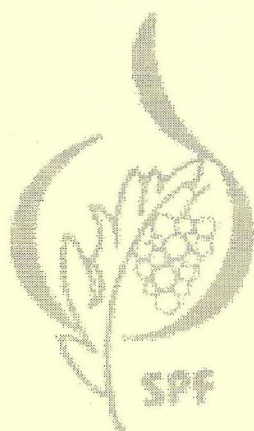


Novos Rumos na Protecção das Plantas

**ACTAS DA 2ª REUNIÃO BIENAL DA
SOCIEDADE PORTUGUESA DE
FITOPATOLOGIA**



**OEIRAS
Estação Agronómica Nacional
24 e 25 de Setembro de 1998**

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ANTISSORO POLICLONAL PARA DETECÇÃO DE ds-RNA

Rodrigues, P.C., Carvalho, M. & Pereira, A.M.N.
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000 Vila Real

ABSTRACT

PRODUCTION AND CHARACTERISATION OF A POLYCLONAL ANTISERUM FOR DETECTION OF ds-RNA

Most plant viruses have single stranded RNA genome (ss-RNA). This nucleic acid presents a double stranded replicative form (ds-RNA) when replicating in plant cells. Healthy plants have no detectable amounts of ds-RNA thus, the presence of ds-RNA is a strong indication of viral infection.

We produced a polyclonal antiserum for a synthetic nucleotide [poly(I):poly(C), double stranded, sterile. Reactivity of the antiserum was characterised by ID-ELISA and titre of the antiserum was determined by agar double diffusion tests.

The usefulness of this antiserum in the detection of viral infection has been tested namely for one grapevine associated leafroll virus (GLRaV-3). Detection of ds-RNA is not a specific diagnostic method. However, it can be useful in sanitary programs when the identity of the pathogen is irrelevant.

Keywords: ds-RNA; clonal selection; serological test.

INTRODUÇÃO

A maioria dos vírus fitopatogénicos contém, no seu genoma, ácido ribonucleico monocatenário (ss-RNA) e apenas uma pequena percentagem tem RNA bicatenário (ds-RNA) (Jones, 1992). O RNA monocatenário tem, no entanto, capacidade de replicação no interior de células vegetais dando origem a uma forma replicativa intermédia de ds-RNA (Valverde *et al.*, 1990). Considerando que plantas saudáveis não contêm quantidades detectáveis de ds-RNA, a sua presença em extractos de plantas é uma forte indicação de infecção viral (Dodds *et al.*, 1984; Boscia, 1993). Assim, o ds-RNA detectado pode ter origem num genoma viral com ds-RNA ou, mais frequentemente, numa forma replicativa de ss-RNA, pelo que, segundo Morris e Dodds (1979), a sua análise se torna um método fiável de indexagem de material vegetal. Teoricamente, só um vírus cujo genoma seja constituído por DNA (que representam menos de 10% dos vírus fitopatogénicos conhecidos) estaria fora das possibilidades desta técnica (Nolasco e Sequeira, 1992).

A detecção de ds-RNA em plantas infectadas é normalmente efectuada através de extracção dos ácidos nucleicos com perclorato de sódio ou fenol-clorofórmio, purificação do ds-RNA por coluna cromatográfica de celulose e sua análise por electroforese em gel de poliacrilamida (Dodds *et al.*, 1984; Valverde *et al.*, 1990; Nolasco e Sequeira, 1992; Carvalho, 1998). Uma vez que este método de detecção requer procedimentos bastante

laboriosos, as técnicas serológicas para detecção de ds-RNA são uma boa alternativa na indexagem de material, quando não é prioritário conhecer a identidade do patógeno (Aramburu e Moreno, 1994). As técnicas serológicas para detecção de ds-RNA baseiam-se na utilização de antissoros mono ou policlonais para polinucleótidos sintéticos, bicatenários.

Neste trabalho produzimos um antissoro policlonal para um polinucleótido sintético [poli(I):poli(C)] para detecção de ds-RNA em material vegetal virótico. A reactividade do antissoro foi testada por ID-ELISA e o título do antissoro determinado por teste de dupla difusão em agar. Avaliou-se o desempenho dos anticorpos produzidos para detecção de ds-RNA em extractos de videira e em ds-RNA purificado de material infectado com GLRaV-3 (vírus do enrolamento foliar da videira, serotipo 3).

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de anticorpos policlonais

Dois coelhos do tipo "Coelho doméstico" foram imunizados com uma proteína sintética bicatenária [poli(I):poli(C), estéril, Pharmacia 27-4729-01], reconstituída a 2mg/ml. Os coelhos foram imunizados por via intramuscular com cinco injeções (com intervalo semanal). As colheitas de sangue, também semanais, iniciaram-se 6 semanas após a primeira imunização e mantiveram-se durante 5 semanas. Os soros obtidos ("antissoro inteiro") foram armazenados em doses de 1ml, a -20°C.

Purificação de IgG

A purificação de IgG, a partir de 1ml de "antissoro inteiro" realizou-se por precipitação com sulfato de amónio. A IgG purificada foi armazenada, na concentração de 1mg/ml (OD_{280nm} = 1,4) a -20°C.

Reactividade do antissoro

A avaliação da reactividade do antissoro (e da IgG) realizou-se por ID-ELISA (adaptado de Aramburu *et al.*, 1991): a placa foi revestida com Poli-L-Lisina (4µg/ml), seguiu-se a adição do antigénio [poli(I):poli(C)] em 9 diluições, bloqueio com PBS-T-4% de leite em pó magro, e adição do "antissoro inteiro" (1/1000) ou da IgG (1/1000). O teste terminou com a adição do conjugado ("goat anti-rabbit" conjugado com fosfatase alcalina - Sigma) e o respectivo substrato (p-nitrofenil fosfato).

Título do antissoro

Foi determinado pelo teste de dupla difusão em agar (1%, Oxoid). No alvéolo central colocou-se a poli(I):poli(C) a 0,5mg/ml (ótima interacção antigénio-anticorpo, previamente determinada) e nos alvéolos periféricos 5 concentrações do antissoro (s/diluição, 1:2, 1:5, 1:10, e 1:30) e um controlo negativo (água destilada).

Extracção e purificação de ds-RNA

Foi utilizado como material infectado varas de videira com GLRaV-3 (Vírus do enrolamento foliar da videira, serotipo 3). O método do fenol-clorofórmio foi usado na extracção dos ácidos nucleicos (Hu *et al.*, 1990). Raspas de varas infectadas (10g) foram pulverizadas em azoto líquido e adicionado 45ml de 2x STE (0,1M NaCl, 0,05M Tris e 0,01M EDTA, pH 6,8) com 15ml de SDS 10%, 0,8ml de bentonite (40mg/mL), 1ml de 2-mercaptoetanol, 25ml de solução de fenol saturada e 0,1ml de NH₄OH. A esta solução adicionou-se 25ml de clorofórmio - álcool isoamílico (24:1) e agitou-se 45 min. à temperatura ambiente. Uma baixa centrifugação permitiu separar os ácidos nucleicos totais da fase orgânica e o sobrenadante foi filtrado em lã de vidro e diluído em STE até volume final de 100ml. Ao extracto obtido adicionou-se, gota a gota, com agitação, etanol a 95% até à concentração de 16,5%. Homogenizou-se, de seguida, com celulose CF11 (2g) e procedeu-se à construção da coluna de cromatografia, seguindo-se lavagem com STE contendo 16,5% de etanol, de forma a arrastar todos os ácidos nucleicos excepto o ds-RNA. Adicionou-se 1mL de STE para baixar a concentração de etanol, drenou-se a celulose e recolheu-se o ds-RNA efectuando 3 lavagens com 3ml de STE. Centrifugou-se o líquido eluído e precipitou-se o ds-RNA com três volumes de etanol a 95% e a -20°C e 0,1 volume de 3,0M acetato de sódio, pH 5,0. Após agitação intensa, incubou-se durante a noite a -20°C e centrifugou-se a 8 000 rpm durante 30 min. Procedeu-se à ressuspensão do precipitado em 0,5mL de STE, seguindo-se nova precipitação com acetato de sódio e etanol. Centrifugou-se 15 min. a 13 000 rpm a 4°C, ressuspendendo-se (1 µl/g) o precipitado em tampão TE (0,04M Tris, 1mM EDTA, pH 7,8).

RESULTADOS

Reactividade do antissoro. O limiar de detecção do polinucleótido sintético com o antissoro policlonal produzido foi de $1,25 \times 10^3$ µg/ml no teste ID-ELISA (Fig.1). Valor idêntico é referido por Zamzinger e Tavantzis (1982). A pouca diferença evidenciada no teste

com "antissoro inteiro" vs IgG sugere uma fraca precipitação de IgG durante o processo de purificação.

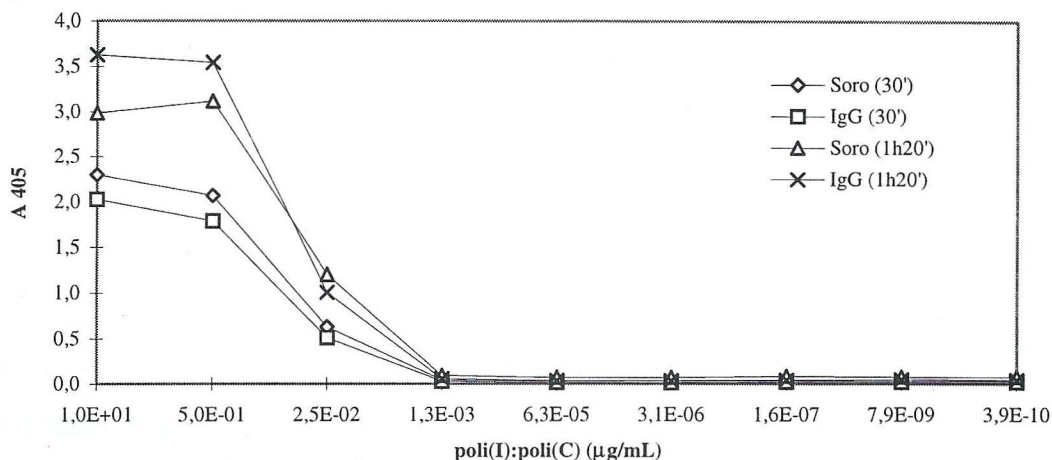


Figura 1 - Limiar de detecção dos anticorpos (antissoro "inteiro" e IgG purificada) produzidos para Poli(I):Poli(C).

Título do antissoro. Pelo teste de dupla difusão em agar e usando a [poli(I). poli(C)] na concentração óptima de 0,5mg/mL [Fig. 2a)], foi determinado o título do antissoro policlonal produzido em 1:10 [Fig. 2b)].

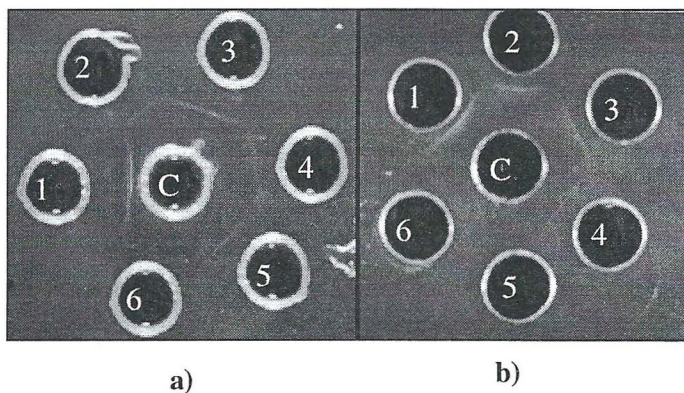


Figura 2 - Teste de dupla difusão em agar: a) alvéolo central: antissoro (sem diluição); alvéolos periféricos - diluições de poli(I):poli(C): 1. 2 mg/mL; 2. 1 mg/mL; 3. 0,5 mg/mL; 4. 0,25 mg/mL; 5. 0,125 mg/mL; 6. água destilada; b) alvéolo central - poli(I):poli(C) (0,5 mg/mL); alvéolos periféricos - diluições de antissoro: 1. sem diluição; 2. 1:2; 3. 1:5; 4. 1:10; 5. 1:30; 6. água destilada.

Deteção de ds-RNA em extractos aquosos e em ds-RNA purificado. A Fig. 3 ilustra a deteção por ID-ELISA de ds-RNA viral em amostras de videira infectadas com GLRaV-3, tanto a partir de extractos aquosos como de ds-RNA purificado das mesmas varas.

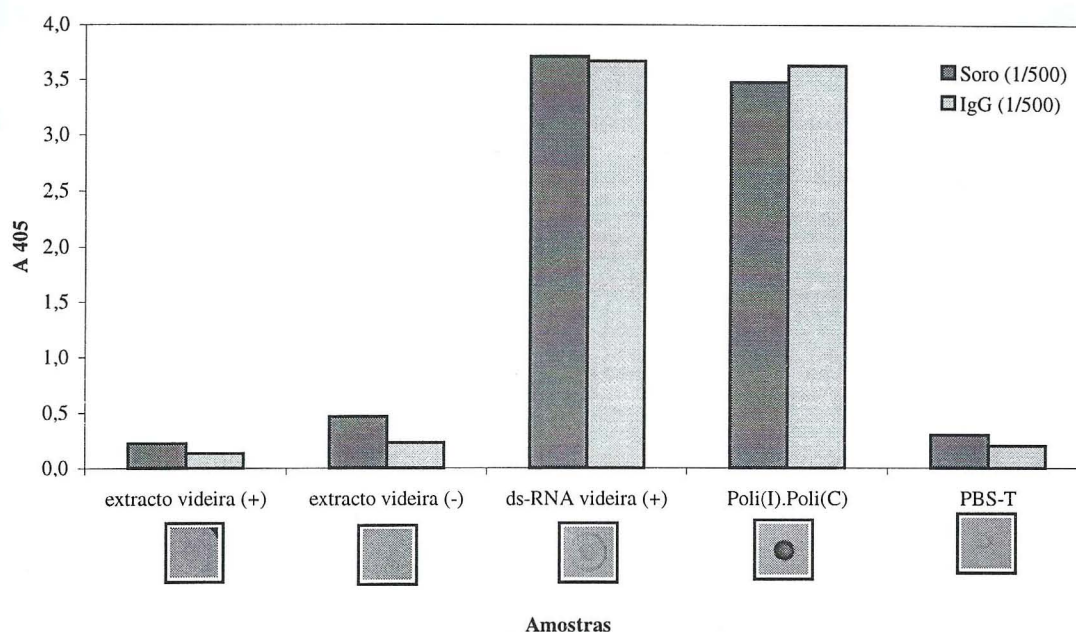


Figura 3 - Avaliação do desempenho dos anticorpos produzidos para poli(I):poli(C) em extractos aquosos de videira 1:5 (p/v) e em ds-RNA purificado a partir de 5 g de material vegetal por alvéolo. Teste ELISA-indirecto em placa (gráfico) e ELISA-indirecto em membrana (na base do gráfico; a cada quadrícula corresponde o mesmo antigénio que foi usado para o teste em placa).

Não foi possível a detecção de ds-RNA a partir de extractos aquosos, visto os valores de A405nm para as amostras positivas serem semelhantes aos das amostras negativas, o que confirma resultados já previamente referidos (Carvalho e Pereira, 1997, Carvalho, 1998). Com a amostra de ds-RNA purificado dos extractos aquosos, obteve-se no entanto reacção fortemente positiva e muito próxima dos obtidos na reacção homóloga [para poli(I):poli(C)], o que evidencia a elevada capacidade de reacção do antissoro produzido.

DISCUSSÃO

Após cinco imunizações durante cinco semanas, num total de 10mg de [poli(I):poli(C)] houve uma boa resposta imunológica, iniciada 3 semanas após a última imunização e que atingiu o máximo 5 semanas após a última imunização, decrescendo desde então (resultados não apresentados, *in* Rodrigues, 1998). O polinucleótido bicatenário sintético utilizado foi mais imunogénico do que idêntico produto de outra firma comercial (Carvalho, 1998).

O antissoro policlonal produzido para o polinucleótido bicatenário sintético [poli(I):poli(C)] apresenta elevada reactividade para o antigénio homólogo e detecta eficientemente ds-RNA purificado de material lenhoso infectado com GLRaV-3. No entanto, a detecção de ds-RNA a partir de extractos aquosos de videira não deu resultados satisfatórios. Duas grandes limitações estão associadas aos extractos aquosos de videira para

detecção de ds-RNA: baixa concentração na planta da forma replicativa de GLRaV-3 e forte influência dos compostos fenólicos e polissacáridos.

Apesar de não ser um diagnóstico específico, a detecção de RNA bicatenário a partir de extractos (purificados) de ácidos nucleicos poderá desempenhar um papel importante em programas de selecção sanitária (prospecção de viroses) quando a identificação do patogénio é irrelevante.

AGRADECIMENTOS

À Secção de Parasitologia e Higiene Animal e à Secção de Clínicas Veterinárias da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro pelas condições e apoio na manutenção dos coelhos para produção dos soros. Parte deste trabalho foi executado no âmbito dos projectos PAMAF 2045 e PAMAF 2076. M. Carvalho beneficiou de uma bolsa PMRH/BM/4621.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aramburu, J. e Moreno, P. 1994. Detection of double-stranded RNA (dsRNA) in crude extracts of virus-infected plants by Indirect ELISA. *J. Phytopathology*, 141: 375-385.
- Aramburu, J., Navas-Castillo, J., Moreno, P. e Cambra, M. 1991. Detection of double-stranded RNA by ELISA and dot immunobinding assay using an antiserum to synthetic polynucleotides. *Journal of Virological Methods*, 33: 1-11.
- Boscia, D. 1993. Isolation and analysis of double-stranded RNAs. pp. 217-218 In *Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis*. Ed. Martelli, G. P., Rome.
- Carvalho, M. 1998. O vírus do enrolamento foliar da videira, serotipo 3 (GLRaV-3)-Produção de antissoros e caracterização. Dissertação de Mestrado em Agricultura, Ambiente e Mercados. UTAD, Vila Real, 93 pp.
- Carvalho, M e Pereira, A.-M. N. 1997. Serological detection of double-stranded RNA from grapevine viruses. pp. 99-100 In 12th ICGV Meeting, Lisbon, 28 Sept. to 4 Oct.,.
- Dodds, J. A., Morris, T. J. e Jordan, R. L. 1984. Plant viral double-stranded RNA. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 22: 151-168.
- Hu, J., Gonsalves, D. e Teliz, D. 1990. Characterization of closterovirus-like particles associated with grapevine leafroll disease. *J. Phytopathology*, 128: 1-14.
- Jones, A. 1992. Application of double-stranded RNA analysis of plant to detect viruses, virus-like agents, virus satellites and subgenomical viral RNAs. pp.115-128 In *Techniques for the rapid detection of plant pathogens*. Ed. J. M. Duncan & Torrance. Blackwell Scientific Publications.
- Morris, J. e Dodds, J. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissues. *Phytophology*, 69: 854-858.
- Nolasco, G. e Sequeira, O. 1992. A pesquisa de RNA bicatenário (ds-RNA) aplicada ao diagnóstico viral. *Ciência Biológica* (aceite para publicação).
- Rodrigues, P. 1998. Produção e caracterização de um antissoro policlonal para detecção de ds-RNA. Relatório Final de estágio da Licenciatura em Engenharia Agrícola. UTAD, Vila Real, 59pp.
- Valverde, R., Nameth, S. e Jordan, R. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease*, 74: 255-258.
- Zamzinger, D. e Tavantzis, S. 1982. Detection of double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Phytopathology*, 72: 268.