

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



MARCEL SALMERON LORENZI

“DESENVOLVIMENTO DE UM PROGRAMA DE FITOSSANIDADE PARA *POTYVIRUS* E *POTEXVIRUS*”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Marcel Salmeron Lorenzi e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular na área de Imunologia.

Orientador: Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado

Co-Orientador: Profa. Dra. Gisele Abigail Montan Torres

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

L887d	<p>Lorenzi, Marcel Salmeron Desenvolvimento de um programa de fitossanidade para <i>Potyvirus</i> e <i>Potexvirus</i> / Marcel Salmeron Lorenzi. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientadores: Dagmar Ruth Stach-Machado, Gisele Abigail Montan Torres. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. PVY. 2. PepYMV. 3. PVX. 4. Controle fitossanitário. 5. Anticorpo policlonal. I. Stach-Machado, Dagmar Ruth, 1951-. II. Torres, Gisele Abigail Montan. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p>(scs/ib)</p>
-------	--

Título em inglês: Development of a fitosanity program for *Potyvirus* and *Potexvirus*.

Palavras-chave em inglês: PVY; PepYMV; PVX; Fitossanity control; Policlonal antibody.

Área de concentração: Imunologia.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Dagmar Ruth Stach-Machado, Jorge Alberto Marques Rezende, Ivan Paulo Bedendo.

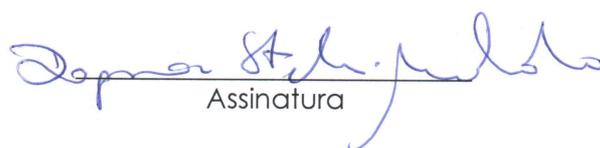
Data da defesa: 13/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 13 de Fevereiro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado
(Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Jorge Alberto Marques Rezende

Assinatura

Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo

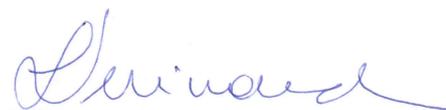
Assinatura

Prof. Dr. José Alberto Caram de Souza Dias



Assinatura

Profa. Dra. Liana Cardoso Verinaud



Assinatura

Aos meus pais Maria Isabel e Geraldo
Às minhas irmãs Dayane, Gabrielle e Giovana
pelo apoio, amor e confiança!

DEDICO!

“Toda glória deriva da ousadia para começar”.
Eugene F. Ware

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela sabedoria, força, perseverança e paciência para alcançar meus objetivos .

À Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado, pela amizade, confiança, oportunidade e estímulo à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Jorge Alberto Marques Rezende pelo apoio e ajuda no início do trabalho.

Ao meu companheiro José Edivaldo Buriolla pelo aprendizado e apoio.

Ao Prof. Dr. José Alberto Caram de Souza Dias pelo apoio e auxílio durante o trabalho.

À Profa. Dra. Anete Pereira de Souza pelo auxílio com a biologia molecular e pela confiança.

À Dra. Gisele Torres pelo companheirismo e aprendizado no início dos meus trabalhos.

Às professoras Liana Verinaud e Wirla M.S.C. Tamashiro pela amizade e colaboração nessa caminhada.

Agradeço aos meus pais e às minhas irmãs por estarem sempre me apoiando e confiando em minha caminhada.

Aos meus amigos Halley, Henrique, Tiago Ferreira, Tiago Lodi, Gustavo, Felipe e Rafael pelo companheirismo e amizade durante o tempo de república.

Às amigas Lívia, Mina e Ana Cristina pela amizade, apoio e momentos de lazer.

Aos muitos amigos da Biologia 02 que fizeram parte de minha caminhada e sempre farão parte da minha vida.

Ao amigo Luis Peroni pela amizade, aprendizado, apoio e fundamental auxílio em todas as etapas do trabalho.

Ao amigo José Raimundo pela amizade, companheirismo e ajuda.

À amiga Juliete pela amizade e companhia durante o café.

Ao amigo Márcio e todos os alunos do Laboratório 5 pela colaboração e ajuda durante esses anos.

À amiga Maria Cecília pelo apoio, amizade e companheirismo.

Às amigas Jacy, Camila e Patrícia pela amizade e pela ajuda profissional.

Aos funcionários do DMI, Dirce, Rose, Antônio, Marcos César e Lúcia pela ajuda, amizade e carinho.

Aos professores e colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia, agradeço por estarem sempre dispostos a colaborar.

À Fermentec pelas oportunidades, confiança, apoio e laços de amizade firmados neste último ano.

À Sra. Lourdes, secretária do CPG-GBM, pela inúmeras ajudas com os formulários, documentos e disciplinas.

Ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Unicamp pela Oportunidade, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho ...

Obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS	17
2.1. Material Vegetal e Isolados de Vírus	18
2.2. Multiplicação e Expansão das amostras virais	18
2.3. Purificação Viral	19
2.4. Determinação da concentração protéica	20
2.5. Microscopia Eletrônica	21
2.6. Elisa Indireto	21
2.7. Animais experimentais	22
2.8. Esquemas de Imunização	22
2.9. Análise Computacional do PVY e PVX	23
2.10. Extração de RNA	23
2.11. Construção de cDNA	24
2.12. PCR	24
2.13. IC-RT-PCR	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1. Obtenção de fontes de inóculo	28
3.2. Multiplicação e Expansão das amostras virais	29
3.3. Detecção das amostras virais	32
3.4. Purificação Viral	36
3.5. Titulação do soro policlonal	39
3.6. Sensibilidade do antisoro	40
3.7. Especificidade do antisoro	41
3.8. Estabelecimento do IC-RT-PCR	44
4. CONCLUSÃO	54
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
6. ANEXOS	63

RESUMO

No Brasil a batata é considerada uma das principais hortaliças produzidas, tanto em área plantada quanto em consumo. A produção anual é em torno de 2 milhões de toneladas, ocupando uma área superior a 130 mil hectares, gerando cerca de 500 mil empregos.

Nos últimos anos, a bataticultura brasileira vem sofrendo perdas significativas devido ao aumento da incidência de viroses, principalmente provocadas pelo vírus Y da batata (*Potato virus Y* – PVY). Mundialmente, são conhecidas pelo menos três linhagens distintas do vírus Y: PVY^O, PVY^C e PVY^N, cujos sintomas variam de acordo com o ambiente e a planta hospedeira. A linhagem PVY^N apresenta uma variante denominada PVY^{NTN}, que provoca sintomas de mosaico foliar mais intenso e a indução de formação de anéis necróticos nos tubérculos. A presença de focos de infecção de PVY em índices acima de 4% (limite de tolerância regulamentada pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento) é suficiente para condenar o uso de determinadas lavouras para a produção de batata-semente, além de representar grandes danos em cultivos comerciais de batata para consumo. Já o PVX pode representar um grande problema quando em associação com o PVY. É um vírus cosmopolita, sendo transmitido mecanicamente e caracterizado por mosaico leve nas folhas, mais visíveis na metade inferior da planta.

Atualmente, a análise de fitossanidade e a indexação viral da batata-semente destinada à multiplicação comercial no Brasil são efetuadas através da combinação da utilização de plantas indicadoras, que demanda tempo, e por testes sorológicos como ELISA, os quais representam custos adicionais à cadeia produtiva, uma vez que o Brasil é dependente da importação dos antisoros de detecção. Deste modo, considerando a relevância do estabelecimento de testes de diagnóstico nacionais que permitam a identificação específica dos vírus Y e X, em virtude da grande incidência de infecções do PVY e da grande necessidade de proteção contra o aumento da introdução do PVX, com o

agravante de grandes prejuízos na co-infecção, os objetivos específicos deste projeto foram produzir soros policlonais específicos para o PVX e PVY, estabelecer ELISA indireto e desenvolver diagnóstico molecular dos vírus através de *primers* específicos e do IC-RT-PCR.

Esse trabalho conseguiu isolar e purificar os vírus X e Y através da indexação biológica e protocolos de extração. Com isso, foi possível produzir e caracterizar os anticorpos policlonais para o PVY e o PVX, com grande especificidade e poder de detecção. Após essas etapas, foi realizado a construção de *primers* específicos, e o desenvolvimento de técnicas moleculares de detecção baseadas na extração de material genético de folhas infectadas e PCR com os respectivos *primers*, obtendo-se os respectivos fragmentos esperados, concluindo com sucesso o estabelecimento do teste. Por fim, tentou-se estabelecer o IC-RT-PCR, todavia o tamanho reduzido das partículas virais inviabilizou a realização do teste, mas a execução da detecção por ELISA e molecular separadamente foi estabelecido com sucesso, permitindo agregar novas tecnologias nacionais e contribuindo com a redução dos custos para a execução dos testes de fitossanidade, importantes e imprescindíveis para o controle das viroses predominantes na bataticultura nacional.

ABSTRACT

The potato culture (*Solanum tuberosum* L.) represents the fourth major vegetal production in the world, reaching productivity indexes which overcome that of cereals in 5 times.

Potato crop may be affected by several disease. Actually, some references point out near 40 in a total of 70 disorders are caused by viral agents. Among the most important viruses of potato, virus X and Y usually cause major concern, due to their harmful effects in productivity and commercialization of potato.

Nowadays, the viral infections have found their way into Brazil's potato production regions in a very fast manner. The state of São Paulo is the most affected. Although potato crop is among the top 10 major crops in the country, its production relies on virus-free imported potato-seeds to maintain its production. This is not only responsible by a considerable part of the production costs, but also represents a dangerous entrance door for a number of exotic pathogens inexistent in our territory. Thus, a phytosanitary control of imported seed-potato lots, which enter Brazil via Santos harbor in the State of São Paulo, has fundamental importance. The usage of immunodiagnosis like ELISA, although being efficient and widely applied, results in an additional cost due to the dependency of Brazil on the importation of polyclonal antisera and monoclonal antibodies necessary for the proper detection of the most important virus affecting the national potato plantations.

It has becoming a must for the seed-potato production a program in Brazil to have our independence of the diagnostic antiserum reagents for ELISA to at least the most important seed-potato viruses. The independence on importation of these biotechnological products and the modernization of immunodiagnosis by applying molecular techniques with specific primers and like IC-RT-PCR (Immocapture - Reverse Transcriptase - Polymerase

ABSTRACT

Chain Reaction), which makes possible to detect the major potato's virus in a fast, efficient and cheap way in order to screen the sanity of the material produced in the country, leading to a increase in production and stating the quality of it.

This work isolated and purified the virus X and Y by biological indexing and extraction protocols. Therefore, it was possible to produce and to characterize the polyclonals antiserum to PVX and to PVY, with great specificity and power of detection. After these steps, it was made specifics primers and the development of molecular detection techniques based on extraction of genetic material from infected leaves and PCR with the primers. The expected fragments was obtained, concluding with successful the establishment of the test. Finally, there was the attempt to establish the IC-RT-PCR, however the small size of viral particles prevented the test, but the implementation of detection by ELISA and molecular separately was successful, add new national technologies allowing and contributing to the reduction of costs for implementing of the fitosanitty tests, importants and essentials for the control of viruses prevailing in the national potato culture.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.) figura atualmente como a quarta maior produção vegetal do planeta com aproximadamente 330 milhões de toneladas (FAO, 2006), sendo superada apenas por cereais como trigo, milho e arroz. Os principais países produtores de batata são a Rússia, China e Polônia, embora mais de um terço da produção mundial provenha de países em desenvolvimento como o Brasil.

O gênero *Solanum* compreende cerca de 2000 espécies, que possuem 12 cromossomos e variam de diplóides ($2n = 24$) a pentaplóides ($2n = 60$). A espécie cultivada (*S. tuberosum* L.) é um tetraplóide ($2n = 4x = 48$), pertencente à família *Solanaceae* e é comumente denominada de batata, batata-inglesa, ou batatinha.

A batateira é uma planta herbácea, cuja parte subterrânea é formada por estolhos, na extremidade dos quais se desenvolvem os tubérculos, que constituem o órgão de multiplicação e o produto comercial final da cultura. A propagação vegetativa apresenta como vantagem a possibilidade de fixação de um genótipo interessante. Por outro lado, há a necessidade de uma fiscalização sanitária rigorosa do material selecionado evitando, desta maneira, focos de infecção nos campos de produção e, conseqüentemente, altos índices de infecção.

No Brasil, a cultura da batata se destaca no cenário agrícola contemporâneo dada sua grande importância alimentar, econômica e social. A produção anual é em torno de 2,8 milhões de toneladas ocupando uma área superior a 130 mil hectares (ABBA, 2004). Embora o consumo da batata no mercado nacional assemelhe-se ao mercado mundial, a produtividade da batata brasileira (20.865 kg/ha) superou a produtividade média do mundo em 21,3% (FAO, 2006). Do ponto de vista social, a batata representa um dos principais alimentos da cesta básica, e gera cerca de 500 mil empregos diretos ou indiretos, tais como

produção de agroquímicos, fertilizantes, máquinas e equipamentos (CAMARGO e MAZZEI, 1996).

Das 70 doenças que acometem a batata, mais de 30 são de etiologia viral, e representam uma das principais limitações ao incremento da produção. Os primeiros relatos datam da década de 30, sendo que no final da década de 90, a maioria das viroses descritas no mundo já havia sido detectada também no Brasil (SOUZA-DIAS e IAMAUTI, 1997; KIMATI *et al.*, 2005). A ausência de um inverno rigoroso nas principais regiões produtoras do país altera a epidemiologia das viroses, devido ao incremento das populações de insetos vetores - os afídeos - e à forma rápida de transmissão. Além disso, a possibilidade de realização de até três cultivos anuais de batata permite a manutenção das fontes de inoculo dos vírus nos campos de batata.

Devido à rápida e alta incidência de viroses, o país sofre com a dependência da batata-semente importada, livre de doenças e, portanto, necessária à produção nacional. As importações anuais de tubérculos-semente provenientes de países como Holanda e Alemanha representam uma parcela considerável do custo de produção, atingindo até 40% do custo por hectare (REESTAMAM, 1970; HIRANO, 1988, FURUMOTO e LOPES, 1997).

A cultura da batata pode ser afetada por diversas doenças causadas por vírus e uma por viróide (HOOKER, 1981; STEVENSON, 2005). O vírus do enrolamento da folha (PLRV – *Potato Leafroll Virus*), o vírus Y (PVY – *Potato Virus Y*), o vírus X (PVX – *Potato Virus X*) e o vírus S (PVS – *Potato Virus S*) geralmente são os mais importantes (DE BOKX e HUTTINGA, 1981; WEIDEMANN, 1988; SOUZA-DIAS, 1995; SOUZA-DIAS, 1996; FIGUEIRA, 1999). Historicamente, o PLRV foi o mais associado à rejeição de batata-semente nos principais estados produtores do Brasil. O PVY, por sua vez, é o

causador de mosaico mais comumente encontrado no país, passando a ser predominante a partir de meados da década de 1990. O PVX é um vírus cosmopolita e endêmico na cultura da batata, não tanto no Brasil, mas particularmente nos países da Europa e América do Norte que são os principais produtores e exportadores de batata-semente para o Brasil. Já o PVS, apesar de geralmente não provocar sintomas, é bastante estável e de fácil transmissão mecânica. Independentemente do vírus considerado, a batata-semente constitui-se na principal fonte de inóculo (SOUZA-DIAS e IAMAUTI, 1997).

No caso de infecção múltipla, os sintomas observados podem ser muito diferentes daqueles provocados por cada um dos vírus do complexo se considerados individualmente. Geralmente, observam-se sintomas mais acentuados devido a uma sinergia entre os vírus do complexo. É o caso da infecção conjunta de PVY e PVX que causa o chamado mosaico rugoso, e de PVS com PVX, apresentando o dobro de perdas em produção (SOUZA-DIAS e IAMAUTI, 1997).

Nos últimos anos, as infecções virais pelo vírus X e principalmente pelo vírus Y da batata têm se expandido com rapidez na cultura de batatas de diferentes regiões produtoras no Brasil, particularmente no Estado de São Paulo. Este fato acarreta grande preocupação, visto que, em função das favoráveis condições climáticas brasileiras, a batata pode ser propagada em cultivos sucessivos ao longo do ano. No mais, a sobrevivência de vetores e de solanáceas selvagens, amplamente distribuídas pelo território nacional, é garantida ao longo do ano ampliando as fontes de inóculo.

O PVY é a espécie-tipo do gênero *Potyvirus* (BARNETT, 1991, LUZ, 1995), família *Potyviridae* e apresenta uma grande variabilidade genética devido a erros de replicação, à recombinação e ao rearranjo com segmentos genômicos (GLAIS *et al.*, 2002). É mundialmente distribuído e provoca sérios danos em diversas solanáceas, tais como

culturas de batata, fumo, pimenta e tomate (SHUKLA *et al.*, 1994). O PVY é transmitido por mais de 25 espécies de afídeos, de maneira não-persistente, sendo que a principal forma de disseminação da doença é através de batatas-semente infectadas (SOUZA-DIAS e IAMAUTI, 1997).

As diferentes estirpes que infectam a batata têm sido classificadas em três grupos, de acordo com os sintomas provocados em cultivares específicas de batata e fumo:

- a estirpe PVY^O (*comum ou ordinária*); é a forma mais comum. Este grupo está presente no mundo todo e apresenta a menor taxa de mutações;

- a estirpe PVY^N (*necrótica*); que causa necrose em plantas de fumo;

- a estirpe PVY^C (*clorótica*); menos comum, ausente na América do Norte, mas presente em algumas partes da Europa e principalmente na Austrália (SOUZA-DIAS e IAMAUTI, 1997; CHANDELIER *et al.*, 2001).

Na infecção primária, os sintomas causados pela estirpe PVY^O variam desde mosaico ao amarelecimento dos folíolos apicais, e queda de folhas mais velhas, deixando a planta com aspecto de “pinheirinho”. Folíolos afetados geralmente apresentam enrugamento, deformação foliar, riscas pardas nas nervuras na face inferior dos folíolos. Já a estirpe PVY^N pode causar anéis ou pontuações necróticas nas folhas, cuja infecção sistêmica acarreta, no final do ciclo da cultura, o aparecimento de mosaico leve nas folhas apicais, sem ocorrer queda de folhas (SOUZA-DIAS e IAMAUTI, 1997). Estas estirpes, PVY^O e PVY^N, são conhecidas há décadas na bataticultura, mas, recentemente, um isolado do PVY^N denominado PVY^{NTN} (causando sintomas denominados, na Europa, de *Potato tuber necrotic ringspot disease*) tem sido detectado em vários Estados brasileiros induzindo necrose em forma de anéis superficiais nos tubérculos (SOUZA-DIAS, 2004), além de vários recombinantes de PVY^O e PVY^N terem sido relatados. Além disso, o grupo de

isolados PVY^{N/NTN} provêm de dois sub-grupos geograficamente distintos: um europeu (EU) PVY^(N/NTN) e um norte-americano (NA) PVY^(N/NTN). A diagnose dos isolados PVY^{N/NTN} tem se tornado cada vez mais complexa devido ao número crescente de isolados e sub-isolados, e à incidência de infecções mistas (NIE e SINGH, 2002).

O PVY pertence a um dos maiores grupos de fitovírus, representando cerca de 30% dos vírus de plantas repertoriados (RIECHMANN *et al.*, 1992). A ocorrência dos Potyvirus têm grande impacto econômico, principalmente devido ao fato de serem capazes de infectar um grande número de plantas (BOONHAM & BARKER, 1998), entre elas: batata, fumo, tomate, pimentão e abobrinha, nas quais causam, freqüentemente, perdas significativas na produção.

Esses vírus são caracterizados por apresentar partículas virais filamentosas e flexíveis, com 730 nm de comprimento e 11 nm de diâmetro, sendo formadas por cerca de 2000 subunidades de um único tipo de proteína arranjada de forma helicoidal envolvendo o genoma viral.

Como a maioria dos vírus de planta, o PVY apresenta RNA de fita simples com sentido positivo, não segmentado e com aproximadamente 10 Kb. Apresenta uma pequena proteína ligada covalentemente à porção terminal 5' do genoma, denominada VPg e uma pequena cauda poli (A) na porção terminal 3'. O genoma dos potivírus contém uma única e longa ORF (“**O**pen **R**eadin**G** **F**rame”) que é traduzida em uma extensa poliproteína, podendo ter de 340 a 370 KDa dependendo da espécie do vírus (ROBAGLIA *et al.*, 1989). Essa poliproteína é clivada por proteinases virais, produzindo pequenos polipeptídios, conforme descritos na FIGURA 1.

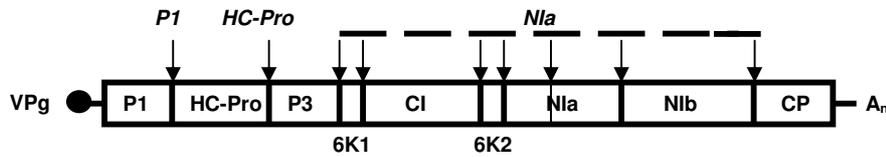


FIGURA 1 – Organização do genoma dos potivírus. Os diferentes produtos em que a poliproteína é clivada são (da região N para a C-terminal): **P1**, primeira proteína e proteinase; **HC-Pro**, proteína componente e protease auxiliar; **P3**, terceira proteína; o peptídeo putativo 6K, **6K1**; proteína **CI**, formadora dos corpos de inclusão; um segundo peptídeo 6K, **6K2**; **Nla**, proteína de inclusão nuclear ‘a’; **Nlb**, proteína de inclusão nuclear ‘b’ e **CP** a proteína do capsídeo viral. Em itálico são mostradas as proteinases virais. As setas indicam os locais de clivagem destas proteinases.

Dentre esses produtos virais, destacam-se como as menos conservadas as regiões codificadoras das proteínas P3, P1 e a porção N-terminal da capa protéica (CP – Coat protein), enquanto a região Nlb é reportada como a mais conservada (SHUKLA *et al.*, 1991).

A estrutura proteica helicoidal que envolve o conteúdo genômico dos vírus é denominada capsídeo proteico formado pelas proteínas da capa viral (CP). Dentro do grupo dos potivírus, além da função de envoltório, as proteínas CP também atuam na transmissão do vírus por afídeos de uma planta a outra, na movimentação do vírus célula-célula dentro da planta hospedeira e na regulação da amplificação do RNA viral (URCUQUI-INCHIMA *et al.*, 2001).

A determinação da seqüência de aminoácidos da capa protéica de PVY foi realizada primeiramente por SHUKLA e colaboradores (1986), que verificaram que essa proteína continha 267 aminoácidos e peso molecular de 29 KDa. Estudos posteriores revelaram que espécies distintas de potivírus diferenciam-se entre si quanto ao comprimento do gene codificador da CP e quanto à seqüência da porção N-terminal (ALEMAN-VERDAGUER *et al.*, 1997). Comparações realizadas entre vários isolados de potivírus mostraram que membros de espécies distintas exibiam entre 38 e 71% de similaridade na seqüência gênica,

enquanto membros de linhagens individuais, entre 90 e 99%. Dessa forma, os potivírus podem ser claramente diferenciados em membros e linhagens distintas tendo como base a homologia na sequência de aminoácidos da capa protéica (SHUKLA e WARD, 1986). Devido a essas características, o gene que codifica a CP é o mais frequentemente selecionado para estudos de diversidade genética. Comparações na sua sequência permitiram classificar membros da família *Potyviridae* em gênero, espécies e linhagens (ALEMAN-VERDAGUER *et al.*, 1997).

A região codificadora de CP corresponde à região C-terminal do genoma viral e a proteína CP está dividida em três domínios: uma região central mais conservada ou domínio central e dois domínios variáveis N e C-terminais que são expostos na superfície da partícula viral. O domínio N-terminal contém a maioria dos epítomos vírus-específicos (SHUKLA *et al.*, 1988) e o domínio C-terminal está relacionado com a formação da capa protéica que envolve o RNA viral (SHUKLA, *et al.*, 1991).

Apesar do polimorfismo encontrado, entre vários isolados PVY, no gene que codifica para a CP, a proteína P1 é a menos conservada entre os potyvirus e entre as estirpes de PVY (DOMIER *et al.*, 1987; MARIE-JEANNE TORDO *et al.*, 1995). Quanto aos isolados europeus Eu-PVY^{NTN}, foi demonstrada a estrutura recombinante do seu genoma, derivada de PVY^O e Eu-PVY^N (Glais *et al.*, 2002). Por outro lado, no que diz respeito ao isolado norte-americano NA-PVY^{NTN} Tu 660, as análises filogenéticas e a forte similaridade de sequência, indicam que ele seria o resultado de mutações do isolado NA-PVY^N (NIE e SINGH, 2003).

Vários métodos moleculares têm sido desenvolvidos na tentativa de se distinguir entre os isolados PVY^N e PVY^{NTN}. Alguns destes trabalhos são baseados nas diferenças na região 5' do genoma (WEIDEMANN e MAISS, 1996; WEILGUNY e SINGH, 1998;

ROSNER e MASLENIN, 1999), outros na região 3' do genoma (ROSNER e MASLENIN, 2001), inclusive considerando-se o evento de recombinação na região codificadora da capa protéica (BOONHAM *et al.*, 2002, BOONHAM, 2002 #12), enquanto que outros ainda baseiam-se na variabilidade ao longo de todo o genoma (GLAIS *et al.*, 1998).

A capacidade dos isolados de PVY em causar necrose é um dos mais importantes fatores envolvidos na taxonomia e a principal causa dos impactos agrônômicos deste vírus. Alguns autores acreditam que um domínio de 2 kb se estendendo da extremidade 3' do gene P1 até a extremidade 5' do gene P3 estaria envolvida na capacidade de causar necrose em tabaco (GLAIS *et al.*, 2002). Em outro estudo recente, a região C-terminal da proteína multifuncional HC-Pro inclui dois resíduos (K₄₀₀ e E/G₄₁₉) envolvidos na resposta necrótica de plantas de *N. tabacum* cv. Xanthi quando infectadas por PVY^N (TRIBODET *et al.*, 2005).

O PVX, por sua vez, é um vírus cosmopolita e um dos mais amplamente encontrados em alguns campos de produção de batata, de países particularmente da América do Norte, produtores e exportadores de batata-semente. Ele é praticamente endêmico na batateira, podendo infectar também o tomateiro e plantas de fumo, causando pouca redução na produção, o que poderia induzir dúvidas quanto à relação custo:benefício da limpeza das plantas e sementes, isentando-as da infecção viral. Entretanto, o PVX pode representar um grande problema à cultura da batata, quando em associação com o PVY, causando o chamado *rugose mosaic*. Ele não é transmitido por vetores, mas sim através de contato mecânico ou por enxertia. A batata-semente constitui-se como a principal fonte de inóculo desse vírus, além de outras solanáceas silvestres hospedeiras (SOUZA-DIAS e IAMAUTI, 1997).

Este patógeno tem uma gama de hospedeiros restrito dentro da família Solanaceae e algumas espécies de Amaranthaceae e Chenopodiaceae. A doença caracteriza-se por sintomas muito leves de mosaico nas folhas, mais visíveis na metade inferior da planta. Na comparação com uma planta sadia nota-se ligeira redução de tamanho das folhas e do crescimento geral da planta afetada (SOUZA-DIAS & IMAUTI, 1997).

O *Potato Virus X* (PVX) é pertencente à família dos Potexvirus (SALAZAR, 1996) e se caracteriza por apresentar-se como um vírus não envelopado, com nucleocapsídeos filamentosos habitualmente flexíveis de forma alongada, medindo aproximadamente de 470 a 550 nm de comprimento e 13 nm de largura, com simetria helicoidal. O genoma é composto de uma molécula de RNA fita simples positiva, cujo comprimento é de 6,4 kb e apresenta 5 ORFs, sendo a 5ª codificadora do capsídeo viral (ASTIER *et al.*, 2001). O RNA é *capped* e poliadenilado (MURPHY *et al.*, 1995). O RNA genômico permite a expressão da ORF 1, cuja proteína é uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp, 166 kDa) que apresenta motivos metil-transferase, helicase e polimerase. As ORFs 2 a 5 são expressas através de vários RNAs sub-genômicos. A ORF 2 codifica para uma proteína TGBp1 de 24 kDa que possui um segundo motivo helicase. As proteínas 3 (TGBp2, 12 kDa) e 4 (TGBp3, 8 kDa) estão implicadas no movimento do vírus de célula a célula em plantas infectadas. O grupo dos três genes (TGB, *triple gene block*) 2+3+4 encontra-se igualmente em outros gêneros de vírus como Carlavirus, Benyvirus, Pomovirus, Pecluvirus, Hordeivirus, Alexivirus, Foveavirus. A ORF 5 codifica para a proteína do capsídeo (ASTIER *et al.*, 2001).

Análises filogenéticas das seqüências nucleotídicas do gene que codifica a CP, que corresponde à maioria dos dados disponíveis, agrupa as estirpes de PVX em 3 grupos: (i) o europeu *Nx*-avirulento; (ii) o europeu *Nx*-virulento, e (iii) o norte-americano *Nx*-virulento.

Além disso, a capa protéica viral é o determinante da resistência mediada pelo gene *Nx* do hospedeiro, enquanto que a proteína de movimento (25 kDa) é o fator determinante da resistência mediada pelo gene *Nb* (MALCUIT *et al.*, 2000; KAGIWADA *et al.*, 2002).

Muitas estirpes de PVX são conhecidas e apresentam grande variabilidade patogênica. A classificação das estirpes se dá por meio de testes biológicos, sorológicos e/ou moleculares e podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com a sua virulência aos genes de hipersensibilidade *Nx* e *Nb* (SANTA CRUZ & BAULCOMBE, 1995). O gene *Nb* confere resistência contra as estirpes dos grupos 1 e 2, enquanto o gene *Nx* confere resistência contra as estirpes dos grupos 1 e 3. Ambos os genes não conferem resistência ao grupo 4. As estirpes do grupo 1 ocorrem principalmente associadas com as estirpes do grupo 3, enquanto as do grupo 2 são encontradas apenas ocasionalmente, apresentando, em experimentos de enxertia, pontos necróticos nas folhas de cultivares de batata portadora do gene *Nb*.

Apesar da observação dos sintomas em plantas hospedeiras ser útil na diagnose de uma doença, ela geralmente não é suficiente para estabelecer um diagnóstico seguro e preciso das viroses de plantas. Os sintomas de uma doença viral podem variar em função de vários parâmetros, como o isolado do vírus, a variedade do hospedeiro, a data da infecção e as condições ambientais (MATTHEWS, 1991; ASTIER *et al.*, 2001).

A utilização de métodos sorológicos de detecção e identificação dos vírus, de modo complementar à observação dos sintomas de plantas infectadas permitiu separar vírus diferentes e relacionar vírus semelhantes ou variantes de um mesmo vírus. Entre esses métodos, a técnica de ELISA proporcionou, sobretudo, um ganho em rapidez e sensibilidade na detecção de vírus, em relação aos métodos tradicionalmente empregados, possibilitando embasamento e formulação de novas leis de controle fitossanitário da

importação da batata-semente, passando a ser exigido para a certificação do material importado, conforme instrução normativa N^o12, de 10 de junho de 2005, que estabelece os níveis máximos de contaminação das pragas que acometem a bataticultura.

O emprego metodologia do ELISA nos tubérculos também é de grande importância para a identificação das infecções virais, principalmente no monitoramento das batatas-sementes, além de facilitar as amostragens dos campos de batata na avaliação da contaminação viral. Deve se lembrar que no caso de tubérculos dormentes a técnica de ELISA não é suficientemente sensível devido à baixa concentração viral após a colheita, por isso a necessidade da realização dos testes no período correto. (MCDONALD e SINGH, 1996; MORAES *et al.*, 2003).

A partir dos anos 80, técnicas de clonagem, de seqüenciamento e de amplificação *in vitro* tornaram-se disponíveis. O conhecimento dos genomas dos vírus de plantas proporcionou novas perspectivas no desenvolvimento de técnicas de diagnose (SINGH, 1999). Contrariamente às técnicas serológicas, que detectam em geral uma proteína viral (a proteína do capsídeo viral), as técnicas baseadas na seqüência dos ácidos nucléicos permitem, em teoria, a detecção de qualquer região do genoma viral (ASTIER *et al.*, 2001). Entre as técnicas de biologia molecular, a PCR (*polymerase chain reaction*) apresentou novas perspectivas para a detecção de vírus de plantas.

A PCR consiste na amplificação exponencial de seqüências específicas de DNA, graças ao reconhecimento e à hibridação de curtas seqüências complementares (oligonucleotídeos), e à ação de uma Taq DNA polimerase. No caso de vírus constituídos de RNA, é necessário incluir anteriormente à reação de amplificação propriamente dita, uma etapa de transcrição reversa (RT, *reverse transcription*), durante a qual o RNA será copiado em um DNA complementar (cDNA). A sensibilidade e a especificidade do teste

PCR dependem da escolha dos oligonucleotídeos, da temperatura de hibridação e do número de ciclos (Henson e French, 1993). Através do estudo dos vírus da família *Potyviridae* e *Potexviridae*, foi demonstrado o uso de protocolos variados de RT-PCR na diferenciação dos vírus em nível de família, gênero, espécie, isolados ou ainda tipos serológicos (SINGH, 1998).

Inúmeras modificações e melhoramentos dos testes PCR têm sido constantemente efetuados, de maneira a ampliar os campos de aplicação destes métodos (ASTIER *et al.*, 2001). Uma dessas variantes de metodologia, chamada de PCR multiplex, visa utilizar oligonucleotídeos específicos de vários vírus num mesmo meio de reação, de maneira a detectar estes vírus simultaneamente. Tal procedimento diminui sensivelmente o custo e o tempo da detecção, quando comparado com reações individuais de PCR. Nie e Singh (2000) (NIE e SINGH, 2000) relataram sua aplicação na detecção simultânea de PLRV, PVY, PVA, PVX e PVS, inclusive no caso de tubérculos dormentes de batata, através da utilização de um oligonucleotídeo-dT comum para a síntese dos cDNAs.

Nas últimas décadas os ensaios imunomoleculares têm sido amplamente utilizados no diagnóstico de doenças de plantas e na detecção de fitopatógenos. Estes testes de detecção baseados em ambas as técnicas estão entre os principais produtos de biotecnologia, apresentando um impacto enorme no manejo da agricultura e no controle fitossanitário.

Dentre as inúmeras técnicas de diagnóstico imunomolecular, as reações imunoenzimáticas como ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) que permitem a identificação e quantificação do fitopatógeno tem desempenhado um papel importante. O diagnóstico utilizando ensaio de ELISA com soros policlonais ou anticorpos monoclonais desempenha um papel importante no estudo dos *potexvirus* e *potivírus*. Ele auxilia estudos

epidemiológicos de identificação do vírus tanto em hospedeiros como em vetores, para avaliação das relações evolutivas do vírus, entre outros (MARINHO & KITAJIMA, 1989).

Com o progresso das técnicas imunológicas, muitos soros policlonais e anticorpos monoclonais passaram a ser produzidos para muitos isolados de PVX e PVY, na busca por anticorpos capazes de reagir de forma diferenciada com isolados geográfica e biologicamente distintos, ampliando a capacidade de detecção do ELISA com esse aumento do número de epítomos específicos capazes de serem detectados.

Devido à alta incidência e à rápida disseminação de viroses, o país depende da importação da batata-semente, livre de doenças, conforme já citado. Mesmo sabendo-se das perdas que estas doenças causam para a cultura, o controle fitossanitário dos lotes de batata-semente ainda é ineficaz em função do custo elevado de importação dos anticorpos necessários aos testes de ELISA, o que inviabiliza em alguns casos os testes de sanidade e permitem a entrada e proliferação no país do material contaminado. Tal fato fornece o embasamento para o desenvolvimento de pesquisas que propiciem a produção nacional dos antisoros e anticorpos específicos aos mais variados vírus, permitindo dessa forma a redução dos custos dos testes de sanidade e o controle mais rígido das infecções virais, evitando principalmente a entrada de material contaminado do exterior.

Por outro lado, as análises moleculares por PCR (Polymerase Chain Reaction) têm se mostrado como um bom método de detecção de diversos fitopatógenos (HENSON e FRENCH, 1993; ASTIER *et al.*, 2001), apresentando um ganho significativo em termos de sensibilidade, ampliando o poder de detecção e permitindo um mapeamento mais detalhado dos vírus que acometem a bataticultura

Todavia, uma vez que a maioria dos vírus de plantas tem seu genoma codificado em RNA, é necessário efetuar a reação de transcrição reversa, que requer a extração dos ácidos

nucléicos com a utilização de solventes orgânicos, os quais podem provocar contaminação ambiental, risco de manuseio, além de perdas do material genético da amostra, diminuindo, a eficiência de detecção (NOLASCO *et al*, 1993; SINGH, 1998). Deste modo, protocolos que têm associado a captura direta do patógeno através da utilização de anticorpos específicos com a posterior amplificação por RT-PCR denominados de IC-RT-PCR, (*ImmunoCapture-Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) têm se mostrado eficientes na identificação de inúmeros vírus (WETZEL, 1992; SHARMAN *et al*, 2000; HELGUERA, *et al*, 2001; HEMA *et al*, 2003). A utilização do IC-RT-PCR tem permitido a identificação de infecções simultâneas como as infecções causadas pelos vírus do mosaico do tomate e do tabaco (JACOBI *et al*, 1998), as infecções das diferentes estirpes do vírus da necrose amarela da beterraba (KOENIG, 1996; KUNDU *et al*, 2004) e as infecções pelos potivírus yam (KOENIG, 1996; MUMFORD, 1997; JACOBI *et al*, 1998; KUNDU *et al*, 2004; NJUKENG *et al*, 2005).

Atualmente, a análise de fitossanidade e a indexação viral da batata-semente destinada à multiplicação comercial no Brasil são efetuadas através da combinação da utilização de plantas indicadoras (que propiciam a multiplicação e a sintomatologia de vírus específicos), com grande demanda de tempo, espaço físico e mão de obra, e por testes sorológicos como ELISA, os quais representam custos adicionais à cadeia produtiva, uma vez que o Brasil é dependente da importação dos antisoros de detecção. Todavia, o custo poderia ser reduzido e mais acessível se os custos com a importação fossem eliminados com o desenvolvimento e disponibilização de kits nacionais. Deste modo, considerando a relevância do estabelecimento de testes de diagnóstico nacionais sensíveis e confiáveis que permitam a identificação específica dos vírus X e Y, com custos reduzidos, em virtude da grande incidência dessas infecções virais, particularmente do PVY, os objetivos específicos

INTRODUÇÃO

deste projeto foram a obtenção de antisoros policlonais para o PVX e PVY, o estabelecimento de testes de imunodiagnóstico como ELISA indireto, a detecção molecular dos vírus e a tentativa de desenvolver o IC-RT-PCR, com o intuito de estabelecer técnicas com maior poder de detecção e de maior segurança e confiabilidade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal e Isolados de Vírus

Foram utilizadas fontes de inóculo liofilizadas dos vírus PVX e PVY (cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Jorge A. M. Rezende do Depto. Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”) as quais foram propagadas e mantidas em plantas hospedeiras *Datura stramonium* e *Capsicum annuum*, respectivamente.

Plantas e tubérculos de batata infectados foram obtidos dos produtores de batata (Pedro Hayashi da Pirassu-Agrícola – Vargem Grande do Sul), do pesquisador Dr. José Alberto Caram de Souza Dias (Instituto Agronômico de Campinas) e do laboratório de cultura de tecidos dirigido pela bióloga Jacqueline P. C. Amaral (São João da Boa Vista-SP).

2.2. Multiplicação e expansão das amostras virais

A viabilidade das fontes de inoculo, assim como a expansão das amostras virais de PVY e PVX, foram efetuadas através da inoculação mecânica utilizando o abrasivo em pó comercial (Carborundum®) em plantas hospedeiras e indicadoras. No presente trabalho foram utilizadas as plantas de *Solanum tuberosum* (cvs Atlantic e Asterix), *Nicotiana tabacum* Xanthi, *Nicotiana tabacum* NN, *Nicotiana clevelandii*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor* e *Capsicum annum*.

Deste modo, folhas das plantas hospedeiras e indicadoras foram tratadas com o abrasivo e inóculo viral previamente obtido através da maceração de folhas infectadas em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4 contendo 0,024 M de NaSO₃, e aplicado manualmente seguindo-se o contorno das nervuras.

Na indexação viral por plantas indicadoras são utilizados em torno de 3 vasos por tipo de planta contendo 3 plantas por vaso, com a presença de uma planta como controle negativo. Posteriormente, depois da identificação e limpeza do inóculo, visto que as infecções mistas são muito comuns, utilizou-se as plantas hospedeiras adequadas (*Datura stramonium* para o PVX e *Nicotiana tabacum NN* para o PVY) em lotes de 20 vasos para fins de multiplicação viral e purificação.

2.3. Purificação Viral

A purificação do PVX e PVY foi efetuada utilizando dois protocolos distintos, segundo descritos por FOSTER & TAYLOR (1998).

Folhas infectadas com PVX (60g de material vegetal) sem as nervuras centrais, foram homogeneizadas em tampão Tris-borato 0,2M e pH 7,5 com 0,2% de β -mercaptoetanol (2,0 mL/g de folha). Em seguida, o homogeneizado foi filtrado por quatro camadas de gaze, adicionando-se n-butanol (concentração final de 6%). A mistura foi deixada no gelo por 45 minutos com agitação constante, sendo em seguida centrifugada a 15.000g. O sobrenadante foi coletado. O vírus presente no sobrenadante foi precipitado pela adição de PEG 8000 8% na presença de 2% de NaCl, a temperatura de 4°C durante 30 a 60 minutos. Após centrifugação da solução a 15.000 g por 10 minutos, o pellet foi ressuscitado em tampão Tris-borato, pH 7,5. Preparou-se um colchão de sacarose de 4 mL em tubos Ti 60 (ultracentrífuga Beckman). O vírus foi centrifugado por 3h a 4°C a 86.500g. O *pellet* resultante foi ressuscitado no mesmo Tris-borato. Em seguida, procedeu-se uma centrifugação a 86.500g (à 15°C), em gradiente de alta densidade de CsCl por 17 horas. Coletou-se a banda do vírus, seguindo-se de uma diluição de quatro vezes em tampão Tris-

borato. Realizou-se, ainda, uma centrifugação a 100.000g por 2 horas, sendo que o *pellet* foi finalmente ressuspensão no mesmo tampão contendo 0,1% de azida sódica. Armazenamento a 4°C.

Para PVY, por sua vez, as folhas infectadas (50 g de material vegetal) foram homogeneizadas sem as nervuras centrais, em tampão fosfato 0,25 M pH 7,5, 0,01 M Na-EDTA e 0,1% ácido tioglicólico (2,0 mL/g de folha). Foi realizada uma centrifugação a 3.000g por 10 minutos, sendo coletado o sobrenadante e adicionado 1% Triton X 100, 4% PEG 6000 e 0,1 M NaCl. O material foi submetido à agitação constante por 2,5 horas a 4°C, sendo, em seguida, centrifugado a 9.000g por 15 minutos. O precipitado foi ressuspensão em tampão fosfato 0,25M pH 7,5 e 0,01M de MgCl₂, e deixado em agitação constante *overnight*. Após esse período, o material foi centrifugado a 29.000g por 1,5 hora, sendo ressuspensão em tampão fosfato 0,01 M pH 7,0, e re-submetido a uma centrifugação a 9.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e centrifugado em gradiente de CsCl, com uma solução de CsCl 15% sobre um colchão de CsCl a 53%, ambos dissolvidos em tampão fosfato 0,01M pH 7,0. Por fim, centrifugou-se por 16 horas a 30.000g e foi coletada a banda do vírus, fazendo-se a diálise com 3 trocas em tampão fosfato 0,01M pH 7,0 e armazenando a 4°C.

2.4. Determinação da Concentração Protéica

A absorbância pode ser utilizada para estimar a concentração de vírus purificados. Nesse sentido ela é frequentemente chamada de extinção (E) e é linearmente proporcional ao comprimento da cubeta de quartzo utilizada no espectrofotômetro que é de 1 cm. A concentração do vírus (c) e seu coeficiente de extinção (EC) são estabelecidos como a

extinção de uma suspensão de 1mg/mL (0,1%) no comprimento de onda de 260 nm em uma via de comprimento de luz de 1cm (E 0,1% 1cm, 260nm). Assim a concentração da amostra de vírus em mg/mL (c) pode ser calculada como sua extinção em 260nm (E260).

2.5. Microscopia Eletrônica

Para a microscopia eletrônica de transmissão, com o poder de resolução adequado para a visualização das partículas virais, as telinhas foram pré-tratadas com Formvar 1% em Dicloroetileno e, após isso, foram adsorvidas as partículas virais por 30 minutos, lavadas em água destilada e contrastadas com acetato de uranila 2% em Tampão maleato 0.5 M, pH 5.0, para visualização no microscópio das estruturas virais e da morfologia específica do PVX e PVY. Foram utilizados os microscópios eletrônicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia/UNICAMP e do Departamento de Fitopatologia/ESALQ-USP.

2.6. ELISA Indireto

Placas de poliestireno 96 orifícios (MaxiSorp - Nunc™) foram sensibilizadas com uma solução de 2 µg/mL de antígeno viral purificado, dissolvida em tampão carbonato (0,05 M, pH 9,6), em volume de 100 µL/poço e incubadas overnight, a 4° C. Entre as diferentes etapas do ensaio as placas foram lavadas (três vezes) com PBS-T (PBS + 0,05% de Tween 20). As placas foram bloqueadas com 2% de leite em pó desnatado (Molico®) dissolvido em PBS (PBS-Molico), reincubadas por 60 minutos a 37° C. Em seguida, os anticorpos da Agdia® e os produzidos durante o trabalho foram diluídos e adicionados à placa e esta, incubada a 37°C durante 120 minutos. Em seguida, adicionou-se o conjugado

MATERIAIS E MÉTODOS

anticorpo anti-imunoglobulina de coelho marcado com fosfatase alcalina (Sigma) na diluição de 1:30.000, e reincubação a 37⁰ C por 60 minutos. Adição do substrato PNPP (para-nitrofenil fosfato) na concentração de 1 mg/mL, diluído em tampão substrato dietanolamina. A leitura da DO foi efetuada em leitor de ELISA (Labsystems Multiskan Biochromatic[®] Type 348) a 405 nm. (CLARK *et al.*, 1977).

2.7. Animais experimentais

Durante o desenvolvimento do projeto foram utilizados 3 coelhos fêmeas da raça Brancos da Nova Zelândia, com 4 meses de idade, provenientes da Granja Grota Azul, para cada vírus purificado (PVX e PVY). Os animais, em bom estado de saúde, foram acondicionados em gaiolas individuais no biotério, com temperatura constante de 21°C. O uso dos animais e o protocolo de imunização está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP com o número de protocolo 1008-2.

2.8. Esquemas de Imunização

Para produção dos soros policlonais do PVY e do PVX os coelhos foram imunizados pela via intra-dérmica conforme segue:

<i>1.^a dose</i>	<i>Dia 0</i>	<i>100 µg / mL do Ag em Adjuvante de Freud completo</i>
<i>2.^a dose</i>	<i>Dia 21</i>	<i>150 µg / mL do Ag em Adjuvante de Freud incompleto</i>
<i>3.^a dose</i>	<i>Dia 35</i>	<i>200 µg / mL do Ag em Adjuvante de Freud incompleto</i>
<i>Sangria Branca</i>	<i>Dia 42</i>	

Para a obtenção de soro policlonal específico para os vírus PVX e PVY, os coelhos foram imunizados utilizando doses crescentes e subcutâneas de antígeno. A primeira imunização foi administrada com Adjuvante de Freund completo e as outras duas com adjuvante de Freund incompleto. Realizada a sangria de prova, deu-se um *booster* subcutâneo, procedendo-se posteriormente a sangria branca via punção cardíaca. O sangue foi centrifugado, o soro foi separado e inativado em banho de 56°C por 1 hora, aliquoteado e estocado à -20°C.

2.9. Análise Computacional do PVY e PVX

A identificação das regiões específicas características dos diferentes vírus (PVY e PVX) foi efetuada através da procura em bancos de dados de seqüências e de trabalhos publicados (RIGOTTI e GUGERLI, 2007 e SCHUBERT *et al*, 2007), de modo a efetuar o desenho de *primers* específicos. O desenho dos *primers* que foram sintetizados para as RT-PCR respeitou os seguintes critérios: *i*) comprimento do *primer* entre 18 e 25 nucleotídeos; *ii*) maior proximidade com a extremidade 3' que com a 5'; *iii*) conteúdo em G+C entre 45 e 60%; *iv*) temperatura de anelamento (T_a) superior a 50°C; *v*) comprimento mínimo do produto amplificado de 200pb; e *vi*) ausência de estrutura secundária (SINGH e SINGH, 1997; NIE e SINGH, 2002).

2.10. Extração de RNA

A extração de folhas de batata infectadas foi realizada utilizando o kit RNeasy Mini®, segundo o protocolo do fornecedor (Qiagen, Austin TX, USA). A integridade do RNA foi analisada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

A quantidade e pureza do RNA foram determinadas em espectrofotômetro de luz UV por meio da avaliação das absorvâncias a 260 nm e da relação entre as absorvâncias a 260/280 nm, respectivamente. A integridade das moléculas foi avaliada em gel de agarose 1,5% pela observação de bandas bem definidas correspondentes aos fragmentos 5S, 18S e 28S do RNA ribossômico.

2.11. Construção de cDNA

A transcrição reversa foi efetuada utilizando o RNA total da amostra, seguindo o protocolo do kit InProm II – Reverse Transcriptase System (Promega Corporation, Madison WI, USA) e do kit da Sigma[®] Enhanced Avian HS RT-PCR. A quantificação do DNA complementar (cDNA) foi efetuada por espectrofotômetro de luz UV por meio da avaliação das absorvâncias a 260 nm e da relação entre as absorvâncias a 260/280nm.

Para caracterização específica da estirpe do isolado, as plantas que forem consideradas positivas para o PVY no teste de ELISA indireto serão analisadas por RT-PCR, utilizando para tanto os primers propostos por BOONHAM *et al.* (2002). Para estas análises, serão retiradas as camadas superficiais dos tubérculos próximos aos anéis necróticos ou folhas sintomáticas.

2.12. PCR

As reações de PCR semi-quantitativo foram realizadas com o volume final de 25uL por reação, cada uma contendo: 60 mM Tris-HCl pH9,0, 15 mM KCl, 2,1mM MgCl₂, 20mM (NH₄)₂SO₄, 0,1mM de cada dNTP, 0,2pmol/uL de cada primer (direto e reverso) e 0,3μL de *Taq* polimerase (5U/μL). As condições básicas da reação foram 94°C por cinco

minutos, 40 ciclos de trinta segundos a 94°C para denaturação, trinta segundos a 60°C para anelamento e quarenta e cinco segundos a 72°C para extensão, seguido de mais cinco minutos a 72°C para extensão final.

2.13. IC-RT-PCR

1º Etapa: Sensibilização

Microplacas de poliestireno de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo específico para cada vírus (monoclonal ou policlonal) e incubadas à 4°C por 12 horas. Em seguida, foram bloqueadas com uma solução contendo tampão fosfato salino e “Molico”, e incubadas a 37°C por 1 hora, e lavadas com PBS-Tween.

2º Etapa: Extração e adição do antígeno

As amostras de planta foram tratadas com tampão específico contendo PVP-40, para evitar a oxidação do material, e PEG-6000, para evitar a agregação das partículas virais. O extrato foi centrifugado e o sobrenadante adicionado às microplacas sensibilizadas com o anticorpo específico para o vírus a ser detectado.

3º Etapa: Reação da transcriptase reversa

Foi adicionado a cada poço da microplaca uma solução contendo dNTPs, inibidor de ribonuclease, o primer downstream específico e a transcriptase reversa MMLV. A microplaca foi incubada por 1 hora a 37°C.

4º Etapa de PCR

Nesta etapa, as concentrações dos reagentes foram as seguintes: 60 mM Tris-HCl pH9,0, 15 mM KCl, 2,1mM MgCl₂, 20mM (NH₄)₂SO₄, 0,2mM de cada dNTP, 0,2µM de cada primer (direto e reverso) e 1,6 U de *Taq* polimerase.

A temperatura de anelamento e os ciclos utilizados durante a amplificação seguiram o que já foi descrito do item anterior. Os amplificados serão separados em gel de agarose, corados com brometo de etídeo, e em seguida, fotografados sob luz ultravioleta. A diagnose de um vírus específico é determinada pela presença de um produto de amplificação com o tamanho.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção de fontes de inóculo

Fontes de inóculo liofilizadas dos vírus PVX e PVY (cedidas pelo Prof. Rezende) foram propagadas e mantidas em plantas hospedeiras *Datura stramonium* e *Capsicum annuum*, respectivamente. As FIGURAS 2A e B mostram os sintomas de mosaico apresentado pelas plantas infectadas com PVX e PVY, respectivamente.

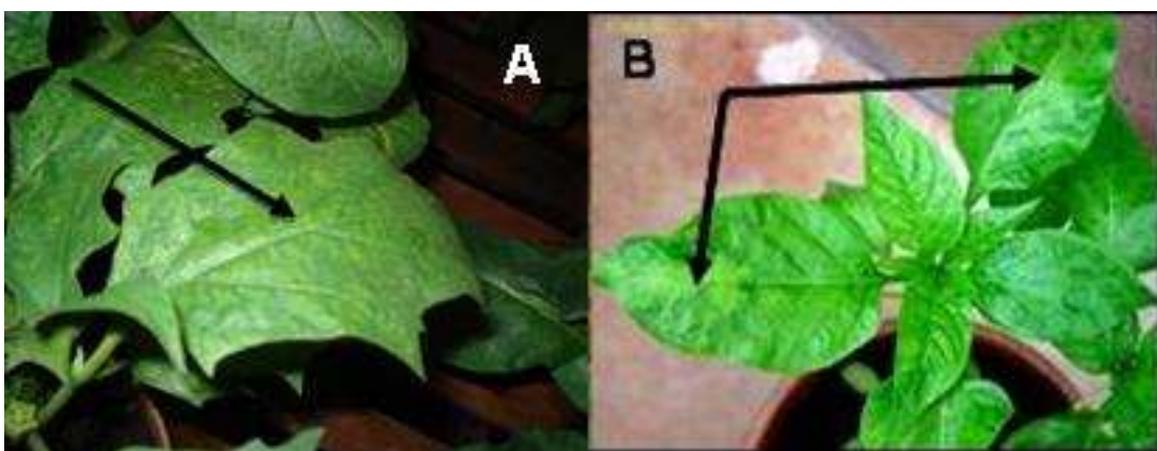


FIGURA 2. (A) Sintomas de mosaico em plantas de *Datura stramonium* infectadas com PVX. (B) Sintomas de mosaico intenso em plantas de *Capsicum annuum* infectadas com PVY.

As plantas e tubérculos de batata infectados (TABELA 01) obtidas junto a produtores de batata (Pedro Hayashi da Pirassu-Agrícola – Vargem Grande do Sul) e ao laboratório de cultura de tecidos dirigido pela bióloga Jacqueline P. C. Amaral foram utilizados para os testes nas plantas indicadoras, para avaliação da potencialidade dos inóculos. Além de fontes obtidas junto ao Dr. José Alberto Caram de Souza Dias, do Instituto Agrônomo de Campinas.

TABELA 01. Fontes de inóculo dos vírus, diagnosticados pela avaliação dos sintomas.

Nº amostra	Identificação da fonte	Material de origem	Espécie vegetal de origem	Fornecedor do Inóculo
1	PVY	Tubérculos	<i>Solanum tuberosum</i>	Jacqueline
2	PVX + PVS	Tubérculos	<i>Solanum tuberosum</i>	Jacqueline
3	PVY	Planta inteira	<i>Solanum tuberosum</i>	Jacqueline
4	PVX + PVS	Planta inteira	<i>Solanum chacoense</i>	Pedro Hayashi (produtor)
5	PVY	Planta inteira	<i>Solanum tuberosum</i>	Pedro Hayashi (produtor)
6	PVY ^{NTN}	Tubérculos com anéis necróticos	<i>Solanum tuberosum</i>	Pedro Hayashi (produtor)
7	PVY ^{NTN}	Folhas	<i>Nicotiana TNN</i>	Dr. Caram
8	PVY ^N	Folhas	<i>Nicotiana TNN</i>	Dr. Caram

3.2 Multiplicação e expansão das amostras virais

As demais fontes de inóculo (1, 2, 7 e 8) não permitiram a sua propagação quer em plantas hospedeiras ou indicadoras, todavia obtivemos a expansão viral das amostras 3, 4, 5 e 6 e dos inóculos do Prof. Rezende. Estas foram multiplicadas com sucesso nas plantas de *Datura stramonium* (Planta hospedeira e indicadora de PVX – produção de mosaico foliar intenso) e *Capsicum annuum* (Planta hospedeira de PVY – produção de mosaico foliar intenso). As plantas resultantes da propagação foram utilizadas para purificação viral dos respectivos vírus.

A amostra 3 apresentava uma sintomatologia característica da infecção em batata, tais como enrugamento da borda das folhas, mosaico foliar e necrose de nervuras. Logo, para a realização da indexação viral, foi realizada a inoculação da fonte em plantas de *Solanum tuberosum* (cvs Atlantic e Asterix), *Nicotiana tabacum* NN (planta hospedeira indicadora de PVY – produz mosaico foliar e pontos cloróticos), *Nicotiana tabacum* Xanthi (Planta indicadora hospedeira de PVY – produz mosaico foliar), *Nicotiana tabacum clevelandii* (Planta indicadora hospedeira de PVS – *Potato vírus S* – produz pontos

cloróticos bem leves) e *C. quinoa* (Planta indicadora de PVY – produz lesões locais ao longo das folhas). Os sintomas da amostra 3 foram muito leves em plantas de batata, mas extremamente intensos em plantas de *Nicotiana tabacum* NN e de *C. quinoa*.

A amostra 4, que apresentava uma infecção mista dos vírus PVX + PVS, também foi inoculada em diferentes plantas indicadoras para a obtenção da separação viral. Deste modo, foi inoculada (denominada ‘1.^a inoculação’) em plantas de *Datura metel* (planta indicadora e hospedeira de PVX e PVY – produção de mosaico foliar intenso), *Datura stramonium* (planta indicadora e hospedeira de PVX – produção de mosaico foliar intenso - FIGURA 3B) e *N. clevelandii* (planta indicadora e hospedeira de PVS – produção de pontos cloróticos bem leves). A partir de folhas inoculadas de *D. metel* e *N. clevelandii*, foi efetuada uma nova inoculação (‘2.^a inoculação’) utilizando as mesmas espécies, de modo a garantir esta separação. A inoculação da amostra em *Datura stramonium* gerou infecção com sintomatologia, de modo que as folhas foram liofilizadas e poderão ser utilizadas para futura expansão viral. Todavia não obtivemos êxito na propagação do PVS nas plantas indicadoras testadas. Deste modo optamos por sua propagação na planta indicadora *Chenopodium album* (planta indicadora de PVS – produção de lesão local), mas também não obtivemos sintomas de infecção.

A amostra 5 inoculada inicialmente apenas em *Nicotiana tabacum* NN, produziu sintomas de mosaico nítidos, conforme visualizado na FIGURA 3A. Posteriormente efetuou-se a passagem desta amostra nas plantas indicadoras *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor* (planta indicadora de PVY – produção de lesão local) e em *N. Tabacum* Turkish (planta hospedeira e indicadora de PVY – produção de mosaico foliar e pontos cloróticos). As FIGURAS 3C e 3D mostram as lesões locais características da infecção por PVY. O resultado foi satisfatório e condizente com a expectativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tubérculos com anéis necróticos sintomáticos para PVY^{NTN} (amostra 6 – FIGURA 3F) que estavam em processo de germinação (FIGURA 3E), brotaram e suas respectivas folhas apresentaram sintomas intensos e característicos de infecção por PVY, tais como necrose de nervuras, mosaico foliar e enrugamento foliar.

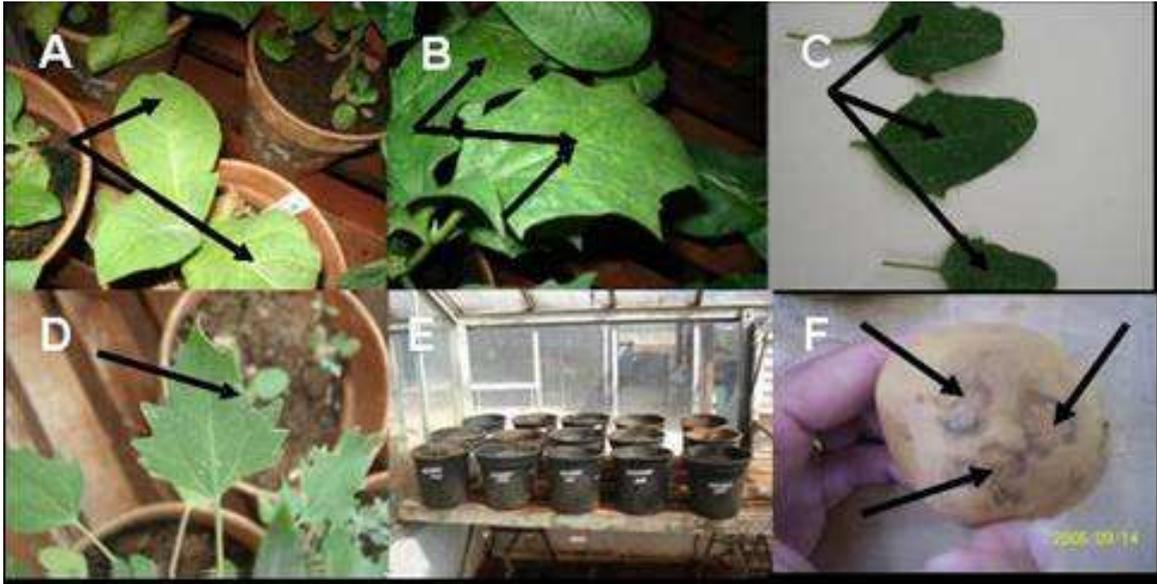


FIGURA 3. (A) *N. tabacum* NN com sintoma de mosaico (PVY). (B) *D. stramonium* com mosaico (PVX). (C) Folhas de *C. quinoa* com lesões locais (PVY). (D) Folhas de *C. quinoa* com lesões locais (PVY). (E) Tubérculos com PVY^{NTN} em processo de brotação. (F) Tubérculos com anéis necróticos (sintomáticos para PVY^{NTN}).

Deste modo, todas as fontes de inóculo inicialmente propagadas em plantas hospedeiras e indicadoras acima especificadas tiveram suas folhas coletadas e armazenadas em duas amostras distintas. A primeira, congelada à -80°C para minimizar os processos degradativos e preservar o material para extração de RNA, enquanto que a segunda amostra foi liofilizada de modo a se ter a disposição amostras virais específicas para multiplicação e purificação.

3.3 Detecções das amostras virais

O acompanhamento das plantas hospedeiras *Datura stramonium* e *Capsicum annuum* inoculadas respectivamente com PVX e PVY (dos inóculos cedidos pelo Prof. Rezende) foi realizado por ensaio de ELISA indireto utilizando os soros policlonais comerciais Anti-PVY, Anti-PVX, Anti-PVS e Anti-PLRV (Agdia[®]) importados, permitindo a observação da presença viral e sem contaminação em ambos os casos, conforme podemos observar na FIGURA 4, na qual temos reatividade específica de PVX na *Datura* e de PVY no *Capsicum*.

Na amostra 3 utilizada como fonte de inóculo, a presença viral das plantas indicadoras inoculadas foi feito por ELISA indireto utilizando os mesmos soros policlonais comerciais, permitindo a visualização da presença da multiplicação do PVY tanto na *Nicotiana* quanto no *C. quinoa*, sem contaminantes de outros vírus, conforme observado na FIGURA 5.

Nas mostras 4, 5 e 6, utilizadas como fontes de inóculo de PVX, PVS e PVY nos ensaios de propagação em plantas indicadoras/hospedeiras, o acompanhamento viral procedeu da mesma forma que anteriormente, com os mesmos soros policlonais. Conforme evidenciado na FIGURA 6, podemos observar que nas plantas inoculadas com a amostra 5 observamos reação positiva para PVY em *N. TNN*, *C. quinoa* e *S. tuberosum* (amostra 5 - inóculo), ao passo que o resultado positivo esperado para *N. turkish* e *C. amaranticolor* não foi observado. Embora na literatura estejam estabelecidas as plantas indicadoras específicas de determinado vírus, fatores ambientais e variações do inóculo podem contribuir para a não propagação adequada do vírus. Ainda na FIGURA 6 podemos observar que as plantas inoculadas com a amostra 4 apresentaram reação positiva para PVX em *N. clevelandii*, *D.*

metel, *D. stramonium* e *S. tuberosum* (amostra 4 - inóculo) e para PVS em *S. tuberosum* (amostra 4 - inóculo). A única divergência nessas respostas seria a *N. clevelandii* propagando o vírus X ao invés do S, mas isto se encaixa nas variações passíveis de serem encontradas e conforme já mencionadas anteriormente. Por fim, o teste da amostra 6-inóculo com os mesmos soros policlonais evidenciou a presença do PVY, conforme esperado. Podemos evidenciar que não ocorreram infecções mistas ressaltando a especificidade das plantas indicadoras, salvo no caso em que previamente já tínhamos a presença de mais de um vírus, no caso da amostra 4.

Nas amostras 7 e 8, temos duas variantes do PVY, sendo a primeira o NTN e a segunda o Ncurl, uma variante da estirpe N, conforme estabelecido pelo Prof. Caram (comunicação pessoal). Na FIGURA 7 podemos acompanhar por ELISA indireto que essas amostras inoculadas em *N. tabacum NN* propagaram o vírus PVY, evidenciado pela resposta positiva do teste. Devemos deixar claro que o teste sorológico consegue separar as espécies virais, mas a separação de estirpes fica difícil em função das pequenas variações antigênicas proporcionadas pelas pequenas variações gênicas. Dessa forma os soros policlonais não têm essa sensibilidade para reconhecer pequenas variações dos epítomos passíveis de serem detectados. Contudo é confiável e útil na detecção viral e nas infecções mistas.

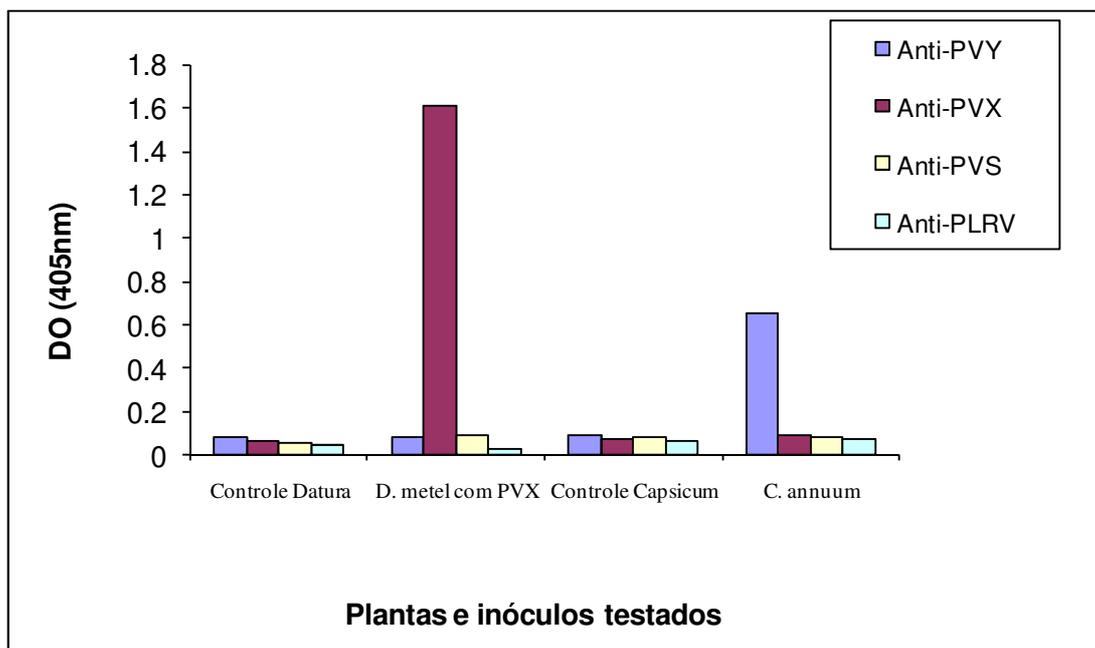


FIGURA 4. Análise por ELISA indireto das amostras cedidas pelo Prof. Rezende, utilizadas na purificação viral do PVX (*Datura stramonium*) e do PVY (*C. annum*).

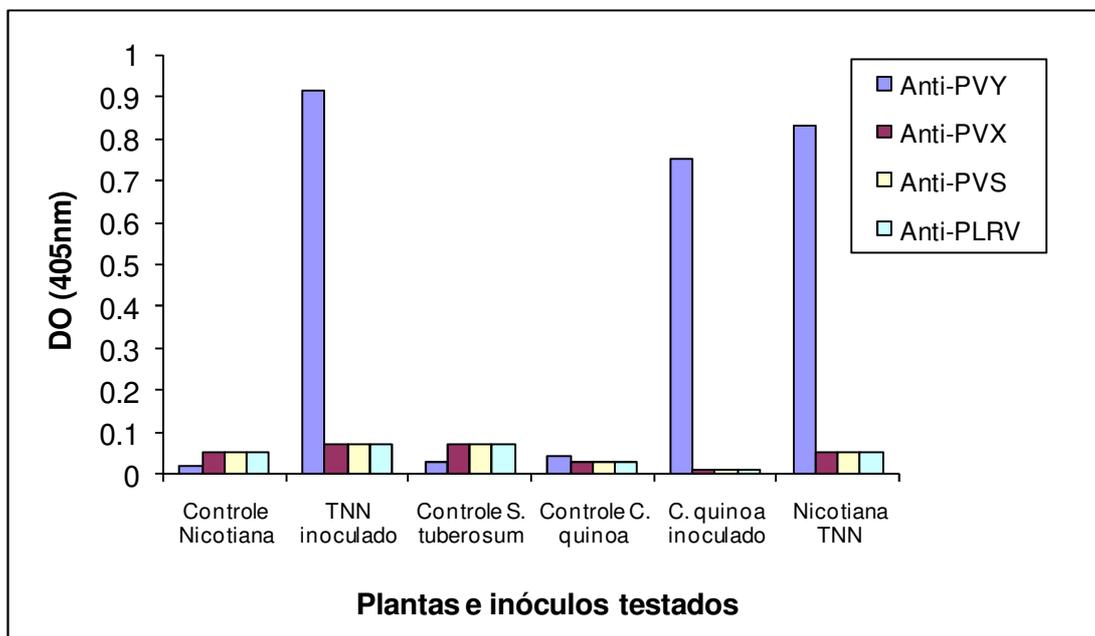


FIGURA 5. Análise por ELISA indireto das amostra 3 utilizada como fonte de inóculo de PVY nos ensaios de propagação.

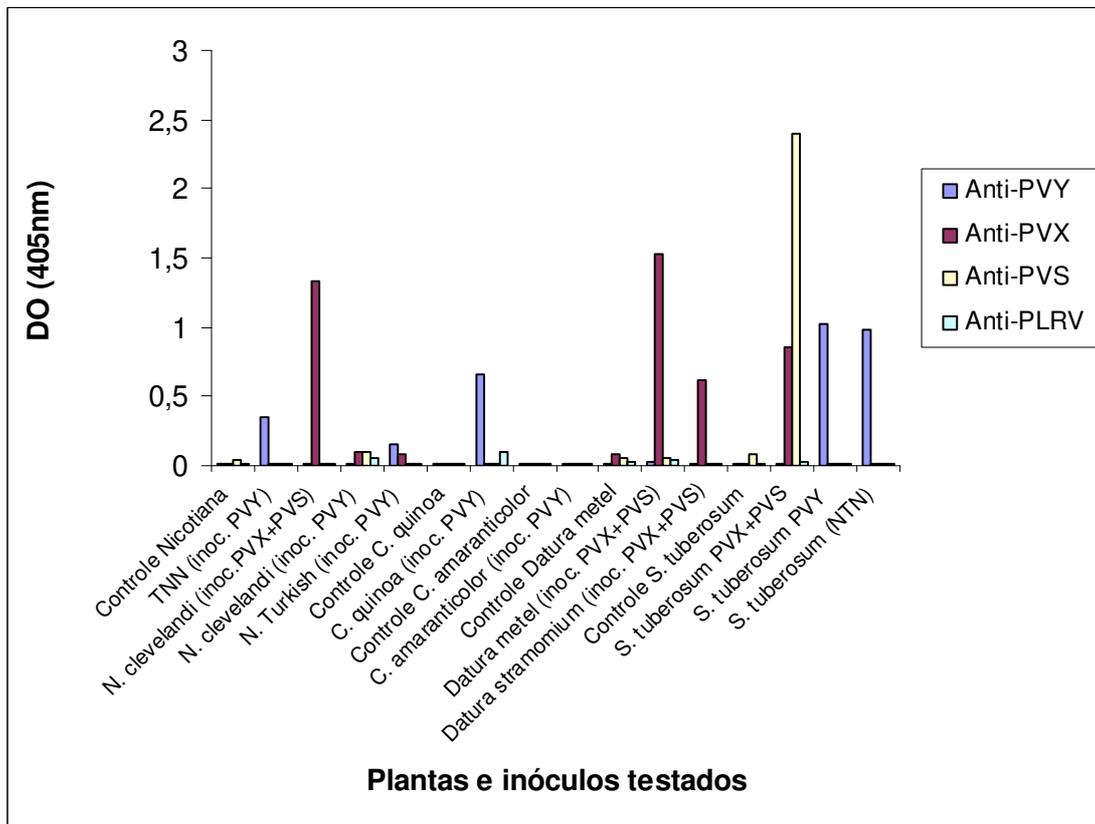


FIGURA 6. Análise por ELISA indireto das amostras cedidas pelo produtor Pedro Hayashi (amostras 4, 5 e 6), utilizadas como fontes de inóculo de PVX, PVS e PVY nos ensaios de propagação.

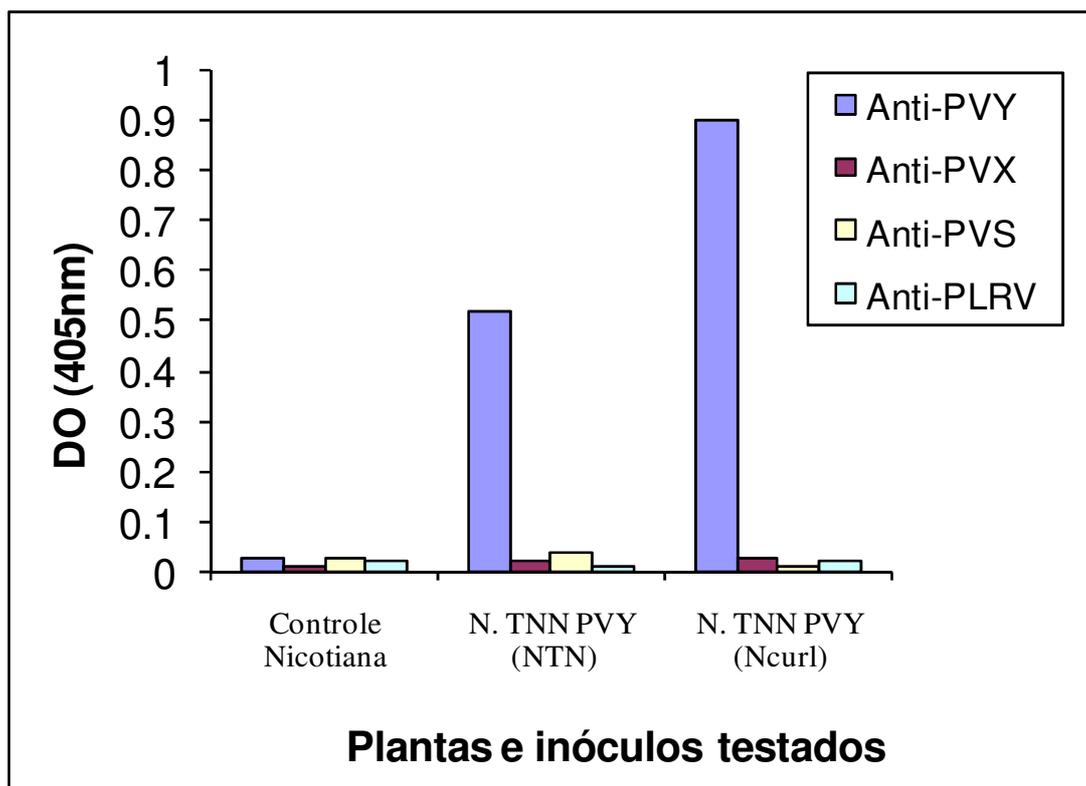


FIGURA 7. Análise por ELISA indireto das amostras cedidas pelo Prof. Caram (amostras 7 e 8), utilizadas como fontes de inóculo de PVY nos ensaios de propagação.

3.4 Purificação viral

A purificação dos vírus PVX e PVY foi efetuada utilizando dois protocolos distintos, segundo descrito por FOSTER e TAYLOR (1998). Podemos observar a banda final do vírus no processo de purificação na FIGURA 8.

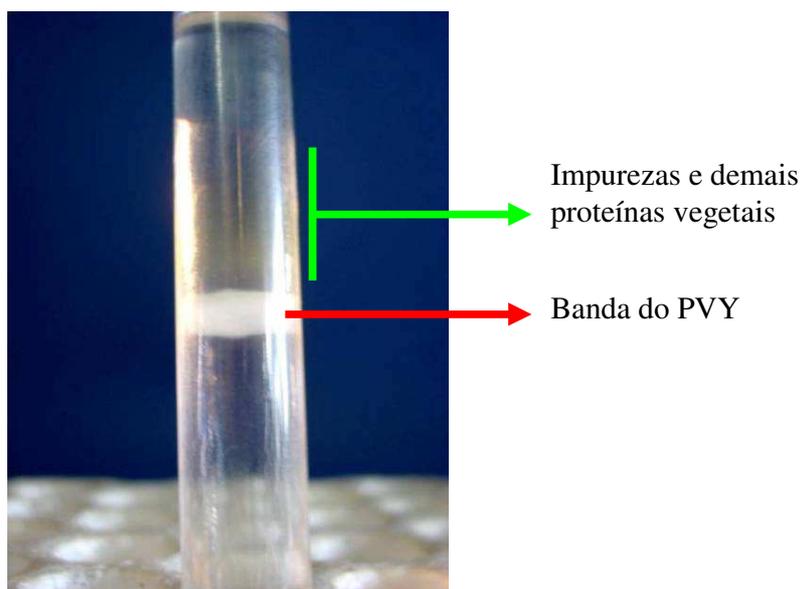


FIGURA 8. Foto ilustrando a banda de vírus (branco opalescente), bem como as impurezas e demais proteínas vegetais (esverdeado) logo acima.

O rendimento da purificação foi calculado utilizando como o coeficiente de extinção 2,0 para o PVX e 2,3 para o PVY, (DIJKSTRA & JAGER, 1998). Obtivemos, respectivamente 6,57 e 2,90 mg/mL de vírus, respectivamente. Estas diferenças de rendimento ocorrem em razão de particularidades intrínsecas de cada vírus, tais como tamanho e conformação das partículas e estabilidade das mesmas durante o processo.

Para identificação e caracterização das partículas virais purificadas efetuamos a microscopia eletrônica de transmissão.

As FIGURAS 9A e B mostram a estrutura e tamanho das partículas virais a partir das purificações efetuadas, cujas estruturas permitem a classificação como vírus PVX e PVY, respectivamente.

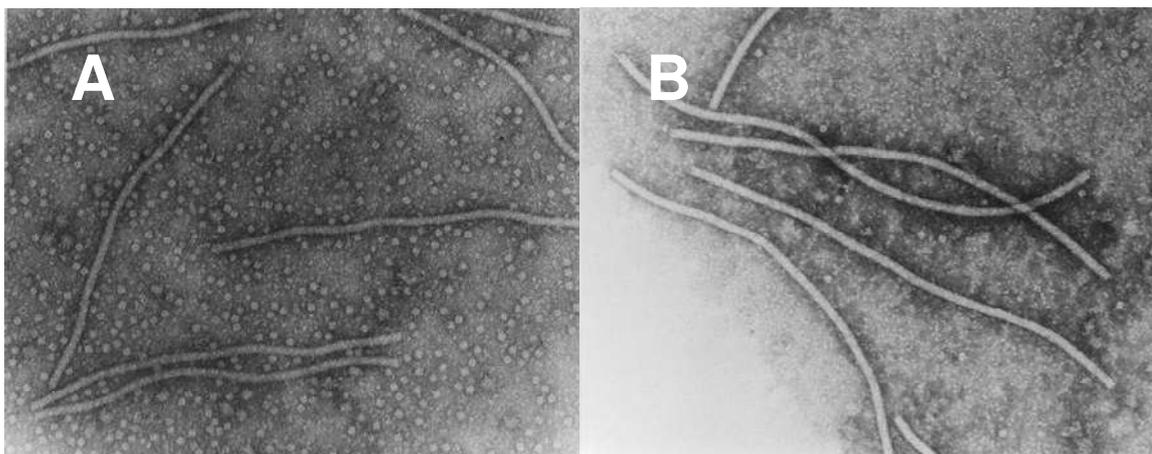


FIGURA 9. (A) PVX. As partículas virais apresentam a forma filamentosa alongada e flexível, medindo 550 nm de comprimento e 15 nm de diâmetro, apresentando simetria helicoidal (B) PVY. As partículas virais são filamentosas e flexíveis, com 730 nm de comprimento e 11 nm de diâmetro (aumento de 77.500X).

No entanto, para comprovar a identidade do PVY, este foi seqüenciado na ESALQ/USP sob a supervisão do Prof. Rezende. Deste modo, embora o vírus PVY (**FIGURA 2B**) corresponda a um *Potyvirus*, o mesmo não é o PVY da batata e sim *Pepper Yellow Mosaic Virus* (PepYMV) recentemente identificado em plantas de pimentão (INOUE-NAGATA *et al.*, 2002) e que tem apresentado alta incidência no Brasil, infectando diferentes espécies de solanáceas.

Os isolados de PVY provenientes de outras espécies de solanáceas como pimentão, pimenta, tomate e fumo, podem algumas vezes induzir sintomas necróticos em *N. tabacum*, similares àqueles induzidos por estirpes do grupo PVY^N. Contudo, esses nem sempre infectam sistematicamente a batata, não podendo, portanto, ser considerados como integrantes desse grupo (GEBRE SELASSIE, 1985). Por outro lado, resultados obtidos por MORAES (2003) mostraram que isolados de PVY da batata infectam pimentão. Deste modo, embora não tenhamos purificado o PVY da batata, o trabalho com o vírus PepYMV

assume maior interesse no que diz respeito à possibilidade de distinção entre vírus capazes de infectar tanto pimentão quanto batata uma vez que, produzimos um soro policlonal específico para o vírus PepYMV, o qual foi testado quanto a reatividade cruzada com outros potivírus e sua utilização para o estabelecimento de imunodiagnóstico.

3.5. Titulação do soro policlonal

A determinação da qualidade do antisoro é crucial para o desenvolvimento do imunodiagnóstico e requer a padronização da reatividade do soro, uma vez que algumas características como título, sensibilidade e especificidade de reconhecimento ou de reação cruzada são fundamentais para o seu estabelecimento. A intensidade das reações sorológicas é geralmente avaliada pelo título, ou seja, pela diluição máxima em que se observa uma reação, o qual pode ser objetivamente avaliado mediante a determinação espectrofotométrica da quantidade de reação. O título ou a diluição ideal do soro foi determinado através de diluições crescentes de soro, mantendo constante a concentração do antígeno (2 µg/mL) em ensaios de ELISA indireto. Os resultados obtidos da titulação (FIGURA 10) mostraram que o título foi de 1:30.000 para o anti-PVX e 1:40.000 para o anti-PVY, que corresponde à maior diluição sérica que ainda induz uma resposta positiva no ensaio de ELISA indireto, medido a 405 nm. O título sorológico, todavia, não representa uma medida da quantidade de anticorpo presente no soro, uma vez que são constituídos por uma mistura de anticorpos que apresentam uma afinidade e avidéz heterogênea em relação ao antígeno (vírus). A maior diluição do soro, contudo, permite inferir que o mesmo apresenta grande especificidade ao antígeno.

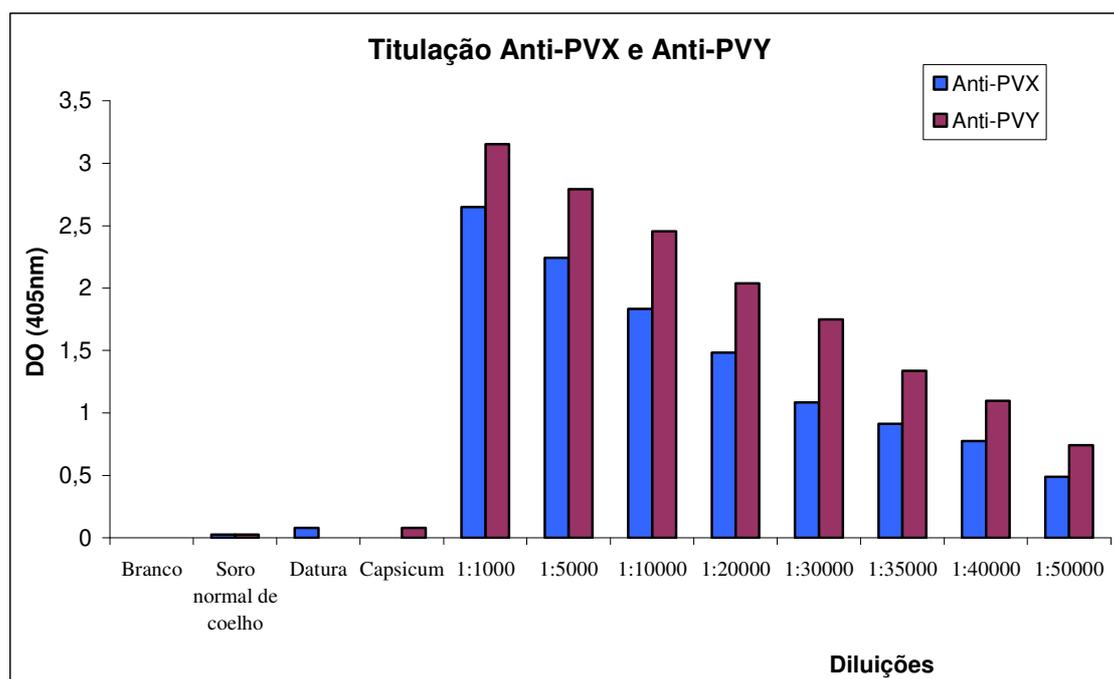


FIGURA 10. ELISA indireto para determinar o título dos soros policlonais **anti-PVX** e **anti-PVY**. Os antisoros foram utilizados nas diluições de 1:10.000 até 1:50.000. Soro normal de coelho e plantas hospedeiras sadias (utilizadas na propagação viral) foram utilizados como controles negativos.

3.6. Sensibilidade do antisoro

Entre os parâmetros de padronização do soro esta a determinação da sensibilidade de reconhecimento do antígeno, isto é, quantificar a concentração do antígeno que o mesmo é capaz de reconhecer. O ensaio de ELISA indireto foi realizado utilizando diluições seriadas do antígeno mantendo a concentração do soro constante (FIGURA 11). Nossos dados mostraram que, a reação positiva aumenta gradativamente com o aumento da concentração de antígeno adicionado (ou concentração de vírus – $\mu\text{g/mL}$), até atingir um máximo que corresponde à dose ideal de antígeno, e depois, em virtude da reação que denominamos de zona de excesso de antígeno onde ocorre uma competição entre o antígeno disponível e o anticorpo presente no ensaio, há uma diminuição gradativa da reação. Os resultados mostraram que os soros de coelho anti-PVX e anti-PVY são

capazes de reconhecer com eficiência a partir de 0,125 $\mu\text{g/mL}$ de concentração viral no ensaio de ELISA indireto, confirmando sua grande sensibilidade ao antígeno.

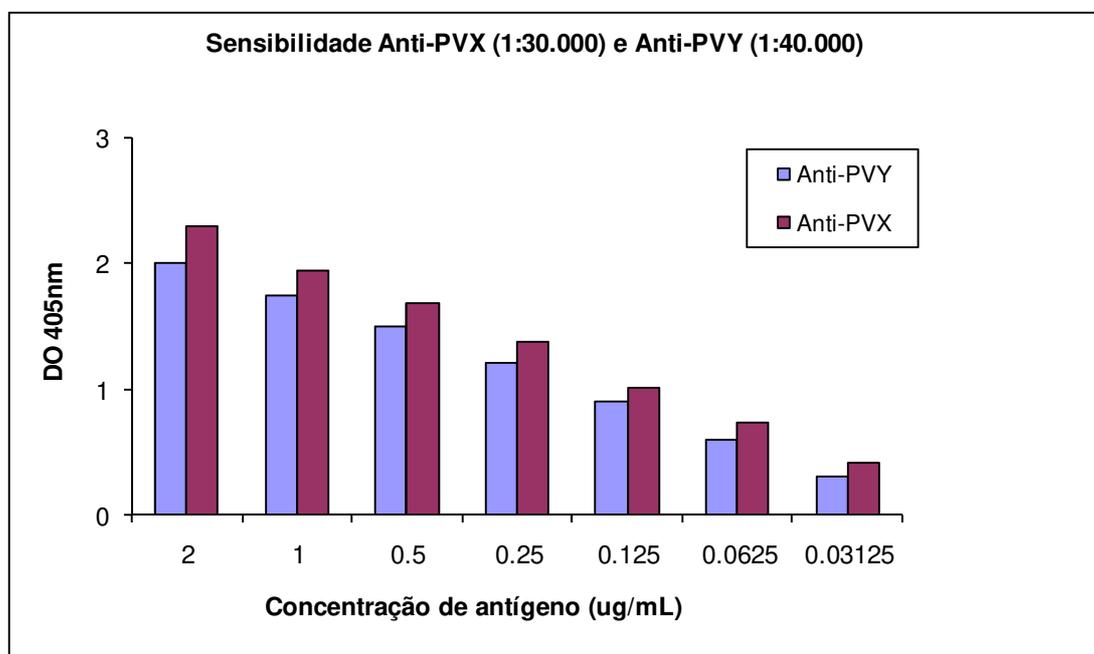


FIGURA 11. Análise da sensibilidade do ensaio de ELISA indireto para detecção dos vírus PVX e PVY. As concentrações virais foram avaliadas em triplicata e as médias simples foram calculadas e mostradas no gráfico.

3.7. Especificidade do antisoro

Como um dos objetivos deste projeto foi obter soros policlonais anti-PVX e anti-PVY específicos para o estabelecimento de um ensaio de diagnóstico de modo a permitir a identificação específica destas infecções virais, foi de fundamental importância determinar a especificidade de reconhecimento. Logo, os antisoros comerciais da Agdia® (Anti-PVY, Anti-PX, Anti-PVS e Anti-PLRV) e os antisoros produzidos (Anti-PVX e Anti-PVY) foram testados contra os vírus purificados e amostras de plantas infectadas sintomáticas (FIGURA 12). Os dados mostraram que os antisoros produzidos reagem de forma específica com os seus respectivos antígenos, reforçando a especificidade dos mesmos. Em

outras palavras, as amostras de *N. tabacum NN* que continham PVY e a amostra purificada foram positivas tanto para o antisoro comercial quanto para o produzido no trabalho, mostrando a especificidades dos mesmos, ocorrendo de forma similar com os antisoros anti-PVX testados com o vírus PVX purificado.

Deste modo, o antisoro específico produzido para vírus PepYMV tem enorme importância, uma vez que permite identificar os vírus capazes de infectar tanto pimentão quanto batata, o qual foi testado quanto a sua reatividade cruzada com outros vírus (FIGURA 12).

A reatividade cruzada com o soro anti-PepYMV aqui observada se justifica pela similaridade genética desse vírus com o PVY. Ambos pertencem à mesma família e apresentam 76,3% de similaridade genética (INOUE-NAGATA *et al* , 2002). Isso nos permite concluir que por se tratar de um soro policlonal podemos utilizá-lo como antisoro de detecção para todas as estirpes de PVY nos ensaios de imunodiagnóstico, visto que ambos os vírus compartilham de muitos dos epítomos passíveis de serem reconhecidos em função da grande similaridade genética.

Para confirmar a capacidade de reconhecimento do nosso soro, testamos amostras de batata infectadas com PVY e amostras de pimentão infectados com PepYMV, gentilmente cedidas pela Dra. Inoue-Nagata da EMBRAPA-Hortaliças de Brasília. Com isso, realizamos os testes utilizando os anticorpos policlonais e monoclonais para PVY e o antisoro policlonal para PepYMV produzido (FIGURA 13). Pudemos observar novamente a existência de reatividade cruzada entre os antisoros policlonais anti-PVY e anti-PepYMV, justificada pela similaridade genética de ambos os vírus, que geram múltiplos epítomos antigênicos semelhantes, passíveis de serem reconhecidos pelo mesmo antisoro.

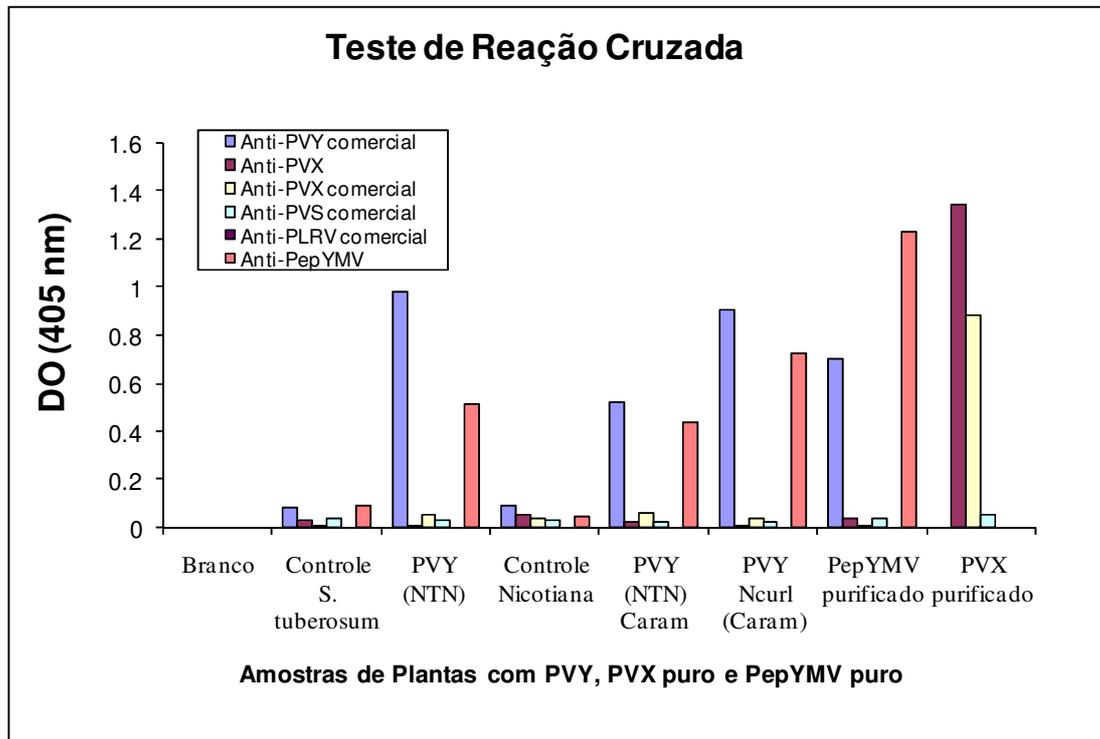


FIGURA 12. Teste de reatividade cruzada. Foram utilizadas amostras de plantas com PVY e os vírus purificados (PVX e PepYMV) contra os soros policlonais comerciais (utilizados na diluição 1:200) e os soros policlonais produzidos no trabalho (utilizados na diluição 1:30.000 (Anti-PVX) e 1:40.000 (Anti-PepYMV)).

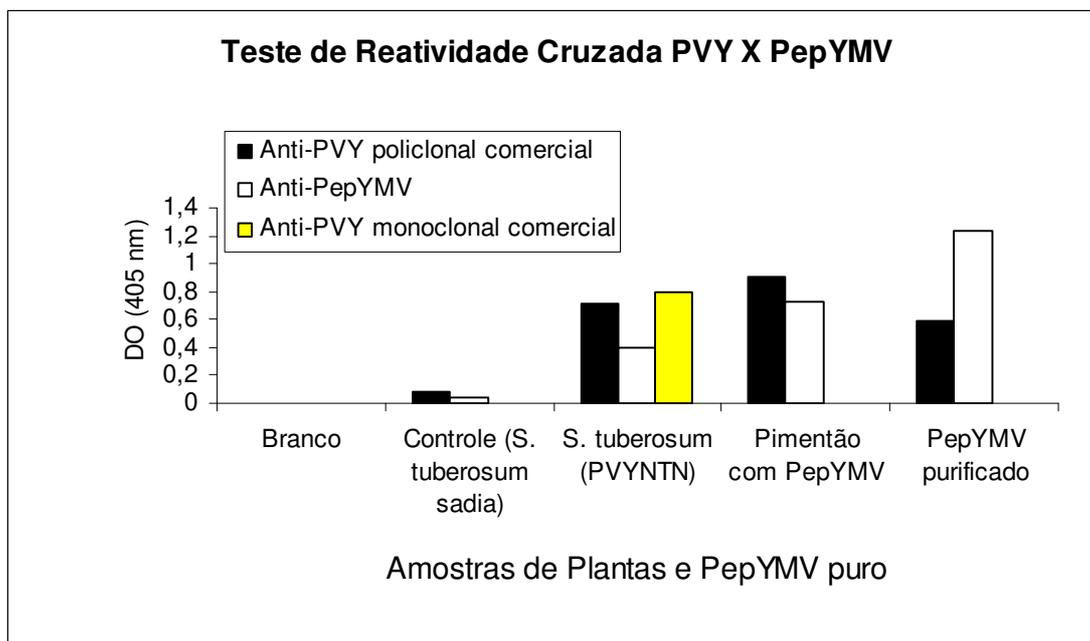


FIGURA 13. Teste de reatividade cruzada do PVY e do PepYMV. Foram utilizadas amostras de batata com PVY, amostras de pimentão com PepYMV e o vírus purificado PepYMV contra os soros policlonais comerciais (anti-PVY – diluição 1:200), anticorpo monoclonal anti-PVY (diluição 1:200) comercial e o soro policlonal anti-PepYMV (diluição 1:40.000) produzido no trabalho.

3.8. Estabelecimento do IC-RT-PCR (*ImmunoCapture-Reverse*

Transcriptase Polymerase Chain Reaction) – Técnica que alia a sensibilidade e o poder de captura do ELISA com a especificidade de detecção do PCR.

A identificação das regiões específicas características dos diferentes vírus (PVY, PVX) foi efetuada através da procura em bancos de dados de seqüências e de trabalhos publicados (RIGOTTI e GUGERLI, 2007 e SCHUBERT *et al*, 2007), de modo a efetuar o desenho de *primers* específicos.

Entre as 373 seqüências disponíveis do *Potato Vírus Y*, nos bancos de dados (GenBank), 5 são referenciadas como correspondendo a PVY^C; 30, a PVY^O; 39, a PVY^N; 5,

a PVY^{N:O}; e 23, a PVY^{NTN}. Além disso, dispõe-se de 24 seqüências do genoma completo de PVY.

Apesar de ser improvável que a região da capa protéica (CP) contenha a região determinante para a ocorrência dos sintomas, a comparação da seqüência da CP tem sido usada para identificar as diferentes estirpes (BOONHAM *et al.*, 2002, BOONHAM *et al.*, 2002). Deste modo, realizamos o alinhamento (FIGURA 14) utilizando o programa MegAlign do software DNASTar/Laserget 5.0 pelo método Clustal W da seqüência nucleotídica codificadora da CP de diferentes estirpes de PVY: uma de PVY^O (AJ223594.1), duas de PVY^N (AF522296.1, AJ223592.1), duas de PVY^{N:O} (AY745492.1, AY745491.1) e duas de PVY^{NTN} (AY840082.1, AY166866.1). O nível de identidade nucleotídica entre as seqüências variou de 89 a 99%, tornando mais difícil a localização de pares de *primers* específicos para cada uma das estirpes.

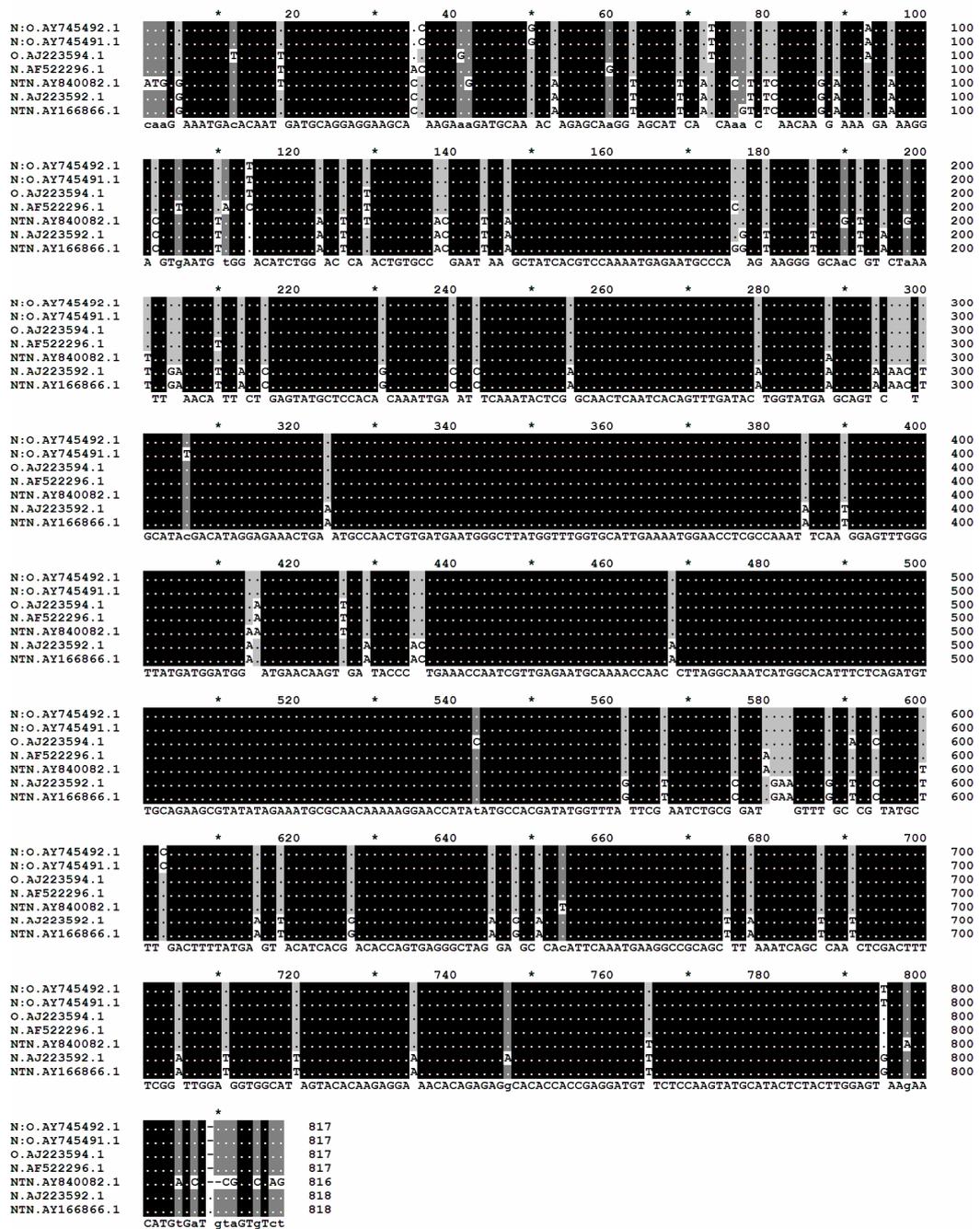


Figura 14. Alinhamento de 7 seqüências nucleotídicas (AY745492.1, AY745491.1, AJ223594.1, AF522296.1, AY840082.1, AJ223592.1, AY166866.1) referentes à capa protéica do vírus Y da batata (PVY, *Potato Virus Y*). Os nucleotídeos idênticos estão indicados por “.” e em fundo preto, e os diferentes, estão indicados no alinhamento. Os nucleotídeos anotados em branco com fundo cinza chumbo apresentam 80% de identidade, enquanto que aqueles anotados em preto com fundo cinza claro, 60% de identidade, entre as seqüências consideradas. Na última linha, é apresentado o consenso das seqüências comparadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como previsto no plano inicial deste trabalho, paralelamente à análise das seqüências disponíveis nos bancos de dados, foram analisados conjuntos de *primers* publicados em artigos científicos, como os de WEILGUNY (1998), BOONHAM (2002), MORAVEC (2003), NIE (2003). Serão feitos testes de amplificação com alguns destes pares de primers, de modo, a permitir em etapa posterior, a realização de PCRs multiplex.

A seqüência nucleotídica completa de vários isolados de PVX foi determinada, totalizando 11 nos bancos de dados, embora existam outras 40 seqüências parciais do genoma de PVX. Efetuamos o alinhamento de 17 seqüências nucleotídicas correspondendo à capa protéica (CP, 711 pb, 25 kDa) do vírus X da batata (FIGURA 15). O nível de identidade nucleotídica entre as seqüências variava de 93 a 99%, havendo diversas possibilidades para o desenho de primers, para a geração de fragmentos de tamanho conveniente para detecção em experimentos de RT-PCR.

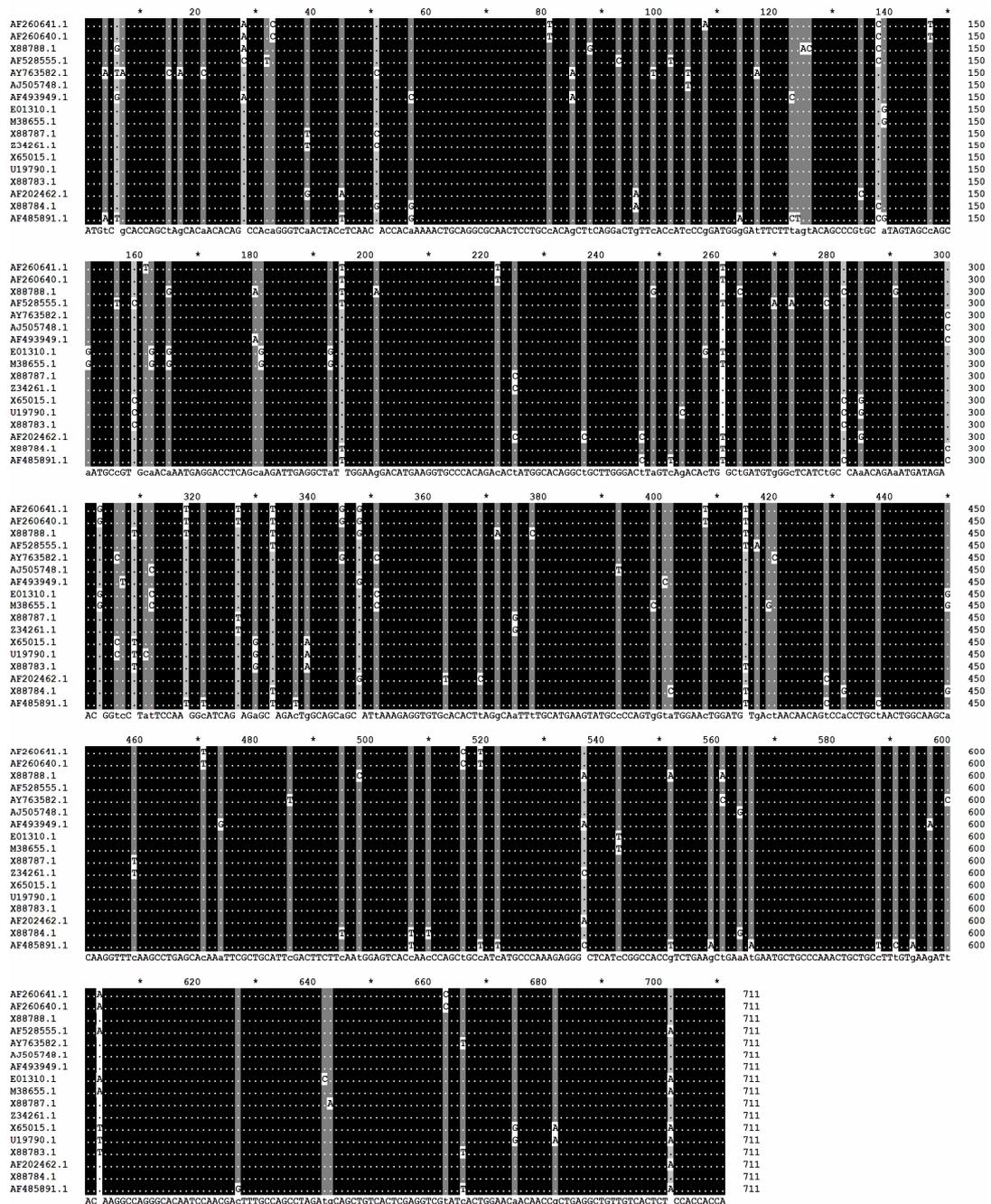


Figura 15. Alinhamento de 17 seqüências nucleotídicas (AF260641.1, AF260640.1, X88788.1, AF528555.1, AY763582.1, AJ505748.1, AF493949.1, E01310.1, M38655.1, X88787.1, Z34261.1, X65015.1, U19790.1, X88783.1, AF202462.1, X88784.1, AF485891.1) referentes à capa protéica do vírus X da batata (PVX, *Potato Virus X*). Os nucleotídeos idênticos estão indicados por “.” e em fundo preto, e os diferentes, estão indicados no alinhamento. Os nucleotídeos anotados em branco com fundo cinza chumbo apresentam 80% de identidade, enquanto que aqueles anotados em preto com fundo cinza claro, 60% de identidade, entre as seqüências consideradas. Na última linha, é apresentado o consenso das seqüências comparadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o desenho destes primers foram adotados os seguintes critérios: *i*) comprimento do primer entre 18 e 25 nucleotídeos; *ii*) maior proximidade com a extremidade 3' que com a 5'; *iii*) conteúdo em G+C entre 45 e 60%; *iv*) maior temperatura de anelamento (*Ta*) superior a 50°C; *v*) comprimento mínimo do produto amplificado de 200pb; e *vi*) ausência de estrutura secundária (NIE e SINGH, 2002). Com isso os *primers* desenhados seguem na TABELA 02.

TABELA 02: Os pares de primers que são utilizados nas detecções moleculares e no IC-RT-PCR para identificação dos vírus X, Y, S e PepYMV. **F** – forward, **R** – reverse.

Vírus	Par de primers	Seqüência dos primers (5' → 3')
PVX	F	TAG CAC AAC ACAGGC CAC AG
	R	GGC AGC ATT CAT TTC AGC TTC
PVY-O	F	TCT GG(AG) ACA CAT AC(AT) GT(AG) CC(AG) A
	R	TGT ACT GAT GCC ACC GTC GAA C
PVY-N	F	TCT GGA ACT CA(CT) ACT GTG CCA C
	R	CCT TCA TTT GAA TGT GTG CCT CT
Potyvirus	F	GAA CC(AG) TA(CT) ATG CCA CG(AGC) TA(CT) G
	R	(CT)(GT)(AGC) AC(CT) CCA AG(CT) A(AGT)(AG) GTA TG
PepYMV	F	GAA GAA GAG AGC TAA GAA TGA ACA G
	R	GTG GTG CCG CCT ACT TTC

Os primers referentes aos PepYMV foram obtidos a partir das seqüências clonadas e analisadas no trabalho de INOUE-NAGATA et al (2002), já que o genoma do mesmo não foi seqüenciado.

De posse de todos os dados e materiais necessários realizaram-se todos os testes moleculares na tentativa de se estabelecer o IC-RT-PCR. A partir de material vegetal infectado (*D. stramonium* com PVX e *S. tuberosum* com PVY) congelado (a -80°C) e fresco realizou-se procedimentos de extração de RNA de ambos os materiais (FIGURA 16), que esboça o resultado da extração de RNA de folhas congeladas de batata infectadas

com PVY. A visualização das três bandas do RNA ribossômico evidencia a presença de RNA.

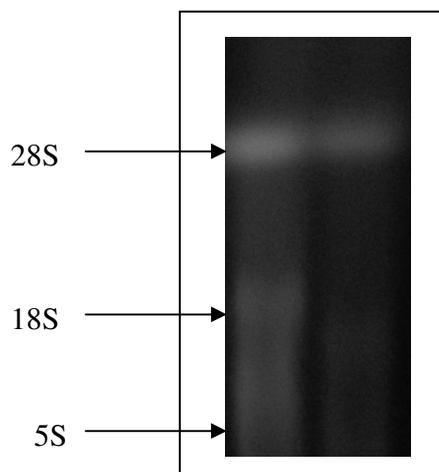


FIGURA 16. Integridade do RNA ribossômico em gel de agarose 1,5% com os fragmentos 5S, 18S e 28S.

Em conformidade, realizaram-se as construções de cDNA para os teste dos *primers* e verificação da eficiência do PCR antes de tentar realizar a imunocaptura das partículas virais. A transcrição reversa foi efetuada utilizando 3,1 mg de RNA total das amostras de material infectado com PVX e PVY e a quantificação do cDNA por espectrofotômetro determinou um rendimento de 3,3mg/mL e $260/280\eta\text{m}=2,007$, determinando que a transcrição ocorreu com sucesso e propiciou uma quantidade suficiente para a realização do PCR.

As reações de PCR semi-quantitativo dos *primers* PVY^N e PVY^O, Potyvirus e PVX foram realizadas e analisadas em gel (FIGURAS 17 e 18), as quais permitiram a detecção e identificação de seqüências da capa protéicas dos vírus em estudo

A diagnose do PVY a partir de folhas de batata congeladas infectadas foi determinada pela presença de produtos de amplificação com os tamanhos esperados. Fragmento de 549pb para o par de *primers* PVY^N, fragmento de 608pb para o par de

primers PVY^O e fragmento de 310pb para o par de *primers* Potyvirus. Por sua vez, a diagnose do PVX a partir de folhas de *D. stramonium* congeladas infectadas foi evidenciada pelo produto de amplificação de 582pb correspondente ao par de *primers* PVX (FIGURA 18).

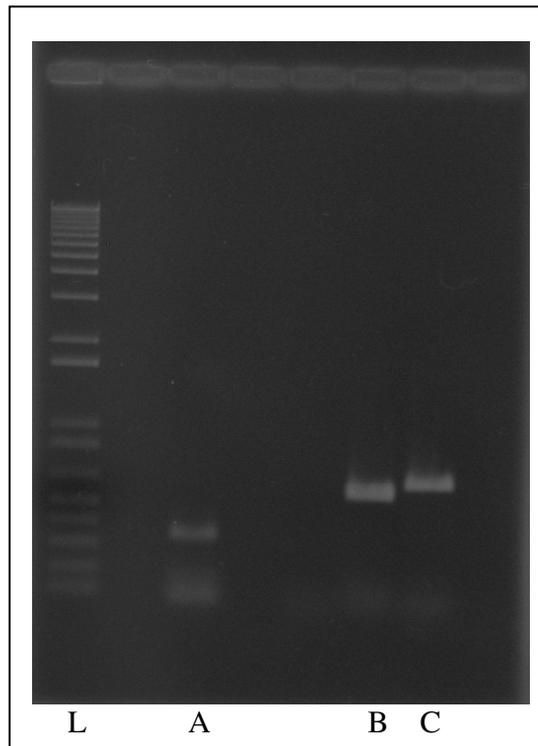


FIGURA 17. Análise do PCR semi-quantitativo do controle 18S e dos primers PVY^N e PVY^O em gel de agarose 1% mostrando os amplificados de 350pb (A), 500pb (B) e 550pb (C), respectivamente. (L) Ladder DNA 1 Kb Plus, Invitrogen.

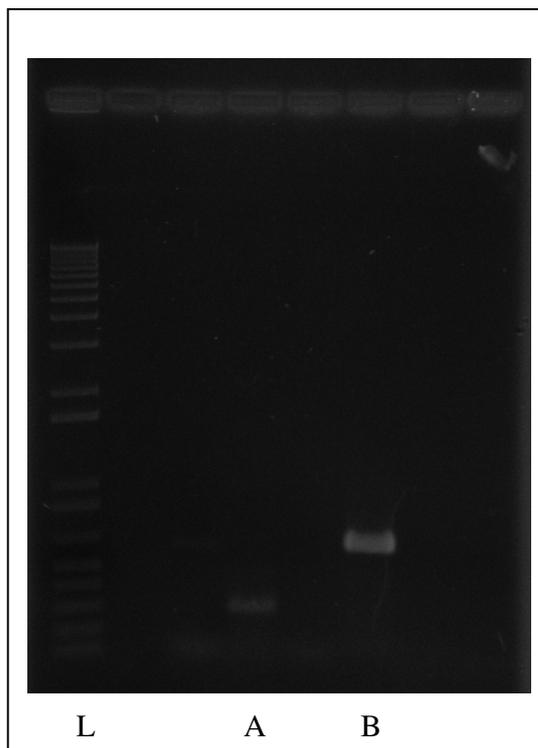


FIGURA. 18. Análise do PCR semi-quantitativo dos primers Potyvirus e PVX em gel de agarose 1% mostrando os amplificados de 310pb (A) e 582pb (B), respectivamente. (L) Ladder DNA 1 Kb Plus, Invitrogen.

A partir disso, sabendo da funcionalidade dos *primers* e da eficiência da extração de RNA a partir dos materiais vegetais, realizamos os testes para vincularmos a imunocaptura com a análise molecular do PCR. Entretanto encontramos vários obstáculos e nas inúmeras tentativas de realizar o IC-RT-PCR não conseguimos resultado positivo em nenhuma delas. Conforme já demonstrado, os resultados de ELISA indireto eram positivos para as amostras testadas e feito separadamente a extração de RNA do material vegetal, construção de cDNA e PCR com *primers* específicos obtivemos resultados positivos de identificação conforme já observado. No entanto, quando tentamos realizar a captura das partículas virais com os soros policlonais e transferir esse conjugado para os tubos para transcrição e PCR, ao invés de potencializarmos o resultado do PCR conforme esperado e observado em trabalhos com

outros vírus como CTV (vírus da tristeza do citrus) e o mosaico da cana-de-açúcar (JIANG *et al.*, 2003), não obtivemos amplificação. Diante dessa problemática tentamos realizar a captura não só em placas de ELISA, mas diretamente em placas de PCR, para evitar possível degradação na passagem do material da placa para os tubos no termociclador. Mais uma vez não obtivemos sucesso. Tentamos utilizar o *kit* de transcrição da Sigma[®] ao invés daquele que estávamos utilizando de forma recorrente (da Impron II - Promega) e também não conseguimos resposta positiva.

Com isso, sabendo-se que de forma separada as técnicas ELISA e PCR apresentaram resultados satisfatórios, e que ao tentar estabelecer o IC-RT-PCR não foi possível chegarmos a resultados condizentes com o esperado, tentando contornar todas as variáveis que de alguma forma poderiam estar influenciando como placa de captura, material infectado congelado e fresco, concentração de soro policlonal (1:100, 1:500, 1:1000 e 1:5000 de diluição) e *kits* de transcrição, podemos inferir que a dificuldade seja intrínseca ao vírus, ao passo que com outros vírus esse teste seja possível. O fato do vírus ser RNA justifica perdas durante o procedimento, mas os resultados positivos dos PCRs realizados sem a imunocaptura, a partir de extrações diretas do material vegetal infectado, inviabiliza este argumento como justificativa. O que pode ocorrer é que a quantidade de partículas virais capturadas pelo soro policlonal não forneça o material genético necessário para que o teste seja viável, ao contrário da quantidade ideal fornecida quando realizamos as extrações de RNA diretamente do material vegetal infectado. No mais, o fato do tamanho das partículas virais dos em estudo serem menores que as partículas dos outros vírus em que o procedimento foi realizado com sucesso, também auxilia na inviabilidade do teste. As partículas em estudo têm 500nm (PVX) e 730nm (PVY) enquanto que o CTV tem 2000nm, corroborando com a dificuldade no estabelecimento do IC-RT-PCR.

4. CONCLUSÃO

Por fim, embora não tenhamos estabelecido o IC-RT-PCR, conseguimos assegurar o estabelecimento de ELISA indireto com soros policlonais específicos e com qualidade igual ou superior aos soros importados do mercado, viabilizando a redução dos custos que tanto dificultam o controle fitossanitário eficiente dos campos de batata e dos lotes de batata semente importados. Além disso, conseguimos estabelecer o diagnóstico molecular através de *primers* específicos para o PVY e PVX, mostrando a eficiência, rapidez e confiabilidade do uso da PCR na identificação e caracterização desses vírus na cultura da batata e no rastreamento da batata-semente, possibilitando futuramente maior perspectiva de controle fitossanitário nos campos de batata.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBA, 2004. Disponível em: <http://www.abbabatatabrasileira.com.br>.
- AGRIANUAL 2005. Batata – 172-178. Editora Agros Comunicação. São Paulo, SP 500p.
- Aleman-Verdaguer, M.E.; Goudou-Urbino C.; Dubern J.; Beachy R. N. & Fauquet. C. 1997. Analysis of the sequence diversity of the P1, HC, P3, NIb and CP genomic regions of several yam mosaic potyvirus isolates: implications for the intraspecies molecular diversity of potyviruses *Jour. Gen. Virol.* 78: 1253-1264.
- Astier, S., Albouy, J., Maury, Y., Lecoq, H. 2001. Principes de virologie végétale: génome, pouvoir pathogène, écologie des virus. Mieux comprendre, 444p. INRA, Paris.
- Barnett, O. W. 1991. Potyviridae, a proposed family of plant viruses. *Arch. Virol* 118: 139-141
- Boonham, N. & Barker, I. 1998. Strain specific recombinant antibodies to potato vírus Y potyvirus. *Journal of Virological Methods* 74: 193-199.
- Boonham, N., Walsh, K., Hims, M., Preston, S., North, J., Barker, I. 2002. Biological and sequence comparisons of *Potato virus Y* isolates associated with potato tuber necrotic ringspot disease. *Plant Pathology* 51: 117-126.
- Boonham, N., Walsh, K., Preston, S., North, J., Smith, P., Barker, I. 2002. The detection of tuber necrotic isolates of Potato virus Y, and the accurate discrimination of PVY(O), PVY(N) and PVY(C) strains using RT-PCR. *J Virol Methods* 102(1-2): 103-12.
- Camargo, W. P. ; Mazzei .1996. Informações econômicas. 26: 53-67.
- Chandelier, A., Dubois, N., Baelen, F., De Leener, F., Warnon, S., Remacle, J., Lepoivre, P. 2001. RT-PCR-ELOSA tests on pooled sample units for the detection of virus Y in potato tubers. *J Virol Methods* 91(2): 99-108.
- 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.* 34: 475-483
- De Bokx, J.A., Huttinga, H. 1981. Potato virus Y. *Commonw. Mycol. Inst. / Asso. Appl. Biology*, Kew, England.
- Dijkstra, J. & Jager, C. 1998. *Practical Plant Virology - Protocols and Exercises*. Ed. Springer.
- Domier, L.L., Shaw, J.G., Rhoads, R.E. 1987. Potyviral proteins share amino acid sequence homology with picorna-, como- and caulimoviral proteins. *Virology* 158: 20-27.
- FAO (2006). <http://www.fao.org>.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Figueira, A.R. 1999. Viroses da Batata: situação atual e perspectivas futuras. Informe Agropecuário 20: 86-96.
- Foster, G.D., Taylor, S.C. (Eds.) Plant Virology Protocols – From Virus Isolation to Transgenic Resistance. Humana Press, New Jersey. 1998. 571p.
- Furumoto, O., Lopes, C.A. Batata-semente. In: Lopes, C.A. e Buso, J.A. (eds) Cultivo da batata (*Solanum tuberosum* L.).Embrapa Hortaliças, p.8-9, 1997.
- Gebre Selassie, K. Variabilité naturelle des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sud-est de la France. Caractérisation et classification en pathotypes. Agronomie, Paris, v.5, n.7, p.621-630, 1985.
- Glais, L., Tribodet, M., Gauthier, J. P., Astier-Manifacier, S., Robaglia, C. and Kerlan, C. 1998. RFLP mapping of the whole genome of ten viral isolates representative of different biological groups of potato virus Y. Arch Virol 143(11): 2077-91.
- Glais, L., Tribodet, M., Kerlan, C. 2002. Genomic variability in Potato Potyvirus Y (PVY): evidence that PVY(N)W and PVY(NTN) variants are single to multiple recombinants between PVY(O) and PVY(N) isolates. Arch Virol 147: 363-78.
- Helguera, P. R.; Taborda, R.; Docampo, D. M., Ducasse, D. A. 2001. Immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction combined with nested PCR greatly increases the detection of Prunus necrotic ring spot vírus in the peach. J Virol Methods 95: 93-100.
- Hema, M.; Kirthi, N.; Sreenivasulu, P., Savithri, H. S. 2003. Development of recombinant coat protein antibody based IC-RT-PCR for detection and discrimination of sugarcane streak mosaic virus isolates from Southern India. Arch Virol 148: 1185-1193.
- Henson, J., French, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annu. Rev. Phytopathol 31: 81-109.
- Hirano, H. Situação atual e perspectivas de produção de batata- semente no Brasil. In:Reunião técnica anual de pesquisa e extensão da cultura da batata na região sul do Brasil,5. 1988. Pelotas, Anais Embrapa CFACT, 1998, p.11-12.
- Hooker, W.J. 1981. Compendium of Potato Diseases, pp. 125. American Phytopathological Society, Saint Paul.
- Inoue-Nagata, A. K., Fonseca, M. E. N., Resende, R. O., Boiteux, L. S., Monte, D. C., Dusi, A. N., Ávila, A. C. de, van der Vlugt, R. A. A. 2002. Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annuum*. Arch Virol 147: 849–855.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Jiang, J. X., Chen, Z. X., Zhou, X. P. 2003. Production of a Monoclonal Antibody to *Sugarcane mosaic virus* and its Application for Virus Detection in China. *J. of Phytopathology* 151 (6): 361-364.
- Jacobi, V.; Bachand, G.D.; Hamelin, R.C., Castello, J.D. 1998. Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamoviruses. *J Virol Methods* 74 (2): 167-178.
- Kagiwada, S., Yamaji, Y., Nakabayashi, H., Ugaki, M., Namba, S. (2002). The complete nucleotide sequence of *Potato virus X* strain OS: the first complete sequence of a Japanese isolate. *J Gen Plant Pathol* 68: 94-98.
- Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. (Org.). *Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas*. 4ª. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres LTDA, 2005, v. 2, 668p.
- Koenig, R.; Luddecke, P., Haeberle, A. M. 1996. Detection of beet necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infections by examining single-strand conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *BioTechniques* 20 (5): 842-846.
- Kundu, K., Rysanek, P. Detection of beet yellows virus by RT-PCR and immunocapture RT-PCR in *Tetragonia expansa* and *Beta vulgaris*. *Acta Virol* 2004 (48-3):177-182.
- Luz, W.C. Revisão Anual de Patologia de Plantas. Vol III. RAPP. RS. 1995. 430p
- Malcuit, I., de Jong, W., Baulcombe, D. C., Shields, D. C., Kavanagh, T. A. 2000. Acquisition of multiple virulence/avirulence determinants by potato virus X (PVX) has occurred through convergent evolution rather than through recombination. *Virus Genes* 20(2): 165-72.
- Marie-Jeanne Tordo, V., Chachulska, A.M., Fakhfakh, H., Le Romancer, M., Robaglia, C., Astier-Manifacier, S. 1995. Sequence polymorphism in the 5'NTR and in the P1 coding region of potato virus Y genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 76: 939-949.
- Marinho, V. L. A. ; Kitajima, E. W. 1989. Método simplificado de purificação de alguns potyvirus *Fitopatol. Bras.* 14 (1): 91-93.
- Matthews, R. 1991. *Plant virology*. Academic Press, San Diego.
- McDonald, J.G., Singh, R.P. 1996. Coat protein and 5' nontranslated region of a variant of Potato virus Y. *American Potato Journal* 73: 317-323.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Moraes, F.H.R. 2003. Caracterização de isolados do vírus Y (“Potato Vírus Y” – PVY) provenientes de batata no Brasil. Tese de doutorado, Universidade Federal de Lavras, 124p.
- Moravec, T., Cerovska, N., Boonham, N. 2003. The detection of recombinant, tuber necrosing isolates of Potato virus Y (PVY(NTN)) using a three-primer PCR based in the coat protein gene. *J Virol Methods* 109(1): 63-8.
- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., S.A.Ghabrial, Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., Summers, M. D. 1995. *Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses*. Springer-Verlag, Wien, New York, Virology Division, International Union of Microbiological Societies.
- Mumford, R.A., Seal S.E. 1997. Rapid single-tube immunocapture RT-PCR for the detection of two yam potyviruses. *J Virol Methods* 69 (1): 73-79.
- Njukeng A.; Atiri G.I., Hughes, J.D.2005. Comparison of TAS-ELISA, dot and tissue blot, ISEM and immunocapture RT-PCR assays for the detection of Yam mosaic virus in yam tissues. *Crop Protection* 24 (6): 513-519.
- Nie, X., Singh, R.P. 2000. Detection of multiple potato viruses using an oligo(dT) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR. *J Virol Methods* 86: 179-85.
- Nie, X., Singh, R. P. 2002. A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of Potato virus Y by uniplex and multiplex RT-PCR. *J Virol Methods* 104(1): 41-54.
- Nie, X., Singh, R. P. 2003. Evolution of North American PVY(NTN) strain Tu 660 from local PVY(N) by mutation rather than recombination. *Virus Genes* 26(1): 39-47.
- Nolasco, G., Blas, C., Torres, V., Ponz, F. 1993. 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.
- Riechmann, J. L.; Lain, S., Garcia, J. A. 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular-biology. *J Gen Virol* 73 (1): 1-16.
- Rigotti, S. and Gugerli, P. 2007. Rapid Identification of potato virus Y strains by one-step triplex RT-PCR. *J Virol Methods* 140: 90-94.
- Reestemam, A.J. Importance of the degree of virus infections for the production of ware potatoes. *Potato Research*, Wageningen, v. 13, p.248-268, 1970.
- Robaglia, C.; Durand-Tardif, M.; Tronchet, M. ; Boudazin, G.; Astier-Manifacier, S., Casse-Delbart, F. 1989. Nucleotide sequence of potato virus Y (N Strain) genomic RNA. *J. Gen. Virol.*, 70:935-947.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rosner, A., Maslenin, L. 1999. Differentiating PVYNTN by unique single-restriction cleavage of PCR products. *Potato Research* 42(2): 215-221.
- Rosner, A., Maslenin, L. 2001. Differentiating PVY(NTN) from PVY(N) by annealing to reference RNA transcripts. *J Virol Methods* 97(1-2): 125-31.
- Salazar, L. F., 1996. *Potato Viruses and Their Control*. Peru: International Potato Center. 214 p.
- Santa Cruz, S., Baulcombe, D. 1995. Analysis of potato virus X coat protein genes in relation to resistance conferred by the genes Nx; Nb and Rx1 of potato. *J Gen Virol* 76(8): 2057-2061
- Schubert, J., Fomitcheva, V., Sztangret-Wisniewska, J. 2007. Differentiation of *Potato virus Y* strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. *J Virol Methods* 140: 66-74.
- Sharman, M.; Thomas, J. E., Dietzgen, R. G. 2000. Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. *J Virol Methods* 89: 75-88.
- Shukla, D. D. et al. .1986. Coat protein of polyviruses .2. amino-acid-sequence of the coat protein of potato virus Y. *Virology* 152: 118-125.
- Shukla, D. D., Strike, P. M., Tracy, S. L., Gough, K. H., Ward, C. W. 1988. The N and C termini of the coat proteins of Potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *Jour. Gen. Virol.* 69:1497-1508.
- Shukla, D. D.; Frankel, M. J.; Ward, C. W. 1991. Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. *Jour. Can. Plant Pathol.* 13: 178-191.
- Shukla, D., Ward, C., Brunt, A. 1994. *The Potyviridae*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Singh, M., Singh, R.P. 1997. Potato virus Y detection: sensitivity of RT-PCR depends on the size of fragment amplified. *Can. J. Plant Pathol.* 19: 149-155.
- Singh, R.P. 1998. Reverse-transcription polymerase chain reaction for the detection of viruses from plants and aphids. *J Virol Methods* 74: 125-38.
- Singh, R.P. 1999. Development of the molecular methods for potato virus and viroid detection and prevention. *Genome* 42: 592-604.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Souza-Dias, J.A.C. 1995. Viroses da batata e suas implicações na produção de batata-semente no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica* 21: 264-266.
- Souza-Dias, J.A.C. 1996. Doenças causadas por vírus em batata. *Informe Agropecuário* 18: 54-63.
- Souza-Dias, J.A.C., Iamauti, M.T. 1997. Doenças da batateira (*Solanum tuberosum* L.). Manual de fitopatologia. Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A. and Rezende, J. A. M. São Paulo, Editora Agronômica Ceres Ltda. 2: Doenças das plantas cultivadas: 137-164.
- Souza-Dias, J. A. C. ; Sawasaki, H.; Okada, M. M. ; Westoffa, L. G . 2004. Potato Virus Y ntn (PVYntn): Confirmada a presença em 5 estados produtores de batata no Brasil. In: XXII Congresso Paulista de Fitopatologia, 2004, Campinas, sp. *Summa Phytopathologica* 30: 99-99.
- Stevenson, W. R., Loria, R., Franc, G. D., Weingartner, D. P. *Compendium of Potato Diseases*. 2ª. Edição. Amer Phytopathological Society, 2005, 106p.
- Tribodet, M., Glais, L., Kerlan, C., Jacquot, E. 2005. Characterization of *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVYN isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *Journal of General Virology* 86: 2101-2105.
- Urcuqui-Inchima, S.; Haenni, A., Bernardi, F.2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Vírus Res.* 74: 157-175.
- Weidemann, H.L. 1988. Importance and control of potato virus Y^N (PVY^N) in seed potato production. *Potato Research* 31: 85-94.
- Weidemann, H. L., Maiss, E. 1996. Detection of the potato tuber necrotic ringspot strain of *Potato virus Y* by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction. *Journal of Plant Disease and Protection* 103: 337-345.
- Weilguny, H., Singh, R. P. 1998. Separation of Slovenian isolates of PVY(NTN) from the North American isolates of PVY(N) by a 3-primer PCR. *J Virol Methods* 71(1): 57-68.
- 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 (1-2): 27-37.

6. ANEXOS



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

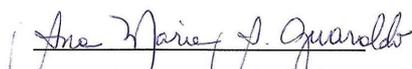
Certificamos que o Protocolo nº 1008-2, sobre "PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA AS ESTIRPES DO VIRUS Y DA BATATA ENCONTRADAS NO ESTADO DE SÃO PAULO E AVALIAÇÃO DA SUA APLICABILIDADE NO DIAGNÓSTICO EM ENSAIOS DE DAS-ELISA E IC-RT-PCR" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado / Marcel Salmeron Lorenzi está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em 24 de abril de 2006.

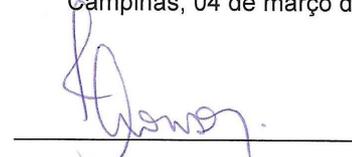
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1008-2, entitled "PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST STRAINS OF POTATO VIRUS Y FOUND IN STATE OF SÃO PAULO AND EVALUATION OF ITS APPLICABILITY IN DAS-ELISA AND IC-RT-PCR ASSAYS", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on April 24, 2006.

Campinas, 04 de março de 2009.

2ª. VIA


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3788-6359
Telefax: (19) 3788-6356
E-mail: ceea@cemib.unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>