perclorato de sódio).

Seguiu-se, com modificações, o método 3 descrito por Rezaian e Krake (1987), tendo-se empregue o tampão de extracção referido por aqueles autores. Os tecidos vegetais eram homogeneizados na proporção 1/4 (p/v) com o respectivo tampão de extracção. Após maceração com agitação durante cerca de 30 minutos, efectuava-se uma centrifugação (30 minutos a 5000 g) a baixa temperatura. Os ácidos nucleicos eram recolhidos numa zona intermédia do tubo, entre o "pellet" e um coágulo superficial e precipitados com três volumes de etanol frio (Sambrook *et al.*, 1989). Após centrifugação e secagem do "pellet" sob vácuo, os ácidos nucleicos eram resuspenso em 5 ml de STE. O ds-RNA era em seguida purificado por cromatografia em celulose.

-Método C (extracção a quente).

Este método baseou-se num protocolo apresentado por Watkins *et al.* (1990) para extracção de ds-RNA de morangueiro, a que se adicionou um passo de tratamento com hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) para evitar a contaminação com polisacáridos (Ausubel *et al.*, 1990).

As amostras eram moídas em almofarizes quentes (60 °C) na presença de 4 volumes de tampão de extracção também pré aquecido a 60°C. Após transferência para recipiente adequado, ajustava-se a concentração de NaCl a 0,7 M e adicionava-se CTAB até à concentração final de 1%. Esta mistura era incubada a 60°C durante cerca de 20 minutos, com agitação. Adicionavam-se então dois volumes (relativamente ao peso das amostras) de fenol saturado com água contendo 0,3% de 8-hidroxiquinoleína, um volume de mistura de clorofórmio-isopentanol (24/1) e incubava-se à temperatura ambiente com agitação durante 30 minutos. A fase aquosa era separada por centrifugação, recolhida e re-extraída com 5 ml de clorofórmio-isopentanol. O ds-RNA era então purificado por cromatografia em CF 11 a partir desta fase aquosa.

2.2.2. Purificação e Concentração do ds-RNA

A purificação do ds-RNA era efectuada por cromatografia em Celulose CF 11, seguindo-se de perto o método apresentado por Morris e Dodds (1979).

Adicionava-se etanol à preparação de ácidos nucleicos totais de modo a obter, com rigor, uma concentração final de 16,5% de etanol. Esta operação era efectuada gota a gota, com agitação e à temperatura ambiente, a fim de evitar a precipitação dos ácidos nucleicos. Com extractos de algumas cucurbitáceas observava-se com muita frequência tendência à precipitação, pelo que era necessário diluir a preparação de ácidos nucleicos totais. Após verificar a inexistência de precipitação, adicionava-se 0,5 g de celulose CF 11 (Whatman) e a suspensão era homogeneizada e mantida à temperatura ambiente num recipiente herméticamente fechado durante 15 minutos. Depois de novamente homogeneizada, a suspensão era vertida em seringas de 10 ml (funcionando como colunas de cromatografia) obturadas na base por um disco de entretela; o líquido eluído era novamente vertido na seringa até que toda a celulose ficasse retida. A celulose era então lavada pela passagem de 25 ml de STE contendo 16,5 % de etanol (STE-ETOH). Adicionava-se então mais 1 ml de STE para baixar a concentração de ETOH e por fim recolhia-se a fracção enriquecida em ds-RNA com a adição de mais 2 ml de STE. O ds-RNA era então concentrado por meio de dois ciclos de precipitação com etanol (Sambrook *et al.*, 1989). No primeiro ciclo era resuspenso em 400 µl de STE e no segundo de 10 a 100 µl de tampão TAE, conforme o peso da amostra de tecido. Algumas amostras eram tratadas com DNase I ou também com RNase A entre os dois ciclos de precipitação.

2.2.3 Tratamentos enzimáticos da preparação de ds-RNA

Tratamento com RNase A, em condições de alta e baixa salinidade.

Este tratamento podia ser efectuado antes ou após a electroforese.

Tratamento antes da electroforese: após a primeira precipitação com etanol, o ds-RNA era resuspenso em 0.1 x SSC e dividido em dois lotes. A concentração salina de um dos lotes era elevada até 0.3 M NaCl. Ambos os lotes eram então incubados com RNase A na concentração final de 1 µg/ml durante 10 min. a 37 °C. Este tratamento era finalizado pela adição da mistura de trabalho de DNase I, contendo proteinase K.

Tratamento após electroforese: após coloração com brometo de etídio e visualização das bandas, o gel era cortado longitudinalmente e os canais que se pretendiam estudar colocados em placas de Petri onde eram sujeitos a tratamento com 10 µg/ml de RNase A e 500 ng/ml de brometo de etídio em 10 ml de tampão SSC esterilizado, em duas modalidades (Zelcer *et al.*, 1981): em condições de baixa salinidade (0,1x SSC) ou de alta salinidade (2x SSC). A digestão decorria à temperatura ambiente durante cerca de 2 a 3 horas, observando-se periodicamente a sua progressão.

Tratamento com Nuclease S1

Após a primeira precipitação com etanol, o ds-RNA era resuspenso no tampão descrito por Smith, *et al.* (1991) aquecido a 70 °C durante 3 minutos e rapidamente arrefecido em gelo (Smith, *et al.*, 1991). Após adição de Nuclease S1 (Sigma) na concentração final de 1 Unidade/µl, a reacção era incubada 30 minutos a 37 °C. Findo este período procedia-se ao tratamento com DNase I e Proteinase K.

Tratamento com DNAse I

O tratamento com DNase I era efectuado após a primeira precipitação do ds-RNA com etanol, ou após o tratamento com RNase A ou com Nuclease S1. A fim de eliminar eventuais traços de RNase, a DNase I era previamente tratada com Proteinase K na presença de CaCl₂ (Tullis e Rubin, 1980), durante 30 min. a 37 °C. A solução de trabalho de DNase continha por amostra: 4 µg de DNase I, 10 µg de Proteinase K e 0,27 µmol de CaCl₂. O ds-RNA a ser tratado era resuspenso em 0,2x STE (excepto no caso de ter sido tratado com RNase) e incubado 30 min. a 37 °C após a adição da solução de trabalho de DNase e de MgCl₂. As concentrações finais eram: 10 µg/ml de DNase I, 25 µg/ml de proteinase K e 5,8 mmol/l de MgCl₂. Em seguida o ds-RNA era extraído com 2 volumes

de fenol saturado com STE e 1 volume de clorofórmio-isopentanol (24:1) e finalmente concentrado por precipitação com etanol e ressuspensão em TAE.

2.2.4. Fraccionamento electroforético do ds-RNA e registo dos perfis

A electroforese era geralmente feita em mini-géis de poliacrilamida (80 mm por 95 mm por 0,75 mm) com concentração de 5% ou 6% durante 3 horas a 4°C à tensão constante de 100 V, em tampão TAE (Sambrook *et al.*, 1989). Após electroforese o gel era corado com brometo de etídio (500 µg/ml) e visualizado à transparência com iluminação ultra violeta (λ 302 nm). Os resultados eram registados fotograficamente com película Polaroid 667. Posteriormente a imagem era digitalizada por meio de um "Scanner", com que se constituiu um banco de imagens.

Coloração com Nitrato de Prata

Os géis eram corados pelo método de Samons, referido por Igloi (1983). Finalmente eram secos e guardados.

Estimativa dos tamanhos dos fragmentos de ds-RNA.

Para evitar o usual método gráfico de Bozarth e Harley (1976) estudaram-se várias funções que permitissem relacionar o comprimento (em bp) da molécula de ds-RNA com a sua mobilidade electroforética. Para uma das funções com que se obteve bons ajustamentos, ($S=EXP(b/d)$), em que **S** é o comprimento, **d** a mobilidade electroforética e **a** e **b** dois parâmetros) desenvolveu-se um programa de computador que calcula os parâmetros da curva pelo método dos mínimos quadrados. Para cada gel calculavam-se os parâmetros com base na posição de um conjunto de bandas correspondentes a moléculas de comprimento conhecido, estimando-se então os tamanhos das restantes moléculas de ds-RNA por meio daquela função. A medição das distâncias migradas por cada banda era efectuada sobre a imagem digitalizada, utilizando-se como unidade de comprimento o "pixel".

Processamento das imagens com vista à impressão

Todas as figuras referentes aos fraccionamentos electroforéticos foram impressas a partir das respectivas imagens digitalizadas. As imagens obtidas mediante coloração com brometo de etídio foram impressas em negativo para aumentar o contraste.

3. Resultados

3.1. Estudo e adaptação da metodologia de pesquisa e análise de RNA bicatenário em sistemas experimentais.

Empregaram-se diversos sistemas experimentais (GBLV / *Chenopodium quinoa*; CarMV / *C. quinoa*; CMV / *C. quinoa* ou *Cucumis sativus*; TYMV / *Brassica pekinensis*) para adaptar e aferir a metodologia empregue por outros autores, de que resultaram os protocolos descritos na secção de materiais e métodos.

Com aqueles sistemas bastava uma pequena quantidade de tecido vegetal para permitir uma fácil caracterização do padrão de bandas de RNA bicatenário. As quantidades mínimas para aquela caracterização eram da ordem dos 0,1 g (Fig. 3.1-1). Contudo, geralmente, a quantidade de RNA bicatenário analisada em cada electroforese correspondia a cerca de 1-2 g de tecido.

certo esta pag, 24

Fig. 3.1-1. RNA bicatenário extraído de *C. quinoa* inoculado com CMV, correspondente a diversas quantidades de tecido foliar analisado. Extracção de ácidos nucleicos pelo método A. Não foi efectuado tratamento com DNase I. Coloração do gel com nitrato de prata.

Por vezes era patente próximo do topo do gel uma banda larga e difusa (Fig. 3.1-1), também referida por outros autores (Dodds, *et al.*, 1984; Lee, 1984) e atribuída a DNA contaminante. Esta banda desaparecia após tratamento da preparação de ácidos nucleicos com DNase I. Dada a sua posição e aspecto característicos era facilmente identificável e não dificultava a caracterização do perfil de bandas de RNA bicatenário, pelo que nem sempre este tratamento era efectuado.

Quando necessário, a confirmação da natureza bicatenária do RNA era efectuada através da sua característica resistência ao tratamento com RNase em condições de alta salinidade e susceptibilidade em condições de baixa salinidade (Fig. 3.1-2). Em alternativa, podia-se efectuar o duplo tratamento com Nuclease S1 e DNase I com a vantagem de diminuir a fluorescência de fundo devida à contaminação com RNA monocatenário heterogéneo, que se verificava nalguns casos.

certo fim pag 28, esta 25

Fig. 3.1-2. Tratamento com RNase A após a electroforese. A digestão foi efectuada com 10 µg/ml de enzima em condições de alta salinidade **A** ou baixa salinidade **B**. No canal **C** não foi aplicada enzima. As fotografias foram efectuadas ao fim de 2h ou 3h. O ds-RNA analisado corresponde a 2,2 g de *C. quinoa* inoculado com CarMV. Extracção de ácidos nucleicos pelo método A. Coloração do gel com brometo de etídio.

Os perfis de bandas de RNA bicatenário obtidos naqueles sistemas experimentais foram os esperados, no entanto foram detectadas algumas bandas adicionais que se verificou estarem associadas a *C. quinoa*, assunto que será retomado mais adiante. Relativamente ao CMV, podem observar-se na Fig. 3.1-3,A as bandas de RNA bicatenários correspondentes aos três RNA genómicos e ao RNA 4, sub genómico, codificante para a proteína do capsídeo (Francki, 1985). Para além destes era ainda patente em certas preparações a existência de outros RNA subgenómicos, com mobilidade próxima da do RNA 4. O padrão de RNA bicatenário do GBLV (Fig. 3.1-3,B) não está descrito na bibliografia; é constituído por 2 bandas bastante próximas, o que se ajusta bem à existência de dois RNA genómicos, cujas massas moleculares relativas foram estimadas em $4,36 \times 10^6$ e $4,18 \times 10^6$ (Martelli *et al.*, 1977), e que provavelmente correspondem às duas nucleoproteínas detectadas por Ferreira (1970), Ferreira e De Sequeira (1972). O padrão obtido com CarMV (Fig. 3.1-3,B) foi idêntico ao descrito por outros autores: é constituído por uma banda correspondente ao RNA genómico, 4003 bp, e duas bandas correspondentes a RNA sub-genómicos, de 1689 bp e 1472 bp (Morris e Carrington, 1986). Conforme se pode observar na Fig. 3.1-3, o método matemático que se utilizou para estimar os tamanhos das moléculas de RNA bicatenário permite obter boas aproximações. No caso do TYMV (Fig. 3.2-2) encontra-se uma banda genómica de cerca de 6318 bp (Matthews, 1991) e diversas bandas sub-genómicas mais ou menos patentes.

certo fim pag 28, esta 26

Fig. 3.1-3. Padrões de RNA bicatenário obtidos em sistemas experimentais. **A)** CMV. Reprodução de um canal da Fig. 3.1-1, apresentando-se um exemplo de estimativa de tamanho das moléculas de ds-RNA. Como padrão utilizaram-se os valores referidos por (Francki, 1985; Rizzo e Palukaitis, 1989) para os RNA 1 a 4, respectivamente: 3357, 3035, 2193, 1027. **B)** GBLV e CarMV. Reprodução de um canal da Fig. 3.1-5, apresentando-se um exemplo de estimativa de tamanho das moléculas de ds-RNA. Para padrão utilizaram-se, para o GBLV, os valores de Mr de $2,1 \times 10^6$ e $2,2 \times 10^6$ estimados por (Martelli *et al.*, 1977), e para o CarMV, os valores 4003, 1689 e 1472 nt referidos por (Morris e Carrington, 1986). Q1 e Q2 são duas das bandas associadas a *C. quinoa*.

Ao analisar o RNA bicatenário obtido de *C. quinoa* observava-se por vezes um conjunto de bandas que se veio a verificar estar associado à própria planta, mesmo quando não inoculada (Figs 3.1-4 e 3.1-5). Estas bandas eram menos intensas que as de origem viral e geralmente apenas detectáveis ao analisar amostras correspondentes a 1,5-2 g de tecido. Este padrão de bandas era constituído por duas mais intensas (designadas Q1 e Q2, com tamanho estimado em 2600 bp e 1000 bp) e diversas outras bandas mais fracas. Estas bandas não eram afectadas por tratamento com DNase I e pelo menos as bandas Q1 e Q2 tinham o comportamento típico de RNA bicatenário ao serem tratadas com RNase A (Fig. 3.1-4). Por outro lado, a inoculação e desenvolvimento da infecção com CarMV parecia reforçar a intensidade destas bandas (vide Fig. 3.1-5,B). O padrão de bandas era idêntico com plantas obtidas de sementes oriundas de Portugal ou de Espanha.

certo fim pag 28. esta 27

Fig. 3.1-4. RNA bicatenário associado a *C. quinoa*. Em cada canal foram analisados 2,2 g de *C. quinoa* não inoculado. O canal **A** foi tratado após electroforese com RNase A em condições de alta salinidade e o canal **B** em condições de baixa salinidade. Estão assinaladas as posições das bandas Q1 e Q2.

Para avaliar as possibilidades de detecção de infecções mistas e a precocidade do diagnóstico, fizeram-se alguns ensaios de inoculação sequencial de *C. quinoa* com GBLV e CarMV seguida de colheita periódica de material para análise (Fig. 3.1-5). Verificou-se que era possível detectar o padrão de bandas correspondente a cada vírus ao fim de dois ou três dias após a inoculação enquanto os sintomas eram patentes apenas ao fim de quatro ou cinco dias. Não se observou a existência de interferência mútua entre os perfis de bandas de cada vírus.

Ao pretender-se aplicar o método usual de extracção de ácidos nucleicos, método **A**, a plantas com metabolismo secundário mais complexo (por exemplo: Vinha, Figueira) surgiram diversas dificuldades (entupimento das colunas de CF11, presença de quantidades elevadas de RNA monocatenário heterogéneo originando um intensa fluorescência de fundo ao analisar o gel), que levaram ao estudo de outros métodos de extracção. Na Fig. 3.1-6 apresentam-se alguns exemplos comparativos da aplicação dos métodos A, B e C. O método B (perclorato) originava sempre bandas mais fracas que os outros métodos, e não se revelou adequado para amostras de videira, pelo que foi abandonado. Pelo contrário, o método C (extracção a quente) revelou-se uma boa alternativa ao método usual, sendo aliás o único que permitia obter bons resultados em diversos hospedeiros lenhosos.

certo ao fim de pag 28, esta

Fig. 3.1-5. Evolução do perfil electroforético no início da infecção. **A)** Infecção mista de *C. quinoa* com GBLV e CarMV. A inoculação com GBLV foi efectuada no dia 0 e com CarMV no dia 1. Os tecidos para análise foram colhidos nos dias 2 a 6. Observou-se o aparecimento de sintomas no dia 4. **B)** Infecção de *C. quinoa* com CarMv. A inoculação foi efectuada no dia 0 e os tecidos para análise colhidos nos dias 1 a 6. Observou-se o aparecimento de sintomas no dia 5. **C,** planta de controle não inoculada. Em todos os casos a quantidade de tecido correspondente a cada canal foi cerca de 1,7 g. Extração de ácidos nucleicos pelo método A. Coloração do gel com brometo de etídio.

3.1-6 certo fim desta, 29

Fig. 3.1-6. Comparação de métodos de extracção de ácidos nucleicos. **1 e 2)** Tomateiro (2g) colhido no campo e infectado com CMV e outro vírus não identificado; 1) extracção pelo método B (perclorato) e 2) extracção pelo método A. **3 e 4)** *C. quinoa* (2g) inoculado com CarMV; 3) extracção pelo método B e 4) pelo método C (extracção a quente). **5 e 6)** Figueira com sintomas de mosaico (0,7 g); 5) extracção pelo método A e, 6) pelo método C.

3.2. Resultados obtidos com vírus e hospedeiros de origem diversa.

Por vezes, ao analisar amostras de diversas plantas com sintomas que poderiam ser atribuídos a infecções virais, ou mesmo com infecções confirmadas por ELISA (caso de alguns Ilarvírus, resultados não apresentados), não se obtiveram resultados. Noutros casos as bandas eram demasiado atenuadas para se poder caracterizar o perfil.

No caso de sobreiro (Fig. 3.2-1, canal 6), sem sintomas aparentes de infecção viral, foi possível isolar RNA, muito provavelmente bicatenário (neste caso não foi confirmada a natureza bicatenária do RNA). Desconhece-se contudo se esta molécula está associada à planta ou a algum vírus latente. Outros RNA bicatenários associados a vírus desconhecidos em meloeiro e *C. quinoa* estão apresentados na Fig. 3.2-1, (canais 5 e 4); no primeiro caso trata-se provavelmente de um potyvírus e no segundo caso uma infecção mista com CarMV.

O padrão característico dos Potyvírus (neste caso o ZYMV), com uma banda apenas, correspondente ao genoma inteiro (cerca de 10 Kb), está presente em Fig. 3.2-2, canal 4.

No caso do MRDV, um Fijivírus com o genoma constituído por dez segmentos de RNA bicatenário, observaram-se apenas oito das respectivas bandas (Fig. 3.2-2, canal 6) devido a três dos segmentos terem um comprimento muito semelhante.

certo fim pag 30, esta

Fig 3.2-1. Padrões de RNA bicatenário associados a diversos vírus e hospedeiros. **1)** CMV. 0,5 g de tomateiro colhido no campo e naturalmente infectado. **2)** CMV. 1 g de "Courgette" colhida no campo, naturalmente infectada. **3)** CMV. 1 g de *Nicotiana glutinosa*. Coleção da EAN. **4)** CarMV e vírus desconhecido. 1,5 g de *C. quinoa* **5)** Vírus desconhecido (potyvirus ?). 1,5 g de Meloeiro com sintomas de mosaico. **6)** ds-RNA extraído de 1,5 g de folhas de sobreiro sem sintomas aparentes. **7) e 8)** ds-RNA associado a pimenteiro. Análise de 0,5 g extraídos de pimenteiro de duas variedades diferentes, não inoculados. Canais 4), 5) e 6) extracção de ácidos nucleicos pelo método C. Restantes canais, extracção pelo método A.

certo fim pg 30, esta

Fig. 3.2-2. Padrões de RNA bicatenário associados a alguns vírus **1)** TYMV. 0,5 g de couve da china inoculada experimentalmente. **2)** GLRaV III (?). 4 g de folha de videira "Pinot Noir" Positiva por ELISA para GLRaV III. **3)** idem, outra planta GLRaV III **4)** ZYMV. 1 g de "Courgette" inoculada experimentalmente. **5)** GFLV. 2,2 g de *C. quinoa* inoculado experimentalmente. **6)** MRDV. 0,5 g de raízes de milho colhido no campo. **7)** CarMV. 1g de *C. quinoa* inoculado experimentalmente. **8)** CTV. 0,5 g de casca de Limeira Tahiti inoculada experimentalmente com isolamento TR2 (I. Reunião). **9)** CTV. 0,3 g de casca de Lorangeira doce colhida no campo e positiva por ELISA para CTV. Extracção de ácidos nucleicos pelo método C, à excepção do canal 1) em que se empregou o método A.

O padrão do GFLV, (Fig. 3.2-2, canal 5) apresenta para além das bandas esperadas correspondendo aos RNA 1 (7344 bp,) e RNA 2 (3774 bp), duas bandas estimadas em cerca de 900 e 1200 bp. Embora o RNA bicatenário tenha sido extraído de *C. quinoa*, estas bandas apresentam mobilidade diferente das associadas àquela planta. Poderia eventualmente tratar-se de um satélite associado a este isolamento. No entanto (resultados não apresentados) a eluição do ds-RNA destas bandas e subsequente tentativa de amplificação por PCR não permitiu demonstrar a existência de relação com o RNA satélite descrito por Pinck *et al.* (1988).

A extracção de RNA bicatenário directamente de tecidos foliares de videira foi possível pelo método C em duas videiras positivas por ELISA para o GLRaV III (Fig. 3.2-2, canais 2 e 3). Em ambos os casos só se observou uma banda, com mobilidade ligeiramente superior à banda dos potyvírus. Portanto poderia tratar-se da banda correspondente ao genoma viral. Esta banda não estava presente em videiras não infectadas com este vírus.

A existência de RNA bicatenário associado a plantas não inoculadas é ilustrada na Fig. 3.2-1 (canais 7 e 8) com o pimenteiro. É de notar a variação da posição das bandas entre as duas variedades.

3.3. Variação do perfil electroforético entre isolamentos de um vírus.

Na Fig. 3.2-1, (canais 1 e 3), estão ilustradas pequenas variações no padrão de bandas obtido de isolamentos de CMV colhidos em locais e épocas diferentes. São patentes variações na mobilidade das bandas genómicas (RNA1 e RNA2, Fig. 3.2-1, canal 2), bem como no aparecimento ou desaparecimento de bandas sub-genómicas. Em alguns casos de amostras correspondentes a plantas já infectadas há bastante tempo, apenas era patente a banda do ds-RNA 3 (resultados não apresentados). No caso do CTV são também visíveis diferenças entre os dois isolamentos apresentados (Fig. 3.2-2, canais 8 e 9).

3.4. RNA bicatenário associado a doenças de etiologia presumivelmente viral. Caso do Mosaico da Figueira.

O mosaico da figueira é uma doença largamente espalhada, com importância económica considerável principalmente nos pomares virados para a produção para o consumo em fresco. As árvores infectadas apresentam as folhas com diversos graus de mosaico e distorcidas. Frequentemente os frutos são também afectados. A etiologia desta doença, geralmente apontada como viral, nunca foi estabelecida.

Os melhoramentos introduzidos na metodologia de extracção de ácidos nucleicos, de que resultou o método C, permitiram efectuar uma pesquisa de RNA bicatenários em figueiras afectadas desta sintomatologia. Verificou-se, num conjunto de diversas plantas, que 11 amostras oriundas de árvores doentes apresentavam um conjunto de bandas de RNA bicatenário (Fig. 3.4-1). Não se detectou RNA bicatenário em 4 plantas aparentemente sãs. Aquelas bandas, que eram relativamente intensas no início da rebentação, atenuavam-se com o decorrer da Primavera e Verão. A análise do perfil electroforético era nessas alturas dificultada ainda pelo aumento de fluorescência de fundo, o que impunha o tratamento sistemático com nuclease S1.

certo fim da pag 32, esta

Fig. 3.4-1. RNA bicatenário associado ao Mosaico de figueira. 1) Variedade desconhecida colhida no campo, com sintomas; .0,35 g. 2) Variedade desconhecida colhida no campo, sem sintomas; .0,35 g. 3) Eucharía Preta com sintomas, 0,35 g. Colecção UAL. 4) Lampa Branca com sintomas, 0,35 g; Colecção UAL. 5) Variedade desconhecida colhida no campo, com sintomas; .0,35 g. 6) Variedade desconhecida colhida no campo, sem sintomas; .0,35 g.7) e 8) Marcadores: ds-RNA respectivamente de pimenteiro e de CMV.9) Berbera preta com sintomas, 2 g, colecção da UAL. 10) Toque Branco com sintomas, 2 g, Colecção da UAL. Está marcada a posição das bandas A e B referidas no texto.

O padrão completo de bandas incluía geralmente duas bandas mais intensas: **A**, com mobilidade próxima mas inferior à do ds-RNA extraído de Pimenteiro (estimado em cerca de cerca de 12 Kbp por Valverde *et al.*, 1990) e **B**, com mobilidade próxima do RNA 3 de CMV (2,2 Kbp). Para além destas eram detectáveis ainda outras bandas geralmente mais fracas.

Observou-se alguma variação entre os perfis electroforéticos de diversas amostras. Assim, no que respeita às bandas mais intensas, a banda **A** estava presente em apenas cerca de 80 % dos perfis. Apenas num único caso (Fig. 3.4-1, canal 9) a banda **B** não existia, estando substituída por outra correspondente a Mr ligeiramente superior.

4. Discussão

Adaptaram-se diversos protocolos de extracção e análise de ds-RNA com vista ao diagnóstico de infecções provocadas por vírus de RNA ou agentes similares mal caracterizados. A metodologia resultante não requer equipamento sofisticado nem manipulações delicadas e demora dois a três dias a executar. Nos sistemas experimentais utilizados encontrou-se uma boa reproducibilidade e um limiar de detecção dentro da ordem de grandeza referida por outros autores (Dodds, *et al.*, 1984; Valverde *et al.*, 1986). Estas características estão contudo longe das possibilidades de automação e sensibilidade da técnica ELISA.

Enquanto metodologia de diagnóstico viral, a pesquisa de ds-RNA tem uma fiabilidade variável. Ao invés de outras metodologias (por ex. a técnica ELISA), tal prende-se mais com factores relativos ao hospedeiro do que ao patogéneo; a sua aplicação com segurança requer um conhecimento prévio da planta no que respeita ao processo mais adequado à extracção de ds-RNA bem como ao eventual conteúdo de ds-RNA endógeno. No entanto, uma vez que este conhecimento esteja adquirido, apresenta a vantagem de não estar dirigida para determinado vírus mas antes para o "conteúdo viral" da cultura, incluindo agentes mal caracterizados para os quais a metodologia alternativa seria a indexagem biológica. Para além do caso descrito do mosaico da figueira, esta potencialidade da pesquisa de ds-RNA é ilustrada para a videira por Habili *et al.* (1992).

Ao passar a analisar amostras de diversas plantas colhidas no campo, para além de frequentemente se ter que passar a utilizar maiores quantidades de tecido, e ao contrário de conclusões apresentadas por Dodds *et al.* (1984), verificou-se uma acentuada dependência relativamente ao hospedeiro no que respeita à maior ou menor facilidade de purificação de ds-RNA. Os problemas encontrados, e referidos também na bibliografia, caem dentro de dois tipos:

- Por um lado a existência de mucilagens que originam o entupimento das colunas de CF11, como é referido também por outros autores (Moreno *et al.*, 1990; Watkins *et al.*, 1990), e que está associado a uma excessiva coloração de fundo do gel de electroforese e que impede a análise dos resultados. Este problema foi solucionado para diversos hospedeiros empregando um protocolo de extracção a quente baseado em Watkins *et al.* (1990), a que se adicionou uma etapa suplementar (eliminação de polisacáridos por tratamento com CTAB), conforme referido por Ausubel *et al.* (1990). Para além disso, o tratamento com nuclease S1 permitiu reduzir ainda mais a coloração de fundo.
- Outro tipo de dificuldade é relativa a tecidos ricos em compostos fenólicos, como a videira (Newbury e Possingham, 1977). Nos extractos deste tipo de hospedeiros

parece haver uma interacção entre os ácidos nucleicos, os compostos de origem vegetal e o fenol do meio de extracção, originando a partição (e perda) dos ácidos nucleicos na fase fenólica (Rezaian e Krake, 1987). Por este motivo Rezaian e Krake (1987) preconizaram a substituição de fenol por um agente caotrópico (perclorato de sódio) no meio de extracção. Contudo, neste trabalho, no caso da videira, não se obtiveram bons resultados com um método baseado no perclorato. Com o método de extracção a quente foi possível analisar ds-RNA directamente a partir de tecidos de videira. Possivelmente, a composição do meio e a extracção a quente concorrem para a inactivação dos compostos interferentes com os ácidos nucleicos referidos por aqueles autores (Rezaian e Krake, 1987).

O perfil electroforético do ds-RNA que foi encontrado associado a plantas de pimenteiro era muito semelhante a alguns perfis descritos na bibliografia (Valverde *et al.*, 1990) e cai dentro do segundo grupo referido por Fukuhara *et al.* (1993), isto é, ds-RNAs não associados a partículas virais. É de realçar o facto de, a variedades diferentes de pimenteiro corresponderem perfis diferentes o que obriga ao uso de plantas de controlo da mesma variedade daquelas em que se pretende pesquisar o RNA bicatenário de origem viral.

A presença de ds-RNA associado a *C. quinoa* foi, tanto quanto se sabe, referida inicialmente por Nolasco e De Sequeira (1991b). Mais recentemente foi também referida a existência de uma banda correspondente a uma molécula com Mr $1,8 \times 10^6$ (aproximadamente, 2,7 Kbp) por Hutchinson *et al.* (1992) ou diversas bandas correspondentes a moléculas com menos de 3 Kbp por German *et al.* (1992). Pelo menos no primeiro caso há uma boa concordância com o valor estimado neste trabalho. É frequente as plantas desta espécie apresentarem infecções latentes pelo chamado Vírus do Mosaico do Chenopodium, que não é mais do que o SoMV (Dias e Waterworth, 1967). Contudo a forma replicativa do SoMV corresponderia a cerca de 4 Kbp (Hull, 1985), valor bastante diferente do encontrado. Por outro lado, considerando a classificação de Fukuhara *et al.* (1993), o valor de 2,6 Kbp valor cairia dentro da gama admissível para um vírus críptico. Atendendo a que *C. quinoa* é uma planta frequentemente empregue em trabalhos experimentais, nomeadamente para a multiplicação de vírus para a obtenção de antisoros, será importante ter presente as consequências de uma eventual infecção com vírus crípticos.

A possibilidade de identificar determinado vírus pelo perfil electroforético do ds-RNA é variável conforme o vírus. Nos vários casos exemplificados, tem-se por um lado o CMV e o MRDV que, com um padrão característico, são de mais fácil identificação, e no caso oposto, os membros do grupo Potyvirus que apresentam uma única banda. É ainda

necessário ter em conta que, por vezes, atenuações na intensidade de algumas bandas podem dificultar a identificação do perfil.

Tanto o CMV como o CTV apresentaram variações do perfil electroforético entre isolamentos. No caso destes dois vírus tais variações são frequentes e têm permitido a diferenciação entre isolamentos (Moreno *et al.*, 1990; Pares *et al.*, 1992). Este tipo de análise requer a observação do perfil completo de bandas e foi difícil de executar em plantas de campo que não estivessem em condições vegetativas óptimas ou que não fossem os hospedeiros apropriados, do ponto de vista de extracção do RNA bicatenário e de multiplicação do vírus, para este tipo de análise. As condições ideais implicam uma passagem por hospedeiros experimentais em condições de estufa e a certeza da inexistência de infecção conjunta com outros agentes infecciosos. Com o CTV são referidos problemas dependentes da variedade do hospedeiro, da época do ano e das condições fisiológicas da planta (Dodds *et al.*, 1987). Para além desta limitações, muitos vírus originam perfis electroforéticos pouco informativos devido a um número muito pequeno de bandas. Estão neste caso, por exemplo, os Potyvirus, cuja estratégia de expressão genómica não envolve a produção de RNA sub-genómicos.

No que respeita ao mosaico da figueira, em estudos ultra-estruturais de tecidos doentes havia já sido assinalada a presença de corpos esféricos e baciliformes envolvidos em membrana, bem como de partículas semelhantes a viriões (Appiano, 1982; Martelli *et al.*, 1990). Em estudos efectuados em Portugal, também por microscopia electrónica, foram observadas partículas que se assemelhavam a Rhabdovirus e agregados de partículas filamentosas semelhantes às dos Closterovirus (Sequeira, *et al.*, 1993). Por outro lado, foram também isolados a partir de plantas doentes o SoMV (Quacquarelli, 1971) e um potyvirus (Grbelja e Eric, 1983); no entanto não foi possível em ambos os casos atribuir a causa da doença àqueles vírus. A pesquisa de ds-RNA em figueiras com mosaico foi inicialmente abordada por Nolasco e De Sequeira (1991a). Nesse seguimento, os dados aqui referidos sugerem fortemente que a presença de sintomas está relacionada com um patogéneo que em alguma etapa da sua multiplicação envolve moléculas de ds-RNA. Um, eventualmente mais vírus de RNA seriam candidatos bastante plausíveis. Nesta ordem de ideias, a banda **A**, que nem sempre estava presente, poderia corresponder a um Potyvirus, eventualmente aquele que foi referido por Grbelja e Eric (1983), e as demais bandas poderiam corresponder ao agente responsável pela doença. Nos perfis analisados não se encontrou qualquer banda que pela sua posição pudesse corresponder à forma replicativa de SoMV (cerca de 4 Kbp, Hull, 1985).

A mobilidade electroforética do ds-RNA em função do comprimento da molécula em bp não é, tal como no caso do DNA, representada em papel semi-logarítmico por uma

recta (Bozarth e Harley, 1976), isto é, não se trata de uma função logarítmica simples. Possivelmente as razões para tal, que não interessa aqui aprofundar, prendem-se com o facto de as moléculas de ds-RNA adoptarem uma estrutura espacial mais compacta (dupla hélice A) do que as moléculas de DNA (Lewin, 1987). Do ponto de vista prático, o método geralmente empregue para estimar o tamanho de uma molécula de ds-RNA correspondente a determinada banda (geralmente referido por método gráfico de Bozarth e Harley, 1976) é a interpolação em papel semi-logarítmico sobre uma curva ajustada à mão a um conjunto de padrões. Neste trabalho, ao poder substituir-se a interpolação gráfica pelo ajustamento computadorizado de uma função matemática, obteve-se uma considerável economia de trabalho.

Diagnóstico de Vírus e Patogêneos Sub-Virais com Base na Amplificação de Ácidos Nucleicos *in vitro*

1. Introdução

1.1. Técnicas de Amplificação de Ácidos Nucleicos *in vitro*

Depois do desenvolvimento das técnicas de recombinação de DNA durante os anos setenta, possibilitando que um dado gene fosse retirado do seu contexto natural e copiado muitas vezes (amplificado) noutra organismo, o mais importante desenvolvimento da biologia molecular foi poder passar-se a efectuar a amplificação sem a intervenção de organismos multiplicadores, isto é, *in vitro*. Este importante passo foi marcado pelo aparecimento (Saiki *et al.*, 1985) e aperfeiçoamento (Saiki *et al.*, 1988) da técnica designada Reacção em Cadeia da Polimerase ("Polymerase Chain Reaction", PCR).

Desde então têm sido desenvolvidas outras técnicas de amplificação *in vitro*, com características diversas (Quadro 1.1), que se refletem no custo dos reagentes, de equipamento, ou nas suas potenciais utilizações.

Estas técnicas empregam pequenos segmentos de DNA de sequência determinada, os iniciadores ("primers"), que vão hibridar com a molécula de ácido nucleico em estudo ("target"), cuja sequência pode ser em grande parte desconhecida. Esta hibridação vai desencadear uma replicação em cadeia em que se atinge um número de cópias da ordem dos milhões. Em algumas técnicas só são amplificados os iniciadores; nestes casos ocorre apenas uma amplificação do sinal de detecção da molécula "target". Noutras, são amplificadas também zonas da molécula "target" adjacentes aos iniciadores. Tal permite para além da detecção, empregar a amplificação como técnica preparativa para outros estudos (clonagem, sequenciação, etc..)

Embora teóricamente qualquer das técnicas de amplificação *in vitro* possa ser empregue no diagnóstico viral, tem sido a PCR e em muito menor escala, a 3SR (Guatelli *et al.*, 1990) que têm sido mais utilizadas com esse fim.

Quadro 1.1. Características de algumas técnicas de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro*.

Técnica ¹	Amplificação	Temperatura	Iniciadores ²	Enzimas
PCR	Iniciador + zona adjacente	Variação cíclica	2 x 20 mer	DNA Pol termoestável
LCR	Iniciador	Variação cíclica	4 x 20 mer	DNA ligase termoestável
3SR	Iniciador + zona adjacente	Constante	1 x 25 mer 1 x 47 mer	AMV RTase RNase H T7 RNA Pol
Q β	Iniciador	Constante	1 x 220 mer	Q β replicase
SDA	Iniciador + zona adjacente	Constante	2 x 40 mer	Exo ⁻ Klenow Pol Hinc II Restrictase

(1)- PCR, "Polymerase Chain Reaction"; LCR, "Ligase Chain Reaction" (Barany, 1991); 3SR, "Self sustained sequence replication" (Guatelli *et al.*, 1990); Q β Replicase (Lizardi *et al.*, 1988); SDA, "Strand Displacement Amplification" (Walker *et al.*, 1992)

(2)- Número de iniciadores x tamanho usual

1.1.1. "Self sustained sequence replication", 3SR

É uma técnica que foi desenvolvida por Guatelli *et al.* (1990). Resumidamente, uma cadeia de RNA é amplificada a temperatura constante por meio de um ciclo de reacções acopladas de transcrição reversa e transcrição do cDNA resultante, conforme esquematizado na Fig. 1.1.1 É de notar a inexistência de desnaturação térmica para separar as cadeias do híbrido DNA:RNA; em vez disso é empregue RNase H. Neste processo é explorada a dupla actividade, DNA Polimerase RNA dependente e DNA polimerase DNA dependente, da AMV RTase. O produto principal da amplificação é RNA "antisense", sendo o factor de amplificação da ordem dos 10 milhões em 2 horas.

O DNA bicatenário também pode ser amplificado por este método mediante uma prévia desnaturação e incorporação numa das cadeias da sequência do promotor T7.

Do ponto de vista prático esta técnica dispensa o uso de termociclador, mas o custo por reacção resulta cerca de 15 vezes mais elevado do que o da PCR (protocolo de Guatelli *et al.* (1990), preços de catálogo de Boehringer Mannheim).

esta pag 39, acertada em bx

Fig. 1.1.1. "Self sustained sequence replication",3SR. (versão simplificada, em que só um dos iniciadores contém o promotor T7)

1) Um dos iniciadores, I1, apresenta para além de uma zona complementar da cadeia a amplificar, uma zona de ligação (promotor) à T7 RNA Polimerase. Após hibridação com a cadeia de RNA, este iniciador é alongado por acção da AMV Reverse Transcriptase, formando-se um híbrido DNA:RNA. 2) A parte RNA deste híbrido é então degradada por acção de RNase H, permitindo a hibridação do segundo iniciador, I2. 3) A actividade DNA Polimerase DNA dependente da AMV RTase alonga este iniciador e torna a molécula bicatenária, o que possibilita, 4) a sua repetida transcrição por acção da T7 RNA Polimerase. Entra-se então na fase de reacção em cadeia em que as moléculas de RNA transcritas pela T7 RNA pol permitem a reiniciação do processo. Nesta fase, embora as reacções sejam basicamente as mesmas, a sua sequencia não é idêntica à da fase acíclica.

1.1.2. A reacção em cadeia da polimerase ("Polymerase Chain Reaction", PCR).

A PCR (Fig. 1.1.2) é essencialmente uma técnica de amplificação de DNA, efectuada por uma série de ciclos sucessivos, compostos de: desnaturação térmica da molécula bicatenária de DNA, hibridação dos iniciadores à molécula a amplificar,

esta pg 40

Fig. 1.1.2. PCR, "Polymerase Chain Reaction" (três primeiros ciclos). Cada ciclo é constituído por uma etapa de desnaturação térmica, hibridação dos iniciadores e alongamento. Notar a existência de produtos de amplificação curtos (a partir do 3º ciclo) e longos. Os primeiros acumulam-se exponencialmente e constituem o produto predominante ao fim de vários ciclos; os segundos acumulam-se aritmeticamente.

alongamento dos iniciadores e formação de duas novas moléculas bicatenárias.

Teòricamente, em cada ciclo cada cadeia de DNA vai originar duas novas cadeias contendo a região entre os locais de hibridação dos iniciadores. Esta região é portanto amplificada exponencialmente por um factor 2^n (n é o número de ciclos). Contudo, passados os primeiros ciclos, a inevitável diminuição da actividade da enzima aliada à possibilidade das cadeias recém-formadas começarem a competir com os iniciadores para hibridarem nos mesmos locais, acarreta uma diminuição da eficiência de amplificação, pelo que o crescimento tende para um patamar. Uma modelização matemática destes aspectos é apresentada em Nedelman *et al.* (1992).

Na concepção inicial de Saiki *et al.* (1985), a PCR empregava o fragmento Klenow de *E. coli* DNA Polimerase; esta enzima tinha que ser repetidamente adicionada após cada etapa de desnaturação térmica. Este grave inconveniente veio a ser ultrapassado por Saiki *et al.* (1988) que passaram a empregar uma DNA Polimerase termoestável obtida de *Thermus aquaticus* (Taq DNA Pol), o que possibilitou a automatização da técnica.

Para a amplificação a partir de RNA (técnica geralmente designada por RT-PCR) é necessário proceder a uma prévia transcrição reversa seguida de desnaturação térmica para separar as cadeias do híbrido DNA:RNA e para destruir a RTase, que parece inibir a actividade da taq DNA Pol (Sellner *et al.*, 1992). A transcrição reversa tanto pode ser realizada pela AMV RTase como pela MMLV RTase. Recentemente, foi descrita (Myers e Gelfand, 1991) e comercializada uma DNA Polimerase termoestável obtida de *Thermus thermophilus*, Tth DNA Pol, que alternativamente apresenta actividade DNA Polimerase RNA dependente, ou DNA Polimerase DNA dependente, mediante mudança de tampão (substituição de Mn^{2+} por Mg^{2+}). Esta enzima pode portanto efectuar por si só tanto a transcrição reversa como a amplificação. Drygin *et al.* (1992) exemplificam esta utilização da enzima para amplificação de RNA viral de TMV. Alguns autores (Ohan e Heikkila, 1993) recomendam utilizar como iniciador para a transcrição reversa, oligo (dT) ou hexanucleótidos aleatórios. Contudo, no caso de amplificação de RNA viral é frequente empregar o iniciador de jusante da PCR.

As potencialidades da PCR são tão vastas que o seu uso rapidamente se disseminou em todos os ramos de conhecimento que necessitam da Biologia Molecular. De 1985 a 1992 foram publicados mais de cinco mil trabalhos científicos fazendo referência à PCR (Arnheim e Erlich, 1992). Diversos livros e manuais de laboratório tratam em profundidade os aspectos relevantes da execução e aplicação da PCR.

1.2. Aplicação ao Diagnóstico Viral

As técnicas de amplificação de ácidos nucleicos apresentam diversas vantagens relativamente a outras técnicas de diagnóstico precedentes, sendo uma delas a muito maior sensibilidade. Este aumento de sensibilidade torna-se importante por possibilitar um diagnóstico mais precoce ou, em trabalhos de rastreio, possibilitar o processamento conjunto de maior número de amostras e assim diminuir o custo do rastreio por unidade de área.

Em comparação com a técnica imunoenzimática ELISA, as amplificações de ácido nucleico têm a vantagem de serem dirigidas ao genoma e assim poderem ser utilizadas para agentes de natureza viral ou sub-viral que não tenham capsídeo proteico capaz de estimular a produção de anticorpos. Para além disso, possibilitam ainda modelar a especificidade do diagnóstico pois teoricamente é possível ao determinar os iniciadores, escolher uma zona genómica conservada dentro de um grupo de vírus e assim orientar o diagnóstico para vários vírus de um grupo (Langeveld *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1991), ou pelo contrário, procurar zonas genómicas características de certas estirpes, e assim estreitar a especificidade.

Em comparação com técnicas que envolvem hibridação com sondas de ácido nucleico, é de notar que, em última análise, as técnicas de amplificação também se baseiam na hibridação. Contudo, deixa de ser necessário recorrer ao emprego, complicado do ponto de vista do diagnóstico de rotina, de marcadores radioactivos ou bioquímicos para detectar o sinal de hibridação.

De entre os vários processos de amplificação de ácidos nucleicos poderão ser vantajosos os que permitirem amplificar não só os iniciadores mas também a zona adjacente do genoma viral que, numa segunda etapa do diagnóstico, pode ser utilizada para a tipificação genómica do isolamento (ver Cap. 3).

1.2.1. "Self sustained sequence replication", 3SR

O emprego deste método no diagnóstico viral é ainda bastante recente e tem-se limitado ao HIV-1 (Guatelli *et al.*, 1990; Gingeras *et al.*, 1991; Kievits *et al.*, 1991; Malek *et al.*, 1992), com limiares de detecção da ordem das 10^{-5} fmol a 10^{-1} fmol (Guatelli *et al.*, 1990). Sendo ao contrário da PCR, conceptualmente orientado para a amplificação de moléculas de RNA, esta técnica pode vir a tornar-se especialmente interessante no diagnóstico de vírus de plantas.

1.2.2. "Polymerase Chain Reaction", PCR.

O método de amplificação de ácidos nucleicos que mais tem sido empregue no diagnóstico viral é a PCR. No que respeita a plantas, a PCR tem sido utilizada para a detecção de vírus (Rybicki e Hughes F. L., 1990; Vunsh *et al.*, 1990) e viróides (Hadidi e Yang, 1990) desde 1990. Sem ser exaustivo, apresentam-se no Quadro 1.2.2 exemplos da sua aplicação em diversos grupos de vírus, satélites e viróides.

Analisando os dados referidos naquele quadro, é notória em diversos casos uma sensibilidade muitíssimo maior que a da técnica ELISA. Acrescente-se que, em alguns casos, aqueles elevados valores foram obtidos graças ao emprego de sondas radioactivas para detecção dos produtos da PCR (Vunsh *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1991), condições que estão longe das pretendidas em ensaios de rotina. Noutros casos, os valores apresentados são algo teóricos pois a comparação da sensibilidade entre ELISA e PCR foi avaliada a partir dos resultados obtidos com uma série de diluições de RNA viral previamente purificado (Vunsh *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1991; Wetzel *et al.*, 1991; Hadidi *et al.*, 1993) ou de vírus purificado (Wetzel *et al.*, 1992), e não por comparação directa de diluições de tecidos infectados. Noutros ainda (Borja e Ponz, 1992), foram empregues hospedeiros experimentais diferentes daqueles para que terá interesse económico o diagnóstico. Assim, é bastante provável que em condições de rotina, a sensibilidade, embora maior que a da técnica ELISA, não atinja a ordem de grandeza dos valores apresentados em alguns daqueles exemplos.

A elevada sensibilidade possibilitou a detecção de vírus num único indivíduo vector: afídeo (Lopezmoya *et al.*, 1992), nemátodo (Esmenjaud *et al.*, 1993) e cochonilha (Minafra e Hadidi, 1993), em casos que não são acessíveis à técnica ELISA, o que vem abrir diversas possibilidades de estudos epidemiológicos e da relação vírusvector.

Outro aspecto comum à maioria dos protocolos referidos é a análise incidir sobre uma preparação de ácidos nucleicos totais da planta a testar. Do ponto de vista prático, tal envolve geralmente um passo de extracção de ácidos nucleicos com fenol seguido de precipitação com etanol, segundo protocolos mais ou menos complicados. Esta etapa representa uma séria limitação ao uso da PCR em condições de rotina, quer pela morosidade de preparação das amostras quer pelos efeitos nocivos para a saúde que a manipulação de fenol pode originar. Para obviar estes inconvenientes, alguns autores conseguiram efectuar a transcrição reversa e amplificação do genoma viral directamente em macerados vegetais tamponizados e diluídos (Wetzel *et al.*, 1991; De Blas, 1992; Borja e Ponz, 1992). Contudo, o método não pode ser generalizado pois não funciona com alguns hospedeiros (De Blas, 1992).

Quadro 1.2.2 Algumas aplicações da PCR ao diagnóstico de vírus e viróides de plantas.

Vírus, Grupo	Preparação das amostras	Deteção da amplificação	Sensibilidade	ref ^a
BYMV, Potyvírus	Extracção de ácidos nucleicos	Hibridação molecular	10 ⁴ vezes > ELISA	(Vunsh <i>et al.</i> , 1990)
PPV, Potyvírus	Homogeneização, Disrupção de viriões	Electroforese	5.10 ³ vezes > ELISA	(Wetzel <i>et al.</i> , 1991)
PPV, Potyvírus	Extracção de ácidos nucleicos	Conjugado enzimático	não determinada	(Korshineck <i>et al.</i> , 1991)
PSbMV, Potyvírus	Extracção de ácidos nucleicos	Electroforese	10 vezes > ELISA	(Kohnen <i>et al.</i> , 1992)
PPV Potyvírus	Homogeneização, Imunocaptura, disrupção de viriões	Electroforese	5.10 ³ vezes > ELISA	(Wetzel <i>et al.</i> , 1992)
Grupo Potyvírus	Extracção de ácidos nucleicos	Electroforese	= Elisa	(Langeveld <i>et al.</i> , 1991)
PLRV, Luteovírus	Extracção de ácidos nucleicos	Electroforese	10 ⁴ vezes > ELISA	(Hadidi <i>et al.</i> , 1993)
BWYV, Luteovírus	Extracção de ácidos nucleicos	Hibridação molecular	10 ⁴ vezes > ELISA	(Jones <i>et al.</i> , 1991)
Grupo Luteovírus	Extracção de ácidos nucleicos	Electroforese	não determinada	(Robertson <i>et al.</i> , 1991)
TRV, Tobravírus	Extracção de ácidos nucleicos	Electroforese	60 µg tecido foliar <i>N. Clevelandii</i>	(Robinson, 1992)
TSWV, Tospovírus	Extracção de ácidos nucleicos	Electroforese	10 ² vezes > ELISA	(de Haan <i>et al.</i> , 1991)
CaMV, Caulimovírus	Homogeneização, Disrupção de viriões	Electroforese	0,3 pg viriões	(Lopezmoya <i>et al.</i> , 1992)
BYV, Closterovírus	Extracção de ácidos nucleicos	Electroforese	1 mg tecido foliar <i>Cucumis sativus</i>	(Coffin e Coutts, 1992)
FDV, Fijivírus	Extracção de ácidos nucleicos	Hibridação molecular	10 ⁴ vezes > sondas biotiniladas	(Smith, G.R. <i>et al.</i> , 1992)

Quadro 1.2.2 (Continuação).

Vírus, Grupo	Preparação das amostras	Detecção da amplificação	Sensibilidade	ref ^a
Grupo Geminivírus	Extracção de ácidos nucleicos	Electroforese	não determinada	(Rojas <i>et al.</i> , 1993)
MSV, Geminivírus	Extracção de ácidos nucleicos	Electroforese	50 fg/ml viriões	(Rybicki e Hughes, 1990)
ArMV Nepovírus	Extracção de ácidos nucleicos	Electroforese	5 mg tecido foliar <i>Vitis vinifera</i>	(Ipach <i>et al.</i> , 1992)
CLRV Nepovírus	Homogeneização em tampão	Electroforese	10 ⁹ vezes > ELISA	(Borja e Ponz, 1992)
CMV, Cucumovírus	Homogeneização em tampão	Electroforese	10 ³ vezes > ELISA	(De Blas, 1992)
CMV, Cucumovírus	Extracção de ácidos nucleicos	Electroforese	1 Semente infectada em 1000 sementes	(Wylie <i>et al.</i> , 1993)
CMV satellite	Homogeneização em tampão	Electroforese	não determinada	(De Blas, 1992)
ASV, Viróide	Extracção de ácidos nucleicos	Electroforese	7500 vezes > Page Return	(Hadidi e Yang, 1990)
CEV, viróide	Extracção de ácidos nucleicos	Electroforese	1 pg ácidos nucleicos totais	(Yang <i>et al.</i> , 1992)

No caso do vírus da Hepatite A, Jansen *et al.* (1990) desenvolveram um método ("Antigen-Capture Polymerase Chain Reaction") que envolve uma etapa prévia de captura de viriões mediante anticorpos adsorvidos a uma fase sólida seguida de lavagens para eliminação de componentes do hospedeiro e disrupção térmica dos viriões para libertação do genoma viral. Este método, que passou despercebido durante algum tempo, foi modificado para a detecção do PPV ("Immunocapture Polymerase Chain Reaction", IC/PCR) por Wetzell *et al.* (1992). Independentemente, Nolasco *et al.* (1992, 1993b) desenvolveram um outro método com base na imunocaptura que aparentemente se baseia em princípios distintos e é totalmente realizável em placas com o formato das placas de microtitulação ELISA. O desenvolvimento deste método é um dos principais assuntos focados neste capítulo.

Outro óbice que dificulta o emprego da amplificação de ácidos nucleicos no diagnóstico de rotina é a avaliação do resultado da amplificação, feita geralmente por electroforese ou hibridação molecular sobre membrana. Estes métodos, que são adequados a laboratórios de investigação, não se tornam práticos para o processamento de um elevado número de amostras.

Como alternativa, Korshineck *et al.* (1991) apresentaram um método em que durante a amplificação era incorporado um nucleótido biotilado. O produto da amplificação era aplicado ("Dot-blot") a uma membrana de nitrocelulose, fixado e detectado por meio da actividade de um conjugado estreptavidina - fosfatase alcalina.

Outra aproximação, bastante interessante pela possibilidade de automação e quantificação dos resultados, deriva do trabalho de Landgraf *et al.* (1991b). Neste, a amplificação é efectuada com dois iniciadores marcados, um com biotina, outro com isotiocianato de fluoresceína, ficando ambos os marcadores incorporados nas moléculas amplificadas. Estas moléculas são em seguida capturadas por uma fase sólida revestida com estreptavidina. A detecção e quantificação da amplificação é efectuada por meio de um fluorímetro. Este processo foi melhorado (Landgraf *et al.*, 1991a) com o emprego de placas de microtitulação e de métodos imunoenzimáticos para detecção de fluoresceína, com a grande vantagem de poder utilizar equipamento já existente nos laboratórios que efectuem diagnóstico por ELISA. Diversas variações têm sido entretanto introduzidas: no que respeita à imobilização do produto de amplificação, substituição da ligação biotina - avidina pela hibridação com uma sonda de captura adsorvida à placa de microtitulação (Kawai *et al.*, 1993; Mallet *et al.*, 1993; van der Vliet *et al.*, 1993) e no que respeita ao antigénio marcador, substituição da fluoresceína por digoxigenina incorporada por meio de um nucleótido marcado durante a amplificação (Suzuki *et al.*, 1992; Holmstrom *et al.*, 1993). Outra variação ainda, é a detecção da cadeia imobilizada por hibridação a baixa temperatura com uma sonda directamente ligada a fosfatase alcalina (Tada *et al.*, 1992). Alguns destes processos foram já aplicados ao diagnóstico de HIV-1.

Uma objecção a estes métodos, em que, ao contrário da electroforese ou da hibridação molecular, não há uma verificação (de tamanho ou de sequência) do produto que é amplificado, é uma maior possibilidade de ocorrência de falsos positivos por amplificação inespecífica de ácidos nucleicos da planta ou de outros patogéneos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

2.1.1 Patogéneos virais e sub-virais.

Ao longo deste trabalho empregou-se material vegetal de origem diversa, infectado com vários vírus e RNA satélites:

- Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv Xanthi e pimenteiro (*Capsicum annum* L.) cv Yolo Wonder, mantidas sob estufa no Laboratório de virologia vegetal do CIT INIA em Madrid, infectadas com diversos isolamentos de CMV, alguns contendo o CMV Sat RNA (De Blas, 1992).
- idem, infectadas com TSWV (De Blas, 1992).
- Plantas de faveira (*Vicia faba* L.) mantidas em condições idênticas, infectadas com BYMV (De Blas, 1992).
- Plantas de batateira (*Solanum tuberosum* L.) mantidas em condições idênticas, infectadas com PLRV (De Blas, 1992).
- Varetas de noqueira (*Junglans regia* L.), infectada com CLRV e mantidas congeladas a -20 °C (Borja e Ponz, 1992).
- Folhas de (*Nicotiana benthamiana* L.) infectadas com PMMV (Alonso *et al.*, 1991).
- Folhas e varas de videira infectadas com Isolamentos de GFLV de origem diversa (Anexo 3.1, Secção de Resultados). Grande parte destas amostras foram colhidas no campo, em Vale de Parra, concelho de Albufeira, no Algarve, numa vinha com uma elevada taxa de infecção por este vírus, também infestada com nemátodos *Xiphinema index*. Algumas das varas foram postas a enraizar e mais tarde transferidas para uma estufa, constituindo-se uma colecção de isolamentos.
- Varetas de várias espécies de citrinos infectados com isolamentos de CTV de origem diversa (Anexo 3.2, Secção de Resultados). A casca das varetas foi removida e mantida congelada até à sua utilização.

2.1.2 Imunoreagentes

Empregaram-se os seguintes anticorpos para vírus e RNA bicatenário:

CMV: anticorpos policlonais (Sanofi).

PLRV: anticorpos policlonais (Boehringer)

BYMV: anticorpos monoclonais específicos para Potyvírus (Agdia)

CLRV: anticorpos policlonais cedidos pelo Dr. Rowhani (Univ. Davis, California)

TSWV: anticorpos policlonais de soro bruto não fraccionado cedido pelo Dr. Gonsalves (Univ. Cornell, Geneva, New York)

PMMV: anticorpos policlonais de soro bruto não fraccionado cedido pela Dr^a. Serra (CSIC, Madrid).

CTV: anticorpos monoclonais, clones 3DF1 e 3CA5 (Ingenasa), e anticorpos monoclonais, clone 4E5, cedidos pelo Dr. Zebzami (UCP-DDR, Rabat, Marroc)

GFLV: anticorpos policlonais (Bioreba) e anticorpos policlonais obtidos por fraccionamento dos soros U9 e C110, cedidos pelo Prof. Oscar Sequeira (EAN, Oeiras)

SLRV, ArMV e RRV: anticorpos policlonais (Bioreba).

GBLV anticorpos policlonais cedidos pelo Prof. Oscar Sequeira (EAN, Oeiras)

Líquido ascítico contendo anticorpos monoclonais para RNA bicatenário cedido pelo Dr. Powell (Univ. Florida, Florida)

Empregaram-se também conjugados enzimáticos com fosfatase alcalina para o ArMV (Bioreba), CTV (Ingenasa e conjugado cedido pelo Dr. Zebzami) e para o GFLV (Bioreba e conjugado feito a partir de IgG do antisoro U9).

2.1.3 Clone de cDNA do gene da proteína do capsídeo do GFLV.

Em algumas experiências empregou-se um plasmídeo pCGN cedido pela Dr^a F. Sanchez (CIT-INIA, Madrid), contendo um enxerto de cDNA de 2304 nt englobando o gene da proteína do capsídeo de um isolamento do vírus mantido na colecção de Davis, California. Este enxerto foi excisado por digestão com Sph I e amplificado com os iniciadores para GFLV com diversos objectivos.

2.1.4 Soluções e Tampões.

-Empregou-se água de qualidade Mili Q, esterilizada, tendo-se verificado que não era necessário o tratamento com DEPC para a obtenção de bons resultados.

-PBS ("Phosphate Buffered Saline"): KH_2PO_4 1,5 mM, Na_2HPO_4 , 8 mM, KCl 2,5 mM, NaCl 140 mM, NaN_3 3mM; pH 7,4

-PBS-Tween: PBS contendo 0,05 % de Tween 20.

-Tampão de extracção geral: Tris-HCl 0,35 M pH 8,0 , NaCl 140 mM, 3 mM NaN_3 , contendo 2% PVP 40, 1% PEG 6000 e 0,05% Tween 20.

2.1.5 Enzimas e alguns outros produtos empregues em técnicas de biologia molecular.

- Endonucleases de restrição Hinf I, Taq I, Rsa I, Msp I, Hae III, Sph I de Boehringer, e respectivos tampões fornecidos pelo fabricante.
- Transcritase reversa de Moloney Murine Leukemia Virus de Gibco BRL.
- DNA Polimerase de *Thermus aquaticus* de Boehringer, Gibco BRL ou Biosynthesis.
- RNase A de Sigma, tratada segundo Sambrook *et al.* (1989) para eliminar DNAses.
- Fosfatase Alcalina de mucosa intestinal de bovino para marcação enzimática de anticorpos, Sigma Type VII-T ou Boehringer grade I
- Inibidor de ribonucleases (HPRI) de Pharmacia ou Boehringer
- deoxinucleótidos (dNTPs) de Boehringer
- Dig-11-dUTP, Boehringer
- Kit de marcação não radioactiva: "DNA non-radioactive labeling and detection Kit" de Boehringer.
- Kit de detecção de digoxigenina: "Dig nucleic acid detection kit" de Boehringer
- Marcadores de Mr (Fig. 2.1.5): M1, DNA de fago lambda digerido com Hind III (Sigma); M2, idem, digerido com Hind III e Eco RI (Sigma); M3, idem digerido com Pst I; M4, pBR32 digerido com Hae III (Sigma); M5, 1 Kbp DNA Ladder de Gibco BRL.
- Oligonucleótidos iniciadores da PCR: sintetizados para cada caso (Quadro 2.2.7.1.) por Biosynthesis, British Bio-technology Products ou LNETI.

esta pag 49 , certo em baixo

Fig. 2.1.5. Comprimentos de alguns dos fragmentos dos marcadores de Mr utilizados. M1, DNA de fago Lambda digerido com Hind III. M2, idem, digerido com Hind III e Eco RI. M3, Idem, digerido com Pst I. M4, pBR32 digerido com Hae III. M5, 1 Kb DNA Ladder. Electroforese em gel de poliacrilamida a 6,5 %, coloração com brometo de etídio. Nota: as electroforeses foram efectuadas em condições diferentes, pelo que as migrações dos marcadores não são comparáveis entre si.

2.1.6. Equipamento de uso específico

- Termociclador Intelligent Heating Block IHB 2024, Cambio
- Termociclador Perkin Elmer Cetus gene amp PCR system 9600
- Termociclador Hybaid Omnigene TR3
- Fluorímetro TKO 100, Hoefer. Scientific.
- Colorímetro Microtiter Plate Reader MK II, Titertek
- Vacugene XL, Kabi Pharmacia

2.2. Métodos

2.2.1. Fraccionamento da fracção IgG de antisoros para o GFLV.

O fraccionamento dos antisoros U9 e C110 foi efectuado por dupla precipitação salina seguida de diálise contra PBS (diluído 1/2), conforme descrito em Nolasco e De Sequeira, (1985).

2.2.2. Marcação enzimática de anticorpos.

A conjugação dos anticorpos do antisoro U9 baseou-se no protocolo de Ausubel *et al.* (1990). Foi feita na proporção (p/p) de IgG / Fosfatase Alcalina de 1/3, partindo de 0,3 mg de IgG. Para o efeito, empregou-se fosfatase alcalina em solução salina que foi directamente adicionada à IgG, sem necessidade de precipitação prévia da enzima. Adicionou-se então glutaraldeído (0,6 %, valor final) e incubou-se a mistura durante 2h30 à temperatura ambiente. Findo este período, o conjugado foi diluído com 1 ml de 50 mM Tris-HCl pH 8,0 , 5 mM Mg Cl₂ contendo 0,5 % de NaN₃ e dializado durante 20h contra 4 x 250 ml de PBS. Finalmente adicionou-se ovalbumina na concentração final de 5%.

2.2.3. Técnica imunoenzimática ELISA-DAS.

Foi efectuada essencialmente como descrito por Clark e Adams (1977), mas empregando volumes de 100 µl por alvéolo. A extracção das amostras foi feita na proporção aproximada de 1/10 a 1/20 (p/v), com o tampão de extracção geral descrito em 1.4 (ou apenas PBS-T com 2 % PVP no caso de citrinos). A leitura das absorvâncias era efectuada ao fim de 1h30 de incubação á temperatura ambiente com o substrato enzimático. Para confirmação de alguns resultados efectuava-se outra leitura ao fim de 16h a 6 °C.

2.2.3.1 Limiar de positividade para o GFLV.

No caso do GFLV consideraram-se como positivas as amostras que ao fim de 1h30 de hidrólise do substrato apresentassem uma diferença, relativamente ao contôlo negativo, maior ou igual a 0,10 unidades de absorvância a 405 m. Este critério corresponde aproximadamente ao critério generalizado de "duas vezes a absorvância do contrôlo negativo", já que geralmente a amostra de contrôlo negativo apresentava uma absorvância de cerca de 0,10. Consideraram-se como negativas as amostras em que aquela diferença de absorvância fosse menor que 0,06 unidades e duvidosas as amostras em que aquele valor estivesse compreendido entre 0,06 e 0,10.

2.2.3.2 Limiar de positividade para o CTV

No caso do CTV consideraram-se diferenças de absorvância relativamente ao contrôlo negativo ligeiramente diferentes: valores maiores ou iguais a 0,12 correspondendo a amostras positivas e valores menores que 0,08 correspondendo a amostras negativas, sendo os casos intermédios considerados duvidosos. Este limiar é sensivelmente equivalente ao habitualmente empregue pelos serviços de agricultura, 0,10 de diferença ao fim de 1h (Eng^o J.J. Faustino, comunicação pessoal).

2.2.4. Extracção de ácidos nucleicos de tecidos foleares de videira.

A extracção de ácidos nucleicos totais foi feita empregando agentes caotrópicos em lugar de fenol. Foram utilizados o perclorato de sódio e o isotiocianato de guanidinium, segundo os protocolos de Fuchs *et al.* (1991a) e de Wilkinson (1991), respectivamente.

2.2.5. Transcrição reversa com nucleótidos marcados com ³²P

Os ácidos nucleicos correspondentes a cerca de 1 µg de tecido foliar foram resuspenso em água estéril, aquecidos a 65 °C e rapidamente arrefecidos em gelo, na presença de 6 pmol de iniciador de jusante de GFLV, com o objectivo de promover a hibridação do iniciador. Adicionaram-se em seguida os restantes componentes da mistura de transcrição reversa, que foi efectuada em volumes de 10 µl (composição final: Tris-HCl 50 mM pH 8,3 , 75 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 1 mM Dithiotreitol, 1mM de cada dNTP, 0,6 µM de iniciador de jusante, 20 unidades de inibidor de ribonucleases e 200 unidades de MMLV RTase) e continha adicionalmente 5 µCi de [α -³²P] dCTP, 3000 Ci / mmol. A transcrição reversa foi incubada durante 1h a 37°C, sendo em seguida os

produtos fracionados por electroforese em agarose a 1 %. Finalmente, o gel foi autoradiografado numa película fotográfica para Raios X (Kodak XAR 5) em presença de um ecrã intensificador a -70 °C durante 18 h.

2.2.6. Análise das sequências nucleotídicas

As sequências nucleotídicas dos diversos vírus foram obtidas de publicações ou por busca das bases de dados da EMBL ou do genbank por E-mail. A análise de vários aspectos da sua estrutura primária foi efectuada com auxílio dos programas Dnasis™ e Oligo™.

2.2.7. Amplificação do genoma viral por PCR.

2.2.7.1. Oligonucleótidos iniciadores.

No quadro 2.2.7.1 apresenta-se a sequência dos iniciadores que foram empregues. Nos casos de BYMV, CLRV, CMV, CMV Sat-RNA, PLRV, e TSWV utilizaram-se iniciadores cuja sequência fora determinada por outros autores; nos restantes casos, os iniciadores foram determinados com auxílio do programa OLIGO™, tomando como base as sequências dos respectivos genomas. Como princípio, procurou-se que as zonas escolhidas para os iniciadores tivessem um comprimento entre 18 nt e 25 nt com um conteúdo de (G+C)% entre 50 % a 60 %, pontos de fusão (T_m) semelhantes, não se auto hibridassem nem hibridassem entre si, e que apresentassem reduzidas possibilidades de iniciação de polimerização inespecífica noutras locais do genoma. Adicionalmente tentou-se também que o segmento a amplificar tivesse cerca de 500 nt (Dr.F. Ponz, comunicação pessoal), o que permitiria conjugar uma fácil detecção por coloração com brometo de etídio e uma boa eficiência de amplificação..

No caso do GFLV os iniciadores foram determinados com base nas sequências do RNA 2 de dois isolamentos, de Davis (Sanchez *et al.*, 1991) e a estirpe F13 (Serghini *et al.*, 1990), as únicas disponíveis na altura. Não foi possível encontrar regiões de consenso entre as duas sequências que obedecessem aos requisitos pretendidos, pelo que cada um dos iniciadores apresenta uma falha ("mismatch") relativamente à sequência da estirpe F13. O par de iniciadores escolhido permite a amplificação de um segmento de 568 bp na região inicial da proteína do capsídeo (571-1138 na numeração de Sanchez *et al.* (1991), ou 2040-2607 na numeração de Serghini *et al.* (1990).

Para o RNA satélite da estirpe F13 empregou-se a sequência publicada por Fuchs *et al.* (1989), tendo-se escolhido um par de iniciadores que permite amplificação de um fragmento de 409 bp, entre os nucleotídeos 618 -1026.

Os iniciadores para o CTV foram baseados na sequência do gene da proteína do capsídeo do isolamento T36 da Florida (Sekiya *et al.*, 1991), conduzindo à amplificação dos primeiros 541 nucleótidos.

Os iniciadores para PMMV foram baseados na sequência publicada por Alonso *et al.* (1991), e correspondem à amplificação de 496 bp (nt 735 a nt 1230) do gene da proteína de Mr 126 K.

Quadro 2.2.7.1.- Sequências dos iniciadores utilizados.

Vírus	Iniciador de montante	Iniciador de jusante	ref.
BYMV	5'-GCCTTATGGTGTGGTGCATAG-3'	5'-CAAGCATGGTGTGCATATCACG-3'	1
CLRV	5'-CATGACGAGTGGGCGTC-3'	5'-GCGTCGGAAAGATTACG-3'	2
CMV	5'-GTAGACATCTGTGACGCGA-3'	5'-GCGCGAAACAAGCTTCTTATC-3'	1
CMV-sat	5'-GATGGAGAATTGCGCAGAGGG-3'	5'-CATTACGGAGATCAGCATAGC-3'	1
CTV	5'-ATGGACGACGAAACAAAGAA-3'	5'-CAAGAAATCCGCACACAAGT-3'	4
GFLV	5'-CCGTGAGAGGATTGGCTGGTA-3'	5'-ATGGGAGGGCAAGTGAGAAAAT-3'	4
GFLV Sat	5'-TCCTCTCGTGGTCCTTATGGG-3'	5'-AGAAGCAACCGTGGGGATACA-3'	4
PLRV	5'-CCAGTGGTTRTGGTC-3'	5'-GTCTACCTATTTGG-3'	2
PMMV	5'-TGTCTGCTATGCTGCCTTCC-3'	5'-CCTTTCCCCTCGTTCTGTAA-3'	4
TSWV (*)	5'-ATCAAGCTTCTGAAGGTCAT-3'	5'- <i>CATGGATCCTGCAGAGCAATTGTGTCA</i> -3'	1

Referências: (1)- De Blas, 1992; (2)- Borja e Ponz, 1992; (3)- Robertson *et al.*, 1991; (4)- Este trabalho.

(*)- A zona em itálico não é complementar do genoma viral.

2.2.7.2. Amplificação do genoma precedida de imunocaptura (IC/RT-PCR) com anticorpos específicos.

Ao longo deste trabalho a metodologia de IC/RT-PCR foi sofrendo graduais ajustamentos e melhoramentos, descritos na secção de Resultados. A metodologia aqui apresentada incorpora já essas alterações e não reflete exactamente as condições experimentais em que foram efectuadas as primeiras experiências (Nolasco *et al.*, 1992; Nolasco *et al.*, 1993b). Por outro lado procurou-se empregar sempre que possível a composição de meio recomendada por cada fabricante de enzimas. Assim, as composições apresentadas respeitam às enzimas indicadas que, de entre as várias experimentadas, resultaram menos dispendiosas. Em anexo desta secção é apresentado um protocolo laboratorial detalhado.

Empregaram-se placas de microtitulação de fundo redondo (Cooke Microtiter System) que foram revestidas com os anticorpos adequados em condições idênticas às empregues para a técnica ELISA, mas apenas com IgG. As amostras a testar foram também processadas de modo análogo ao empregue para a técnica ELISA. Em diversas experiências comparativas empregaram-se os mesmos extractos para IC/RT-PCR e para ELISA. Em cada alvéolo utilizava-se apenas 50 µl de extracto (IC/RT-PCR). O processo de imunocaptura desenvolvia-se habitualmente durante 16 horas a 6°C sendo em seguida as placas lavadas com PBS-T.

Composição da mistura de transcrição reversa: Tris-HCl 50 mM pH 8,3 , 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM Dithiotreitol, 1mM de cada deoxinucleotídeo, 1 µM de iniciador de jusante e continha, por reacção, 5 unidades de inibidor de ribonucleases (Kabi-Pharmacia) e 100 unidades de MMLV RTase (Gibco-BRL). Esta mistura era adicionada à razão de 10 µl por alvéolo.

As placas, cobertas com fita adesiva, eram incubadas a 39 °C durante 1h. Durante este período eram mantidas num plano inclinado e sujeitas a um movimento de rotação por forma a que a mistura de transcrição reversa contactasse toda a superfície revestida do alvéolo.

Finda a síntese de cDNA transferia-se o conteúdo de cada alvéolo para os tubos do termociclador que já haviam sido preparados com 38 µl de mistura de amplificação e cerca de 20 mg (1 palheta) de cera histológica. Efectuava-se então uma incubação a 94 °C durante dois minutos que permitia a desnaturação da RTase e dos híbridos cDNA:RNA, bem como a fusão da cera que passava a constituir uma barreira contra a evaporação. No fim deste período deixava-se a temperatura baixar até 72 °C e adicionava-se, por tubo, 1 unidade de Taq Pol (PyrostaseTM) tamponada em dois microlitros. Assim, cada reacção de amplificação era efectuada em 50 µl de uma mistura com a composição final: 60 mM Tris-HCl pH 9, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 15 mM KCl, 2,1 mM MgCl₂, 200 µM dithiotreitol, 200 µM de cada deoxinucleotídeo, 0,2 µM de cada iniciador e contendo 0,005 % de BSA e 1 unidade de PyrostaseTM. A amplificação era efectuada mediante 5 ciclos compostos por patamares sucessivos de 30 s, a 92 °C (desnaturação), 52 °C (hibridação dos iniciadores) e 72 °C (alongamento dos iniciadores) a que se seguiam 30 ciclos em que a duração do patamar de 92 °C era reduzida para 5 s e finalmente 1 ciclo em que a duração do patamar de 72 °C era aumentada para 5 minutos. No caso do PLRV o patamar de hibridação era a 45 °C (Robertson *et al.*, 1991).

Terminada a amplificação, os tubos eram invertidos (se necessário, previamente reaquecidos a 65 °C por 1 minuto para fundir a cera), separando-se a cera que escorria e

solidificava pelas paredes do tubo, da fase aquosa, que ficava aderente ao fundo do tubo. Daqui era recolhido um pequeno volume (geralmente 1/10 da reacção) directamente para a análise do resultado da amplificação, conservando-se o resto para outros estudos.

A análise dos resultados foi habitualmente feita por fraccionamento electroforético em gel de agarose (1%) ou poliacrilamida (5% ou 6,5%), visualizando-se o DNA por excitação com UV após coloração com brometo de etídio, segundo os métodos habituais (Sambrook *et al.*, 1989). Nalguns casos os géis de poliacrilamida foram corados com prata (Igloi, 1983) com o objectivo de melhor visualizar algumas bandas ténues. Os registos fotográficos dos géis foram digitalizados por meio de um "scanner", tendo-se constituído um banco de imagens. Todas as figuras referentes aos fracionamentos electroforéticos foram impressas a partir das respectivas imagens digitalizadas. As imagens obtidas mediante coloração com brometo de etídio foram impressas em negativo para aumentar o contraste.

Alternativamente os produtos amplificados foram quantificados por fluorimetria (ver 2.2.7.5).

2.2.7.3. PCR precedida de captura do vírus sem anticorpos.

Os extractos a testar eram adicionados aos alvéolos não revestidos, sendo todos os demais passos idênticos ao processo descrito em 2.2.7.2.

2.2.7.4. PCR precedida de imunocaptura de RNA por meio de anticorpos específicos para RNA bicatenário.

Os alvéolos eram revestidos com uma diluição 1/500 de líquido ascítico contendo anticorpos monoclonais específicos para RNA bicatenário. A extracção das amostras, aplicação na placa, incubação e lavagens eram idênticas ao processo referido em 2.2.7.2. Depois das lavagens adicionava-se a cada alvéolo 20 µl de água contendo 1 µM de iniciador de jusante, incubava-se a 90°C durante 5 minutos e arrefecia-se a placa rapidamente em gelo. De cada alvéolo recolhiam-se 12,5 µl a que eram adicionados os restantes elementos da mistura de transcrição reversa definida anteriormente, num volume total de 20 µl. Os restantes passos eram idênticos ao descrito em 2.2.7.2., mas empregando volumes finais duplos (com as mesmas concentrações de reagentes).

2.2.7.5. Quantificação por fluorimetria do DNA amplificado.

Em alguns ensaios diluía-se uma fracção (1/5 a 1/3) dos produtos amplificados em 2 ml de TNE contendo 1 µg/ml de fluorocromo Hoechst 33258 e quantificada por fluorimetria (excitação a 353 nm, emissão a 453 nm).

2.2.8. Ensaios efectuados com vista a esclarecer o processo de libertação do RNA viral.

Na figura 2.2.8 estão esquematizados diversos tratamentos efectuados em quatro alvéolos de placas de microtitulação, numerados de 1 a 4. Em todos os casos empregou-se extracto de videira infectada com o isolamento U9. A imunocaptura realizou-se durante 4h a 37 °C.

Alvéolo 1: Após imunocaptura e lavagem foi incubado com uma RTmix em que o inibidor de ribonucleases (HPRI) foi substituído por 100 ng de RNase A, durante 30 min a 39 °C. O conteúdo foi recolhido para amplificar (Tratamento 1.1). No mesmo alvéolo, após nova lavagem com PBS-Tween, adicionou-se RTmix normal, incubou-se nas condições habituais de transcrição reversa, e recolheu-se o conteúdo para amplificar (Tratamento 1.2).

Alvéolo 2: Após imunocaptura e lavagem o alvéolo foi incubado com RTmix durante 30 min a 39 °C e o conteúdo recolhido para amplificar (Tratamento 2.1). No mesmo alvéolo, após nova lavagem com PBS-Tween, adicionou-se outra dose de RTmix, incubou-se nas condições habituais de transcrição reversa, e recolheu-se o conteúdo para amplificar (Tratamento 2.2).

Tratamento 3: Após imunocaptura e lavagem o alvéolo foi incubado com 100 ng de RNase em tampão de transcrição reversa durante 30 min a 39 °C. O alvéolo foi lavado com PBS-Tween, adicionou-se tampão de transcrição reversa e incubou-se 30 min a 39 °C. Recolheu-se uma aliquota (2µl) que foi adicionada a uma RTmix, incubada nas condições habituais de transcrição reversa e amplificada (Tratamento 3.1). No mesmo alvéolo, após nova lavagem com PBS-Tween, adicionou-se outra dose de RTmix, incubou-se nas condições habituais de transcrição reversa, e recolheu-se o conteúdo para amplificar (Tratamento 3.2).

Alvéolo 4: Após imunocaptura e lavagem o alvéolo foi incubado com tampão de transcrição reversa durante 30 min a 39 °C. Recolheu-se uma aliquota (2µl) que foi adicionada a uma RTmix, incubada nas condições habituais de transcrição reversa e finalmente amplificada (Tratamento 4).

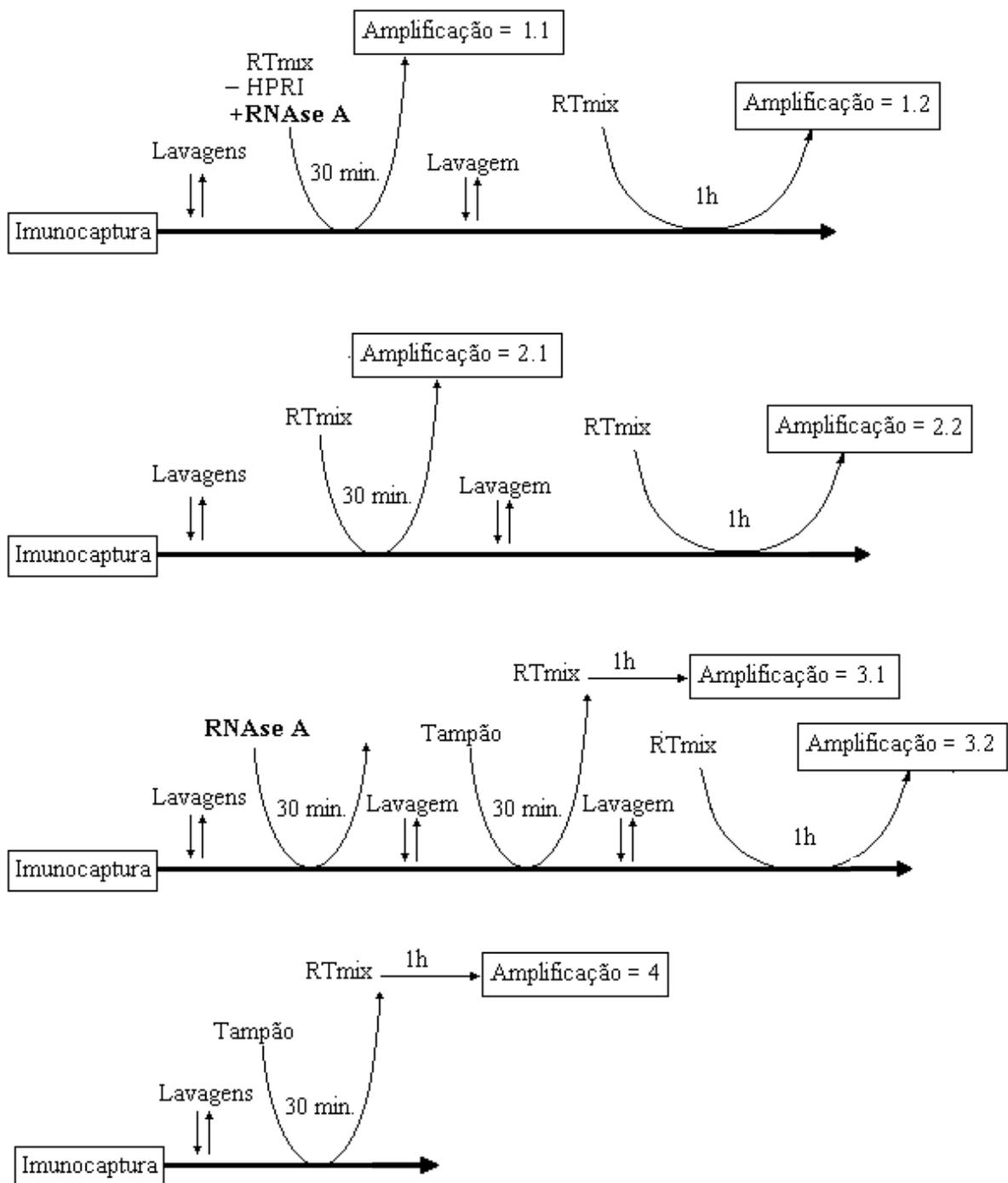


Fig. 2.2.8. Representação esquemática dos ensaios efectuados com vista a esclarecer o processo de libertação do RNA viral.

2.2.9. Marcação de sondas de DNA com Digoxigenina.

A marcação com digoxigenina foi efectuada por dois processos. No caso da sonda para o GFLV referida em 3.1.3, utilizou-se o Kit de marcação de Boehringer, "DNA non-radioactive labeling and detection kit" seguindo as instruções do fabricante. Para a marcação tomou-se o produto da reacção de amplificação do gene da proteína do capsídeo enxertado em pCGN.

No caso da sonda para o GFLV F13 sat RNA (empregue em 3.6), a marcação foi efectuada directamente a partir de um extracto de videira infectada com a estirpe F13, tendo-se aproveitado a reacção de amplificação por IC/RT-PCR para incorporar Dig-11-dUTP. Para aumentar a eficiência da marcação, isto é, para marcar um elevado número de cadeias de DNA com algumas moléculas de digoxigenina, em vez de marcar poucas cadeias de DNA com muitas moléculas de digoxigenina, optou-se por adicionar a digoxigenina apenas na etapa de amplificação. A transcrição reversa foi então efectuada com uma concentração de dNTPs mais baixa do que o habitual: 300 μM de cada dNTP. Os restantes dNTPs, incluindo Dig-11-dUTP, foram adicionados na etapa de amplificação. A concentração final de dNTPs nesta etapa foi então: 70 μM de dig-dUTP, 180 μM de dTTP e 260 μM de cada um dos outros. Depois da amplificação tomaram-se 7,5 μl dos produtos amplificados que foram fracionados por electroforese em gel de Agarose a 1% (Fig. 2.2.9).

certo fim desta pag, 58

Fig 2.2.9. Purificação por electroforese da sonda para GFLV F13 Sat RNA. 1) Produto da amplificação de GFLV F13 Sat RNA, não marcado. 2) idem, marcado com Digoxigenina; notar o atraso na migração. M4, pBR32 digerido com Hae III. Electroforese em gel de agarose a 1 %, coloração com brometo de etídio.

O bom sucesso da marcação com digoxigenina foi comprovado pelo característico atraso na migração electroforética (Lion e Haas, 1990). A sonda foi recuperada do gel por um processo adaptado de Koenen (1989): a zona do gel contendo a banda foi cortada e imersa 5 minutos em azoto líquido dentro de um microtubo de 0.5 ml cujo fundo havia

sido perfurado e coberto com um rolhão de algodão não hidrófilo. Este tubo foi em seguida centrifugado durante 15 minutos a 13 000 rpm a 4°C dentro de um segundo microtubo de 1,5 ml; neste processo a matriz de agarose ficou retida sobre o algodão e a fase aquosa contendo a sonda foi recolhida no segundo tubo; foi adicionada de 1/10 do seu volume em LiCl 4M e purificada por precipitação com etanol como habitualmente (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.10. Transferência tipo Southern para membranas de nylon e hibridação com as sondas para GFLV e GFLV sat RNA.

As amostras de DNA a analisar foram sujeitas a um fraccionamento em gel de agarose, coradas com brometo de etídio e visualizadas com UV. A transferência processava-se em condições alcalinas (NaOH 0,4 M) de um dia para outro para membranas de nylon (Hybond N⁺ ou Boehringer), segundo Sambrook *et al.* (1989). Alternativamente, a transferência era efectuada também em condições alcalinas mas empregando um aparelho de transferência por vácuo, durante 1h. No fim, a membrana era lavada em 20 x SSC durante 10 minutos, seca ao ar, fixada pelo calor (120 °C durante 20 min. no caso das membranas Boehringer ou 80 °C x 15 minutos para as membranas Hybond N⁺) e guardada.

A pré-hibridação foi efectuada durante 2h30 a 68 °C por imersão das membranas, dentro de uma bolsa de plástico, em 5 x SSC contendo 1 % de agente de bloqueio (Boehringer), 0,1 % de Laurilsarkosyne e 0,02 % de SDS. Para a hibridação, renovou-se a solução de pré-hibridação e adicionou-se a sonda que previamente havia sido desnaturada em água a ferver. A hibridação decorreu a 68 °C de um dia para outro. No final efectuaram-se 2 lavagens por imersão (5 minutos cada, a temperatura ambiente) em 2 x SSC contendo 0,1 % SDS e 2 lavagens (15 minutos cada, a 68 °C) em 0,1 x SSC contendo 0,1 % SDS. A membrana foi em seguida seca ao ar. A revelação dos resultados foi efectuada pelo kit "Dig nucleic acid detection kit" segundo protocolo do fabricante. Este kit baseia-se na detecção da digoxigenina por anticorpos marcados com fosfatase alcalina, seguida de incubação com um substrato enzimático cujos produtos são insolúveis.

Anexo 2-1. Protocolo de IC/RT-PCR, (caso do CTV).

- 1) Placas ELISA de fundo redondo. Revestimento em condições habituais (1/1000, 4h, 37°C) mas apenas 50 µl por alvéolo. Eventual armazenamento a - 20 °C das placas revestidas.
- 2) Extração de amostras (peciolos foleares ou casca de raminhos) 1/10 em PBS-Tween contendo 2% PVP. Aplicação de 50 µl por alvéolo. Incubação cerca de 16 h a 6°C.
- 3) Lavagem com PBS-Tween. Aplicação imediata de 10 µl de RT mix ou congelamento por vários dias.
- 4) Tapar os alvéolos com fita adesiva. Incubação 1 hora a 39 °C. Durante a incubação o plano da placa ELISA deverá ser mantido num plano inclinado (+/- 20 ° com a vertical) enquanto a placa gira em torno de um eixo perpendicular ao plano. Isto permitirá que a RT mix entre em contacto com toda a superfície revestida do alvéolo.
- 5) Congelamento da placa ou recolha do cDNA e transferência para um microtubo contendo já 38 µl de Amp mix e uma lentilha de cerca de 20 mg de cera (POLIWAX DIFCO 8829-18)
- 6) No termociclador:
 - Desnaturação 2 min a 94 °C
 - Patamar a 72 °C. Adição de 2 µl de Pyro mix
 - 5 ciclos:
 - 92 °C - 30 s
 - 52 °C - 30 s
 - 72 °C - 30 s
 - 30 ciclos:
 - 92 °C - 5 s
 - 52 °C - 30 s
 - 72 °C - 30 s
 - 1 ciclo:
 - 92 °C - 5 s
 - 52 °C - 30 s
 - 72 °C - 300s
- 7) Separação da cera: aquecer a 65 °C e inverter os tubos. A fase aquosa fica aderente ao fundo do tubo e a cera escorre pelas paredes onde solidifica.

Composição das misturas:

RT mix (volumes para 1 reacção):

Água estéril MiliQ	4.35 µl
Reverse Transcription buffer (5x conc., Gibco BRL)	2.00 µl
0.1 M DTT	1.00 µl
Iniciador de jusante (10 µM):	1.00 µl
dNTPs (10 mM cada nucleótido)	1.00 µl
Inibidor de Ribonucleases (Kabi Pharmacia)	0.15 µl
MMLV Reverse Transcriptase (Gibco BRL)	0.50 µl

Amp mix (volumes para 1 reacção):

Água estéril MiliQ	32.20 µl
Pyrostase buffer (10x conc., Biosynthesis)	4.80 µl
Iniciador de montante (10 µM)	1.00 µl

Pyro mix (volumes para 1 reacção):

Água estéril MiliQ	1.30 µl
Pyrostase buffer (10x conc., Biosynthesis)	0.20 µl
Pyrostase (Biosynthesis 2 units/µl)	0.50 µl

3. Resultados.

3.1. Desenvolvimento de um método de detecção de GFLV em videira.

3.1.1. Avaliação da eficiência dos iniciadores e optimização da concentração de magnésio na mistura de amplificação.

Para testar o funcionamento dos iniciadores bem como a melhor concentração de magnésio a empregar, ensaiou-se a amplificação a partir de um enxerto do gene da proteína do capsídeo em pCGN previamente cortado com Sph I. Conforme se pode observar na Fig. 3.1.1, obtem-se a amplificação de um segmento de DNA com o tamanho esperado (568 nt). Quanto à concentração de magnésio, ensaiaram-se várias concentrações a partir de um valor base de 1,5 mM Mg^{2+} que normalmente já vem incluído nos tampões fornecidos pelos fabricantes da Taq polimerase. Não é nítida a existência de um óptimo na gama de valores ensaiados, contudo, com maiores concentrações de plasmídeo e de magnésio parece haver um aumento de produtos inespecíficos heterogêneos. Passou então a empregar-se uma concentração de 2,1 mM Mg^{2+} ou de 1,5 mM Mg^{2+} , conforme a amplificação fosse ou não precedida de transcrição reversa. Na prática, tal corresponde a não adicionar mais magnésio do que o que já vem habitualmente incluído nos tampões da transcriptase reversa e da Taq polimerase fornecidos pelos fabricantes.

estapag 61

Fig. 3.1.1 Efeito da concentração de DNA e de magnésio na amplificação. A amplificação foi feita com pCGN previamente linearizado, contendo um enxerto do gene da proteína do capsídeo de GFLV. M3, DNA de Fago lambda digerido com Pst I. Electroforese da direita para a esquerda, gel corado com brometo de etídio.

Em ensaios de diluições sucessivas foi possível efectuar a amplificação com quantidades de plasmídeo inferiores a 10^{-13} g de DNA.

3.1.2. Transcrição reversa e amplificação a partir de preparações de ácidos nucleicos totais extraídos de folhas de videira infectada com GFLV.

Dada a prévia experiência de dificuldade de extrair RNA a partir de tecidos de videira pelo método clássico do fenol - clorofórmio, fizeram-se várias extracções de ácidos nucleicos empregando agentes caotrópicos e efectuaram-se alguns ensaios em que aliquotas destas preparações eram empregues em reacções de transcrição reversa seguida de amplificação, mas sem sucesso. Para investigar se a ausência de produtos de amplificação se devia a problemas na etapa de transcrição reversa ou de amplificação, efectuaram-se tentativas de transcrição reversa de algumas dessas preparações empregando um nucleótido marcado com [α - 32 P]. Após fraccionamento por electroforese em gel de agarose não se detectou qualquer sinal radioactivo correspondente a produtos de Mr elevado, concluindo-se pela inexistência de síntese de cDNA.

3.1.3. Emprego de anticorpos para efectuar uma prévia purificação de GFLV: "Immunocapture Reverse Transcriptional Polymerase Chain Reaction" (IC-RT/PCR).

Partindo do princípio de que a inexistência de síntese de cDNA se deveria provavelmente à dificuldade de extracção de RNA viral com suficiente integridade a partir dos tecidos de videira, surgiu a ideia de efectuar uma prévia purificação do vírus por algum método expedito. Uma possibilidade seria o emprego de anticorpos, tal como efectuado por McCaustland *et al.* (1991) para o vírus da Hepatite E. Contudo em vez de se efectuar a purificação do complexo vírus - anticorpo por ultra centrifugação, tal como aqueles autores, optou-se por empregar anticorpos adsorvidos a uma placa de microtitulação, eliminando-se os demais componentes do extracto por lavagens tal como na técnica ELISA.

Em ensaios iniciais, estudou-se a extracção do RNA viral no próprio alvéolo após a lavagem da placa: para o efeito comparou-se o tratamento dos alvéolos com perclorato de sódio, isotiocianato de guanidinium ou proteinase K, seguido de extracção com fenol e concentração do RNA viral com etanol. Verificou-se que era possível efectuar a amplificação, mas de modo muito ineficiente, com este último tratamento.

A extracção do RNA viral por aqueles métodos resultava bastante trabalhosa pois implicava passos adicionais de extracção com fenol e precipitação com etanol para eliminar o agente de disrupção das partículas virais. Estudou-se então possibilidade de efectuar essa desnaturação por meios físicos. Segundo resultados de estabilidade térmica de GFLV referidos por Quacquarelli *et al.* (1976), uma etapa de congelação a -70 °C

seguida de aquecimento a 67 °C possibilitariam a libertação do RNA viral. De facto, esta aproximação possibilitou bons resultados (Fig. 3.1.3-1).

esta pag 63

Fig. 3.1.3-1. Amplificação de diversas diluições de extracto de videira infectada com GFLV e comparação com a técnica ELISA. Os resultados da amplificação foram analisados por electroforese (1/3 dos produtos) e fluorimetria (1/5 dos produtos). M3, Fago Lambda digerido com Pst I. Electroforese em 5% de poliacrilamida, da direita para a esquerda. Gel corado com brometo de etídio. Valor obtido com o controlo negativo, por fluorimetria, 42. Os resultados por ELISA foram obtidos ao fim de 1h30 de incubação com o substrato e já estão subtraídos do valor correspondente ao controlo negativo.

No seguimento verificou-se que na etapa de disrupção térmica era possível dispensar quer o congelamento quer o aquecimento ou ainda, muito surpreendentemente, que era possível dispensar totalmente esta etapa. Obteve-se assim o método representado esquematicamente na Fig. 3.1.3-2.

Resumidamente, as amostras são preparadas como para a técnica ELISA e o vírus capturado numa placa de microtitulação previamente revestida de anticorpos específicos para o vírus. Após lavagem da placa e eliminação do extracto da planta, os reagentes da mistura de transcrição reversa são directamente adicionados ao alvéolo proseguindo-se com a síntese do cDNA e em seguida a amplificação.

O produto principal da amplificação por este método era um fragmento com o comprimento esperado, 568 nt. Por vezes, com algumas amostras de plantas infectadas, podiam-se observar também outras bandas mais ténues. Nunca se observaram quaisquer bandas em amostras obtidas de plantas de controlo negativo. Para comprovar que os produtos da amplificação eram específicos do GFLV, efectuou-se uma transferência do tipo "Southern" para uma membrana de nylon seguida de hibridação com uma sonda marcada com digoxigenina, obtida por amplificação do enxerto do gene da proteína do capsídeo no plasmídeo pCGN (Fig. 3.1.3-3).

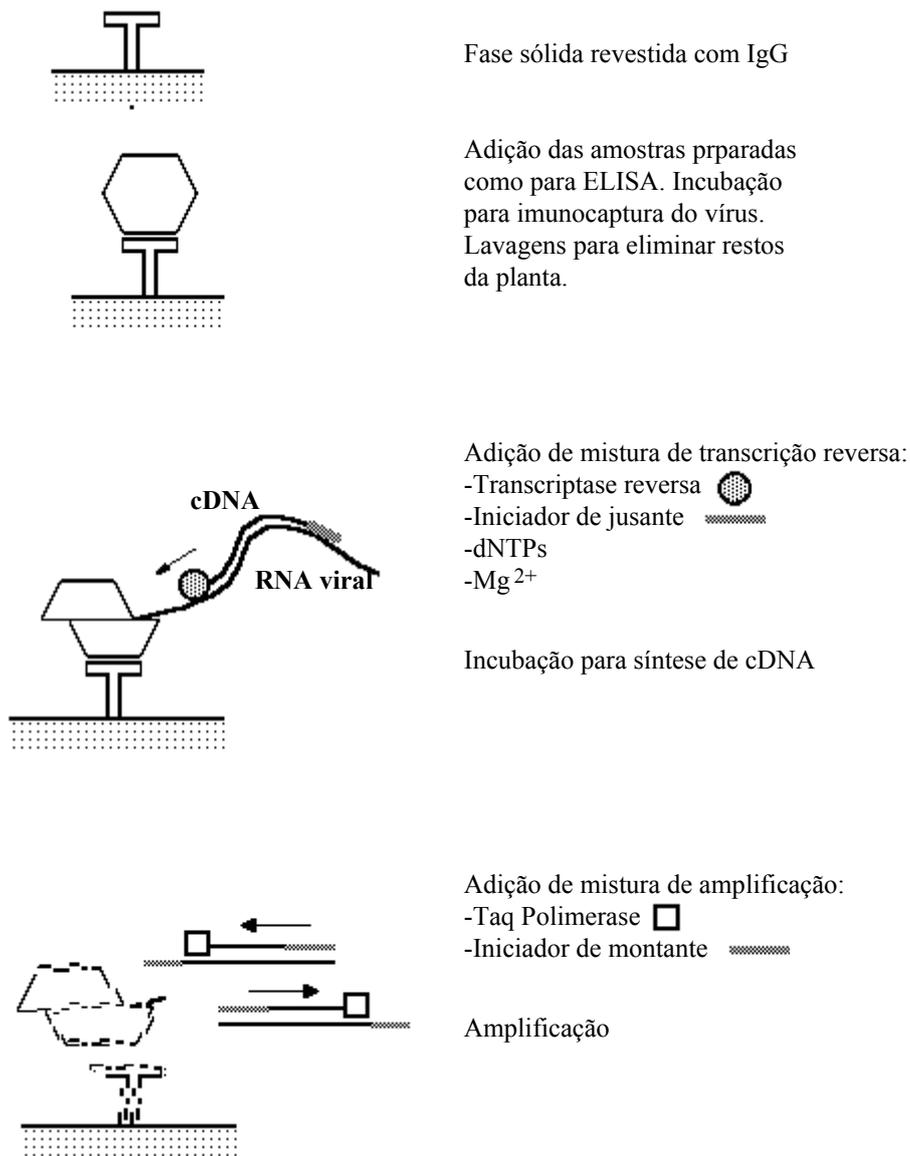


Fig. 3.1.3-2. "Immunocapture Reverse Transcriptional Polymerase Chain Reaction", IC/RT-PCR.

O aperfeiçoamento deste método, que como se verá é generalizável a outros vírus e agentes sub-virais, e que possibilita a imunocaptura do vírus seguida de transcrição reversa, amplificação e detecção dos produtos de amplificação numa mesma placa de microtitulação, levou á apresentação de um pedido de patente no "Registro de La Propriedad Industrial de España" (Nolasco *et al.*, 1992).

esta pag 65

Fig. 3.1.3-3. **A-** Fraccionamento em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação provenientes de duas videiras sãs, 1) e 3), e duas videiras infectadas com GFLV, 2) e 4). M3, DNA de Fago Lambda digerido com Pst I. Coloração com brometo de etídio. **B-** Transferência (tipo Southern) para uma membrana de nylon e hibridação com uma sonda marcada com digoxigenina, obtida do gene da proteína do capsídeo de GFLV.

3.1.4. Optimização das condições de transcrição reversa e amplificação

Efectuaram-se diversos ensaios com o objectivo de reduzir a quantidade e custo dos reagentes e também de melhorar o limiar de detecção. Nesse sentido procurou-se diminuir o volume das reacções o que permitiu aumentar as concentrações dos reagentes dispendiosos sem aumentar a sua quantidade.

esta pag 65

Fig 3.1.4. Amplificação de diversas diluições de extracto de videira infectado com GFLV. Electroforese (da direita para a esquerda) em gel de poliacrilamida a 6,5 %; coloração com nitrato de prata. Está assinalada a posição do produto de amplificação esperado (568 bp).

No que respeita aos patamares térmicos não se observou uma influência significativa da temperatura de incubação da transcrição reversa entre 37 °C e 42 °C, ou da temperatura de hibridação dos iniciadores durante a amplificação, entre 52 °C e 63 °C. Pelo contrário, já a temperatura e duração do patamar de desnaturação têm um forte efeito, tendo-se melhorado substancialmente os resultados ao reduzir a temperatura de 94 °C para 92 °C e a duração de 1 minuto para 5 segundos.

A integração destas e de outras alterações de menor importância resultaram no protocolo apresentado em Materiais e Métodos. Com este protocolo era possível detectar a amplificação quando o extracto da planta era diluído 1/800 000 (Fig. 3.1.4).

3.1.5. Estudo da influência alguns factores no processo de imunocaptura com GFLV

O efeito da concentração de IgG empregue no revestimento da fase sólida não parece ser um factor crítico, no intervalo de valores ensaiados, entre 2 µg/ml e 0,25 µg/ml, a avaliar pelos resultados da Fig. 3.1.5-1. É de notar que se poderá assim utilizar uma concentração de anticorpos mais baixa do que a habitualmente empregue na técnica ELISA, embora neste trabalho se tenha na maioria dos casos empregue uma concentração de 1 µg/ml. Por outro lado, o emprego de soro bruto ou da fracção IgG conduziu a resultados equivalentes (não apresentados).

esta pag 66

Fig. 3.1.5-1. Efeito da concentração de IgG empregue na imunocaptura. **A** e **B** extractos de duas videiras infectadas com GFLV incubados em alvéolos revestidos com a concentração inducada de IgG. **C**, extracto de planta não infectada, concentração de IgG: 1 µg/ml. **M3**, Fago Lambda digerido com Pst I. Electroforese (da direita para a esquerda) em 1% de agarose, gel corado com brometo de etídio.

Comparando anticorpos policlonais de origem diversa observou-se uma ligeira melhoria nos resultados obtidos com anticorpos homólogos do isolamento testado (Fig. 3.1.5-2,A).

Num número limitado de ensaios com vários isolamentos experimentou-se também a imunocaptura com anticorpos específicos para outros Nepovírus. Verificou-se que era possível obter amplificação quando a imunocaptura era efectuada com anticorpos para o ArMV bem como, mas com menor intensidade, com anticorpos para o Raspberry Ringspot Vírus, Strawberry Latent Ringspot Vírus e Grapevine Bulgarian Latent Vírus (Fig. 3.1.5-2,C). A avaliar pela intensidade das bandas, não parece haver diferença na capacidade de imunocaptura pelos anticorpos para estes últimos vírus. A possibilidade de estas amplificações resultarem de um efeito inespecífico de adsorção do vírus ao poliestireno (efeito possível com o CMV, ver 3.3.2.) ou de qualquer outro efeito dos anticorpos, foi testada em paralelo (Fig. 3.1.5-2,B), empregando alvéolos não revestidos ou revestidos com anticorpos específicos para o CMV, e rejeitada.

Quadro 3.1.5.- Valores obtidos por ELISA com isolamentos que é possível amplificar após imunocaptura com anticorpos específicos para ArMV.

Isolamento	Revestimento e conjugado GFLV-U9	Revestimento e conjugado ArMV
24	1,48	0,17
35	1,38	0,18
28	0,83	0,08
U9 (*)	0,30	0,06
ArMV	-0,05	1,25

Os valores das absorvâncias a 405 nm já estão subtraídos do valor correspondente ao controlo negativo. As medições foram feitas ao fim de 1h30.

(*)- Os valores anormalmente baixos obtidos com este isolamento devem-se ao facto de ser mantido em estufa e o ensaio ter sido realizado no início do verão.

Esta reactividade dos anticorpos para o ArMV foi também abordada pela técnica ELISA (Quadro 3.1.5), observando-se que algumas das amostras amplificadas com imunocaptura por anticorpos para o ArMV originavam resultados positivos e resultados duvidosos quando se empregavam reagentes específicos para o ArMV. Eventualmente estas amostras poderiam estar duplamente infectadas com GFLV e ArMV e a amplificação obtida após imunocaptura por anticorpos específicos para o ArMV corresponder à amplificação do próprio ArMV, por falta de especificidade dos

iniciadores para o GFLV. Contudo, verificou-se com um isolamento de ArMV que o par de iniciadores empregue para o GFLV praticamente não permite a amplificação do ArMV (Fig 3.1.5-2,D). Por outro lado, pelo menos no caso do isolamento U9 e a avaliar pelos resultados de tipificação genómica por SSCP (ver cap. 3) não se detectam diferenças de sequência entre os fragmentos amplificados após imunocaptura com anticorpos para ArMV ou para GFLV, o que parece indicar que ambos os anticorpos capturam o mesmo isolamento.

esta pag 68

Fig. 3.1.5-2. Emprego de anticorpos de diversa especificidade na imunocaptura de GFLV. **A-** 1) e 3), isolamento U9 capturado respectivamente com anticorpos C110 e U9 (antisoro homólogo); 2) e 4), outro isolamento capturado com anticorpos C110 e U9. **B-** Isolamento U9 capturado 1) com anticorpos para CMV, 2) por adsorção directa ao poliestireno, 3) com anticorpos para ArMV e 4) com anticorpos U9 (antisoro homólogo). **C-** Isolamento U9 capturado 1) por adsorção directa ao poliestireno, 2) com anticorpos para GBLV, 3) com anticorpos para SLRV, 4) com anticorpos para RRV-grapevine strain e 5) com anticorpos para RRV-cherry strain. **D-** 1) e 2) SLRV e ArMV capturados com anticorpos U9; 3) a 6) Isolamento U9, isolamento 24, ArMV e SLRV capturados com anticorpos para ArMV. Todas as amplificações foram efectuadas com os iniciadores para GFLV. Electroforese em gel de poliacrilamida a 5%, coloração com brometo de etídio. M1, DNA de Fago Lambda digerido com Hind III; M4, pBR32 digerido com Hae III.

Relativamente ao tempo de incubação para a imunocaptura, obtêm-se resultados aparentemente semelhantes com incubações curtas (da ordem das 4h) a 37 °C ou de um dia para outro a 6 °C (Fig. 3.1.5-3). Contudo, quando se analisam extractos altamente diluídos obtêm-se melhores resultados com incubações de um dia para outro. Por outro lado, incubações da ordem de 1h são manifestamente insuficientes.

esta pag 69

Fig. 3.1.5-3. Efeito da duração e temperatura de incubação da imunocaptura. Electroforese (da direita para a esquerda) em gel de poliacrilamida a 5%, coloração com brometo de etídio.

Por ser menos dispendioso que o tampão de extracção geral referido em Materiais e Métodos, ensaiou-se também a extracção e incubação dos extractos em PBS-Tween contendo 2% PVP e 1% de sulfato de nicotina, tampão que é habitualmente empregue na técnica ELISA com este vírus. Por razões não esclarecidas os resultados obtidos com este tampão foram pouco consistentes, obtendo-se nalguns ensaios resultados piores, noutros, equivalentes.

esta pag 69

Fig. 3.1.5-4. Efeito do pH e composição do tampão de extracção. Os extractos foram obtidos em: 1) a 3), 0,2 M Tris contendo 2% PVP, 0,8% NaCl, 0,05 % Tween e 1% de sulfato de nicotina, respectivamente a pH 7,5 , pH 8 e pH 8,3; 4) tampão de extracção geral referido em materiais e métodos; 5) PBS-Tween contendo 2%PVP e 1% sulfato de nicotina, pH 7,4; 6) idem, mas a primeira lavagem com PBS-Tween foi substituída por uma incubação de 3 minutos com Tris 1M pH 9. A Incubação das amostras decorreu a 37 °C durante 4 horas. Electroforese em gel de agarose a 1%, coloração com brometo de etídio.

3.1.6. Ensaio efectuado com vista a melhor compreender o processo libertação do RNA viral.

Uma vez que não era necessário efectuar qualquer tratamento para tornar o RNA viral acessível à RTase, pensou-se inicialmente que o choque de variação de pH entre as etapas de extracção, lavagem e de transcrição reversa (8,0 - 7,4 - 8,3) produziria uma desestabilização ou mesmo disrupção do capsídeo, conduzindo à libertação do RNA viral. No entanto veio a verificar-se que não havia qualquer efeito nítido pelo facto de a extracção e imunocaptura ser efectuada a diferentes valores de pH, entre 7,2 e 8,3, ou resultante de uma curta incubação a pH 9,0 imediatamente antes da adição da mistura de transcrição reversa (Fig. 3.1.5.4)

Para determinar em que etapa ocorria a libertação do RNA viral, efectuaram-se algumas experiências em que, partindo de extracto de plantas infectadas e, após a imunocaptura e lavagens, se trataram os alvéolos da placa de microtitulação com RNase A. Depois de algumas experiências prévias, efectuaram-se os ensaios esquematizados na Fig. 2.2.8 (Materiais e métodos)

Como esperado, verificou-se que a substituição do inibidor de ribonucleases por RNase A na mistura de transcrição reversa não permite a síntese de cDNA (Fig. 3.1.6, tratamento 1.1). Em ensaios prévios havia-se verificado que a ausência do inibidor de ribonucleases não é impeditiva da síntese de cDNA, embora melhorasse os resultados; portanto este ensaio mostra o bom funcionamento da RNase A nas condições empregues. O mesmo alvéolo em que se efectuou este tratamento foi em seguida incubado com uma mistura de transcrição reversa normal (Fig 3.1.6, tratamento 1.2), tendo-se então produzido cDNA que foi amplificado com sucesso.

Fig 3.1.6. Fraccionamento electroforético dos produtos de amplificação obtidos após diversos tratamentos referidos em 2.8 (Materiais e métodos). M1, DNA de Fago Lambda digerido com Hind III. Gel de poliacrilamida a 5% corado com brometo de etídio.

Portanto o RNA viral não está exposto antes da adição da mistura de transcrição, pois nesse caso não haveria qualquer amplificação. Contudo há aparentemente uma contradição entre o facto de a RNase A ter impedido a síntese de cDNA em 1.1 mas não em 1.2 . A não ser que a exposição do RNA fosse um processo gradual; nesse caso a amplificação no tratamento 1.2 seria possível pois corresponderia a RNA libertado já na ausência de RNase A.

Esta hipótese foi testada efectuando no mesmo alvéolo duas transcrições reversas sucessivas intervaladas por uma lavagem (Fig. 3.1.6, tratamentos 2.1 e 2.2), tendo-se verificado correcta.

Noutro alvéolo previamente tratado com RNase A verificou-se que a incubação só com tampão (de transcrição reversa) apenas permite a amplificação ao nível vestigial (Fig. 3.1.6, tratamento 3.1). Contudo, no mesmo alvéolo (Fig. 3.1.6, tratamento 3.2), a posterior adição de mistura de transcrição reversa completa permitiu obter o nível habitual de amplificação. Noutro alvéolo não tratado com RNase A (Fig. 3.1.6, tratamento 4) efectuou-se uma incubação com tampão apenas, obtendo-se resultados semelhantes ao tratamento 3.1; a fraca amplificação não se deve portanto a resíduos de RNase A no alvéolo.

Parece portanto que a libertação do RNA viral é um processo gradual que está associado à presença (porventura à actividade) da mistura de transcrição reversa.

3.2. Generalização da metodologia IC/RT-PCR a outros vírus e patogéneos sub-virais.

Numa série de ensaios verificou-se que a metodologia de IC/RT-PCR desenvolvida para o GFLV era também aplicável a outros vírus e patogéneos sub-virais (Fig 3.2.1), obtendo-se os fragmentos com os tamanhos esperados. Tal como no caso do GFLV algumas das amostras conduziram ao aparecimento de outras bandas para além da esperada; estas bandas eram contudo específicas do patogéneo visto nunca aparecerem nas amostras de controlo negativo.

No caso do PMMV era conspícuo para além do fragmento esperado, outro com cerca de 350 nt. Para estudar a possível origem deste fragmento fez-se uma análise mais aprofundada das possibilidades de hibridação dos iniciadores com o genoma viral. Verificou-se que a extremidade 3' do iniciador de jusante pode estabelecer 6 ligações contíguas com os nucleótidos 1062 a 1067 do genoma viral e mais algumas outras, isoladas até ao nucleótido 1082. Dadas as condições pouco restritivas da etapa de

No caso do RNA satélite do isolamento F13 a identidade do produto amplificado foi ainda verificada por meio de digestão com 4 enzimas de restrição (Fig. 3.2-2), tendo-se obtido os fragmentos esperados com 3 das enzimas. A digestão com Taq I originou um fragmento de cerca de 270 nt em lugar de dois fragmentos esperados de 172 e 95, que no genoma são adjacentes. A interpretação mais simples será a existência de uma mutação pontual que terá acarretado a perda de um local de corte de Taq I.

Fig. 3.2-2. Digestão do produto amplificado de GFLV F13 sat-RNA com diversas enzimas de restrição. **A-** 1) a 4) Digestão respectivamente com Taq I, Msp I, Hinf I e Hae III. Electroforese em 6,5 % de acrilamida; gel corado com brometo de etídio. **B-** Coloração com prata da região assinalada em A, verificando-se a presença de um fragmento difícil de observar com brometo de etídio. M4, pBR32 digerido com Hae III.

Os fragmentos de restrição esperados são os seguintes:

1- Taq I:	137,	172,	95	
2- Msp I:	96,	193,	8,	112
3- Hinf I:	139,	270		
4- Hae III:	160,	12,	180,	57.

Os dois fragmentos de Taq I assinalados em *itálico* apareceram no gel substituídos por um único fragmento de cerca de 270 bp.

3.3. Outras variantes do método de enriquecimento selectivo de vírus.

3.3.1.- Imunocaptura com anticorpos específicos para RNA bicatenário.

Para obviar a necessidade de se dispôr de anticorpos específicos para a proteína do capsídeo, o que permitiria alargar esta metodologia a casos de vírus defectivos, viróides ou outros agentes similares mal caracterizados, ensaiou-se a captura dos RNA bicatenários associados à infecção viral por meio de anticorpos (Fig. 3.3.1). Nos casos experimentados, os fragmentos amplificados eram de tamanho idêntico aos obtidos com imunocaptura específica. Já a intensidade das bandas não era idêntica em todos os casos,

tendo-se obtido melhores resultados com a captura específica nos casos de GFLV e CTV. Noutros casos não havia diferenças significativas entre os dois métodos.

Fig. 3.3.1. Imunocaptura de RNA de diversos vírus efectuada com anticorpos para RNA bicatenário. 1) BYMV. 2) CMV. 3) GFLV. 4) CLRV. 5) CMV sat RNA. 6) e 7) TSWV em pimenteiro e tabaco. 10) e 11) dois CTV. No caso do TSWV compara-se a captura com anticorpos específicos para o vírus em, 8), pimenteiro e, 9), tabaco. No caso do CTV, a captura com anticorpos específicos está apresentada em 12) e 13). M5, 1 Kb DNA Ladder, Gibco BRL; M3, Fago lambda digerido com Pst I. M2, Fago lambda digerido com Hind III e Eco RI. Coloração com brometo de etídio.

3.3.2. Captura sem anticorpos.

A adsorção directa do vírus ao poliestireno foi também ensaiada; apenas no caso do CMV possibilitou a obtenção de resultados comparáveis à imunocaptura específica (resultados não mostrados)

3.3.3. IC/RT-PCR em alvéolos em que foi realizado o teste ELISA

Esta variante poderá ter interesse quando se pretenda confirmar rapidamente um resultado duvidoso por ELISA. O caso apresentado na Fig. 3.3.3, que foi obtido com um extracto congelado alguns dias antes, seria considerado duvidoso pelo ELISA. Verifica-se não haver grande diferença quando a transcrição reversa é efectuada logo após a imunocaptura ou apenas depois da incubação com o substracto enzimático.

Fig. 3.3.3. Amplificação a partir de alvéolos onde decorreu a técnica ELISA. 1) Após se ter efectuado a técnica ELISA, incluindo uma incubação com substrato enzimático durante 1h30 (diferença de absorvância relativamente ao controlo negativo: 0,069), lavou-se o alvéolo e adicionou-se a mistura de transcrição reversa, procedendo-se em seguida segundo o protocolo habitual. 2) Após a imunocaptura procedeu-se segundo o protocolo usual. M1, Fago Lambda digerido com Hind III. Electroforese em poliacrilamida a 6,5 %, coloração do gel com brometo de etídio.

3.4. Quantificação fluorimétrica do DNA amplificado como alternativa ao fraccionamento electroforético.

Num número limitado de ensaios avaliou-se a possibilidade de substituir o fraccionamento electroforético por uma quantificação fluorimétrica do DNA amplificado com o objectivo de determinar se uma amostra seria negativa ou positiva. Nos dois exemplos apresentados, Figs 3.1.3-1 e 3.4, em que se empregou apenas uma fracção (1/5) do produto amplificado, o limiar de detecção parece situar-se entre o do ELISA e o da electroforese. É de notar que no caso do CTV, a sensibilidade por fluorimetria foi cerca de três ordens de grandeza superior à do ELISA.

Fig.

3.4

Fig. 3.4. Amplificação por IC/PCR de diversas diluições de extractos de *citrus sinensis* infectado com CTV e comparação com os resultados obtidos pela técnica ELISA. A detecção do produto da amplificação foi feita por fraccionamento electroforético de 1/3 dos produtos de amplificação em gel de 1% de agarose e por análise fluorimétrica de 1/5 dos produtos. Os resultados por ELISA foram obtidos ao fim de 1h30 de incubação com o substrato e já estão subtraídos do valor correspondente ao controlo negativo. O valor obtido por fluorimetria para o controlo negativo foi 22. O gel foi corado com brometo de etídio. M3, DNA de fago Lambda digerido com Pst I.

3.5. Fiabilidade da técnica IC/RT-PCR relativamente à técnica ELISA.

Com os objectivos de verificar se a metodologia IC/RT-PCR, nomeadamente o par de iniciadores que foi concebido para um dado isolamento, seria aplicável à generalidade dos isolamentos de cada vírus, e de comparar o seu desempenho com o da técnica

ELISA, efectuou-se um pequeno rastreio por ambos os métodos cobrindo isolamentos de origem geográfica e sintomatologia distinta.

3.5.1. Ensaio com GFLV.

O rastreio foi efectuado de Maio a Julho. No total foram testadas 107 plantas (Vide anexo 3.1, no final da secção de resultados), na sua maioria mantidas no campo. Alguns dos resultados obtidos por ambas as técnicas estão apresentados na Fig. 3.5.1.

É de notar a existência de algum polimorfismo quanto ao tamanho do produto amplificado e à presença de algumas bandas inespecíficas. Por outro lado não parece haver uma relação entre a intensidade (avaliada a olho) da banda electroforética correspondente ao produto específico e o valor de A_{405} . Em alguns casos, a valores elevados de absorvância correspondem bandas bastante fracas, ou mesmo, impossibilidade de detectar amplificação.

Fig 3.5.1

Fig. 3.5.1. Comparação dos resultados obtidos por ELISA e IC/PCR com diversos isolamentos de GFLV. Os valores de absorvância apresentados já estão subtraídos do valor correspondente ao controlo negativo e foram obtidos ao fim de 1h30 de incubação com o substrato. A electroforese (da direita para a esquerda) foi em gel de poliacrilamida a 6,5%; coloração com brometo de etídio. Em cada canal foi analisado 1/10 do produto amplificado. Nos canais assinalados com (*) foi possível observar-se após coloração com nitrato de prata, a banda de 568 nt.

De um total de 80 amostras positivas por ELISA encontraram-se 7 amostras negativas por IC/RT-PCR. Alguns destes testes foram repetidos, mas sem alteração dos resultados. No gráfico 3.5.1-1 apresentam-se os valores obtidos por ELISA para as amostras negativas por IC/RT-PCR. Como se pode verificar, algumas destas amostras apresentam valores bastante afastados da zona de valores de interpretação duvidosa por ELISA.

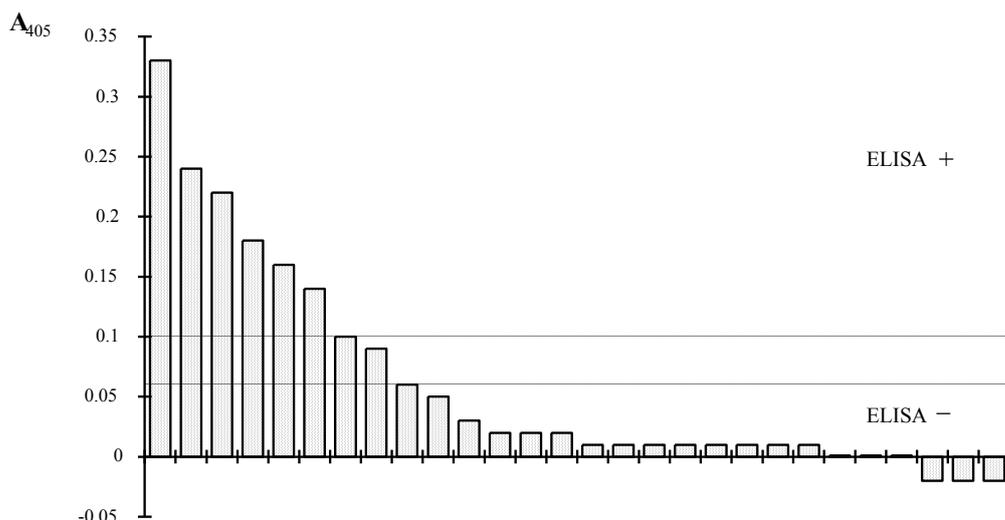


Gráfico 3.5.1-1. GFLV: Valores obtidos por ELISA para as amostras negativas por IC/RT-PCR. Os valores de absorvância foram medidos ao fim de 1h30 de incubação com o substrato, e já estão subtraídos do valor correspondente ao controle negativo.

Por seu turno, em 25 amostras negativas por ELISA 7 eram positivas por PCR. (Gráfico 3.5.1-2). Nestes casos as bandas eram geralmente de fraca intensidade.

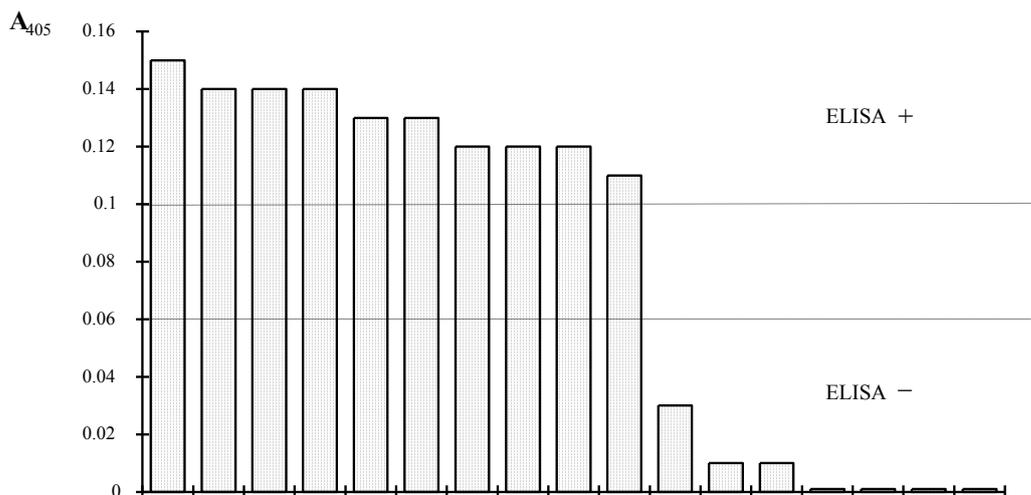


Gráfico 3.5.1-2. GFLV. Amostras positivas por IC/RT-PCR, que correspondem a baixos valores por ELISA ($A_{405} < 0,15$). Os valores de absorvância foram medidos ao fim de 1h30 de incubação com o substrato, e já estão subtraídos do valor correspondente ao controle negativo.

3.5.2. Ensaio com CTV.

Antes de efectuar o rastreio procedeu-se ao acerto de algumas condições de trabalho de IC/RT-PCR com vista a facilitar o processamento de um maior número de amostras. Assim verificou-se que se podiam obter resultados equivalentes usando para meio de extracção PBS-Tween contendo 2% de PVP em vez do meio empregue para o GFLV e outros vírus.

Obtinham-se também bons resultados quer a amostra fosse constituída por tecidos de lançamentos com crescimento primário ("raminhos"), casca de ramos com crescimento secundário, limbo ou pecíolo foliar; este é particularmente favorável pois por ser facilmente destacável facilita o processo de preparação das amostras. O vírus era ainda detectável no floema dos chamados porta enxertos resistentes (eg. Citrange Troyer), mas não nas raízes.

O rastreio foi efectuado ao longo de todo o ano, incidindo sobre amostras com características diversas: isolamentos de CTV de origem geográfica distinta, amostras que noutros laboratórios haviam dado resultados duvidosos por ELISA com anticorpos policlonais e amostras colhidas num pomar onde os Serviços de Agricultura haviam detectado um foco de infecção resultante de introdução clandestina de material de propagação vegetativa. A grande maioria destas amostras foi novamente testada por ELISA com anticorpos monoclonais.

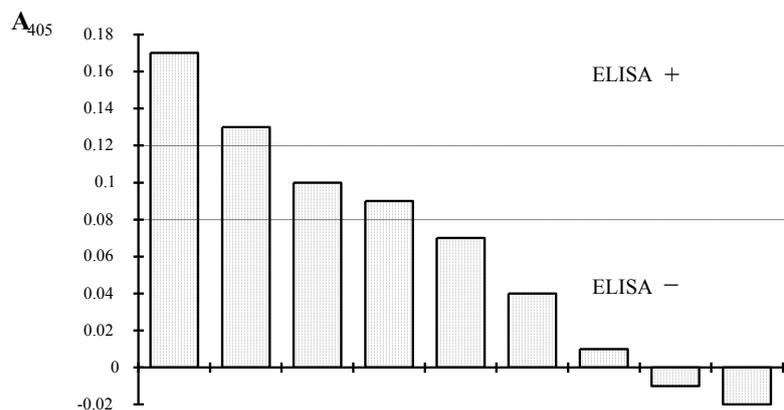


Gráfico 3.5.2. CTV. Amostras positivas por IC/RT-PCR, que correspondem a baixos valores por ELISA ($A_{405} < 0.2$). Os valores de absorvância foram medidos ao fim de 1h30 de incubação com o substrato, e já estão subtraídos do valor correspondente ao controle negativo. Todas as amostras com valores por ELISA mais elevados (não representadas) foram positivas por IC/RT-PCR.

pagina inteira Fig. 3.5.2

Fig. 3.5.2. Comparação de alguns resultados obtidos por IC/RT-PCR e ELISA com diversos isolamentos de CTV. ELISA: Os valores apresentados referem-se á absorvância depois de subtraída do valor correspondente ao contróló negativo, tendo sido medida ao fim de 1h30 de incubação com o substrato. IC/PCR: O produto de amplificação das amostras marcadas com (*) só foi visível após coloração com nitrato de prata. O fraccionamento electroforético (da direita para a esquerda) foi feito em gel de poliacrilamida a 6,5%. A coloração foi com brometo de etídio.. M1, DNA de fago Lambda digerido com Hind III; M2, idem digerido comHind III e Eco RI.

Como se pode verificar no anexo 3.2 (no final da secção de resultados), de um total de 64 amostras testadas por ambas as técnicas, 50 eram positivas por ELISA. Todas as amostras positivas por ELISA eram-no também por IC/RT-PCR. Duas amostras com resultados duvidosos por ELISA resultaram positivas por IC/RT-PCR. Em 14 amostras negativas por ELISA, 5 eram positivas por IC/RT-PCR. No gráfico 3.5.2 apresentam-se os resultados das amostras positivas por IC/RT-PCR, a que correspondem os mais baixos valores por ELISA. Na Fig 3.5.2, apresenta-se o resultado do fraccionamento electroforético do produto de IC/RT-PCR de algumas amostras.

3.6. Detecção do RNA satélite de GFLV.

No início do verão efectuou-se um número limitado de tentativas de detecção do RNA satélite de GFLV numa colecção de diversos isolamentos, mantida em estufa. Em contraste com o resultado da amplificação da própria estirpe F13, obtiveram-se na maioria dos casos várias bandas correspondentes a fragmentos menores que o esperado (409 bp) para a amplificação específica deste satélite (Fig 3.6, A). Para além destas bandas, algumas amostras apresentavam na posição correcta uma banda bastante fraca. A amostra de controlo negativo para o satélite (F13M), não apresentava qualquer banda.

fig

3.6

10

cm

Fig. 3. 6. Detecção de GFLV Sat RNA. **A-** Fraccionamento electroforético (da direita para a esquerda) em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação de diversas amostras. M4, pBR32 digerido com Hae III. Coloração com brometo de etídio. **B-** transferência tipo "Southern" para uma membrana de nylon e hibridação com uma sonda obtida de GFLV F13 Sat RNA, marcada com Digoxigenina.

Para esclarecer este assunto empregou-se uma sonda obtida por amplificação do RNA sat da própria estirpe F13. Esta sonda foi utilizada para testar por hibridação em membrana os produtos de amplificação daquelas amostras (Fig 3.6, B), tendo-se confirmado que a banda ténue que aparecia em alguns casos na posição correcta,

correspondia a um produto de amplificação específico. Também se pode verificar na mesma figura que as outras bandas não estão relacionadas com a sonda que foi empregue.

Ficou portanto provada a ocorrência em videiras de campo de um RNA encapsidado pela proteína de GFLV e relacionado com o satélite da estirpe F13 deste vírus. Foi também possível verificar a presença deste RNA no isolamento GH, de origem francesa, que à priori se sabia conter o satélite (Fuchs *et al.*, 1991a).

Anexo 3.1. Origem dos isolamentos de GFLV e resultados comparativos do diagnóstico por IC/RT-PCR e ELISA.

Isolamento	Origem ¹	IC/RT-PCR	ELISA ²
U9, EAN	Oeiras	+	0.3
PI 31, EAN	Oeiras	+	0.29
PI 25, EAN	Oeiras	+	0.32
PL 26, EAN	Oeiras	+	0
PL 36, EAN	Açores	+	0.39
PI 14, EAN	Madeira	+	0.26
PL 13, EAN	Madeira	+	0.33
PL 1 (EAN 63), EAN		-	0.05
Trincadeira CL 64, EAN		+	0
30-VP	Algarve	+	0.55
42-VP	Algarve	+	0.26
41-VP	Algarve	+	0.38
40-VP	Algarve	+	0.59
22-VP	Algarve	+	0.35
21-VP	Algarve	+	0.18
4-VP	Algarve	+	0.44
23-VP	Algarve	-	0
24-VP	Algarve	+	0.22
43-VP	Algarve	+	0.11
46-VP	Algarve	-	0.24
47-VP	Algarve	-	0.16
48-VP	Algarve	-	0.22
49-VP	Algarve	+	0.27
51-VP	Algarve	+	0.37
93-VP	Algarve	+	0.27
31-VP	Algarve	+	0.38
52-VP	Algarve	-	0
53-VP	Algarve	-	0.01
54-VP	Algarve	+	0.38
55-VP	Algarve	+	0.3
56-VP	Algarve	+	0.3
57-VP	Algarve	+	0.4
58-VP	Algarve	+	0.47
59-VP	Algarve	+	0.33
60-VP	Algarve	+	0.19
27-VP	Algarve	+	0.18
26-VP	Algarve	+	0.2
3-VP	Algarve	+	0.28
28-VP	Algarve	+	0.38
29-VP	Algarve	+	0.21
61-VP	Algarve	+	0.25
62-VP	Algarve	+	0.2
63-VP	Algarve	+	0.28
64-VP	Algarve	+	0.23
65-VP	Algarve	+	0.32

Anexo 3.1. (Cont.)

Amostra	Origem ¹	IC/RT-PCR	ELISA ²
66-VP	Algarve	+	0.13
67-VP	Algarve	-	0.14
68-VP	Algarve	+	0.23
69-VP	Algarve	+	0.29
70-VP	Algarve	+	0.29
71-VP	Algarve	+	0.3
72-VP	Algarve	+	0.21
73-VP	Algarve	+	0.11
74-VP	Algarve	+	0.18
75-VP	Algarve	+	0.2
76-VP	Algarve	+	0.24
77-VP	Algarve	+	0.44
34-VP	Algarve	+	0.24
32-VP	Algarve	+	0.21
78-VP	Algarve	+	0.13
33-VP	Algarve	-	-0.02
35-VP	Algarve	+	0.24
36-VP	Algarve	+	0.14
79-VP	Algarve	+	0.25
80-VP	Algarve	-	-0.02
37-VP	Algarve	-	-0.02
38-VP	Algarve	-	0.01
86-VP	Algarve	+	0.12
85-VP	Algarve	-	0.18
84-VP	Algarve	-	0
83-VP	Algarve	+	0.14
82-VP	Algarve	+	0.17
81-VP	Algarve	+	0.12
87-VP	Algarve	-	0.1
88-VP	Algarve	+	0.14
89-VP	Algarve	-	0.03
90-VP	Algarve	-	0.33
91-VP	Algarve	-	0.09
92-VP	Algarve	-	0.06
b-G	Algarve	-	0.01
c-G	Algarve	-	0.02
d-G	Algarve	-	0.02
e-G	Algarve	-	0.02
f-G	Algarve	+	0.01
g-G	Algarve	-	0.01
h-G	Algarve	+	0.15
i-G	Algarve	+	0.23
j-G	Algarve	+	0.19
l-G	Algarve	-	0.01
n-G	Algarve	-	0.01
o-G	Algarve	-	0.01

Anexo 3.1. (Cont.)

Amostra	Origem ¹	IC/RT-PCR	ELISA ²
Clone 519	T.Montes	+	0
Clone 421	T.Montes	+	0
Clone 418	T.Montes	+	0.01
Clone 301	T.Montes	+	0.33
Clone 328	T.Montes	-	0.01
S Toledo	Espanha	+	n.d.
Murcia	Espanha	+	n.d.
Trolinger	Alemanha	+	0.03
Lemberger	Alemanha	+	0.12
Muskat Trolinger	Alemanha	+	0.66
MT 41	Italia	+	0.54
AQ 4	Italia	+	0.43
BA 1	Italia	+	0.84
K87	Hungria	+	1.04
N219	França	+	1.55
N61	França	+	0.52
B845	França	+	1.22
C1237	França	+	1.19
GH	França	+	0.85
F13N	França	+	1.08
F13M	França	+	1.11

(1)- Os isolamentos não oriundos do Algarve foram fornecidos por: Dr. O. de Sequeira (EAN), Dr^a A.M. Nazaré Pereira (UTAD), Dr. C. De Blas (CIT-INIA, Madrid), Dr. J.L. Cenis (CRIDA, Murcia), Dr. Kassemeyer (Staatliches Weinbauinstitut, Alemanha), Dr. G. Martelli (Univ. Bari, Italia), Dr. B. Walter (INRA, França).

(2)- Valores de absorvância ao fim de 1h30 de incubação com o substrato, subtraídos do valor de absorvância correspondente ao controle negativo. Consideraram-se positivas as amostras em que este valor era maior ou igual a 0.10 e duvidosas aquelas com valor compreendido entre 0,06 e 0,10.

Anexo 3.2. Origem dos isolamentos de CTV e resultados comparativos do diagnóstico por IC/RT-PCR e ELISA.

Isolamento ¹	Origem ²	Sintomatologia ³	Resultado	
			IC/RT-PCR	ELISA ⁴
78	Espanha / po	n.d	+	>2
50	Espanha / po	n.d	+	>2
CPO	Espanha / po	n.d	+	0,74
NSF 1	Espanha / po	n.d	+	nd
NSF 2	Espanha / po	n.d	+	nd
NSF 4	Espanha / po	n.d	+	0,09
(NSF 6)	Espanha / po	n.d	-	0,04
NSF 7	Espanha / po	n.d	+	nd
NSF 9	Espanha / po	n.d	+	>2
NSF 10	Espanha / po	n.d	+	nd
NSF 11	Espanha / po	n.d	+	>2
NSF 12	Espanha / po	n.d	+	nd
NSF 13	Espanha / po	n.d	+	>2
NSF 15	Espanha / po	n.d	+	0,10
NSF 16	Espanha / po	n.d	+	>2
NSF 17	Espanha / po	n.d	+	0,07
NSF 18	Espanha / po	n.d	+	nd
NSF 19	Espanha / po	n.d	+	0,41
M2	Espanha / MA	n.d.	+	0,01
M3	Espanha / MA	n.d.	+	0,69
Murcia	Espanha	n.d	+	1,10
CP	Espanha	suave	+	0,17
LMSET	Portugal	n.d	+	0,04
TR1	Africa do Sul / IR	suave	+	>2
TR2	Ilha de Reunião	moderado	+	>2
TR3	Ilha de Reunião	moderado	+	>2
TR4	Ilha de Reunião	suave	+	>2
TR5	Ilha de Reunião	moderado	+	>2
TR6	Ilha de Reunião	moderado	+	>2
TR7	Ilha de Reunião	moderado	+	>2
TR9	Ilha de Reunião	severo	+	>2
TR11	Ilha de Reunião	severo	+	>2
TR14	Ilha de Reunião	moderado	+	>2
TR20	Ilha de Reunião	severo	+	>2
TR24	Ilha de Reunião	moderado	+	>2
TR25	Ilha de Reunião	moderado	+	>2
TR26	Ilha de Reunião	n.d.	+	>2
TR27	Ilha de Reunião	n.d.	+	>2
TR28	Ilha de Reunião	n.d.	+	>2
TR1 + TR11	Ilha de Reunião	n.d.	+	>2
TR3 + TR11	Ilha de Reunião	n.d.	+	>2
TR18 + TR11	Ilha de Reunião	n.d.	+	>2
TR22 + TR11	Ilha de Reunião	n.d.	+	>2
(TR31 + TR11)	Ilha de Reunião	n.d.	-	0,01
LMX31	Ilha de Reunião	n.d.	+	>2
LT22	Ilha de Reunião	moderada	+	>2
LT18	Ilha de Reunião	moderada	+	>2
CBV28	Ilha de Reunião	n.d.	+	>2
LT01	Ilha de Reunião	n.d.	+	>2

Anexo 3.2. (Cont.)

Isolamento ¹	Origem ²	Sintomatologia ³	Resultado	
			IC/RT-PCR	ELISA ⁴
POM03	Ilha de Reunião	n.d.	+	>2
CBV11	Ilha de Reunião	n.d.	+	>2
BGD10	Marrocos / CO	n.d.	+	0,38
BGD07	Marrocos / CO	n.d.	+	1,95
BGH03	Marrocos / CO	n.d.	+	>2
BGH02	Marrocos / CO	n.d.	+	>2
BGF07	Marrocos / CO	n.d.	+	>2
BGT24	Marrocos / CO	n.d.	+	1,27
BGP09	Marrocos / CO	n.d.	+	>2
Meyer	Marrocos	n.d.	+	>2
(P21/B6)	Corsega	n.d.	-	-0,05
(H08/B6)	Corsega	n.d.	-	0,03
(L23/B7)	Corsega	n.d.	-	0,01
(I28/B7)	Corsega	n.d.	-	0,01
H06/B6	Corsega	n.d.	+	0,13
(N10/B7)	Corsega	n.d.	-	0,02
(H09/B6)	Corsega	n.d.	-	0,00
(I29/B7)	Corsega	n.d.	-	-0,02
LM-J04/B6	Corsega	n.d.	+	-0,01
LA-J04/B6	Corsega	n.d.	+	-0,02
k	Corsega	n.d.	+	1,70
Kiyomi	Japão / CO	severa	+	n.d.

1- As amostras que se vieram a revelar negativas por ambas as técnicas estão entre parenteses.

2- Origem do isolamento. Uma barra seguida de iniciais significa que a amostra foi colhida num local diferente da origem do isolamento. MA-Marrocos, CO- Corsega, IR- Ilha de Reunião, PO- Portugal. Os isolamentos da Ilha de Reunião e África do Sul foram fornecidos pelo Dr. M. Grisoni (CIRAD-FLHOR); os isolamentos de Córsega, Marrocos e Japão foram fornecidos pelo Dr. B. Aubert (CIRAD-FLHOR); os isolamentos de origem Espanhola são resultado de importações clandestinas e foram fornecidos pelo Engº J.J. Faustino (DRAA).

3- Classificação segundo Garnsey *et al.*, (1987), fornecida pelo Dr. M. Grisoni.

4- Valor da absorvância a 405 nm depois de subtraído o valor do contróló negativo. Incubação com substrato durante 1h30. Consideraram-se positivas as amostras em que este valor era maior ou igual a 0,12 e duvidosas aquelas com valor compreendido entre 0,08 e 0,12.

4. Discussão

4.1. Características do diagnóstico de patógenos virais e sub-virais por IC/RT-PCR

Ao longo deste trabalho, e em consequência das dificuldades que surgiram ao tentar-se efectuar a PCR a partir de tecidos de videira, desenvolveu-se um método de diagnóstico viral com elevada sensibilidade que parece ser de aplicação geral, extensível também ao âmbito da virologia animal (Rodríguez *et al.*, 1994) e a viróides (Nolasco *et al.*, 1993b).

Um dos aspectos a realçar neste método é que, para todos os efeitos, a síntese de cDNA se processa a partir do vírus previamente purificado. Uma importante consequência é não se propiciar a amplificação inespecífica de ácidos nucleicos do hospedeiro, facto que é comum com métodos que se baseiam na extracção de ácidos nucleicos totais, (Rybicki e Hughes, 1990; Jones *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1991; Wetzel *et al.*, 1991; Ipach *et al.*, 1992; Robinson, 1992; Rojas *et al.*, 1993), em detrimento da amplificação do genoma viral e/ou da facilidade de interpretação dos resultados. Por outro lado, não havendo uma prévia extracção (por fenol ou outros processos) de ácidos nucleicos, o genoma viral está protegido das enzimas do hospedeiro, mantendo-se facilmente a sua integridade até à etapa de síntese de cDNA.

Do ponto de vista prático, a "purificação" do vírus é efectuada directamente a partir do extracto da planta, mediante captura por anticorpos adsorvidos a uma fase sólida seguida de lavagens para eliminar extracto. Este processo é executado muito facilmente e não requiere mais trabalho ou destreza laboratorial na preparação das amostras do que o necessário para a técnica ELISA. Isto torna-o especialmente adequado ao manuseamento de grandes números de amostras, portanto ao seu emprego em condições de rotina. Nesse sentido, o emprego de placas com o formato ELISA para fase sólida torna concebível um certo grau de automação pois permite continuar a empregar diverso equipamento (lavadores de placas, micropipetas, "dispensers") já existente em laboratórios especializados na testagem de elevado número de amostras por técnicas imunoenzimáticas. Por outro lado são já comercializados termocicladores preparados para receber placas de 96 alvéolos com o formato ELISA.

No seguimento dos trabalhos de Jansen *et al.* (1990) relativos ao vírus da hepatite A, Wetzel *et al.* (1992) aplicaram o método de IC/PCR à detecção do Plum Pox Vírus. Mais recentemente, diversos autores aplicaram a IC/PCR à detecção de vários vírus da videira (Brandt e Himmler, 1993; Chevalier *et al.*, 1993; Minafra e Hadidi, 1993; Minafra *et al.*, 1993). Um método semelhante foi também empregue por Candelier-Harvey e Hull (1993) para detectar fenómenos de transencapsidação do genoma de CMV em plantas

transgénicas expressando a proteína do capsídeo de Alfafa Mosaic Vírus. Em todos estes casos a etapa de síntese de cDNA é precedida de um passo específico para a disrupção dos viriões, por calor (95 °C) ou tratamento com Triton X-100 a quente (65 °C) ou extracção com fenol, a que se segue outra etapa de desnaturalização do RNA por calor ou por hidróxido de metil-mercúrio (o que necessita ainda de um passo adicional de neutralização por β -mercaptoetanol). Contrastando com estes protocolos, verificou-se neste trabalho não ser necessária qualquer etapa de disrupção dos viriões nem desnaturalização do genoma viral. Para além do interesse teórico desta questão, abordado mais em pormenor adiante, a inexistência destas etapas simplifica significativamente o protocolo laboratorial.

O fraccionamento electroforético como processo de detectar os produtos amplificados reduz significativamente o potencial de utilização deste método em situações em que seja necessário testar grande número de amostras. Como alternativa fizeram-se alguns ensaios por fluorimetria que originaram resultados bastante promissores. De facto, é de notar que apenas foi empregue uma pequena fracção dos produtos amplificados (20 %) e que o fluorímetro utilizado está preparado para cuvettes de 2 ml, o que obrigou a diluir cerca de 100 vezes os produtos da PCR; mesmo assim obteve-se com o CTV uma sensibilidade cerca de três ordens de grandeza superior à detecção por ELISA. Por outro lado existem no mercado aparelhos capazes de efectuar medições directamente em placas de formato ELISA. É portanto concebível que todo este método possa ser efectuado numa mesma placa com o formato ELISA (Nolasco *et al.*, 1992, 1993b).

Em comparação com outros processos que empregam iniciadores marcados com biotina e fluoresceína e técnicas imunoenzimáticas para detectar os produtos da PCR (Landgraf *et al.*, 1991a, b), a fluorimetria resulta menos dispendiosa em reagentes e é também menos trabalhosa.

Tanto com a fluorimetria como com os outros processos há, comparativamente com a electroforese, uma perda de informação relativamente ao produto amplificado: como este não é identificado poderia estar-se a quantificar produtos resultantes da amplificação inespecífica de ácidos nucleicos do hospedeiro. No entanto o processo de imunocaptura confere um grau adicional de especificidade que permite evitar a ocorrência deste tipo de falsos positivos.

Outras variantes deste método que envolvem uma captura inespecífica, por adsorção directa dos viriões à placa ou mediante o emprego de anticorpos para RNA bicatenário, poderão ter interesse em situações determinadas, em que não se disponha de

anticorpos específicos para o patógeno. Este aspecto foi exemplificado para o caso do viróide do tubérculo fusiforme da batateira ("Potato Spindle Tuber Viroid", PSTV) por Nolasco *et al.* (1993b). Outras situações em que esta abordagem tem interesse é no caso de doenças como o Mosaico de figueira (Cap 1) ou "Rupestris Stem Pitting" (Azzam e Gonsalves, 1991) que estão associadas à presença de RNA bicatenários mas em que não foi possível isolar partículas virais. Porém, nestas variantes a eventualidade de amplificação indesejável de RNA bicatenários associados ao hospedeiro ou outros patógenos também presentes deverá ser avaliada cuidadosamente.

4.2. Processo de libertação do RNA viral.

Sendo o método de IC/RT-PCR efectuado directamente em extractos de planta, haveria a possibilidade de o molde para a síntese de cDNA não ser o RNA contido nos viriões, mas alguma hipotética forma intermediária do ciclo de replicação em que o genoma viral estivesse associado à proteína do capsídeo, mas não encapsidado. Embora à priori esta hipótese não fôsse muito plausível dadas as condições agressivas para o RNA a que era possível sujeitar quer o extracto da planta quer o produto que é capturado pelos anticorpos (incubação durante vários dias na placa, incubação várias horas a 37 °C, sujeição às diversas etapas da técnica ELISA), foram efectuados alguns ensaios com vista a esclarecê-la. Assim verificou-se que o tratamento com RNase A após a imunocaptura não inibe a amplificação do genoma viral. Por outro lado, ensaios feitos (De Blas, 1992) com uma preparação purificada de GFLV (em que a integridade dos viriões fôra previamente verificada), mostraram que o genoma contido em viriões sujeitos à imunocaptura podia vir a servir de molde à síntese de cDNA sem qualquer tratamento específico para libertar o RNA.

Qual seria a contribuição de eventuais formas virais não encapsidadas? Comparando a intensidade das bandas resultando dos tratamentos 1.2 e 2.2 (Fig. 3.1.6), verifica-se uma maior intensidade no alvéolo não tratado com RNase; no entanto esta diferença poderia ser atribuída a resíduos de RNase que tenham ficado no alvéolo, pois efectuando uma etapa intermédia de incubação com inibidor de ribonucleases antes da adição da segunda mistura de transcrição reversa, aquela diferença é quase inexistente (resultados não apresentados). Assim é provável que a principal contribuição para a síntese de cDNA seja o genoma de forma encapsidadas.

Admitindo então que o genoma viral chega à fase de transcrição reversa ainda protegido pelo capsídeo, resta esclarecer qual é o mecanismo que permite a exposição do RNA à acção da Transcriptase reversa.

É sabido que a exposição a condições de alcalinidade, força iónica elevada e ausência de Mg^{2+} pode originar a disrupção dos capsídeos de alguns vírus isométricos (Harrison, 1983; Hirth e Givord, 1986). Embora as condições de extracção e síntese de cDNA empregues na IC/RT-PCR não fossem tão drásticas que permitissem antever tal eventualidade, efectuaram-se com o GFLV alguns ensaios com incubações a diferentes pH, incluindo um choque a pH 9,0; mas não se encontraram diferenças significativas entre os diversos tratamentos.

No entanto é de notar que na gama de valores de pH, força iónica e temperatura a que decorre a imunocaptura, lavagens e transcrição reversa, vários vírus sofrem em maior ou menor grau alterações conformacionais ("swelling") que envolvem a expansão do capsídeo por afastamento entre si das sub-unidades proteicas (Harrison, 1983). Particularmente no caso do GFLV é possível observar ao microscópio electrónico alterações conformacionais do capsídeo quando se procede a uma incubação em condições alcalinas (O. A. de Sequeira, comunicação pessoal).

Foi bastante surpreendente ter-se verificado que a libertação do RNA viral era gradual e ligada senão à actividade, pelo menos à presença da mistura de transcrição reversa, o que faz suspeitar de um mecanismo de libertação do RNA bastante diferente de uma simples disrupção dos viriões. No entanto já Brisco *et al.* (1986) haviam verificado com o SBMV e CCMV que o RNA podia ser traduzido *in vitro* directamente de viriões expandidos ("swollen"). Recentemente Wyatt e Berger (1991); Wyatt *et al.* (1993) mostraram que era possível sintetizar cDNA directamente a partir de preparações purificadas de diversos vírus bastando para tal sujeitá-los a um prévio congelamento ou, no caso de CCMV, sem qualquer tratamento prévio. Visto o CCMV ser precisamente um dos vírus em que ocorre a expansão do capsídeo nas condições empregues, aqueles autores sugeriram um mecanismo em que a transcriptase reversa interagindo com as partículas expandidas, lhes extraía o RNA à medida que ia servindo de molde à síntese de cDNA. Segundo aqueles autores tratar-se ia de um processo algo reminiscente do processo de desencapsidação coordenado com a tradução, "cotranslational disassembly".

Nos trabalhos de Wyatt *et al.* (1993), o efeito do congelamento não é explicado mas é sugerido que pode originar uma destabilização do capsídeo. De facto, resultados de Adrian *et al.* (1992) e Witz *et al.* (1993) referentes ao TYMV mostram que o congelamento é acompanhado por uma alteração conformacional em que há uma interpenetração do RNA no capsídeo proteico acompanhado por uma expansão deste; este estado intermédio de alteração conformacional precede a libertação do RNA por um buraco que se forma no capsídeo quando se dá o descongelamento. Possivelmente com os outros vírus estudados por Wyatt *et al.* (1993) o congelamento é também acompanhado

de uma alteração conformacional envolvendo a expansão do capsídeo, que possibilitaria à transcritase reversa de actuar por um mecanismo semelhante ao proposto para o CCMV.

No caso do método desenvolvido neste trabalho, que outro tipo de causa que não o congelamento poderia originar a destabilização da estrutura dos viriões? Uma possibilidade seria a interacção epítopo - paratopo. Esta interacção não é simplesmente do tipo chave- fechadura, mas requer alguma flexibilidade estrutural que permite ao epítopo adoptar uma conformação mais adequada para o ajustamento ao paratopo (Tainer *et al.*, 1984). É de crer que as tensões criadas por este ajustamento conformacional pudessem ser ainda maiores se os anticorpos tiverem a sua mobilidade diminuída por estarem adsorvidos a uma fase sólida. Por outro lado, pelo menos com alguns dos vírus ensaiados, as forças de coesão do capsídeo poderiam estar diminuídas devido às condições de pH e força iónica. No caso do TMV (Dekker *et al.*, 1989; Van Regenmortel *et al.*, 1993) há evidência de alterações conformacionais em viriões capturados por anticorpos adsorvidos a placas ELISA, alterações essas que impedem os viriões de reagir com um segundo anticorpo. Pelo contrário, quando o TMV é capturado com anticorpos imobilizados sobre uma matriz flexível de dextrana, não se verificam alterações na antigenicidade (Dubs *et al.*, 1992). Outros exemplos de alterações conformacionais motivados pela interacção com anticorpos, são referidos por Matthews (1991) nos casos do TBSV e o SBMV e por Mandel (1979) para diversos vírus de animais. A situação inversa também é verdadeira pois verificou-se com o TMV (Saunal *et al.*, 1993) de que alguns anticorpos monoclonais podem interagir com o capsídeo estabilizando-o e impedindo o processo de "cotranslational disassembly". Seria então importante estudar em cada caso se os anticorpos empregues na imunocaptura dos viriões são também os mais adequadas para originar a necessária distorção do capsídeo.

A amplificação a partir de viriões directamente adsorvidos ao plástico só funcionou eficientemente no caso do CMV. Tal poderá dever-se ao facto de ser um vírus particularmente instável que se pode considerar estar permanentemente no estado expandido ("swollen") (Johnson e Argos, 1985). Embora a indução de alterações conformacionais motivada por adsorção directa ao poliestireno seja reconhecida para alguns outros vírus, e provavelmente seja um fenómeno geral (Van Regenmortel *et al.*, 1993), possivelmente não seriam suficientemente intensas ou adequadas para possibilitar a eficiente síntese de cDNA.

A ser correcta a hipótese de a transcritase reversa ser capaz de extrair o RNA viral de viriões desestabilizados pela imunocaptura ou adsorção ao plástico, este método seria conceptualmente diferente dos métodos AC/PCR de Jansen *et al.* (1990) e (no seu seguimento) do IC/PCR de Wetzel *et al.* (1992), que se baseiam na transcrição reversa de

RNA eluído de viriões desnaturados. Por essa razão e por a transcrição reversa ter um papel chave, designou-se o método desenvolvido neste trabalho por Imunocapture Reverse transcriptional Polymerase Chain Reaction (IC/RT-PCR).

Outra questão que não ficou esclarecida é saber quais são as possibilidades de aplicar este método a vírus com genoma de DNA.

4.3. Uso de IC/RT-PCR na elucidação de relações serológicas distantes.

Ao estudar os requisitos de especificidade dos anticorpos necessários para a imunocaptura observou-se que era possível capturar o GFLV com anticorpos específicos para o ArMV. Tal não será de estranhar visto ser conhecida uma relação serológica entre ambos os vírus, diferenciados por um SDI entre 3 e 7 (Dias e Harrison, 1963; Tobias, 1993). No entanto verificou-se também a possibilidade de imunocaptura com anticorpos para Nepovírus pertencentes a outros sub-grupos dos Nepovírus entre os quais não eram reconhecidas relações serológicas (Harrison e Murrant, 1977), o que levanta uma relação insuspeitada entre estes vírus. Recentemente Frison e Stacesmith (1992) produziram, a partir de ArMV, vários clones de anticorpos monoclonais que reagem com ArMV e RRV, ArMV e CLRV, ArMV e GFLV, ou apenas com CLRV ou TBRV, o que reforça os resultados obtidos neste trabalho.

Uma relação serológica distante entre vírus que são muito distintos, CMV e AMV, foi também reconhecida mediante o emprego de um método de imunocaptura seguida de amplificação (Candelier-Harvey e Hull, 1993).

A Imunocaptura associada à amplificação do genoma pode portanto ser um método muito útil na elucidação de relações serológicas distantes, para as quais os métodos clássicos não têm sensibilidade suficiente. Esta metodologia será ainda mais vantajosa se puder estiver associada a um método de quantificação de resultados como a fluorimetria.

4.4. Rastreio de patógenos virais e sub-virais por IC/RT-PCR

Empregando o método IC/RT-PCR conseguiu-se detectar o GFLV em extractos foleares, diluídos inicialmente 1/200 000 e, após alguns melhoramentos no protocolo, em extractos diluídos 1/800 000. Em varas dormentes Brandt e Himmler (1993) empregando o método IC/PCR de Wetzel *et al.* (1992) obtiveram um limiar detecção apenas de 1/20 000, mas necessitando duas amplificações sucessivas, pelo que os resultados não são directamente comparáveis. De qualquer modo, o método aqui desenvolvido é algumas

centenas de vezes mais sensível do que a técnica ELISA, o que está de acordo com a ordem de grandeza obtida por outros autores com técnicas de diagnóstico baseadas na PCR e aplicadas à detecção de diversos vírus.

Para além da sensibilidade, outra característica que se revelou bastante importante estudar, foi a fiabilidade. Assim no caso do GFLV, de 25 amostras consideradas negativas pela técnica ELISA, cerca de 30 % revelaram ser positivas por IC/RT-PCR, o que será uma consequência da sua muito maior sensibilidade. No caso do vírus da sharka, segundo os dados de Wetzel *et al.* (1992), pode verificar-se que esta razão atinge os 77 %.

Por outro lado, em 80 amostras positivas por ELISA encontraram-se cerca de 9 % que não foram detectadas por IC/RT-PCR. Como se verá no Cap. 3, o gene da proteína do capsídeo é, ao contrário do que se poderia antecipar, bastante variável. Algumas mutações pontuais poderiam ocorrer na zona do iniciador de montante (responsável pela especificidade) e impedir a sua hibridação ou alongamento com a eficiência necessária. Para ultrapassar esta deficiência seria necessário conhecer um maior número de sequências genómicas do vírus para se poderem encontrar outras regiões mais conservadas ou conceber iniciadores degenerados em algumas posições.

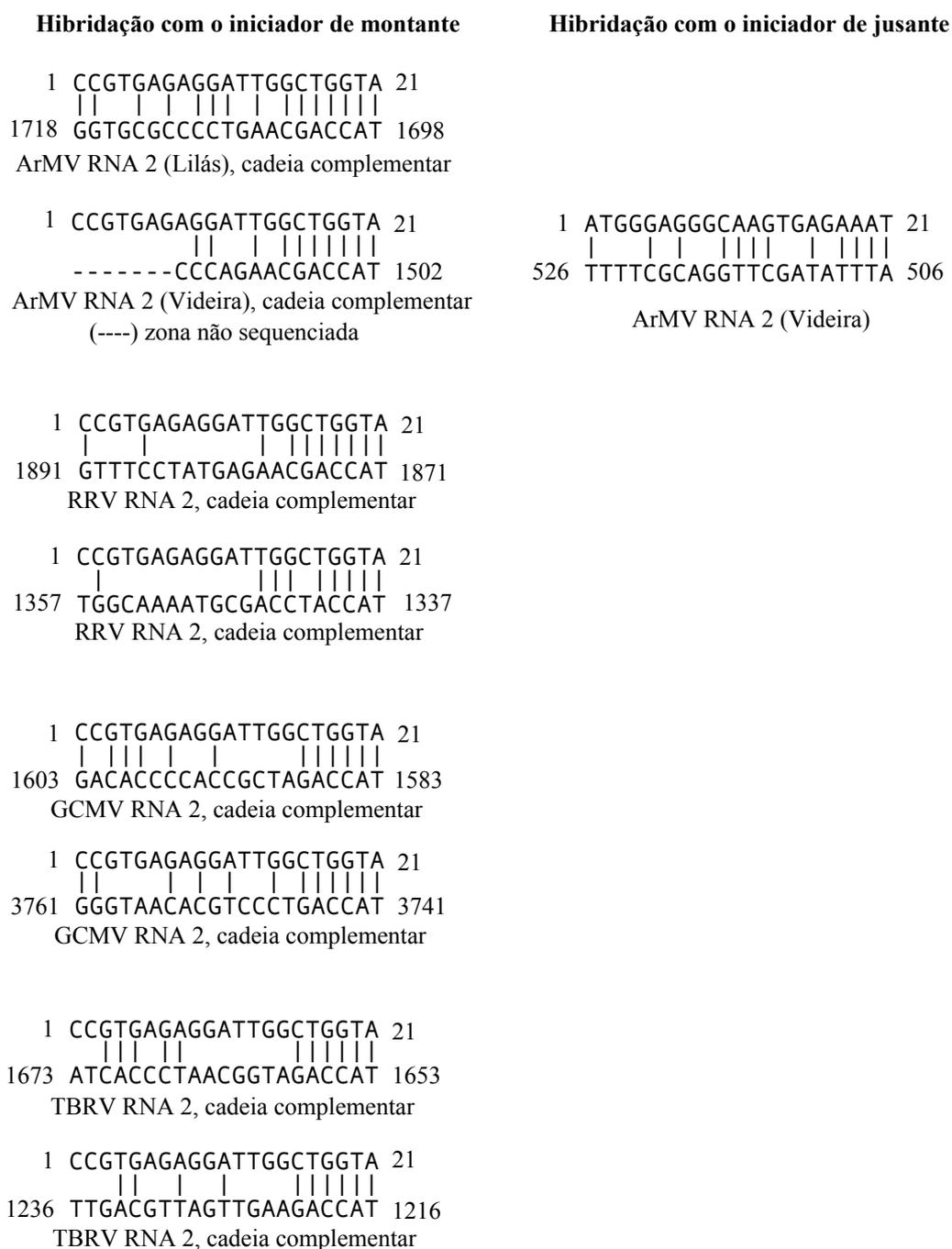


Fig. 4.4. Zonas mais prováveis de iniciação de amplificação inespecífica com outros Nepovírus. Consideraram-se as seguintes sequências presentes na base de dados da EMBL: ArMV RNA 2 (Lilac) , D10086; ArMV RNA 2 (videira) X55460; RRV RNA 2, S46011; GCMV RNA 2, X151163; TBRV RNA 2, X04062. Em todos os casos a numeração de bases está efectuada da extremidade 5' para 3'. A análise foi feita com o programa OLIGO.

O GFLV e o ArMV apresentam uma homologia na proteína do capsídeo de 69 % (Steinkellner *et al.*, 1992), o que pode originar falta de especificidade na sua amplificação por PCR (Ipach *et al.*, 1992). Neste caso tal não aconteceu, sendo mínima a amplificação do ArMV quer quando a imunocaptura era assegurada por anticorpos para o ArMV quer para o GFLV. Na Fig. 4.4 apresenta-se a hipótese mais provável, que pode ainda originar amplificação, de hibridação inespecífica do iniciador de montante com o RNA 2 do

ArMV. Tal como para o GFLV a hibridação dá-se no início do gene da proteína do capsídeo, mas com 6 falhas ("mismatches") que diminuem consideravelmente a eficiência de iniciação. Para jusante, a zona mais provável de hibridação do iniciador de jusante estende-se entre os nucleótidos 506 - 526, o que originaria um produto amplificado de 533 bp. Dado a muito fraca intensidade da banda obtida (Fig 3.1.5-2) não é possível avaliar com exactidão o seu tamanho, mas verifica-se que é desta ordem de grandeza. Na Fig 4.4 apresentam-se também as hipóteses mais favoráveis de hibridação do iniciador de montante com os RNA 2 de outros Nepovírus que afectam a videira na zona Mediterrânica (Bovey e Martelli, 1992), e cujas sequências estavam disponíveis nas bases de dados do Genbank e da EMBL. Verifica-se que em todos os casos a quantidade de falhas é mais elevada que com o ArMV, o que, conjugado com fraco nível de amplificação que se obteve com este vírus, permite prever que a amplificação inespecífica não será detectável.

Em diversos isolamentos de GFLV oriundos do Algarve verificou-se a presença de um RNA relacionado com o satélite da estirpe F13 descrito por Pinck *et al.* (1988); aparentemente a sua ocorrência é bastante frequente (4 casos em 7). As plantas de campo correspondentes às amostras positivas não manifestavam qualquer sintomatologia distinta das demais. Recentemente Saldarelli *et al.* (1993) detectaram também, por meio de uma sonda, um RNA relacionado com o satélite de F13 em 5 isolamentos num total de 34 de origem diversa. Embora o número de amostras fosse pequeno, a maior frequência de detecção do satélite poderia traduzir, no nosso caso, a maior sensibilidade do método de diagnóstico empregue.

As dificuldades encontradas, em comparação com a estirpe F13, na amplificação das amostras do Algarve poderia ser devida também (como no caso do RNA 2) a variações da sequência nucleotídica na zona de hibridação do iniciador de montante. Possivelmente a sequência deste satélite é também bastante variável. A existência de uma mutação pontual entre dois clones de cDNA oriundos da estirpe F13 foi referida por Fuchs *et al.* (1989). Neste trabalho verificou-se também o desaparecimento de um local de corte por Taq I no satélite da estirpe F13. No caso do Tomato Black Ring Vírus (TBRV), outro Nepovírus, são conhecidos cinco RNA satélites (Hemmer *et al.*, 1987) de tamanho muito próximo e com uma homologia de 63 %. Uma situação semelhante poderia também ocorrer com satélites do GFLV.

No caso do CTV o grau de sensibilidade comparativamente com o ELISA foi melhor que para o GFLV. Também a fiabilidade foi melhor neste caso, visto todas as amostras positivas por ELISA serem-no também por IC/RT-PCR, tendo-se coberto um leque vasto de proveniências. A razão entre o número de amostras negativas por ELISA e

positivas por PCR foi elevada, curiosamente também da ordem dos 30 % tal como para o GFLV.

É de notar que estes casos tão abundantes de falsos negativos por ELISA refletem directamente a proveniência das amostras (à priori provàvelmente infectadas) e que numa população com outra origem estes valores poderiam ser mais baixos. Contudo isto mostra a possibilidade de muitas plantas infectadas passarem despercebidas em rastreios executados pela técnica ELISA, o que no âmbito da selecção sanitária, certificação e quarentena poderá ter consequências bastante graves.

Daí a premência de introduzir a curto prazo estas novas metodologias de diagnóstico no trabalho de rotina deste âmbito.

Tipificação genómica de vírus com base na amplificação de ácidos nucleicos *in vitro*

1. Introdução

A amplificação *in vitro* de ácidos nucleicos para além de poder ser empregue para diagnosticar a presença do genoma de um vírus, pode também servir de técnica preparativa para a tipificação genómica. Neste capítulo estuda-se a conjugação da IC/RT-PCR com metodologia de análise mutacional, com vista ao desenvolvimento de métodos eficientes de tipificação genómica. Como modelos de aplicação utilizaram-se os genes da proteína do capsídeo do GFLV e do CTV.

1.1 A estrutura de "quasi-espécie" e a tipificação genómica.

Poderia parecer que bastaria o conhecimento da sequência de um isolamento, ou de algumas propriedades directamente relacionadas com a sua estrutura primária, para se poder efectuar a tipificação genómica. Contudo é necessário ter em conta que os vírus cujo genoma é constituído por RNA têm uma elevada variação genética cuja principal causa é atribuída á elevada taxa de erro das RNA polimerases RNA dependentes. Dado o muito elevado número de genomas que são replicados durante o processo infeccioso, cada isolamento é na realidade constituído por uma distribuição de variantes com divergências pontuais relativamente a uma sequência média, que frequentemente é também a mais abundante. Assim o genoma de um vírus é estatisticamente definido mas cada exemplar desse genoma é, a priori, indeterminado. Este conceito de não uniformidade genómica dos isolamentos é o conceito de "quasi-espécie", de que se pode encontrar uma revisão em Domingo *et al.* (1985). Num exemplo estudado por Domingo *et al.* (1978) relativamente ao bacteriófago Q β , a sequência mais abundante representava apenas 14 % das variantes presentes na população. Deste exemplo sobressai que uma importante dificuldade da tipificação genómica é conseguir representar a população de variantes de cada isolamento. Outra situação problemática para representar é a ocorrência de populações genómicas em que há mais do que uma variante com elevada ocorrência (população multi-modal), geralmente referida por mistura de estirpes. A falta de representatividade da tipificação pode é ainda agravada nos casos em que a tipificação se baseia em cDNA clonado, por apenas tomar uma sequência do conjunto da população.

Idealmente estes problemas apenas se atenuam nos casos em que a sequência média se aproxima da sequência mais frequente e que a dispersão seja fraca.

1.2 Métodos de tipificação.

De acordo com o modelo de "quasi-espécie", as diferenças entre isolamentos são na maior parte devidas a mutações pontuais distribuídas ao acaso por toda a sequência (Matthews, 1991). Os métodos de tipificação devem então ter um bom poder de resolução para poder detectar estas diferenças. O emprego de sondas de algumas centenas de nucleotídeos não será portanto a abordagem mais indicada. Outros métodos recorrem ao uso directo do RNA viral que é segmentado em determinados locais por meio de RNAses ou por processos químicos. Requerem um trabalho prévio de purificação do vírus e genoma viral, o que limita seriamente a sua aplicabilidade. No entanto, em virologia vegetal, os poucos estudos que têm permitido obter dados quantitativos sobre a variabilidade genómica de populações naturais têm sido efectuados por estes métodos, mapeamento genómico por RNase T1 (Rodriguez-Cerezo *et al.*, 1989, 1991), e protecção da acção da RNase ("RNase Protection Assay"), (Aranda *et al.*, 1993).

Outros métodos recentemente introduzidos que também preservam a distribuição das variantes genómicas e estão dirigidos para a tipificação da(s) variante(s) mais frequente(s) da população, recorrem a uma prévia transcrição reversa e amplificação de parte do genoma viral por PCR. O produto amplificado é em seguida estudado por métodos de análise mutacional de DNA ou sequenciado. Nos métodos de tipificação descritos em seguida, a tipificação é efectuada directamente a partir dos extractos de plantas pelo emprego da IC/RT-PCR.

1.2.1 Análise do polimorfismo de locais de restrição ("Restriction Site Polimorphisms", RSP)

Neste método o produto amplificado é, tal qual ou depois de purificado, sujeito a digestões com diversas enzimas de restrição que se sabe à priori que cortam em determinados pontos a sequência de um isolamento que é tomado como padrão. Outros isolamentos que sejam divergentes relativamente ao padrão nos locais de reconhecimento das enzimas, não serão cortados nos mesmos locais. Por fraccionamento electroforético dos produtos digeridos, facilmente se distinguem os isolamentos entre si por originarem diferentes padrões de bandas.

Esta metodologia de tipificação tem sido aplicada a diversos vírus de animais e foi também usada para a elucidação de relações entre isolamentos pela construção de

fenogramas com base nos padrões de restrição (Heppell *et al.*, 1992). No caso de vírus de plantas a sua utilização é recente e tem-se limitado à tipificação de isolamentos de CMV (Rizos *et al.*, 1992), CTV (Gillings *et al.*, 1993) bem como de diversos Luteovírus (Robertson *et al.*, 1991; Hadidi *et al.*, 1993) e Geminivírus (Rojas *et al.*, 1993) amplificados com iniciadores específicos para o grupo.

Um aspecto muito interessante da tipificação por RSP é a possibilidade de comparar os padrões dos isolamentos fragmento a fragmento, obtendo-se informação sobre o grau de semelhança dos isolamentos. Adicionalmente, e segundo a teorização desenvolvida por Nei e Li (1979); Nei e Tajima (1981); Nei e Miller (1990), esta semelhança (ou diferença) pode ser expressa em termos de número de substituições nucleotídicas.

Parte dos resultados deste capítulo referentes à tipificação do GFLV por este método, foram já apresentados (Nolasco e De Sequeira, 1993).

1.2.2 Análise de polimorfismos conformacionais monocatenários ("Single Stranded Conformation Polimorphisms", SSCP)

Este método foi introduzido por Orita *et al.* (1989a, b) e tem sido largamente empregue principalmente no âmbito da Medicina no estudo de mutações somáticas de natureza oncogénica e despistagem de doenças genéticas. Revisões das suas potencialidades, limitações e aplicações podem ser encontradas em Hayashi (1992); Beier (1993).

A análise mutacional por SSCP é bastante simples de executar e rápida. Resumidamente, o fragmento a estudar é amplificado, desnaturado térmica ou quimicamente e sujeito a um fraccionamento electroforético em condições não desnaturantes e geralmente a baixas temperaturas (4°C-6°C). Nestas condições, uma fracção importante das cadeias complementares não se volta a emparelhar entre si e em vez disso toma uma conformação espacial dependente das suas possibilidades de auto-emparelhamento. Por seu turno, estas estão directamente relacionadas com a estrutura primária da cadeia. A migração no gel de poliacrilamida é muito sensível à conformação espacial das moléculas pelo que cada sequência diferente originará uma banda numa posição distinta. Assim, num gel de análise por SSCP pode-se observar para cada amostra uma banda correspondente a DNA bicatenário, que migra geralmente com maior rapidez, e duas bandas correspondentes a cada uma das moléculas monocatenárias. Comparando a posição das bandas com um padrão, verifica-se se a sequência da molécula analisada é idêntica ou não à do padrão. Contudo não se pode saber se duas sequências são muito ou

pouco distintas. Por outro lado, uma grande vantagem é não requerer o conhecimento prévio da sequência a analisar.

Embora o método original e ainda o mais utilizado para a detecção das bandas de electroforese seja a prévia marcação radioactiva têm surgido diversos protocolos que recorrem ao nitrato de prata (Hayashi, 1992).

O efeito de alterações de sequência na mobilidade electroforética das moléculas monocatenárias é imprevisível à priori e possivelmente nem todas as alterações de sequência originam desvios de mobilidade noticiáveis (Orita *et al.*, 1989b). Diversos factores relacionados com as condições de desnaturação e de fraccionamento electroforético têm uma influência considerável na eficiência de detecção das mutações e têm sido estudadas de modo sistemático (Fan *et al.*, 1993; Glavac e Dean, 1993; Hongyo *et al.*, 1993). No que respeita à molécula a analisar, o principal factor é o comprimento: a eficiência de detecção de uma única mutação pontual é, conforme os autores, entre 70 % a 90 % quando o comprimento da cadeia a analisar é de 200 bases e diminui para 60 % a 80 % quando o comprimento aumenta para 400 bases (Hayashi, 1992; Sheffield *et al.*, 1993); para cadeias de 600 bases esta eficiência é muito menor, 3 % segundo Sheffield *et al.* (1993). O tipo de mutação (transversão ou transição) e a sua posição na cadeia não tem influência na detectabilidade (Fan *et al.*, 1993; Sheffield *et al.*, 1993).

A análise mutacional por SSCP não foi empregue para a tipificação molecular de vírus até muito recentemente (Afzal *et al.*, 1993; Nolasco e De Sequeira, 1993). Parte dos resultados referentes ao GFLV apresentados neste capítulo foram já referidos em (Nolasco e De Sequeira, 1993).

1.2.3 Síntese aleatória de cDNA (SAcDNA).

A ocorrência esporádica de bandas inespecíficas (Cap. 2), que no caso do PMMV puderam ser atribuídas a fenómenos de hibridação inespecífica do iniciador de jusante durante a transcrição reversa, fez surgir a ideia de que seria possível empregar as condições pouco restritivas desta etapa para promover a síntese de segmentos discretos de cDNA por alongamento de um iniciador **inespecífico** que se unisse às cadeias de RNA nos locais para os quais apresentasse maior homologia. Se numa etapa seguinte estes segmentos fossem amplificados empregando um iniciador **específico** a montante (Fig. 1.2.3), obter-se-ia um conjunto de moléculas de DNA que poderia ser característico da população de genomas virais de um isolamento.

Esta concepção que como se verá neste capítulo, se veio a mostrar correcta, constitui portanto um novo método de tipificação genómica de vírus.

Uma característica muito importante deste método é o emprego de um iniciador longo (cerca de 20 mer) na etapa de hibridação aleatória. Isto permite que durante a amplificação a temperatura do patamar de hibridação seja suficientemente elevada para assegurar a especificidade de hibridação do iniciador de montante que também é longo. Consegue-se assim obrigar a extremidade 5' terminal das cadeias de DNA a estar localizada, o que permite dirigir a tipificação para determinado gene do vírus.

Adicionalmente este método é caracterizado pelo facto de o acto decisivo da tipificação, isto é, a hibridação do iniciador de jusante, ocorrer antes da amplificação. Eventuais formas pouco frequentes mas com alta afinidade para o iniciador podem assim ser amplificadas e contribuir para a tipificação do isolamento.

A aplicação deste método ao CMV, GFLV e CTV, englobando parte dos resultados deste capítulo, é apresentada por Nolasco *et al.*, 1994a.

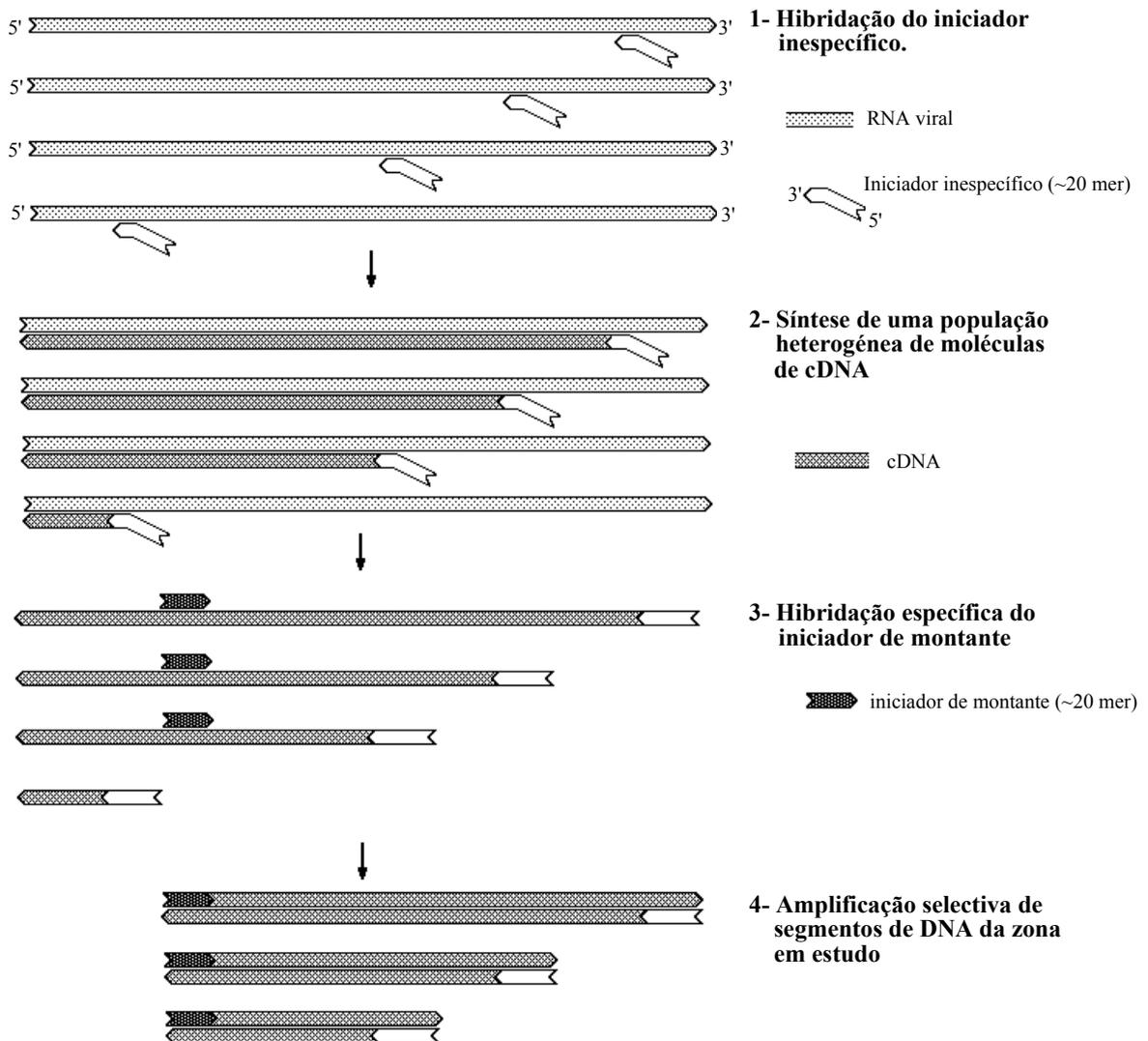


Fig. 1.2.3. Tipificação molecular por Síntese Aleatória de cDNA (SACDNA). **1 e 2.** Após imunocaptura, procede-se à síntese de cDNA com um iniciador inespecífico de cerca de 20 mer. Apenas serão alongadas as cadeias iniciadas numa zona com suficiente homologia para a extremidade 3' do iniciador de jusante. **3 e 4.** A amplificação por PCR decorre em condições de restritividade mais elevadas, assegurando que apenas sejam amplificadas as cadeias iniciadas a jusante do segundo iniciador (zona em estudo). A população de moléculas amplificadas será característica da sequência da zona em estudo.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais.

Utilizaram-se isolamentos de origem geográfica diversa de GFLV e CTV e uma população natural de GFLV obtida de uma vinha da região do Algarve (Vale de Parra) cuja planta se apresenta em anexo. A origem e designação de cada isolamento está descrita nos anexos 3.1 e 3.2 do segundo capítulo. Em todos os casos o vírus foi obtido directamente do material vegetal original, folhas de videira no caso de GFLV e raminhos de *citrus* spp. no caso do CTV.

As sequências dos iniciadores utilizados foram também já definidas no Cap. 2, tendo-se usado a seguinte notação: U-GFLV e D-GFLV, respectivamente iniciadores de montante e jusante de GFLV; U-CTV e D-CTV, idem de CTV; U-SAT e D-SAT, idem de GFLV Sat RNA. Os anticorpos e grande parte dos demais reagentes de biologia molecular, bem como o equipamento, foram também já descritos no Cap. 2. Adicionalmente empregaram-se diversas enzimas de restrição, referidas adiante, de Boehringer Mannheim.

Empregaram-se ainda os seguintes conjuntos de programas de computador: DNASIS™ (Pharmacia), MARS (Dr. J.G. de Boer, York University), RESTSITE 1.10 (Dr. J. Miller, Whitehead Institute/MIT) e NTSYS-pc 1.60 (Dr. F.J. Rohlf, New York State University).

2.2 Métodos

2.2.1 Amplificação específica por IC/RT-PCR

A amplificação específica de parte do gene da proteína do capsídeo de GFLV e CTV foi efectuada por IC/RT-PCR, tal como descrito anteriormente. As zonas amplificadas foram idênticas às referidas no cap.2.

Após a amplificação tomava-se 1/10 do volume que era analisado por electroforese para avaliar, aproximadamente, a quantidade de DNA produzida. As amostras de que se pretendia efectuar a tipificação molecular por SSCP ou RSP eram precipitadas por etanol, resuspenso em 10 µl de água estéril e congeladas até serem utilizadas.

2.2.2 Análise de Poliformismos de Locais de Restrição (RSP)

No caso do GFLV tomaram-se as sequências genómicas conhecidas, estirpe USA/J (Sanchez *et al.*, 1991) e estirpe F13 (Serghini *et al.*, 1990), e com auxílio do programa DNAsis analisou-se a parte amplificada em busca de locais de corte por enzimas de restrição. Como critério de selecção das enzimas considerou-se: a possibilidade de cortar pelo menos uma das sequências, que a maior parte dos fragmentos originados fosse maior que 100 bp com tamanhos diversificados, e o menor preço. Selecionaram-se assim as seguintes: Hae III, Msp I, Rsa I, Taq I, Hinf I, todas com 4 nucleótidos no local de restrição.

No caso do CTV considerou-se a sequência genómica da estirpe T36 (Sekiya *et al.*, 1991) e por critérios análogos seleccionaram-se: Rsa I, Taq I, Hinf I e Alu I.

As digestões foram feitas a 37°C durante 3h em volumes finais de 10 µl tamponizados com o tampão fornecido pelo fabricante, empregando por reacção 5 unidades de enzima e entre 1/5 a 1/7 do DNA amplificado.

Os fragmentos de restrição foram fraccionados por electroforese em mini-géis (80 mm por 95 mm por 0.75 mm) de poliacrilamida a 6,5 % em tampão TAE (Sambrook *et al.*, 1989). Após coloração com brometo de etídio os géis foram fotografados sob UV e digitalizados com auxílio de um "Scanner".

A análise dos fragmentos de restrição foi efectuada sobre as imagens digitalizadas o que simplificou bastante as comparações das posições das bandas e as estimativas dos tamanhos. Os perfis electroforéticos obtidos com as digestões de cada isolamento foram previamente comparados com o respectivo perfil não digerido para possibilitar a detecção de eventuais bandas resultantes de amplificações inespecíficas. Todas as figuras referentes aos fracionamentos electroforéticos foram impressas a partir das respectivas imagens digitalizadas. As imagens obtidas mediante coloração com brometo de etídio foram impressas em negativo para aumentar o contraste.

2.2.3 Análise de Polimorfismos Conformacionais Monocatenários (SSCP).

No caso do GFLV seguiu-se de perto o protocolo de Orita *et al.* (1989a, b), mas não se incorporou qualquer nucleótido marcado radioactivamente durante a amplificação. Tomava-se para análise entre um terço a metade do produto amplificado, que era adicionado a 7,5 µl de 20 mM EDTA (pH 8,0) contendo 80 % de formamida e 0.05% de azul de bromofenol. Esta mistura era aquecida a 80 °C durante 5 minutos e rapidamente

arrefecida em gelo. Alternativamente, parte do produto amplificado era desnaturado a 42 °C em 50 mM NaOH, 1 mM EDTA, e adicionado de 1/10 volume de formamida (Yap e McGee, 1992). O fraccionamento electroforético era efectuado a 6 °C em mini-géis de poliacrilamida a 8 % em tampão TBE segundo métodos usuais (Sambrook *et al.*, 1989), nos primeiros ensaios durante 15 h a 40 V e mais tarde a 100 V. Após a electroforese o gel era corado com nitrato de prata pelo método referido em Igloi (1983).

Em alguns ensaios de PCR assimétrica, duas aliquotas de 1/50 do produto amplificado por IC/RT-PCR eram reamplificadas em separado na presença apenas de um dos iniciadores em cada reacção, num volume final de 25 µl (mantendo-se as concentrações habituais dos demais reagentes), por meio de 40 ciclos de 5s a 92°C, 30 s a 52°C e 30 s a 72°C. Cerca de 1/5 dos produtos eram adicionados de mistura de formamida/EDTA e analisados tal como descrito acima.

No caso do CTV, o método de desnaturação foi diferente do empregue no caso do GFLV. Depois da amplificação, precipitação por Etanol e resuspensão em água tomava-se cerca de 1/10 do produto que era adicionado a uma mistura de 10 µl de 5mM EDTA (pH 8,0) contendo 0,05 % de SDS. Após aquecimento a 80 °C durante 5 min, a mistura era rapidamente arrefecida em gelo. Antes da electroforese adicionava-se 2,5 µl de LB I (Sambrook *et al.*, 1989). A electroforese era feita em condições idênticas às empregues para o GFLV. Para observação dos resultados bastava a coloração com brometo de etídio.

2.2.4 Tipificação molecular por Síntese Aleatória de cDNA (SAcDNA).

Empregou-se um protocolo quase idêntico ao utilizado na amplificação específica por IC/RT-PCR, mas diferindo no iniciador de jusante. Este, (empregue durante a transcrição reversa) foi substituído por outro não específico para o vírus a analisar, depois de verificada a compatibilidade com o iniciador de montante. O iniciador de montante era específico para o vírus em causa, tendo sido já definido no Cap. 2. A temperatura do patamar de hibridação durante a amplificação foi ligeiramente mais elevada, 54 °C, a fim de aumentar a especificidade de hibridação do iniciador de montante. O fraccionamento electroforético foi feito com 1/3 do produto amplificado, geralmente em gel de poliacrilamida a 6,5%.

2.2.5 Estimativa do distanciamento genético.

O distanciamento genético entre isolamentos foi avaliado através do número de diferenças nucleotídicas por posição ("nucleotide differences per site") (Nei e Li, 1979).

O cálculo deste índice foi feito por meio do algoritmo apresentado por Nei e Miller (1990), recorrendo ao programa RESTSITE aplicado ao conjunto de fragmentos de restrição obtidos, tomados cada qual como caracter unitário. Neste cálculo considerou-se igual probabilidade de substituição das quatro bases, igual probabilidade de substituição em cada uma das três posições de cada codão e que o ganho ou perda da cada local de restrição era devido apenas a uma única substituição. Esta última hipótese determina que os valores obtidos sejam mínimos. Para cada par de isolamentos i, j começou-se por calcular um coeficiente de semelhança, $F = 2m_{ij}/(m_i+m_j)$, em que m_{ij} o é número de fragmentos de restrição (obtidos com todas as enzimas) comuns aos dois isolamentos, e m_i e m_j o número de fragmentos total obtido em cada isolamento. Este coeficiente foi então utilizado para calcular um parâmetro G definido por meio de um processo iterativo: $G_n = (F(3 - 2G_{n-1}))^{1/4}$, usando numa primeira aproximação $G_1 = F^{1/4}$. Uma vez que o valor de G estivesse estabilizado, era empregue para calcular o número de diferenças nucleotídicas por posição, entre os dois isolamentos: $d_{ij} = (-2/r) \text{Log}_e G$, sendo r o número de nucleótidos no local de restrição das enzimas empregues (no caso de r variar a formulação é mais complexa; contudo no presente caso $r = 4$ para todas as enzimas).

Para calcular as divergências nucleotídicas inter-populacionais entre as populações X e Y , começou-se por calcular os valores de d_{ij} para estimar as médias das diferenças nucleotídicas entre todos os isolamentos dentro de cada população (diversidade nucleotídica), D_X e D_Y , e entre todos de ambas as populações, D_{XY} . A divergência nucleotídica, D , entre as populações era então avaliada a partir de D_{XY} depois de este termo ser corrigido por uma parcela que toma em consideração a variação nucleotídica dentro de cada população: $D = D_{XY} - (D_X + D_Y)/2$, (Nei e Li, 1979).

3-Resultados

3.1 Tipificação genómica de GFLV

3.1.1 Polimorfismos conformacionais monocatenários (SSCP)

Para familiarização e adaptação do método às condições de trabalho existentes efectuaram-se alguns ensaios exploratórios com diversos isolamentos. (Fig. 3.1.1-1).

Fig. 3.1.1-1. Estudo de algumas condições de análise por SSCP. **A-** Diversos isolamentos oriundos de Dois Portos. Estão assinaladas as bandas correspondentes a moléculas monocatenárias (ss-DNA) e bicatenárias (ds-DNA). **B-** Isolamento U9, desnaturado 1) com NaOH ou 2) por meio de calor. Electroforese em gel de 6,5 % de poliacrilamida durante 15 h a 40 V. M1, marcador. **C-** Análise por SSCP mediante amplificação assimétrica. 3) método normal, 4) reamplificação com iniciador de jusante, 5) reamplificação com iniciador de montante. **D-** Isolamento U9 capturado com anticorpos 6) para GFLV e 7) para ArMV. Em A a electroforese foi efectuada em gel de 6,5 % de poliacrilamida contendo 10 % de glicerol, durante 15 h a 40 V; nos restantes casos foi feita sem glicerol, durante 15 h a 80 V. Todos os géis foram corados com nitrato de prata. Nos painéis B,C e D estão assinaladas as posições das bandas monocatenárias.

Verificou-se, a avaliar pela intensidade da banda correspondente ao DNA bicatenário, que um dos principais problemas era a renaturação ou não desnaturação da totalidade das moléculas bicatenárias, o que, limitando o rendimento em moléculas de DNA monocatenário, dificultava a detecção destas. Para ultrapassar este problema tentou-se outro método de desnaturação (Fig. 3.1.1-1,B), por meio de NaOH, (Yap e McGee, 1992); embora se conseguisse diminuir ligeiramente a intensidade da banda de DNA bicatenário, este método originava um intenso rasto que dificultava a análise dos resultados. Outra possível solução para evitar os problemas associados à desnaturação incompleta ou renaturação foi apresentada por Lazaro e Estivill (1992): o DNA é reamplificado em duas reacções separadas, cada qual apenas com um iniciador (amplificação assimétrica). Cada uma das reacções produz apenas uma das cadeias monocatenárias, que não pode portanto hibridar com a outra cadeia. Um exemplo desta variação é apresentado na Fig. 3.1.1-1,C mas resulta pouco prático.

O fraco rendimento em moléculas monocatenárias é assim um dos principais óbices ao emprego de métodos de detecção como a coloração por nitrato de prata, que são muito menos sensitivos do que os métodos radioactivos. No entanto ainda assim foi possível na maioria dos casos distinguir as bandas correspondentes às moléculas monocatenárias.

Para melhorar a distinção entre os isolamentos verificou-se ser necessário prolongar o fraccionamento electroforético, tendo a banda correspondente à molécula bicatenária deixado de ser visível no gel. Passou a utilizar-se habitualmente um fraccionamento de 15 h a 80 V (tensão constante).

Para verificar se a origem dos anticorpos empregues na imunocaptura teria efeito nos resultados fizeram-se alguns ensaios comparativos, com IgG dos antisoros U9 e C110, não se tendo observado diferenças (resultados não apresentados). Este ensaio foi também efectuado com anticorpos para o GFLV e para o ArMV (Fig. 3.1.1-1,D) tendo-se observado que o padrão obtido era idêntico em ambos os casos. Assim, tal como sugerido no Cap. 2, ambos os anticorpos parecem conduzir à captura de populações análogas de genomas virais.

Alguns isolamentos originavam mais do que duas bandas monocatenárias. Embora à priori não se possa excluir a possibilidade de o isolamento ser composto por uma população genómica multimodal (mistura de estirpes), é admissível a existência de mais do que uma conformação estável em determinadas condições de meio (Orita *et al.*, 1989a, b).

A reproducibilidade da análise por SSCP é elevada desde que se mantenham constantes as condições em que é efectuado o fraccionamento electroforético (Orita *et al.*, 1989b; Fan *et al.*, 1993). Algumas repetições de ensaios efectuados com o mesmo extracto, sujeito a amplificação e fraccionamento electroforético em separado ou efectuados com extractos obtidos de diferentes partes da mesma planta (Fig. 3.1.1-2), mostram esta reproducibilidade. No entanto variações das condições ambientais durante o fraccionamento, principalmente de temperatura, são suficientes para alterar a posição das bandas. Para obviar os efeitos de eventuais variações as conclusões respeitantes a comparações entre isolamentos devem ser feitas apenas dentro de cada gel. Mesmo assim, desde que as condições de fraccionamento não sejam muito distintas, é possível observar uma forte semelhança nos padrões obtidos em ocasiões distintas (isolamento U9, Fig. 3.1.1-1,B,D e Fig. 3.1.1-2).

Fig. 3.1.1-2 Reproducibilidade da análise por SSCP. **A-** O mesmo extracto das plantas 13VP e 14VP foi amplificado em ocasiões distintas e analisado em simultâneo. **B-** Extractos obtidos de diferentes partes da planta 12VP foram amplificados em separado e analisados lado a lado. **C-** Idem, com extractos da planta 3VP. Electroforese em gel de poliacrilamida a 6,5 %, durante 15 h a 40V. Coloração do gel com nitrato de prata.

Fig 3.1.1-3 Análise por SSCP de diversos isolamentos obtidos na mesma vinha. A numeração refere-se à identificação das plantas de onde foram colhidas as amostras (ver mapa em material e métodos). Cada conjunto agrupado sob um traço é proveniente de plantas contíguas na mesma linha da vinha. Electroforese em gel de poliacrilamida a 6,5 %, durante 15 h a 80 V. Coloração com nitrato de prata.

Uma vez acertadas as condições mais adequadas, empregou-se esta metodologia para efectuar alguns ensaios exploratórios da variabilidade de isolamentos obtidos na mesma vinha (Vale de Parra, ver planta em Materiais e Métodos). Surpreendentemente observou-se uma grande variabilidade dos padrões obtidos (Fig. 3.1.1-3), mesmo em casos em que as fontes dos isolamentos eram plantas contíguas na linha. Por outro lado, os ensaios de reproducibilidade da análise por SSCP (Fig. 3.1.1-2) e outros de RSP (ver adiante) efectuados a partir de extractos de diferentes partes da mesma planta sugerem homogeneidade de distribuição genómica do vírus em cada planta. Assim a variabilidade ocorreria essencialmente entre isolamentos de diferentes plantas.

3.1.2. Síntese Aleatória de cDNA (SAcDNA)

Efectuaram-se diversos ensaios preliminares, principalmente com as estirpes F13N e F13M que diferem apenas na presença, ou não, do satélite GFLV Sat-RNA. Ensaíram-

se na etapa de transcrição reversa três iniciadores, U-CTV, D-CTV e D-SAT. Como era de esperar, os produtos obtidos com cada iniciador foram diferentes, (Fig. 3.1.2-1), geralmente entre um e três fragmentos correspondentes a bandas mais intensas, com comprimentos que nalguns casos atingiam cerca de 2Kbp.

Fig. 3.1.2-1 Reproducibilidade da tipificação genómica por síntese aleatória de cDNA. Empregaram-se os iniciadores U-CTV, D-CTV e D-SAT conforme indicado, com as estirpes F13N e F13M (que apenas diferem na presença ou ausência do RNA satélite) e duas diluições (1/10 e 1/100) de extracto de videira com o isolamento P/58VP. M4 e M2 marcadores de peso molecular, respectivamente pBR32 digerido com Hae III e DNA de fago Lambda digerido com Eco RI e Hind III. Electroforese em gel de poliacrilamida a 6,5 %, coloração com brometo de etídio.

Para tentar explicar a ocorrência das várias bandas (pelo menos as mais intensas), efectuou-se uma análise da sequência genómica da estirpe F13N em busca de possíveis locais de hibridação do iniciador empregue na transcrição reversa. De entre estes locais consideraram-se aqueles que não originassem falhas ("mismatches") junto à extremidade 3' do iniciador, zona que é determinante na possibilidade de alongamento do iniciador pela transcriptase reversa (Creighton *et al.*, 1992). No caso do iniciador D-CTV, encontraram-se dois locais de possível hibridação, posições 3173-3192 (45 % de homologia) e 3643-3662 (70 % de homologia), em que a extremidade 3' do iniciador é precedida de um troço de contínuo de seis ligações. Por amplificação, poderiam originar-se fragmentos de 1153 bp e 1623 bp, sendo de facto visíveis no gel bandas correspondentes a fragmentos com tamanhos próximos. Já não foi possível explicar de modo análogo uma outra banda intensa correspondente a um fragmento de cerca de 270 bp.

No caso do iniciador U-CTV, um raciocínio semelhante permite seleccionar o local 2609-2628 (70 % de homologia) em que a extremidade 3' do iniciador é precedida por 7 ligações contínuas; a hibridação neste local originaria um fragmento de 589 bp, também visível no gel.

No caso do iniciador D-SAT, a banda de cerca de 400 bp poderia ser explicada pela hibridação ao local 2422-2442 (75 % de homologia), embora a extremidade 3' do iniciador seja precedida de apenas duas ligações seguidas.

Ao incluir-se o iniciador D-SAT que hibrida especificamente com o RNA satélite da estirpe F13N, pretendeu-se verificar até que ponto o iniciador de montante do GFLV conseguiria por si só assegurar a especificidade da amplificação. Se tal não ocorresse, haveria o perigo de inadvertidamente, em infecções mistas, amplificar genomas de vírus serologicamente relacionados ou amplificar outras regiões do genoma. Comparando os resultados (Fig. 3.1.2-1) obtidos com as estirpes F13N e F13M (que diferem apenas no facto de a segunda não ter associado o RNA satélite) verifica-se que são idênticos. Portanto, as cadeias de cDNA iniciadas e sintetizadas sobre a molécula do satélite não são amplificadas. Verificou-se também em confirmação destes resultados, que aqueles produtos de amplificação que curiosamente são constituídos principalmente por um fragmento de comprimento semelhante ao do fragmento originado pela amplificação específica, não hibridam com uma sonda específica para o satélite (Fig. 3.1.2-2).

A reproducibilidade dos resultados obtidos com cada iniciador é confirmada pelos idênticos resultados obtidos com as estirpes F13N e F13M (Fig. 3.1.2-1). Na mesma figura, verifica-se também que o facto de variar a diluição do extracto não afecta qualitativamente o padrão de bandas, o que deixa antever que este método é relativamente independente da concentração do vírus nos tecidos infectados. Contudo pôde observar-se uma certa variação na intensidade das bandas em reacções efectuadas em diferentes ocasiões (ver P/58VP em Fig. 3.1.2-1 e Fig.3.1.2-3).

Fig. 3.1.2-2 **A)** Estirpe F/F13N de GFLV amplificada por IC/RT-PCR com iniciadores U-SAT + D-SAT (amplificação específica do RNA satélite) e U-GFLV + D-SAT (Amplificação de cDNA iniciado aleatoriamente com D-SAT). Fraccionamento electroforético em gel de agarose a 1,4 %, coloração com brometo de etídio. Nota: por problemas havidos na solidificação do gel, a migração decorreu mais rapidamente à superfície do gel do que na base, originando bandas anormalmente espessas. M2 e M4, respectivamente DNA de Fago Lambda digerido com Eco RI e Hind III e pBR32 digerido com Hae III. **B)** Efectuou-se uma transferência tipo "Southern" do lado esquerdo do gel para uma membrana de nylon seguido de hibridação com uma sonda específica para o RNA satélite.

Para avaliar as possibilidades de tipificação genómica por esta metodologia alargaram-se os ensaios a maior número de isolamentos, grande parte dos quais também estudados posteriormente por RSP. Na Fig. 3.1.2-3 apresentam-se os resultados obtidos com os iniciadores U-CTV e D-CTV.

Alguns isolamentos originaram bandas correspondentes a fragmentos que a serem considerados bicatenários teriam um comprimento excessivo para que a sua extremidade 5' pudesse corresponder ao início do gene da proteína do capsídeo (zona de hibridação específica do iniciador de montante). Como sugerido no Cap. 2, é possível que estas bandas correspondam a produtos monocatenários (daí a sua menor mobilidade) resultantes de assimetrias de amplificação. Como além disso, estes fragmentos se situam numa região do gel em que é difícil distinguir individualmente as posições das bandas, não se tomaram em conta para efeitos de tipificação bandas correspondentes a fragmentos com tamanho superior a 2Kbp.

O iniciador D-CTV originou maior número (13 fragmentos) no total de isolamentos testados, com uma média de 2,5 fragmentos por isolamento, enquanto que U-CTV (9 fragmentos) originou em média 1,8 fragmentos, possibilitando assim a existência de elevado número de padrões distintos e confirmando a elevada variabilidade observada por SSCP.

Fig 3.1.2-3 Tipificação de diversos isolamentos de GFLV por Síntese Aleatória de cDNA. Conforme indicado, a transcrição reversa foi efectuada com o iniciador U-CTV ou D-CTV. Electroforese em gel de poliacrilamida a 6,5 %. Coloração com brometo de etídio. M4 e M2, respectivamente DNA de fago Lambda digerido com Eco RI e Hind III e pBR32 digerido com Hae III.

Dada o desconhecimento quanto à independência entre as bandas, o que poderá não acontecer se na cadeia genómica houver competição entre diversos locais próximos para hibridação com o iniciador inespecífico, ou se se formarem fragmentos parcialmente monocatenários resultantes da hibridação de cadeias de tamanho diferente, que são eventualidades que necessitam um estudo mais aprofundado para serem esclarecidas, a comparação entre isolamentos foi efectuada por padrões e não fragmento a fragmento. Tal não permite porém quantificar as relações de semelhança entre isolamentos.

Cada um dos iniciadores possibilitou a distinção entre cerca de 65% dos isolamentos testados (num total de 31), obtendo-se na maior parte dos casos padrões únicos. No caso de D-CTV apenas ocorreram cinco grupos em que mais de um isolamento manifestava o mesmo padrão: (P/86VP, P/93VP e P/24VP); (P/78VP e P/59VP); (P/57VP e P/58VP); (P/65VP e P/28VP); (F/F13N e F/F13M). Os grupos de isolamentos de idêntico padrão originados por U-CTV foram: (A/Lemb e A/Mtro); (P/U9, P/86VP e F/GH); (P/78VP, P/55VP); (P/93VP e P/59VP); (P/57VP e P/58VP) e (F/F13N e F/F13M). Como não houve coincidência entre as constituições da maior parte dos grupos obtidos com cada iniciador, tomando em conjunto os dados de ambos iniciadores apenas não foi possível distinguir os pares de isolamentos (F/F13N e F/F13M) e (P/57VP e P/58VP), o que corresponde a um maior poder discriminatório do que a análise por RSP (ver adiante).

Fig. 3.1.2-3 (Continuação).

Os sete isolamentos de França e Hungria incluídos neste estudo foram também analisados por outros autores. Todos reagiram (com alguma variação de intensidade do sinal) com uma sonda específica para o gene da proteína do capsídeo (Fuchs *et al.*, 1991a); com um painel de 8 anticorpos monoclonais apenas foi possível distinguir 3 padrões distintos de reacção entre estes isolamentos (Huss *et al.*, 1987). No entanto por SAcDNA com o iniciador D-CTV é possível distinguir claramente todos os isolamentos menos F13N e F13M.

3.1.3 Polimorfismos de locais de restrição (RSP).

Fig. 3.1.3-1 GFLV. Tipificação genómica por RSP. (++) representa a posição de bandas dificilmente visíveis. Electroforese em gel de poliacrilamida a 6,5 %. Coloração do gel com brometo de etídio. Na digestão com Rsa I a coloração de H/K87 foi repetida com nitrato de prata. M4, pBr32 digerido com Hae III, empregue como marcador. As imagens correspondentes ao fraccionamento electroforético das digestões dos restantes isolamentos são apresentadas em anexo no fim da secção de resultados.

Ao todo analisaram-se 54 isolamentos com 5 enzimas (Fig. 3.1.3-1), obtendo-se uma média de 6,6 fragmentos por cada isolamento, de um total de 37 fragmentos. Seis dos fragmentos eram únicos.

O baixo valor médio deve-se ao facto de cerca de um terço dos isolamentos (31%) ter originado 4 ou menos fragmentos e apenas cerca de metade (53%) originar entre 5 e 9 fragmentos. No Quadro 3.1.3 estão condensadas as presenças ou ausências de cada fragmento de restrição em todos os isolamentos analisados.

Atendendo a que a N fragmentos correspondem $N-1$ locais de restrição e que cada local de restrição era de 4 bases, tomando o valor médio do número de fragmentos que caracterizou cada isolamento verifica-se que na realidade a tipificação efectuada correspondeu apenas a uma amostragem de cerca de 4% das bases da região genómica em estudo. Este valor é cerca de metade do que fora previsto com base numa distribuição aleatória de locais de restrição de 4 bases, utilizando 5 enzimas.

Tanto no caso do isolamento USA/J como no caso de F13 obtiveram-se os fragmentos de restrição esperados conforme haviam sido deduzidos das sequências genómicas, e que correspondem aos mapas de restrição da Fig. 3.1.2-2

Numa observação rápida pode-se confirmar os resultados obtidos por SSCP e SAcDNA, quanto à existência de elevada variabilidade. A variação dos padrões obtidos com cada enzima parece assentar mais em variação bruscas, portanto ganho ou perda de

possibilidades de ganho de locais de restrição envolvendo um número mínimo de mutações foram avaliadas a partir das sequências de F13 e USA/J com auxílio do programa MARS. A solução mais simples e que melhor explica o padrão de três bandas envolve a mutação de U para C na posição 2392 do RNA 2 de GFLV F13. Esta mutação, que não altera o aminoácido codificado (glicina), possibilita o aparecimento de um local de restrição de Hae III (GGCC) de modo que a enzima passa a cortar o fragmento de 483 bp em dois fragmentos de 352 bp e 131 bp correspondentes ao mapa de restrição Hae III-B. O terceiro padrão, de duas bandas, pode ser originado do anterior por perda do local de restrição da posição 2521 - 2524.

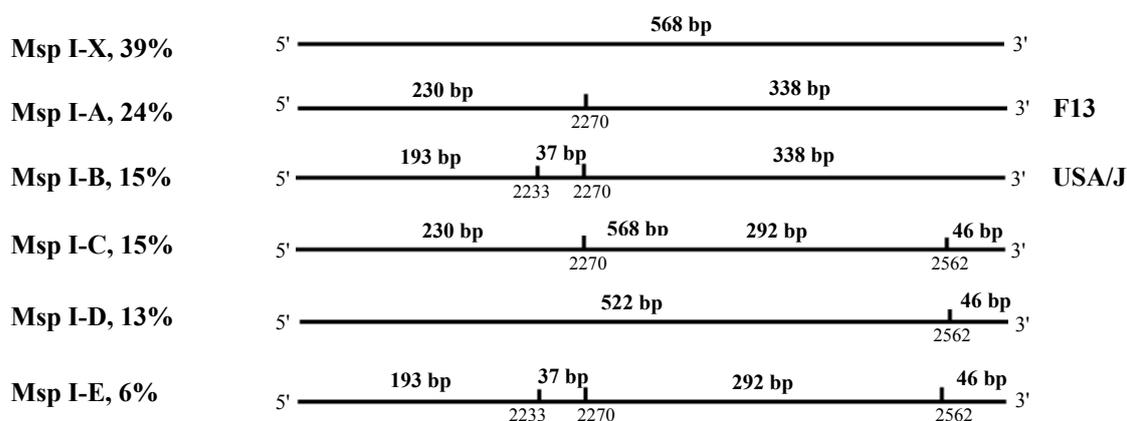


Fig. 3.1.3-2 (Continuação). Mapas de restrição por Msp I.. Nota: alguns mapas são hipotéticos, ver texto.

Com Msp I, não foram digeridos 39 % dos isolamentos. Os mapas de restrição correspondentes a F13 (Msp I-A) e USA/J (Msp I-B), são comuns respectivamente a 24 % e 15 % dos isolamentos. A passagem do mapa Msp I-A para Msp I-B envolve apenas uma mutação U para C na posição 2233. Por meio de uma análise semelhante à efectuada para Hae III, deduziram-se três outros mapas de restrição que podem explicar as bandas que ocorrem nos restantes isolamentos. Estes mapas envolvem apenas a aquisição de um local de restrição de Msp I por mutação de A para G na posição 2563. Nenhuma das referidas mutações nas posições 2233 e 2563 tem influência na sequência polipeptídica por não alterar os aminoácidos codificados, treonina e prolina, respectivamente.

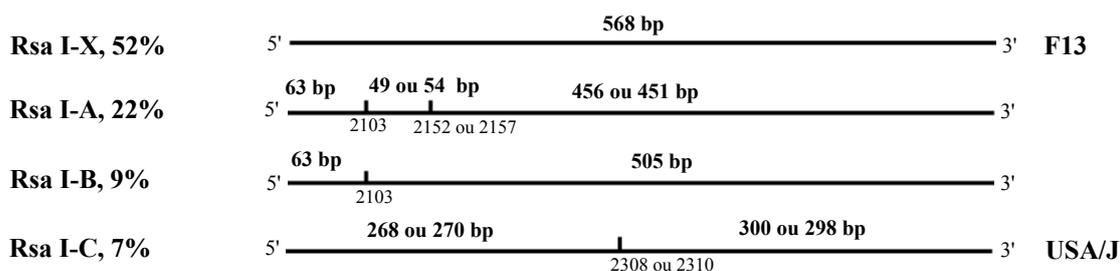


Fig. 3.1.3-2 (Continuação). Mapas de restrição por Rsa I. Nota: alguns mapas são hipotéticos, ver texto.

A digestão com Rsa I originou padrões de 7 tipos diferentes, embora 83% dos isolamentos se distribuisse apenas por três tipos. A situação mais frequente foi a ausência de locais de restrição, em 52% dos isolamentos. O padrão do isolamento USA/J foi pouco frequente (7 %). A existência de soluções múltiplas apenas permitiu determinar os mapas de restrição hipotéticos para os casos mais frequentes. Estes foram deduzidos considerando a possibilidade de uma mutação A para G na posição 2101 e de uma mutação, alternativamente, na posição 2152 (C para A) ou 2158 (U para C). Nenhuma destas mutações tem efeito nos aminoácidos codificados, respectivamente, arginina, valina e tirosina. A passagem de F13 para USA/J poderá ou não alterar a sequência peptídica conforme a mutação ocorrer em 2309 (tirosina para histidina por mutação de U para C) ou em 2308 (A para G, conservando-se valina).

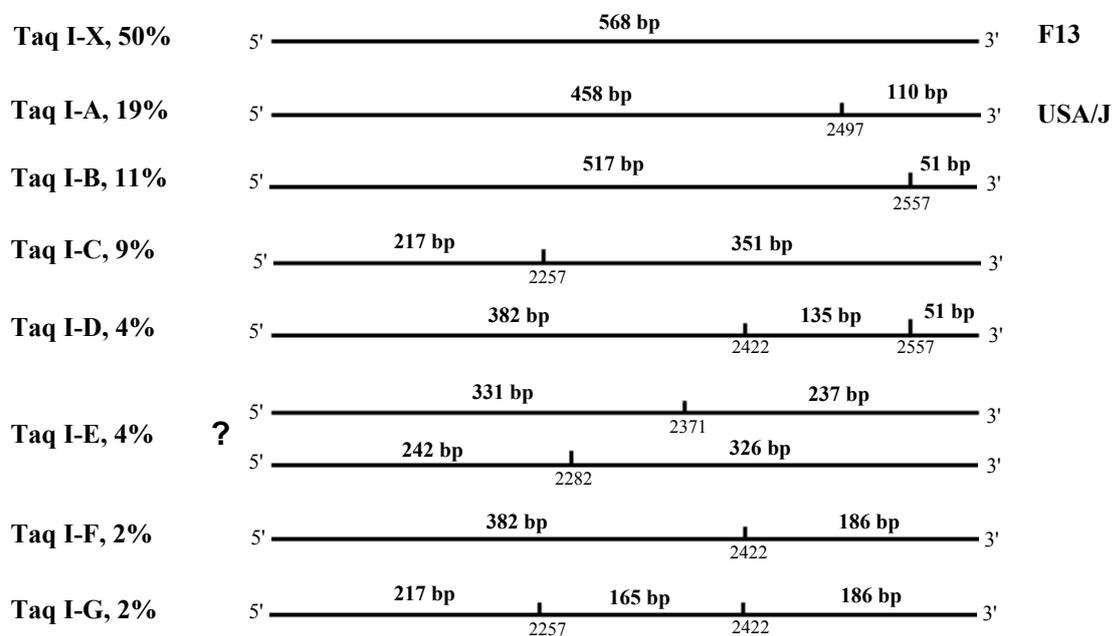


Fig. 3.1.3-2 (Continuação). Mapas de restrição pot Taq I. Nota: alguns mapas são hipotéticos, ver texto.

A digestão com Taq I originou oito tipos distintos, mas a maior parte dos isolamentos (89 %) cai dentro de um de dois tipos. A situação mais comum (50 % dos isolamentos, incluindo F13) é a inexistência de locais de restrição, seguida do padrão correspondente a USA/J (19 % dos isolamentos). Para construir os 8 mapas de restrição envolvendo um número mínimo de mutações foi necessário considerar a ocorrência de 4 mutações nas seguintes posições: 2257, mutação de U para C; 2422, mutação de U para C; 2557, mutação U para C e, alternativamente nas posições 2282 ou 2371, mutação A para C. Este último caso corresponde ao mapa de restrição E, que não foi possível deduzir inequivocamente com os dados disponíveis. Nenhuma das mutações de U para C altera os aminoácidos codificados, fenilalanina em todos os casos. No caso do mapa E ou na passagem do mapa Taq I-X, (correspondente a F13) para Taq I-A (USA/J), também nenhuma das mutações altera os aminoácidos codificados.

Quadro 3.1.3. GFLV. Fragmentos de restrição obtidos.

Fragmentos	Hae III					Msp I					Hinf I					
	484	352	218	132	84	523	338	292	230	193	384	300	244	200	184	140
P/U9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
P/31EAN	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0
P/25EAN	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
P/36EAN	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1
P/14EAN	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
P/30VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
P/42VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
P/41VP	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
P/22VP	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1
P/21VP	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1
P/4VP	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
P/24VP	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1
P/93VP	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0
P/55VP	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
P/57VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
P/58VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
P/59VP	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0
P/60VP	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1
P/27VP	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1
P/26VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
P/3VP	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
P/28VP	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
P/61VP	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1
P/65VP	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
P/69VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
P/71VP	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0
P/73VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
P/16VP	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
P/75VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
P/11VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
P/77VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
P/78VP	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
P/32VP	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
P/35VP	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
P/86VP	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0
P/HG	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
P/IG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
P/JG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
P/UTA301	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1
E/STO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
E/MUR	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0
A/TRO	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
A/LEMB	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
A/MTRO	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0
I/MT41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
I/BA1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0
H/K87	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
F/N61	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
F/B845	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
F/C1237	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
F/GH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
F/F13N	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
F/F13M	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
USA/J	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1

Resumo das presenças (1) ou ausências (0) de cada fragmento de restrição. No cabeçalho, por baixo do nome de cada enzima estão identificados os fragmentos observados nos géis. Cada fragmento está designado pelo seu comprimento estimado: apenas pela posição relativa ao marcador (fragmentos sombreados) ou obtido dos mapas de restrição (não sombreados). Lateralmente estão indicados os isolamentos.

Quadro 3.1.3 (Continuação).

Fragmentos	Taq I											Rsa I										
	517	458	382	351	330	235	217	186	165	135	110	505	455	360	310	298	270	255	150	120	110	
P/U9	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/31EAN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/25EAN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/36EAN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/14EAN	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/30VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/42VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/41VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/22VP	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/21VP	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/4VP	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/24VP	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/93VP	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
P/55VP	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/57VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/58VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/59VP	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/60VP	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/27VP	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/26VP	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
P/3VP	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
P/28VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/61VP	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/65VP	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/69VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/71VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/73VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/16VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/75VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/11VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/77VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/78VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/32VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/35VP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/86VP	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/HG	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/IG	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/JG	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P/UTA301	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E/STO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
E/MUR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
A/TRO	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
A/LEMB	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A/MTRO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I/MT41	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I/BA1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
H/K87	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
F/N61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F/B845	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
F/C1237	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F/GH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F/F13N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F/F13M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
USA/J	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0

Ocorrência de populações genómicas multi-modais.

Alguns isolamentos (ex: P/24VP, P/4VP, P/78VP) originaram consistentemente com várias enzimas de restrição, fragmentos cuja soma de comprimentos excedia os 568 nt. A consistência da sua ocorrência com várias enzimas sugeria não se tratarem de digestões incompletas mas de uma "mistura de estirpes". Um exemplo, o do isolamento P/24VP foi estudado mais em pormenor.

Fig. 3.1.3-3. Ocorrência de populações genómicas multimodais. **A)** Fraccionamento electroforético em gel de poliacrilamida dos produtos amplificados a partir do isolamento P/24VP. Notar a existência de três bandas em lugar de uma. **B, C e D)** Digestão respectivamente com Hae III, Hinf I e Taq I de amostras obtidas de várias partes da mesma planta, P/24VP. A numeração refere-se ao nó, contado a partir da base da vara, de onde foi retirada a amostra. A vara 1 tem 15 nós e a vara 2, 13 nós. Electroforese em gel de poliacrilamida a 6,5 %, coloração com brometo de etídio.

Conforme se pode ver na Fig. 3.1.3-3, o produto da amplificação é constituído por três bandas correspondentes a moléculas de comprimento próximo. Quando incubado com Rsa I (Fig. 3.1.3-1) nenhuma daquelas moléculas era digerida; com Hae III ou Msp I apenas era cortado uma; mas quando digerido por Taq I ou Hinf I, eram cortadas as três

moléculas, originando grupos de fragmentos de tamanho semelhante (dubletos). Uma interpretação possível seria tratar-se de moléculas de tamanho ligeiramente diferente e com extensas zonas homólogas em que se mantivesse a posição relativa dos locais de restrição. Para observar como seria a distribuição desta população genómica dentro da planta, colheram-se amostras de diversas partes da planta, que foram analisadas em separado. Verificou-se que a distribuição era quase, mas não totalmente, homogénea: enquanto numa das varas e nas raízes as três variantes originam bandas de intensidade semelhante entre si, na outra vara era predominante uma das variantes e as outras duas, mais fracas, apenas eram detectáveis após coloração com nitrato de prata.

Este isolamento parece ilustrar um caso em que não está ainda atingido um equilíbrio entre várias variantes genómicas do vírus na planta. As variantes parecem diferir não só na sequência mas também no comprimento.

Variação genómica ao longo do tempo.

Uma causa para a elevada variabilidade genómica entre os isolamentos poderia ser uma rápida evolução divergente da população viral em cada planta. Para avaliar esta hipótese efectuaram-se alguns ensaios comparando os resultados de RSP dos isolamentos P/77VP, P/3VP, P/26VP, P/24VP, P/22VP, P/28VP e P/U9 obtidos a partir de varas postas a enraizar em 1992, com os padrões obtidos um ano depois nas plantas originais. Apenas se encontraram diferenças no isolamento P/28VP, com a perda de um local de restrição de Msp I e um de Rsa I, na planta de campo em 1993. A variante genómica mais frequente parece assim manter-se estável.

3.1.4 Estudo quantitativo da variabilidade genómica do GFLV

O número de substituições nucleotídicas por posição em cada par de isolamentos foi estimado a partir da matriz dos fragmentos de restrição (Quadro 3.1.3) com o auxílio do programa RESTSITE.

Verificou-se que globalmente a população analisada é bastante heterogénea, com um valor da diversidade nucleotídica elevada: 97,2 (erro padrão: +/- 13,3) por cada 1000 bases

3.1.4.1. Análise da diferenciação geográfica

Para verificar se haveria relação entre o grau de semelhança genotípica entre isolamentos e a sua origem geográfica, começou-se por calcular os índices de divergência nucleotídica entre populações oriundas de países distintos. Estes resultados, bem como os índices de diversidade nucleotídica (intra-populacional), estão apresentados no Quadro 3.1.4.1-1.

	França (6)	Alemanha (3)	Hungria (1)	Italia (2)	Portugal (39)	Espanha (2)	USA (1)
França (6)	56,2						
Alemanha (3)	3,8	33,1					
Hungria (1)	33,6	41,2	---				
Italia (2)	-25,0	-13,4	-16,0	127,0			
Portugal (39)	27,1	50,1	71,6	-2,8	76,6		
Espanha (2)	-4,1	-4,2	42,0	-46,3	23,7	113,9	
USA (1)	64,4	54,4	90,7	2,4	45,0	27,34	---

Quadro 3.1.4.2-1. GFLV. Índices de divergência (canto inferior esquerdo) e diversidade (diagonal) nucleotídica (x 1000) de populações de isolamentos obtidos em diversos países. Entre parentesis indica-se o número de isolamentos analisados em cada população. Os índices de diversidade não foram calculados nos casos em que apenas foi analisado um isolamento.

Ao analisar este quadro, não é patente a existência de sub-divisões ao nível geográfico. De facto os índices de diversidade (intra-populacionais) são da mesma ordem de grandeza, ou mesmo superiores (donde a existência de valores negativos), aos índices de divergência (inter-populacionais). Tal significa que as populações separadas geográficamente compartilham uma fracção apreciável de variantes genómicas.

Numa outra abordagem, determinou-se e comparou-se a diversos níveis (continente, país, local) a diversidade nucleotídica. Seria de esperar que se houvesse uma relação entre o âmbito da origem geográfica e a diversidade nucleotídica, esta última se reduziria à medida que a origem geográfica fosse mais restrita. Como se pode observar no Quadro 3.1.4.1-2, há de facto uma redução da diversidade, mas pequena, quando se passa do conjunto dos isolamentos obtidos na Europa, para Portugal. Dentro do país, a diversidade da população obtida na mesma vinha (vale de Parra) pouco difere do conjunto do território Nacional. Não é portanto nítida a existência de uma relação entre a diversidade nucleotídica entre os isolamentos e a origem geográfica do local onde foram obtidos.

Ambito de origem dos isolamentos	Diversidade nucleotídica intra-populacional (x 1000)
Europa (53 isolamentos)	84,7
Portugal (39 isolamentos)	76,6
V. Parra (30 isolamentos)	73,8

Quadro 3.1.4.1-2 GFLV. Diversidade nucleotídica em populações de diversos âmbitos geográficos.

3.1.4.2. Análise da diferenciação a nível local (na mesma vinha).

No histograma 3.1.4.2 estão representados os números de substituições nucleotídicas por posição em todos os pares isolamentos de Vale de Parra. Uma fracção não desprezável é composta por isolamentos que diferem em menos de 15 nucleótidos por 1000 (baixa diversidade). Sendo o GFLV transmitido pelo nemátodo *Xiphinema index*, seria de esperar que a maioria dos isolamentos geneticamente mais relacionados fosse oriunda de plantas dispostas em posições próximas no terreno.

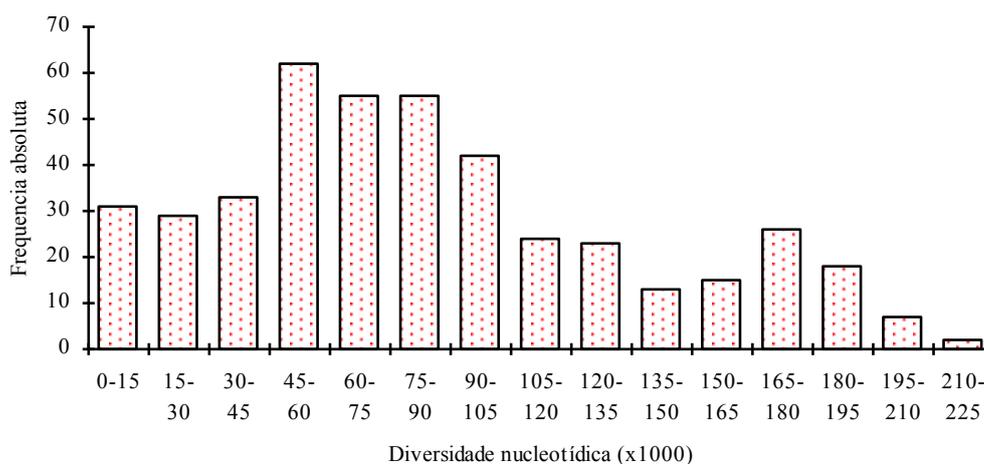


Fig. 3.1.4.2. Histograma da diversidade nucleotídica em todos os pares isolamentos (435) de Vale de Parra.

Para observar se haveria tal influência consideraram-se todos os conjuntos de 2 plantas distanciadas entre si de 1,5 m em linha e de 3 m em linha, tendo-se calculado os valores médios das diversidades dos isolamentos dentro daqueles grupos, que foram respectivamente 67,6 (+/- 18,1) e 83,7 (+/- 14,4). É de notar que embora os grupos oriundos de plantas adjacentes apresentem uma diversidade menor, é ainda bastante elevada. Para esclarecer melhor esta questão, avaliou-se a relação entre a matriz do número de substituições nucleotídicas entre isolamentos e a matriz das distâncias espaciais entre as plantas, por meio do teste não-paramétrico de Mantel, tendo-se verificado que o coeficiente de correlação é muito baixo, 0,117, para evidenciar a existência de qualquer tipo de relação.

3.1.4.3 Análise de outras possíveis relações de agrupamento entre isolamentos.

Efectuou-se uma ordenação por Análise das Coordenadas Principais com o objectivo de evidenciar a existência de outras possíveis relações, de natureza não geográfica, entre os isolamentos.

Fig. 3.1.4.3-1. Análise de Coordenadas Principais. No lado esquerdo estão representadas as projecções nos três planos coordenados e no lado direito as designações dos isolamentos. Estão também assinalados os três grupos de isolamentos, A, B e C, referidos no texto.

Neste tipo de análise, parte-se de um conjunto de objectos de que se conhecem as relações de semelhança (ou ao invés, de distanciamento) de cada par de objectos. Os objectos são posicionados num espaço de dimensões reduzidas, geralmente bi- ou tri-dimensional, de modo que o distanciamento (espacial) entre os objectos traduza o mais possível o distanciamento entre as suas características. Em resultado obtêm-se aglomerações de objectos com maior semelhança entre si. No presente caso empregou-se como medida de distanciamento entre os isolamentos as estimativas do número de substituições nucleotídicas por posição já determinadas anteriormente, tendo-se efectuado a análise com o auxílio do conjunto de programas NTSYS. Considerou-se um espaço tri-dimensional, tendo-se verificado que os três eixos permitiam explicar, respectivamente, 39,4 % , 20,6 % e 15,4 % da variação. Na Fig. 3.1.4.3-1 apresentam-se as projecções das posições dos isolamentos nos três planos coordenados. A projecção no plano 1 0 2 permitiu distinguir três grupos, designados por A, B e C. O grupo A apresenta-se mais disperso e, exceptuando o isolamento USA/J, é composto por isolamentos de Portugal, na

grande maioria da vinha de Vale de Parra. Os agrupamentos B e C, são mais compactos e estão mutuamente mais próximos. No conjunto de ambos os agrupamentos estão representadas quase equitativamente amostras oriundas de Portugal e do estrangeiro. As projecções nos outros dois planos apenas permitem esclarecer algumas questões de pormenor relativas ao posicionamento de determinadas amostras. No plano 2 0 3 não é possível a distinção de qualquer grupo enquanto no plano 1 0 3 apenas se distingue A e B + C, estes últimos sobrepostos.

Para complementar a Análise por Coordenadas Principais, empregaram-se as estimativas das divergências nucleotídicas para agrupar os isolamentos pela técnica UPGMA construindo-se o correspondente dendrograma (Fig. 3.1.4.3-2). Os principais agrupamentos visíveis neste dendrograma correspondem bastante bem, no que respeita à constituição, aos três agrupamentos observáveis na Análise por Coordenadas Principais (apenas 4 isolamentos aparecem posicionados noutra grupo). O grupo A (26 isolamentos) é composto na grande maioria por isolamentos de Vale de Parra (81 %) ou de Portugal (96 %). Este grupo diverge dos restantes a um nível de divergência nucleotídica bastante elevada, maior que 120 substituições por 1000 bases. Os outros dois grupos, B e C, divergem entre si ainda a um nível elevado, pouco maior que 80 substituições por 1000 bases, sendo respectivamente constituídos por 64 % e 41 % de isolamentos de Portugal.

Atendendo a que um número considerável de isolamentos é, do ponto de vista de análise por RSP, mal conhecido visto originar um número reduzido de bandas (menor ou igual a 4), marcaram-se no dendrograma estes isolamentos. Observa-se assim que se distribuem equitativamente entre os grupos A e B + C, pelo que é pouco provável que a digestão com enzimas adicionais venha a alterar a existência daqueles dois grandes grupos. Contudo concentram-se significativamente no grupo B, pelo que a existência deste grupo poderia ser algo artificial, isto é, a digestão com um número maior de enzimas levar ao aumento da diversidade dentro do grupo, com o seu eventual desaparecimento por dispersão. Verifica-se também que, com excepção do grupo formado pelos isolamentos F/F13N e F/F13M, os outros grupos com diversidade nucleotídica nula são compostos por isolamentos que originaram um reduzido número de fragmentos; a igualdade das suas sequências é portanto duvidosa, o que é confirmado por SAcDNA.

Fig. 3.1.4.3-2. Dendograma obtido pelo método UPGMA aplicado à matriz das divergências nucleotídicas entre isolamentos. Entre parentesis está indicado o número de fragmentos em que se baseou o dendograma, nos casos em que este número foi baixo. A composição dos grupos A, B e C é quase idêntica á dos grupos assinalados na análise de coordenadas principais (as diferenças dizem respeito ao posicionamento dos isolamentos P/35VP, P/27VP, F/N61 e F/B845). A escala horizontal representa o número de substituições nucleotídicas por cada 1000 bases.

Noutra abordagem, procurou-se observar como se relacionavam os isolamentos dentro de cada área geográfica. No entanto tal apenas foi possível para Portugal, em que se dispunha de dados de um número suficientemente grande de isolamentos. Com este objectivo agruparam-se os isolamentos em dois grupos independentes: isolamentos oriundos de Vale de Parra e os oriundos de Portugal excluindo os de Vale de Parra (visto o número de isolamentos oriundos de Vale de Parra ser muito mais numeroso que os do resto de Portugal, procurou-se com esta exclusão não influenciar o dendograma do segundo grupo com as relações do primeiro grupo). Os respectivos dendogramas, construídos de modo idêntico ao anteriormente referido, estão apresentados nas Figs 3.1.4.3-3 e 3.1.4.3-4. Interessantemente, verifica-se que ambas as populações reproduzem a principal característica existente na população global, nomeadamente a divisão em dois sub-grupos que divergem ao nível de mais de 120 substituições por cada 1000 bases. Será que em Portugal as populações naturais de GFLV se sub-dividem em dois tipos? Para avaliar mais correctamente esta hipótese seria necessário considerar grupos populacionais independentes de dimensão semelhante colhidos em diversos locais, o que não foi feito. No que respeita à população Europeia, se excluirmos Portugal, já não se observou esta sub-divisão (resultados não apresentados), caindo todos os isolamentos dentro dos sub-grupos B e C definidos pela análise por Coordenadas Principais. O sub-grupo A seria então pouco frequente, ou raro, fora de Portugal ?

Fig. 3.1.4.3-3. Dendograma obtido pelo método UPGMA aplicado à matriz das divergências nucleotídicas entre os isolamentos de Vale de Parra. Entre parentesis está indicado o número de fragmentos em que se baseou o dendograma, nos casos em que este número foi baixo. Estão assinalados também os grupos (definidos na Análise de Coordenadas Principais) em que se incluem os isolamentos. A escala horizontal representa a divergência nucleotídica por cada 1000 bases.

Fig. 3.1.4.3-4. Dendograma obtido pelo método UPGMA aplicado à matriz das divergências nucleotídicas entre os isolamentos de Portugal, excluindo os de Vale de Parra. Entre parentesis está indicado o número de fragmentos em que se baseou o dendograma, nos casos em que este número foi baixo. Estão assinalados também os grupos (definidos na Análise de Coordenadas Principais) em que se incluem os isolamentos. A escala horizontal representa a divergência nucleotídica por cada 1000 bases.

Procurando as principais diferenças entre os grupos A e B+C, verifica-se que todos os isolamentos do grupo A correspondem ao mesmo mapa de restrição por Hinf I, distinguindo-se dos restantes pela presença de um local de restrição na posição 2283-2287. As outras diferenças não são tão marcadas e correspondem apenas a maiores frequências de ocorrência de determinados locais de restrição num dos grupos. Porém o eventual significado biológico desta divisão não é patente.

No que respeita à sintomatologia, apenas se dispuseram de observações referentes à vinha de Vale de Parra, efectuadas no mês de Maio. Os síndromas observados correspondem ao Urticado e Clorose Infecciosa referidas por Hewitt *et al.* (1970). No entanto na maior parte dos casos estas manifestações ocorriam em conjunto e não foi nítida a predominância de qualquer tipo num dos grupos referidos.

3.2 Tipificação Genómica do CTV

Para o estudo da tipificação genómica do CTV tomaram-se isolamentos de diferentes origens geográficas, de que havia disponíveis, para alguns, dados referentes às suas propriedades biológicas. Não foi possível neste caso estudar a variabilidade dentro de um mesmo pomar.

3.2.1 Polimorfismos conformacionais monocatenários (SSCP).

Fig. 3.2.1-1. Tipificação por SSCP de CTV. **A e B**, Isolamentos da Ilha de Reunião. Desnaturação sem formamida. Coloração do gel com brometo de etídio. Nota: Para melhor se observar as bandas, o contraste dos canais correspondentes aos isolamentos Tr1, Tr26, Tr 27 e Tr28 foi ajustado independentemente do resto do gel. **C**, Isolamentos oriundos de Espanha, tendo-se efectuado repetições das análises de alguns. Condições experimentais idênticas às de A e B. **D**, Desnaturação com formamida e coloração do gel com nitrato de prata. Notar a intensidade da banda correspondente a DNA bicatenário (ds-DNA).

Ao efectuarem-se alguns ensaios de tipificação por formação de heteroduplexos (não apresentados), verificou-se que se poderiam vir a obter melhores resultados na tipificação por SSCP se se retirasse a formamida do meio de desnaturação. Esta melhoria relaciona-se com uma forte atenuação da banda correspondente ao DNA bicatenário, e é

acompanhada pela intensificação da fluorescência das bandas correspondentes ao DNA monocatenário quando se efectua a coloração do gel com brometo de etídio. Esta intensificação é de tal modo que permite dispensar a coloração com nitrato de prata. As razões deste facto não foram investigadas; eventualmente poderá ter por causa, não uma melhoria das condições de desnaturação, mas uma melhor facilidade de intercalação do brometo de etídio na estrutura secundária do DNA monocatenário na ausência de formamida.

Nos casos apresentados na Fig. 3.2.1-1, na sua maioria de isolamentos de CTV da Ilha de Reunião, é possível distinguir claramente vários isolamentos com padrão único, (Tr1, Tr3, Tr5, Tr9 e Tr11) e grupos de isolamentos (Tr2 e Tr20), (Tr4 e Tr14) e (Tr6, Tr7, Tr24, Tr25, Tr27 e Tr28) com padrão muito semelhante dentro de cada grupo. Noutro conjunto de isolamentos introduzidos de Espanha por importações clandestinas em duas ocasiões distintas (isolamentos Nsf2 e Nsf9 por um lado, 50 e 78 por outro) verificou-se a existência de um padrão comum em 3 isolamentos, facilmente distinguível do padrão do quarto isolamento.

3.2.2 Síntese aleatória de cDNA.

Nestes ensaios empregaram-se a maioria dos isolamentos testados já por SSCP e diversos outros isolamentos oriundos de Marrocos. Escolheram-se dois iniciadores de transcrição reversa que em ensaios preliminares haviam originado padrões com maior número de bandas: D-GFLV e D-SAT. Conforme se pode observar na Fig. 3.2.2-1, os padrões eram, tal como para o GFLV, geralmente compostos de 1 a 3 bandas mais intensas correspondentes a fragmentos até cerca de 2 Kbp. O poder discriminatório dos dois iniciadores foi semelhante, distinguindo-se respectivamente 7 e 10 padrões distintos com D-GFLV e D-CTV.

Fig. 3.2.2-1. Tipificação de diversos isolamentos de CTV por Síntese Aleatória de cDNA. Conforme indicado, a transcrição reversa foi efectuada com o iniciador D-Sat ou D-GFLV. Electroforese em gel de poliacrilamida a 6,5 %. Coloração com brometo de etídio. M4 e M2, respectivamente DNA de fago Lambda digerido com Eco RI e Hind III e pBR32 digerido com Hae III.

No Quadro 3.2.2 apresentam-se os grupos de isolamentos que foi possível distinguir com cada iniciador. No conjunto, com os dados dos dois iniciadores apenas não foi possível distinguir, três pares de isolamentos: D07-F07, H02-P09 e K-CP de um total de 23 isolamentos. Os isolamentos dos dois primeiros pares são oriundos de Marrocos e como se verá adiante não estão distantes geneticamente. Por outro lado, os grupos de isolamentos (Tr2, Tr5, Tr6, Tr7, Tr25) e (Tr14, Tr20, Tr24, Tr25, Tr28, 78LM) obtidos respectivamente com D-SAT e D-GFLV aproximam-se, na sua constituição, de grupos definidos por padrões identicos em SSCP ou de baixa diversidade nucleotídica por RSP. Parece portanto haver uma relação entre os resultados obtidos com as três técnicas de tipificação.

	Transcrição reversa com D-SAT	Transcrição reversa com D-GFLV
TR1	Tr1, Tr3, Tr4, Tr28	Tr1, Tr9, Nsf9, D10, H02, P09
TR2	Tr2, Tr5, Tr6, Tr7, Tr25	---
TR3	Tr1, Tr3, Tr4, Tr28	Tr3, D07, H03, F07
TR4	Tr1, Tr3, Tr4, Tr28	---
TR5	Tr2, Tr5, Tr6, Tr7, Tr25	---
TR6	Tr2, Tr5, Tr6, Tr7, Tr25	nd
TR7	Tr2, Tr5, Tr6, Tr7, Tr25	---
TR9	---	Tr1, Tr9, Nsf9, D10, H02, P09

TR14	---	Tr14, Tr20, Tr24, Tr25, Tr28, 78LM
TR20	---	Tr14, Tr20, Tr24, Tr25, Tr28, 78LM
TR24	---	Tr14, Tr20, Tr24, Tr25, Tr28, 78LM
TR25	Tr2, Tr5, Tr6, Tr7, Tr25	Tr14, Tr20, Tr24, Tr25, Tr28, 78LM
TR28	Tr1, Tr3, Tr4, Tr28	Tr14, Tr20, Tr24, Tr25, Tr28, 78LM
78LMB	nd	Tr14, Tr20, Tr24, Tr25, Tr28, 78LM
NSF9	---	Tr1, Tr9, Nsf9, D10, H02, P09
D10	D10, D07, F07	Tr1, Tr9, Nsf9, D10, H02, P09
D07	D10, D07, F07	Tr3, D07, H03, F07
H03	H03, H02, P09	Tr3, D07, H03, F07
F07	D10, D07, F07	Tr3, D07, H03, F07
K	K, CP	nd
H02	H03, H02, P09	Tr1, Tr9, Nsf9, D10, H02, P09
P09	H03, H02, P09	Tr1, Tr9, Nsf9, D10, H02, P09
CP	K, CP	nd

Quadro 3.2.2. Grupos de isolamentos com padrões de bandas idênticos (admitindo-se alguma variação na intensidade mas não na posição das bandas), obtidos com cada um dos iniciadores. Na linha de cada isolamento indica-se o grupo em que este se insere ou (---) no caso de ser um padrão único. Alguns casos em que não se originaram bandas com intensidade suficiente para serem analisadas estão designados por **nd**.

3.2.3 Polimorfismos de locais de restrição(RSP).

Analisaram-se 23 isolamentos de diversas origens geográficas (Espanha, Marrocos, Africa do Sul e Ilha da Reunião) com 4 enzimas, Hinf I, Rsa I, Taq I e Alu I, apresentando-se na Fig. 3.2.3-1 resultados destas digestões e no Quadro 3.2.3 o resumo dos fragmentos obtidos. Adicionalmente englobaram-se também neste estudo diversas estirpes de Israel e a estirpe B35 de origem Espanhola, tendo-se para tal deduzido os fragmentos que seriam obtidos com aquelas enzimas a partir das sequências que foram recentemente publicadas (Mawassi *et al.*, 1993; Pappu *et al.*, 1993b). Ao contrário do GFLV, o número de fragmentos obtidos foi elevado, com uma média de 12,9 fragmentos por isolamento, sendo todos os isolamentos caracterizados por mais de 11 fragmentos. Não foi possível analisar directamente a estirpe T36 (Florida), que serviu de base à escolha das enzimas.

Fig. 3.2.3-1 Tipificação de CTV por RSP com diversas enzimas de restrição. (++) representa a posição de bandas dificilmente visíveis. Electroforese em gel de poliacrilamida a 6,5 %. Coloração do gel com brometo de etídio. M4, pBr32 digerido com Hae III, empregue como marcador. As imagens das restantes digestões estão apresentadas em anexo no fim da secção de resultados.

Com base no número médio de fragmentos, e por um raciocínio semelhante ao efectuado para o GFLV, verificou-se que a tipificação se baseou numa amostragem média de cerca de 9% da região genómica em estudo.

O polimorfismo originado por digestão com Hinf I relacionou-se fortemente com a origem geográfica dos isolamentos, sendo patente a existência de três tipos mais frequentes correspondentes a isolamentos da Ilha de Reunião, de Espanha e Marrocos e de Israel. (Fig. 3.2.3-2, mapas Hinf I A,D e F). Para deduzir os mapas de restrição desta enzima, considerou-se a sequência da estirpe Ach-T (de Israel), que apresenta maior número de locais de restrição (cinco), e por tentativas, eliminaram-se diversas combinações de 1 a 3 locais de restrição até obter os mapas da Fig. 3.2.3-2, que permitem explicar a quase totalidade dos fragmentos obtidos.

Alguns dos isolamentos originaram fragmentos cuja soma excedia o comprimento da zona amplificada. No caso de Tr3 e Tr4 pôde constatar-se por repetição que se tratava de uma digestão incompleta. Não foi no entanto o caso de Nsf9 e Tr9, que provavelmente corresponderão a isolamentos compostos por populações de sequências multimodais. No caso de Tr9, um dos fragmentos é ligeiramente mais curto, cerca de 5 a 10 bp, do que o correspondente fragmento de 130 bp dos outros isolamentos da Ilha de Reunião. Este fragmento não pôde ser explicado com base nos locais de restrição anteriores. Admitindo uma mutação A para C na posição 427 tal já seria possível (Fig. 3.2.3-2 mapa Hinf I, F). Contudo esta mutação acarretaria no entanto uma alteração de asparginina para histidina numa posição da sequência de aminoácidos que é conservada entre vários isolamentos, conforme se pode observar no trabalho de Pappu *et al.* (1993b).

Recentemente Gillings *et al.* (1993) propuseram um conjunto de mapas de restrição por Hinf I e Rsa I de diversos isolamentos de CTV. Esses mapas foram deduzidos com base na sequência do isolamento T36 e, no que respeita a Hinf I, apresentam diferenças relativamente aos apresentados neste trabalho. A principal diferença provém de um local de restrição que aqueles autores julgaram necessário criar

por mutação de A para G na posição 373 da proteína do capsídeo de T36 (vide Fig. 3.2.3-2), e que poderia explicar também as dimensões de alguns fragmentos que se obtiveram neste trabalho. Essa mutação teria por consequência a substituição de asparagina por ácido aspártico no resíduo 125 das estirpes T3, T4, T55, T30 e T26. No entanto, verifica-se nas sequências de aminoácidos dessas estirpes, que foram apresentadas por Pappu *et al.* (1993b), que não ocorre tal substituição. Em alternativa, neste trabalho, explicaram-se os fragmentos em causa através de um local de restrição na posição 111-115, local que, como já referido, existe nas estirpes B35 e Ach-T e cuja aquisição a partir de T36 não envolve alteração de aminoácidos. Nos restantes locais de restrição há concordância com os mapas propostos por Gillings *et al.* (1993). Nomeadamente no local de restrição (73-77), que é conservado entre todos os isolamentos.

Quadro 3.2.3. CTV. Fragmentos de restrição obtidos.

	Taq I										Rsa I									
	436	320	304	240	225	211	150	132	104	79	320	290	250	249	227	166	147	144	125	83
TR1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
TR2	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
TR3	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
TR4	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
TR5	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
TR6	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
TR7	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
TR9	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
TR14	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
TR20	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
TR24	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
TR25	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
TR28	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
78LM	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
NSF9	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
D10	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
D07	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
H03	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
F07	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
K	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
H02	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
P09	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
CP	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
T36	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
B35	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
MT	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
Mor-T	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
Mik-T	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
HT	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
VTa	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
ST4	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
ST	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
Hed-T	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
Ach-T	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
VT	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1

Resumo das presenças (1) ou ausências (0) de cada fragmento de restrição. No cabeçalho, por baixo do nome de cada enzima estão identificados os fragmentos observados nos géis. Cada fragmento está designado pelo seu comprimento estimado: apenas pela posição relativa ao marcador (fragmentos sombreados) ou obtido dos mapas de restrição (não sombreados). Os fragmentos dos 12 isolamentos da parte inferior do quadro foram deduzidos das respectivas sequências. Não se consideraram fragmentos de tamanho inferior a 70 bp.

Quadro 3.2.3 (Continuação)

	Alu I						Hinf I							
	299	241	204	171	95	70	428	386	337	299	130	117	91	73
TR1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
TR2	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
TR3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
TR4	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1
TR5	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
TR6	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
TR7	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
TR9	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1
TR14	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
TR20	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
TR24	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
TR25	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
TR28	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
78LM	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
NSF9	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1
D10	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
D07	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
H03	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
F07	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
K	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H02	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
P09	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
CP	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
T36	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
B35	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
MT	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
Mor-T	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Mik-T	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
HT	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
VTa	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
ST4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
ST	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Hed-T	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Ach-T	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
VT	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1

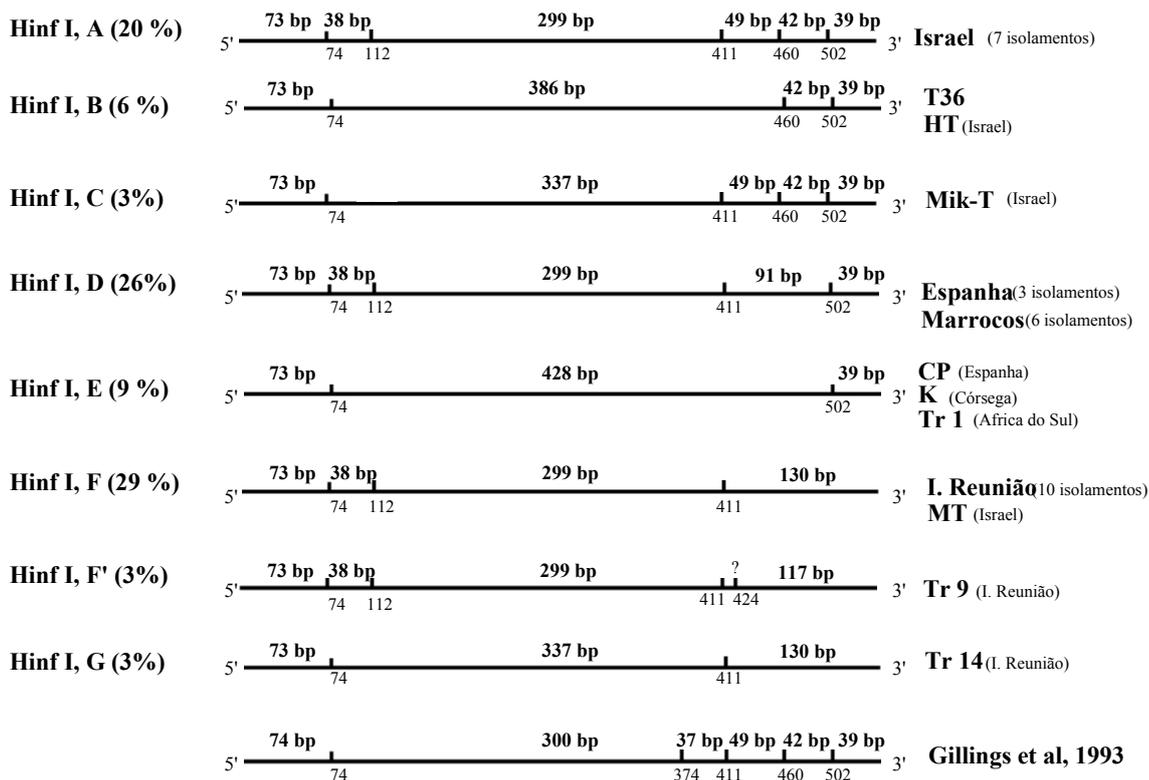


Fig. 3.2.3-2. Mapas de restrição por Hinf I., indicando-se a origem geográfica dos isolamentos e a frequência de ocorrência de cada mapa. Está também representado parte do mapa 3 proposto por Gillings *et al* (1993) e que permite explicar fragmentos com tamanho idêntico ao obtido neste trabalho, mas que não está de acordo com as sequências de aminoácidos apresentadas por Pappu *et al*, (1993b).

No caso de Rsa I, os isolamentos distribuíram-se por dois grupos que englobam, grosso modo, por um lado os isolamentos de Israel e Ilha de Reunião, por outro os da zona ocidental do Mediterrâneo. Os mapas de restrição, que foram deduzidos com base na sequência do isolamento Ach-T por perda de combinações de locais de restrição, permitiram explicar a quase totalidade das bandas e correspondem também a alguns dos que foram apresentados por Gillings *et al*. (1993).

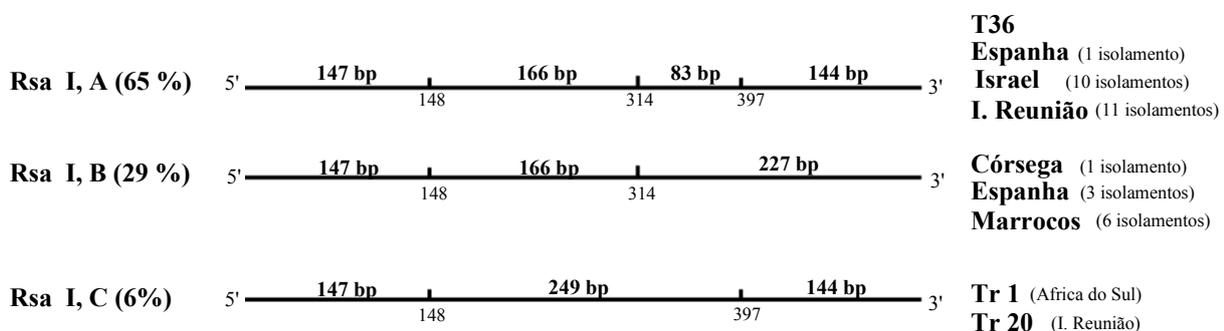


Fig. 3.2.3-2. (Continuação). Mapas de restrição de Rsa I, indicando-se a origem geográfica dos isolamentos e a frequência de ocorrência de cada mapa.

Alguns isolamentos, Tr 14 da I. Reunião e H03, F07 e H02 de Marrocos, apresentaram para além das bandas correspondentes aos mapas de restrição dos grupos Rsa I- A e Rsa

I-B, respectivamente, algumas que não ocorrem em mais isolamentos e não podem ser explicadas sem considerar a ocorrência de outros locais de restrição. Uma vez que a soma dos tamanhos dos fragmentos de cada um destes isolamentos excede o comprimento da zona amplificada, tratam-se provavelmente de isolamentos compostos por populações multi-modais de sequências.

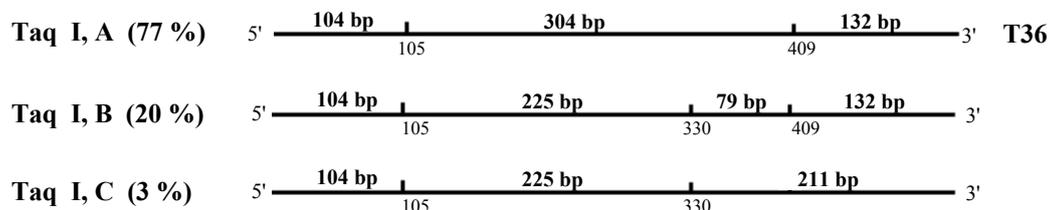


Fig. 3.2.3-2 (Continuação). Mapas de restrição de Taq I. Não é patente uma distribuição por zona geográfica de origem dos isolamentos, pelo que não se refere a sua proveniência.

A digestão por Taq I é ainda menos discriminatória que por Rsa I já que a grande maioria dos isolamentos apresenta um conjunto de bandas idêntico, correspondentes ao mapa de restrição Taq I-A. Curiosamente os isolamentos de Israel apresentam maior diversidade, distribuindo-se pelos três mapas apresentados. Para além das bandas mais intensas, os isolamentos de Reunião Tr 1, Tr 9 e os isolamentos Marroquinos H03, F07 e H02 apresentaram outras bandas, reproduzíveis, correspondentes à sobreposição de outros mapas de restrição não determinados.

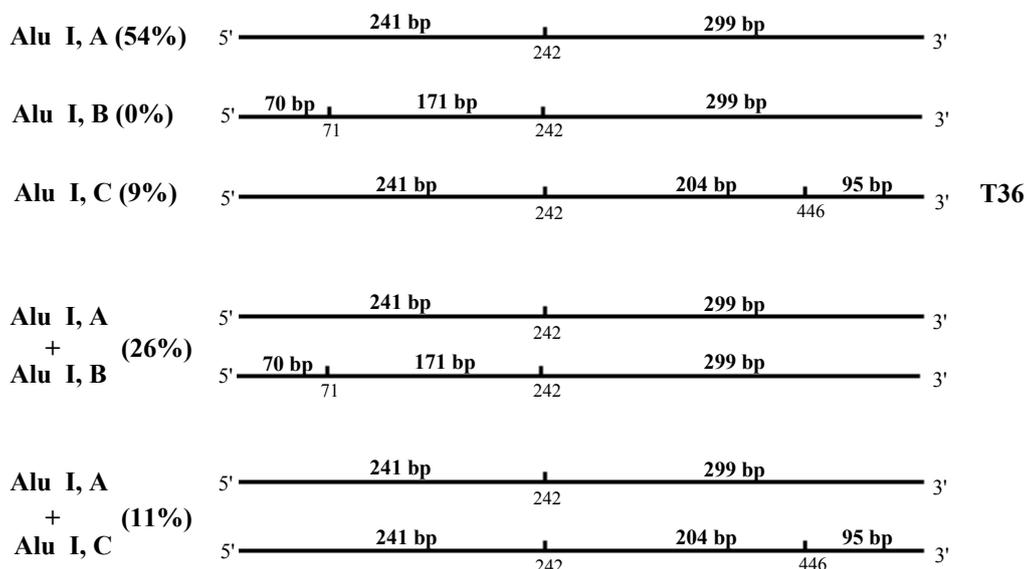


Fig. 3.2.3-2 (Continuação). Mapas de restrição por Alu I.

Os padrões de bandas obtidos com Alu I caem na grande maioria em dois tipos distintos, que não parecem estar relacionados com a origem geográfica dos isolamentos. No tipo mais frequente (54% dos isolamentos), correspondente ao mapa de restrição A, englobam-se isolamentos de quase todas as proveniências consideradas. O segundo tipo

mais frequente (26%) também não está limitado a uma zona geográfica. Para explicar os fragmentos de restrição deste grupo foi necessário admitir a criação de um local de restrição a partir do mapa A, por mutação de T para A na posição 69, que não altera o aminoácido codificado, alanina. No entanto este mapa de restrição (mapa B) ocorreu sempre em conjunto com o mapa A, visto o fragmento de 241 bp em que se situa o hipotético novo local de restrição, não desaparecer. Como à priori parecia estranho a ocorrência de um tão grande número de isolamentos com populações multimodais de sequências, repetiram-se as digestões com vários destes isolamentos para verificar se não se tratariam de digestões incompletas, tendo num dos casos a repetição sido efectuada com uma preparação de DNA obtido de uma nova amplificação. Adicionalmente, os tempos de digestão e a concentração enzimática foram aumentados em cerca de 50 %. No entanto, os padrões obtidos foram exactamente os mesmos, tendo-se inclusivamente mantido as intensidades relativas das bandas, o que torna pouco provável que se trate de digestões incompletas. No que respeita ao mapa de restrição C, correspondente à estirpe sequenciada T36, poucas vezes ocorreu isolado, tendo mais frequentemente aparecido também sobreposto ao mapa A. Tal como anteriormente, a repetição de algumas digestões apoia a ideia de que esta sobreposição de mapas de restrição não corresponde a digestões incompletas.

Tomando em conjunto as 4 enzimas, a quase totalidade das bandas pôde ser explicada através de um conjunto de 14 locais de restrição cuja presença variou de isolamento para isolamento, cobrindo um conjunto de 31 codões de aminoácidos. Para ter uma ideia se ocorrência ou não de cada local de restrição poderia ser associada a alterações de aminoácidos, verificou-se no conjunto dos resultados de Pappu *et al.* (1993b) e de Mawassi *et al.* (1993), correspondentes à estrutura primária das proteínas do capsídeo de 21 estirpes de CTV, se os aminoácidos cobertos por cada local de restrição eram ou não conservados entre aquelas as estirpes. Nove dos locais de restrição corresponderam a aminoácidos conservados entre todas as sequências enquanto que os locais Rsa(395-398), Rsa(312-315) e Hinf(459-463) corresponderam a aminoácidos conservados em 20/21 das sequências. O local de restrição Alu(240-243) corresponde a uma zona conservada em 18/21 sequências e apenas o local Rsa(146-149) corresponde a uma zona mais variável. Pode-se então concluir que é pouco provável que a maioria das variações dos padrões de bandas corresponda a variações proteicas.

Estudo da possibilidade de tipificação de isolamentos severos de CTV por RSP

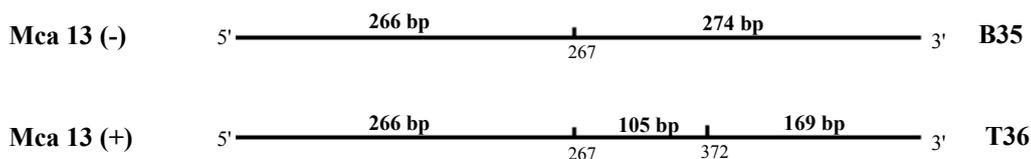


Fig 3.2.3-3. Mapa de restrição de B35 e T36 digeridos com Tru 9 I. Indica-se também a reactividade com o anticorpo Mca 13.

O anticorpo monoclonal Mca 13 é tido por reagir apenas com as estirpes severas de CTV (Permar *et al.*, 1990). Surgiram entretanto indicações de que este anticorpo reagia também com isolamentos da Ilha de Reunião classificados como suaves (Dr. M. Grisoni comunicação pessoal) no sistema de avaliação de propriedades biológicas de Garnsey *et al.* (1987). Como a reactividade do MCA 13 foi recentemente relacionada (Pappu *et al.*, 1993a) com a presença de um codão de fenilalanina (5'-GTTTAA-3') nas bases 370-372 (sublinhadas) em 10 estirpes que reagiram com aquele anticorpo e pelo contrário, em 8 estirpes que não reagiram, aquele codão estava substituído pelo da tirosina (5-GTATAA-3'), tentou-se esclarecer a situação através da tipificação genómica por RSP. Procurou-se então encontrar uma enzima de restrição que, digerindo diferencialmente aqueles codões, permitisse confirmar ao nível genómico a reacção de MCA 13. Uma enzima adequada é Tru 9 I, cujo local de restrição é TTAA. Entrando em conta com os outros codões possíveis para a tirosina, TAC, e para a fenilalanina, TTC, conclui-se que o corte no local 370-372 é condição suficiente para a reacção com o Mca 13. Na Fig. 3.2.3-3 apresentam-se os mapas de restrição referentes às estirpes T36 e B35. Nestas estirpes a reacção com Mca 13 relaciona-se com a presença de dois fragmentos de 169 bp e 105 bp e a não reacção com a sua substituição por um fragmento de 274 bp.

Fig. 3.2.3-4. CTV. Digestão com Tru 9 I. Está indicada a posição das bandas correspondentes aos fragmentos que deveriam aparecer apenas no caso dos isolamentos que reagem com o anticorpo Mca 13. Os isolamentos Tr 1 e Tr 4 foram classificados como suaves e os isolamentos Tr 11, Tr20, Tr 18 e Tr 9, como severos por meio de testes biológicos (M. Grisoni, comunicação pessoal).

Na Fig 3.2.3-4 apresentam-se as digestões com Tru 9 I de diversos isolamentos da Ilha de Reunião, verificando-se que todos os isolamentos testados originaram os fragmentos de 105 bp e 169 bp, independentemente da sintomatologia. Confirmou-se assim que a presença do codão de fenilalanina não se limita aos isolamentos de sintomatologia severa, ao contrário do que havia sido avançado por Pappu *et al.* (1993a).

3.2.4 Estudo quantitativo da variabilidade genómica do CTV.

O número de substituições nucleotídicas por posição em cada par de isolamentos foi estimado a partir da matriz dos fragmentos de restrição (Quadro 3.2.3) com o auxílio do programa RESTSITE, tal como para o GFLV.

Verificou-se que globalmente a população analisada é bastante heterogénea, com um valor da diversidade nucleotídica elevada: 27 (erro padrão: +/- 2) por cada 1000 bases.

3.2.4.1 Análise da diferenciação geográfica das populações de CTV.

Os valores das divergências e diversidades nucleotídicas agrupando os isolamentos por local de origem. estão apresentados no Quadro.3.2.4.1.

	Africa do Sul	Corsega	Espanha	Florida	Israel	I. Reunião	Marrocos
Africa do Sul (1)	--						
Corsega (1)	28,1	--					
Espanha (4)	21,3	8,7	22,3				
Florida (1)	31,5	4,3	16,9	--			
Israel (10)	54,1	43,0	22,0	34,9	11,9		
I. Reunião (12)	37,5	32,9	13,1	23,5	18,8	12,4	
Marrocos (6)	44,4	14,4	5,7	49,6	37,5	26,6	7,8

Quadro 3.2.4.1 Divergências (canto inferior) e diversidades (diagonal) nucleotídicas por 1000 bases, entre populações de CTV de distinta origem geográfica. Entre parentesis indica-se o número de isolamentos de cada proveniência.

Nos casos em que se dispôs de mais de um isolamento e foi possível estimar as diversidades nucleotídicas, estas não foram elevadas. Os isolamentos de Espanha foram os que apresentaram maior diversidade entre si e os de Marrocos foram os mais homogéneos. Nos casos da Ilha de reunião e de Israel, em que se agruparam isolamentos de sintomatologia diversa, a diversidade foi também baixa. Assim, nestes três casos a proximidade de origem geográfica parece relacionar-se com uma menor diversidade nucleotídica. É ainda patente naquele quadro a fraca divergência entre os isolamentos da zona ocidental da bacia Mediterrânica (Marrocos, Espanha e Córsega).

3.2.4.2 Análise de outras possíveis relações de agrupamento entre isolamentos.

Nas figuras 3.2.4.2-1 e 3.2.4.2-2, apresentam-se os resultados da Análise de Coordenadas Principais e o dendograma construído pelo método UPGMA a partir das estimativas do número de substituições nucleotídicas por posição entre os isolamentos. Como é patente nestas figuras, principalmente no dendograma, a origem geográfica é o principal factor de agrupamento. Distinguem-se claramente três grupos que englobam respectivamente 82 %, 80 % e 92 % dos isolamentos oriundos da zona ocidental do Mediterrâneo, de Israel e da Ilha de Reunião. Os principais factores de diferenciação destes grupos são a ausência do local de restrição Hinf I (501-505) nos isolamentos da ilha de Reunião e a ausência do local Rsa I (395-398) na zona Mediterrânica Ocidental. Um quarto agrupamento, menor, é constituído por isolamentos de origem e propriedades biológicas diversas. Pode também observar-se que os isolamentos de Espanha, pela sua dispersão, parecem ter tido diversas origens.

Fig. 3.2.4-1. Análise de Coordenadas Principais efectuada a partir das estimativas das divergências nucleotídicas entre isolamentos, tendo-se sobreposto uma árvore de distancias mínimas. Nas projecções repetidas do lado direito da figura estão identificados os isolamentos. As posições assinaladas com um círculo correspondem a grupos de isolamentos projectados no mesmo local (Tr6, Tr2, Tr24, Tr25, Tr28, Tr5, Tr7), (D07, B35, 78LM, P09), (H03, H02, F07), (Ach-T, Hed-T, ST, ST4, VT, VTa).

Uma vez que a origem geográfica parece ser o factor de agrupamento mais forte, a eventual relação com as propriedades biológicas deverá ser efectuada dentro de cada zona de origem. No caso de Israel não é aparente qualquer relação, visto estarem agrupados muito próximamente isolamentos que causam sintomatologia bastante distinta, o que também já havia sido observado por Mawassi *et al.*, (1993). No caso da Ilha de Reunião, a maior parte dos isolamentos classificados suaves ou moderados estão agrupados em conjunto enquanto os severos se distanciam sem se agruparem entre si. Uma situação semelhante, embora com menor número de isolamentos, pode observar-se nos resultados de Pappu *et al.*, (1993a), referentes a isolamentos de Flórida.

Fig. 3.2.4-2. Dendograma obtido pelo método UPGMA aplicado às estimativas das divergências nucleotídicas entre isolamentos. A escala horizontal representa o número de substituições por cada 1000 bases.

anexo. Fig 3.1.3-1 (Continuação)
digestões 2

=glv digestões 3

Fig. 3.1.3-1 (Continuação) (*) representa a posição de bandas originadas por amplificação inespecífica que não são fragmentos de restrição.

digestoes 4 Fig. 3.1.3-1 (Continuação).

digestoes 5 GFLV

digestoes 6 GFLV

anexo 3.2.3. Fig. 3.2.3-1 (Continuação).

Fig. 3.2.3-1 (Continuação).

4. Discussão

4.1 Métodos de tipificação genómica.

Nos trabalhos englobados neste capítulo desenvolveram-se três métodos de tipificação genómica de patogéneos virais directamente a partir do extracto vegetal, que se caracterizam por uma grande facilidade de aplicação pois evitam a laboriosa extracção de ácidos nucleicos por métodos convencionais. Estes métodos que conjugam a IC/RT-PCR com a tipificação genómica têm sido também aplicados, em conjunto com o grupo de investigadores do CIT-INIA (Madrid), a diversos outros vírus dos grupos Cucumovírus, Tospovírus, e Potyvírus (De Blas *et al.*, 1993; Martinez-Herrera *et al.*, 1994; Nolasco *et al.*, 1994a) e foram objecto de dois pedidos de patente no "Registro de la Propiedad Industrial de España" (Nolasco *et al.*, 1993a, 1994b).

Recentemente foram desenvolvidos métodos de tipificação molecular de DNA, AP-PCR (Williams *et al.*, 1990); ou RAPD (Welsh e McClelland, 1990) ou de RNA (Welsh *et al.*, 1992) que recorrem à hibridação aleatória de um único iniciador, geralmente curto, à cadeia a tipificar. Estes métodos têm sido largamente utilizados no mapeamento de genes, taxonomia, filogenética e detecção de mutações em praticamente todos os grupos de seres vivos, ou comparação da expressão genómica em diversos tecidos (Welsh *et al.*, 1994). Mas, dada a sua falta de especificidade, não é possível aplicá-los a vírus que não estejam purificados, o que por seu turno inviabiliza a sua aplicação a um número considerável de isolamentos. De facto não se encontram referências bibliográficas acerca da sua aplicação no campo da virologia. No método SAcDNA estes problemas puderam ser ultrapassados recorrendo à etapa de imunocaptura. Adicionalmente, limitando a etapa de baixa restritividade à transcrição reversa, foi possível obter um aumento de especificidade que permite delimitar a zona genómica que se pretende analisar.

Dada a simplicidade dos protocolos dos métodos de tipificação apresentados, é possível obter com rapidez dados de tipificação genómica de um número elevado de amostras, o que vem contribuir para preencher uma falha importante no âmbito da virologia, particularmente em virologia vegetal. Tal permitirá alargar consideravelmente os estudos relacionados com a tipificação genómica, tais como: epidemiologia e evolução virais, relação vírus-hospedeiro e vírus-vector, protecção cruzada, etc... Fora do âmbito da investigação, estes métodos são suficientemente simples para poderem ser aplicados por serviços de oficiais de agricultura com vista ao controlo de determinadas estirpes potencialmente mais destrutivas.

Comparativamente com a análise de RNA bicatenário, os métodos descritos neste capítulo apresentam grandes vantagens pois são independentes do hospedeiro e da presença de outros parasitas, não estão limitados pelo modo de expressão genómica do vírus a analisar, podem ser aplicados directamente a amostras de campo, são muito menos trabalhosos e requerem quantidades muito pequenas de tecido, o que possibilita colher um número elevado de amostras do mesmo hospedeiro.

Comparativamente com o emprego de anticorpos ou sondas, tanto a tipificação por RSP como por SAcDNA permitiram discriminar entre diversos isolamentos de origem francesa indistinguíveis com um painel de 8 anticorpos monoclonais (Huss *et al.*, 1987) ou com sondas de cDNA (Fuchs *et al.*, 1991a).

No quadro 4.1 estão resumidas diversas características destes métodos que são discutidas em pormenor mais adiante.

Quadro 4.1 Comparação entre os métodos de tipificação empregues

	SSCP	RSP	SAcDNA
Poder discriminante	2	3	1
Possibilidade de analisar relações entre isolamentos	não	sim	?
Objecto da tipificação	Variantes mais frequentes	Variantes mais frequentes	População genómica
Reproducibilidade	3	1	2
Trabalho laboratorial	2 - 3	3	1
Custo (reagentes)	1	3	1

Na classificação de 1 a 3, o valor 1 é o mais favorável.

Para comparar o poder discriminante destes métodos, tomaram-se os resultados do CTV, vírus que apresentou a menor variabilidade. Considerando o grupo de isolamentos analisado pelos três métodos, verifica-se que mesmo utilizando 4 enzimas de restrição, não foi possível distinguir entre si 7 isolamentos oriundos da Ilha de Reunião. Por SSCP, 5 de estes 7 isolamentos apresentavam ainda padrões muito semelhantes, enquanto que por SAcDNA, com um dos iniciadores, apenas 3 daqueles isolamentos apresentavam padrão idêntico e com o outro, 5 isolamentos. Contudo, tomando em conjunto os dados de ambos conseguiu-se a discriminação de todos aqueles isolamentos. Considerando agora o grupo analisado por SAcDNA e RSP (23 isolamentos), verifica-se que por SAcDNA se conseguiu distinguir 20 padrões diferentes enquanto que por RSP apenas se distinguiram 13. Assim, empregando dois iniciadores, a SAcDNA apresenta-se como o método mais discriminatório. Deve-se notar que enquanto por RSP e SSCP a comparação entre isolamentos esteve limitada a menos de 600 bases, por SAcDNA a zona comparada

estendeu-se até cerca de 2000 bases. Outro factor que pode pesar também é a possibilidade de formas raras presentes na população genómica de cada isolamento contribuírem para a tipificação por SAcDNA mas não por RSP.

No caso da análise por RSP é possível aumentar o poder discriminante empregando um maior número de enzimas, mas tal não se afigura muito prático. No caso da análise por SSCP poder-se há considerar a possibilidade de aumentar o poder discriminante efectuando duas electroforeses em paralelo, em diferentes condições de temperatura ou composição do gel (Beier, 1993). Outro factor ainda, que não foi investigado neste trabalho, e que poderá influir no poder discriminante da análise por SSCP é o comprimento do segmento de DNA a analisar. Segundo vários autores (vide introdução deste capítulo) a eficiência da detecção de mutações pontuais diminui fortemente quando o comprimento do fragmento a analisar ultrapassa as 200 bp; tanto no caso do GFLV como do CTV empregaram-se neste trabalho fragmentos de mais de 500 bp. No entanto, paradoxalmente, não é certo que uma grande eficiência de detecção de mutações conduza a melhores resultados. Atendendo a que cada isolamento é constituído por uma distribuição de sequências diferentes e que a sequência modal pode não ser muito abundante, se houver uma alta eficiência na distinção entre sequências, o número de exemplares da sequência modal pode ser insuficiente para permitir a sua detecção no gel de electroforese.

A análise e interpretação dos resultados é mais fácil no caso de RSP, principalmente se se puder recorrer a um conjunto de mapas de restrição ou de dados de sequenciação do vírus, elementos que ajudam muito na identificação das bandas de cada isolamento. Além disso a comparação entre isolamentos pode ser feita banda a banda e, considerando cada fragmento um carácter unitário, calcular um índice de semelhança ou estimar as diversidades nucleotídicas, com vista a estudar as relações entre os isolamentos. No caso do SAcDNA põem-se problemas semelhantes aos da análise de resultados obtidos por amplificação aleatória de DNA ou RNA, discutidos por Welsh *et al.* (1994). Por um lado a independência dos caracteres (fragmentos) não está ainda suficientemente investigada. Por outro lado há que esclarecer o modo de tomar em conta a intensidade de cada banda. Esta depende principalmente de dois factores: 1) do grau de homologia do local do genoma onde se vai unir o iniciador inespecífico para com a extremidade 3' desse iniciador. 2) da proporção de variantes genómicas que apresentam esse local de homologia. O esclarecimento desta questões é determinante para poder utilizar os dados de SAcDNA também no estudo das relações entre isolamentos ou apenas como método de discriminação e identificação. No caso da análise por SSCP apenas se pode concluir acerca da identidade ou não dos isolamentos visto não ser possível relacionar directamente a estrutura primária de um segmento monocatenário de

DNA com a sua mobilidade electroforética (Hayashi, 1992). Por outro lado há por vezes alguma dificuldade em distinguir os padrões quando as bandas estão em posições demasiado próximas.

Relativamente à reproducibilidade dos resultados, não parecem existir problemas com qualquer dos métodos. No entanto há que ter em conta a maior ou menor facilidade com que se atinge o grau de rigor que é necessário existir nas condições experimentais para assegurar essa reproducibilidade. Tais condições são mais fáceis de assegurar na análise por RSP que não apresenta qualquer etapa que seja especialmente crítica. Tal já não se passa na análise por SSCP em que é necessário um apertado controle nas condições de temperatura durante a electroforese e na composição do gel. A SAcDNA tem quanto a este ponto um posição intermédia; a sua etapa crítica é a transcrição reversa e é necessário prestar atenção aos factores que influem na hibridação do iniciador inespecífico, principalmente: concentração do iniciador e concentração salina e temperatura, o que não levanta dificuldade de maior.

Relativamente ao trabalho laboratorial envolvido, o método mais simples é SAcDNA que é executado por um protocolo análogo ao da IC/RT-PCR. A análise por SSCP pode ser mais ou menos trabalhosa consoante se tenha de recorrer ou não à coloração com nitrato de prata. A análise por RSP é a mais repetitiva e trabalhosa se se pretender um poder de discriminação semelhante ao dos outros métodos.

A DNA polimerase termoestável empregue nestes trabalhos foi a Taq polimerase, que não tem associada a actividade de exonuclease 3'-5', pelo que eventuais erros resultantes da incorporação de um nucleótido não complementar do molde não são eliminados (Tindall e Kunkel, 1988). Este facto origina uma taxa de mutação que tem sido avaliada entre $1,7 \times 10^{-4}$ e 5×10^{-6} por nucleótido por ciclo de replicação (Gelfand e White, 1990), valor que é da mesma ordem de grandeza do estimado para as transcritases reversas (Creighton *et al.*, 1992). Embora estes valores das taxas de mutação possam parecer potenciais fontes de erro de tipificação genómica, na realidade não o são. Por um lado as mutações distribuem-se aleatoriamente no segmento amplificado pelo que no final da amplificação a fracção de moléculas de DNA que apresenta um determinado erro é demasiado baixa para poder resultar na criação de um novo tipo genómico fictício. Por outro lado, num estudo matemático simplificado (Kraweczac *et al.*, 1992) foi concluído que nas condições de amplificação e análise por RSP geralmente empregues, a fracção de moléculas que não sofre mutação é suficientemente elevada para que seja diminuta a probabilidade de falhar a caracterização de um determinado tipo genómico existente. Noutro estudo, Almond *et al.* (1992) verificaram empiricamente que a amplificação por PCR com Taq polimerase não alterava a estrutura de quasi espécie de um isolamento do

Simian Immunodeficiency Vírus (SIV) e que a diversidade de sequências nucleotídicas amostradas em diferentes ocasiões era reproduzível.

4.2 Variabilidade comparativa de GFLV, CTV e outros vírus.

No âmbito da virologia vegetal há poucos estudos que tenham permitido estimar a divergência nucleotídica entre um número relativamente grande de isolamentos, principalmente de populações naturais. Tanto quanto foi possível analisar a bibliografia sobre o assunto, é a primeira vez que são apresentados dados quantitativos de variabilidade de populações naturais de vírus de culturas lenhosas.

Os poucos estudos que abordam a epidemiologia molecular de vírus de plantas em condições naturais referem-se ao PMMV (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1989) ao TMGMV (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1991), primeiramente designado por U5-TMV, e ao RNA satélite do CMV (CMV Sat RNA) (Aranda *et al.*, 1993). Estes estudos foram efectuados em culturas hortícolas, em que foram analisadas diversas populações do Sueste de Espanha. No caso do PMMV, o valor médio da divergência nucleotídica entre epifítias que se verificaram em cinco anos consecutivos na zona de Almeria foi de 18,6 substituições por 1000 bases (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1989). No caso do TMGMV, o valor médio da divergência variou entre 14,2 e 21,6 (substituições por 1000 bases) consoante a análise recaiu em populações locais ou separadas de centenas de quilómetros (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1991). Este caso apresenta especial interesse pelo facto de o método de tipificação empregue ter sido o mapeamento por RNase T1 e as divergências nucleotídicas estimadas pelo mesmo algoritmo que foi empregue neste trabalho, tendo a amostragem média recaído sobre, respectivamente, 9% e 12% do genoma viral. Com base nestes, e noutros estudos (Rodríguez-Cerezo e Garcia-Arenal, 1989), ambos os vírus foram considerados como pouco variáveis originando populações geneticamente estáveis. No caso do CMV Sat RNA (Aranda *et al.*, 1993), foram analisadas por "RNase Protection Assay" populações obtidas em três anos consecutivos num raio de dezenas de quilómetros, mas o método de estimar a divergência nucleotídica foi distinto dos anteriores. O valor da divergência obtido foi 64,4 substituições por 10000 bases. Sendo o CMV sat RNA geralmente considerado geneticamente bastante variável, tomou-se este valor como referência de uma população heterogénea e variável.

Comparativamente, no caso do GFLV, o valor da diversidade nucleotídica encontrado neste trabalho para o gene da proteína do capsídeo leva a considerá-lo como tendo uma variabilidade bastante elevada.

Já no caso do CTV, os valores encontrados são semelhantes aos do PMMV e TMGMV, correspondendo portanto a um caso de baixa diversidade nucleotídica.

Note-se porém que sem a menor indicação do que se passa com os outros genes virais, possivelmente sujeitos a outras forças de selecção, não é possível extrapolar esta conclusão para a totalidade do genoma.

4.2.1 Variabilidade genómica do GFLV

Contra o que inicialmente se esperava com base nos conhecimentos disponíveis obtidos por serologia e hibridação molecular, a variabilidade encontrada no terço 5' terminal do gene da proteína do capsídeo foi bastante elevada. Com base nos dados obtidos por RSP tentou-se explicar esta variabilidade por meio de hipotéticos mapas de restrição que se coadunassem com um modelo de variabilidade assente sobretudo em ganhos ou perdas de locais de restrição originadas por mutações pontuais, em acordo com um modelo de "quasi-espécie" (Domingo *et al.*, 1985). Neste panorama não parece haver contradição com o trabalho de Fuchs *et al.* (1991a) que encontrou grande homogeneidade entre diversos isolamentos por hibridação molecular com sondas de várias centenas de nucleotídeos, incapazes de discriminar mutações pontuais. Outra característica dos mapas de restrição construídos é que a maior parte dos locais de restrição considerados não envolve, na sua aquisição, alteração de aminoácidos. A variabilidade encontrada repercuti-se-ia então pouco na proteína do capsídeo, o que também está de acordo com a homogeneidade serológica deste vírus (Dias e Harrison, 1963; Huss *et al.*, 1987).

Outro aspecto importante que foi evidenciado pela análise por RSP foi a ocorrência de populações multi-modais do gene da proteína do capsídeo. Este aspecto, que parece ser frequente com outros vírus, como o CTV, não havia ainda sido demonstrado para o GFLV.

4.2.2 Epidemiologia Molecular de GFLV

Uma das importantes características da diversificação genómica deste vírus é que populações geograficamente distintas parecem compartilhar uma alta proporção de variantes comuns. Esta falta de relação das distancias (espaciais) entre os locais de origem dos isolamentos e as estimativas das divergências nucleotídicas manifestou-se tanto entre regiões (países, províncias) como ao nível local, dentro da mesma vinha. Este facto é bastante surpreendente pois a disseminação do GFLV, quer através do material de propagação vegetativa quer pelo nemátodo vector, *Xiphinema index*, está intimamente

ligada à proximidade espacial (no que respeita à propagação vegetativa, pelo menos em Portugal, a principal fonte de material para enxertia é geralmente local). No entanto com o TMGMV que em condições naturais apenas se transmite por contacto também foi demonstrada a inexistência de correlação entre a distancia geográfica e a divergência nucleotídica (Rodriguez-Cerezo *et al.*, 1991), bem como a falta de evidência para a subdivisão da população ao nível geográfico (Moya *et al.*, 1993).

Outro aspecto que se revelou interessante foi a população de isolamentos existente num raio de algumas dezenas de metros apresentar uma divergência nucleotídica semelhante à que se encontrou num raio de milhares de quilómetros (Vale de Parra: 73,8; Europa: 84,7 substituições por 1000 bases). Também aqui existe algum paralelismo com o caso do TMGMV (Rodriguez-Cerezo *et al.*, 1991), em que a divergência, embora em termos absolutos fôsse menor que para o GFLV, apenas aumentou de 14,2 para 21,6 substituições por 1000 bases ao considerar locais de amostragem com um raio de metros ou de centenas de quilómetros. Aqueles autores sugeriram que existiria um limite máximo da diversidade genómica em resultado de uma selecção negativa sobre a variação em determinados locais do genoma. No caso do GFLV, a proximidade desse eventual limite ainda parece mais marcada, mas apenas se encontrou um local de restrição (com Hinf I) comum a todos os isolamentos. Parece assim que, de forma independente, e portanto partindo de isolamentos distintos, cada população é capaz de explorar a potencialidade de variar de certos locais do seu genoma tendendo para um limite máximo de diversificação em que a composição das populações tende a aproximar-se.

Embora o número de casos em que se efectuou a tipificação genómica do vírus simultaneamente a partir de diversas partes da mesma planta ou em anos consecutivos, fosse reduzido, verificou-se a quase ausência de variação em cada planta, sugerindo a existência de um equilíbrio da população de variantes genómicas de cada isolamento. Num caso analisado mais em pormenor pôde verificar-se que este equilíbrio é possível mesmo com uma população multi-modal de variantes.

Na vinha de Vale de Parra, o elevado número de plantas infectadas próximas umas das outras e a presença do nemátodo vector, são indicações fortes de que grande parte das plantas tenha sido infectada pelo vector, já depois da instalação da vinha. Nesta situação esperava-se que a transmissão pelo vector actuasse como factor de homogeneização entre os isolamentos, o que não se verificou. Uma vez que os isolamentos de cada planta parecem estar em equilíbrio, é algo intrigante a origem da variabilidade entre as plantas. Uma possível causa da variabilidade poderá, paradoxalmente, estar relacionada com a própria transmissão pelo vector devido à falta de representatividade da população que é

transmitida relativamente à população genómica de origem. Esta diferente distribuição da população inoculada daria origem nos tecidos recém infectados a novas relações de concorrência entre as variantes genómicas, possibilitando o surgimento de populações com outras distribuições genómicas e com variantes modais diferentes das da população original. Para tal seria necessário que as variantes genómicas mais frequentes na população original representassem relativamente ao total da população uma fracção pequena, tal como no caso do fago Q β (Domingo *et al.*, 1978), e que a quantidade de partículas virais inoculada pelo vector fôsse pequena. Não há de momento dados que permitam inferir directamente a validade desta hipótese mas recentemente (Esmenjaud *et al.*, 1993), (Esmenjaud, comunicação pessoal) verificou-se a existência de acentuada variação nucleotídica entre sequências de GFLV obtidas de *X. index* de uma mesma amostra de solo. A influência da transmissão viral em condições naturais, na variabilidade, não tem sido estudada em virologia vegetal. Em virologia animal são conhecidas diversas situações em que a variabilidade é, em condições naturais, afectada por episódios periódicos de redução drástica da população ligados à transmissão viral, alternando com o restabelecimento de grandes populações (Duarte *et al.*, 1993).

Não foi possível atribuir significado biológico aos diversos tipos genómicos encontrados, por se ter partido de uma população de isolamentos não caracterizada biologicamente, na maior parte vegetando em condições de campo. No entanto encontrou-se uma nítida sub-divisão em dois grupos facilmente distinguíveis pela presença, ou não, de um determinado local de restrição por Hinf I. O significado desta divisão será agora mais facilmente investigado no que respeita a sintomatologia, transmissibilidade e outras características, com a certeza de que, se existir, é possível identificá-lo. Esta abordagem para tentar relacionar as propriedades biológicas com a tipificação genómica é oposta à geralmente utilizada, em que se parte de uma caracterização biológica mas se corre o risco de não encontrar um marcador molecular apropriado, ou as propriedades biológicas seleccionadas em ambiente controlado de estufa não terem contrapartida em condições de cultura naturais (por exemplo a reacção de "Seedling-Yellows" no caso do CTV).

4.2.3 Variabilidade genómica e epidemiologia molecular do CTV

A análise da variabilidade do CTV recaiu sobre cerca de 80% do gene da proteína do capsídeo mostrando um gene com baixos valores de diversidade nucleotídica e em que, tal como o GFLV, as mutações detectadas não parecem estar relacionadas com variações peptídicas, o que está de acordo com a conhecida homogeneidade serológica deste vírus.

Note-se no entanto que o genoma do CTV com cerca de 20 Kbp é o maior de entre os vírus de plantas pelo que muita da variabilidade deste vírus deverá estar associada a outras regiões para além da proteína do capsídeo.

Não obstante a homogeneidade, foi possível distinguir entre si por SAcDNA 87% dos isolamentos analisados. Concretamente no caso do CTV, é importante dispor de métodos que permitam eficientemente distinguir entre isolamentos e que permitam desenvolver o estudo da epidemiologia do vírus, estudos de protecção cruzada e evitar a propagação de determinadas estirpes (Bar-Joseph *et al.*, 1989). Na ausência de alternativas, isto tem sido feito principalmente por análise de RNA bicatenários (Moreno *et al.*, 1990), com as limitações inerentes a este método. Além disso, a análise de RNA bicatenários tem um poder de discriminação bastante baixo, que limita a sua aplicação; numa análise de padrões de RNA bicatenários obtidos de 137 isolamentos (Guerra *et al.*, 1991), apenas se distinguiram 16 padrões distintos, havendo 58% dos isolamentos com o mesmo padrão.

O conhecimento de que partir de um único isolamento se podem segregar durante a transmissão, principalmente por afídeos, novos isolamentos com propriedades distintas é já antigo e foi inicialmente demonstrado por recurso a métodos biológicos (Grant e Higgins, 1957). De então para cá esta evidência tem crescido, tendo também sido demonstrada por análise de RNA bicatenários (Dodds *et al.*, 1987; Moreno *et al.*, 1990, 1993). Estes factos têm sido geralmente interpretados segundo a sugestão de Grant e Higgins (1957), de que cada isolamento seria composto por uma mistura de estirpes. Neste trabalho alguns isolamentos originaram consistentemente por RSP, com uma ou mais enzimas, conjuntos de fragmentos que denotam amplificação de mais do que uma variante genómica. O mesmo facto é também referido por Gillings *et al.* (1993), com digestões de Hinf I do gene da proteína do capsídeo. Parece portanto que frequentemente, cada isolamento é composto por uma mistura de componentes cuja distribuição estatística de variantes genómicas, no que respeita ao gene da proteína do capsídeo, é multi-modal. Na maior parte dos casos em que tal ocorreu, as variantes genómicas diferiam apenas num local de restrição.

Recentemente Pappu *et al.*, (1994) sequenciaram uma extensão significativa do genoma do CTV para montante do gene da proteína do capsídeo tendo encontrado um outro gene cuja sequência é relacionada com a da proteína do capsídeo. Se este segundo gene fôsse suficientemente semelhante poderia ser também amplificado pelos iniciadores que se empregaram e originar resultados susceptíveis de ser interpretados como a ocorrência de uma população bi-modal de variantes. Analisando a sequência desse segundo gene verificou-se que esta eventualidade não poderia ocorrer com o iniciador de

montante empregue neste trabalho nem com o iniciador empregue por Gillings *et al.* (1993) por apresentarem muito baixa homologia com aquela região do genoma.

Não se pôde concluir que houvesse uma tendência para os isolamentos se agruparem conforme as suas propriedades biológicas dentro de cada zona geográfica. Embora no caso da Ilha de Reunião diversos isolamentos distintos por SAcDNA e que originam uma sintomatologia suave ou moderada divergissem pouco, este modo de agrupamento já não se verificou nos isolamentos de Israel. Por outro lado Pappu *et al.* (1993b) referem relações entre a sintomatologia causada por alguns isolamentos (onze) e o seu modo de agrupamento por UPGMA com base na sequência de aminoácidos da proteína do capsídeo enquanto Gillings *et al.* (1993) referem que os isolamentos classificados como suaves se concentram todos em apenas dois mapas de restrição por Hinf I enquanto os restantes se dispersam por 5 mapas de restrição; contudo nesse estudo os isolamentos suaves eram apenas 12 e os restantes 35.

Quanto à alegada relação referida por Pappu *et al.* (1993a) entre a sintomatologia e a presença ou ausência do codão de fenilalanina na posição 370-372 não se verificou com os isolamentos suaves da Ilha da Reunião. Estes foram digeridos por Tru 9 I, enzima que deveria cortar naquela posição apenas os isolamentos severos. Adicionalmente pôde também verificar-se nas sequências dos isolamentos de Israel (Mawassi *et al.*, 1993) que o codão de fenilalanina, TTT, é conservado mesmo em isolamentos classificados como originando sintomatologia suave. A validade desta relação havia também entretanto sido posta em causa ao nível serológico também por Kano *et al.* (1989), que verificara a reacção do MCA13 com alguns isolamentos suaves do Japão. Esta relação não pode ser portanto extrapolada para isolamentos distintos daqueles para que foi estabelecida.

Parece portanto ressaltar destes diversos estudos que não foi ainda detectada uma relação entre a sintomatologia e a proteína do capsídeo que possa ser generalizada e servir para prever as propriedades de um isolamento.

Ao contrário do GFLV e dos outros vírus já referidos para os quais há dados de divergências nucleotídicas interpopulacionais, o principal factor de diversificação do gene da proteína do capsídeo parece ser o distanciamento geográfico. As diversidades nucleotídicas atingidas em cada grupo geográfico são semelhantes e não traduzem importantes diferenças de contexto epidemiológico que existem entre as zonas da região Mediterrânica e a Ilha de Reunião. Nomeadamente nesta última, a presença do muito mais eficiente vector *T. citricida* ou de isolamentos capazes de atingir títulos nos tecidos infectados muito mais elevados (a avaliar pelo ELISA, resultados não apresentados), que no conjunto proporcionam uma muito maior circulação do CTV. Estes resultados

contrastam com os de Guerri *et al.* (1991) que referem maior diversidade nos padrões de RNA bicatenário obtidos de isolamentos de zonas com mais alta taxa de infecção.

Nas populações estudadas nunca se atingiu uma diversificação tão acentuada como no caso do GFLV, o que parece evidenciar um mecanismo de diversificação com características diferentes. Seria interessante poder comparar a distribuição de variantes existente num isolamento de GFLV e num de CTV para saber se as diferenças encontradas se relacionam com mecanismos intrínsecos, como por exemplo, diferentes taxas de mutação por genoma replicado, ou se se relacionam com outros factores de ordem epidemiológica relativos à transmissão ou aos hospedeiros.

Conclusões Gerais

A pesquisa de RNA bicatenário, enquanto método de diagnóstico viral, apresenta um interesse limitado, pela sua baixa sensibilidade, pelo trabalho laboratorial necessário para a executar e pela dependência do hospedeiro no que respeita ao método de extração de ácidos nucleicos e à eventual presença de RNA bicatenário endógeno. Estas características dificilmente permitirão a sua utilização em condições de rotina. Por outro lado, uma característica importante é a possibilidade de ser utilizada na ausência de reagentes específicos, o que permite abordar problemas de etiologia presumivelmente viral ainda não esclarecidos, como por exemplo, neste trabalho, o caso do Mosaico de figueira. Mesmo nestes casos a sua utilização será essencialmente exploratória, ou preparativa com vista à aquisição de dados de sequenciação que possibilitem a aplicação de outros métodos de diagnóstico também virados para o genoma viral. De qualquer modo, o âmbito de aplicação deixa de ser o diagnóstico de rotina para entrar na investigação.

Pelo contrário, o método de diagnóstico desenvolvido neste trabalho (IC/RT-PCR), que conjuga a captura do patogéneo por anticorpos, com a amplificação por PCR de parte do genoma viral, tem uma aplicabilidade que parece ser geral para vírus e patogéneos sub-virais com genoma de RNA. Este método tem a elevada sensibilidade característica das técnicas de amplificação, sem contudo se basear nos laboriosos protocolos que geralmente são característicos das técnicas que envolvem a manipulação de ácidos nucleicos. Os resultados preliminares respeitantes à detecção dos produtos de amplificação por fluorimetria abrem adicionalmente a possibilidade de efectuar todo o processo numa placa semelhante às empregues para a técnica ELISA, com um número mínimo de manipulações e um grau de automatização semelhante ao daquela técnica. Ao permitir a detecção de RNA satélites e dispensar o emprego de anticorpos específicos para o capsídeo, o âmbito de aplicação deste método é mais alargado que o da técnica ELISA.

Ao testar comparativamente por IC/RT-PCR e ELISA lotes de amostras que se sabia à priori estarem provavelmente infectadas com GFLV ou CTV verificou-se que o vírus era detectado em mais de um terço das amostras negativas por ELISA. Este resultado mostra directamente que em situações de diagnóstico que envolvam elevada

responsabilidade, como por exemplo na certificação de material de propagação vegetativa, o uso da IC/RT-PCR não se deveria limitar à re-testagem de resultados duvidosos por ELISA mas sim de todos os negativos.

No caso do CTV as sequências dos iniciadores escolhidas foram adequadas a todos os isolamentos, de origem diversa, que foram testados. Tal não aconteceu com o GFLV que se verificou ter um gene da proteína do capsídeo altamente variável. Neste caso, e noutros semelhantes que se venham a detectar, é necessário escolher regiões do genoma mais conservadas para efeitos de diagnóstico.

Em isolamentos naturais de GFLV de origem Portuguesa detectou-se a presença do RNA satélite, com uma frequência mais elevada do que havia sido previamente assinalada por outros autores que recorreram a sondas de cDNA marcadas radioactivamente. É a primeira vez que este satélite é detectado em Portugal.

A IC/RT-PCR pode ser também um meio bastante útil nos estudo de relações serológicas distantes entre vírus. Num número limitado de ensaios verificou-se que o GFLV poderia ser reconhecido, não só por anticorpos para o ArMV, com o qual existe uma relação serológica reconhecida, mas também por anticorpos para outros Nepovírus com os quais nunca tinha sido posta em evidência qualquer relação serológica.

Uma característica essencial de IC/RT-PCR é dispensar tratamentos específicos, químicos ou físicos, para possibilitar o acesso da RTase ao genoma viral. Os ensaios efectuados para esclarecer este aspecto apontam para um mecanismo gradual em que a RTase é capaz de extrair o genoma viral de dentro de viriões, provavelmente distorcidos pelas forças de interacção com os anticorpos.

Para além do diagnóstico, a IC/RT-PCR foi também vantajosamente empregue na tipificação genómica de vírus, quer como técnica preparativa de métodos de análise mutacional (por exemplo: SSCP, RSP), quer como método directo de tipificação empregando um iniciador de transcrição reversa de sequência não específica (SACDNA).. Qualquer destes métodos é passível de ser empregue em condições de rotina, directamente em amostras provenientes do campo e não está, tal como a pesquisa de RNA bicatenário, limitado a determinados grupos de vírus.

Entre os três métodos de tipificação, SACDNA foi o que apresentou maior poder discriminante entre isolamentos do mesmo vírus e é também o menos trabalhoso. Num dos exemplos de aplicação foi possível distinguir entre diversos isolamentos de GFLV que com sondas de cDNA ou anticorpos monoclonais não são discerníveis. Ainda não

está esclarecida a possibilidade de empregar este método no estudo das relações entre os isolamentos, o que seria altamente interessante. A análise por SSCP do produto amplificado foi o método que apresentou menos interesse. A análise por RSP, embora seja menos discriminante que os outros, apresenta como grande atractivo a possibilidade de determinar as relações entre isolamentos e pode ser utilizada na quantificação da variabilidade genética de populações de isolamentos.

O GFLV pode ocorrer em populações genómicas multimodais no mesmo hospedeiro e, contrariamente ao esperado no início dos trabalhos, apresenta grande variabilidade no gene da proteína do capsídeo. De acordo com os modelos postulados para explicar os fragmentos de restrição, esta variabilidade não se traduziria ao nível proteico.

A nível local, e no que respeita ao gene da proteína do capsídeo, o distanciamento genético não se relacionou com a distancia espacial entre as plantas de onde foram colhidos os isolamentos. Uma hipótese de trabalho para explicar a variabilidade encontrada seria o nemátodo vector *X. index* desempenhar, não um papel homogeneizador entre as variantes genómicas, mas ter o papel precisamente oposto. Tal seria devido a uma redução drástica no número de viriões durante a transmissão, que possibilitaria a inoculação de uma população de variantes genómicas não representativa da população de origem.

Ao nível inter-regional não se encontrou relação entre o âmbito de origem dos isolamentos e a diversidade nucleotídica da população; a diversidade encontrada num pequeno raio era da mesma ordem de grandeza que a da população Europeia. Estas características de diversificação são semelhantes às encontradas por outros autores, nos muito poucos estudos do mesmo género que foi possível encontrar, referentes a vírus de plantas.

Em Portugal as populações de GFLV dividem-se em dois grandes grupos determinados pela presença de um local de restrição de Hinf I, cujo significado biológico não está esclarecido.

Contrariamente ao GFLV, o CTV apresenta uma baixa diversidade nucleotídica e o principal factor de agrupamento foi a origem geográfica. Este vírus parece evidenciar assim um mecanismo de diversificação populacional diferente. No entanto, tal como o GFLV, a maioria das variações nucleotídicas não se repercute directamente ao nível proteico.

Não se encontrou uma tendência nítida para os isolamentos de CTV se agruparem de acordo com as propriedades biológicas, nomeadamente com a capacidade de originar sintomatologia mais ou menos severa. O estudo mais pormenorizado dirigido para um alegado marcador molecular de isolamentos severos mostrou que a sua validade não podia ser generalizada.

Bibliografía

- ABOU-ELSNAR, M.A., JONES, A.T., MAYO, M.A. (1985). Detection of dsRNA in Particles of Vicia Cryptic Virus and in *Vicia faba* Tissues and Protoplasts. *J. Gen Virol.* 66:2453-2460.
- ADRIAN, M., TIMMINS, P.A., WITZ, J. (1992). In Vitro decapsidation of Turnip Yellow Mosaic Virus investigated by cryo-electron microscopy: a model for the decapsidation of a small isometric virus. *J. Gen Virol.* 73:2079-2083.
- AFZAL, M.A., YATES, P.J., FORSEY, T., MINOR, P.D. (1993). Use of single strand conformation polymorphism for the initial characterization of virus isolates. *Vaccine* 11:1169.
- ALBERTINI, D., VOGEL, R., BOVE, C., BOVE, J.M. (1988). Transmission and preliminary characterization of citrus tristeza strain K. In: Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Navarro, L. (eds.), Proc. of the 10th Conf. IOCV. University of California, Riverside, California, p. 17-21.
- ALMOND, N., JONES, S., HEATH, A.B., KITCHIN, P.A. (1992). The Assessment of Nucleotide Sequence Diversity by the Polymerase Chain Reaction Is Highly Reproducible. *J. Virol. Methods* 40:37-44.
- ALONSO, E., GARCIALUQUE, I., DELACRUZ, A., WICKE, B., AVILARINCON, M.J., SERRA, M.T., CASTRESANA, C. (1991). Nucleotide Sequence of the Genomic RNA of Pepper Mild Mottle Virus, a Resistance-Breaking Tobamovirus in Pepper. *J. Gen Virol.* 72:2875-2884.
- APPIANO, A. (1982). Cytological observations on leaves of fig infected with fig mosaic. *Caryologia* 35:152.
- ARAMBURU, J., NAVAS-CASTILLO, J., MORENO, P., CAMBRA, M. (1991). Detection of double-stranded RNA by ELISA and dot immunobinding assay using an antiserum to synthetic polynucleotides. *J. Gen Virol.* 33:1-11.
- ARANDA, M., FRAILE, A., GARCIA-ARENAL, F. (1993). Genetic variability and evolution of the satellite RNA of Cucumber Mosaic Virus during natural epidemics. *J. Virol.* 67:5896-5901.
- ARNHEIM, N., ERLICH, H. (1992). Polymerase chain reaction strategy. *Ann. Rev. Biochem.* 61:131-156.
- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.D., SMITH, J.A., STRUHL, K. (1990). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & sons, NY.
- AZZAM, O.I., GONSALVES, D. (1991). Detection of ds-RNA in grapevines showing symptoms of rupestris stem pitting and the variabilities encountered. *Plant Disease* 75:960-964.
- BALLESTER-OLMOS, J.F., PINA, J.A., NAVARRO, L. (1988). Detection of Tristeza-seedling Yellows strain in Spain. In: Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Navarro, L. (eds.), Proc. 10Th Conf. Int. Organ. Citrus Virol. IOCV, Riverside, CA, p. 28-32.
- BALLESTEROLMOS, J.F., PINA, J.A., CARBONELL, E.A., MORENO, P., DEMENDOZA, A.H., CAMBRA, M., NAVARRO, L. (1993). Biological Diversity of Citrus Tristeza Virus (CTV) Isolates in Spain. *Plant Pathology* 42:219-229.

- BARANY, F. (1991). Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193.
- BAR-JOSEPH, M., LEE, R.F. (1989). Citrus Tristeza Virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant viruses* 353.
- BAR-JOSEPH, M., LOEBENSTEIN, G., COHEN, J. (1972). Further purification and characterization of threadlike particles associated with citrus tristeza disease. *Virology* 50:821-828.
- BAR-JOSEPH, M., GARNSEY, S.M., GONSALVES, D., MOSCOVITZ, M., PURCIFULL, D.E., CLARK, M.F., LOEBENSTEIN. (1979). The use of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69:190-194.
- BAR-JOSEPH, M., GARNSEY, S.M., GONSALVES, D. (1980). The Closteroviruses: A distinct group of elongated plant viruses. *Adv. Virus Res.* 25:93-168.
- BAR-JOSEPH, M., MARCUS, R., LEE, R.F. (1989). The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27:291-316.
- BEIER, D.R. (1993). Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis as a Tool for Genetic Mapping. *Mammalian Genome* 4:627-631.
- BEN-ZE'EV, I.S., BAR-JOSEPH, M., NITZAN, Y., MARCUS, R. (1989). A severe citrus tristeza virus isolate causing the collapse of trees of sour orange before virus is detectable throughout the canopy. *Ann. appl. Biol.* 114:293-300.
- BORJA, M.J., PONZ, F. (1992). An appraisal of different methods for the detection of the walnut strain of cherry leafroll virus. *J. Virol. Methods* 36:73-83.
- BOUSALEM, M., CANDRESSE, T., QUIOT-DOUINE, L., QUIOT, J.B. (1994). Comparison of three methods for assessing Plum Pox Virus variability: Further evidence for the existence of two major groups of isolates. *J. Phytopathol.* (in press).
- BOVEY, R., MARTELLI, G.P. (1992). Directory of Major Virus and Virus-Like Diseases of Grapevines. PNUD-FAO, RAB/88/025, 111 pp.
- BOVEY, R., BRUGGER, J.J., GUGERLI, P. (1980). Detection of fanleaf virus in grapevine tissue extracts by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and Immune Electron Microscopy (IEM). *In: Proc. 7th meeting of ICGV. Canada Agric. Res. Branch, Niagara Falls, 1980, p. 259-275.*
- BOZARTH, R.F., HARLEY, E.H. (1976). The electrophoretic mobility of double-stranded RNA in polyacrylamide gels as a function of molecular weight. *Biochim. Biophys Acta*, 432:329-335.
- BRANDT, S., HIMMLER, G. (1993). Detection of grapevine fanleaf virus (GFLV) from woody material by using immunocapture polymerase chain reaction. *In: Gugerli, P. (ed.), Extended abstracts of the 11th meeting of the ICGV. RAC, Montreux, Switzerland, p. 150.*
- BRAVO, M.A., de SEQUEIRA, O.A. (1991). Redução das densidades populacionais de *Xiphinema index* Thorne & Allen e de *X. pastaichum* (Tulaganov) Kirjanova, através da aplicação de herbicidas e rotações culturais. *In: Actas do 1º Encontro Nacional de Protecção Integrada, Univ. Evora, 10-12 Jan. 1991. p. 174-181.*
- BRISCO, M., HULL, R., WILSON, T.M.A. (1986). Swelling of isometric and bacilliform plant virus nucleocapsids is required for virus-specific protein synthesis in vitro. *Virology* 148:210-217.
- CAMBRA, M., MORENO, P., NAVARRO, L. (1979). Detección rápida del virus de la "Tristeza" de los cítricos (CTV), mediante la técnica inmunoenzimática ELISA-sandwich. *Ann. INIA, ser. prot. veg.* 12:115-125.
- CAMBRA, M., CAMARASA, E., GORRIS, M.T., GARNSEY, E.M., GUMPF, D.J., TSAI, M.C. (1992) Epitope diversity of isolates of citrus tristeza virus (CTV) in Spain. Abstracts of the XIIth Conf. of IOCV, November 23-27, 1992, New Dehli, India.

- CANDELIER-HARVEY, P., HULL, R. (1993). Cucumber mosaic virus genome is encapsidated in alfalfa mosaic virus coat protein expressed in transgenic tobacco plants. *Transgenic Research* 2:277-285.
- CHEVALIER, S., GREIF, C., BASS, P., WALTER, B. (1993). Development of the immunocapture reverse transcription PCR procedure for detection of GVA in grapevine tissues. *In: Gugerli, P. (ed.), Extended Abstracts of the 11th meeting of the ICGV. RAC, Montreux, Switzerland, p. 151.*
- CLARK, M.F. (1981). Immunosorbent assays in plant pathology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19:83-106.
- CLARK, M.F., ADAMS, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. *J. Gen Virol.* 33:165-167.
- COFFIN, R.S., COUTTS, R.H.A. (1992). DsRNA Cloning and Diagnosis of Beet Pseudo-Yellows Virus by PCR and Nucleic Acid Hybridization. *Intervirology* 33:197-203.
- COFFIN, R.S., COUTTS, R.H.A. (1993). The closteroviruses, capilloviruses and other similar viruses: a short review. *J. Gen. Virol.* 74:1475-1483.
- COSTA, A.S., MULLER, G.W. (1980). Tristeza control by cross protection. *Plant Disease* 64:538-541.
- CREIGHTON, S., HUANG, M.M., CAI, H., ARNHEIM, N., GOODMAN, M.F. (1992). Base Mismatch Extension Kinetics - Binding of Avian Myeloblastosis Reverse Transcriptase to Matched and Mismatched Base Pair Termini. *J. Biol. Chem.* 267:2633-2639.
- de BLAS, C. 1992. *Estudios sobre tecnicas de deteccion de virus y patogenos subvirales vegetales y busqueda de resistencia al virus del mosaico del pepino (CMV) en germoplasma de pimiento.* Ph.D. Thesis, Universidad Complutense de Madrid, 151 pp.
- de BLAS, C., SANCHEZ, F., MARTINEZ-HERRERA, D., JORDA, C., NOLASCO, G., ROMERO, J., TORRES, V., PONZ, F. (1993): Tipificacion molecular rapida de virus vegetales por PCR. II Reunion de Biologia Molecular de Plantas, Valencia, España, Noviembre 1993.
- de HAAN, P., GIELEN, J., VAN GRINSVEN, M., PETERS, D., GOLDBACH, R. 1991. *Detection of tomato spotted wilt virus in infected plants by molecular hybridization and PCR.* Ph.D. Thesis, University of Wageningen.
- de SEQUEIRA, O.A. (1983): Considerações sobre a doença do urticado na selecção da videira. Comunicação nº 5. Encontro de técnicos de viticultura, Ministério de Agricultura, Pescas e Alimentação. Agosto 1983, 6pp.
- de SEQUEIRA, O.A., DIAS, H.F. (1964). Transmissão do vírus do urticado da videira pelo nemátodo *Xiphinema index* Thorne & Allen. *Agronomia Lusitana* XXIV:307-316.
- DEKKER, E.L., PORTA, C., VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1989). Limitations of different ELISA procedures for localizing epitopes in viral coat protein subunits. *Arch. Virol.* 105:269-286.
- DIAS, H.F. (1963). Host range and properties of grapevine fanleaf and grapevine yellow mosaic viruses. *Ann. appl. Biol.* 51:85-95.
- DIAS, H.F., HARRISON, D. (1963). The relationship between grapevine fanleaf, grapevine yellow mosaic and arabis mosaic viruses. *Ann. appl. Biol.* 51:97-105.
- DIAS, H.F., WATERWORTH, H.E. (1967). The identity of a seed-borne mosaic virus of *Chenopodium amaranticolor* and *C. quinoa*. *Canadian Journal of Botany* 45:1285-1295.
- DODDS, J.A. (1986). The potential for using double-stranded RNAs as diagnostic probes for plant viruses. *In: Jones, R.A.C., Torrance, L. (eds.), Developments in Applied Biology: Developments and Application in Virus Testing.* Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK, p. 71-86.

- DODDS, J.A., JORDAN, R.L., ROISTACHER, C.N., JARUPAT, T. (1987). Diversity of Citrus Tristeza Virus Isolates Indicated by dsRNA Analysis. *Intervirology* 27:177-188.
- DODDS, J.A., BAR-JOSEPH, M. (1983). Double stranded RNA from plants infected with Closteroviruses. *Phytopathology* 73:419-423.
- DODDS, J.A., MORRIS, T.J., JORDAN, R.L. (1984). Plant viral double-stranded RNA. *Ann. Rev. Phytopathol.* 22:151-168.
- DODDS, J.A., JARUPAT, T., LEE, J.G., ROISTACHER, C.N. (1987). Effects of strain, host, time of harvest and virus concentration on double stranded RNA analysis of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 77:442-447.
- DOMINGO, E., SABO, D., TADATSUGU, T., WEISSMAN, C. (1978). Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* 13:735-744.
- DOMINGO, E., MARTINEZ-SALAS, E., SOBRINO, F., TORRE, J.C., PORTELA, A., ORTIN, J., LOPEZ-GALINDEZ, C., PEREZ-BRENA, P., VILLANUEVA, N., NAJERA, R., VAN DE POL, S., STEINHAEUER, D., De POLO, N., HOLLAND, J. (1985). The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance- a review. *Gene* 45:1-8.
- DRYGIN, Y.F., KOROTAEVA, S.G, DOROKHOV, Y.L. (1992). Direct TMV polymerase chain reaction for TMV detection in crude cell extracts. *Febs Letters* 309:350-352.
- DUARTE, E.A., CLARKE, D.K., MOYA, A., ELENA, S.F., DOMINGO, E., HOLLAND, J. (1993). Many-trillionfold amplification of single RNA virus particles fails to overcome the Muller's ratchet effect. *J. Virol.* 67:3620-3623.
- DUBS, M.C., ALTSCHUH, D., VANREGENMORTEL, M.H.V. (1992). Interaction Between Viruses and Monoclonal Antibodies Studied by Surface Plasmon Resonance. *Immunol. Lett.* 31:59-64.
- DULIEU, P., BAR-JOSEPH, M. (1990). In vitro translation of the citrus tristeza virus coat protein from a 0.8 kbp double-stranded RNA segment. *J. Gen Virol.* 71:443-447.
- ESMENJAUD, D., PINCK, L., WALTER, B., ABAD, P. (1993). Detection of grapevine fanleaf virus (GFLV) in a single vector nematode *Xiphinema index* using the Polymerase Chain Reaction (PCR). Abstract 11.3.12. 6th International Congress of Plant Pathology, 28 Jul - 8 Aug, Montreal, Canada.
- FAN, E., LEVIN, D.B., GLICKMAN, B.W., LOGAN, D.M. (1993). Limitations in the use of SSCP analysis. *Mutation Research* 288:85-92.
- FAUSTINO, J.J. (1989). *Prospecção do vírus da Tristeza dos citrinos (CTV) pela técnica ELISA numa área do Algarve*. Trabalho de fim de curso. Universidade de Évora, Evora. 61 pp.
- FERREIRA, A.A. 1970. *Um novo vírus da videira*. Relatório final do curso de Engº Agrónomo, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, 139 pp.
- FERREIRA, A.A., de SEQUEIRA, O.A. (1972). Preliminary studies on an undescribed grapevine virus. *In: Proc. IV meeting of ICGV, Colmar, 16-18 June 1970. INRA, p. 137.*
- FRANCKI, R.I.B. (1985). The virus and their taxonomy. *In: Francki, R.I.B. (ed.), The Plant viruses. Plenum press, p. 1-18.*
- FRANCKI, R.I.B., JACKSON, A.O. (1972). Immunochemical detection of double-stranded Ribonucleic acid in leaves of sugar cane infected with Fiji disease virus. *Virology* 48:275-277.
- FRANKLIN, R.M. (1966). Purification and properties of the replicative intermediate of the RNA bacteriophage R17. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55:1504-1511.

- FRESNO, J. 1992. *Correlacion bioecológica entre nematodos transmisores de virus (Xiphinema spp.) y el virus de la "Degeneracion Infecciosa de la vid"-Entrenudo corto (GFLV)-*. Ph.D. Thesis, Universidad Complutense de Madrid, 262 pp.
- FRISON, E.A., STACESMITH, R. (1992). Cross-Reacting and Heterospecific Monoclonal Antibodies Produced Against Arabis Mosaic Nepovirus. *J. Gen Virol.* 73:2525-2530.
- FUCHS, M., PINCK, M., SERGHINI, M.A., RAVELONANDRO, M., WALTER, B., PINCK, L. (1989). The nucleotide sequence of satellite RNA in Grapevine Fanleaf Virus, strain F13. *J. Gen Virol.* 70:955-962.
- FUCHS, M., PINCK, M., ETIENNE, L., PINCK, L., WALTER, B. (1991a). Characterization and detection of grapevine fanleaf virus by using cDNA probes. *Phytopathology* 81:559-561.
- FUCHS, M., PINCK, M., SERGHINI, M.A., PINCK, L., WALTER, B. (1991b): The satellite RNA associated with grapevine fanleaf virus strain F13. *In: Proc. 10th ICGV Meeting, Volos, Greece, 1990, p.131-137.*
- FUKUHARA, T., MORIYAMA, H., PAK, J.Y., HYAKUTAKE, H., NITTA, T. (1993). Enigmatic Double-Stranded RNA in Japonica Rice. *Plant Molecular Biology* 21:1121-1130.
- GAL-ON, A., ANTIGNUS, Y., ROSNER, A., RACCAH, B. (1992). A Zucchini Yellow Mosaic Virus coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. *J. Gen. Virol.* 73:2183-2187.
- GARNSEY, S.M., GUMPF, D.J., ROISTACHER, C.N., CIVEROLO, E.L., LEE, R.F., YOKOMI, R.K., BAR- JOSEPH, M. (1987). Toward a standardized evaluation of the biological properties of citrus tristeza virus. *Phytophylactica* 19:151-157.
- GELFAND, D.H., WHITE, T.J. (1990). Thermostable DNA polymerases. *In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds.), PCR protocols. Guide to method and applications. Academic Press, Inc., San Diego, p. 129-140.*
- GERMAN, S., CANDRESSE, T., LEGALL, O., LANNEAU, M., DUNEZ, J. (1992). Analysis of the dsRNAs of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus. *J. Gen Virol.* 73:767-773.
- GILLINGS, M., BROADBENT, P., INDSTO, J., LEE, R. (1993). Characterization of isolates and strains of citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 44:305-317.
- GINGERAS, T.R., PRODANOVICH, P., LATIMER, T., GUATELLI, J.C., RICHMAN, D.D., BARRINGER, K.J. (1991). Detection of human immunodeficiency virus type I in AIDS patients using amplification-mediated hybridization analysis: Reproducibility and quantitative limitations. *Journal of Infectious Diseases* 164:1066-1074.
- GLAVAC, D., DEAN, M. (1993). Optimization of the Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Technique for Detection of Point Mutations. *Human Mutation* 2:404-414.
- GOULD, A.R., FRANCKI, R.I.B. (1981). Immunochemical detection of ds-RNA in healthy and virus-infected plants and specific detection of viral ds-RNA by hybridization to labelled complementary DNA. *J. Virol. Methods* 2:278-286.
- GRANT, T.J., HIGGINS, R.P. (1957). Occurrence of mixtures of tristeza virus strains in citrus. *Phytopathology* 47:272-276.
- GRBELJA, J., ERIC, Z. (1983). Isolation of a potyvirus from *Ficus carica* L. *Acta Bot. Croat.* 42:11-14.
- GUATELLI, J.C., WHITFIELD, K.M., KWOH, D.Y., BARRINGER, K.J., RICHMAN, D.D., GINGERAS, T.R. (1990). Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878.

- GUERRI, J., MORENO, P., LEE, R.F. (1990). Identification of citrus tristeza virus strains by peptide maps of virion coat protein. *Phytopathology* 80:692-698.
- GUERRI, J., MORENO, P., MUÑOZ, N., MARTINEZ, M.E. (1991). Variability among Spanish citrus tristeza virus isolates revealed by double-stranded RNA analysis. *Plant Pathology* 40:1-7.
- HABILI, N., KRAKE, L.R., BARLASS, M., REZAIAN, M.A. (1992). Evaluation of biological indexing and ds-RNA analysis in grapevine virus elimination. *Ann. appl. Biol.* 121:277-283.
- HADIDI, A., YANG, X. (1990). Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification. *J. Virol. Methods* 30:261-270.
- HADIDI, A., MONTASSER, M.S., LEVY, L., CONVERSE, R.H., MADKOUR, M.A., SREZECKOWSKI, L.J. (1993). Detection of Potato Leafroll and Strawberry Mild-Yellow Luteoviruses by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Plant Disease* 77:595-601.
- HANS, F., PINCK, M., PINCK, L. (1993). Location of the replication determinants of the satellite RNA associated with grapevine fanleaf nepovirus (strain F13). *Biochimie* 75:597-603.
- HARRISON, B.D., MURANT, A.F. (1977). Nepovirus Group. *CMI/AAB Descriptions of Plant viruses* 185.
- HARRISON, S.C. (1983). Virus structure: high resolution perspectives. *Adv. virus res.* 28:175-240.
- HAYASHI, K. (1992). PCR-SSCP A Method for Detection of Mutations. *Genet. Anal-Tech. Appl.* 9:73-79.
- HEMMER, O., MEYER, M., GREIF, C., FRITSCH, C. (1987). Comparison of the nucleotide sequences of five tomato black ring virus satellite RNAs. *J. Gen. Virol.* 68:1823-1833.
- HEPPELL, J., BERTHIAUME, L., TARRAB, E., LECOMTE, J., ARELLA, M. (1992). Evidence of Genomic Variations Between Infectious Pancreatic Necrosis Virus Strains Determined by Restriction Fragment Profiles. *J. Gen Virol.* 73:2863-2870.
- HEWITT, W.B., RASKY, D.J., GOHEEN, A.C. (1958). Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology* 48:586-595.
- HEWITT, W.B., MARTELLI, G., DIAS, H.F., TAYLOR, R.H. (1970). Grapevine Fanleaf Virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant viruses* 28.
- HIRTH, L., GIVORD, L. (1986). Tymoviruses. In: Koenig, R. (ed.), *The Plant Viruses*. Plenum press, NY, p. 163-212.
- HOLMSTROM, K., ROSSEN, L., RASMUSSEN, O.F. (1993). A Highly Sensitive and Fast Nonradioactive Method for Detection of Polymerase Chain Reaction Products. *Anal. Biochem.* 209:278-283.
- HONGYO, T., BUZARD, G.S., CALVERT, R.J., WEGHORST, C.M. (1993). "Cold SSCP": a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-stranded conformation polymorphism analysis. *Nucleic Acids Res.* 21:3637-3642.
- HULL, R. (1985). The Sobemovirus group. In: Koenig, R. (ed.), *The Viruses*. Plenum Press, NY, p. 113-146.
- HULL, R., AL-HAKIM, A. (1988). Nucleic acid hybridization in plant virus diagnosis and characterization. *Tibtech* 6:213-218.
- HUSS, B., MULLER, S., SOMMERMEYER, G., WALTER, B., VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1987). Fanleaf Virus Monoclonal Antibodies: their use to distinguish different isolates. *J. Phytopathology* 119:358-370.
- HUSS, B., WALTER, B., FUCHS, M. (1989). Cross-protection between arabis mosaic virus and grapevine fanleaf virus isolates in *Chenopodium quinoa*. *Ann. appl. Biol.* 114:45-60.

- HUTCHINSON, P.J., HENRY, C.M., COUTTS, R.H.A. (1992). A Comparison, Using dsRNA Analysis, Between Beet Soil-Borne Virus and Some Other Tubular Viruses Isolated from Sugar Beet. *J. Gen Virol.* 73:1317-1320.
- IGLOI, G. (1983). A silver stain for the detection of nanogram amounts of tRNA following two-dimensional electrophoresis. *Anal. Biochem.* 134:184-188.
- IPACH, U., ALTMAYER, B., EICHHORN, K.W. (1992). Detection of Arabis Mosaic Virus Using the Polymerase Chain Reaction (PCR). *Vitis* 31:213-219.
- JANSEN, R.W., SIEGL, G., LEMON, S.M. (1990). Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2687-2871.
- JIMENEZ, F., GOHEEN, A.C. (1980). The use of Enzyme-linked Immunosorbent Assay for detection of grape fanleaf virus. *In: Proc. 7th meeting ICGV. Canada Agric. Res. Branch, Niagara Falls*, p. 283-291.
- JOHNSON, J.J., ARGOS, P. (1985). Virus particle stability and structure. *In: Francki, R.I.B. (ed.), The plant viruses. Plenum Press, NY*, p. 19-56.
- JONES, T.D., BUCK, K.W., PLUMB, R.T. (1991). The Detection of Beet Western Yellows Virus and Beet Mild Yellowing Virus in Crop Plants Using the Polymerase Chain Reaction. *J. Virol. Methods* 35:287-296.
- JORDAN, R.L. (1986). Diagnosis of plant viruses using double-stranded RNA. *In Zimmerman, R. H. et al.; (Eds), Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. Martinus Nijhoff Pub.,p. 125-133.*
- KANO, T., GARNSEY, S.M., KOIZUMI, M., PERMAT, T.A. (1989): Serological diversity of citrus tristeza virus field isolates in Japan. Abstracts of the XIth IOC Conf., October 24-November 17, 1989. Florida and California. USA.
- KAVANAGH, T., GOULDEN, M., SANTA CRUZ, S., CHAPMAN, S., BARKER, I., BAULCOMBE, D. (1992). Molecular analysis of a resistance breaking strain of Potato Virus X. *Virology* 189:609-617.
- KAWAI, S., MAEKAWAJIRI, S., YAMANE, A. (1993). A Simple Method of Detecting Amplified DNA with Immobilized Probes on Microtiter Wells. *Anal. Biochem.* 209:63-69.
- KIEVITS, T., VANGEMEN, B., VANSTRIJP, D., SCHUKKINK, R., DIRCKS, M., ADRIAANSE, H., MALEK, L., SOOKN. (1991). NASBA Isothermal Enzymatic Invitro Nucleic Acid Amplification Optimized for the Diagnosis of HIV-1 Infection. *J. Virol. Methods.* 35:273-286.
- KOENEN, M. (1989). Recovery of DNA from agarose gels using liquid nitrogen. *Trends in Genetics* 5:137.
- KOENIG, R., PAUL, H.L. (1982). Variants of ELISA in plant virus diagnosis. *J. Virol. Methods* 5:113-125.
- KOHNEN, P.D., DOUGHERTY, W.G., HAMPTON, R.O. (1992). Detection of pea seedborne mosaic potyvirus by sequence specific enzymatic amplification. *J. Virol. Methods* 37:253-258.
- KORSHINECK, I., HIMMLER, G., SAGL, R., STEINKELLNER, H., KATINGER, H.W.D. (1991). A PCR membrane spot assay for the detection of plum pox virus RNA in bark of infected trees. *J. Virol. Methods* 31:139-146.
- KRAWECZAC, M., REISS, J., SCHMIDTKE, J., ROSLER, U. (1992). Polymerase chain reaction: replication errors and reliability of gene diagnosis. *Nucleic Acids Res.* 17:2197-2201.
- LANDGRAF, A., RECKMANN, B., PINGOUD, A. (1991a). Direct analysis of polimerase chain reaction products using enzyme-linked immunosorbent assay techniques. *Anal. Biochem.* 198:86-91.
- LANDGRAF, A., RECKMANN, B., PINGOUD, A. (1991b). Quantitative analysis of polymerase chain reaction (PCR) products using primers labeled with biotin and a fluorescent dye. *Anal. Biochem.* 193:231-235.

- LANGEVELD, S.A., DORE, J.M., MEMELINK, J., DERKS, A.F.L.M., VAN DER VLUGT, C.I.M., ASJES, C. (1991). Identification of Potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *J. Gen. Virol.* 72:1531-1541.
- LAZARO, C., ESTIVILL, X. (1992). Mutation Analysis of Genetic Diseases by Asymmetric-PCR SSCP and Ethidium Bromide Staining - Application to Neurofibromatosis and Cystic Fibrosis. *Mol Cell Probe* 6:357-359.
- LEE, R.F. (1984). Use of double stranded RNAs to diagnose citrus tristeza virus strains. *Proc. Fla. state Hort. Soc.* 97:53-56.
- LEE, R.F., CALVERT, L.A., HUBBARD, J.D. (1984). Characterization of the coat protein of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 74:801.
- LEFEBVRE, A., SCALLA, R., PFEIFFER, P. (1990). The double stranded RNA associated with the '447' cytoplasmic male sterility in *Vicia faba* is packaged together with its replicase in cytoplasmic membranous vesicles. *Plant Molecular Biology* 14:477-490.
- LEGIN, R., BASS, P., ETIENNE, L., FUCHS, M. (1993). Selection of mild virus strains of fanleaf degeneration by comparative field performance of infected grapevines. *Vitis* 32:103-110.
- LEWIN, B. (1987). *Genes*. John wiley & sons, NY. 761 pp.
- LION, T., HAAS, O.A. (1990). Nonradioactive labeling of probe with digoxigenin by polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 188:335-337.
- LIZARDI, P.M., GUERRA, C.E., LOMELI, H., TUSSIE-LUNA, I., KRAMER, F.R. (1988). Exponential amplification of recombinant-RNA hybridization probes. *Bio Technology* 6:1197-1202.
- LOPEZMOYA, J.J., CUBERO, J., LOPEZABELLA, D., DIAZ-RUIZ, J.R. (1992). Detection of Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) in Single Aphids by the Polymerase Chain Reaction (PCR). *J. Virol. Methods* 37:129-138.
- MALEK, L., DARASCH, S., DAVEY, C., HENDERSON, G., HOWES, M., LENS, P., SOOKNANAN, R. (1992). Application of NASBA Isothermal Nucleic Acid Amplification Method to the Diagnosis of HIV-1. *Clin Chem* 38:458".
- MALLET, F., HEBRARD, C., BRAND, D., CHAPUIS, E., CROS, P., ALLIBERT, P., BESNIER, J.M., BARIN, F., MANDRAND, B. (1993). Enzyme-Linked Oligosorbent Assay for Detection of Polymerase Chain Reaction-Amplified Human Immunodeficiency Virus Type-1. *Journal of Clinical Microbiology* 31:1444-1449.
- MANDAHAR, C.L. (1989). Multiplication of plus-sense RNA viruses. *In: Mandahar, C.L. (ed.), Plant Viruses, Vol. I.* CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 125-171.
- MANDEL, B. (1979). Interaction of viruses with neutralizing antibodies. *In: Fraenkel-Conrat, H., Wagner, R.R. (eds.), Comprehensive Virology. Virus - Host Interactions.* Plenum press, New York, p. 37-121.
- MARSH, L.E., POGUE, G.P., HUNTLEY, C.C., HALL, T.C. (1991). Insight to replication strategies and evolution of (+) strand RNA viruses provided by brome mosaic virus. *In: Miflin, B.J. (ed.), Oxford surveys of plant molecular and cell biology.* Oxford University Press, Oxford, England, p. 297-334.
- MARTELLI, G.P. (1986). Virus and virus-like diseases of the grapevine in the Mediterranean area. *FAO Plant Prot. Bull* 34:25-42.
- MARTELLI, G.P., GALLITELLI, D., ABRACHEVA, P., SAVINO, V., QUACQUARELLI, A. (1977). Some properties of grapevine Bulgarian latent virus. *Ann. appl. Biol.* 85:51-58.

- MARTELLI, G.P., CASTELLANO, M.A., LAFORTEZZA, R. (1990): Ultrastructure of mosaic infected fig leaves. *In: Proc. 8Th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union. Agadir, Morocco. p. 189-190.*
- MARTINEZ-HERRERA, D, SANCHEZ, F., de BLAS, C., JORDA, C., NOLASCO, G., ROMERO, J., TORRES, V., PONZ, F. (1994): Quick PCR typing of plant viruses. Congress of the International Society of Plant Molecular Biology, Amsterdam, June 1994.
- MATTHEWS, R.E.F. (1991). *Plant Virology*. Academic Press Inc., San Diego. 835 pp.
- MAWASSI, M., SHALITIN, D., GAFNY, R., LEITNER, O., CABILLY, S., BAR-JOSEPH, M. (1992): The diversity of citrus tristeza virus strains in Israel: Indication of the presence of coat protein gene (CPG) subgroups differently reacting with monoclonal antibodies. Abstracts of the XIIth IOCV Conf., November 23-27, 1992, New Dehli, India.
- MAWASSI, M., GAFNY, R., BARJOSEPH, M. (1993). Nucleotide Sequence of the Coat Protein Gene of Citrus Tristeza Virus - Comparison of Biologically Diverse Isolates Collected in Israel. *Virus Genes* 7:265-275.
- Mc CAUSTLAND, K.A., BI, S.L., BRADLEY, D.W. (1991). Application of Two RNA Extraction Methods Prior to Amplification of Hepatitis-E Virus Nucleic Acid by the Polymerase Chain Reaction. *J. Virol. Methods* 35:331-342.
- MINAFRA, A., HADIDI, A. (1993). Detection of grapevine virus A in single mealybugs by immunocapture - reverse transcription - polymerase chain reaction. *In: Gugerli, P. (ed.), Extended abstracts of the 11th meeting of the ICGV. RAC, Montreux, Switzerland, p. 139.*
- MINAFRA, A., HADIDI, A., SALDARELLI, P. (1993). Sensitive immunocapture and multiplex reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of grapevine leafroll associated virus III and grapevine virus B. *In: Gugerli, P. (ed.), Extended Abstracts of the 11th meeting of the ICGV. RAC, Montreux, Switzerland, p. 137-138.*
- MONETTE, P.L., JAMES, D., GODKIN, S.E. (1989a). Double-stranded RNA from rupestris stem pitting-affected grapevines. *Vitis* 28:137-144.
- MONETTE, P.L., JAMES, D., GODKN, S.E. (1989b). Comparison of RNA extracts from in vitro shoot tip cultures of leafroll-affected and leafroll-free grapevine cultivars. *Vitis* 28:229-235.
- MORENO, P., GUERRI, J., MUÑOZ, N. (1990). Identification of Spanish strains of citrus tristeza virus by analysis of double-stranded RNA. *Phytopathology* 80:477-482.
- MORENO, P., GUERRI, J., BALLESTER-OLMOS, J.F., MARTINEZ, M.E. (1991). Segregation of citrus tristeza virus strains evidenced by double stranded RNA (ds-RNA) analysis. *In: Brlansky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W. (Eds.) Proc. of the 11th IOCV Conference, IOCV, Riverside. pp. 20-24.*
- MORENO, P., GUERRI, J., BALLESTER-OLMOS, J.F., ALBIACH, R., MARTINEZ, M.E. (1993). Separation and interference of strains from a Citrus Tristeza Virus isolate by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. *Plant Pathology* 42:35-41.
- MORRIS, T.J., CARRINGTON, J.C. (1986). Carnation Mottle and Viruses with similar properties. *In: Koenig, R. (ed.), The Plant Viruses. Plenum Press, p. 73-112.*
- MORRIS, T.J., DODDS, J.A. (1979). Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* 69:854-858.
- MOSER, O., FUCHS, M., PINK, L., STUSSI-GARAUD, C. (1992). Immunodetection of grapevine fanleaf virus satellite RNA-encoded protein in infected *Chenopodium quinoa*. *J. Gen. Virology* 73:3033-3038.
- MOYA, A., RODRIGUEZ-CEREZO, E., GARCIA-ARENAL, F. (1993). Genetic structure of natural populations of the plant RNA virus Tobacco Mild Green Mosaic Virus. *Mol. Biol. Evol.* 10:449-456.

- MYERS, T.W., GELFAND, D.H. (1991). Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* 30:7661-7666.
- NEDELMAN, J., HEAGERTY, P., LAWRENCE, C. (1992). Quantitative PCR - Procedures and Precisions. *Bull Math Biol* 54:477-502.
- NEI, M., LI, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5269-5273.
- NEI, M., MILLER, J.C. (1990). A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics* 125:873-879.
- NEI, M., TAJIMA, F. (1981). DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97:145-163.
- NEWBURY, H.J., POSSINGHAM, J.V. (1977). Factors affecting the extraction of intact ribonucleic acid from plant tissues containing interfering phenolic compounds. *Plant Physiology* 60:543-547.
- NOLASCO, G. (1982). *A diagnose rápida do vírus do Urticado (Nó Curto) da Videira pelo teste ELISA*. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, 51 pp.
- NOLASCO, G. (1988). *O vírus da Tristeza dos Citrinos: situação actual do seu conhecimento e aspectos metodológicos da prevenção e controlo da virose*. Universidade do Algarve, Faro, 54 pp.
- NOLASCO, G., de SEQUEIRA, O.A. (1985). The dynamics and performing conditions of ELISA in the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine. *Garcia da Orta, Sér. Est. Agron.* 12 (1-2):273-280.
- NOLASCO, G., de SEQUEIRA, O.A. (1991a): Double stranded RNA (ds-RNA) associated with fig mosaic disease. Abstract 5P2, IV Portuguese-Spanish Biochemistry Congress, Povoá do Varzim, September 29- October 2, 1991.
- NOLASCO, G., de SEQUEIRA, O.A. (1991b). A pesquisa de RNA bicatenário (ds-RNA) aplicada ao diagnóstico viral. *Ciencia Biológica* (aceite para publicação).
- NOLASCO, G., de SEQUEIRA, O.A. (1993). Genome diversity of field isolates of grapevine fanleaf virus (GFLV) analyzed by single stranded conformation (SSCP) and restriction fragment length (RFLP) polymorphisms. *In: Gugerli, P. (ed.), Extended abstracts of the 11th Meeting of ICGV, Montreux, Switzerland. RAC, Nyon, p. 31-32.*
- NOLASCO, G., de BLAS, C., BORJA, M.J., TORRES, V., PONZ, F. 1992. Procedimiento para la detección e identificación de patógenos virales y sub-virales. Registro de la Propiedad Industrial de España. Patente de Invención P9201232, 6 Jun 1992.
- NOLASCO, G., MARTINEZ-HERRERA, D., SANCHEZ, F., ROMERO, J., PONZ, F., TORRES, V. 1993a. Procedimiento para analizar estructuralmente el genoma de patógenos virales y sub-virales. Registro de la Propiedad Industrial de España. Patente de Invención P9302657, 21 Dec. 1993.
- NOLASCO, G., de BLAS, C., TORRES, V., PONZ, F. (1993b). A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *J. Virol. Methods* 45:201-218.
- NOLASCO, G., de BLAS, C., de SEQUEIRA, O.A. (1994a): Molecular typification of plant viruses by the use of aleatory cDNA synthesis in Immunocapture Reverse Transcriptional Polymerase Chain Reaction. 9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Kusadasi, Turkiye, 18-24 Sept. 1994.
- NOLASCO, G., de BLAS, C., MARTINEZ-HERRERA, D., SANCHEZ, F., ROMERO, J., PONZ, F., TORRES, V. (1994b). Procedimiento para la tipificación molecular de patógenos virales con genoma de RNA y de patógenos sub-virales mediante síntesis aleatoria de cDNA. Registro de la Propiedad Industrial de España. Patente de Invención P94000961, 6 May 1994.

- OHAN, N.W., HEIKKILA, J.J. (1993). Reverse transcription-polymerase chain reaction: an overview of the technique and its applications. *Biotechnology Advances* 11:13-29.
- ORITA, M., IWAHANA, H., KANAZAWA, K., SEKIYA, T. (1989a). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single stranded conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2766-2770.
- ORITA, M., SUZUKI, Y., SEKIYA, T., HAYASHI, K. (1989b). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 8:874-879.
- OWENS, R.A., DIENER, T.O. (1981). Sensitive and rapid diagnosis of Potato Spindle Tuber Viroid disease by nucleic acid hybridization. *Science* 213:670-672.
- PAPPU, H.R., PAPPU, S.S., MANJUNATH, K.L., LEE, R.F., NIBLETT, C.L. (1993a). Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3641-3644.
- PAPPU, H., PAPPU, S., NIBLETT, C., LEE, R., CIVEROLO, E. (1993b). Comparative sequence analysis of the coat protein of biologically distinct citrus tristeza closterovirus isolates. *Virus Genes* 7:255-264.
- PAPPU, H.R., KARASEV, A.V., ANDERSON, E.J., PAPPU, S.S., HILF, M.E., FEBRES, V.J., ECKLOFF, R.M.G., Mc CAFFERY, M., BOYKO, V., GOWDA, S., DOLJA, V.V., KOONIN, E.V., GUMPF, D.J., CLINE, K.C., GARNSEY, S.M., DAWSON, D.O., LEE, R.F., NIBLETT, C.L. (1994). Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the Citrus Tristeza Closterovirus Genome. *Virology* 199:35-46.
- PARES, R.D., GILLINS, M.R., GUNN, L.V. (1992). Differentiation of Biologically Distinct Cucumber Mosaic Virus Isolates by PAGE of Double-Stranded RNA. *Intervirology* 34:23-29.
- PERMAR, T.A., GARNSEY, S.M., GUMPF, D.J., LEE, R.F. (1990). A Monoclonal Antibody that Discriminates Strains of Citrus Tristeza Virus. *Phytopathology* 80:224-228.
- PINCK, L., FUCHS, M., PINCK, M., RAVELONANDRO, M., WALTER, B. (1988). A satellite RNA in Grapevine Fanleaf Virus Strain F13. *J. Gen Virol.* 69:233-239.
- POWELL, C.A. (1991). Preparation and Characterization of Monoclonal Antibodies to Double-Stranded RNA. *Phytopathology* 81:184-187.
- QUACQUARELLI, A. (1971). Fig mosaic and Sowbane mosaic virus. *Phytopath. medit.* 10:283-286.
- QUACQUARELLI, A., GALLITELLI, D., SAVINO, V., MARTELLI, G.P. (1976). Properties of Grapevine Fanleaf Virus. *J. Gen Virol.* 32:349-360.
- REZAIAN, M.A., KRAKE, L.R. (1987). Nucleic acid extraction and virus detection in grapevine. *J. Virol. Methods* 17:277-285.
- REZAIAN, M.A., KRAKE, L.R., CUNYING, Q., HAZZALIN, C.A. (1991). Detection of virus-associated ds-RNA from leafroll infected grapevines. *J. Virol. Methods* 31:325-334.
- RITZENTHALER, C., VIRY, M., PINCK, M., MARGIS, R., FUCHS, M., PINCK, L. (1991). Complete nucleotide sequence and genetic organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA1. *J. Gen. Virol.* 72:2357-2365.
- RIZOS, H., GUNN, L.V., PARES, R.D., GILLINGS, M.R. (1992). Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* 73:2099-2103.
- RIZZO, T.M., PALUKAITIS, P. (1989). Nucleotide Sequence and Evolutionary Relationships of Cucumber Mosaic Virus (CMV) Strains: CMV RNA 1. *J. Gen Virol.* 70:1-11.

- ROBERTSON, N.L., FRENCH, R., GRAY, S.M. (1991). Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. *J. Gen Virol.* 72:1473-1477.
- ROBINSON, D.J. (1992). Detection of Tobacco Rattle Virus by Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction. *J. Virol. Methods* 40:57-66.
- RODRIGUEZ, A., NUNEZ, J.I., NOLASCO, G., PONZ, F., SOBRINO, F., DE BLAS, C. (1994). Direct detection of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol. Methods* (in press).
- RODRIGUEZ-CEREZO, E., GARCIA-ARENAL, F. (1989). Genetic heterogeneity of the RNA genome population of the plant virus U5-TMV. *Virology* 170:418-423.
- RODRIGUEZ-CEREZO, E., MOYA, A., GARCIA-ARENAL, F. (1989). Variability and evolution of the plant RNA virus Pepper Mild Mottle Virus. *J. Virol.* 63:2198-2203.
- RODRIGUEZ-CEREZO, E., ELENA, S.F., MOYA, A., GARCIA-ARENAL, F. (1991). High genetic stability in natural populations of the plant RNA virus Tobacco Mild Green Mosaic Virus. *Journal of Molecular Evolution* 32:328-331.
- ROJAS, M.R., GILBERTSON, R.J., RUSSELL, D.R., MAXWELL, D.P. (1993). Use of Degenerate Primers in the Polymerase Chain Reaction to Detect Whitefly-Transmitted Geminiviruses. *Plant Disease* 77:340-347.
- RONCO, A.E., DAL BO, e, GHIRINGHELLI, P.D., MEDRANO, C., ROMANOWSKY, V., SARACHU, A.N., GRAU, O. (1989). Cloned cDNA probes for the detection of tomato spotted wilt virus. *Phytopathology* 79:1309-1313.
- ROSNER, A., BAR-JOSEPH, M. (1984). Diversity of citrus virus tristeza strains indicated by hybridization with cloned cDNA sequences. *Virology* 139:189-193.
- ROSNER, A., BAR-JOSEPH, M., MOSCOVITZ, M., MEVARECH, M. (1983a). Diagnosis of specific viral RNA sequences in plant extracts by hybridization with a polynucleotide kinase-mediated, 32P-labeled, double stranded RNA probe. *Phytopathology* 73:699-702.
- ROSNER, A., GINZBURG, I., BAR-JOSEPH, M. (1983b). Molecular cloning of complementary DNA sequences of citrus tristeza virus RNA. *J. Gen Virol.* 64:1757-1763.
- ROSNER, A., LEE, R.F., BAR-JOSEPH, M. (1986). Differential hybridization with cloned cDNA sequences for detecting a specific isolate of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 76:820-824.
- RYBICKI, E.P., HUGHES F. L. (1990). Detection and typing of maize streak virus and other distantly related geminiviruses of grasses by polymerase chain reaction amplification of a conserved viral sequence. *J. Gen Virol.* 71:2519-2526.
- SAIKI, R., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., ARNHEIM, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:487-491.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- SALDARELLI, P., MINAFRA, A., WALTER, B. (1993). A survey of grapevine fanleaf nepovirus isolates for the presence of satellite RNA. *Vitis* 32:99-102.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. 1695 pp.

- SANCHEZ, F., CHAY, C., BORJA, M.J., ROWAHNI, A., ROMERO, J., BRUENING, G., PONZ, F. (1991). cDNA sequence of the capsid protein gene and 3' untranslated region of a fanleaf isolate of grapevine fanleaf virus. *Nucleic Acids Res.* 19:5440.
- SAUNAL, H., WITZ, J., VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1993). Inhibition of in vitro cotranslational disassembly of tobacco mosaic virus by monoclonal antibodies to the viral coat protein. *J. Gen. Virol.* 74:897-900.
- SAVINO, V., CHERIF, C., MARTELLI, G.P. (1985). A natural serological variant of Grapevine fanleaf virus. *Phytopath. medit.* 24:29-34.
- SEKIYA, M.E., LAWRENCE, S.D., Mc CAFFERY, M., CLINE, K. (1991). Molecular cloning and nucleotide sequencing of the coat protein gene of citrus tristeza virus. *J. Gen. Virol.* 72:1013-1020.
- SELLNER, L.N., COELEN, R.J., Mc KENZIE, J.S. (1992). Reverse Transcriptase Inhibits Taq Polymerase Activity. *Nucleic Acids Res.* 20:1487-1490.
- SEQUEIRA, J.C., de SEQUEIRA, O.A., NOLASCO, G. (1993): Estudo preliminar da etiologia do mosaico da figueira (*Ficus carica* L.). I. Ultraestrutura do tecido foliar. 28ª Reunião anual da Soc. Port. Microscopia Electrónica e Biologia Celular. 2-4 Dezembro 1993, Oeiras.
- SERGHINI, M.A., FUCHS, M., PINK, M., REINBOLT, J., WALTER, B., PINCK, L. (1990). RNA2 of grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. *J. Gen. Virol.* 71:1433-1441.
- SHEFFIELD, V.C., BECK, J.S., KWITEK, A.E., SANDSTROM, D.W., STONE, E.M. (1993). The Sensitivity of Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis for the Detection of Single Base Substitutions. *Genomics.* 16:325-332.
- SILVA, J.F., de SEQUEIRA, O.A., BRAVO, M.A., MATOS, M.A. (1989). Some ecological aspects of the relationship between grapevine fanleaf virus and its nematode vector *Xiphinema index*. In: Cavalloro, R. (ed.), Proc. of an International Symposium on plant protection problems and prospects of integrated control in viticulture, Lisboa-Vila Real, 6-9 June 1988. International Organization for the Biological and Integrated Control, Commission of the European Communities, p. 507-516.
- SMITH, G.R., VANDEVELDE, R., DALE, J.L. (1992). PCR Amplification of a Specific Double-Stranded RNA Region of Fiji Disease Virus from Diseased Sugarcane. *J. Virol. Methods* 39:237-246.
- SMITH, O.P., HUNST, P.L., HEWINGS, A.D., STONE, A.L., TOLIN, S.A., DAMSTEEGT, V.D. (1991). Identification of ds-RNAs associated with soybean dwarf virus-infected soybean. *Phytopathology* 81:131-134.
- SPIELMAN, A., MARC-MARTIN, S., RAMEL, M.-E., GUGERLI, P. (1993). Expression of several modified grapevine fanleaf nepovirus coat protein genes in transgenic tobacco plants. In: Gugerli, P. (ed.), Extended Abstracts of the 11th ICGV Meeting, Montreux, Switzerland. RAC, Nyon, p. 173-174.
- STEINKELLNER, H., HIMMLER, G., MATTANOVICH, D., KATINGER, H. (1990). Nucleotide sequence of AMV - capsid protein gene. *Nucleic Acids Res.* 18:7182.
- STEINKELLNER, H., HIMMLER, G., SAGL, R., MATTANOVICH, D., KATINGER, H. (1992). Amino-acid sequence comparison of Nepovirus coat proteins. *Virus Genes* 6:197-202.
- STEINKELLNER, H., CAMARA MACHADO, A., CAMARA MACHADO, M., GOLLES, R., KATINGER, H. (1993). Studies on coat protein mediated cross protection of Nepoviruses. In: Gugerli, P. (ed.), Extended abstracts of 11th meeting of the ICGV, Montreux. RAC, Nyon, Switzerland, p. 175.
- SUZUKI, K., OKAMOTO, N., KANO, T. (1992). Chemiluminescent microtiter method for detecting PCR amplified HIV-1 DNA. *J. Virol. Methods* 38:113-122.

- TADA, J., OHASHI, T., NISHIMURA, N., OZAKI, H., FUKUSHIMA, S., TAKANO, J., NISHIBUCHI, M., TAKEDA, Y. (1992). Non-Isotopic Microtitre Plate-Based Assay for Detecting Products of Polymerase Chain Reaction Amplification -Application to Detection of the tdh Gene of *Vibrio-Parahaemolyticus*. *Molecular and Cellular Probes* 6:489-494.
- TAINER, J.A., GETZOFF, E.D., ALEXANDER, H., HOUGHTEN, R.A., OLSON, A.J., LERNER, R.A., HENDRICKSON. (1984). The reactivity of anti-peptide antibodies is a function of the atomic mobility of sites in a protein. *Nature* 312:127-134.
- TANNE, E. (1980). The Use of ELISA for the detection of some nepoviruses in grapevines. *In: Proc. 7th meeting ICGV. Canada Agric. Res. Branch, Niagara Falls, 1980, p. 293-296.*
- TINDALL, K.R., KUNKEL, T.A. (1988). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 27:6008-6013.
- TOBIAS, I. (1993). Serological comparison of some arabis mosaic virus and grapevine fanleaf virus isolates. *In: Gugerli, P. (ed.), Extended abstracts of the 11th conference of ICGV. RAC, Montreux, Switzerland, p. 33.*
- TSAI, C.H., DREHER, T.W. (1993). Increased viral yield and symptom severity result from a single amino acid substitution in the Turnip Yellow Mosaic Virus movement protein. *Molecular Plant Microbe Interactions* 6:268-273.
- TSAI, M.C., SU, H.J., GARNSEY, S.M. (1989): Preparation and application of monoclonal antibodies against strains of citrus tristeza virus. Abstracts of the XIth IOCV conf., October 24-November 17, 1989, Florida and California, USA.
- TULLIS, R.H., RUBIN, H. (1980). Calcium protects DNase I from Protease K. *Anal. Biochem* 107:269-274.
- VALVERDE, R.A., DODDS, J.A., HEICK, J.A. (1986). Double-stranded ribonucleic acid from plants infected with viruses having elongated particles and undivided genomes. *Phytopathology* 76:459-464.
- VALVERDE, R.A., NAMETH, S., OMER, A., AL-MUSA, O., DESJARDINS, P., DODDS, J.A. (1990). Indigenous double-stranded RNA from pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Science* 67:195-201.
- VAN DER VLIET, G.M.E., HERMANS, C.J., KLATSER, P.R. (1993). Simple colorimetric microtiter plate hybridization assay for detection of amplified *Mycobacterium leprae* DNA. *Journal of Clinical Microbiology* 31:665-670.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V., ALTSCHUH, D., ZEDER-LUTZ, G. (1993). Tobacco mosaic virus: A model antigen to study virus-antibody interactions. *Biochimie* 75:731-739.
- VELA, C., CAMBRA, M., CORTES, E., MORENO, P., MIGUET, J.G., De SAN ROMAN, C.P., SANZ, A. (1986). Production and characterization of monoclonal antibodies specific for citrus tristeza virus and their use in diagnosis. *J. Gen. Virol.* 67:91-96.
- VELA, C., CAMBRA, M., SANZ, A., MORENO, P. (1988). Use of specific monoclonal antibodies for diagnosis of citrus tristeza virus. *In: Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Navarro, L. (eds.), Proc. of the 10th IOCV Conf. University of California, Riverside, p. 55-61.*
- VUITTENEZ, A. (1980). The new improvements of serological methods and their possible application to detect and identify viruses and virus-like diseases of the grapevine. *In: Proc. 7th meeting ICGV. Canada Agric. Res. Branch, Niagara Falls, Canada, p. 225-243.*
- VUNSH, R., ROSNER, A., STEIN, A. (1990). The use of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of bean yellow mosaic virus in gladiolus. *Ann. appl. Biol.* 117:561-569.
- WALKER, G.T., LITTLE, M.C., NADEAU, J.G., SHANK, D.D. (1992). Isothermal *In vitro* Amplification of DNA by a Restriction Enzyme/ DNA Polymerase System. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:392-396.

- WALTER, B., BASS, P., CORNUET, P., GUILLAUME, P.M. (1993). Preliminary results of cross protection experiments against grapevine fanleaf virus (GFLV) in the vineyards. *In: Gugerli, P. (ed.), Extended abstracts of 11th meeting of ICGV. RAC, Nyon, Switzerland, p. 167-168.*
- WATKINS, C.A., JONES, A.T., MAYO, M.A., MITCHELL, M.J. (1990). Double-stranded RNA analysis of strawberry plants affected by June yellows. *Ann. appl. Biol.* 116:73-83.
- WELSH, J., Mc CLELAND, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7218.
- WELSH, J., CHADA, K., DALAL, S.S., CHENG, R., RALPH, D., Mc CLELLAND, M. (1992). Arbitrarily Primed PCR Fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res.* 20:4965-4970.
- WELSH, J., RALPH, D., Mc CLELLAND, M. (1994). DNA and RNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR. *In: Sninski, J.J. et al. (eds.), PCR protocols, (in press).*
- WETZEL, T., CANDRESSE, T., RAVELONANDRO, M., DUNEZ, J. (1991). A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *J. Virol. Methods* 33:355-365.
- WETZEL, T., CANDRESSE, T., MACQUAIRE, G., RAVELONANDRO, M., DUNEZ, J. (1992). A Highly Sensitive Immunocapture Polymerase Chain Reaction Method for Plum Pox Potyvirus Detection. *J. Virol. Methods* 39:27-37.
- WILKINSON, M. (1991). Purification of RNA. *In: Brown, T.A. (ed.), Essential Molecular Biology. A practical approach. Oxford University Press, Oxford, p. 69-87.*
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKY, J.A., TINGEY, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- WITZ, J., TIMMINS, P.A., ADRIAN, M. (1993). Organization of Turnip Yellow Mosaic Virus Investigated by neutron small angle scattering at 80 K: An intermediate state preceding decapsidation of the virion? *Proteins: Structure, Function and Genetics* 17:223-231.
- WYATT, S.D., BERGER, P.H. (1991). cDNA synthesis of plant viruses without first isolating RNA. *Phytopathology* 81:1222 (abstract 667).
- WYATT, S.D., DRUFFEL, K., BERGER, P.H. (1993). In vitro destabilization of plant viruses and cDNA synthesis. *J. Virol. Methods* 44:211-220.
- WYLIE, S., WILSON, C.R., JONES, R.A.C., JONES, M.G.K. (1993). A Polymerase Chain Reaction Assay for Cucumber Mosaic Virus in Lupin Seeds. *Australian Journal of Agricultural Research* 44:41-51.
- YANG, X., HADIDI, A., GARNSEY, S.M. (1992). Enzymatic cDNA Amplification of Citrus Exocortis and Cachexia Viroids from Infected Citrus Hosts. *Phytopathology* 82:279-285.
- YAP, E.P.H., MCGEE, J.O. (1992). Nonisotopic SSCP Detection in PCR Products by Ethidium Bromide Staining. *Trends in Genetics* 8:49.
- ZARAGOZA, S. (1986). *Past and present situation of the spanish citrus industry.* Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Valencia, Espanha. 19 pp.
- ZEBZAMI, M., HILL, J.H., VAN DEUSEN, R., NADORI, E.B. (1992): Characterization of monoclonal antibodies raised against citrus tristeza virus in Morocco. Abstracts of the XIIth IOCV Conf., November 23-27, 1992, New Dehli, India.
- ZELCER, A., WEABER, K.F., BALAZS, E., ZAITLIN, M. (1981). The detection and characterization of viral-related double-stranded RNAs in tobacco mosaic virus-infected plants. *Virology*, 113:417-427.

