

**Detecção de *Odontoglossum ringspot virus* em orquídeas
por Imunocaptura-RT-PCR com anticorpos policlonais
produzidos contra proteína capsidial recombinante**

THAIS MIYAI

Dissertação (Mestrado) apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan / IPT, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Biotecnologia).

São Paulo
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Detecção de *Odontoglossum ringspot virus* em orquídeas
por Imunocaptura-RT-PCR com anticorpos policlonais
produzidos contra proteína capsidial recombinante**

THAIS MIYAI

Dissertação (Mestrado) apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan / IPT, para
obtenção do Título de Mestre.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Ricardo Harakava

São Paulo
2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidade em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan,
IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidata: Thais Miyai

Dissertação: Detecção de *Odontoglossum ringspot virus* em orquídeas por Imunocaptura-RT-PCR com anticorpos policlonais produzidos contra proteína capsidial recombinante.

Orientador: Dr. Ricardo Harakava

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a...../...../....., considerou

() Aprovada

() Reprovada

Examinador (a) Assinatura.....
Nome.....
Instituição

Examinador (a) Assinatura.....
Nome.....
Instituição

Presidente Assinatura.....
Nome.....
Instituição

A Deus

Aos meus queridos pais

Mário e Heico

Aos Meus irmãos

Alex e Denis

Ao companheiro de sempre

Fábio

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

Ao Dr. Ricardo Harakava pela oportunidade, orientação, confiança e aprendizado.

Aos meus amados pais Mário e Heico, pelo apoio, paciência, incentivo e ensinamentos durante toda minha vida.

Aos meus irmãos Alex e Denis, pela paciência e carinho de sempre.

Ao querido amigo e companheiro Fábio Hiroshi Kuba, pelo amor, incentivo, paciência e apoio sempre.

À Instituição Religiosa Perfect Liberty por seus preciosos ensinamentos, sem os quais não conseguiria seguir em frente.

Ao Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

À Dra. Sylvia Dias Guzzo, pela amizade, apoio e auxílio.

À Dra. Vera Cecília Annes Ferreira e à PqC Alice Akime Ikuno, pela amizade e pela produção do antissoro utilizado neste trabalho.

À Ms. Milena Apetito Akamatsu pelo grande auxílio na fase inicial desse trabalho.

À grande amiga Milena, pela convivência, amizade desde a graduação, ensinamentos e auxílio inestimável.

À querida Tia Miyoko, pelo apoio, incentivo e exemplo profissional.

Ao Dr. César Martins Chagas por ter me orientado durante a iniciação científica, pela amizade e carinho.

Às amigas Clarice e Letícia pela amizade, paciência e auxílio constante.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica, Chasta, Cleusa, Celso, Cláudia e Alice pelo incentivo e carinho.

Aos funcionários da biblioteca do ICB/USP pelas correções e atenção, às secretárias do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Eliane em especial, pelo incansável trabalho e atenção com os alunos do curso.

"O que prevemos raramente ocorre;
o que menos esperamos geralmente
acontece."

Benjamin Disraeli

RESUMO

MIYAI, T. Detecção de *Odontoglossum ringspot virus* em orquídeas por Imunocaptura-RT-PCR com anticorpos policlonais produzidos contra proteína capsidial recombinante. 2006. 69. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

As orquídeas apresentam uma imensa variabilidade de cores, formas e tamanho de flores e folhas, que as tornam de grande interesse econômico. São utilizadas para fins ornamentais, seja sob a forma de flor-de-corte ou planta envasada, sendo produzidas no mundo todo.

A intensificação do comércio internacional dessa ornamental foi acompanhada de um aumento na ocorrência de problemas fitossanitários. Dentre estes se destacam as viroses, que são disseminadas principalmente através de propagação vegetativa e instrumentos de poda. Dos vírus que infectam orquídeas o *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) é o que ocorre com maior frequência, causando depreciação das plantas e inviabilizando sua comercialização.

Devido à importância econômica das orquídeas para o país e a alta incidência de viroses que ocorrem nessa cultura, percebe-se a necessidade de estudos e de métodos práticos e rápidos para a detecção e diagnose desses patógenos.

O presente projeto teve como objetivos produzir anticorpos policlonais contra proteína capsidial recombinante e, empregando os mesmos, detectar a presença de ORSV em tecidos de orquídeas infectadas através da técnica de IC-RT-PCR (Immunocapture-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction).

O gene da proteína capsidial de ORSV (ORSV-CP) foi clonado em vetor de expressão pQE-30 (QIAGEN) e a proteína expressa em *Escherichia coli* M15 [pREP4], através de indução por diferentes concentrações de IPTG e em diferentes temperaturas. Foi possível verificar através de SDS-PAGE e Western-blot com

anticorpo anti-6xHis, a presença da proteína ORSV-CP em lisado de cultura de bacteriana induzida. Esta foi purificada em coluna de níquel-agarose e inoculada em camundongos para produção de anticorpos policlonais. Os anticorpos produzidos foram utilizados para aplicação da técnica de IC-RT-PCR em tecidos de orquídeas infectadas. Esta técnica permitiu detectar com grande sensibilidade a presença de ORSV em orquídeas, até mesmo em plantas infectadas porém assintomáticas.

Palavras chave: *Odontoglossum ringspot virus*, orquídea, vírus de plantas, proteínas recombinantes, diagnóstico, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

MIYAI, T. **Detection of *Odontoglossum ringspot virus* in orchids by Immunocapture-RT-PCR with antibodies produced against recombinant capsid protein. 2006. 69** Dissertation (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006

Orchids present a huge variability in colors, forms, and size of flowers and leaves that make them of great economical value. They are used for ornamental purposes, either as cut flowers or as potted plants, being produced throughout the world.

Intensification of the international trade of this ornamental has also increased the occurrence of phytosanitary problems. Among these viral diseases are prominent, being disseminated mainly by vegetative propagation and pruning instruments. Among the viruses that infect orchids, *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) is the most frequent one, causing depreciation of plant and hampering its commercialization.

The economical importance of orchids to Brazil and the high incidence of viral diseases that occur in this ornamental make investigation of these pathogens and the development of fast and reliable diagnostic tests high priorities.

The present study aimed the development of polyclonal antibodies against recombinant ORSV capsid protein and, employing these, to detect the presence of ORSV in infected orchid tissues using IC-RT-PCR (Immunocapture-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction).

The ORSV capsid protein (ORSV-CP) gene was cloned in the expression vector pQE-30 (QIAGEN) and expressed in *Escherichia coli* M15 [pREP4], by induction with different IPTG concentrations and incubation at different temperatures. The presence of the ORSV-CP was detected in bacterial culture lysates by SDS-

PAGE and Western-blot using anti-6xHis antibody. The protein was purified using nickel-agarose column and inoculated in mice for the development of polyclonal antibodies. The antibodies were employed in IC-RT-PCR tests of infected orchids tissues. This technique allowed detection of the virus with great sensitivity, even in infected but symptomless plants.

Keywords: *Odontoglossum ringspot virus*, orchid, plant viruses, recombinant proteins, diagnosis, *Escherichia coli*.

LISTA DE FIGURAS

Figura1	A – Micrografia eletrônica de partícula do <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV). B – Modelo da partícula de TMV.....	23
Figura2:	Micrografias eletrônicas de tecidos de orquídeas infectados por ORSV.....	24
Figura 3:	Folhas e flor de orquídeas. A – Folha de orquídea sadia; B – Folha de orquídea infectada por ORSV apresentando anéis cloróticos; C e D – Folha de orquídea infectada por ORSV apresentando anéis necróticos; E – Flor de orquídea infectada por ORSV apresentando anéis cloróticos; F – Folha de orquídea infectada por ORSV apresentando necrose..	25
Figura 4:	Vetor de clonagem pGEM-T Easy com múltiplos sítios de clonagem	34
Figura 5:	Vetor de expressão procariótico pQE-30	38
Figura 6:	Esquema de purificação da proteína fusionada à etiqueta de 6 histidinas (6xHis-tagged) através de cromatografia de afinidade metálica.	42
Figura 7:	A – Eletroforese em gel de agarose 1,5 % do gene ORSV-CP amplificado por PCR. B – Eletroforese em gel de agarose 1,5 % do gene ORSV-CP clonado no vetor pGEM-T Easy.....	47
Figura 8:	A – Eletroforese em gel de agarose 1,5 % da PCR de colônias de <i>E. coli</i> DH5 α transformadas com o gene ORSV-CP em vetor pQE-30. B – Eletroforese em gel de agarose 1,5 % da PCR de colônias de <i>E. coli</i> M15 transformadas com o gene ORSV-CP em vetor pQE-30	48
Figura 9:	Análise da expressão da proteína ORSV-CP por <i>E. coli</i> M15, através de eletroforese em gel de poliácridamida 12 %.....	49
Figura 10:	Análise da expressão da proteína ORSV-CP por <i>E. coli</i> M15, induzida com IPTG 1 mM, a 37 °C por 4 h, através de Western-blotting com anticorpo anti-6xHis.....	50
Figura 11:	Análise da expressão da proteína ORSV-CP por <i>E. coli</i> M15, induzida com 0,25 mM de IPTG, a 30 °C, “overnight”, através de Western-blotting com anticorpo anti-6xHis.	51
Figura 12:	Eletroforese em gel de poliácridamida 12 % das frações da purificação da proteína recombinante ORSV-CP por cromatografia de afinidade metálica	52
Figura 13:	Dot-blot das sangrias de camundongos inoculados com a proteína ORSV-CP	53

Figura 14	Western-blot de extratos foliares de folhas de orquídeas infectadas incubadas com anti-ORSV-CP.	54
Figura 15	Eletroforese em gel de agarose 1,5 % de produto de IC-RT-PCR de orquídeas infectadas por ORSV.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Estirpes de <i>E. coli</i>	34
Tabela 2:	Valores de absorvância (A405) obtidos em teste de ELISA utilizando antissoros diluídos 1:800, anti-ORSV-CP e AS-ORSV (Zettler)	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Orquídeas.....	21
2.2	Vírus de plantas.....	22
2.3	Viroses em orquídeas.....	22
2.4	Gênero <i>Tobamovirus</i>	23
2.5	<i>Odontoglossum ringspot virus</i> (ORSV).....	23
2.6	Métodos diagnósticos de viroses em orquídeas.....	26
2.7	Expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	28
2.8	Proteínas capsidiais (CP)	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Material vegetal e fonte de vírus.....	31
3.2	Microrganismos utilizados	32
3.3	Meios de cultivo.....	32
3.4	Amplificação por PCR do gene ORSV-CP	32
3.5	Clonagem do gene ORSV-CP em vetor pGEM-T Easy.....	34
3.6	Transformação em células de <i>E. coli</i> eletrocompetentes	35
3.7	Seqüenciamento do gene ORSV-CP.....	37
3.8	Sub-clonagem do gene ORSV-CP em vetor de expressão pQE-30.....	37
3.9	Expressão e purificação da proteína ORSV-CP	40
3.9.1	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida	41
3.9.2	Western-blot.....	41
3.10	Otimização do processo de síntese protéica	41

3.11	Purificação da proteína ORSV-CP através de cromatografia de afinidade metálica	41
3.12	Produção de anticorpos policlonais contra a proteína ORSV-CP	42
3.13	Verificação da presença de anticorpos policlonais através de Dot-blot	43
3.14	Detecção de ORSV por ELISA em tecidos de orquídeas infectadas.....	43
3.15	Detecção de ORSV por Western-blot em tecidos de orquídeas infectadas	43
3.16	Detecção de ORSV por RT-PCR em tecidos de orquídeas infectadas	44
3.17	Detecção de ORSV por Imunocaptura-RT-PCR em tecidos de orquídeas infectadas	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	Amplificação por PCR do gene ORSV-CP e clonagem no vetor pGEM-T Easy.....	47
4.2	Sub-clonagem do gene ORSV-CP em vetor de expressão pQE-30.....	48
4.3	Expressão e purificação da proteína ORSV-CP	49
4.4	Verificação da presença de anticorpos policlonais através de Dot-blot	52
4.5	Detecção de ORSV por ELISA em tecidos de orquídeas infectadas.....	53
4.6	Detecção de ORSV por Western-blot em tecidos de orquídeas infectada	54
4.7	Detecção de ORSV por RT-PCR em tecidos de orquídeas infectadas.	55
4.8	Detecção de ORSV por Imunocaptura-RT-PCR em tecidos de orquídeas infectadas	55
5	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As orquídeas pertencem à família Orchidaceae que, em termos de espécie, é considerada como a mais numerosa do reino vegetal. Esse elevado número de espécies e híbridos resulta numa imensa variabilidade de cores, formas e tamanho de flores e folhas, que as tornam de grande interesse econômico. São utilizadas para fins ornamentais, seja sob a forma de flor-de-corte ou planta envasada, sendo produzidas no mundo todo.

Algumas espécies de orquídeas vêm sendo intensamente comercializadas mundialmente, assim, houve uma necessidade de se aumentar a produção para suprir a demanda do mercado. A intensificação do comércio internacional e do movimento de plantas entre diferentes regiões do mundo foi acompanhada de um aumento na ocorrência de problemas fitossanitários.

Dentre estes se destacam as viroses, que são disseminadas principalmente através da propagação vegetativa dos germoplasmas e por instrumentos de poda. Dos vírus que infectam orquídeas o *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) é o que ocorre com maior frequência, causando depreciação das plantas inviabilizando sua comercialização. Em estudo realizado por Freitas (1996) verificou-se que o ORSV, juntamente com o *Cymbidium mosaic virus*, ocorrem em orquídeas no estado de São Paulo com incidência em torno de 10%.

Considerando as orquídeas um produto de elevada importância econômica para o país e a alta incidência de viroses, percebe-se a necessidade de estudos e de métodos práticos e rápidos para a detecção e diagnose desses patógenos.

Desses métodos empregados, os mais comumente utilizados são: indexação em plantas hospedeiras, contrastação negativa de extrato foliar seguida de

observação em microscópio eletrônico de transmissão e técnicas serológicas, como ELISA (enzyme linked immunoassay).

O método de indexação de plantas hospedeiras apresenta uma grande dificuldade de obtenção e manutenção das plantas, além disso, um diagnóstico através dessa metodologia demora cerca de 30 dias para apresentar resultados conclusivos.

A contrastação negativa de extrato foliar é uma técnica de preparação rápida para observação em microscópio eletrônico, onde o resultado pode ser obtido em 15 minutos, porém, permite classificar o patógeno somente em termos de família, uma vez que é possível observar apenas sua morfologia e dimensão. Além disso, a confiabilidade no diagnóstico, através de microscopia eletrônica, fica comprometida se a concentração de partículas virais na planta for muito reduzida.

O ELISA é um teste muito sensível, pois utiliza anticorpos para a detecção do patógeno, mas é um método que apresenta certas limitações como, por exemplo, a necessidade de antissoro específico. Existem à venda kits comerciais de ELISA para o diagnóstico de ORSV, entretanto são importados e de alto custo.

Além dessas, existem ainda outras técnicas, mais sensíveis, que podem ser aplicadas para a detecção de viroses em tecidos vegetais, como a RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) e a IC-RT-PCR (Immunocapture-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction). Apesar desta última fornecer resultados mais acurados, não é muito utilizada por ser necessário o emprego de antissoro específico para sua aplicação.

Antissoros específicos podem ser produzidos utilizando-se como antígeno imunizante partículas virais purificadas a partir de plantas infectadas. Entretanto, os métodos de purificação são de difícil execução e sempre existe o risco de

componentes da planta ainda estarem presentes ao final do processo, resultando em antissoro que reage com os mesmos. Este problema pode ser contornado através da expressão de proteínas virais em sistemas procarióticos, seguida de purificação de acordo com a “etiqueta” presente na proteína de fusão. Etiquetas de poli-histidinas e GST (glutathione S-transferase) são as mais freqüentemente utilizadas e permitem purificação através de métodos cromatográficos simples e eficientes.

A RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) e a PCR são técnicas moleculares atualmente muito utilizadas para a detecção de vírus de RNA e DNA, respectivamente. São metodologias muito sensíveis e confiáveis. Contudo, para RT-PCR, o tempo gasto para a extração do RNA é um fator limitante, além do cuidado que se deve ter para evitar contaminação no momento da extração.

Imunocaptura-RT-PCR (IC-RT-PCR) combina os métodos ELISA e RT-PCR, e consiste em utilizar anticorpo específico para “capturar” partículas virais do extrato da planta infectada. A combinação destas duas técnicas elimina a necessidade de se purificar ácidos nucleicos a partir da planta, o que, particularmente para as orquídeas que apresentam tecidos mucilaginosos, é um fator que dificulta a aplicação de RT-PCR em sua forma tradicional.

A expressão da proteína capsial do ORSV em *Escherichia coli*, permite a produção de anticorpos policlonais específicos em camundongos, os quais podem ser empregados em testes de ELISA para detecção deste vírus, em substituição aos kits importados atualmente utilizados. Estes anticorpos possibilitam, também, o desenvolvimento de um método de IC-RT-PCR, resultando em um teste de fácil execução, com alta especificidade e sensibilidade.

Os anticorpos também têm aplicabilidade em estudos básicos de morfogênese viral, através de métodos de imunomicroscopia eletrônica que permitem a detecção e localização específica de macromoléculas da ultraestrutura celular (GHOSHROY E CITOVSKY, 1998).

O presente projeto teve como objetivos produzir anticorpos policlonais contra proteína capsidial recombinante e, empregando os mesmos, detectar a presença de ORSV em tecidos de orquídeas infectadas através da técnica de IC-RT-PCR.

Para isso foram necessárias as seguintes etapas:

- Expressar a proteína capsidial do ORSV em *Escherichia coli*.
- Produzir anticorpos policlonais específicos para esta proteína através da imunização de camundongos.
- Empregar este anticorpo para o desenvolvimento de método de Imunocaptura-RT-PCR para a detecção do ORSV em plantas infectadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Orquídeas

As orquídeas pertencem à família Orchidaceae, uma das grandes famílias de angiospermas, sendo encontradas em todo o mundo, embora o maior número de espécies e gêneros ocorra nas regiões tropicais, onde predominam as formas epífitas e rupícolas, e nas demais regiões predominam as formas terrestres (JOLY, 1998).

Dentre os gêneros nativos do Brasil destacam-se *Cattleya*, *Laelia*, *Miltonia*, *Stanhopea* e *Oncidium*, que possuem elevado valor econômico (SILVA, 1986), pois apresentam uma grande aceitação no mercado nacional e internacional.

A exportação de produtos da floricultura brasileira, em termos de valor, está crescendo anualmente desde 2001 (KIYUNA et al., 2005a). No primeiro trimestre de 2005, o valor das exportações cresceu 23 %, em relação ao mesmo período do ano anterior, segundo dados da SECEX (Secretaria de Comércio Exterior). Este setor apresentou um crescimento de 122 % até 2005, atingindo US\$ 6,6 milhões no trimestre, tendo como referência o valor exportado no primeiro trimestre de 2000 (referencia).

Assim, o que percebemos é o crescimento que vem ocorrendo neste setor agrícola, em termos de exportação. Entretanto, a manutenção deste bom desempenho no mercado mundial requer um adequado controle dos problemas fitossanitários a fim de evitar a imposição de barreiras pelos países para os quais se está exportando. Dentre os problemas fitossanitários que ocorrem em ornamentais destacam-se as viroses.

2.2 Vírus de plantas

De acordo com Matthews (1991) vírus é um conjunto formado por uma ou mais moléculas de ácido nucléico, normalmente envolto por uma capa protetora de proteína ou lipoproteína. O ácido nucléico é capaz de organizar sua própria replicação somente no interior das células hospedeiras. Dentro dessas células a produção do vírus depende do sistema de síntese de proteínas do hospedeiro e é organizada a partir de materiais existentes na própria célula hospedeira.

Apesar dos vírus de plantas terem sido descobertos no início do século XX, algumas anomalias de plantas, que posteriormente foram constatadas como sendo de origem viral, são conhecidas há muito mais tempo. Um exemplo clássico são as flores variegadas de tulipas que eram muito valorizadas na Europa no século XVII. Alguns agricultores descobriram que esta característica, que era transmitida por enxertia, aumentava consideravelmente o valor comercial do produto. Em 1926, essa variação das flores de tulipa foi associada definitivamente a partículas virais (BEDENDO, 1995).

A grande maioria dos fitovírus estudados até hoje possuem o genoma composto por RNA. Os genomas dos vírus de planta são pequenos, geralmente variando de 4 a 15 kb, codificando de 4 a 12 proteínas (DRUGEON et al., 1999).

2.3 Viroses em orquídeas

Segundo Lawson e Hsu (1995), existem cerca de 27 espécies de vírus que infectam orquídeas. Dos vírus que foram descritos mundialmente, no Brasil foram relatados somente o *Cucumber mosaic virus* (CMV), alguns vírus da família *Rhabdoviridae*, o *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) e o *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) (RIVAS et al., 1998).

Desses, o ORSV e o CymMV são os que ocorrem com maior frequência e são considerados de maior importância no mundo. Entretanto, outros vírus também

podem causar danos à cultura de orquídeas, como algumas espécies do gênero *Potyvirus*, o *Vanilla mosaic virus* – VanMV, que causa severos danos a produções comerciais de *Vanilla* na Polinésia Francesa (Wisler et al., 1987) e o *Dendrobium mosaic virus* – DeMV, observado no Havaí (Hu et al., 1995).

2.4 Gênero *Tobamovirus*

A espécie tipo do gênero *Tobamovirus* é o *Tobacco mosaic virus* (TMV). Os vírus desse gênero apresentam-se na forma de cilindros rígidos alongados, com aproximadamente 18 nm de diâmetro e 300 - 310 nm de comprimento, com uma cavidade central e simetria helicoidal (LEWANDOWSKI, 2000) (Figura 1).

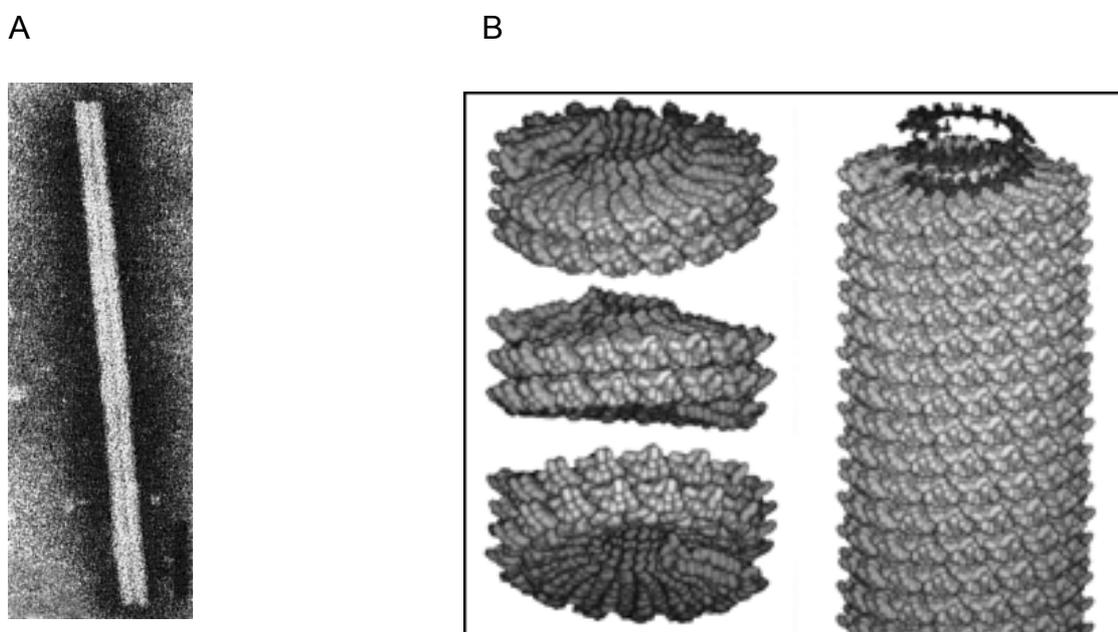


Figura 1: A – Micrografia eletrônica de partícula do *Tobacco mosaic virus* (TMV). (www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=151&figno=08). B – Modelo da partícula de TMV. (www.bio.fsu.edu/faculty-caspar.php).

2.5 *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV)

O ORSV foi detectado pela primeira vez em plantas de *Odontoglossum grande*. São vírus alongados pertencentes ao gênero *Tobamovirus*, apresentando partícula rígida medindo aproximadamente 300 x 18 nm (JENSEN e GOLD, 1951), um dos vírus de maior incidência e importância econômica no mundo (ZETTLER et

al. 1990; WONG et al., 1994; LAWSON e HSU, 1995; RYU e PARK, 1995a), (Figura 2).

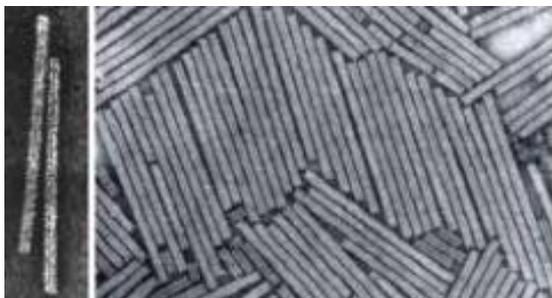


Figura 2: Micrografias eletrônicas de tecidos de orquídeas infectados por ORSV. <http://www.rib.okayama-u.ac.jp/pmi/2003/html/Cymbidium.htm>.

O ORSV é encontrado em altas concentrações em tecidos de plantas infectadas devido à grande estabilidade e facilidade de transmissão através de práticas culturais (LAWSON e BRANNIGAN 1986; KOBAYASHI e KANEMOTO, 1989). É um vírus disseminado por transmissão mecânica, pois não existem relatos de vetor natural para este (HU et al., 1998), e existem indicações de que não seja transmitido através de sementes de plantas infectadas (JENSEN 1951; ZETTLER et al., 1987).

Os sintomas causados por esse vírus aparecem principalmente nas folhas, apresentam-se na forma de anéis cloróticos (Figura 3B) e anéis e pontos necróticos (Figura 3C, D e F). Os sintomas nas flores não são muito comuns. Os tipos de lesões causados por esse patógeno variam entre as espécies de orquídeas. (ZETTLER et al., 1990).

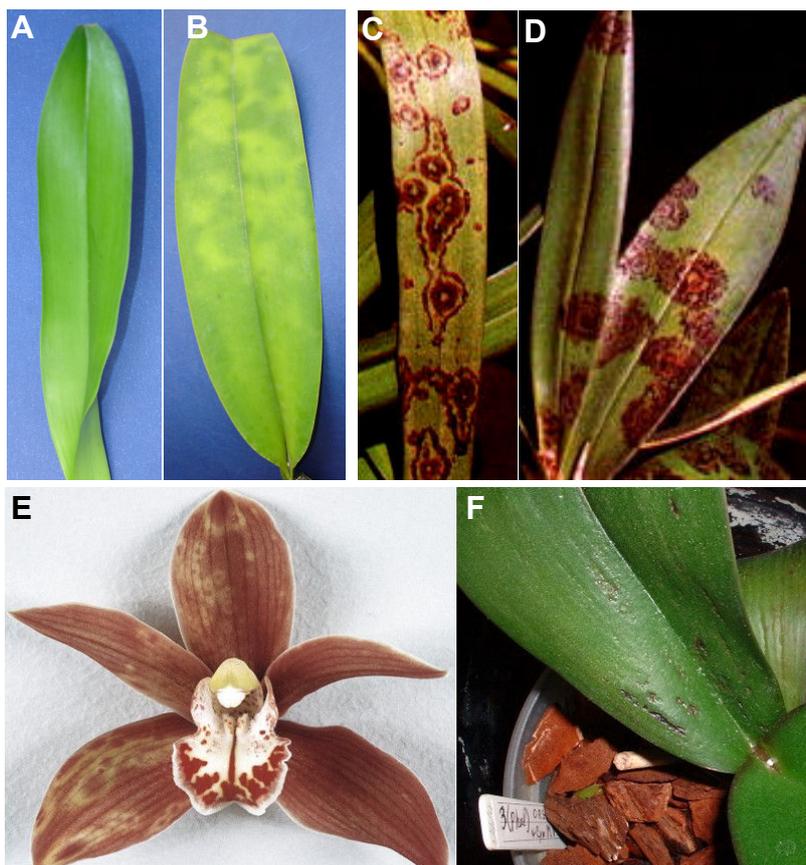


Figura 3: Folhas e flor de orquídeas apresentando sintomas de ORSV. A – Folha de orquídea sadia; B – Folha de orquídea infectada por ORSV apresentando anéis cloróticos; C e D – Folha de orquídea infectada por ORSV apresentando anéis necróticos; E – Flor de orquídea infectada por ORSV apresentando anéis cloróticos; F – Folha de orquídea infectada por ORSV apresentando necrose. www.ont.co.za/virus_diseases.htm (C - cymbidium e D - dendrobium) www.pocketdiagnostic.com/products/ornament/rs/Orchid.html (E - cattleya e F - phalenopsis).

A estabilidade do ORSV, a existência de hospedeiros sem sintomas e o freqüente manuseio das plantas durante a colheita, dificultam o controle desse vírus (ZETTLER et al., 1990).

Muitas orquídeas são propagadas vegetativamente por métodos de cultura de tecidos. Entretanto é muito importante certificar-se de que a planta matriz está livre de vírus antes da multiplicação. Algumas orquídeas infectadas por ORSV não apresentam sintomas foliares ou florais (ZETTLER et al., 1990). Este fato pode causar a escolha dessas plantas infectadas como plantas saudáveis para propagação somática.

Quando plantas assintomáticas contendo uma quantidade muito pequena de vírus foram usadas como amostra, o ORSV foi detectado com sucesso usando a RT-PCR. É possível usar essa técnica para detectar infecções por ORSV em plantas de orquídeas matrizes antes da propagação, assim como para um grande número de bulbos de plantas em escala comercial (RYU e PARK, 1995b).

O genoma do ORSV é constituído por uma molécula de RNA fita simples senso positivo (BRUNT et al., 1996), que foi completamente seqüenciado, apresentando aproximadamente 6,6 kb. O seu RNA codifica pelo menos 4 proteínas. As proteínas de 126 kDa/183 kDa (RNA polimerase dependente de RNA – RdRp) estão envolvidas na replicação de RNA viral. A proteína de movimento (MP) de 33 kDa é necessária para o movimento célula a célula e a proteína capsidial de 18 kDa está envolvida na montagem das partículas virais e no movimento de longa distância dentro da planta (RYU e PARK, 1995a).

Os membros do gênero *Tobamovirus* geralmente apresentam amplo círculo de hospedeiras, dificultando o seu controle. Entretanto, as espécies hospedeiras naturais para o ORSV estão limitadas à família Orchidaceae (RYU e PARK, 1995a).

2.6 Métodos diagnósticos de viroses em orquídeas

Devido à importância em se diagnosticar a ocorrência de viroses em orquídeas cultivadas de maneira rápida e eficiente, ao longo dos anos foram desenvolvidas muitas técnicas para a detecção de ORSV (EUN et al., 2000).

Entre estas, os ensaios biológicos foram amplamente utilizados durante muitos anos para a indexação desse vírus, empregando-se *Chenopodium amaranticolor* e *Gomphrena globosa* como plantas indicadoras (ZETTLER et al., 1990). Aproximadamente sete dias após a inoculação do vírus nas plantas indicadoras, estas podem apresentar sintomas de necroses nas folhas, indicando a presença do patógeno.

A imunomicroscopia eletrônica vem sendo utilizada em estudos da distribuição subcelular das proteínas virais de movimento célula a célula (VAN LENT et al., 1990; ATKINS et al., 1991; DING et al., 1992; ALMON et al., 1997), da proteína do capsídeo (OPARKA et al., 1996), assim como das partículas virais (LARTEY et al., 1997). Entretanto, a aplicação das técnicas de microscopia eletrônica tem suas limitações, pois dependem muito da concentração viral na planta. Além disso, existe a questão financeira, pois um microscópio eletrônico e todo o aporte, incluindo um técnico especializado e os equipamentos que são necessários para sua utilização, apresentam um custo muito elevado.

O teste de ELISA, que se baseia no emprego de anticorpos mono ou policlonais específicos ao vírus, apresenta grande sensibilidade e é particularmente útil para analisar um grande número de plantas, pois o preparo da amostra é relativamente simples (VEJARATPMOL et al., 1998; BARRY, et al., 1996; VAN REGENMORTEL e BURCKARD, 1980). Kits de ELISA para a detecção do ORSV estão disponíveis comercialmente (Agdia, DZMS, LOEWE), porém são importados e de elevado custo.

RT-PCR e PCR são técnicas populares para a detecção e identificação de RNA e DNA, respectivamente, de vírus de plantas. Estas técnicas são extremamente sensíveis, seus custos vêm declinando continuamente e são relativamente de fácil execução. No caso de vírus de RNA, uma fita de DNA complementar (cDNA) ao RNA do vírus é feita com a transcriptase reversa (RT). Posteriormente, primers flanqueando parte do genoma do vírus são estendidos por uma DNA polimerase termoestável em uma série de desnaturações e extensões que irão aumentar exponencialmente o DNA alvo (WEBSTER et al., 2004).

Ryu e Park (1995b) desenvolveram metodologia de RT-PCR para a detecção de ORSV em orquídeas. Park et al. (1998), ao empregarem técnicas de ELISA e RT-PCR para detecção de ORSV, demonstraram que a segunda é mais rápida, confiável e apresenta maior sensibilidade que o método ELISA. Segundo Jeong et al. (2001) a metodologia de RT-PCR estabelecida no experimento que realizaram com ORSV leva a um rápido diagnóstico desse vírus.

A IC-RT-PCR e IC-PCR combinam a captura de vírus por anticorpo específico com amplificação posterior por RT-PCR ou PCR, respectivamente. Neste método, o vírus é capturado por anticorpo que foi adsorvido à superfície interna de um microtubo plástico e as proteínas capsidiais são removidas posteriormente por calor, liberando os ácidos nucléicos. Estes são, então, amplificados via RT-PCR empregando-se primers específicos. Este método é especialmente útil para concentrar partículas virais de espécies de plantas onde o título é muito baixo, ou onde compostos que inibem a PCR estão presentes (WEBSTER et al., 2004). IC-PCR é 10 a 100 vezes mais sensível que o ELISA (BARRY et al. 1996). A IC-RT-PCR apresenta alta especificidade, pois combina os poderes discriminatórios dos anticorpos e dos primers empregados. Em razão de não requerer a purificação de ácidos nucléicos das amostras, IC-RT-PCR é uma metodologia que pode ser mais facilmente aplicada quando a quantidade de amostras é elevada.

2.7 Expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*

Para a produção de anticorpos específicos é necessária a obtenção de antígeno puro. Uma das estratégias para se obter esse antígeno, livre de contaminantes que possam comprometer a qualidade do anticorpo, é a produção da proteína em sistema heterólogo.

Entre os muitos sistemas disponíveis de produção heteróloga de proteínas, a bactéria Gram-negativa *E. coli* continua como uma das mais atrativas, devido à sua habilidade de crescer rapidamente e em alta densidade em substratos baratos, sua genética bem caracterizada e a disponibilidade cada vez maior de vetores de clonagem e de estirpes hospedeiras mutantes. Entretanto, não há garantias de que um produto gênico recombinante irá se acumular em *E. coli* em nível elevado, completo e biologicamente ativo. Esforços consideráveis têm sido direcionados para

umentar o desempenho e a versatilidade desse microrganismo (SCHUMANN e FERREIRA, 2004). As inúmeras vantagens da utilização de *E. coli* têm assegurado o uso contínuo desse importante organismo na produção de alto nível de expressão de proteínas recombinantes (GOLD, 1990; HODGSON, 1993; MARINO, 1989; NICAUD et al., 1986; OLINS e LEE, 1993; SHATZMAN, 1995).

Inicialmente, o gene a ser expresso é clonado em plasmídeos que atingem alto número de cópias na célula bacteriana. Em condições de laboratório, estes plasmídeos são distribuídos aleatoriamente durante a divisão celular e, na ausência de pressão seletiva, são perdidos em baixa frequência. A maioria dos plasmídeos possui marcas de seleção de resistência a antibióticos, estes são adicionados ao meio de cultivo para eliminar células que não contenham o plasmídeo. Alguns vetores de clonagem são desenvolvidos para conter genes ou repressores que causem a morte das células que não contenham o gene recombinante (Baneyx, 1999).

A produção de proteínas recombinantes envolve a clonagem do gene em um vetor de expressão sob o controle de um promotor induzível. Entretanto, a produção da proteína recombinante depende de uma variedade de fatores como a regulação da expressão gênica, a conformação correta da proteína e as características do crescimento celular (SCHUMANN e FERREIRA, 2004).

Um dos mecanismos utilizados para o controle da expressão gênica em vetores procarióticos é o sistema lac que consiste em uma região promotora/operadora que precede o operon lac e o repressor lacI codificado pelo gene lacI. Na ausência de um indutor, o repressor lac se liga ao seu operador situado imediatamente após o promotor (SCHUMANN e FERREIRA, 2004). O

repressor do *lacI* é inativado pela adição de IPTG (análogo à lactose). Este composto se liga ao repressor ativo do *lacI* e causa dissociação deste de seu operador. O IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo indutor do *operon lac* de *E. coli*) apresenta duas vantagens em relação à lactose: primeiro não depende da *lac* permease (passa pela membrana interna por difusão) e, segundo, não pode ser clivado pela β -galactosidase evitando o término da transcrição. (SCHUMANN e FERREIRA, 2004).

2.8 Proteínas capsidiais (CP)

As proteínas capsidiais (CPs) dos vírus de plantas são vagamente definidas com base em sua habilidade de formar estruturas ordenadas que encapsidam o ácido nucléico viral. Entretanto, a CP tem função em praticamente todos os aspectos da multiplicação e disseminação viral, incluindo assistência na replicação do ácido nucléico, movimentos entre células, e transporte de plantas infectadas para não-infectadas através de vetores biológicos. No constante conflito entre hospedeiro e parasita, as plantas desenvolveram mecanismos para reconhecer as CPs virais como elicitores do maquinário de defesa do hospedeiro (CALLAWAY, et al., 2001).

Para a grande maioria dos vírus de plantas, a proteína capsidial é a única proteína com propriedades imunogênicas, assim um antissoro produzido a partir da proteína livre apresentará as mesmas propriedades daquele produzido a partir de partículas virais purificadas (BARBIERI et al., 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Instituto Biológico de São Paulo – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios.

A estratégia adotada para o desenvolvimento deste trabalho foi obter, a partir de RNA total (RNAt) extraído de tecidos de orquídeas infectadas, o gene da proteína capsidial de ORSV (ORSV-CP), o qual foi clonado em vetor de expressão, para a síntese da proteína adicionada de uma etiqueta de poli-histidina (6xHis-tag) expressa em células de *E. coli*.

A adição do 6xHis-tag na porção N-terminal da proteína, foi realizada para permitir a purificação desta através de cromatografia de afinidade metálica. Uma vez purificada, a proteína foi inoculada em camundongos para a produção do anticorpo policlonal, e este utilizado na aplicação de técnica de IC-RT-PCR, para detecção de ORSV em tecidos de orquídeas.

3.1 Material vegetal e fonte de vírus

Foram utilizadas plantas de orquídeas sadias e naturalmente infectadas pelo ORSV, mantidas em casa de vegetação do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo.

Um clone de *E. coli* contendo fragmento correspondendo a cerca de 750 pb próximo à extremidade 3' do genoma do ORSV, em vetor pGEM-T Easy, foi utilizado para a obtenção do gene da CP. Este clone foi produzido no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, a partir de material vegetal de orquídea sintomática recebido de produtor da região de Arujá, SP.

3.2 Microrganismos utilizados

As diferentes linhagens de *E. coli* utilizadas neste trabalho estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1- Estirpes de *E. coli*.

Estirpes	Genótipo/Fenótipo
DH5 α	F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 phoA
M15(pREP4)	F- Nal ^S Str ^S Rif ^S Thi ⁻ Lac ⁻ Ara ⁺ Gal ⁺ Mtl ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺ (Knr/lacIq)

3.3 Meios de cultivo

Todas as linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB Broth, Fisher Scientific) adicionado de antibiótico de acordo com a seleção necessária para cada etapa.

3.4 Amplificação por PCR do gene ORSV-CP

Através da técnica de PCR amplificou-se o gene ORSV-CP, a partir de um fragmento de cDNA que continha parte do gene da proteína de movimento e todo o gene da proteína capsidial de ORSV, utilizando-se os primers ORSV-F e ORSV-R, adicionados de sítios para enzimas de restrição *Bam* HI e *Sst* I. Esses primers utilizados foram desenhados a partir de seqüências depositadas no Genbank.

ORSV-F 5' - GGA TCC TCT TAC ACT ATT ACA GAC- 3'

Bam HI

ORSV-R 5' - GAG CTC TTA GGA AGA GGT CCA - 3'

Sst I

Para a amplificação via PCR utilizou-se as seguintes concentrações dos reagentes:

cDNA	1,0 µL
Tampão Taq DNA polimerase 10 X	2,0 µL
Primer senso (forward) 10 mM	100 nM
Primer antisenso (reverse) 10 mM	100 nM
MgCl ₂	2,5 mM
dNTP	100 µM
Taq DNA polimerase (Invitrogen)	1,25 U

O volume da reação de amplificação foi completado para 20 µL com água deionizada estéril.

A PCR foi conduzida em termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer) e as temperaturas e tempos de incubação utilizados foram:

94 °C	2 min	
94 °C	15 s	} 35 ciclos
52 °C	30 s	
72 °C	50 s	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

A presença do produto de amplificação foi em seguida verificada através de eletroforese em gel de agarose 1,5 % em tampão TAE pH 8,3 (Tris/Ácido acético 40 mM/EDTA 1 mM) (Anexo ??), evidenciada com brometo de etídio e visualizada em fotodocumentador AlphaImager TM 1220 Documentations & Analysis System acoplado a um computador.

A banda específica de aproximadamente 480 pb correspondente ao gene da proteína capsidial de ORSV foi excisada do gel e purificada empregando-se o kit “Perfectprep Gel Clean Up” (Eppendorf).

3.5 Clonagem do gene ORSV-CP em vetor pGEM-T Easy

O gene ORSV-CP foi clonado em vetor pGEM-T Easy com o emprego do kit “pGEM-T Easy Vector System I” (Promega) (Figura 4).

Para a ligação do produto de PCR no vetor pGEM-T Easy utilizou-se as seguintes quantidades dos reagentes:

Tampão de ligação 2X	5,0 µL
Produto de PCR purificado	3,5 µL
Vetor pGEM-T Easy (50 ng/µL)	0,5 µL
T4 DNA ligase	3 U

O volume total da ligação foi de 10 µL.

A ligação foi conduzida a 4 °C por aproximadamente 16h.

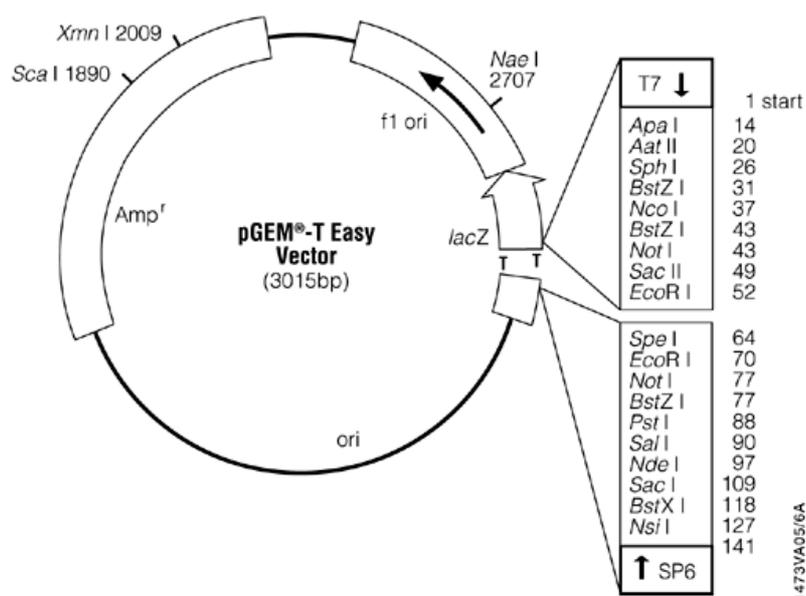


Figura 4: Vetor de clonagem pGEM-T Easy com múltiplos sítios de clonagem. Amp – gene de resistência a ampicilina; Ori – origem de replicação; Lac Z – operon Lac.

3.6 Transformação em células de *E. coli* eletrocompetentes

O produto da ligação foi precipitado com 1 μ L de acetato de sódio 3 M e 22 μ L de etanol 96 % a -80 °C. Após 1 hora centrifugou-se a amostra por 30 minutos a 13.000 g a 4 °C. Em seguida, o sedimento foi lavado com etanol 70 % e secado à vácuo por 5 minutos. O sedimento foi então ressuscitado em 2 μ L de água deionizada estéril e misturado no gelo à 20 μ L de células de *E. coli* DH5 α eletrocompetentes, preparadas como descrito por Sambrook e Russel (2001). As células de *E. coli* foram transformadas com o produto da reação de ligação utilizando-se um eletroporador com pulso de 0,247 kv (Cell-Porator *E. coli* Pulser, Life Technologies). Após a transformação, as células foram misturadas a 1 mL de meio de cultivo líquido LB.

As células transformadas foram incubadas para multiplicação em câmara a 37 °C, sob agitação. Após 1 hora de incubação, 100 μ L da suspensão bacteriana foram plaqueadas em LB-ágar contendo ampicilina 100 μ g/mL, 5 μ L de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoilo- β -D-galactopiranosídeo, substrato para a enzima β -galactosidase) e 50 μ L de IPTG. As culturas foram incubadas a 37 °C por aproximadamente 16 horas. A adição de antibiótico ao meio de cultivo permite o crescimento apenas de células bacterianas que possuem o vetor pGEM-T Easy. As células que apresentaram o plasmídeo desprovido do inserto desejado puderam ser diferenciadas pela coloração azul das colônias, resultante da ação da enzima β -galactosidase sobre o substrato X-Gal.

Após o período de cultivo algumas colônias brancas foram repicadas para uma nova placa de LB contendo ampicilina 100 μ g/mL e a confirmação da clonagem foi feita através de PCR dessas colônias selecionadas, utilizando-se os primers T7 e SP6, que flanqueiam o sítio de clonagem do vetor pGEM-T Easy.

T7 5' -TAATACGACTCACTATAGGG- 3'

SP6 5' -ATTTAGGTGACACTATAGAAT- 3'

Para a amplificação via PCR utilizou-se as seguintes quantidades dos reagentes:

Vetor	1,0 μ L
Tampão <i>Taq</i> DNA polimerase 10 X	2,0 μ L
<i>Primer</i> T7 10 mM	0,2 μ L
<i>Primer</i> SP6 10 mM	0,2 μ L
MgCl ₂ 50 mM	1,0 μ L
dNTP 10 mM	0,2 μ L
<i>Taq</i> DNA polimerase (Invitrogen)	1,25 U

O volume da reação de amplificação foi completado para 20 μ L com água deionizada estéril.

A PCR foi conduzida em termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer) e as temperaturas e tempos de incubação utilizados foram:

94 °C	2 min	
94 °C	15 s	} 35 ciclos
52 °C	30 s	
72 °C	50 s	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

Os produtos dessa reação foram visualizados por eletroforese, em gel de agarose 1,5 %, como descrito anteriormente.

Os clones transformados foram cultivados por 16 horas em meio LB, a 37 °C sob agitação e os plasmídeos foram extraídos através de minipreparação com o kit "Perfectprep Plasmid Mini" (Eppendorf).

Os clones positivos foram armazenados à – 80 °C, em glicerol 50 %.

3.7 Seqüenciamento do gene ORSV-CP

Para confirmar que não ocorreu introdução de mutações durante a amplificação do gene foi feito o seqüenciamento dos clones selecionados utilizando-se o kit “Big Dye Terminator” (Applied Biosystems). Para a reação de seqüenciamento foram utilizados os seguintes volumes dos reagentes:

pGEM-T Easy + ORSV-CP (~250 ng/μL)	2,0 μL
“Big Dye Terminator”	4,0 μL
Primer 10 mM	0,5μL

O volume da reação foi completado para 10 μL com água deionizada estéril.

A mistura de reagentes foi feita com os iniciadores T7 e SP6 separadamente.

O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador de DNA automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems).

Através do programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), as seqüências nucleotídicas obtidas foram comparadas com as depositadas no GenBank.

3.8 Sub-clonagem do gene ORSV-CP em vetor de expressão pQE-30

O gene ORSV-CP foi sub-clonado do vetor pGEM-T Easy para o vetor de expressão procariótico pQE-30 (QIAGEN) (Figura 5), através dos sítios de restrição *Bam* HI e *Sst* I.



Figura 5: Vetor de expressão procariótico pQE-30. PT5 – promotor de bacteriófago T5; *lac O* – operador *lac*; RBS – sítio de ligação do ribossomo; ATG – códon de iniciação de transcrição; 6xHis – etiqueta de 6 histidinas; MCS – múltiplos sítios de clonagem; Stop códon – códon de terminação; Ampicillin – gene que confere resistência a ampicilina; Col E1 – origem de replicação.

Para a liberação dos insertos do gene ORSV-CP presentes no vetor pGEM-T Easy utilizou-se os seguintes volumes dos reagentes:

Tampão React 3 10X	2,0 μ L
<i>Bam</i> HI	0,5 μ L
<i>Sst</i> I	0,5 μ L
Vetor pGEM-T Easy + ORSV-CP	0,5 μ L

O volume da reação para a digestão enzimática foi completado com água deionizada estéril para 20 μ L.

A reação foi conduzida em termociclador por 2 horas a 37 °C, seguindo-se a inativação das enzimas a 65 °C por 20 minutos.

O vetor pQE-30 (aproximadamente 200 ng) foi linearizado utilizando-se as mesmas enzimas e sob as mesmas condições utilizadas para o vetor pGEM-T Easy.

Os produtos da digestão foram separados por eletroforese, em gel de agarose 1,5 % como descrito anteriormente. As bandas correspondentes ao vetor pQE-30 linearizado e ao gene ORSV-CP foram retiradas do gel e purificadas utilizando-se o kit "Perfectprep Gel Clean Up" (Eppendorf).

Para a ligação do produto de PCR no vetor pQE-30 utilizou-se as seguintes quantidades dos reagentes:

Tampão de ligação 2X	5,0 µL
Produto de digestão purificado	3,5 µL
Vetor QE-30 linearizado	0,5 µL
T4 DNA ligase	3 U

O volume total da ligação foi de 10 µL.

A reação de ligação foi conduzida em termociclador a 16 °C por aproximadamente 16h.

Os produtos da ligação foram inseridos em células de *E. coli* eletrocompetentes para a multiplicação dos plasmídeos. As colônias transformadas foram crescidas em meio LB-ágar contendo o antibiótico ampicilina (100 µg/mL), para seleção das bactérias portadoras do plasmídeo pQE-30 contendo o gene ORSV-CP.

Para confirmar a clonagem do gene ORSV-CP no vetor pQE-30, foi realizada PCR das colônias de *E. coli* DH5α transformadas, utilizando-se os primers pQE-Foward (pQE-F) e pQE-Reverse (pQE-R) que flanqueiam a região de clonagem do vetor.

pQE-F 5' – CCCGAAAAGTGCCACCTG – 3'

pQE-R 5' – GTTCTGAGGTCATTACTGG – 3'

Os clones transformados de *E. coli* selecionados foram armazenados em glicerol estéril (15 %), a -80 °C.

Os plasmídeos foram extraídos das células de *E. coli* por mini-preparação utilizando o kit “Perfectprep Plasmid Mini” (Eppendorf).

O vetor pQE-30 contendo o gene ORSV-CP foi inserido em *E. coli* linhagem M15 [pREP4] por eletroporação como descrito no item 3.6. As células de *E. coli* transformadas foram cultivadas em meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL) e canamicina (25 µg/mL).

A linhagem de *E. coli* M15 (QIAGEN) é apropriada para a expressão de proteínas recombinantes utilizando o vetor de expressão pQE-30, uma vez que esta estirpe de *E. coli* apresenta um plasmídeo [pREP4] que expressa constitutivamente o repressor *lacI*. Assim, a expressão do gene que vem logo após o promotor T5, é feita se houver adição do indutor IPTG ao meio de cultivo, liberando desse modo o sítio de ligação da RNA polimerase e, conseqüentemente, a síntese protéica (QIAexpress – The Complete System for 6xHis Technology, QIAGEN, 2000).

Para verificar a clonagem da construção pQE-30+ORSV-CP foi realizada PCR das colônias de *E. coli* M15 transformadas, utilizando-se os primers ORSV-F e ORSV-R.

3.9 Expressão e purificação da proteína ORSV-CP

A produção da proteína ORSV-CP por *E. coli* M15 [pREP4] foi inicialmente induzida através da adição de IPTG ao meio de cultivo na concentração final de 1 mM e incubação a 37 °C por 4 h. A detecção da proteína recombinante foi realizada através de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Western-blot, com o emprego de anticorpo anti-6xHis (Amersham Pharmacia) que reconhece a etiqueta de 6 histidinas fusionada à proteína.

3.9.1 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

A cultura de células bacterianas induzidas pelo IPTG e o controle negativo (cultura sem o indutor) foram sedimentados. Estes sedimentos obtidos foram ressuspendidos em tampão de amostra (Tris-HCl 0,25 M pH 6,8, SDS 2 %, Glicerol 10 %, β -mercaptoetanol 2 %, azul de bromofenol 0,1 %), e submetidos à eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12%, utilizando equipamento para eletroforese vertical Mini Protean II (Bio-Rad). Foram utilizados os marcadores 10 KDa Protein Ladder (Life Technologies) e Prestained Benchmark (Life Technologies) para SDS-PAGE e Western-blot, respectivamente. Para a eletroforese aplicou-se voltagem 200 V por 40 minutos. Em seguida, o gel de SDS-PAGE foi incubado em solução corante (Comassie Blue G250 0,25 %; Ácido acético 10 %) por 2 horas e descorado em solução descorante (Ácido acético 10%).

3.9.2 Western-blot

As proteínas presentes no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema semi-seco, em equipamento Trans-blot SD (Bio-Rad), aplicando-se 15 V com limite de corrente de 0,23 A por 30 minutos.

Em seguida, a membrana foi incubada em solução bloqueadora (0,2 % leite desnatado em TTBS 1X) a 37 °C. Após 30 minutos, a membrana foi lavada com água deionizada e TTBS 1X, seguida de incubação por 2 horas a 37 °C, com o antissoro anti-6XHis (Amershan-Pharmacia) (AS-anti-6XHis 1:30 000 em 0,05 % BSA em TTBS 1X). Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em água deionizada e TTBS 1X. A seguir a membrana foi incubada com o conjugado (antimouse-fosfatase alcalina, Sigma, 1:30 000 em TTBS 1X + 0,05 % BSA), por um período de 2 horas sob temperatura de 37 °C. Mais uma vez a membrana foi lavada em água deionizada e TTBS 1X. Finalmente a membrana foi revelada em 10 mL de tampão para detecção da fosfatase alcalina (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris 100 mM, pH 9,5) contendo 33 μ L BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, 50 mg/mL) e 66 μ L de NBT (Nitroblue tetrazolium, 75 mg/mL).

3.10 Otimização do processo de síntese protéica

Com o intuito de otimizar a síntese da proteína ORSV-CP, foram utilizadas diferentes concentrações de IPTG (0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM e 2 mM), nas temperaturas de 30 °C e 37 °C, por 4 e 16 horas, a expressão foi verificada por Western-blot, como descrito no item 3.9.2.

3.11 Purificação da proteína ORSV-CP através de cromatografia de afinidade metálica

Após otimização da expressão, a proteína ORSV-CP foi purificada em coluna de níquel-agarose, utilizando-se o kit His-Trap (Amershan-Pharmacia) (Figura 6).

As frações correspondentes às diferentes etapas de purificação da proteína (lisado, filtrado, lavado e eluído), foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

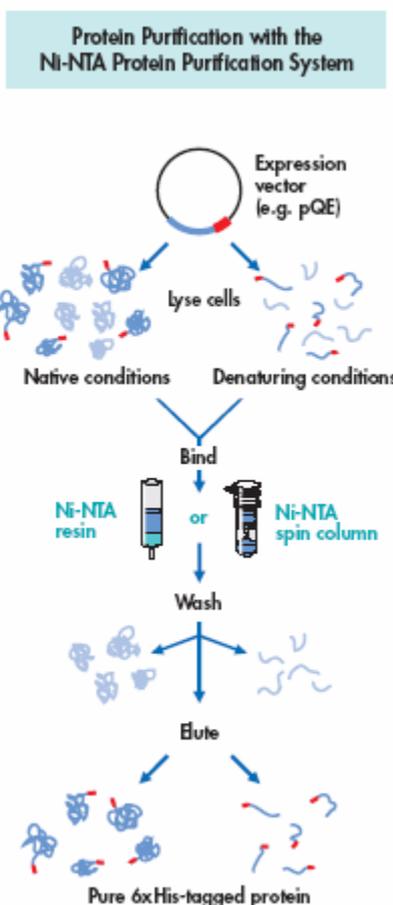


Figura 6: Esquema de purificação da proteína fusionada à etiqueta de 6 histidinas (6xHis-tagged) através de cromatografia de afinidade metálica.

3.12 Produção de anticorpos policlonais contra a proteína ORSV-CP

A proteína ORSV-CP purificada em coluna de níquel-agarose foi submetida a SDS-PAGE. O gel de poliacrilamida foi corado com Coomassie Blue R250 (0,05 % em água) por 30 min e lavado 4x 10 min com água destilada estéril. A banda correspondente à proteína ORSV-CP foi excisada do gel e homogeneizada por

trituração com volume igual de água estéril. Utilizou-se 1 mL desse antígeno para a imunização de cada camundongo Balb/c por inoculação intraperitoneal.

Os animais receberam doses semanais do antígeno, e após a terceira dose, foi feita a sangria para verificação da presença de anticorpos específicos.

3.13 Verificação da presença de anticorpos policlonais através de Dot-blot

Os soros dos camundongos inoculados, obtidos a partir da terceira sangria, foram avaliados por Dot-blot para verificar a presença de anticorpos reativos à proteína ORSV-CP. Para esse teste utilizou-se como antígeno o lisado de *E. coli* induzido com IPTG (Li) e a proteína ORSV-CP purificada (Pp), o controle negativo foi o lisado de *E. coli* não induzido (Ln). Depositou-se 1 μ L de cada antígeno (Li, Pp e Ln) em membrana de nitrocelulose, a qual foi submetida a secagem a 37 °C por 15 minutos. A membrana foi colocada em solução bloqueadora, incubada com antissoro anti-6XHis e com conjugado antimouse-fosfatase alcalina como descrito para Western-blot no item 3.9.2.

3.14 Detecção de ORSV por ELISA em tecidos de orquídeas infectadas

Folhas de orquídeas sintomáticas e assintomáticas foram trituradas em nitrogênio líquido e o pó resultante foi homogeneizado em tampão de cobertura (coating buffer) pH 9,6 (carbonato-bicarbonato 0,05M). O extrato vegetal foi incubado em placas de poliestireno, por 2 horas a 37 °C. Em seguida, a placa foi lavada com água deionizada e PBS-Tween pH 7,4 (Phosphate buffered saline) (NaCl 0,14M; KCl 0,003M, KH₂PO₄ 0,0015M, Na₂HPO₄ 0,004M; Tween-20 0,05%). Após a lavagem fez-se o bloqueio com PBS-Tween + BSA 2 %, por 1 hora a 37 °C. A placa foi novamente lavada com água deionizada e PBS-Tween. Incubou-se então com o antissoro anti-ORSV-CP (1:800) em PBS-Tween + BSA 1%, a 4 °C por cerca de 16 horas. Passado o período de incubação a placa foi lavada e incubada com o conjugado antimouse-fosfatase alcalina, em PBS-Tween + BSA 1 %, por 2 horas a 37 °C. Lavou-se mais uma vez a placa e colocou-se então, p-fenilnitrofosfato (1 mg/mL em tampão NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris 100 mM, pH 9,5). A reação da fosfatase alcalina foi medida em leitor de ELISA Modelo 450 (Bio-Rad), no comprimento de onda de 405 nm, após 40 minutos e 1 hora. Como controle positivo da reação de ELISA, utilizou-se antissoro contra partícula viral (AS-ORSV) produzido por F. W. Zettler (Universidade da Flórida), diluído 1:800 em PBS-Tween + BSA 1%. O antissoro AS-ORSV foi gentilmente cedido pela Dra. Maria Amélia Vaz Alexandre do Laboratório de Virologia Vegetal do Instituto Biológico de São Paulo.

3.15 Detecção de ORSV por Western-blot em tecidos de orquídeas infectadas

A técnica de Western-blot foi aplicada para detecção de ORSV em plantas de orquídeas infectadas. Folhas foram trituradas em almofariz sob nitrogênio líquido e o pó resultante foi ressuspenso em tampão de amostra para SDS-PAGE. Os

extratos foram submetidos à eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida e, posteriormente, transferidos para membrana de nitrocelulose através de eletrotransferência em aparelho do tipo semi-seco “Trans blot SD” (Bio-Rad). A membrana foi incubada com anticorpos anti-ORSV-CP seguidos de anti-camundongo conjugado à fosfatase alcalina. A revelação foi realizada empregando-se os substratos BCIP e NBT como descrito no item 3.9.2.

3.16 Detecção de ORSV por RT-PCR em tecidos de orquídeas infectadas

Para extrair o RNA total das orquídeas infectadas, 0,1 g de tecido foliar foi macerado em nitrogênio líquido até resultar em pó. À esse pó adicionou-se 500 µL de tampão de lavagem (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0, NaCl 2 M, 0,05 % BSA), centrifugando-se em seguida por 10 minutos a 13.000 g. Adicionou-se ao sedimento resultante, 600 µL de tampão CTAB (Cethyltrimethylammonium bromide 2 %, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, 0,5 % de β-mercaptoetanol). Após a incubação da mistura a 55 °C por 30 minutos, acrescentou-se 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Essa mistura foi centrifugada por 10 minutos a 13.000 g. Após a centrifugação, removeu-se a fase aquosa e a esta acrescentou-se 1/10 do volume de acetato de amônio 7,5 M e 1 volume de isopropanol. Incubou-se então à temperatura de -20 °C por 20 minutos. Em seguida centrifugou-se por 10 minutos a 13.000 g. O pellet foi lavado com 1 mL de etanol 70 % e centrifugado por 1 minuto a 13.000 g. Em uma centrífuga à vácuo fez-se a secagem do sedimento de RNA. Este foi então ressuscitado em 20 µL de água deionizada estéril e armazenado a -80 °C.

O RNA extraído foi utilizado como molde para a RT-PCR, a fim de amplificar o gene ORSV-CP. A reação da transcriptase reversa e a PCR foram realizadas logo em seguida utilizando o kit AccessQuick RT-PCR System (Promega), empregando-se os primers ORSV-F e ORSV-R. Para a amplificação via RT-PCR utilizou-se as seguintes quantidades dos reagentes:

RNA	10,00 µL
AccessQuick master mix (2X)	12,5 µL
Primer “forward” 10 mM	0,50 µL
Primer “reverse” 10 mM	0,50 µL
RT/Taq (Promega)	1 U

O volume da reação de amplificação foi completado para 25 µL com água deionizada estéril.

A RT-PCR foi conduzida em termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer) e as temperaturas e tempos de incubação utilizados foram:

48 °C	45 min	
95 °C	2 min	
95 °C	15 s	} 35 ciclos
52 °C	30 s	
72 °C	45 s	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

A presença dos produtos da amplificação foi detectada através de eletroforese em gel de agarose 1,5 % como descrito anteriormente.

3.17 Detecção de ORSV por Imunocaptura-RT-PCR em tecidos de orquídeas infectadas

Em Imunocaptura-RT-PCR, extratos brutos obtidos por trituração de folhas das plantas infectadas em tampão (PBS-Tween), foram depositados em tubos previamente cobertos com anticorpo anti-ORSV-CP (1:500 em tampão de cobertura pH 9,6). Após lavagens com PBS e água deionizada, o ácido nucléico viral foi liberado em 10 µL de água deionizada, através de incubação em altas temperaturas (95 °C / 5 min). A reação da transcriptase reversa e a PCR foram realizadas logo em seguida utilizando o kit AccessQuick RT-PCR System (Promega), empregando-se os primers ORSV-F e ORSV-R.

Para a amplificação via RT-PCR utilizou-se as seguintes quantidades dos reagentes:

AccesQuick master mix (2X)	12,50 µL
Primer "forward" 10 mM	0,50 µL

Primer “reverse” 10 mM 0,50 μ L

RT/Taq 1 U

O volume da reação de amplificação foi completado para 25 μ L com água deionizada estéril.

A RT-PCR foi conduzida em termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer) e as temperaturas e tempos de incubação utilizados foram:

48 °C 45 min

95 °C 2 min

95 °C 15 s

52 °C 30 s

72 °C 45 s

} 35 ciclos

72 °C 7 min

4 °C ∞

A presença dos produtos da amplificação foi detectada através de eletroforese em gel de agarose 1,5 % como descrito anteriormente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Amplificação por PCR do gene ORSV-CP e clonagem no vetor pGEM-T Easy

Aplicando-se a técnica de PCR foi possível amplificar o gene do capsídeo do ORSV, que apresentava cerca de 480 pb (Figura 7A) e estava de acordo com o esperado para esse gene.

Após a clonagem no vetor pGEM-T Easy, a digestão com as enzimas *Bam* HI e *Sst* I permitiu verificar a presença do inserto com o tamanho esperado em gel de agarose 1,5 %, (Figura 7B).

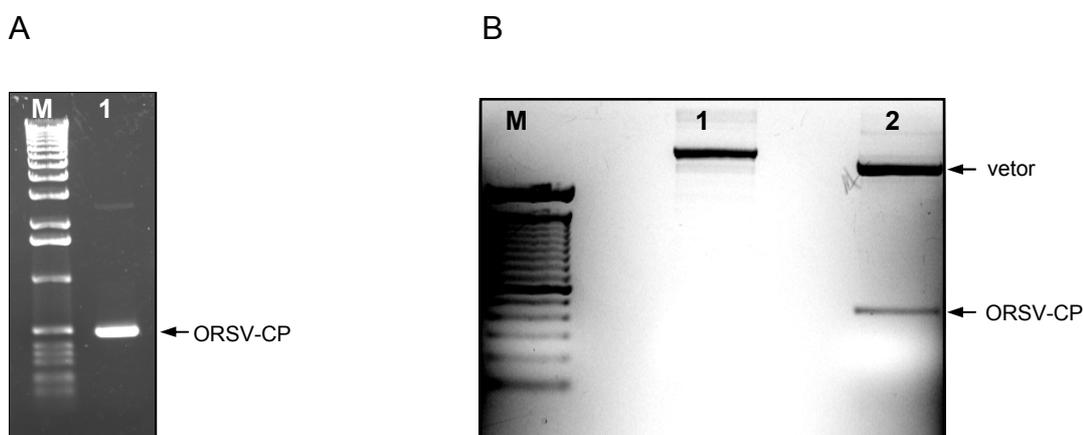


Figura 7: A – Eletroforese em gel de agarose 1,5 % do gene ORSV-CP amplificado por PCR. M – marcador 1kb; 1 – gene ORSV-CP amplificado. B – Eletroforese em gel de agarose 1,5 % do gene ORSV-CP clonado no vetor pGEM-T Easy. M – marcador 100 pb; 1 – plasmídeo não digerido; 2 – plasmídeo digerido com *Bam* HI e *Sst* I.

O seqüenciamento confirmou que o inserto clonado tratava-se do gene ORSV-CP. Análise através do programa BLAST-n, mostrou que a seqüência obtida apresenta níveis de similaridade acima de 97% quando comparada com aquelas de isolados de diferentes partes do globo.

4.2 Sub-clonagem do gene ORSV-CP em vetor de expressão pQE-30

A sub-clonagem do inserto do item anterior no vetor de expressão foi constatada através de PCR das colônias de *E. coli* DH5 α transformadas, utilizando-se os primers pQE-F e pQE-R que flanqueiam o sítio de clonagem do vetor. Após eletroforese em gel de agarose pôde-se observar um fragmento de aproximadamente 650 pb, correspondente ao gene ORSV-CP acrescido de seqüências do vetor (Figura 8A).

O seqüenciamento do gene ORSV-CP clonado no vetor pQE-30 mostrou sua correta inserção, dentro do quadro de leitura apropriado para sua expressão.

A transformação de *E. coli* M15 [pRep4] com o vetor contendo o gene ORSV-CP, foi verificada através de PCR das colônias utilizando os primers pQE-F e pQE-R e observação dos produtos de aproximadamente 650 pb em gel de agarose 1,5 % (Figura 8B).

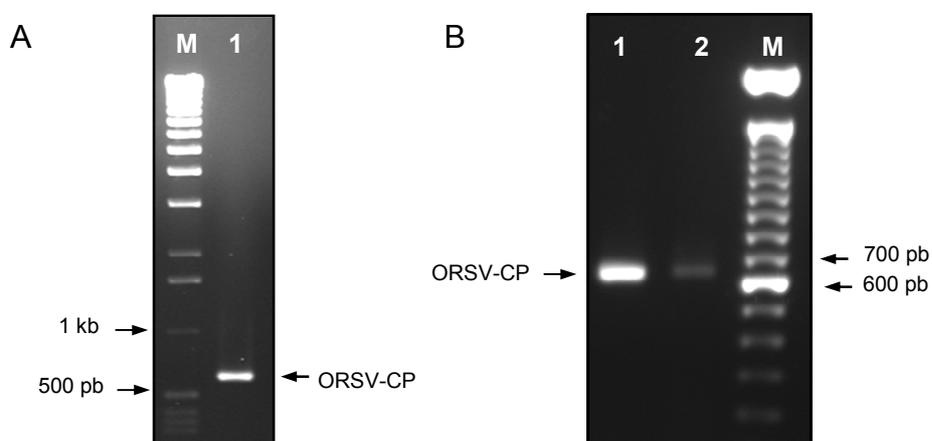


Figura 8: A – Eletroforese em gel de agarose 1,5 % da PCR de colônias de *E. coli* DH5 α transformadas com gene ORSV-CP em vetor pQE-30. M – marcador 1 kb DNA ladder (Invitrogen); 1 – gene ORSV-CP amplificado com os primers pQE-R e pQE-F. B – Eletroforese em gel de agarose 1,5 % da PCR de colônias de *E. coli* M15 transformadas com gene ORSV-CP em vetor pQE-30. M – marcados 100 pb DNA ladder (Invitrogen); 1 e 2 - gene ORSV-CP amplificado com os primers pQE-R e pQE-F

4.3 Expressão e purificação da proteína ORSV-CP

Através de eletroforese em gel de poliacrilamida, do lisado bruto de cultura de *E. coli* induzida pelo IPTG, não foi possível distinguir a banda da proteína heteróloga expressa das demais proteínas (Figura 9).

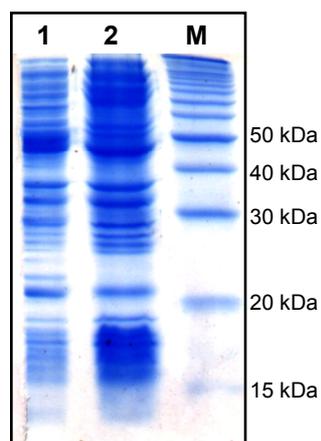


Figura 9: Análise da expressão da proteína ORSV-CP por *E. coli* M15, através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12 %. 1 – lisado de cultura não induzida; 2 – lisado de cultura induzida; M - marcador 10 kDa Ladder (Life Technologies).

Através de Western-blot, empregando anticorpo anti-6xHis, foi possível verificar que a proteína foi expressa após a adição de 1 mM de IPTG, pois apresentou uma única banda com cerca de 22 kDa correspondendo à proteína expressa adicionada da etiqueta de 6 histidinas (Figura 10). Este resultado leva a crer que provavelmente a proteína ORSV-CP não foi detectada em SDS-PAGE devido à baixa quantidade de proteína expressa e por apresentar o mesmo tamanho de alguma proteína da *E. coli*, dificultando assim, sua visualização.

De acordo com SCHUMANN e FERREIRA (2004), nem todo gene heterólogo é eficientemente expresso em *E. coli* e existem fatores que influenciam o nível de expressão das proteínas como características da seqüência gênica, estabilidade do RNA mensageiro, conformação correta e eficiente da proteína, degradação da

proteína expressa por proteases e potencial tóxico da proteína para a célula hospedeira.

A temperatura, tempo de cultivo e a concentração do indutor também são fatores que podem influenciar o nível de proteína expressa pela bactéria (BANEYX, 1999; MAKRIDES, 1996).

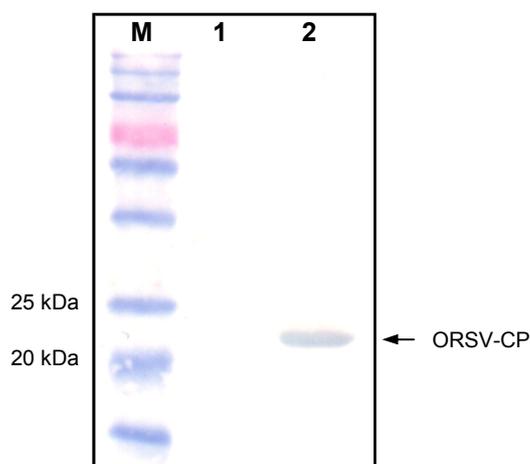


Figura 10: Análise da expressão da proteína ORSV-CP por *E. coli* M15, induzida com IPTG 1 mM, a 37 °C por 4 h, através de Western-blotting com anticorpo anti-6xHis. M - Marcador pré-corado Benchmark (Life Technologies), 1 – lisado de cultura não-induzida, 2 – lisado de cultura induzida.

Com o intuito de otimizar a indução da produção da proteína ORSV-CP, foram ensaiadas diferentes concentrações de IPTG, bem como diferentes temperaturas e tempos de cultivo após adição do indutor (Figura 11). A condição na qual detectou-se maior expressão da proteína recombinante foi à concentração de 0,25 mM de IPTG, 30 °C “overnight” (Figura 12).

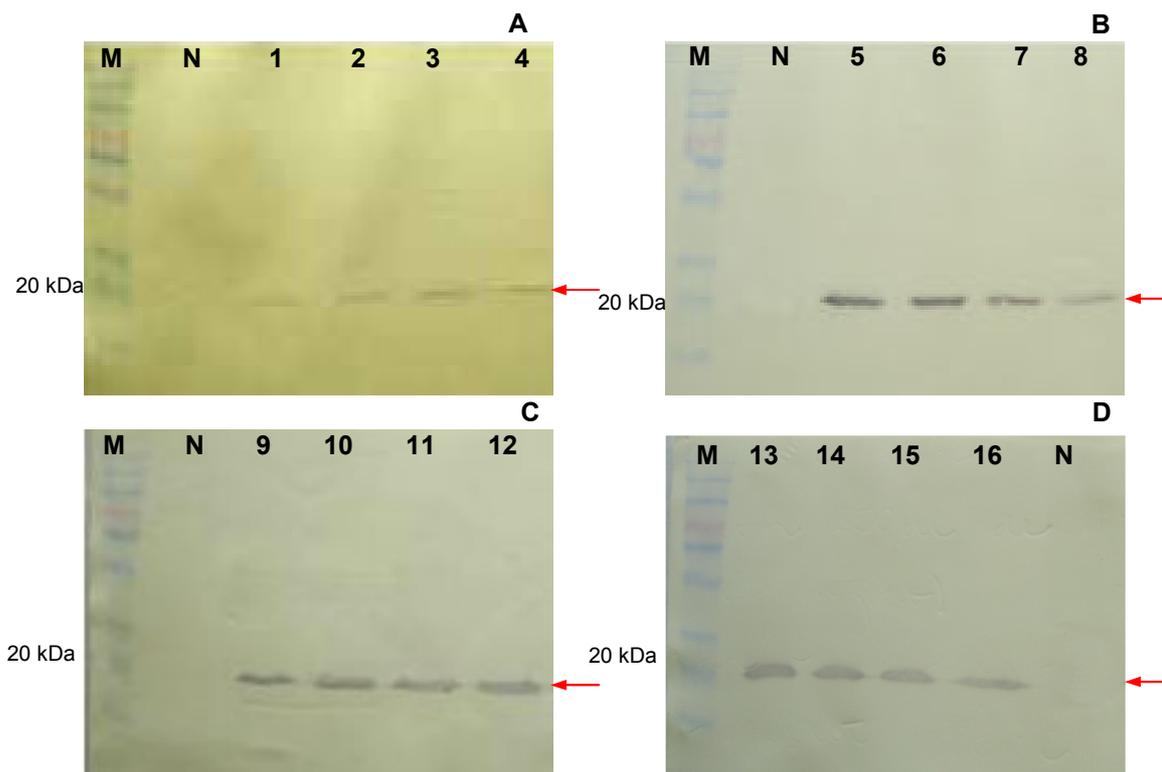


Figura 11: Análise da expressão da proteína ORSV-CP por *E. coli* M15, induzida com diferentes concentrações de IPTG, tempo de cultivo e temperatura, através de Western-blotting com anticorpo anti-6xHis. M - Marcador pré-corado Benchmark (Life Technologies), N - lisado de cultura não-induzida, **A** - 37 °C/4 h, 1 - 2 mM, 2 - 1 mM, 3 - 0,5 mM, 4 - 0,25 mM, **B** - 30 °C/4 h, 5 - 0,25 mM, 6 - 0,5 mM, 7 - 1 mM, 8 - 2 mM, **C** - 37 °C/16 h, 9 - 2 mM, 10 - 1 mM, 11 - 0,5 mM, 12 - 0,25 mM, **D** - 30 °C/16 h, 13 - 0,25 mM, 14 - 0,5 mM, 15 - M, 16 - 2 mM

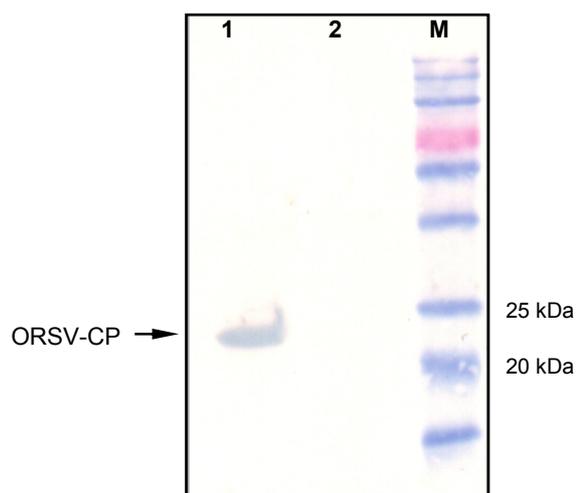


Figura 112: Análise da expressão da proteína ORSV-CP por *E. coli* M15, induzida com 0,25 mM de IPTG, a 30 °C, "overnight", através de Western-blotting com anticorpo anti-6xHis. 1 - lisado de cultura induzida, 2 - lisado de cultura não-induzida, M - Marcador pré-corado Benchmark (Life Technologies).

A proteína ORSV-CP expressa em *E. coli* foi submetida à purificação em coluna de níquel-agarose. A Figura 123 apresenta a eletroforese em gel de poliacrilamida das frações correspondentes às diferentes etapas da purificação. A fração eluída da coluna apresenta uma banda proeminente, com tamanho de 22 kDa aproximadamente, demonstrando assim que esse sistema de purificação foi adequado para separação da proteína ORSV-CP das demais. Da mesma forma, no trabalho de Barbieri et al. (2004), a proteína capsial de *Watermelon mosaic virus* foi eficientemente purificada em coluna de níquel-agarose.

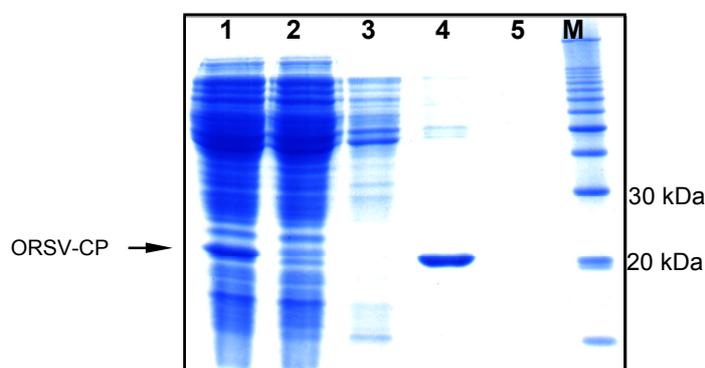


Figura 123: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % das frações da purificação da proteína recombinante ORSV-CP por cromatografia de afinidade metálica. 1 - Lisado bacteriano, 2 - filtrado, 3 - lavado, 4 - eluído, 5 - lavagem da coluna, M - marcador 10 kDa Protein Ladder (Life Technologies).

4.4 Verificação da presença de anticorpos policlonais através de Dot-blot

Utilizando-se a técnica de Dot-blot foi possível verificar o aumento da especificidade do antissoro ao longo das inoculações do antígeno para os camundongos 1 a 3. O camundongo 4 (Figura 134) não apresentou resposta ao antígeno utilizado. O camundongo 3 foi o que apresentou maior resposta à imunização e este foi utilizado para as análises seguintes.

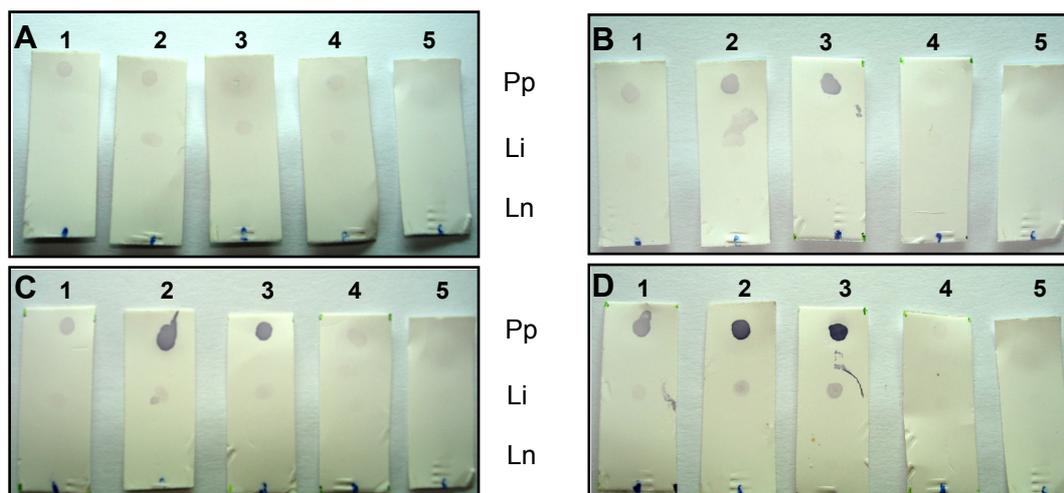


Figura 134: Dot-blot das sangrias de camundongos inoculados com a proteína ORSV-CP. A, B, C e D representam 1^a, 2^a, 3^a e 4^a sangria respectivamente; 1, 2, 3, 4 representam os diferentes camundongos e 5 corresponde ao controle branco (não foi incubado com antissoro); Pp - proteína purificada; Li - lisado de *E. coli* induzida; Ln - lisado de *E. coli* não induzida.

4.5 Detecção de ORSV por ELISA em tecidos de orquídeas infectadas.

Utilizando-se a técnica de ELISA foi possível observar que apenas a planta 3 apresentou valores de absorvância suficientemente maior que o controle negativo (planta sadia), para ser considerada positiva para a presença de ORSV (Tabela 2). O resultado verificado com o antissoro resultante do presente trabalho foi semelhante ao obtido com o antissoro produzido contra partículas virais purificadas produzido por F. W. Zettler (Universidade da Flórida), mostrando que a proteína capsial do ORSV expressa em *E. coli* apresentou comportamento antigênico semelhante ao da proteína da partícula viral purificada a partir de planta infectada.

Tabela 2 – Valores de absorvância (A405) obtidos em teste de ELISA utilizando antissoros diluídos 1:800, anti-ORSV-CP e AS-ORSV (Zettler).

Amostras	AS-ORSV-CP		AS-ORSV comercial	
	30 minutos	1 hora	30 minutos	1 hora
01	0,024	0,034	0,006	0,006
02	0,027	0,038	0,014	0,016
03	0,365	0,498	0,432	0,580
04	0,021	0,030	0,018	0,028
Controle positivo	0,116	0,160	0,223	0,295
Controle negativo	0,054	0,075	0,026	0,033

4.6 Detecção de ORSV por Western-blot em tecidos de orquídeas infectada

Através de Western-blot, utilizando o antissoro produzido contra ORSV-CP, foi possível detectar a presença do vírus em tecidos de orquídeas infectadas, tanto sintomáticas como assintomáticas, porém com bandas mais intensas nas primeiras (Figura 15).

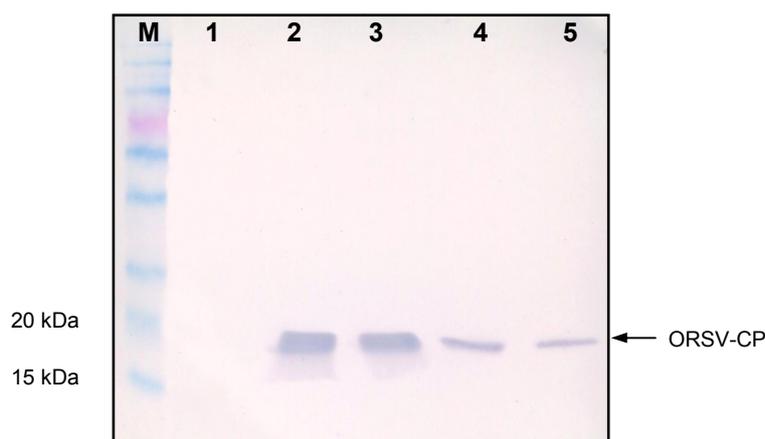


Figura 145 Western-blot de extratos foliares de folhas de orquídeas infectadas incubadas com anti-ORSV-CP. 1 - planta sadia, 2 e 3 - plantas sintomáticas, 4 e 5 - plantas assintomáticas. M - Marcador pré-corado Benchmark (Life Technologies).

4.7 Detecção de ORSV por RT-PCR em tecidos de orquídeas infectadas.

Utilizando-se a técnica de RT-PCR foi possível detectar a presença de ORSV em duas das quatro plantas que tiveram seu RNA total extraído (Figura 16). A presença do ORSV na planta 4 não havia sido detectada pelos testes anteriores de ELISA e Western-blot;

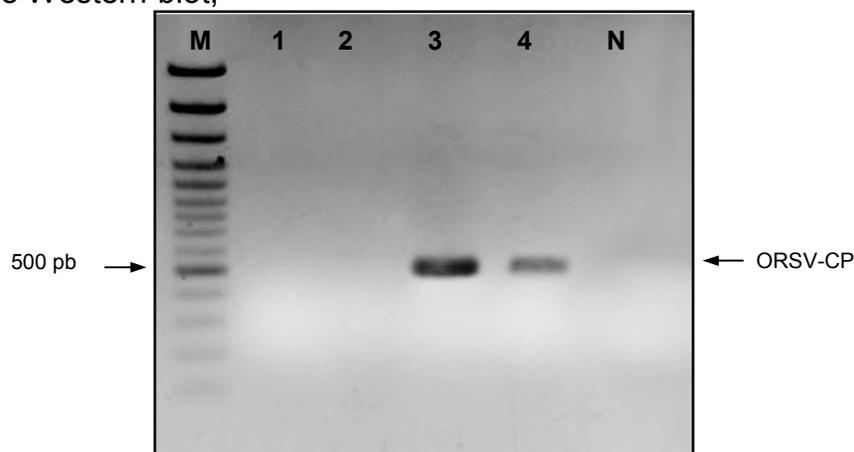


Figura 156: Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produto de RT-PCR de orquídeas infectadas por ORSV. M – Marcador 100 pb. 1, 2, 3 e 4 – plantas assintomáticas. N – controle negativo (planta sadia).

4.8 Detecção de ORSV por Imunocaptura-RT-PCR em tecidos de orquídeas infectadas

Através de eletroforese em gel de agarose das amostras de orquídeas submetidas a imunocaptura-RT-PCR, pode-se notar que todas as amostras apresentaram um fragmento de aproximadamente 500 pb, correspondente à amplificação do gene da proteína capsial de ORSV (Figura 167).

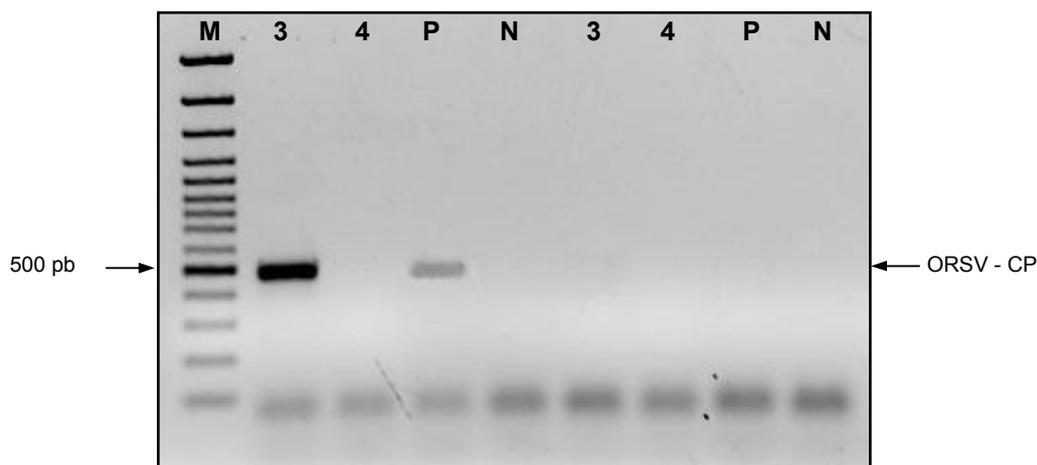


Figura 167 Eletroforese em gel de agarose 1,5 % de produto de IC-RT-PCR de orquídeas infectadas por ORSV. M – marcador 100 pb (Fermentas) 3 e 4 - plantas assintomáticas, P – controle positivo (planta infectada com ORSV), N – controle negativo (planta sadia). A imunocaptura foi realizada com AS ORSV-CP (1:500) ou soro normal de camundongos

As três metodologias empregadas - ELISA, RT-PCR e IC-RT-PCR - permitiram a detecção do ORSV mesmo em plantas assintomáticas. Aparentemente, a técnica de RT-PCR foi a de maior sensibilidade, pois foi a única que permitiu detecção do ORSV na planta 4. Entretanto, este resultado pode ser consequência de uma distribuição irregular do vírus em diferentes partes da planta e, como a quantidade de tecido foliar utilizado para cada ensaio foi reduzida, havia a possibilidade da amostra coletada da planta 4 para a IC-RT-PCR corresponder a uma região da planta com pouco ou nenhum vírus. Há na literatura relatos de que a distribuição de partículas virais em algumas plantas não é homogênea, como no caso do *Tomato ringspot virus* em macieira (Bitterlin, 1984), Tobacco streak virus em morangueiro (Spiegel et al., 1995), Beet necrotic yellow vein virus e Beet soil-borne virus em beterraba (Kaufmann et al., 1992) e Grapevine virus A em videira (Boscia et al., 1992).

Estudos realizados por Barry et al. (1996) mostraram que a IC-RT-PCR é mais sensível que ELISA e RT-PCR para a detecção do ORSV em orquídeas. A maior sensibilidade da RT-PCR verificada no presente trabalho, além da

possibilidade de refletir uma distribuição irregular do vírus já discutida, pode ser devido a uma maior concentração de RNA viral obtida quando este ácido nucléico foi purificado, comparado à concentração obtida quando a partícula viral foi capturada no tubo de PCR através dos anticorpos específicos. A quantidade de vírus que pode ser imuno-capturada é limitada pelo volume de extrato bruto da planta que pode ser incubado no tubo de PCR. No presente estudo utilizou-se um volume de 100 μ L de extrato bruto. Embora maior quantidade de vírus possa ser capturada através da re-aplicação de mais extrato bruto da planta, isso reduziria as principais vantagens da IC-RT-PCR que seriam a rapidez e praticidade.

A RT-PCR tem sido freqüentemente utilizada para a detecção de vírus em plantas, entretanto, para algumas espécies vegetais, a dificuldade na extração de RNA constitui um empecilho para o emprego deste teste em rotina. De acordo com Barry et al. (1996), a RT-PCR com extração de ácidos nucléicos requer tempo muito maior que a IC-RT-PCR, o mesmo tendo sido verificado no presente trabalho. No caso de tecidos de orquídeas, os cuidados são muito maiores, uma vez que estes apresentam grande quantidade de compostos fenólicos que causam oxidação durante a obtenção de extratos e podem ser co-purificados com os ácidos nucléicos, inibindo assim a RT-PCR. Muitas espécies de orquídeas apresentam grandes quantidades de mucilagem que também dificultam a purificação de ácidos nucléicos.

O anti-ORSV-CP obtido no presente trabalho apresentou bom desempenho em western-blot, ELISA e IC-RT-PCR e poderá ser utilizado nos exames de diagnóstico que são rotineiramente realizados no Instituto Biológico, substituindo kits importados de custo elevado e antissoros gentilmente cedidos por pesquisadores estrangeiros, mas disponíveis em quantidades limitadas. Ainda é necessário verificar a possibilidade do anti-ORSV-CP reagir com os tobamovirus mais próximos, como o

Tomato mosaic virus (ToMV) e Tobacco mosaic virus (TMV), mas, ainda que esta reação ocorra, ela não terá importância para o diagnóstico pois estes vírus não ocorrem em orquídeas. Uma análise baseada nas seqüências de aminoácidos da CP de ORSVs presentes no GenBank mostra que o menor nível de identidade dentre os diferentes isolados de ORSV é de 92,4%, enquanto que o maior nível de identidade entre ORSV e ToMV é de 74,5 % e entre ORSV e TMV é de 73,2 %. Estes valores indicam que a possibilidade de reação cruzada é pequena.

Outro teste sorológico no qual o anti-ORSV-CP poderá ser empregado é o RIPA (rapid immunofilter paper assay). Neste teste, antissoro adsorvido em micropartículas de látex coradas e antissoro puro são aplicados em diferentes pontos de uma tira de papel de filtro. Mergulhando-se a ponta da tira em extrato de planta contendo o vírus resulta na formação de uma faixa colorida visível que indica resultado positivo. Embora a sensibilidade deste teste seja menor que a dos demais já mencionados, a facilidade de execução permite que o mesmo seja empregado pelo próprio produtor de orquídeas. O desenvolvimento e a aplicação deste teste para o diagnóstico de ORSV e CyMV foram descritos por Tsuda et al. (1992) e Tanaka et al. (1997).

5 CONCLUSÕES

A expressão da proteína ORSV-CP recombinante com etiqueta 6xHis em *E. coli*, permitiu a obtenção da mesma com alto grau de pureza após cromatografia em coluna de níquel-agarose. Anticorpos policlonais específicos para a proteína ORSV-CP, produzidos em camundongos, permitiram a detecção do vírus em orquídeas infectadas, sintomáticas ou não, através de Western-blot, ELISA e IC-RT-PCR. A metodologia de IC-RT-PCR mostrou-se de fácil aplicação para o diagnóstico do ORSV em orquídeas por tornar desnecessária a purificação de RNAs totais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMON, E.; HOROWITZ, M.; WANG, H.L.; LUCAS, W.J.; ZAMSKI, E.; WOLF, S. (1997). Phloem-specific expression of the Tobacco mosaic virus movement protein alters carbon metabolism and partitioning in transgenic potato plants. **Plant Physiol.** 115: 1599-1607.

ATKINS, D.; HULL, R.; WELLS, B.; MOORE, P.; BEACHY, R.N. (1991). The Tobacco mosaic virus 30 K movement protein in transgenic tobacco plants is localized to plasmodesmata. **J. Gen. Virol.** 72: 209-211.

AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (1998). **Short Prot in Molec Biol**, 3^a ed., Wiley & Sons, Inc.

BARRY, K.; HU, J.S.; KUEHNLE, A.R.; SUGHII, N. (1996). Sequence analysis and detection using immunocapture-PCR of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in Hawaiian orchids, **J Phytopathol.**, 144: 4, 179-186; 24.

BRUNT, A.A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M.J.; GIBBS, A.J.; WATSON, L.; ZUCHER, E.J. (Eds.) **Plant Vir. Online**: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide>.

DING, B.; HAUDENSHIELD, J.S.; HULL, R.J.; WOLF, S. BEACHY, R.N.; LUCAS, W.J. (1992). Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the Tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. **Plant Cell** 4: 915-928.

EUN, A.J-C.; SEOH, M-L; WONG, S-M. (2000). Simultaneous quantitation of two orchid viruses by the TaqMan real-time RT-PCR. **J. Virol. Methods** 85: 93-98.

FRANCKI, R.I.B; MILNE, R.G.; HATTA, T. (1985). **Atlas of plant viruses**, Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 159-172.

FREITAS, J.C. (1996). Incidência e controle de viroses em orquídeas no estado de São Paulo. Piracicaba, 95p. **Dissertação** (M.S.) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

GHOSGROY, S. CITOVSKY, V. (1998.) Preservation of plant cell ultrastructure during immunolocalization of virus particles. **J. Virol. Methods**, 74: 223-229.

GIBBS, A.; MACKENZIE, A. (1997). A primer pair for amplifying par of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **J. Virol. Methods** 63: 9-16.

HU, J.S.; FERREIRA, S.; WANG, M.; BORTH, W.B.; MINK, G.; JORDAN, R. (1995) Purification, host range, serology, and partial sequencing of dendrobium mosaic potyvirus, a new member of the bean common mosaic virus subgroup. **Phytopathol.** 85:542-546.

HU, W.-W.; WONG, S.-M.; LOH, C.-S.; GOH, C.-J. (1998). Synergism in replication of *Cymbidium mosaic potyvirus* (CymMV) and *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV) RNA in orchid protoplasts. **Arch Virol** 143: 1265-1275.

JENSEN, D.D. & GOLD, H.A. (1951). A virus ring spot of *Odontoglossum* orchid: symptoms, transmission and electron microscopy. **Phytopathol** 41: 648-653.

JENSEN, D.D. (1951) Mosaic and black streak disease of *Cymbidium* orchids. **Phytopathol.** 41:401-414.

JEONG, J.H.; YANG, D.C.; PAEK, K.Y. (2001). Comparison of ELISA and RT-PCR for efficient diagnosis of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in *Cymbidium hoosai* Makino. **J. Korean Soci.Hort. Sci.**, 42: 3, 336-340.

JOLY, A.B. (1998). Família Orchidaceae. IN: **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. Companhia Editora Nacional, 12ª ed. p. 730-734.

KIYUNA, I.; ÂNGELO, J. A.; COELHO, P. J. (2005^a). Floricultura: tendência crescente nas exportações. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=2077> desde 11/04/2005.

KIYUNA, I.; ÂNGELO, J.A.; COELHO, P.J. ASSUMPÇÃO, R. (2005^b) Floricultura: Desempenho do comércio exterior em 2004. <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=1742> desde 17/02/05.

LARTEY, R.; GHOSHROY, S.; HO, J.; CITOVSKY, V. (1997). Movement and subcellular localization of a tobamovirus in *Arabidopsis*. **Plant J.** 12: 537-545.

LAWSON, R.H. & BRANNIGAN, M. (1986). **Handbook on orchid pests and diseases**. American Orchid Society, West Palm Beach, FL, 2-49.

LAWSON, R.H. & HSU, H. (1995). Orchid. In: LOEBSTEIN, G.; LAWSON, R.H.; BRUNT, A.A. **Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops**. West Sussex: John Wiley & Sons, 409-420.

LIM, S.T.; WONG, S.M.; YEONG, C.Y.; LEE, S.C.; GOH, C.J. (1993). Rapid detection of *Cymbidium mosaic virus* by the polymerase chain reaction. **J. Virol Methods** 41:37-46.

OPARKA, K.J.; ROBERTS, A.G.; ROBERTS, I.M.; PRIOR, D.A.M.; SANTA CRUZ, S. (1996). Viral coat protein is targeted to but does not gate, plasmodesmata during cell-to-cell movement of potato virus X. **Plant J.** 10:805-813.

PARK, W.M.; SHIM, K.B.; KIM, S.J.; RYU, K.H. (1998) Detection of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* by ELISA and RT-PCR from cultivated orchids in Korea. **Korean J. Plant Pathol.** 14: 2, 130-135.

PEARSON, M.N. & COLE, J.S. (1986). The effects of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* on the growth of *Cymbidium* orchids. **J Phytopathol.** 117: 193-197.

PEARSON, M.N. & COLE, J.S. (1991). Further observations on the effects of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* on the growth of *Cymbidium* orchids. **J Phytopathol.** 131: 193-198.

QIAexpress – The Complete System for 6xHis Technology, QIAGEN, 2000

RIVAS, E.B.; ALEXANDRE, M.A.V.; DUARTE, L.M.L. (1998). Doenças viróticas. IN: Aspectos fitossanitários das orquídeas. **Bol. Téc. Inst. Biol.**, 11: 45-51.

RYU, K.H. & PARK, W.M. (1995a). The complete nucleotide sequence and genome organization of *Odontoglossum ringspot tobamovirus* RNA. **Arch Virol** 140: 1577-1587.

RYU, K.H. & PARK, W.M. (1995b) Rapid detection and identification of *Odontoglossum ringspot virus* by polymerase chain reaction amplification. **FEMS Microbiol. Lett.** 133: 265-269.

SEFC, K.M.; LEONHARDT, W.; STEINKELLNER, H. (2000). Partial sequence identification of grape-vine-leafroll-associated virus-1 and development of a highly sensitive IC-RT-PCR detection method. **J. Virol. Methods** 86: 101-106.

SILVA, W. (1986). **O cultivo de orquídeas no Brasil.** 6. ed. São Paulo: Nobel, 96p.

VAN LENT, J.; WELLINK, J., GOLDBACK, R. (1990). Evidence for the involvement of the 58 K and 48 K proteins in the intercellular movement of cowpea virus. **J. Gen. Virol.** 71: 219-223.

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; BURCKARD, J (1980). Detection of a wild spectrum of *Tobacco mosaic virus* strains by indirect Enzyme-linked immunosorbent assays. **Virol.**, 106: 327-334.

WISLER, G.C.; ZETTLER, F.W.; MU, L. (1987) Virus infections of Vanilla and other orchids in French Polynesia. **Plant Dis.**, 17:1125-1129.

WONG, S-M.; CHNG, C.G.; LEE, Y.H.; TAN, K.; ZETTLER, F.W. (1994). Incidence of cymbidium mosaic and *Odontoglossum ringspot viruses* and their significance in orchid cultivation in Singapore. **Crop Prot.**, 13: 235-239.

YU, H.H. & WONG, S.M. (1998). Synthesis of biologically active cDNA clones of Cymbidium mosaic potexvirus using a population cloning strategy. **Arch Virol.**, 143: 1617-1620.

ZETTLER, F.W.; KO, N.J.; WISLER, C.G ELLIOTT, M.S.; KO, N.J (1987). Some new, potentially significant viruses of orchids and their probable means of transmission. **Am. Orch. Soc. Bull.** 56: 1044-1051.

ZETTLER, F.W.; KO, N.J.; WISLER, C.G; WONG, S.M. (1990). Viruses of orchids and their control. **Plant Dis.**, 74: 621-626.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)