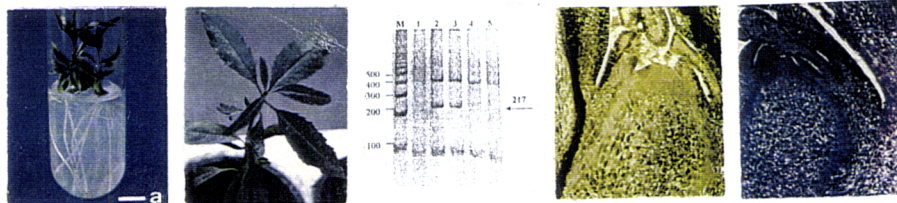


UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**Estudos de saneamento de viroses e de detecção do Ilarvírus
“Prune Dwarf Virus” em amendoeira e introdução à técnica
de Transcrição Inversa-“Polymerase Chain Reaction” *in situ***



SUSANA ISABEL LOPES CLARO TERESO

ÉVORA, 1999

Duplicado 959215

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**Estudos de saneamento de viroses e de detecção do Ilarvírus
“Prune Dwarf Virus” em amendoeira e introdução à técnica
de Transcrição Inversa-“Polymerase Chain Reaction” *in situ***



103 043

Dissertação apresentada à Universidade
de Évora para a obtenção do Grau de
Mestre em Melhoramento de plantas

SUSANA ISABEL LOPES CLARO TERESO

ÉVORA, 1999

631.72

ERRATA

Página	§	Linha	Onde se lê:	Deverá ler-se:
		Capa	Lisboa	Évora
XI			1.3.2. A extracção de RNA bicatenário viral	1.3.2. A extracção de RNA bicatenário
3	1	3	arvense	arbórea
5	4	7	Francesas	francesas
6	6	1	Ilarvirus	Ilarvírus
27	1	12	sacarose 20%	sacarose 2%
37	3	5	NaCO ₃	Na ₂ CO ₃
		6	e acordo	de acordo
41	T5,	Iniciadores	2-5 µl/50 µl	1-2,5 µl/50 µl
		HPRI	16 U	0,32 U/ µl
		Rtase	20 U	0,4 U/ µl
		Taq DNA pol.	1,5-3 U	0,03-0,06 U/ µl
44	T6,	Iniciadores	5 µl/50 µl	2,5 µl/50 µl
45			3.3.2. Adaptação do método de extração	3.3.2. Adaptação do método de extração
65		F11	Figura da esquerda – 11 a; figura da direita – 11 b	
67	1	4	µM	U/ 50 µl
68		F15	Conc. da Taq polimerase (µM)	Conc. da Taq polimerase (U/ 50 µl)
74	2	16	método reduzir	método e reduzir
82	1	17	sguiram	seguiram
83		F16	DETECÇÃO INDIRECTA	DETECÇÃO DIRECTA
			DETECÇÃO DIRECTA	DETECÇÃO INDIRECTA
101	T15,	Iniciadores	2 µl/ 50 µl	5 µl/ 50 µl
		Água miliQ	33,9 µl/ 50 µl	27,9 µl/ 50 µl
102	T16,	Iniciadores	2 µl/ 50 µl	1 µl/ 50 µl
		Água miliQ	30,2 µl/ 50 µl	35,2 µl/ 50 µl
103	T17,	Conc. da solução-stock de DNA es. salmão	6,25 ng/ µl	10 µl/ µl
108	F20, L	7	100 µM	100 µm
110	F21, L	10		
114	F23, L	13		
116	F24, L	9		
112	1	1	ensaios ensaios	ensaios
	2	6	Figuras 20 e 21	Figuras 23 e 24
131	1	1	16 ou 21 dias	16 ou 20 dias
		2	ou 20 dias	ou 21 dias
143	10	1	prunus	Prunus
146	9	1	overview <i>In situ</i> polymerase chain reaction and related technology	overview
147	6	3	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
153	9	2	<i>Prunus amygdalus</i>	<i>Prunus amygdalus</i>

§ - Parágrafo; T - Tabela; F - Figura; L - legenda; pol. - polimerase; es. - de esperma.

O presente trabalho foi realizado no IBET, no âmbito
do projecto PRAXIS/3/3.2/HORT/2143/95
ao abrigo do programa PRAXIS XXI

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que me acompanharam durante este trabalho:

Em primeiro lugar à Prof.^a Dr.^a Margarida Oliveira, por me ter aceite e proposto para a realização deste trabalho, pela orientação científica e pela confiança, e amizade demonstrada; e pela boa disposição contagiante mantida no local de trabalho.

À Mestre Helena Raquel pelos seus conselhos, incansável apoio, e pelo ensino de algumas técnicas utilizadas.

Ao Dr. Gustavo Nolasco pelo apoio à iniciação do RT-PCR *in situ*, pela sua atenção e conselhos na área da virologia.

À Dr.^a Margarida Teixeira Santos, pela sua preciosa orientação na realização das técnicas de extracção de RNA bicatenário, electroforese em gel de poliacrilamida e coloração pelo nitrato de prata. À Petra, pela sua disponibilidade e apoio ao nível destas técnicas.

À Dr.^a Lizete Galego por todo o material disponibilizado, pelo protocolo de hibridação *in situ* em plantas, e pelos conselhos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Rogério pelo seu apoio no tratamento estatístico dos resultados do enraizamento, e pelas suas aulas e apontamentos sobre Estatística.

Ao Dr. Bo Johansen pela sua simpatia e valiosos conselhos viabilizados pela Internet.

À Dr.^a Helena Trindade, ao Eng^o Luís e à Liliana por terem possibilitado a aclimatização das plântulas obtidas neste trabalho.

Um agradecimento muito especial aos meus colegas de laboratório, pela amizade, espírito de união e entre-ajuda mantidos na nossa “meia-casa”: à Sónia pela sua energia e pelo companheirismo criado entre nós, à Raquel pelos seus conselhos e apoio, à Madalena pela sua compreensão e humor, à Célia pela sua tranquilidade e pela atenção dispensada, à Catarina pelo seu interesse no trabalho, apoiando-me sempre que necessário; à Joana pela força transmitida e pelo trabalho conjunto em ensaios de enraizamento; ao Rongcai pelos conhecimentos que gentilmente me transmitiu.

Ao Prof. Dr. Pedro Fevereiro, por manter um espírito de ajuda mútua entre os dois laboratórios, e às pessoas do seu grupo de trabalho, pela sua disponibilidade e apoio.

À Mestre Lucinda Neves, pela sua radiosa simpatia e pelas palavras de apoio e confiança transmitidas.

À Mestre Zita Sequeira pela atenção e apoio prestados durante a minha agradável estadia no Algarve, e às colegas Ana e Joana pelos agradáveis momentos passados na sua companhia. À Dr.^a Natália Marques, pela atenção e informação dispensadas sobre coloração nuclear.

Aos meus companheiros de Mestrado pelos laços de amizade mantidos durante a nossa caminhada: à Teresa pela sua generosidade e amizade demonstradas durante a minha estadia em Évora, ao Alexandre pela sua boa disposição e companhia, à Conceição pela sua graça e determinação e pelo apoio constante, à Rosário pela sua atenção e pelo seu trabalho exemplar como delegada; e à Carla, pela disponibilidade demonstrada durante as viagens constantes entre Évora e o Barreiro.

À Carla, pela simpatia e apoio dados quando solicitada.

Às colegas da sala de lavagens, pelo bom trabalho prestado, essencial aos ensaios realizados.

Um agradecimento muito especial ao Pedro, pela paciência, compreensão e incentivo sempre demonstrados, especialmente em momentos de maior tensão.

À minha mãe, por tudo o que me facultou durante este trabalho, apoio material e psicológico, sem ela não teria iniciado este Mestrado.

ABREVIATURAS

atm	atmosfera
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotreitól
cm, mm, nm	centímetros, milímetros, nanómetros
dTTP	deoxitimidina-5'-trifosfato
dUTP	deoxiuridina-5'-trifosfato
EDTA	tetra-acetato de etileno diamina
ELISA-DAS	Double Antibody Sandwish-ELISA
g	força gravitacional
g, mg, µg,	grama, miligrama, micrograma
°C	graus Celsius
h, min, s	hora, minuto, segundo
IgG	imunoglobulina
λ	lambda
l, ml, µl	litro, mililitro, microlitro
M, mM, µM	molar, milimolar, micromolar
PBS	“Phosphate buffered saline”
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
r.p.m.	rotações por minuto
TAE	tris-acetato/EDTA
TEMED	N, N, N', N' – tetrametil etilenodiamina
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Tween 20	polioxietileno sorbitanomonooleato

ÍNDICE

	PÁGINAS:
I – SITUAÇÃO DA AMENDOEIRA EM PORTUGAL	
1. HISTÓRIA DA CULTURA	3
2. CARACTERÍSTICAS DA PLANTA	4
3. IMPORTÂNCIA ECONÓMICA	5
4. VIROSES NA AMENDOEIRA - O VÍRUS PDV	6
5. OBJECTIVOS DO TRABALHO	9
II - ESTUDOS DE SANEAMENTO DE VIROSES E DE DETECÇÃO DO VÍRUS PDV EM AMENDOEIRA	
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Métodos de saneamento de viroses	13
1.2. Enraizamento e aclimatização em amendoeira	18
1.3. Métodos de detecção viral	19
1.3.1. O método IC/RT-PCR	21
1.3.2. A extracção de RNA bicatenário viral para RT-PCR	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1. Estabelecimento e manutenção de culturas <i>in vitro</i>	27
2.1.1. Preparação de stocks, meios de cultura e material acessório	27
2.1.2. Estabelecimento <i>in vitro</i> de material de campo	28
2.1.3. Micropropagação de rebentos	29
2.2. Ensaio de saneamento de doenças virais	29
2.2.1. Termoterapia	29
2.2.2. Cultura de meristemas de material de campo	32
2.3. Enraizamento e aclimação dos rebentos tratados	33
2.4. Análise do material vegetal resultante dos ensaios de saneamento	36
2.4.1. Optimização do método IC/RT-PCR para a detecção do PDV	36
2.4.1.1. Recolha e preparação do material vegetal	36
2.4.1.2. Imunocaptura das partículas virais	37
2.4.2. Adaptação do método de extração de RNA bicatenário para a detecção do PDV	38
2.4.3. Optimização da transcrição inversa e da amplificação por PCR	39
2.4.4. Análise dos produtos amplificados – electroforese em gel de poliacrilamida e hibridação “Southern blot”	42

3. RESULTADOS	45
3.1. Saneamento de doenças virais	47
<u>3.1.1. Termoterapia</u>	47
<u>3.1.2. Cultura de meristemas de material de campo</u>	53
3.2. Enraizamento e aclimação dos rebentos tratados	54
3.3. Análise do material vegetal resultante dos ensaios de saneamento	61
<u>3.3.1. Optimização do método IC/RT-PCR para a diagnose do PDV</u>	61
<u>3.3.1.1. Recolha e preparação do material vegetal</u>	61
<u>3.3.1.2. Imunocaptura das partículas virais</u>	62
<u>3.3.2. Adaptação do método de extração de RNA bicatenário</u> <u>para a detecção do PDV</u>	64
<u>3.3.3. Optimização da transcrição inversa e da amplificação por PCR</u>	67
4. DISCUSSÃO	69
III – INTRODUÇÃO À TÉCNICA DE RT-PCR <i>IN SITU</i> PARA A ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DO PDV EM AMENDOEIRA	
1. INTRODUÇÃO	79
1.1. Preparação do material histológico	84
1.2. Tratamentos com macerozima, proteinase K e Dnase	85
1.3. Transcrição inversa e PCR	86
1.4. Métodos de detecção - directo <i>versus</i> indirecto	87
1.5. Quantificação dos resultados	89
1.6. Controlos	89
2. MATERIAL E MÉTODOS	93
2.1. Preparação de soluções stock e do material histológico	95
<u>2.1.1. Preparação de soluções stock</u>	95
<u>2.1.2. Preparação do material histológico</u>	96
2.2. Tratamentos com macerozima, proteinase K e DNase	98
2.3. Transcrição inversa e amplificação por PCR	99
2.7. Detecção dos produtos de PCR	101
3. RESULTADOS	105
3.1. Preparação do material histológico	107
3.2. Processamento das amostras	112
4. DISCUSSÃO	119

IV – RESUMO E CONCLUSÕES	
1. RESUMO	127
1.1. Estudos de saneamento de viroses e de detecção do vírus PDV em amendoeira	129
1.2. Introdução à técnica de RT-PCR <i>in situ</i> para a análise da distribuição do PDV em amendoeira	135
2. CONCLUSÕES	137
V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
VI – ADENDA	159

I - SITUAÇÃO DA AMENDEIRA EM PORTUGAL

1. INTRODUÇÃO

1. HISTÓRIA DA CULTURA	3
2. CARACTERÍSTICAS DA PLANTA	4
3. IMPORTÂNCIA ECONÓMICA	5
4. VIROSES NA AMENDEIRA - O VÍRUS PDV	6
5. OBJECTIVOS DO TRABALHO	9

1. HISTÓRIA DA CULTURA

A amendoeira é uma das principais culturas arvenses a nível mundial. Esta árvore de fruto pertence à família *Rosaceae* e tem sido incluída por alguns botânicos no género *Prunus* devido à sua relação com outras espécies deste género (pessegueiro, ameixeira, cerejeira e damasqueiro), designando-a por *Prunus dulcis* (Miller) D. A. Webb syn. *Prunus amygdalus* Batsch. (Kester *et al.*, 1986). No entanto, os primeiros botânicos classificavam-na como sendo um género distinto – *Amygdalus* - e utilizavam o termo *communis* para indicar as respectivas espécies cultivadas (Grasselly e Crossa-Raynaud, 1980 *in* Rugini, 1983).

A amendoeira parece ter o centro de origem nas regiões montanhosas da Ásia Central (Índia, Irão e Paquistão), sendo provavelmente resultante do cruzamento entre as espécies *Amygdalus fenziliana* Fritsch e *Amygdalus bucharica* Korsch (Popov, 1929 *in* Rugini, 1983), ambas relacionadas com a *Amygdalus communis* L. Esta espécie foi dispersa pela Bacia do Mediterrâneo, e em cerca de 1700 a.C. era comum na Palestina (Woodroof, 1967 *in* Rugini, 1983).

A cultura da amendoeira, iniciada aproximadamente em 450 a.C., expandiu-se a partir da Grécia para a Costa Mediterrânica em áreas localizadas. Posteriormente, foi levada para a costa ocidental da América do Norte, onde agora constitui uma das mais importantes fruteiras dos Estados Unidos (Sousa, 1990).

Actualmente, a cultura da amendoeira situa-se nos arredores do mar Mediterrâneo e Médio Oriente e na Califórnia - zonas onde se concentra mais de 90% da produção mundial - e em pequenas áreas que também apresentam o tipo de clima mediterrânico (Himalaia, Chile, Argentina, África do Sul e Austrália). Esta cultura é totalmente condicionada por este tipo de clima, em particular no que respeita ao regime de chuvas nestas zonas. Nesta espécie, as chuvas de Primavera não devem interferir com a polinização cruzada realizada pelas abelhas, porque as cultivares tradicionais são auto-incompatíveis, enquanto que as chuvas de Outono não devem causar problemas à colheita e subsequente secagem dos frutos (Socias i Company, 1997).

2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA PLANTA

A amendoeira é uma árvore de altura média com ramos glabros os quais, com cerca de um ano de idade, apresentam uma cor verde-pálida a vermelho-acastanhada. Na maioria das cultivares mediterrânicas, incluindo as portuguesas, as folhas apresentam pecíolos e são lanceoladas a ovadas com um ápice agudo. Os ramos produzem botões foliares pontiagudos, e botões florais arredondados cujos primórdios florais surgem no início do Outono. De Novembro a Janeiro, dependendo da cultivar (cv.), ocorre a formação dos grãos de pólen (microsporogénese), e a maturação do ovário ocorre logo após a floração (Rugini, 1983).

As flores são hermafroditas, sendo constituídas por 5 pétalas brancas ou rosa, 5 sépalas, 1 único pistilo contendo 2 óvulos, e 20-40 estames. A floração, a qual precede o rebentamento vegetativo, é extremamente precoce e ocorre de Janeiro a Março, dependendo da cultivar. A polinização é geralmente entomófila (Rugini, 1983).

O fruto consiste numa drupa em forma de ovo com um padrão de crescimento sigmóide. O pericarpo é geralmente fino (5-15mm) e sofre deiscência na maturidade. O endocarpo, o qual pode variar na forma, aparência superficial e consistência, é um importante factor na identificação de diferentes cultivares. O endocarpo envolve uma ou duas amêndoas as quais podem variar em tamanho, pesando 0,5-1,5g. Dois cotilédones bem desenvolvidos ocupam o volume total da amêndoa a qual é comestível, podendo ser doce ou amarga (Rugini, 1983).

A amendoeira é uma espécie diplóide ($2x = 16$), tal como as espécies selvagens com ela relacionadas (Rugini, 1983). É altamente polimórfica, provavelmente por ser auto-incompatível e conseqüentemente necessitar de polinização cruzada, bem como devido à sua propagação, realizada exclusivamente por via seminal até finais do século XIX (Rugini, 1983; Socias i Company e Felipe, 1992 *in* Socias i Company, 1997). A sua variabilidade dificulta a distinção entre cultivares e linhagens híbridas genuínas, complexo designado por “ecotipos” (Grasselly e Crossa-Raynaud, 1980 *in* Rugini, 1983).

A amendoeira exige clima quente e seco na Primavera, resistindo bem à secura desde que enxertada em porta-enxertos adequados. Por ser susceptível a asfixia radicular, exige solos com boa drenagem (IMAIAA, 1994). O porta-enxerto mais utilizado é o franco de amendoeira (amêndoa amarga). Contudo, os porta-enxertos

híbridos de pessegueiro x amendoeira, apesar de serem mais caros, oferecem vantagens significativas em relação ao franco – a amendoeira apresenta maior vigor, produção e qualidade da amêndoa. O híbrido de pessegueiro x amendoeira que tem sido mais utilizado é o GF-677 (Cordeiro e Monteiro, 1997).

3. IMPORTÂNCIA ECONÓMICA

Até à década de cinquenta, a produção mundial de amêndoa baseava-se nos países do Sul da Europa, Norte de África e Médio Oriente, onde a cultura explorava situações quase sempre marginais. Com o aumento das necessidades de mercado, surgiram condicionalismos económicos inerentes a uma cultura de baixo rendimento e inadequada à época. Perante esta conjuntura, alguns países evoluíram para a utilização de material vegetal seleccionado e portanto mais produtivo, cultivado em melhores solos e com técnicas apropriadas, tornando-se numa interessante forma de aproveitamento agrícola (Sousa, 1990).

Actualmente, a produção agrícola baseia-se em dois grandes sistemas culturais - intensivo e regadio principalmente nos E.U.A., e de sequeiro em Espanha. Esta produção caracteriza-se por um número restrito de cultivares, adequadas às exigências actuais (principalmente da indústria), marginalizando a oriunda da exploração tradicional, que ainda se mantém nalguns países mediterrânicos, particularmente em Portugal (Sousa, 1990).

A produção portuguesa, importante no quadro mundial na década de 50-60, tem vindo a sofrer um declínio e abandono essencialmente devido à utilização de técnicas culturais desactualizadas e de material vegetal não seleccionado e muito heterogéneo, frequentemente consociado com outras culturas. Por outro lado, mantém-se a ausência de mecanismos de comercialização que garantam o escoamento da produção. A produção portuguesa, incluindo cultivares portuguesas e estrangeiras sobretudo Francesas – Ferragnes, Ferraduel e Ferrastar -, ronda apenas as 5000-6000 toneladas/ano, não atingindo a exportação valores significativos face ao quantitativo mundial de cerca de 400 000 toneladas/ano (Varela, 1997).

A cultura tradicional de amendoeira em Portugal situa-se no Algarve e no Alto Douro, onde os solos são pobres e declivosos, estando no entanto em expansão na região do Alentejo (IMAI, 1994).

O Algarve apresenta produções baixas e heterogéneas devido à existência de numerosas cultivares, consociadas com espécies como a figueira e a alfarrobeira, em locais marginais que dificultam a mecanização. Consequentemente, a amendoeira apesar de ter óptimas condições climatéricas (Sousa, 1990) e nalguns casos produzir amêndoa de boa qualidade (Varela, 1997), tem cedido a outras culturas ou actividades mais rentáveis.

No Alto Douro, a amendoeira encontra-se frequentemente consociada com a oliveira ou com a vinha, ocupando quase sempre encostas abruptas de difícil mecanização. Afastando-se das terras quentes do vale do Douro, encontra áreas menos declivosas mas com clima cada vez mais agreste (Sousa, 1990).

4. VIROSES EM AMENDOEIRA. CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS PDV

Actualmente, as viroses encontram-se em quase todas as espécies de culturas alimentares e, dependendo da severidade da infecção e da natureza dos hospedeiros envolvidos, causam sérias perdas, tanto ao nível da produção da planta como da fraca qualidade do produto.

A cultura da amendoeira encontra-se frequentemente afectada por vírus pertencentes ao género Ilarvírus do grupo Bromoviridae (grupo 4), dos quais se destacam o Vírus do Nanismo das Prunóideas ("Prune Dwarf Virus", PDV) o vírus do mosaico da macieira ("Apple Mosaic Virus", ApMV) e o Vírus da Mancha em Anel Necrótico das Prunóideas ("Prunus Necrotic Ringspot Virus", PNRSV) (Kester *et al.*, 1986). Em Portugal, a análise da distribuição do PDV e do PNRSV na região do Algarve permitiu detectar uma larga difusão destes vírus (Nolasco *et al.*, 1991), os quais constituem um dos principais factores responsáveis pela baixa produtividade das amendoeiras em Portugal (Feijó *et al.*, *in press*).

O termo Ilarvirus teve origem nas palavras *isodiamétrico*, *lábil* e "ringspotting", tendo sido criado inicialmente para referir alguns vírus das Prunóideas os quais eram instáveis na seiva e supostamente esféricos (*in* Fulton, 1981). De facto, muitos vírus

deste grupo são marcadamente instáveis na seiva bruta devido à sua sensibilidade às quinonas formadas pela oxidação (Hampton e Fulton, 1961 *in* Fulton, 1981).

Os membros do grupo Ilarvírus caracterizam-se por possuírem pelo menos três tipos de partículas nucleoproteicas as quais apresentam igual densidade (as suas velocidades de sedimentação diferem devido a diferenças de tamanho) e não possuem um invólucro, podendo ser isodiamétricas, baciliformes ou ter forma irregular (Fulton, 1985 *in* Brunt *et al.*, 1996). Tal como os restantes membros dos *Bromoviridae*, têm genoma de RNA de cadeia simples e de sentido positivo. Nos Ilarvírus, o genoma é tripartido constituído por dois RNAs maiores (1 e 2), monocistrónicos, que codificam proteínas não estruturais envolvidas na replicação viral, e pelo RNA 3, bicistrónico. O RNA 3 codifica um polipéptido envolvido no movimento viral célula-a-célula e a proteína da cápside viral. Esta proteína é expressa a partir de um mRNA subgenómico (RNA4), encapsidado e colinear com o RNA 3 (van Vloten-Doting, 1981 *in* Bachman *et al.*, 1994).

O vírus PDV é causa de numerosas doenças em Prunóideas de considerável importância económica (Gilmer *et al.*, 1976; Nemeth, 1986 *in* Parakh *et al.*, 1995), quer por infecção isolada quer por infecção mista com o PNRSV (Barkley e Sriskanthadas, 1994; Johnston *et al.*, 1994 *in* Parakh *et al.*, 1995; Mink e Aichele, 1984; Uyemoto e Scott, 1992). A sua presença afecta significativamente o rendimento da amendoeira (Camarasa *et al.*, 1986 *in* Nolasco *et al.*, 1991).

O PDV tem como sinónimos “cherry chlorotic ringspot virus”, “peach stunt virus” e “cherry yellows virus” (*in* Brunt *et al.*, 1996). O termo “Prune Dwarf” derivou dos sintomas nanismo e malformação das folhas registados em *Prunus domestica* (Thomas e Hildebrand, 1936 *in* Brunt *et al.*, 1996). O vírus causa ainda um aspecto coriáceo nas folhas de *Prunus domestica*, amarelecimento e abscisão das folhas em *Prunus cesarus* e nanismo em *Prunus persica*, sintomas que são persistentes (Fulton, 1985 *in* Brunt *et al.*, 1996). Em amendoeira, surge por vezes em simultâneo com os vírus PNRSV e ApMV para originar o “mosaico da amendoeira” (Savino *et al.*, 1990 *in* Digiario e Savino, 1992), induzindo manchas cloróticas acompanhadas por variados graus de nanismo, apesar do ApMV ser o principal responsável pelos sintomas típicos desta virose que incluem variados padrões de descoloração amarelo brilhante (Digiario *et al.*, 1992).

A transmissão do PDV não é feita por vector nem pelo contacto entre as plantas, mas sim por inoculação mecânica, por enxertia, e pelo pólen, o qual transmite a infecção à semente e à planta polinizada (Fulton, 1985 *in* Brunt *et al.*, 1996), e em muitas espécies de *Prunus* por semente (Mink e Aichele, 1984). Em amendoeira, a transmissão deste vírus por via de semente não foi significativa pelo teste ELISA. No entanto, este teste pode não ser suficientemente sensível para detectar o vírus no tecido infectado (Parakh *et al.*, 1995), existindo actualmente testes baseados em transcrição inversa – “polymerase chain reaction” (RT-PCR) que, pela sua maior sensibilidade, puderam verificar tais resultados. Nomeadamente, o PDV foi já detectado por RT-PCR em material micropropagado proveniente de semente germinada *in vitro* da cultivar portuguesa Boa Casta (Raquel, 1998).

O PDV apresenta uma distribuição geográfica mundial e uma vasta gama de hospedeiros experimentais incluídos em mais de nove famílias. Nomeadamente, são indicadas para diagnóstico as espécies *Cucumis sativus*, *Cucurbita maxima*, *Sesbania exaltata*, *Crotalaria spectabilis*, *Momordica balsamina*, *Tithonia speciosa*, *Phlox drummondii*, *Thunbergia alata* e *Melilotus officinalis*; para manutenção e propagação, as espécies *Cucurbita maxima* cv. Buttercup e *Nicotiana occidentalis*; para ensaios envolvendo lesões locais, as espécies *Sesbania exaltata* e *Crotalaria spectabilis*; e envolvendo toda a planta, a espécie *Cucumis sativus* (Fulton, 1957 *in* Brunt *et al.*, 1996). Muitos isolados diferem em termos de sintomatologia e de gama de hospedeiros herbáceos, sendo alguns mais rapidamente invasivos em *Prunus* do que outros (Fulton, 1981). Em particular, no caso da amendoeira *versus* PDV, para a indexagem em estufa recomendam-se como espécies indicadoras herbáceas *Cucumis sativus*, e como indicadoras lenhosas *Prunus persica* e *Prunus serrulata*; para a indexagem no campo é igualmente indicada *Prunus serrulata*.

Relativamente às propriedades das partículas virais do PDV, podem ser isodiamétricas de 19-20 nm de diâmetro, a baciliformes com comprimentos superiores a 73 nm, com perfil arredondado (Halk e Fulton, 1978 *in* Fulton, 1981); têm cinco componentes de sedimentação em preparações purificadas – 113S, 75S, 81S, 85S e 98S - (Halk e Fulton, 1978 *in* Brunt *et al.*, 1996); e contêm 14% de ácidos nucleicos, 86% de proteínas e 0% de lípidos (Fulton, 1985 *in* Brunt *et al.*, 1996).

Com base nas relações serológicas entre os Ilarvírus, o PDV foi incluído no subgrupo 4 distinguindo-se dos vírus PNRSV e ApMV, ambos incluídos no subgrupo 3 (Murphy *et al.*, 1995). Os vírus PDV e PNRSV, ainda que serologicamente distintos, apresentam propriedades biológicas comuns - possuem partículas quasi-isodiamétricas, infectam uma vasta gama de espécies de *Prunus* e de outras famílias para além das *Rosaceae*, encontram-se no pólen e na semente, são transmitidos por enxertia, e durante a polinização podem causar infecção em árvores-mãe saudáveis – características que têm contribuído para a sua distribuição mundial (Uyemoto e Scott, 1992).

5. OBJECTIVOS DO TRABALHO

Tal como foi referido anteriormente, as cultivares portuguesas de amendoeira em geral não estão caracterizadas e são afectadas por viroses provocadas por Ilarvírus. Para preservar os genótipos portugueses, bem como para obter material isento e/ou resistente aos referidos vírus, estão a decorrer no laboratório de Engenharia Genética de Plantas (IBET), em colaboração com outros laboratórios, programas que incluem a avaliação dos principais vírus que afectam a amendoeira; a aplicação de tratamentos de termoterapia, quimioterapia e cultura de meristemas isolados para a eliminação desses vírus; e a obtenção de construções genéticas para a introdução de resistência a vírus por transformação genética. Neste âmbito, o presente trabalho, desenvolvido no segundo ano do curso de Mestrado em Melhoramento de Plantas da Universidade de Évora, pretende dar continuidade aos programas para a eliminação de viroses em amendoeira micropropagada, utilizando-se nestes ensaios a cultivar portuguesa Boa Casta. Dado que frequentemente o material vegetal saído dos programas de saneamento se encontra ainda infectado por vírus, embora com níveis muito baixos e de difícil detecção, procurou-se neste trabalho otimizar os métodos de detecção e pesquisar estratégias possibilitando um maior direccionamento dos métodos de saneamento. Uma das formas de facilitar a detecção dos vírus é transferir para o solo as plântulas mantidas *in vitro*. Em condições naturais, verifica-se muitas vezes a proliferação dos vírus que *in vitro* não são detectáveis. Assim, o presente trabalho abordou diversas vertentes com os objectivos seguintes:

1. Continuação dos ensaios de saneamento da amendoeira cv. Boa Casta e monitorização da presença do vírus PDV por métodos moleculares: (a) optimização dos métodos de imunocaptura/transcrição inversa e amplificação por PCR (IC/RT-PCR), e (b) optimização da extracção de RNA bicatenário (RNAds) seguida de RT-PCR.
2. Optimização dos processos de enraizamento e aclimação para a amplificação do material vegetal, e eventual amplificação de vírus, por forma a facilitar a monitorização das plântulas tratadas.
3. Optimização do método de RT-PCR *in situ* para futura análise da distribuição do PDV nos tecidos meristemáticos de amendoeira. O conhecimento da distribuição viral permitirá a definição das dimensões adequadas do explante a isolar nos ensaios de saneamento.

Paralelamente, pretendeu-se dar continuidade a programas de saneamento previamente iniciados (Raquel, 1998), mantendo *in vitro* material adulto e juvenil já submetido a tratamentos de termoterapia (2x), quimioterapia, quimioterapia e termoterapia, ou derivado de cultura de meristemas de material de campo e quimioterapia. Este material foi mantido *in vitro* até serem optimizadas condições para o seu enraizamento.

A produção de amendoeiras portuguesas de qualidade e isentas de viroses deverá traduzir-se a médio e longo prazo no estabelecimento de novos pomares com boas condições de sanidade. A utilização em paralelo de técnicas culturais actualizadas poderá permitir a recuperação da produção desta cultura tradicional portuguesa e do seu interesse económico.

II - ESTUDOS DE SANEAMENTO DE VIROSES E DE DETECÇÃO DO VÍRUS PDV EM AMENDOEIRA

1. INTRODUÇÃO

1.1. Métodos de saneamento de viroses	13
1.2. Enraizamento e aclimação em amendoeira	18
1.3. Métodos de detecção viral	19
1.3.1. O método IC/RT-PCR	21
1.3.2. A extração de RNA bicatenário viral para RT-PCR	23

II. Estudos de saneamento de viroses e de detecção do vírus PDV em amendoeira

1.1. Métodos de saneamento de viroses

A facilidade de transmissão dos Ilarvírus que afectam a amendoeira, aliada à variedade dos seus hospedeiros, tem realçado a urgência de um controlo integrado da sua dispersão. A remoção de focos de infecção de PDV e PNRSV é particularmente difícil pelo facto destes vírus serem transmitidos pelos grãos de pólen e consequentemente terem uma rápida proliferação no campo (Rampitsch *et al.*, 1995). A solução mais adequada será a implementação de novos pomares com material “isento de vírus” e eventualmente resistente, o que implica o desenvolvimento, entre outros, de programas de saneamento que envolvam a detecção dos vírus a eliminar, os ensaios de saneamento e a confirmação do estado de sanidade do material daí resultante (Figura 1). Para a diagnose viral em amendoeira, a sensibilidade do teste ELISA não permitiu em algumas fases do ano detectar o PDV em material de campo infectado, tendo-se optado pela optimização de um método mais sensível envolvendo imunocaptura, transcrição inversa e PCR (IC/RT-PCR). Confirmada a presença deste vírus no material *in vitro* não tratado (Raquel, 1998), deu-se início ao presente trabalho de acordo com os objectivos pré-estabelecidos (*vide* I - 5.), pela aplicação de diferentes tratamentos para a inibição da replicação e possível eliminação de vírus.

Por outro lado, existe pouca literatura relacionada com o comportamento dos vírus de árvores de fruto em sistemas *in vitro*. Factores como a selecção espontânea de rebentos saudáveis como explantes de partida devem ser considerados. Não obstante, experiências com mais de 30 cultivares de fruteiras mostraram que a selecção negativa espontânea é um acontecimento muito raro. Outros processos de selecção são induzidos pela forma de multiplicação através do desenvolvimento de rebentos axilares para atingir um elevado número de clones idênticos *in vitro*. Este comportamento depende da cultivar e do patogéneo e não é uma regra geral (Knapp *et al.*, 1995).

Tradicionalmente os procedimentos terapêuticos eram aplicados a plantas envasadas; actualmente procuram-se aplicar a material mantido *in vitro* (in Spiegel *et al.*, 1993). O sistema *in vitro* é mais conveniente para a eliminação viral em larga escala, uma vez que permite a produção em massa de material clonal, podendo fornecer grande quantidade de plantas “isentas de vírus” num tempo relativamente curto, muito mais rápido do que os métodos de propagação convencionais (Reil e Sutter, 1996). Com este objectivo têm sido progressivamente utilizados métodos como sejam a

termoterapia, a quimioterapia, a micro-enxertia e a cultura de meristemas, tendendo-se à sua combinação numa operação com etapas múltiplas para aumentar a eficiência da eliminação viral.

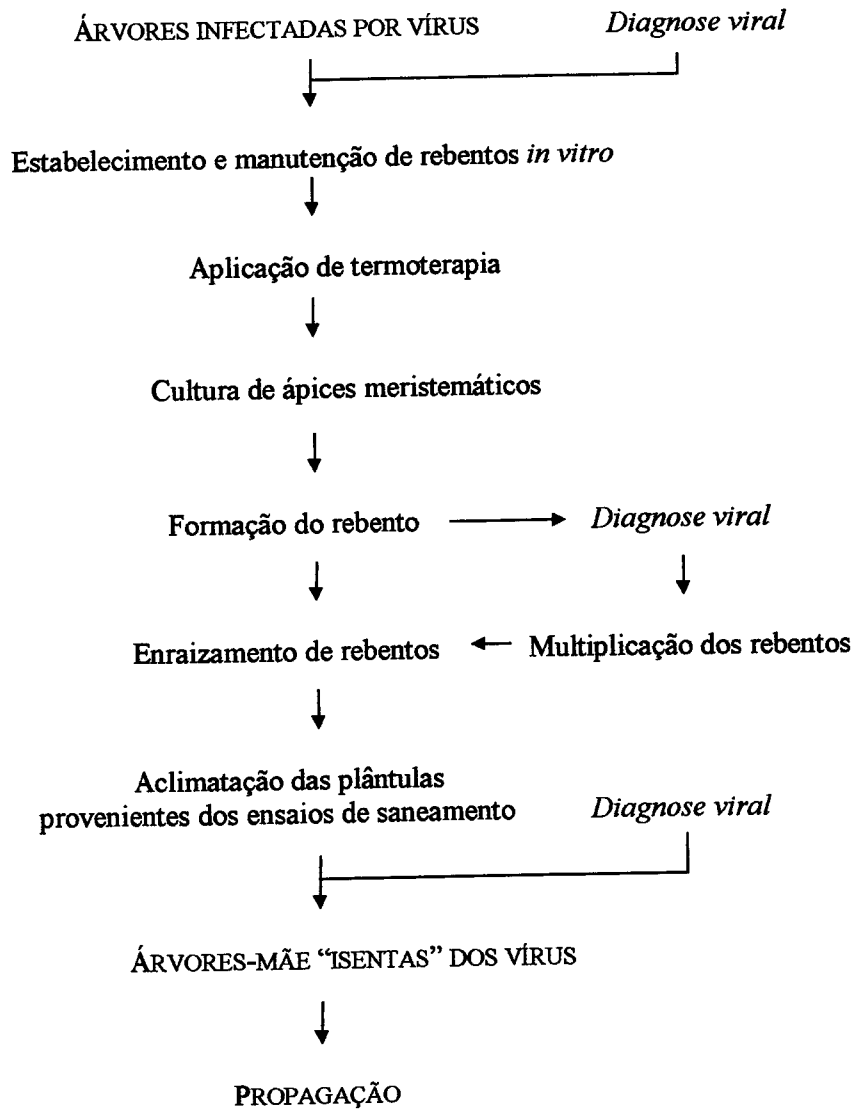


Figura 1 – Representação esquemática das várias etapas a atingir durante a produção de árvores de amendoeira "isentas" dos vírus cuja ausência foi verificada.

Termoterapia

A termoterapia é um dos métodos mais aplicados para o tratamento anti-viral de material *in vitro*, baseando-se no princípio de que a replicação de muitos vírus de plantas é significativamente reduzida quando a planta hospedeira é cultivada a temperaturas elevadas. No entanto, pouco se sabe sobre o modo como estas temperaturas afectam o ciclo de vida do vírus e a relação patogéneo-hospedeiro (Spiegel *et al.*, 1993; Knapp *et al.* 1995).

O procedimento da termoterapia envolve a manutenção de plantas ou de parte das mesmas a uma temperatura elevada (geralmente 36-38 °C), dentro dos limites das suas tolerâncias fisiológicas, por períodos de tempo variando de semanas a meses. No entanto, períodos de tempo relativamente longos a estas temperaturas geralmente causam a deterioração dos tecidos da planta tratada. Para prevenir tais danos, vários investigadores têm aplicado com sucesso tratamentos com períodos de alternância diários entre temperaturas reduzidas e elevadas (Walkey e Freeman, 1977; Lozoya-Saldana e Dawson, 1982), em particular na diminuição do título do PNRSV em *Prunus persica* (Stein *et al.*, 1991). Aparentemente esta alternância causa menos “stress” nas plantas do que a temperatura elevada constante (Spiegel *et al.*, 1993). Lozoya-Saldana e Dawson (1982) sugerem que a alternância permite inibir a multiplicação viral a temperaturas elevadas, e possibilita o crescimento do rebento a temperaturas reduzidas durante um curto período de tempo insuficiente para a recuperação da replicação viral.

Existem muitas espécies infectadas por vírus que não são totalmente lábeis pela termoterapia, pelo que este tratamento é frequentemente combinado com a cultura de meristemas ou de ápices meristemáticos. Um dos problemas resultantes da termoterapia e da cultura de tecidos em geral é a possível hiperhidratação dos rebentos, traduzida pela hipertrofia celular, aumento dos espaços intercelulares, lenhificação reduzida, tendência para o enrolamento, e espessamento das folhas e caules (Pierik, 1987). Este fenómeno foi verificado anteriormente em amendoeira cv. Boa Casta, como resultado de tratamentos de termoterapia, e aumentado quando em combinação com quimioterapia (Raquel, 1998). Assim, pretende-se no presente trabalho testar tratamentos de termoterapia alternativos para minimizar este efeito.

Quimioterapia

A quimioterapia baseia-se na produção de plantas “isentas de vírus” pela aplicação de produtos químicos que inibem ou interferem na replicação viral. Os produtos químicos podem ser pulverizados ou injectados em plantas infectadas, ou incorporados num meio de cultura *in vitro*. Subsequentemente, os ápices meristemáticos são excisados e regenerados (Schuster, 1988). Long e Cassells (1986) referem que, através da cultura de meristemas ou de outros explantes na presença destes produtos, poderá ser possível manter condições inibitórias durante o tempo suficiente para, com sucesso, eliminar os vírus. Vários compostos naturais e sintéticos têm sido testados relativamente ao seu potencial anti-viral em plantas. A investigação tem-se concentrado em dois nucleótidos análogos – ribavirina (virazole) e 5-dihidro-azauracil (DHT), e recentemente num composto derivado do DHT, diacetil-dihidro-5-azauracil (DA-DHT) (Schuster, 1988). No caso da macieira, a ribavirina tem-se revelado particularmente eficaz na inibição da replicação dos vírus ApMV e “Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV) (Hansen, 1985; Hansen, 1988). O sucesso do uso de agentes anti-virais para eliminar vírus de uma planta tem sido limitado, possivelmente devido à íntima relação entre o metabolismo do vírus e o da planta (Horst e Cohen, 1980). Em particular em amendoeira cv. Boa Casta, os viricidas aplicados induziram elevadas percentagens de hiperhidratação (Raquel, 1998), pelo que não foi aplicado qualquer tratamento de quimioterapia no presente trabalho. No entanto, novos compostos estão constantemente a ser desenvolvidos, e combinações de vários deles poderão eventualmente permitir a eliminação dos Ilarvírus que afectam esta cultivar.

Cultura de Meristemas

A cultura de meristemas envolve a excisão de um ápice meristemático em conjunto com um ou dois primórdios foliares da planta - o tamanho mínimo dos ápices excisados varia com as diferentes espécies de plantas e vírus - conjunto esse posteriormente cultivado num meio nutritivo *in vitro*. Tem sido indicada como um método de saneamento eficaz que garante simultaneamente a estabilidade genética e a produção em larga escala (Kantha, 1984 *in* Kantha, 1986; Long e Cassells, 1986; Ribas e Zanette, 1992). No entanto, ainda não foram esclarecidos quais os mecanismos que permitem a eliminação dos vírus dos tecidos meristemáticos. Segundo Pierik (1987), inicialmente sugeriu-se que há competição nas células do tecido meristemático entre a produção de partículas virais e a produção de componentes celulares. É igualmente possível que seja a ausência de elementos vasculares no meristema a dificultar significativamente o transporte das partículas virais (Quak, 1966), hipótese explicativa que continua a ser adoptada por alguns autores. Outros sugeriram que as fortes concentrações auxínicas encontradas nos meristemas inibem a replicação dos vírus (Quak, 1977). Mellor e Stace-Smith (1969) propuseram a ausência nos tecidos meristemáticos de enzimas que seriam essenciais para a multiplicação viral, e Martin-Tanguy *et al.* (1976) sugeriram a presença de inibidores naturais.

Alguns autores salientam a dificuldade no isolamento do meristema, prejudicando frequentemente a sua integridade (Gribaudo *et al.*, 1997), e o efeito da sua reduzida dimensão no vigor dos tecidos, nomeadamente pelas reduzidas taxas de estabelecimento, crescimento e propagação (Lankes, 1995). Roux (1987) refere que em muitas espécies é impossível excisar um explante suficientemente pequeno para garantir a ausência de doença viral e simultaneamente assegurar a formação de plântulas. Perante estes factos e, atendendo à reduzida percentagem de sobrevivência dos meristemas isolados a partir de material *in vitro* em amendoeira cv. Boa Casta (Raquel, 1998), optou-se neste trabalho pela aplicação de termoterapia seguida do isolamento de ápices vegetativos em material *in vitro*, enquanto se tentava avaliar a necessidade de se recorrer a dimensões muito reduzidas para assegurar a eliminação dos vírus (vide III., RT-PCR *in situ* para detectar vírus no ápice vegetativo).

Após a fase da terapia, podem ainda existir títulos indetectáveis de vírus. Por este facto, vários autores recomendam a manutenção das plantas em crescimento por um período de tempo prolongado, para permitir que tais títulos atinjam níveis detectáveis. Esse tempo de espera pode variar com a planta hospedeira, os vírus, e a localização geográfica (Spiegel *et al.*, 1993; Lankes, 1995). Deste modo, a eficácia dos procedimentos aplicados neste trabalho para a eliminação dos Ilarvírus só pode ser avaliada após repetidos testes de detecção durante um período de tempo a ser determinado empiricamente.

1.2. Enraizamento e aclimação em amendoeira

No presente programa de saneamento, o enraizamento e a aclimação são passos fundamentais para o estabelecimento dos rebentos tratados no solo, mesmo que se pretenda posteriormente a enxertia destas plantas em porta-enxertos adequados.

O enraizamento resulta de um complexo de processos bioquímicos e fisiológicos influenciados por diversos factores. Em particular, o enraizamento *in vitro* é influenciado por factores genéticos, juvenildade, reguladores de crescimento, compostos fenólicos, qualidade prévia dos rebentos de sub-culturas anteriores, actividade peroxidásica, fotoperíodo, intensidade e qualidade da luz, entre outros (Nemeth, 1986 *in* Rugini *et al.*, 1993). As auxinas exercem uma forte influência na organização de meristemas que originam órgãos definidos como as raízes; em tecidos organizados, as auxinas parecem ser os principais determinantes na indução de raízes (Gaspar *et al.*, 1996). Neste âmbito, para a indução de enraizamento têm sido utilizadas tanto auxinas existentes naturalmente nas plantas, como sejam o ácido indol-3-acético (IAA) ou o ácido indol-3-butírico (IBA), como auxinas sintéticas por vezes com maior actividade, como é o caso do ácido 1-naftalenoacético (NAA) e do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Gaspar *et al.*, 1996).

Muitas espécies lenhosas têm dificuldade em enraizar por métodos convencionais após o estado juvenil. Na amendoeira, o enraizamento é particularmente difícil, tanto *in vivo* como *in vitro*, neste último caso apenas bem sucedido para algumas cultivares (Rugini, 1987; Rugini, 1993; Caboni e Damiano, 1994). Por outro lado, tem sido demonstrado em amendoeira que o processo de enraizamento é estritamente dependente

do genótipo (Rugini e Verma, 1983; Caboni e Damiano, 1994; Caboni *et al.*, 1997). Em *Prunus* ssp., para a mesma cultivar, a escolha da auxina e respectiva concentração para a indução de enraizamento difere com as condições de cultura específicas utilizadas em cada laboratório (Druart, 1992). Dada também a escassez de literatura disponível sobre enraizamento em amendoeira, surgiu a necessidade de definir condições adequadas para o enraizamento de rebentos micropropagados.

Existem condições que têm sido indicadas como geralmente favoráveis ao enraizamento de algumas espécies de lenhosas, e de *Prunus* em particular. Nomeadamente, o prévio alongamento dos rebentos é favorável ao enraizamento de *Prunus* ssp. (Druart, 1992) e de amendoeira (Rugini, 1986). A escuridão durante a primeira semana da fase de enraizamento é frequentemente essencial para estimular o enraizamento em várias espécies lenhosas (Sriskandarajah *et al.*, 1982; Rugini e Verma, 1983; Rugini *et al.*, 1993). Na amendoeira, a escuridão pelo menos da parte basal do rebento parece ser essencial para a formação de raízes (Rugini *et al.*, 1993). A actividade auxínica pode ser aumentada por compostos fenólicos inibidores da oxidase do IAA, nos quais se incluem o floroglucinol, o catecol, o ácido clorogénico e a rutina (Gaspar *et al.*, 1996). Recentemente, de Klerk *et al.* (1995) identificou o enraizamento adventício em rebentos de macieira como um processo envolvendo fases distintas – desdiferenciação, indução e diferenciação - cada uma com os seus requisitos, e sugeriu a remoção da auxina do meio indutor após a formação dos primórdios radiculares, propondo que o efeito prejudicial desta hormona se deve, pelo menos parcialmente, à estimulação da síntese de etileno. Com base nestes dados, no presente trabalho os ensaios para a optimização do enraizamento envolveram a indução hormonal, no escuro, de rebentos apresentando alongamento de entrenós, durante um período determinado, findo o qual foram transferidos para um meio sem qualquer auxina e num dos ensaios suplementado com floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenzeno).

1.3. Métodos de detecção viral

Os sintomas observados em árvores de fruto, hospedeiros-teste herbáceos e espécies indicadoras lenhosas pode variar significativamente, dependendo da estirpe ou do isolado do vírus. Certos produtos químicos ou patogéneos não relacionados com vírus

podem causar sintomas “virus-like” (Uyemoto e Scott, 1992). A diagnose pode ainda ser dificultada nos casos de vírus instáveis, estirpes desconhecidas, ou vírus em plantas lenhosas. Deste modo, enquanto que algumas viroses podem ser diagnosticadas pelos sintomas, é prudente analisar amostras representativas por métodos mais precisos, de acordo com os vírus e o hospedeiro em causa. Por vezes é necessário utilizar mais do que um método, para aumentar a informação e a confiança no diagnóstico. O diagnóstico baseado na utilização de plantas indicadoras – indexagem biológica – é pouco seguro porque as reacções e sintomas de uma planta variam consoante as condições ambientais, cultivares da planta, e estirpes do vírus, para além de ser bastante moroso. No caso dos Ilarvírus PDV e PNRSV, um dos testes mais sensíveis é a indexagem biológica em *Prunus serrulata* Lindl. cv. Shiro-fugen, o qual não diferencia o PDV do PNRSV (Parakh *et al.*, 1995). Outros métodos, como sejam a microscopia electrónica e detecção dos ácidos nucleicos virais através de sondas radioactivas podem não ser práticos para alguns laboratórios. Os métodos serológicos têm sido os mais utilizados por serem simples e práticos, destacando-se o teste ELISA que desde o seu desenvolvimento para a virologia de plantas (Clark e Adams, 1977) tem sido o teste de diagnose mais amplamente usado para vírus para os quais existam anti-soros disponíveis (Spiegel *et al.*, 1993). Nomeadamente, a variante DAS-ELISA tem sido aplicada em estudos epidemiológicos e monitorização de infecções em plantas com interesse económico. No entanto, a confiança nos resultados do ELISA reduz-se ao período da Primavera, estação de crescimento durante a qual os vírus apresentam um título mais elevado (Barbara, 1980; Clark *et al.*, 1976), sendo pouco eficaz na detecção de baixos títulos virais (Nolasco, 1993). No caso dos vírus PDV e PNRSV, os resultados do ELISA podem ser inconclusivos devido à variação antigénica que apresentam, à reduzida concentração em que se encontram na maioria das árvores, e a flutuações nas concentrações dos vírus na árvore (Scott *et al.*, 1992b). Dos métodos de detecção baseados em hibridação molecular, destaca-se a hibridação “dot-blot” (DIBA), cuja sensibilidade é comparável à do teste ELISA (*in* Candresse *et al.*, 1995b) e evita os problemas relacionados com os diferentes serotipos do vírus a detectar. As técnicas de “immunotissue printing” (Lin *et al.*, 1990; Knapp *et al.*, 1995) são rápidas e não têm grandes exigências de material, mas nem sempre atingem uma sensibilidade comparável à dos testes ELISA ou DIBA (*in* Candresse *et al.*, 1995b). Os métodos baseados na

amplificação genómica têm vindo a conquistar um lugar de destaque na detecção viral, nomeadamente: “Polimerase Chain Reaction” (PCR) (Saiki *et al.*, 1985), “Self-Sustained Sequence Replication” (3SR) (Guatelli *et al.*, 1990), “Nucleic Acid Sequence Based Amplification” (NASBA) (Davey e Malek, 1989), “Strand Displacement Amplification (SDA) (Walker *et al.*, 1992), “Ligation Activated Transcription” (LAT) (Schuster *et al.*, 1995) (*in* Nolasco, 1996).

A técnica de PCR baseia-se na amplificação enzimática rápida e altamente específica de uma determinada sequência de DNA, utilizando uma DNA polimerase termo-estável dirigida por iniciadores específicos. O produto obtido deste processo cíclico é separado por electroforese em gel, podendo ser identificado por sondas específicas de cDNA. Com a sua relativa simplicidade e sensibilidade, o método de PCR permite detectar quantidades mínimas de vírus em tecidos vegetais. No entanto, a sua aplicação requer o conhecimento de sequências virais para a síntese de iniciadores adequados (*in* Spiegel *et al.*, 1993). Para muitos vírus de RNA em plantas, a técnica envolvendo transcrição inversa-PCR (RT-PCR) mostrou ser muito mais eficaz do que o teste ELISA, especialmente quando o título do vírus é baixo ou quando não estão disponíveis antisoros de boa qualidade (*in* Mackenzie *et al.*, 1997). Com base nestes resultados, foram desenvolvidos no presente trabalho dois métodos envolvendo RT-PCR para detectar o PDV, utilizando iniciadores específicos para o gene da cápside proteica deste vírus.

1.3.1. O método IC/RT-PCR para a detecção do PDV

Recentemente têm sido descritos vários métodos para a preparação de amostras de plantas para PCR (Wetzel *et al.*, 1991; Singh e Singh, 1997; Thomson e Dietzgen, 1995). O mais simples baseia-se na introdução do tecido vegetal directamente na mistura de reacção de PCR (Berthomieu e Meyer, 1991 *in* Thomson e Dietzgen, 1995). No entanto, vários extractos de plantas têm mostrado conter substâncias que inibem essa reacção (Vunsh *et al.*, 1991; Singh e Singh, 1996). Para ultrapassar esta questão, os métodos de detecção baseados em PCR têm sofrido melhoramentos tanto ao nível da preparação da amostra como da especificidade da reacção de amplificação. É o caso dos métodos de extracção de RNA com a utilização de compostos como sacarose, albumina

de soro bovino (BSA), polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico, 2-mercaptoetanol, dodecil sulfato de sódio (SDS) e acetato de potássio (Rowhani *et al.*, 1993); com passagem do extracto por uma coluna Sephadex (Vunsh *et al.*, 1991); com a utilização de kits para extracção de RNA disponíveis no mercado (Mackenzie *et al.*, 1997); ou utilizando a resina comercial “GeneReleaserTM” quelante de compostos polifenólicos (Levy *et al.*, 1994.). No caso do PDV, esta resina foi aplicada com sucesso em conjunto com a precipitação por polietileno glicol (PEG) em alternativa ao etanol (Parakh *et al.*, 1995). O método IC/RT-PCR é outro importante desenvolvimento, uma vez que a maioria dos vírus de plantas com importância económica possuem genomas de RNA. Nomeadamente, este tem sido descrito como um dos métodos para atenuar os efeitos de substâncias inibidoras do PCR (Wetzel *et al.*, 1992; Minafra e Hadidi, 1994; Candresse *et al.*, 1995a; Mackenzie *et al.*, 1997).

O IC/RT-PCR envolve (i) imunocaptura dos vírus – concentração e purificação parcial do vírus por anticorpos adsorvidos a uma fase sólida, (ii) transcrição inversa e “polymerase chain reaction” (PCR), e (iii) quantificação dos produtos amplificados. A preparação das amostras é muito simples, semelhante à do teste ELISA. A aplicação da imunocaptura dispensa uma etapa específica para a ruptura da cápside viral, uma vez que a actividade da transcriptase inversa é por si só capaz de extrair o RNA viral dos viriões desestabilizados nesta etapa (Wyatt, 1993). Esta etapa é compatível com a conjugação de RT e PCR num só passo, tanto nos compartimentos de microplacas (Nolasco *et al.*, 1993; Kokko *et al.*, 1996) como em tubos para PCR (Candresse *et al.*, 1995a; Raquel, 1998). Os tecidos vegetais variam quer na facilidade com que o ácido nucleico viral pode ser liberto, quer na presença de factores inibitórios (Thomson e Dietzgen, 1995), ambas as propriedades podem variar numa mesma cultivar (Singh, não publicado *in* Singh, 1998). Os factores que influenciam a libertação do ácido nucleico incluem a espessura e composição da parede celular vegetal, a presença de polissacáridos como o amido e de metabolitos secundários reactivos como os compostos fenólicos. Os vírus variam também no tipo de tecidos que infectam, na sua distribuição irregular pelo tecido, no tipo de infecção - sistémica ou localizada – e na variação da concentração viral em vários órgãos, como sejam as folhas *versus* raízes (Vunsh *et al.*, 1991; Thomson e Dietzgen, 1995; Singh e Singh, 1996). Tem sido igualmente demonstrada a importância da composição e do pH do tampão de extracção, da

temperatura de incubação e do tempo de libertação do vírus do material vegetal (Thomson e Dietzgen, 1995).

O IC/RT-PCR tem vantagens relativamente a outros métodos envolvendo RT-PCR ou hibridação molecular: elevada sensibilidade, aumentada pelo passo de imunocaptura seguido de amplificação por RT-PCR, elevada especificidade devido à combinação da captura de anticorpos específicos para o vírus com a especificidade dos iniciadores, e a detecção viral directamente nos extractos vegetais, eliminando a necessidade da extracção dos ácidos nucleicos (Jacobi *et al.*, 1998). Comparativamente ao teste ELISA, o presente método aumenta a sensibilidade da detecção em várias ordens de magnitude (Wetzel *et al.*, 1992; Candresse *et al.*, 1995a; Rowhani *et al.*, 1995; Jacobi *et al.*, 1998). Por outro lado, o método requer elevada competência técnica e a utilização do gel de electroforese reduz o potencial de automatização, questão ultrapassada por exemplo pela aplicação de protocolos de detecção por espectrofotometria (Holland *et al.*, 1991 *in* Nolasco, 1996). A sensibilidade da detecção por PCR pode ser melhorada amplificando fragmentos relativamente pequenos (Rosner *et al.*, 1997; Singh e Singh, 1997). Para a detecção por electroforese dos produtos de amplificação, as sequências com 200pb a 600pb têm mostrado ser as mais adequadas (*in* Nolasco, 1996).

1.3.2. Extracção de RNA bicatenário para RT-PCR

No âmbito da detecção de vírus, têm sido desenvolvidos métodos para o isolamento e análise de RNAs viral em plantas (Morris e Dodds, 1979; Bar-Joseph *et al.*, 1983; Jordan *et al.*, 1983; Morris *et al.*, 1983; Valverde *et al.*, 1990; Carvalho e Pereira, 1997). Os vírus RNA de cadeia simples (RNAss) representam cerca de 90% de todos os vírus de plantas conhecidos. Durante a sua replicação nas células vegetais, o RNAs é produzido como produto intermediário, sendo designado por forma replicativa (FR), e está consistentemente presente quando uma planta é infectada por um vírus RNAss, independentemente do hospedeiro em causa. Estes RNAs são muito resistentes à degradação enzimática, sendo a técnica de detecção de RNAs apropriada para vírus instáveis (*in* Valverde *et al.*, 1990) como é o caso do PDV. A análise de RNAs “convencional” baseia-se no isolamento de RNAs específicos a partir do tecido da planta infectada e na sua separação por electroforese em gel, normalmente de

poliacrilamida a 6% ou de agarose a 1,0-1.5%, o qual é posteriormente corado e observado (*in Valverde et al.*, 1990; *in Spiegel et al.*, 1993). Esta análise é um rápido instrumento de detecção de vírus não caracterizados ou cujo estado em que se encontram ainda é desconhecido (*in Spiegel et al.*, 1993). No entanto, podem surgir falsos-positivos ou falsos-negativos devido à presença de RNAds não virais em plantas saudáveis, à aparente ausência de um perfil de RNAds em alguns vírus, e à presença de componentes da planta hospedeira que podem interferir com a extracção do RNA (Valverde *et al.*, 1990). De facto, as plantas podem conter vírus de RNAds, formas replicativas de RNA satélite, ou RNAds de origem desconhecida (RNAds celular) (Jordan *et al.*, 1983; Valverde *et al.*, 1986), sendo necessária a confirmação dos resultados negativos por outros métodos para que o material seja considerado “isento” do vírus (*in Spiegel et al.*, 1993). A combinação de extracção do RNAds com a técnica de RT-PCR evita este problema uma vez que só é amplificado o fragmento flanqueado pelos iniciadores fornecidos. A avaliação desses resultados evita os problemas da interpretação do padrão de bandas de RNA quando o método não envolve a RT-PCR.

Um dos principais factores limitantes da aplicação da técnica de PCR no diagnóstico de rotina reside no isolamento de ácidos nucleicos de boa qualidade, isentos de inibidores da reacção de PCR, como é frequente no caso de plantas lenhosas como a videira e muitas cultivares de *Malus*, *Prunus* e *Pyrus*. A extracção do RNAds reduz os efeitos negativos dos compostos fenólicos e de outras substâncias inibitórias e, ao contrário da imunocaptura, permite guardar o extracto obtido a -20°C por tempo indeterminado pelo facto do RNAds ser muito estável. Considerando a provável variabilidade do título viral nos tecidos infectados, a combinação da extracção de RNAds com a técnica de RT-PCR tem um nível de sensibilidade comparável ao obtido por IC/RT-PCR (Wetzel *et al.*, 1992; Mackenzie *et al.*, 1997).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Estabelecimento e manutenção de culturas <i>in vitro</i>	27
2.1.1. Preparação de stocks, meios de cultura e material acessório	27
2.1.2. Estabelecimento <i>in vitro</i> de material de campo	28
2.1.3. Micropropagação de rebentos	29
2.2. Ensaio de saneamento de doenças virais	29
2.2.1. Termoterapia	29
2.2.2. Cultura de meristemas de material de campo	32
2.3. Enraizamento e aclimação dos rebentos tratados	33
2.4. Análise do material vegetal resultante dos ensaios de saneamento	36
2.4.1. Optimização do método IC/RT-PCR para a detecção do PDV ...	36
2.4.1.1. Recolha e preparação do material vegetal	36
2.4.1.2. Imunocaptura das partículas virais	37
2.4.2. Adaptação do método de extração de RNA bicatenário para a detecção do PDV	38
2.4.3. Optimização da transcrição inversa e da amplificação por PCR .	39
2.4.4. Análise dos produtos amplificados – electroforese em gel de poli-acrilamida e hibridação “Southern blot”	42

II. Estudos de saneamento de viroses e de detecção do vírus PDV em amendoeira

2.1. Estabelecimento e manutenção de culturas *in vitro*

2.1.1. Preparação de stocks, meios de cultura e material acessório

Os meios de cultura para material juvenil (MJ) e para material adulto (MA) utilizados no decorrer deste trabalho (*vide* Tabela 1) foram preparados a partir das soluções stock seguintes:

- Macronutrientes, micronutrientes e fonte de ferro do meio Murashige e Skoog (1962) - solução concentrada 10x
- Vitaminas do meio Murashige e Skoog (1962) - solução concentrada 500x
- Fitorreguladores IBA e N⁶ benzilaminopurina (BAP) – 1 mg/ml.

Estas soluções foram mantidas numa câmara frigorífica a 4°C, ou a -20°C no caso das vitaminas ou das soluções de utilização pouco frequente. Para preparar os meios MJ e MA, utilizaram-se as soluções stock nas proporções indicadas na Tabela 1, às quais se adicionaram sacarose 20% e água bidestilada. O pH foi corrigido para 5,7, por adição de soluções de NaOH e de HCl, e o meio solidificado por adição de agar na concentração de 7g/l cozido em forno de microondas. Os meios assim preparados foram distribuídos por boiões (aproximadamente 50 ml por boião com 8 cm de diâmetro e 9 cm de altura), ou tubos (10 ml por tubo com 3 cm de diâmetro e 13 cm de altura). Alternativamente, foram armazenados 500 ml em garrafas de 1l para posterior distribuição por boiões previamente esterilizados. Todos os meios foram esterilizados por autoclavagem a 121°C, 1 atm durante 20 min.

O material vegetal foi assepticamente manuseado em câmara de fluxo laminar horizontal, utilizando material de dissecação – bisturis e pinças – esterilizado por imersão em etanol a 96% seguida de flamejamento.

Todo o material de vidro utilizado ao longo deste trabalho foi esterilizado a seco em estufa a 120°C durante 1h, tendo sido previamente protegido por papel de embrulho ou folha de alumínio.

Tabela 1 – Composição dos meios de cultura baseados no meio de Murashige e Skoog (MS) (1962) utilizados na micropropagação de rebentos da cv. Boa Casta, provenientes de material de campo adulto (MA) e material juvenil (MJ) (Miguel, 1996).

Componentes	MJ	MA
Macronutrientes		
Micronutrientes	MS	=
Vitaminas		
Fonte de Ferro		
Fonte de carbono		
Sacarose (g/l)	20	=
Fitorreguladores		
IBA (mg/l)	0,01	=
BAP (mg/l)	0,3	0,8
Agar		
Microagar (g/l)	7,0	=
pH	5,7	=

2.1.2. Estabelecimento *in vitro* de material de campo

Para o isolamento de material adulto, foram colhidos durante a Primavera do ano de 1998 ramos jovens de árvores da cultivar portuguesa de amendoeira Boa Casta no Centro de Investigação Agrária de Tavira. Estes ramos foram imediatamente transportados numa mala térmica para o laboratório, onde foram conservados numa câmara frigorífica a 4°C até à sua utilização. No dia seguinte, procedeu-se à desinfecção superficial destes ramos. As folhas de cada ramo foram removidas com o auxílio de uma tesoura. Os ramos foram lavados suavemente em água corrente com o auxílio de uma escova (em sentido contrário ao do crescimento dos meristemas), seccionados em porções com cerca de 10 cm as quais foram imersas numa solução de detergente comercial diluído em água bidestilada (10 gotas de detergente/l de água), por um período não superior a 25 min. Seguidamente, este material vegetal foi transferido para um ambiente estéril – câmara de fluxo laminar – onde foi imerso numa solução de etanol a 70% durante cerca de 30 s, e posteriormente transferido para uma solução de

lexívia “Domestos 3” diluída 10x em água bidestilada estéril. Ao fim de 30 min, o material vegetal foi lavado 3x 5 min em água destilada estéril. Finalmente, cada segmento nodal foi isolado em condições de assépsia e inoculado verticalmente em tubos de cultura contendo meio MA estéril.

2.1.3. Micropropagação de rebentos

Os rebentos regenerados a partir dos nós esterilizados foram transferidos para boiões (5-7 por boião) contendo meio MJ. Os rebentos provenientes de amêndoas germinadas *in vitro* - material juvenil – foram obtidos pela sub-cultura de rebentos gentilmente cedidos por C. Miguel.

Após o estabelecimento *in vitro* quer do material adulto quer do juvenil, os respectivos rebentos foram sujeitos a sub-culturas de 21 dias em meio MJ fresco, numa câmara a 22 ± 2 °C, sob lâmpadas fluorescentes de luz branca (Sylvania GRO-LUX F 36 W (GRO)) com $20-30 \mu\text{mol fotões.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sob fotoperíodo de 16h. Para amplificar o material adulto *in vitro*, inicialmente os respectivos rebentos foram submetidos a sub-culturas alternadas nos meios MJ e MA.

2.2. Ensaios de saneamento de doenças virais

2.2.1. Termoterapia

Ao longo deste trabalho foram realizados os ensaios de termoterapia A, B, C, D, E e F em rebentos provenientes de material juvenil da cv. Boa Casta (Tabela 2).

Inicialmente, estes rebentos foram transferidos dos frascos para tubos de cultura com meio MJ – sub-cultura antecedente do primeiro tratamento (T), e igualmente mantidos em câmara a 22 ± 2 °C sob fotoperíodo de 16h. Todos os tratamentos de termoterapia foram efectuados numa câmara de termoterapia programada para 8h de escuro a 31 ± 2 °C e 16h de luz a 38 ± 2 °C. No final de cada tratamento de termoterapia, a porção apical do rebento desenvolvida durante o tratamento (ápice vegetativo com cerca de 1mm acompanhado por 2 folhas) foi transferida para meio fresco voltando à

câmara de cultura *in vitro* a 22 ± 2 °C, onde foi sujeita a 3 sub-culturas de 21 dias para possibilitar o estabelecimento adequado das culturas, a proliferação dos rebentos e a colheita de folhas para a detecção viral.

No ensaio A, 11 plântulas sofreram uma sub-cultura de 10 dias, após o que foram transferidas para meio MJ fresco e colocadas numa estufa adaptada para termoterapia, durante 16 dias. No final deste primeiro tratamento, a porção apical das plântulas sobreviventes foi seccionada em esterilidade e transferida para meio MJ fresco. Cada uma destas porções sofreu sucessivamente três sub-culturas de 21 dias em condições normais de micropropagação (*vide* 2.1.3.), após o que se procedeu a um segundo ciclo de sub-cultura de 10 dias + tratamento de termoterapia de 16 dias, em condições idênticas ao primeiro.

No ensaio B, 18 plântulas foram sujeitas a uma sub-cultura de 21 dias, após o que foram transferidas para meio MJ fresco e colocadas na estufa de termoterapia, durante 20 dias. No final deste primeiro tratamento, o procedimento foi análogo ao do ensaio A, submetendo-se as plântulas a um segundo ciclo de sub-cultura de 21 dias + tratamento de termoterapia de 20 dias.

Após a observação de que no ensaio A/1º tratamento, a percentagem de sobrevivência das plântulas foi maior do que a do ensaio B mas inferior a 90%, procedeu-se ao ensaio C. Neste último, 18 plântulas foram sujeitas ao procedimento do ensaio A alterado - diminuiu-se para 7 dias a duração da sub-cultura precedente a cada tratamento de termoterapia. Os ensaios D, E e F basearam-se no procedimento do ensaio C com algumas variações. No ensaio D, apenas o ápice de cada uma das 18 plântulas foi sujeito aos tratamentos de termoterapia, utilizando-se o meio de cultura proposto por Druart para induzir a formação de “multi-ápices” (Druart, comunicação pessoal, 1998). Este meio foi utilizado para tentar melhorar o processo de regeneração dos rebentos a partir destes ápices. No ensaio E, este mesmo meio foi utilizado apenas na 1ª sub-cultura após a termoterapia. No ensaio F, a duração de cada tratamento foi de 20 dias em vez de 16 dias.

Como controlos, foram mantidos rebentos não sujeitos a qualquer tratamento em meios de cultura idênticos aos dos rebentos tratados.

Tabela 2 – Etapas principais dos ensaios de termoterapia em rebentos provenientes de material juvenil da cv. Boa Casta. Quando não se refere o meio de cultura utilizado, significa que o material foi mantido em meio MJ. (Sc(s) – Sub-cultura(s); T – Tratamento).

ENSAIOS	PASSOS DA TERMOTERAPIA				
	I Sc. pré 1ºT	II 1º T	III Scs. entre 1ºT e 2ºT	IV 2ºT	V Sc. pós 2ºT
A	10 dias	16 dias	a) Isolamento da porção apical b) 3 Scs. de 21 dias c) 1 Sc. de 10 dias	16 dias	a) Isolamento da porção apical b) Scs. de 21 dias
B	21 dias	20 dias	a) Isolamento da porção apical b) 3 Scs. de 21 dias c) 1 Sc. de 21 dias	20 dias	a) Isolamento da porção apical b) Scs. de 21 dias
C	7 dias	16 dias	a) Isolamento da porção apical b) 3 Scs. de 21 dias c) 1 Sc. de 7 dias	16 dias	a) Isolamento da porção apical b) Scs. de 21 dias
D	7 dias	16 dias – ápices em meio Druart	a) 3 Scs. de 21 dias b) 1 Sc. de 7 dias	16 dias – ápices em meio Druart	Scs. de 21 dias
E	7 dias	16 dias	a) Isolamento da porção apical b) 1 Sc. de 21 dias em meio Druart c) 2 Scs. de 21 dias d) 1 Sc. de 7 dias	16 dias	a) Isolamento da porção apical b) 1 Sc. de 21 dias em meio Druart c) Scs. de 21 dias
F	7 dias	20 dias	a) Isolamento da porção apical b) 3 Scs. de 21 dias c) 1 Sc. de 7 dias	20 dias	a) Isolamento da porção apical b) Scs. de 21 dias

2.2.2. Cultura de meristemas de material de campo

O isolamento de meristemas de material adulto foi efectuado a partir de material preparado e esterilizado de forma idêntica à utilizada para o isolamento de segmentos nodais (*vide* 2.1.2.). No final da desinfecção, o material vegetal permaneceu numa solução de ácido ascórbico 5mg/l até ao isolamento dos meristemas. Entretanto, a lupa foi parcialmente esterilizada por lavagem com etanol a 96% e colocada na câmara de fluxo laminar horizontal para se proceder ao isolamento dos meristemas. Para este efeito, utilizaram-se nós individualizados fazendo um escalpe sob o respectivo gomo e retirando as escamas basais do gomo. As restantes brácteas e os primórdios foliares foram retirados com o auxílio do bisturi e da pinça por observação à lupa (25x), até à remoção do meristema em conjunto com os dois primórdios foliares adjacentes. O meristema foi excisado segundo um corte côncavo uma vez que os tecidos subjacentes são necessários para assegurar a sua sobrevivência. Foi dada uma atenção especial à rapidez na fase inicial do isolamento do meristema, uma vez que dela depende o grau de desidratação e de oxidação dos tecidos que podem inviabilizar a regeneração. Estes meristemas foram transferidos e mantidos individualmente durante uma sub-cultura de 21 dias em placas de cultura de tecidos de 24 poços (Nunc “multidish”) com cerca de 1ml de meio indutor de “multi-ápices”. Após desenvolvimento, os meristemas foram transferidos para meio MJ. Durante os primeiros 3 dias de cultura, os meristemas isolados foram mantidos no escuro para evitar a oxidação (George e Sherrington, 1984 *in* Ribas e Zanette, 1992), após o que foram transferidos para as condições normais de fotoperíodo e de temperatura utilizadas na micropropagação (*vide* 2.1.3.).

2.3. Enraizamento e aclimação das plantas resultantes dos programas de saneamento

Os ensaios de enraizamento de rebentos micropropagados foram realizados com material juvenil propagado a partir de uma semente germinada *in vitro*, obtida por polinização aberta da cultivar portuguesa Boa Casta. O material foi estabelecido *in vitro* em Março de 1993 por C. Miguel. Apesar de terem sido estabelecidas culturas a partir de várias sementes, para evitar situações de variabilidade entre germinantes, estes ensaios foram realizados sempre com rebentos do mesmo clone, ou seja, proveniente de uma única semente.

Tendo sido verificado previamente por C. Miguel que, ao contrário do que sucede noutras lenhosas, em amendoeira não há formação de raízes na ausência de uma auxina no meio de cultura, tal condição não foi testada para enraizamento no presente trabalho.

Os rebentos foram mantidos em meio de micropropagação MJ e sujeitos a sub-culturas de 21 dias. Inicialmente foram realizados sete ensaios diferentes (E₁ a E₇) idealizados por C. Miguel com base em dois métodos previamente descritos por Collet e Le (1987) – “Brief Induction Pretreatment” (BIP) e “Long Initiation Pretreatment” (LIP). Em cada ensaio foram utilizados 20 rebentos com 21 dias de sub-cultura e com alongamento dos entrenós, os quais foram sujeitos a indução hormonal em meio sólido suplementado com uma auxina – IAA ou IBA – com diferentes concentrações e período de aplicação, no escuro. Nomeadamente, O pH foi ajustado para 5,8 e o meio solidificado com agar 7g/l ou gelrite 2g/l. Seguidamente, os mesmos rebentos foram transferidos para um meio sem hormonas à luz (*vide* Tabelas 3 e 4). As culturas foram mantidas nas mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa utilizadas na micropropagação. Durante os 21 dias após o início dos tratamentos hormonais, efectuaram-se observações periódicas em relação aos seguintes parâmetros: percentagem de enraizamento, número de raízes por rebento enraizado, comprimento médio das raízes, e percentagem de necrose apical.

Numa fase posterior, efectuaram-se seis novos ensaios em paralelo com os respectivos controlos. Os ensaios E₈ e E₉ corresponderam a um “tratamento de choque” hormonal – meio líquido com uma concentração muito elevada de auxinas durante 1min. Nos ensaios E_{2f} e E_{4f}, o IAA e o IBA, respectivamente, foram esterilizados por filtração em lugar de serem autoclavados, no sentido de verificar, por comparação com

E₂ e E₄, a possibilidade do IAA ou do IBA terem sido significativamente inactivados com a autoclavagem do meio de cultura, afectando os resultados finais. No ensaio E_{4-g} os rebentos não passaram pelo meio de cultura contendo gelrite, para verificar se a ausência deste passo influenciaria significativamente os resultados. Finalmente, foi testado o efeito do floroglucinol após o “choque” hormonal no E₄, numa tentativa de induzir a formação de raízes secundárias (James e Thurbon, 1981 *in* Trindade e Pais, 1997). Para tal, este composto foi esterilizado por filtração e adicionado na concentração 5mg/l aos meios de cultura E_{4B} e E_{4C} após a autoclavagem, antes do meio solidificar.

Os resultados dos ensaios de enraizamento foram sujeitos a tratamento estatístico. Os dados relativos à percentagem de enraizamento foram analisados pelo teste-t; os relativos ao número de raízes por rebento enraizado e ao comprimento médio das raízes foram analisados (1) pelo teste de Bartlett para verificar a homocedasticidade (igualdade das variâncias), (2) pela análise de variância (ANOVA) para testar se as médias calculadas foram significativamente diferentes, e (3) pelo teste de comparações múltiplas de Scheffé para detectar essas diferenças ($P < 0,05$).

A experiência seleccionada (E₄/IBA autoclavado) foi aplicada a rebentos a) não sujeitos a qualquer tratamento (controlo), b) previamente sujeitos a tratamentos de termoterapia e/ou quimioterapia (Raquel, 1998), ou c) submetidos a dois tratamentos de termoterapia consecutivos - T_A a T_F. Durante esta fase, todos os rebentos foram induzidos e mantidos individualmente em tubos contendo 30 ml de meio de cultura.

A aclimação foi inicialmente efectuada em condições improvisadas no laboratório – o conjunto couvettes-plântulas foi coberto por um saco de plástico transparente cujo interior foi pulverizado com água estéril para criar um ambiente de elevada humidade relativa. Esta cobertura foi sendo progressivamente perfurada até ser retirada. Tendo-se verificado a deficiência destas condições para a aclimação, foram aplicadas as condições oferecidas por um instituto que trabalha essencialmente com *Eucalyptus globulus* (RAÍZ). No entanto, estas condições não se revelaram as melhores para a amendoeira, pelo que a aclimação está actualmente a ser optimizada principalmente no que diz respeito ao controlo da temperatura e da podridão na base do caule das plântulas. Neste caso, os rebentos enraizados foram transferidos para alvéolos

contendo um substrato constituído por turfa e areia (1:1), no interior de um estufim com 80-95% de humidade relativa. Após cerca de 3 dias, os alvéolos foram transferidos para uma estufa, onde permaneceram até ao final do 1º mês de aclimação. Durante a aclimação, os rebentos foram sujeitos a tratamentos com fungicidas – inicialmente com o fungicida preventivo de contacto “Euparene” 2g/l (sulfamida); após três dias, com o fungicida preventivo e curativo de contacto “Sumisclex” 1,5g/l (dicarbomícida) e após duas semanas, com o fungicida sistémico “Derosal” 1g/l (benzimidol), cuja aplicação tem sido repetida de 2 em 2 semanas.

Tabela 3 - Ensaio para a optimização do enraizamento de rebentos provenientes de material juvenil da cv. Boa Casta, baseados no método BIP. F – meio esterilizado por filtração; -g – omissão da passagem pelo meio contendo gelrite (B); Vit. - vitaminas.

MEIOS DE CULTURA	1 NOITE / ESCURO A				1 SEMANA / LUZ B	ATÉ AO DESENV. DE RAÍZES / LUZ C
E ₁	175 mg/l	IAA	autoclavado	7g/l agar	MS/2 + Vit. MS + 20g/l sacarose + 2g/l gelrite	MS/2 + Vit. MS + 20g/l sacarose + 7g/l agar
E ₂	80		autoclavado			
E _{2f}	mg/l		filtrado			
E ₃	175 mg/l	IBA	autoclavado			
E _{4f}	80		filtrado			
E ₄	mg/l		autoclavado			
E _{4-g}						
E _{4 c/ floroglucinol}				MS/2 + Vit. MS + 20g/l sacarose + 2g/l gelrite + 5mg/l floroglucinol filtrado	MS/2 + Vit. MS + 20g/l sacarose + 7g/l agar + 5mg/l floroglucinol filtrado	

Tabela 4 - Ensaio para a optimização do enraizamento de rebentos provenientes de material juvenil da cv. Boa Casta, baseados no método LIP (“Long Induction Pretreatment”, E₅ a E₇) ou em “tratamentos de choque” hormonais (E₈ e E₉). Vit. - vitaminas.

MEIOS DE CULTURA	5 DIAS / ESCURO		ATÉ AO DESENVOLVIMENTO DE RAIZES / LUZ	
E ₅	MS/2 + Vit. MS + 20g/l sacarose + 2g/l gelrite	10µM IBA	MS/2 + Vit. MS + 20g/l sacarose + 7g/l agar	
E ₆	MS + Vit. MS + 30g/l sacarose + 7g/l agar	5µM		IAA
E ₇				IBA
1 MINUTO				
E ₈	1g/l			IAA
E ₉				IBA

2.4. Análise do material vegetal resultante dos ensaios de saneamento

2.4.1. Optimização do método IC/RT-PCR para a detecção do PDV

2.4.1.1. Recolha e preparação do material vegetal

Para a optimização do método IC/RT-PCR, foram utilizadas folhas de ramos provenientes de uma amendoeira situada em Monsanto, correspondente ao controlo positivo para a presença do PDV. Os ramos foram colhidos e imediatamente transportados numa mala térmica para o laboratório. Foram igualmente testados rebentos mantidos *in vitro* com 21 dias de sub-cultura, sujeitos ou não a tratamentos de termoterapia, os quais foram seccionados de forma a permitir a utilização da maior quantidade de material vegetal possível nos ensaios, mantendo-se a porção apical em cultura.

Os extractos do material vegetal foram preparados em tampão de extracção contendo PBS 1x, 0,05% Tween 20 e 2% PVP 25, a pH 7,2-7,4, suplementado no

momento com 0,2% BSA. Pesaram-se cerca de 0,2 g a 0,5 g de amostra, a qual foi macerada com a ajuda de um pilão em sacos de plástico contendo respectivamente 2-5 ml de tampão de extração. Cada saco foi cortado num canto de modo a recolher o extracto vegetal para um tubo Eppendorf de 1,5ml. A centrífuga foi previamente arrefecida para 4°C durante 10 min, e os extractos foram centrifugados a 8000 r.p.m. durante 5 min a 4°C.

Tendo como objectivo tecer comparações em termos de sensibilidade, e otimizar a concentração do extracto por forma a minimizar os efeitos inibitórios de determinadas substâncias nele existentes, foram feitas diversas diluições de um extracto de folhas da amendoeira de Monsanto infectada por PDV (árvore controlo positivo). Foi igualmente testado o efeito do composto dietilditiocarbamato de sódio (DIECA) a 0,2% adicionado ao tampão de extração, e a ausência de imunocaptura em várias condições: (a) diluições do extracto vegetal 1:1, 1:5 e 1:25, (b) controlo positivo em água miliQ estéril, e (c) diluição 1:1 do extracto vegetal obtido em tampão de extração contendo DIECA 0,2%.

2.4.1.2. *Imunocaptura das partículas virais*

Cada extracto clarificado (diluído ou não em água miliQ estéril) foi submetido à imunocaptura directamente nos tubos de 0,2 ml de capacidade utilizados para a reacção de RT-PCR. Estes tubos foram previamente revestidos pela adição de 50 µl/tubo de uma suspensão de anticorpos IgG anti-PDV (BIOREBA) diluída 1000x em tampão de revestimento contendo 1,59 g/l NaCO₃, 2,53 g/l NaHCO₃ e 0,20 g/l NaN₃ a pH 9,6, incubando-se durante 4h a 30°C e acordo com as instruções da BIOREBA. No final, os tubos foram lavados em PBS 3x 5 min e guardados a -20°C até ao momento de serem utilizados. Para a imunocaptura, foram incubados 50 µl de extracto/tubo durante 1h30min a 30°C, após o que os tubos foram lavados duas vezes 5 min em PBS e uma vez 5 min em água bidestilada estéril.

Para a optimização da imunocaptura, foram testadas variações na duração da incubação do extracto vegetal nos tubos revestidos, nomeadamente 1h30min a 4°C, 1h30min a 30°C, e durante a noite a 4°C.

2.4.2. Adaptação do método de extração de RNA bicatenário para a detecção do PDV

A extração de RNA bicatenário foi efectuada segundo um protocolo adequado a tecidos vegetais cedido por G. Nolasco da Universidade do Algarve. Este trabalho foi realizado no laboratório de fitopatologia da Estação Agronómica Nacional sob orientação de Margarida Teixeira Santos. O protocolo foi resumido aos seguintes passos:

1. Moeram-se 2-5 g (X) de tecido em azoto líquido, e o pó daí resultante foi transferido para um tubo de centrifuga ao qual se adicionou um volume de tampão de extração 4x superior às g de tecido utilizado (4xX ml, ex: 4x(2-5) ml).
2. Adicionaram-se a este tubo 2xX ml de fenol saturado com 2xX STE, 1xX ml de mistura de clorofórmio:isopentanol (24:1) e X/5 ml de m-cresol. Taparam-se e agitaram-se os tubos misturando bem as fases, durante pelo menos 30 min.
3. A mistura foi centrifugada a 6000 g durante 30 min (centrifuga Hettich EBA 12 R).
4. Recolheu-se cuidadosamente a fase aquosa para não a misturar com o material da interfase e adicionou-se-lhe EtOH, gota-a-gota com agitação, até se obter rigorosamente uma concentração de 16,5% EtOH.
5. Homogeneizaram-se 5g de celulose CF11 (utilizada para a remoção de compostos inibitórios da PCR) em 5 ml de STE-EtOH em cada amostra, e misturou-se a preparação de ácidos nucleicos com esta mistura, evitando a evaporação. Sujeitou-se a mistura final a agitação ligeira durante 5 a 10 min.
6. Tapou-se a base de uma seringa de 10 ml com um disco de entretela. Verteu-se a mistura final anteriormente em agitação para esta seringa, recolhendo o líquido vertido para um tubo. A filtração foi repetida até o líquido ficar límpido. Introduziu-se mais um disco de entretela na seringa, lavando-se então a celulose com 20 ml de STE-EtOH 16,5%.
7. Adicionou-se à seringa 1 ml de STE. Quando a seringa deixou de pingar, adicionou-se-lhe 3 ml de STE e recolheu-se todo o volume eluído num tubo de centrifuga.
8. A este tubo adicionaram-se 300 µl de 3M acetato de sódio com pH 5,2, e 7,5 ml de EtOH a 96%, acertando quando necessário o volume contido nos vários tubos com o mesmo EtOH. Sujeitou-se o material a precipitação pelo frio a -20°C durante 2h a 18h.

9. Centrifugou-se a mistura a 13000 g durante 10 min, eliminou-se no final o sobrenadante, secou-se o pellet sob vácuo ressuspendendo-o seguidamente em 400 µl de STE. A suspensão obtida foi transferida para um tubo de centrífuga de 1,5 ml, ao qual se adicionaram 40 µl de acetato de sódio, perfazendo o seu volume com EtOH mantido a -20°C. Sujeitou-se a mistura a precipitação pelo frio: -20°C durante 2h a 18h, ou -80°C durante 1h.
10. Centrifugou-se esta mistura a 13000 r.p.m. durante 10 min e no final eliminou-se o sobrenadante.
11. Adicionaram-se 500 µl de EtOH a 70% a -20°C a esta mistura, a qual foi sujeita a uma nova centrifugação a 13000 r.p.m. durante 10 minutos, após o que se eliminou o respectivo sobrenadante.
12. Ao pellet resultante adicionaram-se 250 µl de EtOH a 96% a -20°C, e centrifugou-se a 13000 r.p.m. durante 5 min, após o que se eliminou o respectivo sobrenadante secando-se o pellet na estufa a 37°C.
13. Ressuspendeu-se o pellet em 25 µl de água miliQ estéril, e guardou-se a suspensão resultante a -20°C.

O tampão STE foi previamente preparado com 0,5M Tris, 1M NaCl e 0,01M Na₂EDTA, a pH 6,8; e o tampão de extracção com 2xX STE, 3% SDS, 0,3% bentonite e 500 µl β-mercaptoetanol.

Tendo como objectivo verificar a sensibilidade do método e otimizar a concentração do RNAds isolado, testaram-se várias diluições da suspensão obtida - amostra concentrada, e diluída 1:1, 1:10 e 1:20.

2.4.3. Optimização da transcrição inversa e da amplificação por PCR (RT-PCR)

Para as reacções de RT-PCR, foram desenhados iniciadores (sintetizados por Pharmacia e Gibco-BRL) com base na sequência do gene codificante para a proteína da cápside do PDV (cp-PDV), sequência localizada no RNA 3 do PDV (Bachman *et al.*, 1994). Nos ensaios preliminares, utilizaram-se dois iniciadores desenhados por Raquel (1998): a montante o homólogo aos nucleótidos 1175-1196 (iniciador 1175, Pharmacia) e a jusante o complementar aos nucleótidos 1875-1896 (iniciador 1896, Pharmacia), para obter um fragmento de 722pb. Dado que vários autores recomendam a

amplificação de fragmentos mais pequenos - fragmentos com 200-600pb são mais adequados quando os produtos amplificados são sujeitos a análise electroforética (*in* Nolasco, 1996), foi desenhado um novo iniciador de 21 mer (5'TTTTACgggCACATTTggTCC 3') complementar aos nucleótidos 1370-1391 (iniciador 1391, Gibco-BRL).

Em cada corrida de PCR foram utilizados um controlo positivo e um controlo negativo interno - uma mistura de reacção com todos os reagentes mas sem a amostra-teste. A cada um dos tubos de PCR previamente sujeitos a imunocaptura foi adicionada uma mistura de reacção única para RT e PCR (Tabela 5). Os tubos de RT-PCR foram colocados num termociclador (BIOMETRA UNO-Thermoblock™) e submetidos ao seguinte programa de RT-PCR:

REACÇÃO	CICLOS	CONDIÇÕES
RT	1º	38°C 45 min
PCR	2º	94°C 2 min
	3º ao 7º	92°C 30s 54°C 1 min 72°C 1 min
	8º ao 37º	92°C 5s ou 15s 54°C 1 min 72°C 1 min
	38º	72°C 7 min

No final da RT-PCR, os tubos foram guardados a -20°C ou utilizados imediatamente para análise dos respectivos produtos.

Para a optimização do passo de RT-PCR, testaram-se diferentes combinações de iniciadores: 1175 e 1896 (para amplificar um fragmento de 722pb), 1175 e 1391 e 1896 (para dois fragmentos, um de 217pb e outro de 722pb), e 1175 e 1391 (para um fragmento de 217pb), no sentido de testar o factor comprimento do fragmento a amplificar. Foram também testadas diferentes concentrações de Taq DNA polimerase - 1,5, 2,0, 2,5 e 3 U/50 µl de reacção para uma concentração fixa de 0,5 µM de cada iniciador - e a concentração dos iniciadores escolhidos (1175 e 1391) - 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 µM de cada iniciador para uma concentração fixa de Taq DNA polimerase de

3U/50µl de reacção. Em relação ao programa de RT-PCR, testou-se o efeito do tempo de desnaturação das cadeias de cDNA a partir do 8º ciclo - 5s e 15s.

Após a optimização do RT-PCR, testaram-se amostras de rebentos mantidos *in vitro* ou de plântulas aclimatizadas: a) não sujeitos a tratamentos terapêuticos, e b) previamente submetidos a dois tratamentos de termoterapia consecutivos.

Tabela 5 - Mistura preparada para cada reacção de RT-PCR. Conc. – concentração.

<u>Mistura de RT-PCR</u>	<u>Conc. das soluções stock</u>	<u>Conc. final</u>	<u>Para 50 µl (µl)</u>
Água miliQ estéril			
Tampão de PCR II (s/ Mg, Gibco-BRL)	10x	1x	5
MgCl ₂ (Gibco-BRL)	50 mM	2 mM	2
dNTPs (Gibco-BRL)	10 mM cada	0,4 mM cada	2
Iniciador 5' (1175) (Pharmacia)	10 µM	0,2-0,5 µM	2-5
Iniciador 3' (1391) (Gibco-BRL)	10 µM	0,2-0,5 µM	2-5
DTT (Gibco-BRL)	0,1 M	4 mM	2
HPRI (RNA guard, Pharmacia)	40 U/µl	16 U	0,4
RTase (Perkin Elmer)	50 U/µl	20 U	0,4
Taq DNA polimerase (Gibco-BRL)	5 U/µl	1,5-3 U	0,3-0,6

2.4.4. Análise dos produtos amplificados – electroforese em gel de poliacrilamida e hibridação “Southern blot”

Inicialmente os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1% (SEAKEM[®] LE, FMC). Este sistema não foi suficientemente sensível para a detecção do PDV, tanto em material *in vitro* como no controlo positivo (material de campo), pelo que se optou pela análise electroforética em gel de poliacrilamida ou por hibridação “Southern blot”, consoante a disponibilidade dos dois sistemas e o objectivo das experiências. Para determinar o tamanho dos produtos amplificados, foram utilizados para a electroforese em gel de poliacrilamida o marcador de peso molecular “100 base pair DNA ladder G210A” (Promega), cuja banda de maior intensidade é a de 500pb; e para a hibridação “Southern blot” o marcador “100 base pair DNA ladder nº 27-4001” (Pharmacia), cuja banda de maior intensidade é a de 800pb.

Para a análise electroforética em gel de poliacrilamida, foi previamente preparada na hote uma solução de 30% acrilamida + bisacrilamida, dissolvendo-se a 37°C 29g de acrilamida e 1g de bisacrilamida em água bidestilada estéril até perfazer 100ml. Esta solução foi filtrada com uma seringa (filtro 45µm), desoxigenada por vácuo e guardada a 4°C no escuro. Os espaçadores e as placas de vidro do sistema de electroforese foram lavados após cada utilização numa solução cromossulfúrica durante a noite, e posteriormente numa solução de detergente comercial. Em particular, as placas de vidro foram lavadas em álcool a 96% e secas ao ar. Durante a montagem do sistema de electroforese, foi colocada uma tira de parafilme em ambas as bases de cada lado da tina onde vão assentar as placas, para evitar a contaminação da tina e a fuga do gel através desta zona. As amostras de produtos amplificados foram aplicadas em gel de poliacrilamida contendo 6,6% de acrilamida + bisacrilamida, tampão TAE 1x, 10µl TEMED e 0,1% persulfato de amónia (APS). A corrida realizou-se em tampão TAE numa tina Hoefer Scientific Mighty Smal II SE 250, a 70 volts durante 1h30m ou a 100 volts durante 1h, com fonte BIO-RAD Model 200/2.0 power. Estes produtos foram visualizados por coloração com uma solução de nitrato de prata, na qual cada par de geles foi sujeito ao seguinte procedimento:

1. fixação em ácido acético a 10% durante 20 min;
2. lavagem em água bidestilada durante 3x 4 min;
3. incubação em ácido nítrico a 1% durante 3 min;
4. lavagem em água bidestilada durante 4 min;
5. incubação numa solução de nitrato de prata contendo 1 mg/ml AgNO₃ e formaldeído a 0,06%, preparada no momento com agitação no escuro;
6. lavagem em água bidestilada;
7. incubação numa solução reveladora preparada no momento, contendo 30 g/l Na₂CO₃, formaldeído a 0,06%, e tiosulfato de sódio pentahidratado 2 mg/l, durante menos de 5 min;
8. incubação em ácido acético a 10% durante 5 min;
9. fotografia, montagem em papel de filtro e secagem.

As imagens dos geles foram tratadas pelo programa Bio-Profil Vilber Lourmat.

Na hibridação “Southern blot”, os produtos amplificados por RT-PCR foram separados em gel de agarose a 1% e transferidos para uma membrana “HybondTM-N⁺” (Amersham) por tratamento alcalino segundo as instruções da Amersham. Após a fixação do DNA, a membrana foi guardada a 4°C em papel de alumínio, até ao momento da hibridação.

Para sintetizar a sonda a utilizar na hibridação, previamente amplificou-se por PCR um fragmento com 217pb do gene da cpPDV, utilizando os iniciadores 1175 e 1391 (*vide* 2.4.1.3), usando como molde o fragmento de 722pb (no qual está contido o fragmento com 217pb). O DNA molde foi gentilmente cedido por C. Miguel. A mistura de PCR foi preparada tal como indica a Tabela 6. O produto de PCR foi analisado por electroforese em gel de agarose a 1% (Figura 18) e purificado a partir do gel utilizando o kit “QIAquick Spin Handbook” (Qiagen). Inicialmente, a banda correspondente ao fragmento de 217pb foi isolada do gel de agarose com uma lâmina estéril, removendo a agarose em excesso para minimizar o tamanho da porção isolada. Após a pesagem desta porção, o respectivo DNA foi purificado segundo o procedimento indicado pela Amersham.

A análise por hibridação “Southern blot” foi efectuada segundo as instruções dos kits utilizados – “Gene Images random prime labelling module”, e “Gene Images CDP-Star detection module” (Amersham). O primeiro kit foi utilizado para a síntese da sonda

marcada com fluoresceína, hibridação e lavagens de estringência. A marcação da sonda é feita por “random prime labelling”, na qual são utilizados nonâmeros de sequência alietória como iniciadores da síntese de DNA a partir de um molde de DNA desnaturado, por uma reacção catalisada pelo fragmento Klenow da DNA polimerase I de *E. coli*. A Fluoresceína-11-dUTP (Fl-dUTP) substitui parcialmente os dTTPs na reacção para gerar uma sonda marcada com fluoresceína (por incubação durante 1h a 37°). Após a sua desnaturação, a sonda é utilizada directamente na hibridação. O segundo kit foi utilizado para o bloqueamento (1h), incubação com anticorpos anti-fluoresceína (1h) e lavagens subsequentes (3x 10 min), e para gerar e detectar o sinal. Após a exposição ao filme HyperfilmTM-MP (Amersham) durante 10-30 min, a membrana foi revelada durante 5 min, lavada em água e fixada durante 5-10 min, sendo novamente lavada em água e seca ao ar.

Tabela 6 - Mistura de reacção de PCR para a amplificação do fragmento do gene da cp-PDV (217pb), utilizado na preparação da sonda para a hibridação “Southern blot”. Conc. – concentração.

<u>Mistura de PCR</u>	<u>Conc. das soluções stock</u>	<u>Conc. final</u>	<u>Para 50 µl (µl)</u>
Água miliQ estéril			
Tampão de PCR II	10x	1x	5
MgCl ₂	50 mM	2 mM	2
dNTPs	10 mM cada	0,4 mM cada	2
Iniciador 5' (1175)	10 µM	0,5 µM	5
Iniciador 3' (1391)	10 µM	0,5 µM	5
Taq DNA polimerase	5 U/µl	3 U	0,6

3. RESULTADOS

3.1. Saneamento de doenças virais	47
3.1.1. Termoterapia	47
3.1.2. Cultura de meristemas de material de campo	53
3.2. Enraizamento e aclimação dos rebentos tratados	54
3.3. Análise do material vegetal resultante dos ensaios de saneamento	61
3.3.1. Optimização do método IC/RT-PCR para a diagnose do PDV	61
3.3.1.1. Recolha e preparação do material vegetal	61
3.3.1.2. Imunocaptura das partículas virais	62
3.3.2. Adaptação do método de extração de RNA bicatenário para a detecção do PDV	64
3.3.3. Optimização da transcrição inversa e da amplificação por PCR ...	67

II. Estudos de saneamento de viroses e de detecção do vírus PDV em amendoeira

3.1. Saneamento de doenças virais

3.1.1. Termoterapia

Os ensaios de termoterapia foram sempre efectuados em material juvenil, o qual foi facilmente micropropagado permitindo obter rapidamente um número suficiente de rebentos (Figura 2a). Pelo contrário, grande parte do material de campo colocado *in vitro* foi eliminado por estar contaminado, tendo-se registado uma taxa de sobrevivência de 10% que inviabilizou a realização dos ensaios com este material (Figura 2b-e).

Os resultados dos ensaios A a F, em termos de percentagens de sobrevivência e de rebentos com hiperhidratação, encontram-se registados para quatro momentos diferentes (I, II, III e IV, Tabela 7). Nos ensaios controlo (material não sujeito a termoterapia) não houve qualquer caso de hiperhidratação e a percentagem de sobrevivência foi sempre a máxima (100%). Deve notar-se que a hiperhidratação verificada nos ensaios foi apenas parcial, possibilitando sempre a sobrevivência dos respectivos rebentos por sub-cultura de porções não hiperhidratadas.

Em geral, o ensaio D (sub-cultura pré-tratamento de 7 dias, tratamento a ápices mantidos em meio indutor de “multi-ápices” durante 16 dias) originou melhores resultados comparativamente com os restantes, nomeadamente uma taxa de sobrevivência de 100% aliada à reduzida incidência de hiperhidratação (Tabela 7) e ao elevado número de ápices originados (Tabela 8).

Os ensaios A, B, C e D originaram uma reduzida percentagem de rebentos hiperhidratados (Tabela 7). Nomeadamente, no ensaio A surgiu apenas um rebento hiperhidratado no início da 3ª sub-cultura após o 1º tratamento, sintoma que permaneceu até ao início da 1ª sub-cultura pós 2º tratamento mas não foi detectado no início da 3ª sub-cultura pós 2º tratamento. O ensaio B originou um rebento hiperhidratado apenas no início da 1ª sub-cultura pós 1º tratamento, o qual recuperou durante as duas sub-culturas subsequentes. Durante o ensaio C não ocorreu qualquer caso de hiperhidratação, e o D apenas originou um caso que foi anulado até ao início da 3ª sub-cultura após o 2º tratamento (Figura 3d). O 1º tratamento E originou uma reduzida percentagem de rebentos hiperhidratados e no final do 2º tratamento esta subiu para 100%, mas o facto da hiperhidratação ter sido parcial permitiu a total recuperação

registada no início da 3ª sub-cultura pós 2º tratamento (Figura 3e). No ensaio F não foi registado qualquer caso de hiperhidratação.

Em relação à sensibilidade dos rebentos à termoterapia, apenas os ensaios A e B, nos quais a sub-cultura pré-1ºtratamento foi mais longa, e o F o qual envolveu a duração máxima do tratamento de termoterapia tal como o B, originaram taxas de sobrevivência inferiores a 100% (Tabela 7). Nos ensaios A e B, o 1º tratamento reduziu significativamente a percentagem de sobrevivência dos rebentos tratados, o que não sucedeu após o 2º tratamento mantendo-se a mesma percentagem nas sub-culturas subsequentes. Com o ensaio F pretendeu-se avaliar a influência da duração dos tratamentos de termoterapia e do período de sub-cultura pré-tratamentos na variação da taxa de mortalidade. Os resultados obtidos permitiram verificar que, quando a duração da termoterapia foi mais elevada (21 dias), não houve uma diferença significativa entre os ensaios B e F, pelo que neste caso o factor duração da termoterapia sobrepôs-se ao factor duração de sub-cultura pré-tratamento. Quando a termoterapia foi mais reduzida (16 dias), a redução da duração da sub-cultura pré-tratamento permitiu um aumento da sobrevivência de 45,5% para 100% no final dos ensaios.

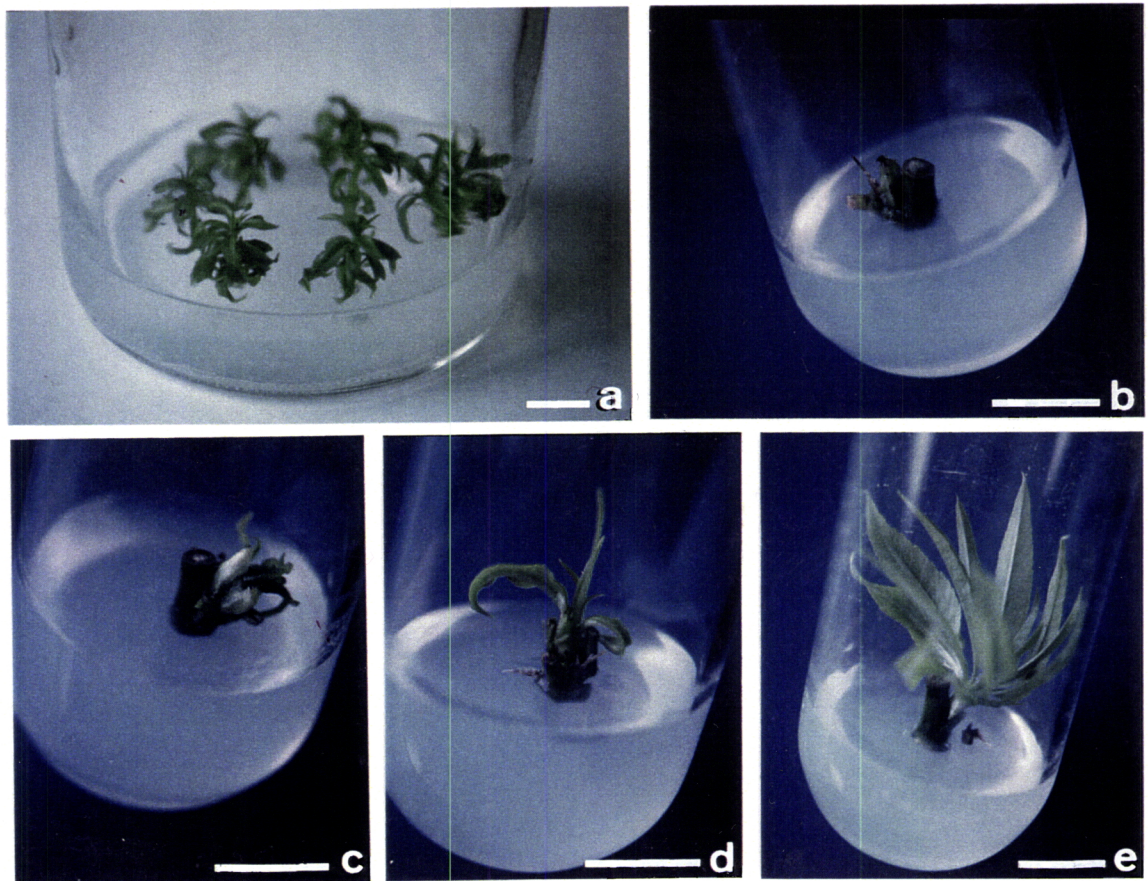


Figura 2 – Estabelecimento *in vitro* de material de campo e micropropagação de material adulto e de material juvenil de *Prunus dulcis* cv. Boa Casta. (a) Rebentos provenientes de sementes germinadas *in vitro* (material juvenil), com 21 dias de sub-cultura. (b-e) Regeneração *in vitro* de rebentos isolados a partir de material de campo (material adulto).

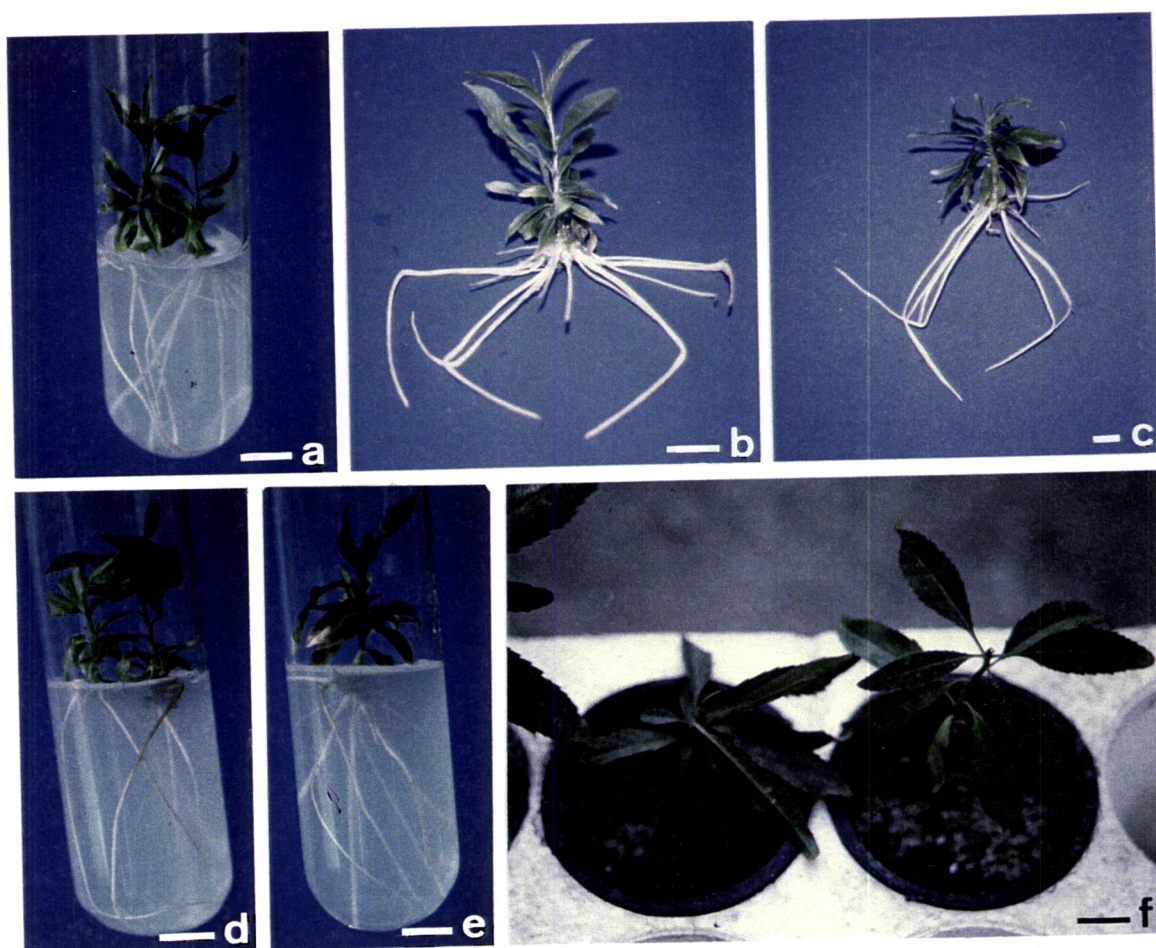


Figura 3 – Ensaio de termoterapia em rebentos provenientes de material juvenil em *Prunus dulcis* cv. Boa Casta. Cultura de plântulas resultantes de rebentos sujeitos a: (a) quimioterapia (Raquel, 1998), apresentando raízes com ortogeotropismo positivo, induzidas no ensaio E₄ em tubo; (b) e (c) quimioterapia e termoterapia (Raquel, 1998), aspecto das raízes com crescimento determinado pela forma do frasco de cultura; (d) ensaio D (dois tratamentos de termoterapia); (e) ensaio E. Em (f) observam-se plântulas aclimatadas resultantes de programas de saneamento em amendoeira, 30 dias após a sua transferência para o substrato.

Tabela 7 - Resultados dos ensaios A a F (vide Tabela 2, pág. 31, com a descrição dos ensaios) em termos de % sobrevivência e de % rebentos apresentando hiperhidratação, no início de: I - 1ª sub-cultura após 1º tratamento, II - 3ª sub-cultura após 1º tratamento, III - 1ª sub-cultura após 2º tratamento e IV - 3ª sub-cultura após 2º tratamento.

Ensaio	Amostra (nº rebentos)	% rebentos c/ hiperhidratação*				% sobreviventes			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV
A	11	0	9,1	9,1	0	72,7	45,5	45,5	45,5
Controlo	11	0	0	0	0	100	100	100	100
B	11	9,1	0	0	0	54,5	36,4	36,4	36,4
Controlo	11	0	0	0	0	100	100	100	100
C	18	0	0	0	0	100	100	100	100
Controlo	18	0	0	0	0	100	100	100	100
D	18	5,6	5,6	5,6	0	100	100	100	100
Controlo	18	0	0	0	0	100	100	100	100
E	18	11,1	11,1	100	0	100	100	100	100
Controlo	18	0	0	0	0	100	100	100	100
F	18	0	-	-	-	50	-	-	-
Controlo	18	0	0	0	0	100	100	100	100

* hiperhidratação parcial.

Tabela 8 – Quantificação dos ápices que foi possível isolar a partir de cada amostra no final dos tratamentos de termoterapia no ensaio D, registada no início da 5ª sub-cultura após o 2º tratamento.

Amostra (rebento)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Nº ápices originados	1	3	3	8	3	8	15	8	7	5	4	11	6	7	8	7	7	5

3.1.2. Cultura de meristemas de material de campo

Os meristemas isolados a partir de material de campo apresentaram, no início da 2ª sub-cultura, uma percentagem de sobrevivência da ordem de 75%, decrescendo para 25% no início da 3ª e atingindo 0% na 4ª sub-cultura. Imediatamente após o isolamento destes meristemas, os mesmos não apresentaram sinais evidentes de oxidação nem de desidratação, uma vez que houve o cuidado de efectuar o isolamento o mais

rapidamente possível. Durante o período pós-isolamento, os meristemas tornaram-se gradualmente hiperhidratados e finalmente acastanhados, assim permanecendo sem originar qualquer rebento após sucessivas sub-culturas em meio MJ.

3.2. Enraizamento e aclimação dos rebentos tratados

Em relação à optimização do enraizamento, o método BIP utilizando o IBA resultou numa maior eficácia de enraizamento, não havendo diferenças significativas nos resultados relativos a ambas as concentrações utilizadas (ensaios E₃ - Figura 7c,i - e E₄ - Figura 7d,h). Os ensaios E₃ e E₄ resultaram numa percentagem de enraizamento mais elevada comparativamente com os restantes (Figura 4) e, comparando procedimentos idênticos, verificou-se que o IBA (E_{3,4,5,7,9}) foi mais eficaz do que o IAA (E_{1,2,6,8}) (Figura 7a-i). No entanto, a comparação dos intervalos de confiança para % de rebentos com raiz (Tabela 9) mostrou que essas diferenças não foram estatisticamente significativas ao nível de 95%. Em termos de número de raízes por rebento enraizado, pode observar-se no gráfico da Figura 5 e por análise de variância (Tabelas 10 e 11) que os ensaios E₃ e E₄ deram resultados significativamente mais elevados ao nível de 95% comparativamente com os restantes. Este facto foi particularmente relevante, uma vez que foi previamente verificado que o número de raízes induzidas em cada rebento é um factor importante no processo de aclimação e conseqüentemente na sobrevivência das plântulas resultantes (Miguel, 1998). Comparando procedimentos idênticos, verificou-se que o IBA (E_{3,4,5,9}) foi mais eficaz no número de raízes produzidas do que o IAA (E_{1,2,8}), com excepção dos casos E₆ e E₇. Analisando os dados relativos ao comprimento médio das raízes por rebento, E₃ e E₄ deram resultados significativamente mais elevados ao nível de 95% (Tabelas 12 e 13) e mais homogêneos ("boxplot" da Figura 6). No entanto, considerando apenas os rebentos enraizados, estas diferenças não foram significativas ao nível de 95% (Tabelas 12 e 13), o que indica que as raízes uma vez formadas, desenvolveram-se normal e igualmente em todos os ensaios. Nos ensaios em geral, alguns rebentos apresentaram um início de necrose apical, que na maioria dos casos se manteve parcial ou, quando total, foi acompanhada pelo desenvolvimento de um ou mais rebentos laterais. Aplicando o ensaio E₄ a material adulto tratado, parte deste material desenvolveu raízes ainda que a sua resposta tenha sido mais tardia

comparativamente com o material juvenil. Paralelamente, algumas raízes obtidas no ensaio E₄ foram seccionadas à mão com lâmina de barbear e coradas com verde-iodo-carmim aluminado, para observação da sua estrutura. Das observações realizadas concluiu-se que as raízes tinham uma organização estrutural normal, o que nem sempre se verifica com a indução *in vitro*.

No contexto apresentado, foi escolhido o ensaio E₄ para aplicar aos rebentos sujeitos aos ensaios de termoterapia A a F, e aos rebentos provenientes de programas de saneamento anteriores. O enraizamento em tubos de cultura mostrou ser mais eficaz porque deste modo as raízes apresentaram um crescimento para baixo e na vertical (ortogeotropismo positivo), facilitando depois o processo de transferência para o substrato colocado em alvéolos (Figura 3a,d,e).

Posteriormente verificou-se que os resultados do ensaio E_{4-g} foram semelhantes aos obtidos no E₄, indicando que, pelo menos em material juvenil, o passo que envolvia a presença de gelrite poderá ser dispensado em futuras aplicações. A esterilização do meio de indução por filtração não melhorou significativamente os resultados dos ensaios E₂ nem E₄. A presença de floroglucinol não induziu um aumento da formação de raízes secundárias, e aparentemente as raízes originadas eram mais finas do que na ausência deste composto.

As condições de aclimação disponibilizadas no Instituto RAÍZ originaram um aumento da percentagem de sobrevivência das plântulas provenientes dos programas de saneamento viral que, mesmo assim foi relativamente baixa devido a infecções fúngicas. Estes resultados reforçam a necessidade do uso de um fitotrão que permita um mínimo de sanidade e o controlo da temperatura, humidade relativa, intensidade luminosa, etc.. Durante a optimização da aclimação, verificou-se não haver necessidade das plântulas permanecerem em cultura *in vitro* até ao 40º dia pós-indução hormonal de enraizamento, uma vez que as raízes curtas facilitam a sua lavagem e a introdução da plântula no substrato. As plântulas com maior alongamento de entre-nós após a indução e formação de raízes resistiram melhor à aclimação. As plântulas sobreviventes reforçaram o seu sistema radicular produzindo numerosas raízes primárias e secundárias (Figura 7k). Na Figura 3f podem observar-se plantas enraizadas e aclimatadas com sucesso, provenientes dos programas de saneamento de viroses.

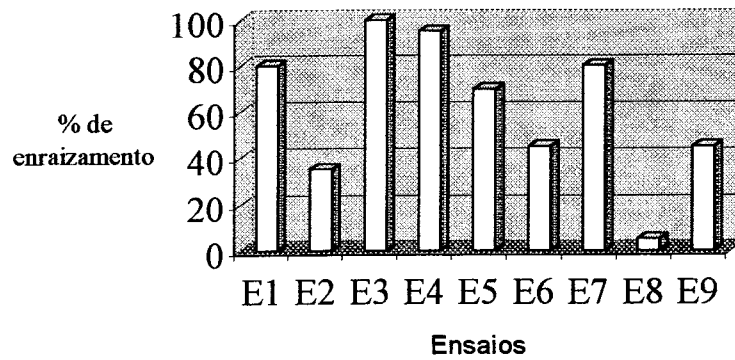


Figura 4 – Resultados dos ensaios de enraizamento E₁ a E₉ em relação à percentagem de rebentos da cv. Boa Casta enraizados *in vitro*.

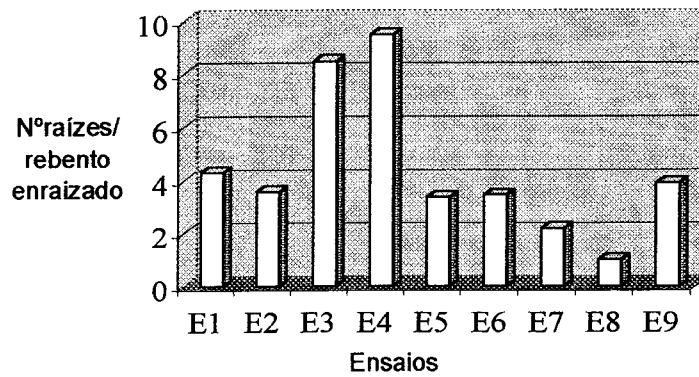


Figura 5 – Resultados dos ensaios de enraizamento E₁ a E₉ em relação ao número de raízes produzidas por rebento enraizado *in vitro* da cv. Boa Casta.

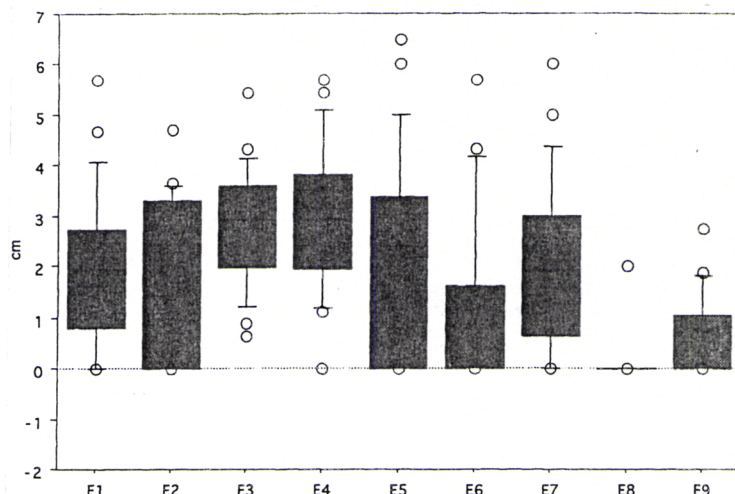


Figura 6 – Resultados dos ensaios de enraizamento E₁ a E₉ em relação ao comprimento médio de raízes produzidas por rebento utilizado.

Tabela 9 – Análise estatística - teste t – da percentagem de rebentos com raiz nos ensaios de enraizamento E₁ a E₉. p – proporção de rebentos com raiz; LI: limite inferior do intervalo de confiança de 95%; LS: limite superior do intervalo de confiança de 95%.

Ensaio	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	E ₅	E ₆	E ₇	E ₈	E ₉
P	0,80	0,35	1,00	0,95	0,70	0,45	0,80	0,05	0,45
LI	0,61	0,13	1,00	0,85	0,49	0,22	0,61	-0,05	0,22
LS	0,99	0,57	1,00	1,05	0,91	0,68	0,99	0,15	0,68

Tabela 10 – Análise de variância (ANOVA) do número de raízes produzidas por rebento enraizado nos ensaios de enraizamento E₁ a E₉.

Varição	Somatório dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado das médias	F
Entre grupos	821,628	8	102,703	3,70*
Erro	1110,101	40	40,244	
Total	1931,729	48	40,244	

* significativo ao nível de 95% (p = 0,0026)

Tabela 11 – Resultados do teste de Scheffé aplicado ao número de raízes produzidas por rebento com raiz nos ensaios E₁ a E₉. (O traço contínuo corresponde à ausência de diferenças significativas entre os ensaios nele incluídos).

Ensaio	4	3	1	9	2	6	5	7	8
Nº médio de raízes/ /rebento com raiz	9,47	8,45	5,56	3,89	3,57	3,44	3,36	2,19	1,00

Tabela 12 – Análise de variância (ANOVA) do comprimento médio das raízes produzidas por rebento nos ensaios de enraizamento E₁ a E₉.

Varição	Somatório dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado das médias	F
Entre grupos	156,219	8	19,527	8,88*
Erro	375,876	171	2,198	
Total	532,095	179	2,972	

* significativo ao nível de 95% (p < 0,0001).

Tabela 13 – Resultados do teste de Scheffé aplicado ao comprimento médio das raízes produzidas por rebento nos ensaios E₁ a E₉. (Os números sobre o mesmo traço indicam a ausência de diferenças significativas entre os respectivos ensaios).

Ensaio	4	3	5	1	7	2	6	9	8
Comprimento médio das raízes / rebento	2,98	2,82	2,19	1,99	1,95	1,16	1,13	0,54	0,10

Ensaio	2	4	5	3	6	1	7	8	9
Comprimento médio das raízes / rebento c/ raiz	3,32	3,14	3,13	2,82	2,82	2,49	2,43	2,00	1,19

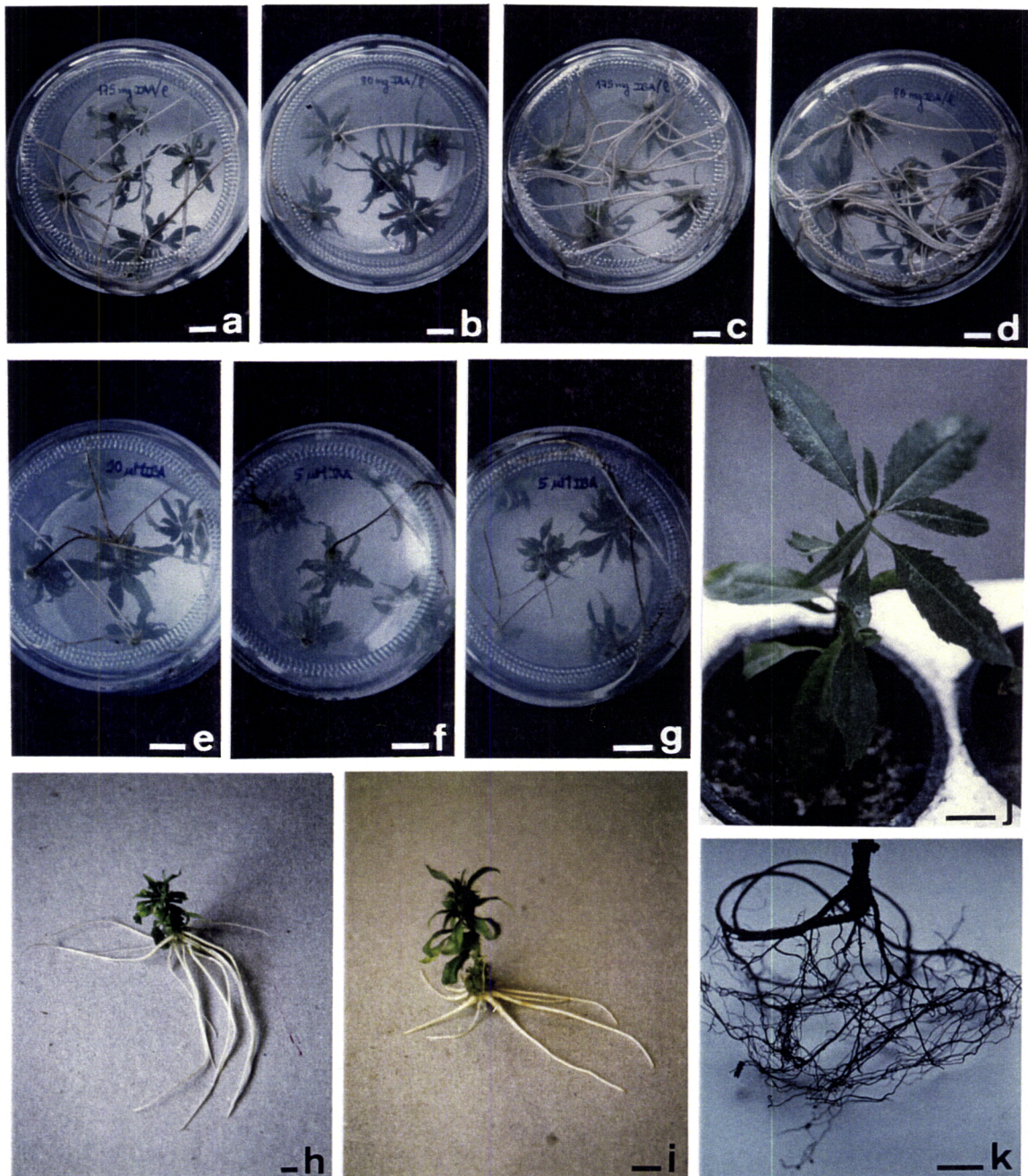


Figura 7 – Ensaio para a optimização do enraizamento de rebentos *in vitro* e aclimação das plântulas resultantes em *Prunus dulcis* cv. Boa Casta. Enraizamento de rebentos não sujeitos a termoterapia, 30 dias após tratamento pelo método BIP com (a) 175mg/l IAA – E₁, (b) 80mg/l IAA – E₂, (c) 175mg/l IBA – E₃, (d) 80mg/l IBA – E₄; pelo método LIP com (e) 10µM IBA – E₅, (f) 5µM IAA – E₆, (g) 5µM IBA – E₇. Aspecto das raízes induzidas através dos ensaios (h) E₄ e (i) E₃. (j) Aclimação de uma plântula micropropagada, cujas raízes foram induzidas através do ensaio E₄. (k) Aspecto do desenvolvimento do sistema radicular de uma plântula aclimatizada, observando-se numerosas raízes primárias e secundárias.

3.3. Análise do material vegetal resultante dos ensaios de saneamento

3.3.1. Optimização do método IC/RT-PCR para a diagnose do PDV

3.3.1.1. Recolha e preparação do material vegetal

Nos ensaios com as várias diluições do extracto de folhas de amendoeira do controlo positivo, verificou-se por hibridação “Southern blot” que a diluição 1:1 foi a que permitiu maior amplificação específica da sequência pretendida, enquanto que as diluições subsequentes resultaram num decréscimo na intensidade das bandas obtidas (Figura 8, pistas 2 a 6). No caso da diluição 1:25, ainda foi possível detectar o PDV por uma banda relativamente intensa acompanhada por um ligeiro arrastamento, indicando que a sensibilidade do método é elevada. A presença do composto anti-oxidante DIECA a 0,2% no tampão de extracção resultou num decréscimo da intensidade da banda obtida (Figura 9, pista 5). No entanto, é de referir que neste caso o extracto foi preparado a partir de outras folhas, as quais poderiam conter um título de PDV inferior ao existente nas utilizadas na ausência de DIECA. Na ausência de imunocaptura, a análise em gel de poliacrilamida permitiu observar em todas as variações uma coloração inespecífica de fundo desde o poço até à zona da pista correspondente ao fim da corrida. Aparentemente, a diluição 1:5 do extracto vegetal resultou numa banda específica mais intensa comparativamente com a diluição 1:1 (Figura 9, pistas 6 e 7).

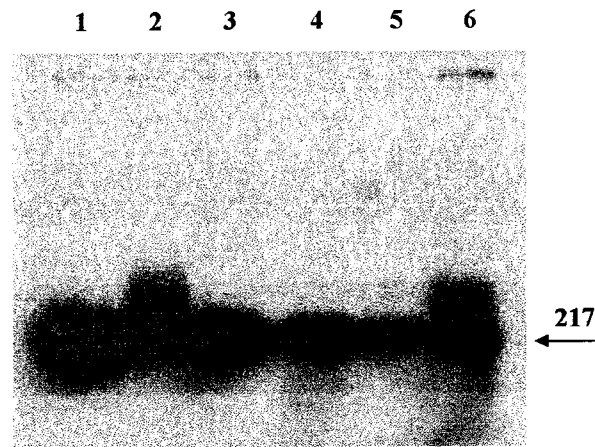


Figura 8 – Estudo dos efeitos da diluição do extracto vegetal, pela análise de produtos de IC/RT-PCR (iniciadores 1175 e 1391) através de hibridação “Southern blot”. Foi utilizado como controlo positivo o produto de RT-PCR de RNAds isolado de folhas da amendoeira de Monsanto, previamente analisado (Pista 1). Pista 2 – extracto concentrado de folhas da amendoeira de Monsanto; pista 3 - diluído 1:1; pista 4 - diluído 1:10; pista 5 - diluído 1:20; pista 6 - diluído 1:25. A seta indica o peso molecular das bandas obtidas, em pares de bases (pb).

3.3.1.2. *Imunocaptura das partículas virais*

Nos ensaios de imunocaptura das partículas virais, foram testadas várias condições em relação a: diluição do extracto vegetal; realização ou não da imunocaptura; temperatura e duração da incubação durante a imunocaptura; e combinações de iniciadores utilizados.

Com as incubações do extracto vegetal a 30°C durante 1h30min (por exemplo: Figura 9, pistas 1, 2, 4 e 5) e a 4°C durante a noite (Figura 10, pistas 1 a 5), foi possível obter resultados positivos. No entanto, com a incubação a 4°C durante apenas 1h30min não foi possível obter qualquer banda (Figura 9, pista 3).

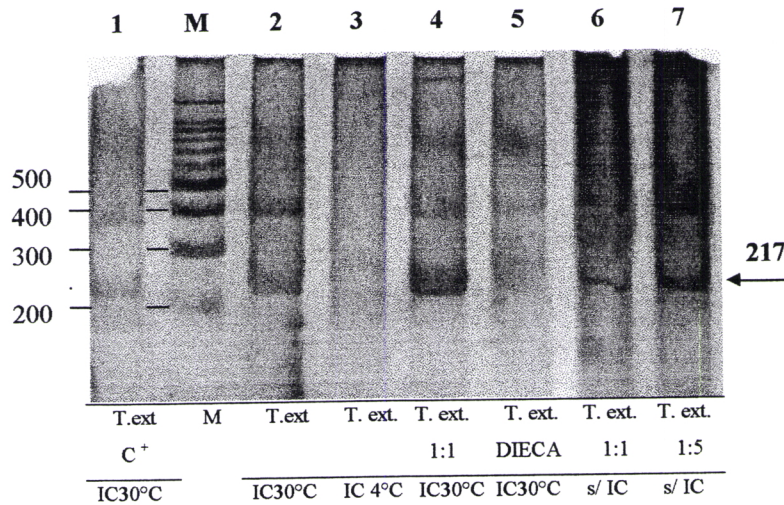


Figura 9 - Estudo dos efeitos da diluição do extracto vegetal, da realização ou não da imunocaptura, e da temperatura e duração da incubação durante a imunocaptura, por análise electroforética em gel de poliacrilamida de produtos de RT-PCR (iniciadores 1175, 1896 e 1391). Pista 1 - controlo positivo comercial do PDV para testes ELISA, extrato em pó preparado em água miliQ estéril. M - marcador de peso molecular 100pb DNA ladder G210A (Promega), peso molecular em pares de bases (pb). Pista 2 a 7 - Extracto de folhas da amendoeira de Monsanto: pista 2 – concentrado, imunocaptura a 30°C; pista 3 – concentrado, imunocaptura a 4°C; pista 4 – diluído 1:1, imunocaptura a 30°C; pista 5 – concentrado, preparado em tampão de extracção com 0,2% DIECA, imunocaptura a 30°C; pista 6 e 7 – sem imunocaptura, extracto diluído: pista 6 – 1:1; pista 7 - 1:5. T. ext. – tampão de extracção; C⁺ - controlo positivo; IC – imunocaptura; s/ IC – sem imunocaptura.

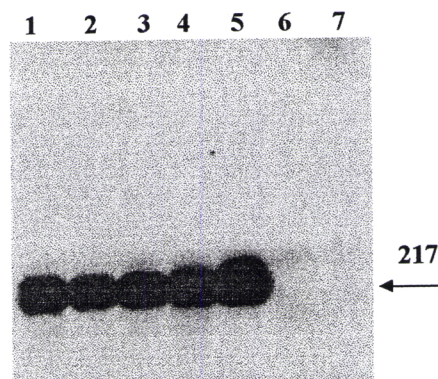


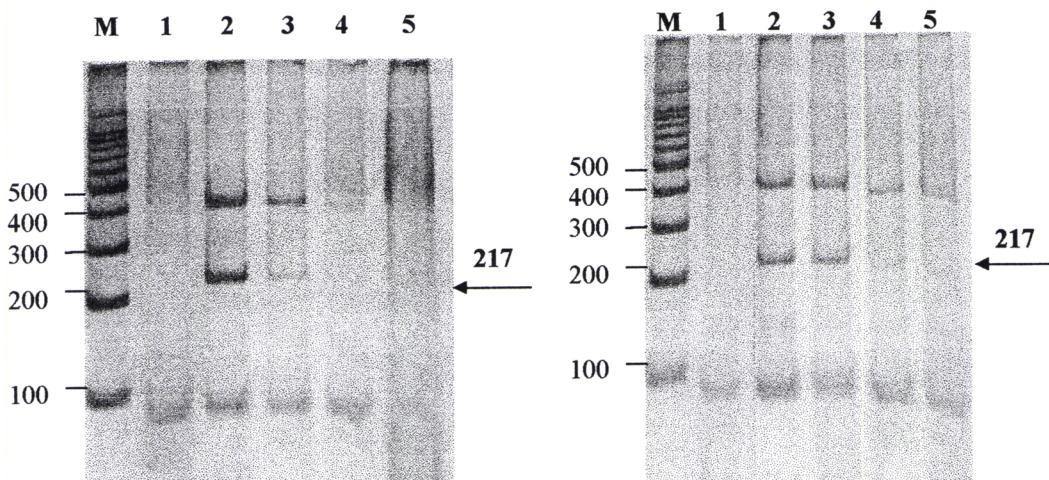
Figura 10 – Estudo do efeito da temperatura e da duração da imunocaptura, e aplicação de IC/RT-PCR (iniciadores 1175, 1896 e 1391) ao material biológico de partida do RT-PCR *in situ*, através da análise por hibridação “Southern blot”. Pistas 1 a 5 - Extractos diluídos 1:1 obtidos do 4º segmento nodal ao ápice vegetativo (4º, 3º, 2º, 1º e ápice, respectivamente) de um ramo da amendoeira de Monsanto utilizado para o RT-PCR *in situ* (um dos controlos do RT-PCR *in situ*), imunocaptura durante a noite a 4°C. Pistas 6 e 7 – extracto de um rebento mantido *in vitro* não sujeito a qualquer tratamento terapêutico, imunocaptura durante a noite a 4°C (pista 6) ou a 30°C (pista 7). A seta indica o peso molecular das bandas obtidas, em pares de bases (pb).

3.3.2. Adaptação do método de extração de RNA bicatenário ao PDV

Durante o presente trabalho foram utilizadas diluições do extracto de RNAs da amendoeira de Monsanto no RT-PCR, as quais resultaram num decréscimo da amplificação quer da sequência curta (com 217pb, Figuras 11a, 11b e 12) quer da sequência mais longa (com 722pb, Figura 13). Nos casos da diluição 1:20 de extracto de folhas e de extracto de caule, foi observada em gel de poliacrilamida uma banda muito ténue mas nítida (Figura 11a no caso das folhas; Figuras 11b e 12 no caso do caule). Deste modo, na detecção do PDV em rebentos micropropagados e em plântulas aclimatadas, o respectivo extracto de RNAs foi utilizado concentrado. A presença do PDV não foi detectada em qualquer dos seguintes casos testados:

- a) material vegetal não sujeito a termoterapia - rebentos mantidos *in vitro* (Figura 14, pista 3) ou plântulas aclimatadas (Figura 14, pista 4);
- b) material vegetal previamente submetido a dois tratamentos de termoterapia consecutivos - rebentos mantidos *in vitro* (Figura 14, pista 5) ou plântulas aclimatadas (Figura 14, pista 6).

Por esta razão, os rebentos resultantes dos tratamentos de termoterapia realizados no âmbito do presente trabalho (ensaios A a F) foram também enraizados, e as plântulas obtidas aclimatadas, para serem periodicamente testadas quanto à presença do PDV.



Figuras 11a e 11b - Estudo do efeito das diluições de RNAds isolado partir de folhas - **Figura 11a** - e de caule - **Figura 11b** - da amendoeira de Monsanto, por análise electroforética em gel de poliacrilamida de produtos de RT-PCR (iniciadores 1175 e 1391). M - marcador de peso molecular 100pb DNA ladder G210A (Promega), peso molecular em pares de bases (pb). Pistas 1 - controlo negativo interno (mistura de RT-PCR). Pistas 2 - RNAds concentrado. Pistas 3, 4 e 5 - RNAds diluído 1:1, 1:10 e 1:20, respectivamente.

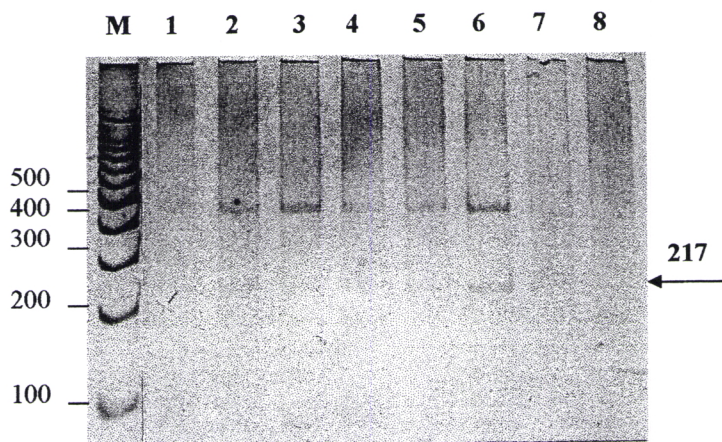


Figura 12 - Estudo do efeito da utilização conjunta dos iniciadores 1175, 1896 e 1391 na detecção do PDV, por análise electroforética em gel de poliacrilamida de produtos de RT-PCR de RNAds isolado de folhas e de caule. M - marcador de peso molecular 100pb DNA ladder G210A (Promega), peso molecular em pares de bases (pb). Pista 1 - controlo negativo interno (mistura de RT-PCR). Pistas 2 a 5 - RNAds isolado de caule e aplicado concentrado (pista 2), diluído 1:1 (pista 3), 1:10 (pista 4), e 1:20 (pista 5). Pistas 6 a 8 - RNAds isolado de folhas e aplicado concentrado (pista 6), diluído 1:1 (pista 7), e 1:10 (pista 8).

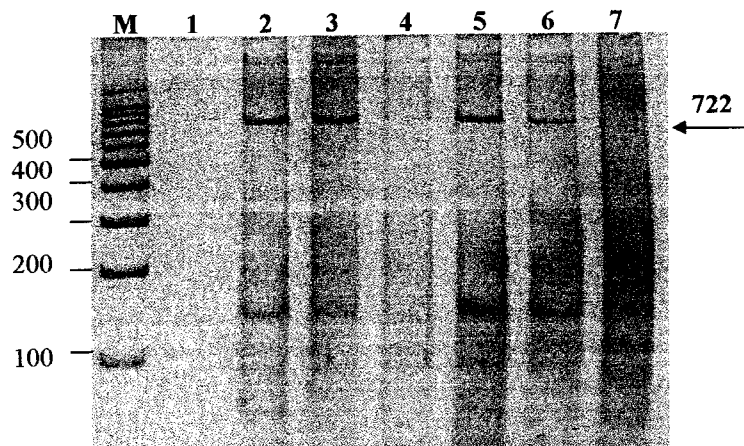


Figura 13 - Estudo do efeito da utilização dos iniciadores 1175 e 1896 na detecção do PDV, por análise electroforética em gel de poliacrilamida de produtos de RT-PCR de RNAds isolado de folhas e de caule. M - marcador de peso molecular 100pb DNA ladder G210A (Promega), peso molecular em pares de bases (pb). Pista 1 - controlo negativo interno (mistura de RT-PCR). Pistas 2 a 4 - RNAds isolado de caule e aplicado concentrado (pista 2), diluído 1:1 (pista 3), ou 1:10 (pista 4). Pistas 5 a 7 - RNAds isolado de folhas e aplicado concentrado (pista 5), diluído 1:1 (pista 6), e 1:10 (pista 7).

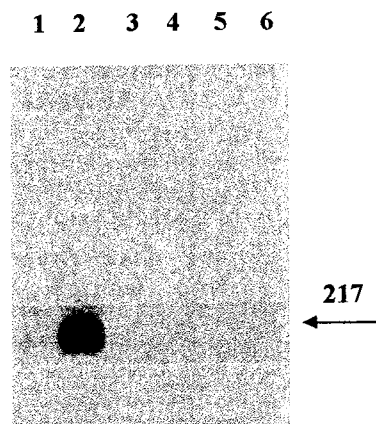


Figura 14 - Avaliação da presença do PDV em folhas de rebentos micropropagados e de plântulas aclimatadas, não tratados - pistas 3 e 4, respectivamente - ou sujeitos a quimioterapia - pistas 5 e 6, respectivamente -, por análise de produtos obtidos por extracção de RNAds/RT-PCR (iniciadores 1175 e 1391) através de hibridação "Southern blot". Pista 1 - Controlo negativo interno (mistura de RT-PCR). Pista 2 - controlo positivo, RNAds da amendoeira de Monsanto previamente analisado. A seta indica o peso molecular das bandas obtidas, em pares de bases (pb).

3.3.3. Optimização da transcrição inversa e da amplificação por PCR (RT-PCR)

Tal como foi referido anteriormente, para a optimização da RT-PCR foram testadas três combinações de iniciadores – 1175 e 1391; 1175, 1896 e 1391; 1175 e 1896 -; quatro concentrações de iniciadores – 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 μM -; quatro concentrações de Taq DNA polimerase – 1,5, 2, 2,5 e 3 μM ; e o tempo de desnaturação a partir do 8º ciclo no programa de RT-PCR – 5 s ou 15 s. A utilização dos iniciadores 1175 e 1896 resultou na amplificação de um fragmento de 722pb e de uma banda inespecífica (extracção de RNAds/RT-PCR, Figura 13). A combinação dos iniciadores 1175 e 1391 resultou na amplificação de um fragmento de 217pb e também de uma banda inespecífica (IC/RT-PCR, Figura 8; extracção de RNAds/RT-PCR, Figuras 11a e 11b). A utilização simultânea dos iniciadores 1175, 1896 e 1391 resultou na amplificação da sequência mais pequena e de uma banda inespecífica equivalente à observada com a combinação 1175 e 1391 (IC/RT-PCR: Figuras 9 e 10; extracção de RNAds/RT-PCR, Figura 12), verificando-se que a amplificação do fragmento mais pequeno (com 217pb) impediu de alguma forma a amplificação do fragmento maior (com 722pb), o que pode esquematizar-se da seguinte forma:

Iniciadores	Sequência 5'-3' dos iniciadores	Combinações de iniciadores		
1175	CCA ATT TAC TTC CAA CTT TCg A			
1896	gCA CAA TCA AAT gAT ggA TCA			
1391	TTT TAC ggg CAC ATT Tgg TCC			
Dimensão dos produtos amplificados		722pb	217pb	217pb

Em relação à optimização da concentração dos iniciadores utilizados, a análise de produtos de IC/RT-PCR (iniciadores 1175 e 1391) por hibridação “Southern blot” permitiu observar que a maior amplificação do produto de RT-PCR foi conseguida com 0,5 μM de cada iniciador (Figura 15). Relativamente à optimização da concentração de Taq DNA polimerase, os resultados não foram conclusivos (Figura 15), o mesmo se verificando em relação ao efeito do aumento do tempo de desnaturação no programa de RT-PCR, por hibridação “Southern blot”. De facto, enquanto que no caso do extracto comercial controlo-positivo do PDV a intensidade da banda obtida foi igualmente elevada com ambos os tempos de desnaturação (Figura 15, pistas 1 e 2), com o extracto de folhas da amendoeira de Monsanto a intensidade da banda foi maior com 5s de desnaturação do que com 15s (Figura 15, pistas 6 e 7).

A concentração do fragmento de DNA utilizado na síntese da sonda para a hibridação “Southern blot” foi estimada em aproximadamente 12,5 ng/μl, por comparação com amostras de DNA do fago λ de concentrações conhecidas (25 ng/μl, 50 ng/μl, 100 ng/μl e 250 ng/μl, Figura 16).

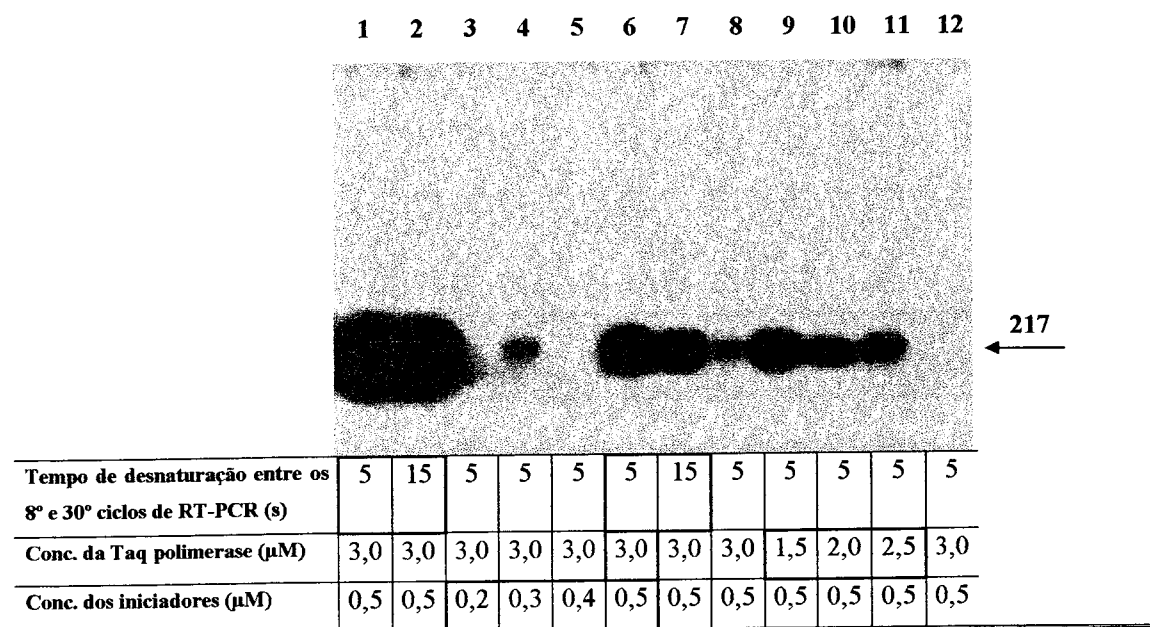


Figura 15 – Ensaio das variações do tempo de desnaturação do programa de RT-PCR, das concentrações da Taq DNA polimerase e dos iniciadores na mistura de RT-PCR, por análise de produtos de IC/RT-PCR (iniciadores 1175 e 1391) através de hibridação “Southern blot”. Pistas 1 e 2 – Controlo positivo comercial do PDV para testes ELISA, extracto em pó preparado em água miliQ estéril. Pistas 3 a 11 – Extractos de folhas de amendoeira de Monsanto infectada pelo PDV. Pista 12 – Controlo negativo interno (mistura de RT-PCR). A seta indica o peso molecular das bandas obtidas, em pares de bases (pb).

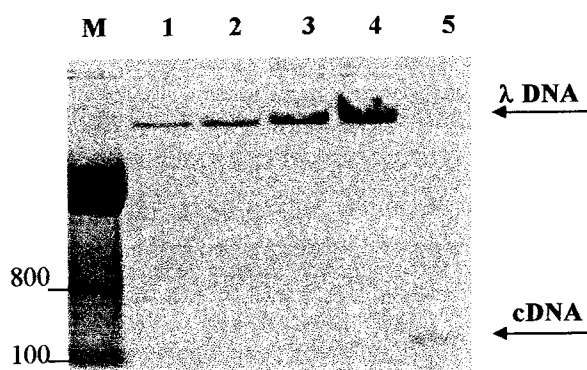


Figura 16 – Estimação aproximada da concentração do DNA utilizado para sintetizar a sonda para a hibridação “Southern blot” (fragmento com 217pb), por comparação com amostras de DNA do fago λ de concentrações conhecidas: pista 1 - 25 ng/μl, pista 2 - 50 ng/μl, pista 3 - 100 ng/μl, e pista 4 - 250 ng/μl. Pista 5 – cDNA com 217pb amplificado (12,5 ng/μl), a isolar para sintetizar uma sonda marcada com fluoresceína. M - marcador de peso molecular 100pb DNA ladder (Gibco-BRL), peso molecular em pares de bases (pb).

4. DISCUSSÃO

A amendoeira é uma espécie altamente heterozigótica, pelo que a utilização de material de origem seminal tem dado lugar à selecção de clones provenientes de material adulto. Frequentemente o estabelecimento *in vitro* de material adulto para micropropagação tem-se revelado difícil, em parte devido a contaminação endógena dos explantes (Raquel, 1998) e, tal como foi verificado no presente trabalho, devido às taxas de multiplicação iniciais serem reduzidas. Apesar dos ensaios de termoterapia, de enraizamento e de aclimação apresentados terem sido efectuados em material juvenil, é objectivo de trabalhos futuros aplicar os ensaios que originaram melhores resultados também a material adulto.

Actualmente não existem tratamentos eficazes para eliminar vírus de plantas no campo, obrigando frequentemente à aplicação de métodos terapêuticos *in vitro*, dos quais se tem destacado a termoterapia aliada à cultura de meristemas ou de ápices meristemáticos. O grande desafio proposto por esta estratégia reside em encontrar um compromisso entre as condições que possibilitam a eliminação de vírus e as que asseguram a sobrevivência da planta. A percentagem de sobrevivência relativamente baixa após os tratamentos de termoterapia previamente realizados (Raquel, 1998) foi elevada para 100% nos ensaios C, D e E desenvolvidos no presente trabalho. Aparentemente, este facto deveu-se, pelo menos em parte, à redução do período de sub-cultura pré-tratamento e da duração do próprio tratamento, aliadas ao aumento do período de tempo em sub-cultura entre os dois tratamentos. A minimização da percentagem de rebentos hiperhidratados após a termoterapia foi de modo geral conseguida. A aplicação de 20 dias consecutivos de termoterapia revelou-se inadequada mesmo reduzindo a duração da sub-cultura pré-tratamentos (caso do ensaio F), tendo causado considerável deterioração dos tecidos dos rebentos tratados (caso dos ensaios B e F). Em geral, os ensaios C (sub-cultura pré-tratamento de 7 dias, tratamento a rebentos mantidos em meio MJ durante 16 dias consecutivos) e D (semelhante ao C mas o tratamento é aplicado a ápices mantidos em meio de indutor de “multi-ápices”) originaram melhores resultados comparativamente com os restantes. A composição hormonal do meio de cultura desempenha uma função importante na eficiência da termoterapia nas *Rosaceae* em geral (Spiegel *et al.*, 1995). No presente trabalho, o meio de Druart aplicado nas condições do ensaio D destacou-se pelo facto de induzir a

multiplicação celular e de originar vários ápices a partir de um rebento tratado, aumentando a probabilidade de se obterem mais rebentos sãos. Apesar dos progressos verificados com os ensaios C e D em termos de sobrevivência e de hidratação dos rebentos tratados, ainda é prematuro tirar conclusões sobre a sua eficácia na inativação do PDV pela termoterapia, e na possível eliminação deste vírus pelo isolamento do ápice vegetativo. É essencial, após os tratamentos terapêuticos, avaliar as plantas regeneradas quanto à presença do(s) vírus a eliminar, pela monitorização periódica de preferência ao longo de duas épocas de floração (Spiegel, 1996; Regner e Stadhuber, 1997). Em relação aos resultados da cultura de meristemas de material de campo, era de prever que o material adulto, por ser mais diferenciado, tivesse menor reacção no meio indutor de “multi-ápices” do que o material juvenil. Um aspecto a considerar futuramente será o isolamento de segmentos nodais de material adulto e, após o seu estabelecimento *in vitro*, proceder ao isolamento do respectivo meristema. Aparentemente, quanto mais reduzida é a dimensão do conjunto meristema e primórdios foliares adjacentes, mais precária é a sobrevivência do explante. A optimização da técnica de RT-PCR *in situ* poderá vir a fornecer dados que permitam encontrar as dimensões ideais do meristema ou do ápice meristemático a isolar, tanto para a termoterapia como para a cultura de meristemas.

Um dos aspectos limitantes da cultura de meristemas tem sido o acastanhamento dos tecidos seccionados, uma situação que resulta da oxidação de compostos fenólicos na presença de oxigénio e agravado pela incidência da luz. Este fenómeno foi mínimo no presente trabalho, possivelmente devido à rapidez no isolamento dos explantes e ao cuidado em mantê-los no escuro durante 2 dias. A opção de aplicar 2 dias de escuro resultou do facto de Raquel (1998) ter observado que a redução parcial da luz, por cobertura com folha de papel, era insuficiente para impedir o acastanhamento.

Analisando os resultados dos ensaios de enraizamento *in vitro* de amendoeira, os ensaios E₃ e E₄ destacaram-se por terem induzido o enraizamento da cultivar portuguesa Boa Casta em quase 100% dos casos. Este facto é particularmente importante na medida em que a amendoeira é uma espécie de difícil enraizamento, o qual tem sido conseguido apenas para um número restrito de cultivares (Rugini e Verma, 1982; Rugini, 1987; Rugini, 1993; Caboni e Damiano, 1994; Caboni *et al.*, 1997) e tem-se revelado

altamente dependente do genótipo (Rugini e Verma, 1983; Caboni e Damiano, 1994; Caboni *et al.*, 1997). Em geral, os casos de sucesso têm adoptado métodos de indução hormonal reactivamente longa, submetendo os rebentos a baixas concentrações de uma auxina (IAA, IBA ou NAA) em meio MS ou de Bourgin e Nitsch (1967) com macroelementos reduzidos ou não a metade, no escuro ou sob determinado fotoperíodo. Neste trabalho, ensaios semelhantes baseados em “Long Initiation Pretreatment” (LIP) tiveram pouco sucesso na indução de enraizamento em amendoeira, ao contrário dos baseados no “Brief Induction Pretreatment” (BIP), os quais deram em geral bons resultados. Comparando os ensaios em geral, em termos da auxina utilizada, o IBA foi mais eficaz na indução de enraizamento do que o IAA. Após o início da formação das raízes, aparentemente estas tiveram um desenvolvimento normal e idêntico em todos os ensaios (E₁ a E₉), pelo que o passo crítico parece ser a indução da rizogénese. Estes resultados parecem indicar que a presença da auxina no meio é necessária apenas na fase inicial do enraizamento, tal como anteriormente verificado para outros genótipos de amendoeira (Caboni e Monastra, 1997) e de macieira (De Klerk e Ter Brugge, 1992). Segundo Caboni *et al.* (1997), durante o primeiro dia do processo de enraizamento ocorrem variações ao nível de fenóis totais e de peroxidases que são determinantes para a obtenção de uma reposta satisfatória. No futuro, pelo menos o procedimento do ensaio E₄ será aplicado em material adulto e em outras cultivares portuguesas de amendoeira, para verificar se também é o mais adequado nestes casos. Pretende-se também testar o sistema em genótipos considerados recalcitrantes por outros grupos a trabalhar em amendoeira. Poderão testar-se concentrações decrescentes de IBA a partir da escolhida (80mg/l) no sentido de verificar qual é a concentração mínima para a qual os resultados, em termos de enraizamento, são ainda satisfatórios. Poderá também testar-se o tempo mínimo necessário de permanência dos rebentos no meio de indução de enraizamento para se obterem igualmente os resultados pretendidos. Caboni *et al.* (1998) verificaram a necessidade de utilizar meio de cultura líquido para alguns genótipos. No caso de clones cujo enraizamento seja particularmente difícil, poderão ser testadas alternativas envolvendo a utilização de meio líquido com substratos sólidos ou a indução por outras auxinas como o NAA combinado ou não com o IBA ou o IAA. Alguns autores referem o sucesso do NAA na indução do enraizamento em *Prunus ssp.* (Druart, 1992) e em amendoeira (Rugini e Verma, 1982). Nos ensaios de enraizamento

E₁ a E₉, não foi observada qualquer relação entre a incidência de necrose apical e as condições específicas de cada ensaio. O início de necrose apical registado em alguns rebentos sujeitos a estes ensaios poderia dever-se à transferência dos rebentos de um meio contendo uma auxina para um meio sem quaisquer hormonas, conduzindo assim a alguma perda de dominância apical. De facto, nos casos mais extremos em que a necrose apical foi completa, desenvolveram-se rebentos laterais. Para evitar esta situação, poderá ser testada a adição de concentrações mínimas de auxina aos meios de cultura após a indução do enraizamento. Poderá ser igualmente interessante variar o período de permanência no último meio de desenvolvimento das raízes até à sua transferência para o substrato, para economizar tempo e otimizar em parte a aclimação. Esta questão coloca-se por se ter verificado experimentalmente que as raízes curtas facilitaram a sua lavagem e a introdução da planta no substrato, evitando quebras que podem conduzir a futuras infecções. O aumento da percentagem de sobrevivência das plântulas à aclimação poderá ser obtido quando for possível dispôr de melhores condições técnicas para a sua realização.

O desenvolvimento e aplicação de métodos de detecção viral são fundamentais nos programas de saneamento de viroses, precedendo os tratamentos terapêuticos para diagnosticar os vírus presentes, e sucedendo-os para verificar a sua eficácia. Um dos métodos mais utilizados na detecção viral em plantas tem sido o teste ELISA. Este, porém, apresenta algumas limitações como a falta de sensibilidade quando o título viral é muito reduzido (Borja e Ponz, 1992; Handing *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1994; Knapp *et al.*, 1995b), problema particularmente interessante no caso dos vírus PDV e PNRSV (Barbara, 1980; Clark *et al.*, 1976; Mink, 1980). Apesar de alguns autores terem considerado o ELISA rápido e eficaz na detecção dos vírus PDV e PNRSV em material micropropagado (Bauman *et al.*, 1984 *in* Snir e Stein, 1985; Wells e Kirkpatrick, 1986), tal não sucedeu na detecção do PDV mesmo em material de campo de amendoeira, tendo Raquel (1998) iniciado a optimização de um método mais sensível como é o IC/RT-PCR. Este método tem sido desenvolvido para a detecção de vários vírus de árvores de fruto economicamente importantes (Jacobi *et al.*, 1996 *in* Jacobi *et al.*, 1998; Wetzell *et al.*, 1992; Candresse *et al.*, 1995b; Rowhani *et al.*, 1995). Para aumentar a eficácia deste método reduzir a presença de inibidores na amostra, Raquel testou os

efeitos da manutenção do extracto vegetal a 4°C antes da IC, a presença do PVP (agente quelante dos polifenóis) e do DIECA (agente anti-oxidante) no extracto vegetal. A remoção das substâncias inibidoras da reacção de RT-PCR é um pré-requisito para o sucesso da detecção de vírus nos seus hospedeiros lenhosos através de RT-PCR (Hadidi e Yang, 1990; Hadidi *et al.*, 1993; Minafra e Hadidi, 1994). Têm sido desenvolvidos vários procedimentos para essa remoção em *Prunus*, como por exemplo o tratamento do extracto clarificado ou dos ácidos nucleicos isolados com a resina GeneReleaser (Levy *et al.*, 1994; Parakh *et al.*, 1995), destacando-se a imunocaptura por permitir simultaneamente a pré-purificação e a concentração das partículas virais. Em particular, o presente trabalho revelou que o sucesso da amplificação por IC/RT-PCR em amendoeira requer a diluição destas substâncias (a proporção 1:1 revelou ser a mais indicada). Na seiva elaborada de muitos hospedeiros do PDV não diluída, o vírus perde metade da sua infecciosidade inicial em cerca de 30 minutos. A inclusão de anti-oxidantes nos extratos de seiva de folhas previne esta rápida perda (*in* Fulton, 1981). No entanto, os resultados da adição de DIECA a 0,2% ao tampão de extracção foram inconclusivos, uma vez que foram obtidos com base num extracto diferente do obtido no ensaio sem DIECA. Em termos de duração da incubação do extracto vegetal na imunocaptura, ambas as condições 1h30min / 30°C e durante a noite / 4°C se mostraram adequadas, uma vez que originaram resultados positivos. O facto da incubação 1h30min / 4°C não ter permitido a detecção do PDV pode dever-se ao facto de, a baixa temperatura, 1h30min não ser tempo suficiente para a ligação anticorpo-cápside viral. Para melhorar o acesso aos ácidos nucleicos virais e a “performance” do teste em geral, têm sido propostas diversas manipulações como a aplicação de calor, de ciclos de congelação/descongelação ou a adição de detergentes (Wetzel *et al.*, 1992; Wyatt *et al.*, 1993; Minafra e Hadidi, 1994; Barbara *et al.*, 1994; Kokko *et al.*, 1996; Lemmetty *et al.*, 1997). Estas manipulações poderão ser testadas para os Ilarvírus que afectam a amendoeira, embora possivelmente as primeiras não sejam adequadas ao caso do PDV por este ser um vírus de grande labilidade. No futuro, o método IC/RT-PCR poderá ser adaptado para a detecção dos vírus PNRSV e ApMV, independentemente ou em simultâneo com a detecção do PDV através do chamado IC/RT-PCR “multiplex”. Este último método poderá ser útil na avaliação do estado de sanidade de amendoeiras no campo e em estudos dos mecanismos de infecção e do movimento viral, em inoculações

controladas de plantas em estufa, à semelhança do que foi sugerido para outros casos (Jacobi *et al.*, 1998). O método de IC/RT-PCR adaptado ao PDV poderá aplicar-se na detecção deste vírus ao nível do pólen ou de órgãos florais, tal como descrito por Levy *et al.* (1995) para a detecção do PPV (Plum Pox Virus; doença de SharKa) em anteras de pessegueiro, ameixeira e damasqueiro.

Uma vez que esta parte do trabalho decorreu durante o Verão, período em que as temperaturas foram geralmente elevadas, e dado que alguns vírus resistem a temperaturas elevadas sob a forma de RNA bicatenário (RNAds) (Knapp *et al.*, 1995b), optou-se por testar um método de extracção de RNAds aplicado antes da reacção de RT-PCR. Tal como no IC/RT-PCR, as etapas deste método foram inicialmente adaptadas para a detecção do PDV em material de campo de amendoeira, e posteriormente aplicadas na análise de material mantido *in vitro* ou aclimatizado, proveniente ou não de ensaios de saneamento viral. Durante a adaptação do método de extracção de RNAds, as diluições realizadas tanto com extractos de caule como de folhas resultaram sempre num decréscimo progressivo da amplificação, podendo reflectir o sucesso da purificação do RNAds na eliminação de substâncias inibidoras da reacção de PCR. Estes resultados sugerem que em futuros ensaios os extractos deverão ser utilizados sempre concentrados. Em alguns casos as taxas de detecção de vírus em árvores fruteiras, por IC/RT-PCR e análise em gel de poliacrilamida, são reduzidas (Candresse *et al.*, 1995b). Por outro lado, os vírus de plantas ocorrem irregularmente em várias partes das mesmas e a concentração viral decresce nos períodos de Verão e Inverno (Stein *et al.*, 1987; Singh e Singh, 1996; Olmos *et al.*, 1997). No presente trabalho, apesar do PDV ter sido detectado em material de campo (amendoeira de Monsanto) por extracção de RNAds/RT-PCR e análise em gel de poliacrilamida, a análise em gel de agarose não possibilitou a detecção. Tal facto poderá reflectir, tal como o IC/RT-PCR, a redução do título do vírus nesta época do ano (Verão).

Alguns autores referem que a sensibilidade da detecção por PCR pode ser melhorada amplificando pequenos fragmentos em vez de fragmentos grandes (Rosner *et al.*, 1997; Singh e Singh, 1997). Utilizando independentemente dois pares de iniciadores específicos em RT-PCR para detectar o PNRSV na cv. Chazanov de amendoeira, Rosner *et al.* (1997) obtiveram maior amplificação da sequência mais curta, resultado

também verificado no presente trabalho para o PDV ainda que a diferença tenha sido menos significativa. Estes autores apresentaram hipóteses explicativas que poderão aplicar-se ao presente caso, nomeadamente a incompleta replicação do cDNA pela Taq DNA polimerase. Utilizando três iniciadores na mesma mistura de reacção, Rosner *et al.* (1997) obtiveram ambas as bandas correspondentes à sequência pequena e à grande, tendo visualizado melhor a sequência mais pequena no caso do título do PNRSV ser reduzido, e a sequência maior quando o título era elevado. No presente trabalho, a utilização conjunta dos iniciadores 1175, 1896 e 1391 no passo de RT-PCR originou a amplificação exclusiva da sequência 217pb (em detrimento da de 722pb), sugerindo que o título do PDV era muito reduzido no material vegetal utilizado na altura da sua colheita (material proveniente da árvore controlo positivo de Monsanto). Por outro lado, a amplificação de produtos de PCR mais curtos é frequentemente explicada pela maior rapidez com que são gerados fragmentos mais curtos pela DNA polimerase. Para a optimização do passo de RT-PCR em tubo, utilizaram-se concentrações de Taq DNA polimerase da ordem das recomendadas para plantas, entre 1 e 4 U por 50µl de mistura de reacção, e de iniciadores entre 0,1 e 1 µM (Candresse *et al.*, 1995b; Crescenzi e Nuzzaci, 1995; Krczal e Vavenarius, 1995; Levi *et al.*, 1995; Nemchinov e Hadidi, 1995; Nemchinov *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 1995; Thomson e Dietzgen, 1995; Singh e Singh, 1996; Olmos *et al.*, 1997; Mackenzie *et al.*, 1997; Jacobi *et al.*, 1998. No entanto, os resultados obtidos no presente trabalho não foram conclusivos, o mesmo sucedendo com as variações no tempo de desnaturação do programa de PCR. Em relação à concentração dos iniciadores escolhidos (1175 e 1391), a de 0,5 µM originou uma amplificação mais intensa da banda específica (217pb), acompanhada no entanto por igual aumento da banda inespecífica observada em gel de poliacrilamida, questão que poderá vir a ser resolvida pela utilização de um iniciador alternativo ao 1391.

Para aumentar a sensibilidade na detecção viral por PCR, têm sido desenvolvidos protocolos que recorrem à reamplificação dos produtos de reacção - “heminested PCR” - (Erlich *et al.*, 1991; Zhang e Erlich, 1994) ou à associação com o teste ELISA - ELISA-PCR (Allard *et al.*, 1993) No entanto, estes métodos apresentam limitações relacionadas com o elevado número de manipulações. Outras formas possíveis para aumentar a sensibilidade do RT-PCR poderão ser as variações ao nível do número de ciclos de amplificação (25, 30, 35 ou 40 ciclos, por ex.), ou da concentração da RTase

(10-30 U/50 µl reacção, por ex.). Para a quantificação e automatização dos métodos de detecção estudados, poderão ser testadas no futuro sondas fluorescentes em substituição da análise electroforética (TaqManTM - Perkin Elmer; Holland *et al.*, 1991; Tyagi e Kramer, 1996 *in* Reeves, 1998).

Alguns autores referem o sucesso do IC/RT-PCR na detecção viral em material micropropagado (Kokko *et al.*, 1996), contrariamente aos testes imunológicos como o ELISA cuja sensibilidade é insuficiente. Por outro lado, segundo Knapp *et al.* (1995) os vírus PDV e PNRSV não são eliminados apenas pela micropropagação. Uma vez que as partículas do PDV são instáveis, a rara ocorrência e aparente perda do PDV em rebentos micropropagados e em plântulas aclimatizadas não foi surpreendente. Roux (1987) igualmente registou a perda dos vírus PDV e PNRSV pela propagação *in vitro*, ao contrário de Knapp *et al.* (1995) que detectaram estes vírus após vários ciclos de multiplicação. Os resultados negativos obtidos neste trabalho com IC/RT-PCR em material micropropagado poderão dever-se à concentração do vírus ser muito reduzida ou apenas a uma baixa concentração da cápside proteica (com o ácido nucleico viral numa concentração “normal”), tal como foi sugerido por Scott *et al.* (1992b) para um caso semelhante. Foi para testar a segunda hipótese que se procedeu à extracção de RNAds seguida de RT-PCR. No entanto, os resultados obtidos parecem sugerir que o PDV não se encontra na forma de RNAds em material *in vitro*, pelo menos com níveis detectáveis. Deste modo, a aparente ausência do PDV nas plântulas aclimatizadas deverá ser confirmada pela aplicação periódica dos métodos de detecção adaptados neste trabalho - IC/RT-PCR e extracção de RNAds/RT-PCR-, durante pelo menos duas estações de crescimento para assegurar a sanidade da amendoeira a longo prazo.

III – INTRODUÇÃO À TÉCNICA DE RT-PCR *IN SITU* PARA A ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DO PDV EM AMENDOEIRA

1. INTRODUÇÃO

1.1. Preparação do material histológico	84
1.2. Tratamentos com macerozima, proteinase K e DNase	85
1.3. Transcrição inversa e PCR	86
1.4. Métodos de detecção - directo <i>versus</i> indirecto	87
1.5. Quantificação dos resultados	89
1.6. Controlos	89

No decorrer dos programas de saneamento de cultivares portuguesas de amendoeira, têm sido utilizadas várias estratégias para a eliminação dos vírus que as afectam, das quais se destaca a associação da termoterapia à cultura de meristemas ou de ápices de rebentos *in vitro*. No entanto, esta estratégia tem sido limitada pelo desconhecimento das dimensões adequadas de tecido a isolar após a termoterapia, uma vez que a sobrevivência dos meristemas isolados está directamente relacionada com a sua dimensão, e desconhece-se a localização das partículas virais nos tecidos da amendoeira, em particular nos meristemas vegetativos. Um dos métodos utilizados para a localização viral em plantas tem sido o “immunotissue printing” (Cassab e Varner, 1987; Lin *et al.*, 1990; Knapp *et al.*, 1995), o qual permite localizar vírus no interior de órgãos individuais (*in Candresse*, 1995b). Em particular, nos casos em que o vírus se encontra apenas numa pequena fracção do tecido (por exemplo, vírus limitados ao floema), este método evita a diluição viral originada pela maceração das amostras, embora possa não atingir a sensibilidade dos testes ELISA ou DIBA (*in Candresse*, 1995b). Por outro lado, no caso das espécies lenhosas, os compostos fenólicos que estas produzem complicam frequentemente a detecção viral. Os métodos de hibridação *in situ* permitem a correlação morfológica e uma sensibilidade superior. Nalguns casos, porém, a concentração da sequência-alvo na amostra é inferior ao limite de detecção desta técnica (*in Muro-Cacho*, 1997). O PCR *in situ* é uma técnica molecular recente que combina a localização celular proporcionada por hibridação *in situ* ou imunohistoquímica com a elevada sensibilidade do PCR. Nomeadamente, permite a detecção de quantidades mínimas de ácidos nucleicos com sensibilidade e especificidade elevadas, enquanto preserva a integridade celular e a morfologia dos tecidos, ao contrário do PCR convencional que requer a ruptura da amostra (Anderson, 1995; Gu, 1995; Nuovo, 1996; Muro-Cacho, 1997). Estas capacidades abrem novas perspectivas ao estudo, a nível celular, da distribuição de reduzidos números de cópias de sequências nucleotídicas. Estes estudos são de particular interesse em situações como infecções virais, mutações génicas, translocação cromossómica, terapia génica ou níveis reduzidos de expressão génica (*in Gu*, 1995). Desde que foi descrita pela primeira vez (Haase *et al.*, 1990), esta “jovem” tecnologia tem sofrido um rápido desenvolvimento tendo sido introduzidas importantes modificações e variações, como o PCR *in situ* directo ou indirecto, o RT-PCR *in situ*, e ainda a aplicação da “self sustained sequence

replication reaction” (IS-3SR, Höfler *et al.*, 1995). A técnica de RT-PCR *in situ* tem sido confinada essencialmente a células e tecidos animais, principalmente na detecção de vírus de RNA (Nuovo *et al.*, 1993; Bagasra *et al.*, 1992; Zehbe *et al.*, 1992; Chiu *et al.*, 1992; Patterson *et al.*, 1993) e em estudos de expressão génica (Martinez *et al.*, 1995). Em plantas, apenas se conhecem três referências na literatura: um estudo de expressão génica por um método radioactivo em *Arabidopsis* (Deeken e Kaldenhoff, 1997); a localização espacial dos transcritos do alelo *Pl* no interior de sementes de *Zea mays* L. (Bombelli *et al.*, 1998); e a amplificação *in situ* do gene codificante para a ribulose-1,5-difosfato carboxilase/oxigenase (*rbcL*) em *Saccharum* (cana-do-açúcar) – primeiro registo de PCR *in situ* em plantas e o segundo com resolução sub-celular (Johansen, 1997). No caso da amendoeira, a utilização da variante RT-PCR *in situ* poderá contribuir para a optimização dos protocolos dos programas de saneamento das cultivares portuguesas, nomeadamente na identificação de tecidos por norma isentos dos vírus que mais as afectam – PDV e PNRSV. Nesse sentido, foram efectuados neste trabalho alguns ensaios preliminares para adaptar esta técnica à localização *in situ* do PDV em vários órgãos da amendoeira – meristemas, pecíolo, limbo e caule. Estas experiências seguiram um procedimento geral que envolve vários passos: preparação do material histológico, tratamentos de digestão sucessivos pelas enzimas macerozima (uma pectinase), proteinase K, e DNase, transcrição inversa e amplificação por PCR, e detecção dos produtos amplificados (Figura 16). Os procedimentos utilizados para hibridação *in situ* de DNA também são apropriados para a amplificação por PCR convencional (Nuovo e Silverstein, 1988), tendo sido por vezes aplicados neste trabalho em alguns passos antes e depois da RT-PCR.

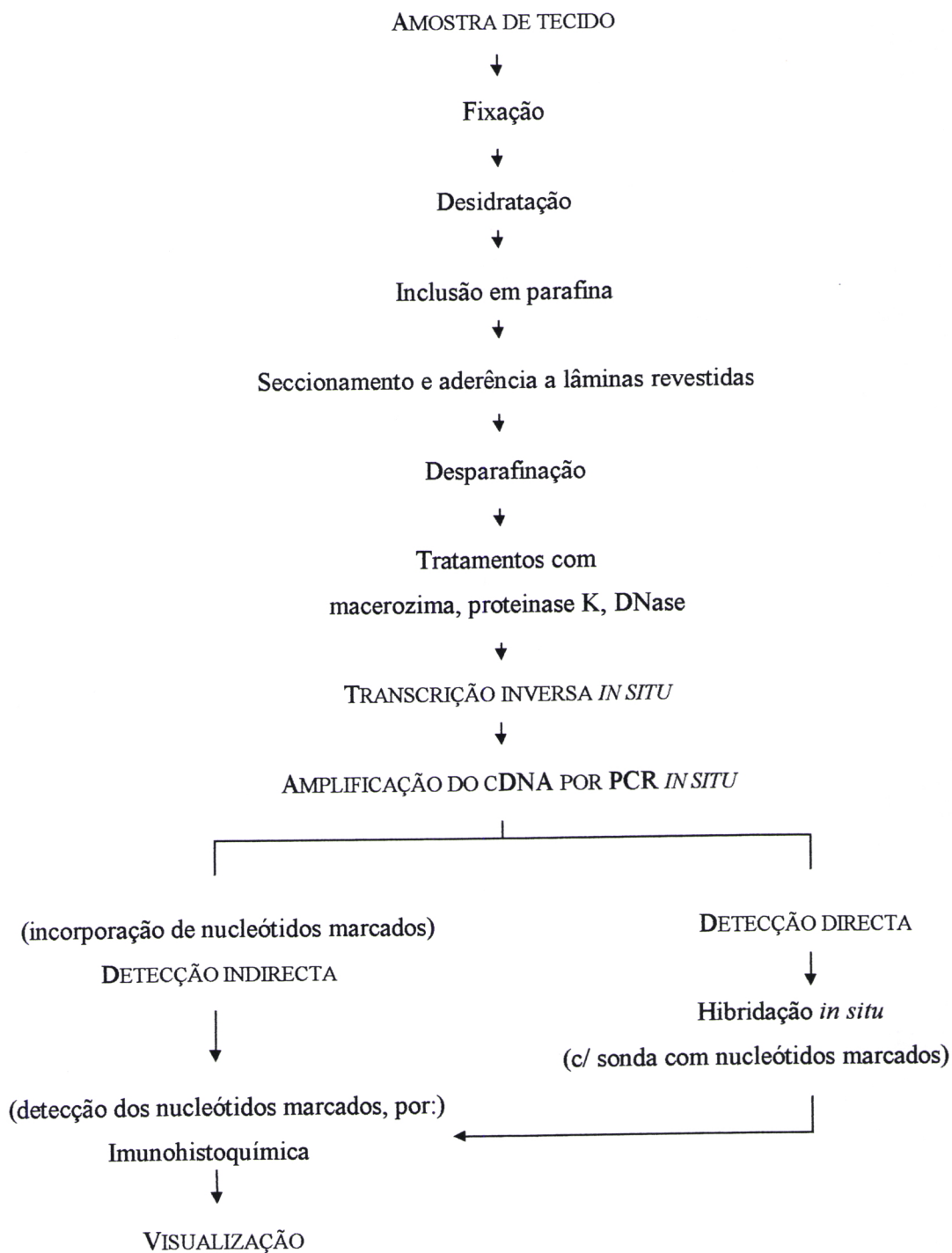


Figura 16 – Representação esquemática das principais etapas dos protocolos de PCR *in situ* utilizados no presente trabalho para secções de tecidos de amendoeira.

1.1. Preparação do material histológico

O PCR *in situ* tem sido realizado com sucesso em vários tipos de amostras: esfregaços de células animais, células em suspensão ou sedimentadas sobre lâmina, cromossomas em metafase, criosecções e secções de tecidos incluídos em parafina. No caso das secções histológicas, a maioria dos autores têm optado pela inclusão dos tecidos em parafina, considerando as criosecções menos indicadas para o PCR *in situ* devido às alterações morfológicas induzidas pela congelação e à taxa superior de difusão do produto amplificado (*in* Muro-Cacho, 1997). Assim, normalmente a preparação das secções envolve a fixação, desidratação, inclusão em parafina e seccionamento com micrótomo, os quais serão seguidamente desenvolvidos.

Geralmente o objectivo da fixação é preservar a morfologia dos tecidos e a integridade dos ácidos nucleicos. No caso do PCR *in situ*, a fixação é um passo crítico, uma vez que o RNA está aprisionado numa organização tridimensional, ligado a proteínas e a outras macromoléculas. A fixação deverá permitir a retenção do RNA, dando-lhe suporte suficiente para impedir a sua remoção das secções durante as lavagens nos passos seguintes, e mantendo-o ainda assim acessível à DNase e aos reagentes de PCR. Para aumentar essa acessibilidade, as secções de material fixado são sujeitas a uma digestão proteásica. Em células animais, a formalina tamponizada com PBS tem-se destacado na preservação morfológica e na minimização da difusão do sinal (Greer *et al.*, 1991), sendo frequentemente indicada como o fixador mais adequado tanto para hibridação *in situ* (Nuovo e Silverstein, 1988) como para PCR *in situ* (Nuovo, 1996). Pelo contrário, utilizando os fixadores desnaturantes, como sejam o EtOH e a acetona, há uma probabilidade relativamente elevada do amplicão se difundir para o exterior da célula (*in* Nuovo, 1996). Em plantas, os protocolos de hibridação *in situ* têm utilizado dois fixadores do grupo dos aldeídos – o formaldeído e o glutaraldeído - que proporcionam superior retenção de RNA e acessibilidade à sonda (Jackson, 1989). Após a fixação, o material é desidratado passando por uma série ascendente de EtOH. Os passos de desidratação, lavagem, e inclusão devem traduzir-se por alterações graduais para evitar danos nos tecidos (Jackson, 1989).

No presente trabalho, foram inicialmente preparadas secções dos vários órgãos do material mantido *in vitro* e da amendoeira de Monsanto (controlo positivo) segundo um protocolo previamente utilizado em estudos histológicos de regeneração adventícia em

amendoeira (Sanchez, 1996; Miguel *et al.*, submetido). Testou-se igualmente um protocolo utilizado para hibridação *in situ* em plantas (Jackson, 1989), cuja eficácia está ainda sob avaliação dependente dos resultados finais de futuros ensaios.

1.2. Tratamentos com macerozima, proteinase K e DNase

Após a desparafinação das secções aderentes a lâminas revestidas, os protocolos para tecidos animais prosseguem directamente para a digestão proteásica. No entanto, em plantas tem sido recomendada a digestão prévia das pectinas para evitar a elevada coloração inespecífica ao nível da lamela média (especialmente no tecido xilémico) quando são utilizados nucleótidos marcados com digoxigenina ou isotiocianato de fluoresceína (Johansen, 1998). No presente trabalho a digestão das pectinas foi efectuada pela aplicação de macerozima a 1%.

A digestão proteásica é a variável-chave do PCR *in situ* (in Nuovo, 1995), uma vez que quebra ligações cruzadas criadas pelo fixador, permitindo o acesso da DNase e dos reagentes do PCR à sequência-alvo. No entanto, este tratamento não deve ser excessivo, de forma a permitir a manutenção de algumas dessas ligações, para a retenção *in situ* do produto de PCR. Deste modo, a duração da digestão e a concentração da protease deverão ser optimizadas para permitir a amplificação do produto de PCR e evitar a difusão do mesmo. As proteases mais utilizadas em patologia de diagnóstico incluem a pepsina, a proteinase K e a tripsina, (Nuovo, 1995). Após a digestão, a protease deve ser completamente inactivada pelo aquecimento ou removida por lavagem, uma vez que quantidades mínimas dessa enzima podem destruir a DNA polimerase, a qual é essencial para a amplificação por PCR (in Gu, 1995).

No caso do RT-PCR *in situ*, geralmente é necessário um tratamento com DNase para destruir todo o DNA endógeno da planta, sendo geralmente recomendado um período de tratamento de cerca de 12h. Este passo pode ser omitido se os iniciadores utilizados no RT-PCR *in situ* tiverem capacidade para amplificar apenas o cDNA que se deseja detectar, evitando assim o aparecimento de falsos positivos. É considerado pré-requisito para o sucesso do RT-PCR *in situ* a ausência de sinal nos controlos negativos (com DNase e por exemplo sem RT). A presença de sinal nuclear nas células do controlo sem DNase é também considerado como um indicativo de uma digestão

proteásica adequada, podendo o ensaio ser utilizado para detectar falsos positivos. No RT-PCR *in situ* directo, este sinal pode representar a reparação do DNA da planta, a amplificação genómica ou o emparelhamento errado dos iniciadores (*in Nuovo, 1995*).

1.3. Transcrição inversa e amplificação por PCR

No RT-PCR *in situ*, a reacção de RT pode ser efectuada no aparelho de PCR ou em câmara húmida. A reacção de PCR realizada em secções de tecidos obriga à montagem de uma câmara de reacção montada em lâmina sobre cada amostra. A câmara é totalmente selada para evitar a evaporação da mistura de reacção e a lâmina é colocada num termociclador com um bloco de aquecimento apropriado.

A reacção de PCR pode envolver a incorporação de nucleótidos marcados (digoxigenina-11-dUTP ou fluoresceína-11-dUTP, por exemplo) nos produtos amplificados, os quais são detectados por imunohistoquímica na técnica de PCR *in situ* directo. No PCR *in situ* indirecto, os produtos amplificados são detectados por hibridação *in situ* com uma sonda específica marcada pelos nucleótidos referidos, seguida por imunohistoquímica. Uma das limitações da aplicação do PCR *in situ* tem sido a reduzida eficiência da amplificação (Ben-Ezara *et al.*, 1991; Embretson *et al.*, 1993a). Para ultrapassar as desvantagens inerentes ao PCR *in situ* e para assegurar uma amplificação suficiente, comparativamente com o PCR convencional têm sido recomendados ciclos de PCR ligeiramente mais longos (Nuovo, 1992), e concentrações de DNA polimerase e de magnésio superiores (Long *et al.*, 1993; Nuovo *et al.*, 1991; Nuovo, 1995). Estas modificações poderão estar relacionadas com a captura de reagentes pelas lâminas ou com a presença de inibidores da PCR na amostra de tecido (Wu *et al.*, 1991). Segundo Nuovo (1995), a composição do tampão de PCR e a concentração dos nucleótidos utilizadas para o PCR convencional mantêm-se no PCR *in situ*. Os iniciadores devem ser desenhados de modo a amplificarem sequências nucleotídicas reduzidas (com 200-300pb no caso das plantas, Johansen, 1997_b). Martinez *et al.* (1995) sugerem que no caso de produtos mais longos pode não haver sinal devido à degradação parcial dos ácidos nucleicos durante o processamento dos tecidos (principalmente durante a fixação, a inclusão e o seccionamento). Geralmente são recomendados 25 a 40 ciclos de PCR, embora o “patamar” da reacção de

amplificação possa ser atingido em menos de 20 ciclos (Nuovo *et al.*, 1991; Bagasra *et al.*, 1992; Long *et al.*, 1993; Steel e Poulson, 1997). No PCR *in situ* directo, este número poderá ser menor do que no método indirecto ou no PCR convencional, de forma a evitar a obtenção de uma coloração excessivamente forte impedindo uma localização detalhada (*in* Martinez *et al.*, 1995).

1.4. Métodos de detecção - directo *versus* indirecto

Tal como foi referido anteriormente, na detecção podem ser utilizados dois métodos diferentes, o directo e o indirecto (*vide* III - 1.3.). O método directo tem sido adaptado por diversos grupos devido à sua maior simplicidade e rapidez (Bombelli *et al.*, 1995; Martinez *et al.*, 1995; Nuovo, 1996; Johansen, 1997). No entanto, este método tem sido desaconselhado por alguns autores porque pode originar resultados falso-positivos, especialmente no caso de secções de tecidos (Long *et al.*, 1993; Komminoth e Long, 1994). Esta tendência, segundo os mesmos autores, pode dever-se quer à incorporação inespecífica dos nucleótidos marcados no DNA endógeno fragmentado e em reparação pela DNA polimerase, quer a emparelhamento inespecífico iniciado por fragmentos de cDNA ou DNA da planta - “emparelhamento endógeno”. Segundo Muro-Cacho (1997), têm sido testadas várias alternativas para reduzir estes artefactos com um sucesso apenas parcial. São estas:

- (1) a utilização de DNA polimerase sem actividade exonucleásica (Komminoth *et al.*, 1994; Komminoth e Long, 1994; Hu *et al.*, 1981; Sallstrom *et al.*, 1994);
- (2) a reparação das extremidades do DNA fragmentado através do tratamento com a ligase T₄ (Zehbe *et al.*, 1994; Staecker *et al.*, 1994; Patel *et al.*, 1994; Martinez e Cuttitta, 1995; Crisan e Mattson, 1993; Grafstrom *et al.*, 1984);
- (3) ou a omissão de nucleótidos marcados nos primeiros ciclos de PCR (Grafstrom *et al.*, 1984; Zaki *et al.*, 1994).

O PCR *in situ* indirecto, embora mais laborioso, permite maior especificidade na detecção de produtos de PCR intracelulares, uma vez que as sondas utilizadas reconhecem apenas sequências especificamente amplificadas. A hibridação das sondas com o produto amplificado segue as regras gerais descritas para a hibridação *in situ* (*in* Muro-Cacho, 1997). Segundo Nuovo (1994), neste caso a duração óptima de digestão

proteásica não varia muito – 20 a 30 min para tecidos fixados durante 4 h a vários dias, o que poderá tornar menos morosa a optimização do método.

Tanto para o método directo como para o indirecto, podem ser usados três sistemas de marcação diferentes – marcação enzimática, fluorescente, ou com ouro (*in* Johansen, 1997_b). A marcação da sonda pode ser feita com marcadores radioactivos, mas actualmente os sistemas de detecção não radioactivos são muito utilizados devido às inúmeras vantagens que apresentam, nomeadamente uma sensibilidade equivalente ou superior, a redução significativa dos tempos de exposição, o menor custo dos materiais, a maior estabilidade das sondas, e a ausência dos riscos relacionados com o manuseamento de material radioactivo. As potenciais desvantagens incluem o facto de envolverem um trabalho ligeiramente mais intensivo (*in* Karcher, 1994). A eficiência da detecção não radioactiva tem sido recentemente melhorada pela utilização de métodos de detecção imunológicos com ouro e prata (Sallstrom *et al.*, 1994; Zehbe *et al.*, 1992).

Um dos sistemas de marcação mais utilizados no PCR *in situ* tem sido o sistema digoxigenina-anti-digoxigenina, baseado na utilização da digoxigenina (DIG), um esteróide isolado de *Digitalis* (*D. purpurea* e *D. lanata*) e não detectável em qualquer outro material biológico (Martin *et al.*, 1990). Este sistema pode ser aplicado tanto no método directo como no indirecto, envolvendo a detecção mediada por anticorpos anti-DIG, de elevada afinidade, conjugados com fosfatase alcalina ou ainda com a peroxidase, a fluoresceína ou a rodamina. A fosfatase alcalina (AP) tem sido muito utilizada em conjunto com o sistema de substrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) - “nitroblue tetrazolium chloride” (NBT) (Bombelli *et al.*, 1995; Martinez *et al.*, 1995; Nuovo, 1996; Johansen, 1997). Neste sistema, a fosfatase alcalina remove enzimaticamente o grupo fosfato do BCIP solúvel e incolor, e o produto indolil daí resultante é oxidado para produzir um dímero insolúvel de cor azul-violeta. A coloração produzida é amplificada pela adição de NBT, um sal solúvel que ao oxidar o grupo indolil, fica reduzido produzindo um intenso corante insolúvel designado por NBT-formazan (Leary *et al.*, 1983).

No presente trabalho, foram aplicados em paralelo os métodos de detecção directo e indirecto, utilizando o sistema DIG-anti-DIG associado à AP em conjunto com o sistema NBT-BCIP.

1.5. Quantificação dos resultados

A quantificação dos resultados finais do PCR *in situ* permanece em aberto, mas os estudos que têm vindo a ser desenvolvidos para delinear uma estratégia adequada são ainda prematuros. Na maioria dos casos, a quantificação morfológica tem sido baseada na contagem de células positivas ou na medição da intensidade da coloração, as quais não são tão lineares como poderiam parecer, sobretudo devido ao efeito “patamar” e à difusão do produto. No caso de secções de tecidos, a quantificação dos resultados não é ainda recomendada (Long *et al.*, 1993; Long *et al.*, 1992) e enquanto não houver conhecimentos mais precisos, não poderá ser mais que comparativa ou semiquantitativa (Gu, 1995).

1.6. Controlos

Uma das vantagens do PCR *in situ* reside na sua capacidade de detectar e analisar a distribuição celular de quantidades mínimas de DNA ou RNA. Porém, esta capacidade é acompanhada por um maior risco de contaminação, pelo que os cuidados recomendados para o PCR convencional devem ser reforçados neste método.

Nos procedimentos de PCR *in situ* é essencial controlar os inúmeros passos envolvidos, não só para interpretar um dado sinal no contexto próprio de sensibilidade e especificidade, como para identificar e corrigir alguns dos artefactos passíveis de ocorrência. Nomeadamente, têm sido indicados alguns controlos prioritários para validar os resultados obtidos. Na área das células e tecidos animais, alguns autores têm utilizado controlos não só qualitativos (para excluir resultados falso-positivos ou falso-negativos) como quantitativos: no caso de suspensões de células intactas, pelo teste de misturas em diferentes proporções de células previamente identificadas como “positivas” ou “negativas”; no caso de tecidos, pela identificação de diferentes tipos de células por imunohistoquímica (Komminoth e Long, 1995).

Em termos qualitativos, dos controlos gerais recomendados, destacam-se:

- a) Amostras-controlo previamente identificadas como positivas ou como negativas para controlar a especificidade e a sensibilidade no método. Ainda não foi possível dispôr deste tipo de amostras para o presente trabalho.
- b) RT-PCR convencional em DNA ou RNA extraídos das amostras-teste para detectar falsos negativos e controlar a sensibilidade. Este tipo de controlo foi efectuado no presente trabalho.

No caso do RT-PCR *in situ* directo, para excluir resultados falso-positivos ou negativos com alguma segurança, são necessários pelo menos os controlos seguintes:

- a) *Controlo positivo / omissão do tratamento com DNase*, para detectar possíveis resultados falso-negativos, cujas causas ainda não estão esclarecidas.
- b) *Controlo negativo / omissão da reacção RT*, para detectar possíveis resultados falso-positivos devidos a emparelhamento incorrecto dos iniciadores e consequente amplificação de sequências de DNA endógeno (nuclear ou citoplasmático).
- c) *Controlo negativo / omissão de iniciadores* na mistura de reacção de PCR, para a detecção de artefactos relacionados com a reparação de quebras no DNA pela actividade exonucleásica da DNA polimerase, ou com a actividade da fosfatase alcalina intrínseca. Autores como Long *et al.* (1993) sugerem ainda a possibilidade de ocorrer “emparelhamento endógeno”, em que a incorporação inespecífica ocorre devido a fragmentos de DNA ou de cDNA que funcionam como iniciadores da síntese de produtos de PCR inespecíficos. Estes fragmentos poderiam ser induzidos por excessiva digestão proteásica, insuficiente tratamento com a DNase, pela fraca fixação dos tecidos ou durante a inclusão ou seccionamento dos mesmos.
- d) *Controlo negativo / omissão da Taq DNA polimerase* na mistura de reacção de PCR, para detectar ligações inespecíficas da sonda e dos anticorpos. Todos estes controlos foram efectuados em cada ensaio no presente trabalho. Alguns autores da área das células ou tecidos animais recomendam adicionalmente a omissão do anticorpo primário na detecção imunohistoquímica, para detectar a actividade enzimática endógena (Komminoth e Long, 1995).

Para o RT-PCR *in situ* indirecto, também são necessários os *controles negativos / omissão da reacção de RT e omissão da Taq DNA polimerase*, requerendo adicionalmente o *controlo negativo / utilização de sondas inespecíficas ou omissão da sonda* na hibridação *in situ*, para controlar a especificidade dessa hibridação. No presente trabalho, todos estes controlos foram efectuados mas não foi utilizada qualquer sonda inespecífica devido à sua indisponibilidade, tendo-se optado por omitir a sonda específica para a detecção do PDV.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparação de soluções stock e do material histológico	95
2.1.1. Preparação de soluções stock	95
2.1.2. Preparação do material histológico	96
2.2. Tratamentos com macerozima, proteinase K e DNase	98
2.3. Transcrição inversa e amplificação por PCR	99
2.4. Detecção dos produtos de PCR	101

2.1. Preparação de soluções stock e do material histológico

2.1.1. Preparação de soluções stock

Ao longo dos ensaios para a otimização do RT-PCR *in situ* em amendoeira, foram preparadas várias soluções:

- PBS – 10mM fosfato de sódio, 130 mM NaCl, pH 7,2, guardado à temperatura ambiente.
- Soluções fixadoras, preparadas de fresco:
- FAA – 63% EtOH, 5% ácido acético, 2% formaldeído.
- Formaldeído a 4% em 0,1 M PBS pH 7,2.
- Solução de macerozima (Serva Feinchemica) a 1% em 0,1M acetato de sódio, 5 mM EDTA, a pH 4,0.
- Solução de proteinase K (Sigma) 6-14 µg/l, a partir de uma solução stock de 10 mg/ml proteinase K em 10 mM Tris-HCl, a pH 7,5, 20 mM CaCl₂ e 50% glicerol.
- Solução de inativação da proteinase K – Solução de glicina (Merk) 2 mg/ml em PBS.
- Solução de DNase (sem RNases, Boehringer Mannheim) 1000 U/ml em 0,1 M acetato de sódio, 5 mM MgSO₄, a pH 5,5.
- Tampão de PCR II 10x concentrado (Gibco-BRL) – 200 mM Tris-HCl (pH 8,4) e 500 mM KCl.
- Mistura de transcriptase inversa M-MLV preparada de fresco (Tabela 14).
- Mistura de PCR preparada de fresco (Tabela 15).
- Tampão bloqueador – 2% BSA em PBS; preparado de fresco.
- Solução de Anti-DIG-AP – Solução stock de Anti-DIG-AP (Boehringer Mannheim) 150 U / 200 µl diluída 1:250 em 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 e 150 mM NaCl.
- Tampão de lavagem – 0,1 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, a pH 9,5, à temperatura ambiente.
- Mistura de hibridação preparada de fresco (Tabela 17).
- Solução de NBT/BCIP – uma pastilha de NBT/BCIP (Boehringer Mannheim) em 10ml de água miliQ estéril, preparada de fresco.
- Meio de montagem – Adesivo de Haupt, preparado com 10 g/l gelatina pura, 150 ml/l glicerol e 20 g/l cristais de fenol.
- Solução corante de azul de toluidina – 0,05% em tampão acetato 0,1 M a pH 4,4 (Feder e O'Brien, 1968).

Para impedir a degradação do RNA viral que se pretendeu detectar, foi necessário assegurar a ausência de RNAses nas soluções utilizadas. As RNAses são enzimas muito estáveis e, embora as existentes nos tecidos fossem inicialmente destruídas pela fixação e pelo tratamento com a protease, teve-se o cuidado de preparar as soluções com água miliQ autoclavada duas vezes, bem como de utilizar sempre material de vidro esterilizado a seco a 180°C durante 16h.

2.1.2. Preparação do material histológico

Para os testes preliminares de RT-PCR *in situ*, foi preparado diverso material vegetal:

- (1) *in vitro* proveniente de cultura de meristemas;
- (2) *in vitro* previamente tratado por termoterapia e quimioterapia;
- (3) *in vitro* sujeito a dois tratamentos de termoterapia;
- (4) de campo controlo positivo;
- (5) *in vitro* não tratado.

Este material foi seccionado em pequenas porções tal como recomenda a literatura (Jackson, 1989), e seguidamente colocado na solução fixadora FAA durante 18 h. Após a fixação, o material foi desidratado numa série crescente de butanol terciário, o qual foi gradualmente substituído por parafina a 60°C, de acordo com o protocolo previamente utilizado em estudos histológicos de regeneração adventícia em amendoeira (Sánchez, 1996; Miguel *et al.*, submetido).

O processamento do material incluído iniciou-se em Maio com o material de campo utilizado como controlo (4). No entanto, não houve qualquer sinal positivo para a presença do PDV, resultado entretanto confirmado por RT-PCR convencional. É possível que tenha havido algum efeito de termoterapia de ocorrência natural nos ramos dos quais foram retirados as amostras, uma vez que estes ramos estavam directamente expostos aos raios solares. Estes resultados vieram acentuar a necessidade de otimizar o protocolo de RT-PCR convencional (*vide* II - 2.3.).

Tal como foi já referido, para tentar melhorar a preservação da integridade das células, procedeu-se à adaptação de um procedimento geral utilizado para hibridação *in situ* em plantas (Jackson, 1989). Neste sentido, e após a optimização do PCR convencional, procedeu-se a uma nova colheita de material de campo controlo, de um ramo

não exposto directamente aos raios solares. Imediatamente após o seu transporte, este material foi fixado, desidratado e incluído, ao longo de 7 dias segundo um procedimento detalhado a seguir.

Dia 1

O material foi separado em diferentes amostras: zona apical, 1º segmento nodal, 2º, 3º, e 4º (mais basal). Aproximadamente metade de cada amostra foi analisada por hibridação “Southern blot” dos respectivos produtos do IC/RT-PCR optimizado, funcionando como um dos controlos para verificar se as amostras se encontram infectadas pelo PDV. Para a fixação da outra metade, foi preparada de fresco uma solução fixadora de 4% de formaldeído em PBS. Para a preparação do formaldeído, ajustou-se o tampão PBS a pH 11 utilizando NaOH, aqueceu-se o PBS a 60°C e seguidamente adicionaram-se 4 g de paraformaldeído, agitando-se até à solubilização total. A solução de formaldeído foi arrefecida no gelo, e o seu pH reajustado para 7 utilizando H₂SO₄ (segundo Jackson (1989) não deve ser utilizado HCl uma vez que a combinação deste com o formaldeído liberta um poderoso carcinogéneo). Para facilitar a penetração do fixador e a remoção do ar dos espaços intercelulares, fez-se a infiltração do fixador sob vácuo durante 5 min.

Dia 2

A solução fixadora foi sucessivamente substituída pelas seguintes soluções:

0,85% NaCl	30 min	em gelo (4°C)
30% EtOH / 0,85% NaCl	1 h	4°C
50% EtOH / 0,85% NaCl	1 h	4°C
70% EtOH / 0,85% NaCl	1 h	4°C
85% EtOH / 0,85% NaCl	12-16h	4°C

Dia 3

A solução de 85% EtOH / 0,85% NaCl foi sucessivamente substituída pelas seguintes:

95% EtOH / água estéril	1h30min	4°C
100% EtOH	1h30min	4°C
100% EtOH	1h30min	4°C
100% EtOH	12-16h	T° ambiente

Dia 4

O EtOH a 100% foi substituído sucessivamente pelas seguintes misturas:

50% EtOH / 50% histoclear 1h T° ambiente

100% histoclear 1h T° ambiente

100% histoclear 1h T° ambiente

50% histoclear / 50% parafina ... 12-16h 60°C

(O histoclear é um substituto menos tóxico do xilol)

Dias 5-7

A solução anterior foi substituída por parafina líquida a 100%, mantida a uma temperatura não superior a 60°C para evitar a destruição dos seus polímeros sintéticos, contribuindo para o sucesso do seccionamento. A parafina foi substituída diariamente de manhã e à tarde, e no 7º dia foram feitos os blocos de parafina. Para o seccionamento destes blocos, foi utilizado um micrótomo de Minot (Jung Reichert) com ângulo da faca de 5° e corte de 8-10 µm de espessura. O micrótomo e a respectiva faca foram cuidadosamente limpos com histoclear entre cada bloco para prevenir a contaminação entre amostras. Os blocos foram talhados em trapézio, deixando cerca de 2 mm de parafina em torno do material vegetal. As secções foram estendidas e secas em gotas de EtOH a 30% em água miliQ estéril sobre lâminas revestidas para PCR *in situ* (Perkin Elmer), às quais aderiram por aquecimento numa estufa a 40°C durante 24h. As lâminas não processadas no momento foram guardadas em tinas de vidro com sílica, numa câmara a 4°C (desta forma são estáveis durante pelo menos 2 meses). Paralelamente, colocou-se numa lâmina de vidro não revestida uma secção de cada amostra de PCR *in situ*, para a avaliação da qualidade da preservação histológica. Essas secções foram coradas com uma solução de azul de toluidina durante cerca de 1 min e depois lavadas em água corrente, observadas e fotografadas.

2.2. Tratamentos com macerozima, proteinase K e DNase

Para iniciar o processamento das amostras, procedeu-se à sua desparafinação colocando-as dentro de tinas de vidro durante 5 min em histoclear, e 5 min em EtOH a 100%. As lâminas foram então retiradas da tina e secas à temperatura ambiente. Em redor de cada amostra foi colocada uma moldura autocolante (Hybaid) limitada superiormente por um quadrado de parafilme, funcionando como uma câmara de

reacção. Cada amostra foi incubada com 100 µl de solução de macerozima, durante 15 min em câmara húmida a 37°C, após os quais as lâminas foram lavadas em água miliQ estéril durante 5 min. Prosseguiu-se directamente para a digestão proteásica realizada por incubação com 100 µl de solução de proteinase K/amostra, em câmara húmida a 37°C. Para otimizar este passo, foram testadas três concentrações diferentes de proteinase K: 6, 10 e 14 µg/ml durante 30 min, e 6 µg/ml durante 30 ou 60 min. A digestão proteásica foi terminada por lavagem em PBS durante 5 min, seguida de incubação numa solução de glicina 2 mg/ml em PBS durante 1 min (100 µl/amostra). Após a secagem das lâminas à temperatura ambiente, cada amostra foi incubada com 50 µl de solução de DNase, em câmara húmida a 37°C durante a noite. Para a utilização como controlo positivo, uma das amostras não sofreu tratamento com DNase tendo-se prosseguido directamente a transcrição inversa. No final da incubação, as amostras foram lavadas 2x 10 min em água miliQ estéril.

2.3. Transcrição inversa e amplificação por PCR

Para o PCR *in situ*, os autores em geral aconselham a amplificação de um fragmento com menos de 300pb (Johansen, 1997b; Gu, 1995). Por esta razão, neste método foram utilizados os iniciadores 1175 e 1391, escolhidos para as reacções de RT-PCR convencional, amplificando uma sequência de 217pb (*vide* II - 2.3.3). As reacções de RT e PCR foram efectuadas em dois passos distintos por recomendação na literatura (*in* Gu, 1995). Cada amostra foi incubada com 50µl de mistura de transcriptase inversa (RTase) (Tabela 14), em câmara húmida a 37°C durante 1h, com excepção de uma amostra à qual foi apenas adicionado tampão de PCR, correspondendo a um dos controlos negativos. Seguidamente, lavaram-se as secções em água miliQ estéril 2x 5 min, escorreram-se as lâminas e procedeu-se à amplificação por PCR.

Tabela 14 - Mistura preparada para as reacções de RT (RT-PCR *in situ* directo e indirecto).

<u>Mistura de RTase</u>	<u>Conc. das soluções stock</u>	<u>Conc.final</u>	<u>P/a 50 µl (µl)</u>
Água miliQ estéril			27,5
Tampão de PCR II (s/ Mg)	10x	1x	5
MgCl ₂	50 mM	5 mM	5
dNTPs	10 mM cada	0,8 mM cada	4
Iniciador 1391	10 µM	0,8 µM	4
DTT	0,1 M	5 µM	2,5
HPRI	40 U/µl	0,8 U/µl	1
RTase	50 U/µl	1 U/µl	1

Nos testes em que foi testado o RT-PCR *in situ* directo, a mistura de PCR foi preparada de acordo com a Tabela 15, adicionando-se 50µl por amostra. Paralelamente, para as amostras controlo negativo foram preparadas duas misturas que apenas diferiram da mistura de PCR uma pela ausência de iniciadores e a outra de Taq DNA polimerase. Posteriormente, testou-se o método indirecto, preparando-se a mesma mistura mas sem DIG-11-dUTP. Em ambos os casos, cada câmara de reacção foi selada retirando a película protectora da moldura, à qual foi então colada uma lamela de poliéster. Rapidamente, as lâminas foram colocadas na placa-suporte para 4 lâminas do aparelho de PCR e foi iniciado o programa de PCR *in situ*, o qual foi idêntico ao programa do RT-PCR convencional optimizado, apesar de terem sido planeados futuros ensaios com programas diferentes. Após a amplificação, cada lamela de poliéster foi cuidadosamente recortada com uma lâmina previamente esterilizada com álcool, para manter a moldura. Para detectar a possível difusão dos produtos amplificados para a mistura de PCR, cada mistura foi cuidadosamente retirada da respectiva câmara de reacção para um tubo Eppendorf (1,5 ml de capacidade) e congelada a -20°C até ser utilizada como amostra numa nova amplificação, agora por PCR convencional. Os produtos dessas amplificações foram analisados por hibridação “Southern blot” (*vide* II - 2.4.2. e 2.4.3.).

No RT-PCR *in situ* directo, as secções foram sujeitas a uma lavagem em PBS durante 5 min, seguida de uma lavagem em EtOH a 100% durante 5 min, após o que secaram à temperatura ambiente. No método indirecto, as secções foram submetidas a lavagem em SSC 2x 5 min a 37°C, fixação em paraformaldeído a 4% em PBS durante 10 min, lavagem em PBS 2x 2 min, desidratação em EtOH a 100% e secagem ao ar.

Tabela 15 - Mistura preparada para as reacções de PCR no método de detecção directo.

<u>Mistura de PCR</u>	<u>Conc. das soluções-stock</u>	<u>Conc. final</u>	<u>Para 50µl (µl)</u>
Água miliQ estéril			33,9
Tampão de PCR II (s/ Mg)	10x	1x	5
MgCl ₂	50 mM	5 mM	5
dNTPs	10 mM cada	0,2 mM cada	1
Iniciador 5' (1175)	10 µM	1 µM	2
Iniciador 3' (1391)	10 µM	1 µM	2
DIG-11-dUTP	1 mM	10 µM	0,5
Taq DNA polimerase (BRL)	5 U/µl	0,06 U/µl	0,6
BSA		0,06%	

2.4. Detecção do produto de PCR

Para a detecção indirecta, foi previamente preparada uma sonda marcada por amplificação da sequência de 217pb (*vide* II - 2.3.3.) por PCR, na presença de DIG-11-dUTP. Esta amplificação foi feita a partir do fragmento de 722pb (*vide* II - 2.3.3.), previamente isolado por restrição de um plasmídeo de clonagem em *E. coli*, e gentilmente cedido por C. Miguel. A mistura de PCR utilizada para esta reacção foi semelhante à utilizada para o PCR convencional, distinguindo-se contudo pela presença de DIG-11-dUTP e por alterações nas concentrações dos restantes nucleótidos, segundo as instruções da Boehringer Mannheim (1996) (Tabela 16). O produto de PCR foi analisado por electroforese em gel de agarose a 1%. O sucesso da marcação com digoxigenina foi comprovado pelo característico atraso na migração electroforética (Figura 18). A concentração da sonda sintetizada foi estimada em aproximadamente 12,5 ng/µl, por comparação com amostras de DNA do fago λ de concentrações conhecidas. Para a purificação da sonda a partir do gel, foi utilizado o kit “QIAquick Spin” (Qiagen) tal como descrito em II - 2.4.4..

No caso da detecção directa, a amplificação foi bloqueada incubando-se as amostras em tampão bloqueador 2% BSA em PBS durante 30 min, após o que se seguiu uma incubação com uma solução de anticorpos Anti-DIG-AP.

Tabela 16 – Mistura de reacção de PCR para a preparação da sonda utilizada no metodo de detecção indirecto.

<u>Mistura de PCR</u>	<u>Conc. das</u>		<u>P/a 50 µl (µl)</u>
	<u>soluções-stock</u>	<u>Conc. final</u>	
Água miliQ estéril			30,2
Tampão de PCR II (s/ Mg)	10x	1x	5
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	1,5
dITPs	10 mM	130 µM	0,7
Outros desoxirribonucleótidos	10 mM cada	200 µM cada	1,5 cada
DIG-11-dUTP	1 mM	70 µM	3,5
Iniciador 5' (1175)	10 µM	0,2 µM	2
Iniciador 3' (1391)	10 µM	0,2 µM	2
Taq DNA polimerase (BRL)	5 U/µl	0,06 U/µl	0,6

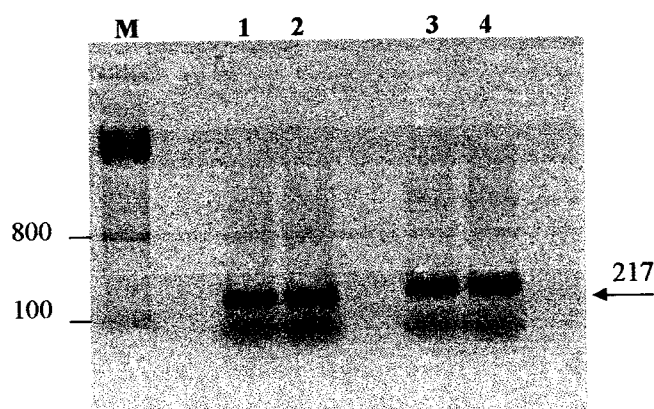


Figura 18 – Análise por electroforese em gel de agarose a 1% de produtos de PCR (iniciadores 1175 e1391). M- marcador de peso molecular 100pb ladder (Gibco-BRL), peso molecular em pares de bases (pb). Pistas 1 e 2 – Produtos da amplificação do fragmento de 217pb (*vide* II - 2.3.3.), dos quais foi isolado o DNA utilizado na construção da sonda para a hibridação “Southern blot” (*vide* II - 2.3.4.). Pistas 3 e 4 – Produtos da amplificação do fragmento de 217pb marcados por DIG, dos quais foi isolada a sonda DNA utilizada no RT-PCR *in situ* indirecto, apresentando um atraso na migração electroforética em relação aos produtos de amplificação não marcados.

Na detecção indirecta, foi preparada uma mistura de hibridação (Tabela 17) da qual foram retirados 50 µl antes de ser adicionada a sonda, correspondendo ao controlo negativo da hibridação. A sonda e o DNA de esperma de salmão foram desnaturados simultaneamente no aparelho de PCR a 90°C durante 5 minutos. A cada amostra foram adicionados 50 µl de mistura de hibridação (com ou sem sonda) e a respectiva câmara de reacção foi selada tal como para a reacção de PCR (*vide* III – 2.3.). A hibridação decorreu durante a noite em câmara húmida a 42°C. Seguidamente, cada lamela de poliéster foi recortada tal como descrito anteriormente (*vide* III – 2.3.) e as lâminas foram sujeitas a lavagens de estringência em 2x SSC, 0,5x SSC e 0,1x SSC, a 42°C durante 5 min cada. A hibridação foi bloqueada incubando as amostras com tampão bloqueador durante 30 min, seguindo-se a incubação com os anticorpos Anti-DIG-AP.

Tanto na detecção directa como na indirecta, as secções foram incubadas durante 1h com uma solução de Anti-DIG-AP diluída 1:250 (50µl/amostra). As lâminas foram então escorridas e lavadas em tampão de lavagem 2x 5 min, em câmara húmida à temperatura ambiente. Finalmente, fez-se a incubação com a solução de substrato NBT/BCIP em câmara húmida a 37°C no escuro. Após 10 min de incubação, o desenvolvimento do precipitado de cor purpúrea foi monitorizado por microscopia óptica, de 10 em 10 min, até 2 h. No final, as lâminas foram lavadas em água miliQ estéril durante 15 min e secas à temperatura ambiente. Após a secagem, procedeu-se à montagem das lâminas, adicionando a cada câmara 50 µl de Adesivo de Haupt.

Tabela 17 - Mistura preparada para as reacções de hibridação no método de detecção indirecto.

<u>Mistura de hibridação</u>	<u>Conc. das soluções-stock</u>	<u>Conc. final</u>	<u>P/a 50µl (µl)</u>
Água miliQ estéril			7
SSC	20x	2x	5
Formamida	37%	18,5%	25
Sulfato de dextrano	50%	10 %	10
DNA de esperma de salmão	6,25 ng/µl	250 ng/µl	1,25
Sonda marcada c/ DIG-11-dUTP	12,5 ng/µl	0,2 ng/µl	0,8
Solução de Denhardt	50x	1x	1

3. RESULTADOS

3.1. Preparação do material histológico	107
3.2. Processamento das amostras	112

3.1. Preparação do material histológico

Comparando os dois protocolos utilizados na preparação do material biológico, em geral ambos permitiram a preservação da estrutura histológica, tal como pode ser observado nas secções coradas com azul de toluidina para monitorização do estado de preservação dos tecidos (Figuras 20 e 21). No entanto, com qualquer dos protocolos verificou-se, ao longo do processo de preparação, um ligeiro acastanhamento sobretudo de material de campo, possivelmente por oxidação fenólica. Refira-se que a amendoeira de campo é habitualmente rica em compostos fenólicos e polissacáridos. De facto, nas secções de material preparado, observaram-se numerosas inclusões provavelmente de natureza fenólica, apresentando inicialmente uma cor de ferrugem que, após coloração com azul de toluidina, se tornou azul escura. Para reduzir a fenolização, poderá recorrer-se no futuro a folhas jovens e possivelmente a órgãos florais. As secções obtidas de material *in vitro* apresentaram geralmente uma estrutura bem preservada ao nível do ápice meristemático, da folha (Figura 21b,f) e do caule. A presença de inúmeras drusas acumuladas nos tecidos de material de campo em geral (Figura 21c,d,e, por exemplo), foram aparentemente responsáveis pela inutilização de vários cortes, já que destruíram a lâmina de corte causando estrias nas secções.

A análise dos produtos amplificados pelo método IC/RT-PCR correspondentes às cinco amostras do material para PCR *in situ* (zona apical, 1º segmento nodal, 2º, 3º, e 4º) permitiu verificar, tanto por electroforese em gel de poliacrilamida (Figura 19) como por hibridação “Southern blot” (Figura 10 - Pistas 1 a 5, *vide* II - 3.3.1.2., p 63), que as cinco amostras estavam infectadas pelo PDV. Após a confirmação da presença do PDV nestes controlos, deu-se continuidade ao protocolo de PCR *in situ* que entretanto já tinha sido iniciado para evitar qualquer deterioração dos tecidos.

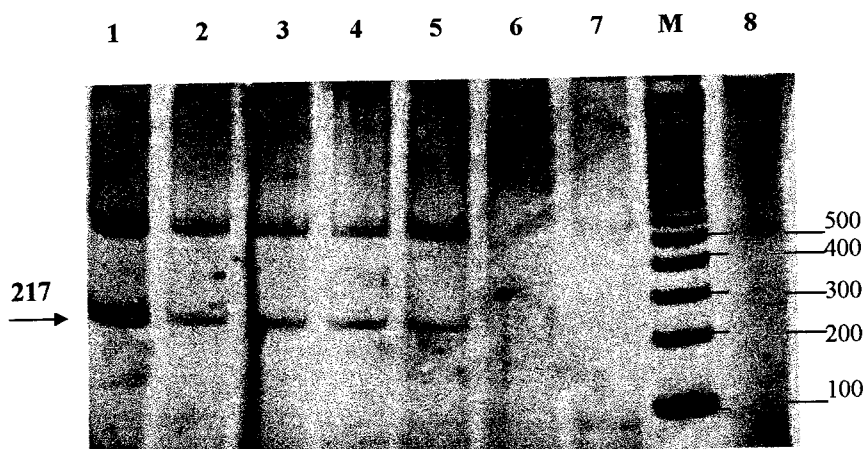


Figura 19 – Monitorização da presença do PDV em extractos obtidos desde o 4º segmento nodal até ao ápice vegetativo (4º, 3º, 2º, 1º e ápice, pista 1 a 5, respectivamente) de um ramo da amendoeira de Monsanto utilizado para o RT-PCR *in situ* (um dos controlos do RT-PCR *in situ*), por análise electroforética em gel de poliacrilamida dos produtos de IC/RT-PCR (iniciadores 1175, 2 e 1391). Extractos diluídos 1:1; imunocaptura realizada durante a noite a 4°C. Pistas 6 e 7 – Rebentos da cv. Boa Casta mantidos *in vitro*, não sujeitos a tratamento terapêutico (pista 6) ou previamente sujeitos a dois tratamentos de termoterapia. M - Marcador do peso molecular 100pb DNA ladder (Promega), peso molecular indicado em pares de bases (pb). Pista 8 – Controlo negativo interno (mistura de RT-PCR).

Figura 20 – Avaliação da preservação da estrutura histológica das amostras de material de campo (amendoeira de Monsanto) preparadas para RT-PCR *in situ*, por coloração com azul de toluidina, imagens de microscopia óptica. (a) Secção longitudinal do ápice meristemático de um botão vegetativo: observação de inúmeras inclusões de compostos fenólicos coradas de azul-esverdeado. (b) Secção transversal da zona da nervura e ligação ao mesófilo de uma folha. (c) Secção transversal do mesófilo de uma folha. (d) Secção transversal do caule com uma ramificação. (e) Fatia de corte transversal de caule, desde o parênquima medular até à epiderme. Barras da figura: a-e – 100 µM.

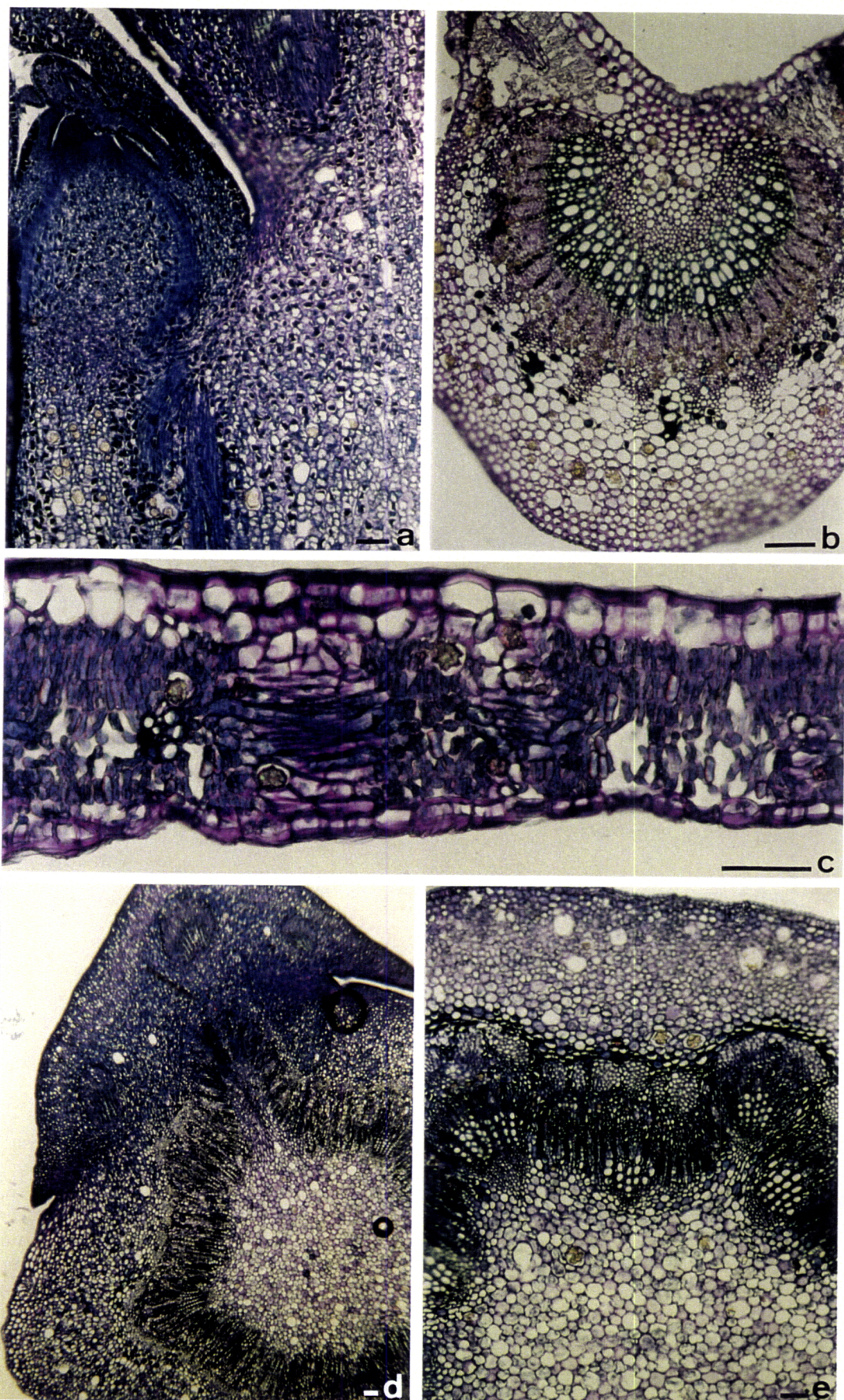
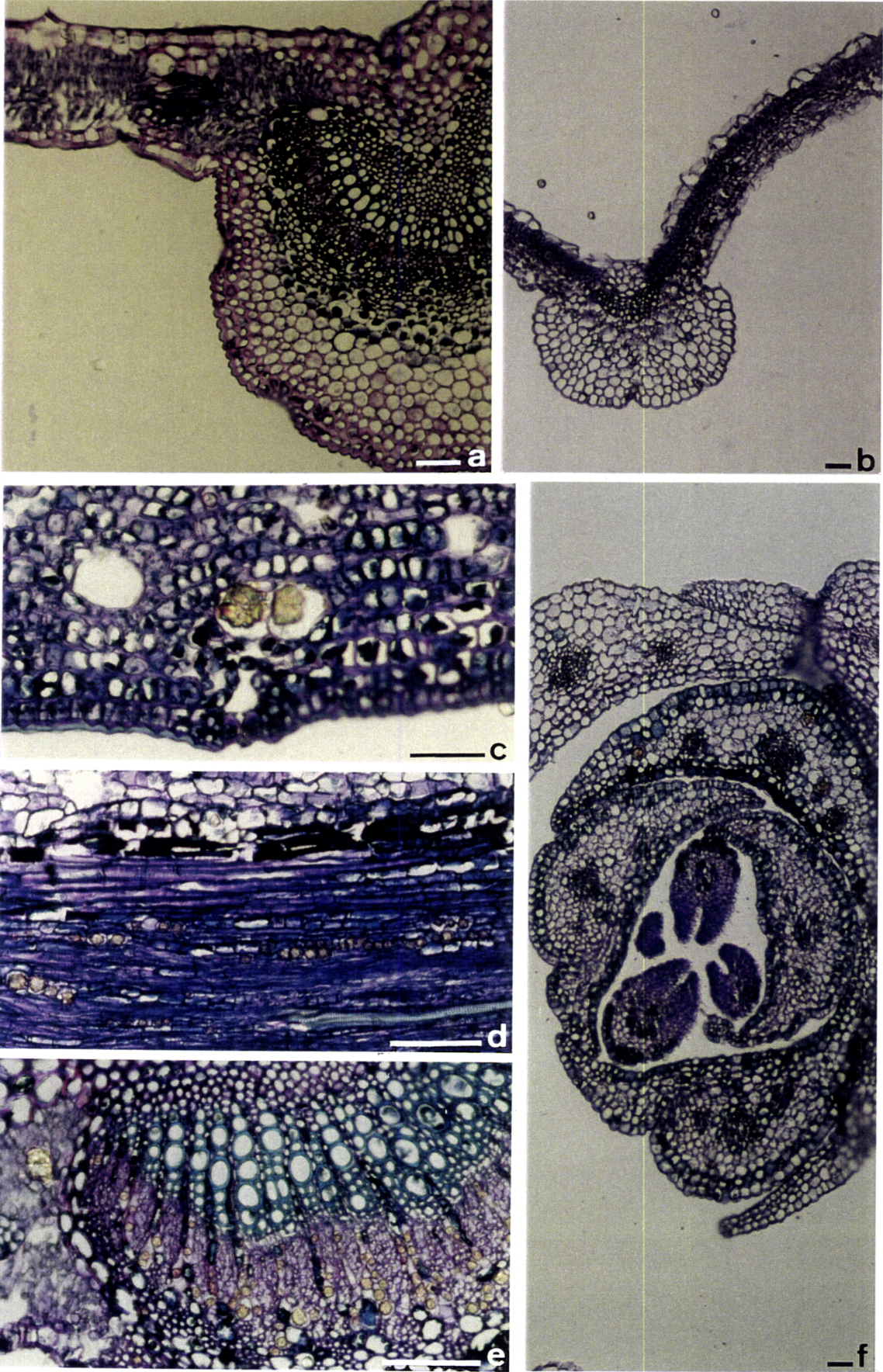


Figura 21 – Estrutura geral do material de campo (amendoeira de Monsanto) e de rebentos mantidos *in vitro*, utilizados nos ensaios de RT-PCR *in situ*. Imagens de microscopia óptica de secções coradas com azul de toluidina. (a) e (b) - Aspectos parciais de secções transversais de folhas (nervura e mesófilo) de material de campo (a) ou de material *in vitro* (b). (c) a (e) – Imagens de material de campo evidenciando a grande quantidade de drusas e as acumulações fenólicas; (c) epiderme e camadas subjacentes de caule jovem mostrando um estoma, drusas e grandes células das quais as drusas foram arrastadas; (d) secção longitudinal ao nível dos feixes vasculares de caule jovem; (e) pormenor de parte da nervura central de uma folha em corte transversal. (f) Secção transversal do ápice meristemático de um rebento mantido *in vitro*, segundo um plano superior ao meristema. Observam-se camadas de folhas jovens e primórdios foliares. Barras da Figura: a-f – 100 µM.



3.2. Processamento das amostras

Dos ensaios realizados ainda não se pode avaliar o efeito da digestão pela macerozima e a sua influência nos resultados finais do RT-PCR *in situ*.

Das variações ao nível da concentração e do tempo de incubação com proteinase K, verificou-se por microscopia óptica (Figuras 23 e 24) e mesmo à vista desarmada que, após a digestão (independentemente da concentração testada), a estrutura das secções digeridas ficou significativamente danificada. Durante a optimização da concentração da proteinase K, os resultados para a presença do PDV foram sempre negativos, não se visualizando qualquer sinal específico (Figuras 20 e 21). Na Tabela 18 é apresentada uma síntese dos resultados do RT-PCR *in situ* em secções de folhas e de ápices meristemáticos da amendoeira de Monsanto. A análise por hibridação “Southern blot” da reamplificação dos produtos do RT-PCR *in situ* para as concentrações de proteinase K de 6, 10 e 14 µg/ml, permitiu verificar a ausência de quaisquer bandas específicas para a presença do PDV nestes produtos. Para a concentração de proteinase K de 6 µg/ml, foi apenas observado um ligeiro “arrastamento” para amostra-teste e um “arrastamento” mais intenso no controlo negativo sem RT, o que não se verificou para os controlos negativos sem iniciadores ou sem Taq DNA polimerase (Figuras 22a e 22b). Para todas as concentrações de proteinase K testadas, em algumas secções foi visualizada no final do PCR *in situ* uma coloração inespecífica tanto na amostra-teste como nos controlos negativos. Esta coloração surgiu localizada em determinadas células e não difusa por toda a amostra (Figura 23c). Para 6 µg/ml de proteinase K, a respectiva amostra controlo-positivo sem tratamento com DNase mostrou uma coloração inespecífica mais intensa comparativamente com as amostras teste e controlo negativos correspondentes (Figura 23a,b), e para a concentração 10 µg/ml de proteinase K esta diferença nem sequer foi observada.

Em geral verificou-se a descolagem de algumas secções das lâminas revestidas durante o respectivo processamento. Aparentemente, este facto deveu-se não apenas ao elevado aquecimento a que essas secções foram sujeitas durante os ciclos de PCR *in situ*, mas também devido à sua elevada espessura. De facto, esta espessura causou contracções diferenciais nos vários tecidos e dificuldades na colagem perfeita das secções (Figuras 20 e 11).

Na ausência de resultados verdadeiramente positivos, não se podem tirar conclusões sobre a eficiência dos métodos directo e indirecto na detecção do PDV. Os

ensaios, ainda preliminares, efectuados pelo método indirecto resultaram num decréscimo da preservação da estrutura histológica comparativamente com os resultados do método directo, os quais também não foram os ideais no que respeita à preservação, aparentemente devido a excessiva digestão proteásica e ao repetido aquecimento durante os ciclos de PCR. Por outro lado, uma vez que a literatura refere que deve ser obtida apenas uma banda para o controlo por PCR convencional, e neste trabalho foram obtidas duas com os iniciadores utilizados, uma específica (com 217pb) e outra inespecífica, apenas os resultados do método indirecto seriam seguros. Deste modo, prevê-se a utilização de outro iniciador em substituição do complementar 1391 para a localização do PDV pelo método directo.

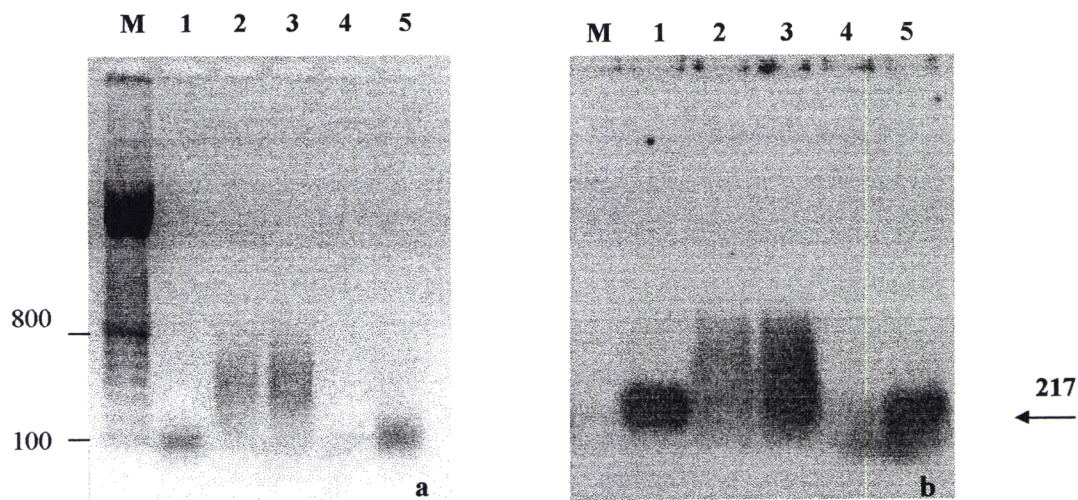


Figura 22 – Análise da reamplificação dos produtos de reacção do RT-PCR *in situ* (iniciadores 1175 e 1391), 6 µg/ml de proteinase K, em folhas do 1º segmento nodal do ramo da amendoeira de Monsanto. **Figura 22a** – Gel de agarose corado com brometo de etídio, posteriormente transferido para membrana “Southern blot” e hibridado. **Figura 22b** – Análise por hibridação “Southern blot” com sonda marcada com fluoresceína. M – marcador do peso molecular 100pb ladder (Gibco-BRL), peso molecular em pares de bases (pb). Pista 1 - Controlo positivo obtido do produto de reacção por IC/RT-PCR do 1º segmento nodal do ramo da amendoeira de Monsanto. Pista 2 – Amostra-teste. Pista 3 – Controlo negativo sem RTase. Pista 4 – Controlo negativo sem iniciadores. Pista 5 – Controlo negativo sem Taq DNA polimerase.

Figura 23 – Resultados do RT-PCR *in situ* utilizando uma concentração de 6 µg/ml de proteinase K, em secções de amostras provenientes da amendoeira de Monsanto. Nas imagens obtidas com objectivas de ampliação superior a 4x utilizou-se contraste de Nomarsky. Estas amostras foram provenientes de material considerado positivo para a presença do vírus PDV por PCR convencional e hibridação “Southern blot”. (a) Amostra controlo-positivo sem tratamento com DNase, secção longitudinal do ápice meristemático. Observa-se uma ligeira coloração inespecífica ao nível dos feixes de vasos condutores. (b) Pormenor da base de uma folha jovem ao nível do ápice meristemático. Nota-se a grande quantidade de inclusões fenólicas cor-de-ferrugem. (c) Amostra-teste, zona da nervura de uma secção transversal de folha. Observa-se alguma coloração inespecífica em torno dos vasos condutores e em células do mesófilo. (d) Material histológico idêntico a (c) mas amostra controlo-negativo sem iniciadores. Nervura em geral sem coloração inespecífica, apenas algumas manchas azuis em algumas células. (e) Amostra controlo-negativo sem iniciadores, secção transversal de limbo: zona do mesófilo sem qualquer coloração. Barras da Figura: a-e – 100 µM.

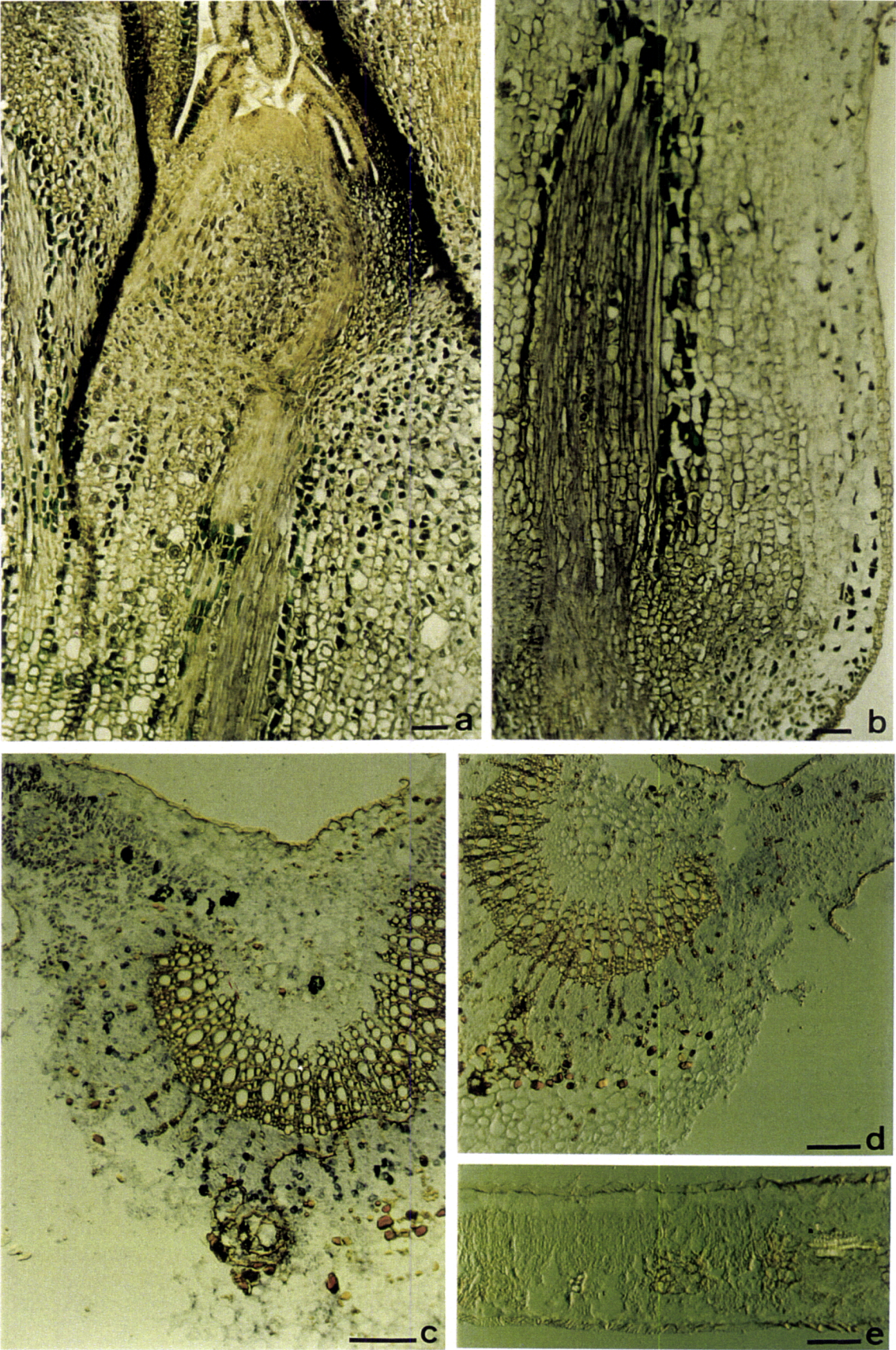


Figura 24 – Imagens de microscopia óptica com contraste de Nomarsky dos resultados do RT-PCR *in situ* utilizando concentrações de 10 ou 14 µg/ml de proteinase K em secções de amostras provenientes da amendoeira de Monsanto. Verifica-se a ausência de coloração tanto na nervura como no mesófilo, bem como o elevado grau de degradação das secções. Estas amostras foram provenientes de material considerado positivo para a presença do vírus PDV por PCR convencional e hibridação “Southern blot” . (a) Amostra-teste - 10 µg/ml de proteinase K, secção transversal da nervura e do mesófilo. (b) Amostra controlo-negativo sem RTase - 10 µg/ml de proteinase K, secção transversal de pecíolo. (c) Amostra-teste - 14 µg/ml de proteinase K, secção transversal de pecíolo. (d) Amostra controlo-negativo sem sonda - 14 µg/ml de proteinase K, secção transversal de limbo. Barras da Figura: (a) a (d) – 100 µM.

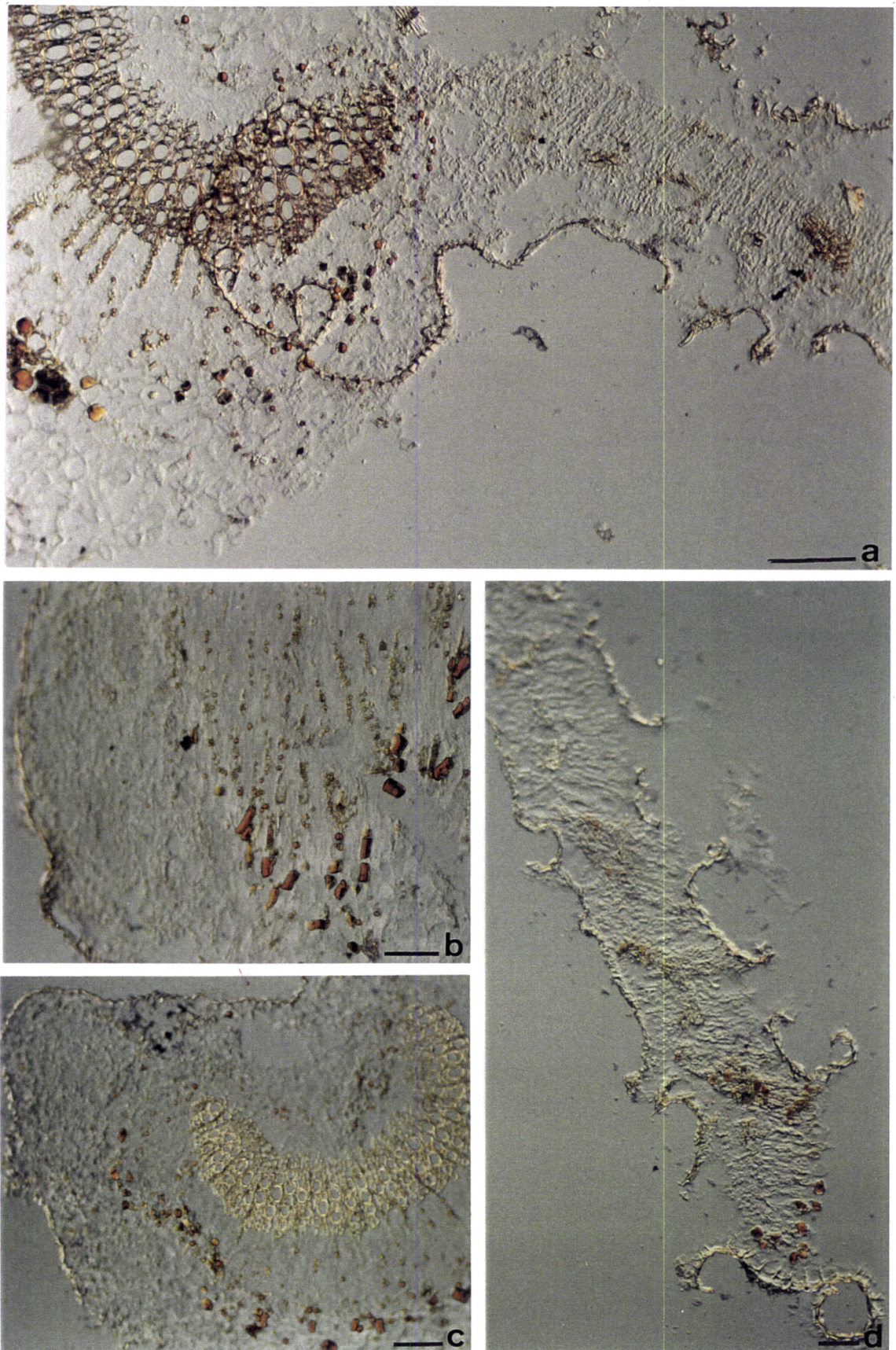


Tabela 18 - Síntese de resultados do RT-PCR *in situ* realizado em secções histológicas de amostras provenientes da amendoeira de Monsanto (folhas e ápices meristemáticos). P_K - proteinase K; C⁻ s/ - controlo-negativo sem (...); C⁺ s/ - controlo-positivo sem (...).

Amostra	Concentração da P _K (30 min de digestão)	Método de detecção	Observações em microscopia óptica
Teste	6 µg/ml	Directo	Alguma coloração inespecífica em células localizadas, tanto no mesófilo como na nervura (Figura 23c).
C ⁻ s/ RTase			2 secções sem coloração; 2 com coloração inespecífica apenas no mesófilo, particularmente intensa no núcleo das respectivas células; restantes secções com coloração inespecífica em células localizadas (mesófilo e nervura).
C ⁻ s/ iniciadores			Nervura de algumas secções com manchas azuis em certas células (Figura 23d), outras sem coloração; ausência de coloração inespecífica no mesófilo (Figura 23e).
C ⁻ s/ Taq DNA pol.			Ausência de coloração inespecífica tanto na nervura como no mesófilo.
C ⁺ s/ DNase			Coloração inespecífica particularmente intensa na zona dos vasos condutores (Figura 23a,b).
Teste	10 µg/ml	Indirecto	Ausência de coloração inespecífica tanto na nervura como no mesófilo; elevado grau de degradação das secções (secção melhor preservada - na Figura 24a).
C ⁻ s/ RTase			Observações idênticas às da amostra-teste (Figura 24b).
C ⁻ s/ Taq DNA pol.			Observações idênticas às da amostra-teste.
C ⁻ s/ sonda			Observações idênticas às da amostra-teste.
C ⁺ s/ DNase			Observações idênticas às da amostra-teste.
Teste	14 µg/ml	Indirecto	Ausência de coloração inespecífica tanto na nervura como no mesófilo; elevado grau de degradação das secções (secção melhor preservada - na Figura 24c).
C ⁻ s/ RTase			Observações idênticas às da amostra-teste.
C ⁻ s/ Taq DNA pol.			Observações idênticas às da amostra-teste.
C ⁻ s/ sonda			Observações idênticas às da amostra-teste (Figura 24d).
C ⁺ s/ DNase			Amostra perdida.

4. DISCUSSÃO

A eliminação de vírus de plantas pela cultura de meristemas tem sido limitada pela falta de informação sobre os factores que afectam a distribuição viral e a sobrevivência dos meristemas isolados. Sabe-se que a probabilidade de eliminar vírus por este método aumenta com a diminuição do tamanho dos ápices excisados (*in* Matthews, 1991). No entanto, o tamanho mínimo do ápice meristemático que permite assegurar a sua sobrevivência e sanidade varia consoante a espécie da planta e com o vírus (*in* Spiegel, 1996). Por outro lado, não está ainda esclarecido qual o alcance da contaminação viral ao nível dos meristemas. Tem sido verificado que para conseguir a regeneração de plantas completas, o meristema deve ser isolado em conjunto com um ou dois primórdios foliares. Em particular, em espécies de *Prunus* verifica-se que apenas uma parte dos meristemas em cultura origina plantas sem vírus (neste caso o PPV), pelo que para aumentar a eficiência do processo este método tem sido associado à termoterapia (Knapp *et al.*, 1995). Para vírus como o PDV, ainda não está esclarecido o transporte viral, tanto célula-a-célula como a longa distância. Pouco se sabe sobre a ligação entre a replicação dos vírus e o seu movimento, embora se reconheça o envolvimento de factores relacionados com o vírus e com o hospedeiro. Os modelos da organização estrutural dos plasmodesmos, por exemplo, pouco esclarecem sobre a identidade e as funções das proteínas plasmodésmicas (*in* Carrington *et al.*, 1996), além de que o movimento viral célula-a-célula parece envolver múltiplos mecanismos em diferentes grupos de vírus de plantas.

O RT-PCR *in situ* é uma poderosa técnica que poderá contribuir para o esclarecimento de algumas questões relevantes sobre a relação vírus-meristema em amendoeira. Na área das células animais, esta técnica tem permitido a localização espacial de vírus em baixo título (Bagasra *et al.*, 1992; Chiu *et al.*, 1992; Zehbe *et al.*, 1992; Patterson *et al.*, 1993; Zaki *et al.*, 1994), embora em plantas a sua aplicação se tenha verificado apenas em estudos de expressão génica (Deeken e Kaldenhoff, 1997; Johansen, 1997; Bombelli *et al.*, 1998). Deste modo, espera-se que a optimização do RT-PCR *in situ* iniciada no presente trabalho possa constituir o início do desenvolvimento desta técnica na área da fitopatologia. Segundo Martinez *et al.* (1995), com os termocicladores multi-lâminas actualmente disponíveis no mercado (Hybaid, MJ Research, Perkin Elmer), esta técnica poderá ter um futuro tão promissor no campo histopatológico como o PCR convencional tem hoje na biologia molecular.

As principais variáveis a otimizar no RT-PCR *in situ* incluem o tipo de fixador utilizado e o tempo de fixação, a duração da digestão proteásica, a composição da mistura de amplificação e, no caso do método de detecção indirecto, também a composição da mistura de hibridação. A adaptação desta técnica ao caso da amendoeira encontra-se num estado ainda precoce, devido ao tempo dispendido e às dificuldades encontradas na optimização do RT-PCR convencional.

Relativamente à escolha do melhor fixador para o PCR *in situ*, existem diversos estudos comparativos para células animais segundo os quais fixadores químicos à base de formaldeído originam uma melhor preservação dos ácidos nucleicos e da integridade morfológica dos tecidos do que os fixadores coagulantes à base de etanol (O'Leary *et al.*, 1994; Martinez *et al.*, 1995). No entanto, resultados contrários foram referidos por Klimecki *et al.* (1994 *in* Martinez *et al.*, 1995). Em tecidos vegetais, o material vegetal fixado em 4% formaldeído, ou em 2,5% glutaraldeído e 2% formaldeído, resistiu a tratamentos de pepsina mais longos do que o material fixado em FAA (ácido acético, formaldeído e etanol), apesar de todos estes fixadores terem permitido a preservação estrutural dos tecidos (Johansen, 1997). Estes resultados poderiam dever-se à maior eficácia tanto do formaldeído como do glutaraldeído na formação de ligações cruzadas requerendo assim um tratamento com pepsina mais longo do que o FAA (Johansen, 1997). Um problema que é importante tentar controlar é o acastanhamento dos tecidos, que geralmente ocorre devido à libertação de compostos fenólicos dos vacúolos durante a fixação, por alteração da permeabilidade membranar (tonoplasto e plasmalema). Esta questão poderá talvez ser minimizada utilizando-se material vegetal mais jovem, como são as folhas jovens que surgem na Primavera, e possivelmente órgãos florais.

A digestão proteásica tem sido referenciada como um passo especialmente crítico no RT-PCR *in situ*, sendo prioritária a sua optimização para evitar a sub-digestão, que impede a entrada dos reagentes, bem como a sobredigestão, que conduz à migração dos produtos de reacção das células e à destruição da estrutura dos tecidos (Martinez *et al.*, 1995). A concentração óptima de proteinase K, uma das proteases vulgarmente utilizadas, varia consoante a fixação aplicada e o tecido em causa, pelo que no presente trabalho foram testadas concentrações entre 6 e 14 µg/ml, escolhidas de modo a incluir valores referidos na literatura (Bagasra *et al.*, 1995; Martinez *et al.*, 1995; Bates *et al.*, 1997; Muro-Cacho, 1997; Bombelli *et al.*, 1998). Todos os tratamentos proteásicos

testados levaram à degradação parcial da estrutura dos tecidos, aparentemente devido a digestão excessiva e à temperatura elevada utilizada nos ciclos de PCR efectuados (35 ciclos). Para minimizar este problema, poderá ser desejável testar concentrações mais baixas de proteinase K ou uma protease menos “agressiva”, possivelmente a pepsina. A pepsina ou a tripsina a baixo pH são normalmente preferidas em relação à proteinase K, uma vez que são menos estáveis do que a proteinase K, e a sua actividade pode ser facilmente inibida aumentando o pH durante o passo de lavagem subsequente. A proteinase K aumenta o risco de sobredigestão, um problema identificável pela ausência de sinal e pela fraca preservação morfológica (*in* Nuovo, 1995). No PCR *in situ* directo, tem-se verificado que o tempo óptimo de digestão proteásica depende do tempo de fixação com formaldeído, pelo que no futuro poderá ser importante testar diferentes tempos de digestão proteásica em função do tempo de fixação. No presente trabalho, obteve-se uma ligeira coloração inespecífica visualizada na proximidade dos feixes vasculares no controlo positivo sem tratamento por DNase e com 6 µg/ml de proteinase K. No entanto, com concentrações superiores de proteinase K esta coloração não foi visível. Estes resultados sugerem que deverão ser testadas concentrações de proteinase K inferiores a 6 µg/ml, para melhorar a preservação das amostras e para avaliar o eventual aumento de sinal – sintomas de digestão óptima. Poderá também ser importante testar diferentes tempos de digestão proteásica em função do tempo de fixação. Tendo em conta que este controlo positivo envolveu sempre a reacção RT, a coloração inespecífica poderia corresponder, pelo menos em parte, à banda inespecífica observada em gel de poliacrilamida dos produtos de reacção do RT-PCR convencional (*vide* II - 3.3.3.). Por outro lado, a coloração inespecífica poderia dever-se à reparação de DNA fragmentado pelos procedimentos antecedentes ao RT-PCR ou à formação de ligações inespecíficas entre a DIG e os constituintes dos tecidos.

Ao nível da transcrição inversa e amplificação por PCR, um possível aspecto a melhorar seria encontrar outro iniciador que não o 1391 para amplificar igualmente um fragmento pequeno mas evitar a banda inespecífica observada em todos os geles de poliacrilamida sempre que este iniciador foi utilizado. Esta banda pode comprometer a localização do PDV por RT-PCR *in situ* directo, uma vez que pode corresponder a DNA mitocondrial ou cloroplastidial, amplificado no plasmalema tal como o cDNA específico do PDV seria. Após a optimização da concentração da protease, variável-

chave do PCR *in situ*, deverão ser optimizadas as concentrações de MgCl₂ e de Taq DNA polimerase, as quais se recomendam geralmente superiores às utilizadas no PCR convencional (Nuovo *et al.*, 1996; Muro-Cacho, 1997; Johansen, comunicação pessoal 1998). Esta recomendação foi seguida no presente trabalho em relação à concentração de magnésio, nomeadamente 5 µM em vez de 2 µM. Nuovo (1995), por exemplo, utiliza 4,5 µM em vez de 1,5 µM/PCR convencional. Contudo, Martinez *et al.* (1995) não observaram diferenças significativas quando variaram a concentração de magnésio. A concentração apropriada de Taq DNA polimerase numa reacção pode variar consoante o tipo de alvos ou de iniciadores. Aplicando o método de detecção indirecto em tecidos animais, alguns autores verificaram que a presença de BSA a 0,06% na mistura de PCR eliminou a necessidade de concentrações mais elevadas de Taq DNA polimerase (Nuovo *et al.*, 1993), situação testada no presente trabalho (utilizando a mesma concentração referida para PCR convencional, 3 U/ 50µl, mas adicionando 0,06% BSA à mistura de PCR). Uma das limitações observadas durante a aplicação do RT-PCR *in situ* foram as temperaturas elevadas nos ciclos de PCR que contribuíram fortemente para a destruição da estrutura celular, tal como foi observado noutros casos (Bates *et al.*, 1997). A utilização de programas de PCR envolvendo menos ciclos poderá constituir uma alternativa a considerar.

Comparando os métodos directo e indirecto no PCR *in situ*, os resultados obtidos ainda não permitiram escolher qual o mais indicado para o caso da amendoeira. Nuovo (1995) refere que os novos investigadores na área do PCR *in situ* devem em primeiro lugar testar o método de detecção directo em secções de tecido incluído em parafina, recomendação seguida no presente trabalho. Segundo este autor, mesmo verificando-se a amplificação inespecífica de DNA, a optimização deste método no presente caso permitirá detectar as condições em termos de fixação e digestão proteásica que permitem a amplificação de DNA nas células analisadas, seja a partir de RNA do próprio DNA endógeno (da planta). Alguns autores optam pelo método directo por ser menos moroso e dispendioso que o indirecto e minimizar a manipulação, a qual poderá resultar na descolagem e subsequente perda das secções (Martinez *et al.*, 1995). Para além disso, segundo Johansen (comunicação pessoal, 1998), o método indirecto apenas reduz os resultados falso-positivos que são devidos ao fraco desenho dos iniciadores, envolvendo outros falso-positivos que resultam da hibridação *in situ*, salientando o facto

das plantas em geral originarem numerosos artefactos deste tipo. Outros autores têm recomendado o método indirecto para evitar falsos positivos (Bagasra *et al.*, 1995; Komminoth e Long, 1995; Zehbe *et al.*, 1995; Zevallos *et al.*, 1995). Segundo Long e Komminoth (1995), no Workshop Internacional de Métodos Modernos em Morfologia Analítica, Abril 1994, Orlando, Florida, (em Proceedings da Cell Vision, Journal of Analytical Morphology, vol.1, nº1) foi opinião consensual que, não tendo sido possível tornar adequadamente os artefactos de inespecificidade inerentes ao PCR *in situ* directo, este método ainda não tinha significado como tecnologia para localização intracelular de sequências de nucleótidos, não excluindo modificações com vista a melhorar a sua especificidade. Esta posição foi mantida no primeiro Workshop Nórdico em PCR *in situ* (Sällström e Zehbe, 1997), no qual participaram pelo menos alguns dos investigadores participantes no Workshop referido anteriormente. Ambos os métodos de detecção originaram neste trabalho uma coloração inespecífica localizada apenas em algumas células. Johansen (comunicação pessoal, 1998) salientou o facto da DIG por vezes originar alguma coloração inespecífica das paredes celulares, resultante da sua tendência para se associar aos compostos fenólicos e às pectinas. A coloração inespecífica obtida neste trabalho poderá indicar que as células coradas contêm uma substância à qual a DIG se liga, incluindo os próprios compostos fenólicos já detectados no estudo histológico, e particularmente abundantes em plantas lenhosas como é o caso da amendoeira. Outra possível explicação para a coloração inespecífica seria a ocorrência de “mispriming” - amplificação de sequências de DNA ou cDNA indesejadas – que parece estar dependente de factores como sejam a especificidade dos iniciadores, o pH e a concentração iónica na mistura de PCR, e a temperatura de emparelhamento (Nuovo, 1992; Chen e Fuggle, 1993; Long *et al.*, 1993; Patterson *et al.*, 1993b; Teo e Shaunak, 1995).

O facto do PDV ainda não ter sido localizado nas secções de tecidos de amendoeira testadas pode ter várias explicações possíveis, uma das quais prende-se com o facto do título do vírus ser muito reduzido - no material de partida do PCR *in situ* não foi possível detectar o PDV por RT-PCR convencional e análise electroforética em gel de agarose, mas apenas em gel de poliacrilamida ou por hibridação “Southern blot”. Para aumentar a sensibilidade deste método, Johansen (comunicação pessoal, 1998) sugeriu várias hipóteses:

1. aumentar a quantidade de DIG-11-dUTP (por outro lado, poderia aumentar a coloração inespecífica anteriormente referida);
2. aumentar o número de ciclos (no entanto, implicaria maior tempo de aquecimento das secções comprometendo a sua integridade, podendo simultaneamente aumentar a coloração inespecífica);
3. ou utilizar um método de detecção imunohistoquímico mas indirecto, nomeadamente pela utilização do anti-DIG e de um anticorpo Anti-anti-DIG (e de um terceiro se tal for necessário), indicando que cada anticorpo adicional aumenta a sensibilidade 3x.

É de salientar ainda que, pelo facto de se ter verificado a presença do PDV nas cinco amostras de material de partida, não significa necessariamente que este vírus se encontrasse nas secções de tecido já processadas. Os resultados falso-negativos ocorrem mais frequentemente em experiências de RT-PCR efectuadas sobre lâminas de vidro (Komminoth *et al.*, 1992; Long *et al.*, 1993; Komminoth *et al.*, 1994), possivelmente devido a reduzida eficiência de amplificação por causas físicas (condução térmica, adsorção da Taq DNA polimerase e de outros componentes da mistura de PCR ao vidro), pela perda dos produtos de reacção durante os passos das lavagens ou da detecção, ou por factores relacionados com o tecido, como a presença de inibidores da Taq DNA polimerase. No caso presente, por reamplificação da mistura recolhida de cada câmara de reacção de PCR, não foi detectado o fragmento esperado, sugerindo não ter ocorrido a difusão do produto de reacção para a mistura. Podem também contribuir para esta reduzida eficiência a fraca qualidade ou a reduzida acessibilidade das sequências-alvo, devido à formação de ligações cruzadas entre DNA e proteínas por parte dos fixadores químicos (*in Komminoth e Long, 1995*). Para vários autores, o PCR *in situ* em secções de tecidos tem sido conseguido apenas com a utilização de múltiplos pares de iniciadores, a produção de pequenos produtos de PCR e a detecção com sondas relativamente longas ou com “cocktails” de sondas (Staskus *et al.*, 1991; Chiu *et al.*, 1992; Embretson *et al.*, 1993; Long *et al.*, 1993).

Os resultados apresentados neste capítulo são assim ainda preliminares, estando prevista a realização de outros ensaios de forma a ultrapassar dificuldades técnicas inerentes ao curto “tempo de vida” do PCR *in situ*. É ainda objectivo de melhoramento a introdução de modificações que permitam procedimentos mais rápidos e menos dispendiosos que os actualmente disponíveis.

IV – RESUMO E CONCLUSÕES

1. RESUMO

- 1.1. Estudos de saneamento de viroses e de detecção do vírus
 PDV em amendoeira 129
- 1.2. Introdução à técnica de RT-PCR *in situ* para a análise da
 distribuição do PDV em amendoeira 135

1.1. Estudos de saneamento de viroses e de detecção do vírus PDV em amendoeira

A cultura da amendoeira, uma das mais importantes a nível mundial, tem vindo a sofrer no nosso país um crescente declínio devido a factores como a desactualização das técnicas culturais utilizadas, a ausência de selecção e de caracterização das cultivares portuguesas, a sua heterogeneidade e consociação com outras culturas, e a ausência de estratégias de comercialização do seu produto. Por outro lado, o rendimento da amendoeira tem sido afectado pela frequente infecção por Ilarvírus nos quais se inclui o PDV (Camarasa *et al.*, 1986 *in* Nolasco *et al.*, 1991). Na tentativa de preservar os genótipos portugueses e de obter material isento dos vírus referidos, têm sido desenvolvidos programas que incluem a diagnose dos principais vírus que afectam as cultivares portuguesas de amendoeira, o estabelecimento *in vitro* de material destas cultivares, ao qual têm sido aplicados vários métodos terapêuticos, e a diagnose viral no final do saneamento. Dado que frequentemente o material vegetal saído dos programas de saneamento se encontra ainda infectado por vírus, embora com níveis muito baixos e difíceis de detectar, procurou-se neste trabalho otimizar os métodos de detecção e pesquisar estratégias que permitam um maior direccionamento dos métodos de saneamento. Em termos gerais, o presente trabalho pode resumir-se aos seguintes passos:

1. Continuação dos programas de saneamento previamente realizados, mantendo *in vitro* o material adulto e juvenil previamente sujeito a tratamentos de termoterapia (2x), quimioterapia, quimioterapia e termoterapia, ou cultura de meristemas de material de campo e quimioterapia até serem estabelecidas condições para a sua transferência para o solo.
2. Teste de tratamentos de termoterapia alternativos na amendoeira cv. Boa Casta, para minimizar a reduzida percentagem de sobrevivência dos rebentos tratados *in vitro*, e o fenómeno da hiperhidratação.
3. Optimização de métodos moleculares de diagnose do vírus PDV, nomeadamente dos métodos de imunocaptura e de extracção de RNA bicatenário (RNAds) seguida de RT-PCR.
4. Aplicação destes métodos na detecção do vírus PDV em material de campo (controlo positivo), material micropropagado não sujeito a terapia, ou sujeito aos tratamentos referidos nos pontos 1. e 2..

5. Optimização dos processos de indução de raízes e de aclimação para o material vegetal tratado para facilitar a detecção viral (normalmente de mais fácil detecção *in vivo* do que *in vitro*).
6. Introdução à técnica de RT-PCR *in situ* para futuramente analisar a distribuição do PDV nos tecidos meristemáticos de amendoeira, de forma a definir as dimensões adequadas do explante a isolar nos ensaios de saneamento.

Para a diagnose viral em amendoeira, a sensibilidade do teste ELISA não permitiu em estudos anteriores, realizados em algumas fases do ano, detectar o PDV em material de campo infectado, tendo-se optado pela optimização de um método mais sensível como é o IC/RT-PCR em tubo. Confirmada a presença do vírus PDV no material *in vitro* não tratado (Raquel, 1998), deu-se início ao presente trabalho de acordo com os objectivos pré-estabelecidos. Alguns autores têm salientado a dificuldade no isolamento de meristemas que garanta o seu estabelecimento, crescimento e propagação, nomeadamente pela excisão de um explante suficientemente pequeno para garantir a ausência de doença viral e simultaneamente assegurar a formação de plântulas. Este facto foi confirmado pela reduzida percentagem de sobrevivência dos meristemas já isolados a partir de material *in vitro* em amendoeira cv. Boa Casta (Raquel, 1998). Deste modo, optou-se neste trabalho pela cultura de meristemas de material de campo em meio indutor de “multi-ápices”, e pela aplicação de termoterapia seguida do isolamento de ápices vegetativos em material *in vitro*. Paralelamente, realizaram-se ensaios preliminares da técnica RT-PCR *in situ* em material de campo para a aplicar futuramente na localização de vírus no ápice vegetativo, por forma a avaliar a necessidade de se recorrer a dimensões muito reduzidas para assegurar a eliminação viral. Imediatamente após o isolamento dos meristemas de material de campo, os mesmos não apresentaram sinais evidentes de oxidação nem de desidratação, mas durante as primeiras subculturas tornaram-se gradualmente hiperhidratados e finalmente acastanhados, assim permanecendo sem originar qualquer rebento após sucessivas subculturas em meio de cultura MJ. Grande parte do material de campo isolado foi eliminado devido à presença de contaminação endógena, tendo-se registado uma taxa de sobrevivência de 10% que inviabilizou a realização dos ensaios de saneamento com este material. Assim, os ensaios de termoterapia foram sempre efectuados em material juvenil, o qual foi facilmente micropropagado permitindo obter um número suficiente de rebentos. Nestes ensaios foi

testado o efeito da duração do tratamento (16 ou 21 dias) e da Sc. pré-tratamento (7, 10 ou 20 dias) na % de sobrevivência dos rebentos tratados. Foi igualmente testado o efeito da manutenção do material em meio “multiappexing” em vez de em meio MJ, durante ou após o tratamento, em relação ao número de ápices originados. Em relação a estes parâmetros, o ensaio D (7 dias pré-tratamento e 16 dias de tratamento de ápices meristemáticos em meio “multiappexing”) originou melhores resultados comparativamente com os restantes.

Quando o tratamento de termoterapia foi mais reduzido (16 dias), a redução da duração da Sc. pré-tratamento de 20 para 7 dias permitiu um aumento da sobrevivência de 45,5% para 100%, no final dos ensaios. A aplicação de maior tempo de tratamento - 20 dias, ensaios B e F - deteriorou significativamente os tecidos dos rebentos tratados, mesmo quando a duração da Sc. pré-tratamentos foi reduzida (caso do ensaio F).

Após a fase da terapia, podem ainda existir títulos indetectáveis de vírus, os quais poderão ser aumentados pela manutenção das plantas em crescimento por um período de tempo prolongado. Deste modo, a eficácia dos procedimentos terapêuticos aplicados neste trabalho será avaliada pela futura aplicação dos testes de detecção adaptados, durante um período de tempo a ser determinado empiricamente. Para dar início a esta monitorização, foram efectuados ensaios no sentido de otimizar o enraizamento *in vitro* dos rebentos tratados, processo que se tem mostrado particularmente difícil e apenas bem sucedido para poucas cultivares (Rugini, 1987; Rugini, 1993; Caboni e Damiano, 1994). Por outro lado, tem sido demonstrado em amendoeira que o processo de enraizamento é estritamente dependente do genótipo, (Rugini e Verma, 1983; Caboni e Damiano, 1994; Caboni *et al.*, 1997). Dada também a escassez de literatura disponível sobre enraizamento em amendoeira, surgiu a necessidade de definir condições adequadas para o enraizamento de rebentos micropropagados. No presente trabalho, os ensaios para a optimização do enraizamento envolveram a indução hormonal (auxinas IAA ou IBA), no escuro, de rebentos apresentando alongamento de entrenós, durante um período determinado, findo o qual foram transferidos para um ou dois meios consecutivos sem qualquer auxina e num dos ensaios suplementado(s) com floroglucinol. Inicialmente, foram realizados sete ensaios diferentes idealizados por C. Miguel com base em dois métodos previamente descritos por Collet e Le (1987) - “Brief Induction Pretreatment” (BIP, ensaios E₁ a E₄) e “Long Initiation Pretreatment” (LIP, ensaios E₅ a E₇). Numa fase posterior, efectuaram-se seis novos ensaios: os ensaios E₈ e E₉ para testar

o efeito do “choque hormonal” com uma concentração muito elevada de auxina IAA ou IBA em meio líquido durante 1min; nos E_{2f} e E_{4f} a respectiva auxina foi esterilizada por filtração em lugar de ser autoclavada no meio, para verificar a possibilidade do IAA ou do IBA terem sido significativamente inactivados com a autoclavagem do meio de cultura; no E_{4-g} os rebentos não passaram pelo meio de cultura contendo gelrite, para verificar se a ausência deste passo influenciaria significativamente os resultados; foi ainda testado o efeito do floroglucinol após o “choque” hormonal no E₄, numa tentativa de induzir a formação de raízes secundárias, tal como foi referido por alguns autores. Durante os 21 dias após o início dos tratamentos hormonais, efectuaram-se observações periódicas em relação aos seguintes parâmetros: percentagem de enraizamento; número de raízes por rebento enraizado; comprimento médio das raízes; e percentagem de necrose apical. O método BIP utilizando o IBA resultou numa maior eficácia de enraizamento, não havendo diferenças significativas nos resultados relativos a ambas as concentrações utilizadas. No contexto apresentado, foi escolhido o ensaio E₄ para aplicar aos rebentos sujeitos aos ensaios de termoterapia A a F, e aos rebentos provenientes de programas de saneamento anteriores. Este ensaio consiste na indução de enraizamento com 80mg/l IBA em meio solidificado com agar durante uma noite no escuro; posteriormente, na manutenção dos rebentos induzidos em meio sem auxina solidificado com gelrite, durante 5 dias à luz; e finalmente em meio idêntico ao segundo mas solidificado com agar, até ao desenvolvimento de raiz. Aplicando o ensaio E₄ a material adulto tratado, parte deste material desenvolveu raízes ainda que a sua resposta tenha sido mais lenta e tardia comparativamente com o material juvenil. Paralelamente, algumas raízes obtidas pelo E₄ foram seccionadas e coradas com verde-iodo - carmim aluminado, revelando uma estrutura normal, característica de uma raiz. Posteriormente verificou-se que os resultados do ensaio E_{4-g} foram semelhantes aos obtidos no E₄, indicando que, pelo menos em material juvenil, o passo que envolvia a presença de gelrite poderá ser dispensado em futuras aplicações. A esterilização do meio de indução por filtração não melhorou significativamente os resultados dos ensaios E₂ nem E₄. A presença de floroglucinol não induziu um aumento da formação de raízes secundárias, e aparentemente as raízes originadas eram mais finas do que na ausência deste composto.

O enraizamento dos rebentos foi sucedido pela aclimação das plântulas respectivas, inicialmente efectuada em condições improvisadas no laboratório as quais se mostraram pouco apropriadas. Posteriormente, testaram-se as condições oferecidas por

um Instituto que trabalha essencialmente com *Eucalyptus globulus* (RAÍZ), tendo-se obtido percentagens de sobrevivência baixas, aparentemente devido não só a fortes oscilações da temperatura como também à podridão observada na base do caule das plântulas. Estes problemas não permitiram a correcta avaliação da eficiência da aclimação, reforçando a necessidade de um fitotério que permita o controlo da temperatura, humidade relativa, intensidade luminosa, etc.. Durante a optimização da aclimação, verificou-se não haver necessidade das plantas permanecerem em cultura *in vitro* até ao 40º dia pós indução hormonal de enraizamento, uma vez que as raízes curtas facilitam sua lavagem e a introdução da planta no substrato.

Paralelamente aos ensaios de termoterapia, de enraizamento e de aclimação, desenvolveram-se ensaios para adaptar os métodos de diagnose IC/RT-PCR e extracção de RNAs à detecção do PDV em material de campo infectado pelo PDV (amendoeira de Monsanto), de modo a serem aplicados à monitorização de rebentos *in vitro* tratados e das plântulas resultantes. Na preparação do material vegetal, para minimizar os efeitos das substâncias inibidoras da PCR e para verificar a sensibilidade do método, foram testadas várias diluições do extracto de folhas (1:1, 1:10, 1:20 e 1:25), em que 1:1 foi a que permitiu maior amplificação da sequência específica. Foi também testado o efeito da presença do composto anti-oxidante DIECA no extracto, tendo-se obtido resultados inconclusivos. O método foi ainda testado na ausência de imunocaptura e simultaneamente com a diluição do extracto (1:1, 1:5 e 1:25). A falta da imunocaptura originou uma coloração inespecífica de fundo desde o poço até à zona da pista correspondente ao fim da corrida, visualizando-se ainda assim uma banda específica, aparentemente mais intensa na diluição 1:5 do que na 1:1. No passo da imunocaptura, foi testado o efeito do tempo e da temperatura de incubação do extracto vegetal: 1h30min a 30°C e durante a noite a 4°C, condições que deram resultados positivos; e 1h30min a 4°C, em que não se obteve qualquer banda. Decorrendo este trabalho no Verão, período durante o qual a temperatura foi geralmente elevada, e dado que alguns vírus resistem a estas temperaturas elevadas sob a forma de RNAs (Knapp *et al.*, 1995b), optou-se pela adaptação de um protocolo de extracção de RNAs pré-RT-PCR adequado para tecidos vegetais. Para verificar a sensibilidade do método e otimizar a concentração do RNAs isolado, foram testadas várias diluições de RNAs tanto de caule como de folhas, as quais resultaram sempre num decréscimo progressivo da amplificação, verificando-se na diluição 1:20 uma banda muito ténue embora nítida.

Para as reacções de RT-PCR, foram desenhados iniciadores com base na sequência do gene codificante para a proteína da cápside do PDV (cp-PDV), sequência localizada no RNA 3 do PDV (Bachman *et al.*, 1994). Nos ensaios preliminares, utilizaram-se dois iniciadores: a montante o homólogo aos nucleótidos 1175-1196 (iniciador 1175) e a jusante o complementar aos nucleótidos 1875-1896 (iniciador 1896), para obter um fragmento de 722pb. Dado que vários autores recomendam a amplificação de fragmentos mais pequenos para aumentar a sensibilidade da detecção, desenhou-se um novo iniciador complementar aos nucleótidos 1370-1391 (iniciador 1391) para obter um fragmento de 217pb. O programa de RT-PCR utilizado foi o seguinte: 45 min a 38°C (reacção de RT); 2 min a 94°C para desnaturar as amostras e a RTase, seguidos de 35 ciclos de amplificação - do 1º ao 5º ciclos 30s a 92°C, 1 min a 54°C e 1 min a 72°C; do 6º ao 35º ciclos 5-15s a 92°C, 1 min a 54°C e 1 min a 72°C - e um ciclo de 7 min a 72°C de extensão final. Uma vez que a análise electroforética em gel de agarose nem sempre foi suficientemente sensível para a detecção do PDV, tanto em material *in vitro* como no controlo positivo (material de campo), os produtos amplificados foram analisados por electroforese em gel de poliacrilamida, ou por hibridação "Southern blot" com uma sonda sintetizada com marcação por Fluoresceína-11-dUTP (Amersham). Para a optimização do passo de RT-PCR, testaram-se diferentes combinações de iniciadores, no sentido de testar o factor comprimento do fragmento a amplificar. Ambas as combinações 1175 e 1391 ou 1175, 1391 e 1896 originaram um fragmento de 217pb, enquanto que 1175 e 1896 originou um fragmento de 722pb. Foram também testadas diferentes concentrações de Taq DNA polimerase (1,5, 2,0, 2,5 e 3 U/50µl de reacção para uma concentração fixa de 0,5 µM de cada iniciador). No entanto, estas variações deram resultados inconclusivos. Já as variações das concentrações dos iniciadores escolhidos (1175 e 1391) (0,2, 0,3, 0,4, e 0,5 µM para uma concentração fixa de Taq DNA polimerase - 3 U/50µl de reacção), revelaram que a maior amplificação dos produtos de RT-PCR foi conseguida para 0,5 µM. Em relação ao programa de RT-PCR, testou-se o efeito da utilização de 5s ou 15s de desnaturação das cadeias de cDNA a partir do 6º ciclo de PCR. Em material *in vitro*, verificou-se que o aumento do tempo de desnaturação em cada ciclo se traduziu num aumento da intensidade da banda específica, diferença não observada com material de campo.

Finalmente, testaram-se pelos métodos de detecção adaptados, IC/RT-PCR e RNAds/RT-PCR, amostras de rebentos mantidos *in vitro* ou de plântulas aclimatadas -

não sujeitos a termoterapia ou provenientes de programas de saneamento de viroses. Estes testes deram sempre resultados negativos para a presença do PDV, possivelmente devido ao seu baixo título, já que não é de prever que todo o material esteja são.

1.2. Introdução à técnica de RT-PCR *in situ* para a análise da distribuição do PDV em amendoeira

No decorrer dos programas de saneamento de viroses de fruteiras, têm sido utilizadas várias estratégias para a eliminação de vírus, das quais se destaca a associação da termoterapia à cultura de meristemas ou de ápices de rebentos *in vitro*. No caso da amendoeira, a utilização da variante RT-PCR *in situ* poderá contribuir para a optimização dos protocolos dos programas de saneamento, nomeadamente na identificação de tecidos isentos dos vírus que mais as afectam – PDV e PNRSV. Nesse sentido, foram efectuados neste trabalho alguns ensaios preliminares para adaptar esta técnica à localização *in situ* do PDV em vários órgãos da amendoeira – meristemas, pecíolo, limbo e caule. Estas experiências têm seguido um procedimento geral iniciado pela preparação do material histológico, submetendo-o a fixação, desidratação, inclusão em parafina, seccionamento e colagem a lâminas revestidas e desparafinação. Neste passo foram testados dois protocolos, os quais permitiram a preservação da estrutura histológica tanto em material *in vitro* como de campo, não evitando porém um ligeiro acastanhamento do material de campo. Este fenómeno deveu-se provavelmente a oxidação fenólica, uma vez que se observaram inclusões supostamente de natureza fenólica, apresentando inicialmente cor-de-ferrugem e, após coloração com azul de toluidina, uma cor azul escura. A análise dos produtos amplificados pelo método IC/RT-PCR correspondentes às cinco amostras do material para PCR *in situ* (zona apical, 1º segmento nodal, 2º, 3º, e 4º) revelou, tanto por electroforese em gel de poliacrilamida como por hibridação “Southern blot”, que as cinco estavam infectadas pelo PDV. Após este resultado positivo, deu-se continuidade ao protocolo de PCR *in situ* que entretanto estava a decorrer no passo de desidratação.

Após a preparação do material histológico, seguiu-se o processamento das amostras:

- (1) tratamentos de digestão sucessivos pelas enzimas macerozima, proteinase K (6, 10 e 14 µg/ml) e DNase;

- (2) transcrição inversa e amplificação por PCR *in situ*;
- (3) detecção directa dos produtos amplificados, por imunohistoquímica, ou indirecta, por hibridação *in situ* seguida de imunohistoquímica;
- (4) e montagem das lâminas e observação dos resultados por microscopia óptica.

Quanto ao efeito da concentração e do tempo de incubação com proteinase K, observou-se que, após a digestão com proteinase K, a estrutura das secções ficou significativamente danificada comparando com a inicial, e os resultados relativos à presença do PDV foram sempre negativos. As análises por hibridação “Southern blot” da reamplificação de qualquer dos produtos obtidos do RT-PCR *in situ* permitiu verificar a ausência de quaisquer bandas específicas para a presença do PDV. De facto, apenas no caso da concentração de proteinase K de 6 µg/ml se observou um ligeiro “arrastamento” na amostra-teste e um “arrastamento” mais intenso no controlo negativo sem RT, sugerindo não ter ocorrido difusão do produto para a mistura de reacção. Uma das explicações para tais resultados prende-se com o facto do título do PDV ser muito reduzido. De facto, no RT-PCR convencional a detecção deste vírus só foi possível por electroforese em gel de poliacrilamida ou por hibridação “Southern blot”. Para todas concentrações de proteinase K testadas, no final do PCR *in situ* observou-se uma ligeira coloração inespecífica, tanto na amostra-teste como nos controlos negativos, aparentemente localizada em determinadas células. Esta coloração poderá indicar a ligação da DIG a substâncias existentes nessas células, incluindo possivelmente compostos fenólicos já que a sua localização coincidia com a destas células, observada após coloração com azul de toluidina. Apenas para 6 µg/ml de proteinase K, a respectiva amostra controlo-positivo (sem tratamento com DNase) mostrou uma coloração inespecífica mais intensa comparativamente com as respectivas amostras-teste e controlos negativos. Para esta concentração de proteinase K, observou-se ainda uma melhor preservação da estrutura do que com concentrações superiores. Estes dois aspectos são indicadores de maior aproximação à digestão proteásica óptima. Os ensaios, ainda preliminares, efectuados pelo método indirecto resultaram num decréscimo da preservação da estrutura histológica comparativamente com os resultados do método directo. No entanto, estes últimos também não foram os ideais no que respeita à preservação, aparentemente devido a excessiva digestão proteásica e ao repetido aquecimento durante os ciclos de PCR. Os resultados obtidos até à data ainda não permitiram escolher qual dos métodos, directo ou indirecto, é o mais indicado para o RT-PCR *in situ* em amendoeira.

2. CONCLUSÕES

Dos ensaios de termoterapia testados, ainda que alguns tenham originado em geral melhores resultados em termos de sobrevivência e de incidência de hiperhidratação, a respectiva eficácia na eliminação viral só poderá ser avaliada com segurança após monitorização periódica, através dos métodos de detecção melhorados no presente trabalho, ou após a transferência para o solo e o crescimento da planta.

Neste trabalho foi demonstrado o potencial dos métodos de IC/RT-PCR e de extracção de RNAds/RT-PCR para a detecção do vírus PDV em material de campo de amendoeira, o que não foi confirmado neste trabalho em material *in vitro* da cv. Boa Casta. Ainda que a comparação entre estes métodos e o teste ELISA não tenha sido quantificada, verificou-se claramente um aumento de sensibilidade utilizando os primeiros, especialmente considerando que este trabalho decorreu numa época do ano desfavorável à detecção viral. O sucesso da amplificação por IC/RT-PCR em amendoeira requer a diluição das substâncias inibidoras da reacção de RT-PCR, e a amplificação do produto de PCR mais curto (de 217pb comparativamente com o de 722pb inicialmente amplificado) aumenta a sensibilidade de ambos os métodos de detecção.

A optimização do RT-PCR *in situ*, iniciada no presente trabalho, poderá contribuir para a compreensão de algumas questões revelantes sobre a relação vírus-meristema em amendoeira, esperando-se que possa constituir o início do desenvolvimento desta técnica na área da fitopatologia. Devido ao tempo dispendido e às dificuldades encontradas na optimização do RT-PCR convencional, a adaptação do RT-PCR *in situ* encontra-se ainda num estado inicial. Modificações a realizar futuramente envolvem:

- aumento do tempo de aderência das secções às lâminas revestidas;
- variações na digestão proteásica (tipo e concentração da protease e tempo de incubação);
- variações na presença de BSA, nas concentrações de magnésio e de Taq DNA polimerase ou de outros componentes na mistura de PCR *in situ*, e ao programa de PCR *in situ* (número e duração dos ciclos, temperatura de emparelhamento);
- utilização de um método imunohistoquímico indirecto, entre outras.

Adicionalmente, prevê-se um maior sucesso com a realização de ensaios com material de campo mais jovem, a colher na Primavera, como sejam as folhas jovens e órgãos florais.

No futuro, o desenvolvimento de um método de IC/RT-PCR “multiplex” para a detecção simultânea dos vírus PDV, PNRSV e ApMV tanto em material vegetativo (de campo e *in vitro*) como em órgãos florais ou directamente em pólen, poderá ser o ponto máximo para apoiar a produção de amendoeiras saudáveis, objectivo último dos programas de saneamento desta cultura.

V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, P, Lantz, O, Sebagh, M, Calvo, C F, Weil, D, Chavanel, G, Senik, A, Charpentier, B (1993) A versatile ELISA-PCR assay for mRNA quantitation from a few cells. *Biotechniques* 15: 730-737.
- ANDERSON, V M (1995) *In situ* PCR: new frontier for histopathologists. *In: In situ Polymerase Chain Reaction and Related Technology*. Gu, J (ed), Eaton Publishing, Boston, pp 131-137.
- BACHMAN, E J, Scott, S W, Xin, G, e Vance, V B (1994) The complete nucleotide sequence of Prune Dwarf Ilarvirus RNA 3: implications for coat protein activation of genome replication in Ilarviruses. *Virology*, 201: 127-131.
- BAGASRA, O, Hauptman, S P, Lischner, H W, Sachs, M, e Pomerantz, R J (1992) Detection of human immunodeficiency virus type I provirus in mononuclear cells by *in situ* polymerase chain reaction. *N Engl J Med* 326: 1385-1391.
- BAGASRA, O, Seshamma, T, Hansen, J, Bobroski, L, Saikumari, P, e Pomerantz, R J (1995) Applications of *in situ* PCR methods in molecular biology. *In: In situ Polymerase Chain Reaction and Related Technology*. Gu, J (ed), Eaton Publishing, Boston, pp 35-67.
- BARBARA, D J (1980) Detecting Prunus Necrotic Ringspot Virus in Rosaceous hosts by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Acta Phytopathol Acad Scient Hungaricae* 15: 329-332.
- BAR-JOSEPH, M, Rosner, A, Moscovitz, M, e Hull, R (1983) A simple procedure for the extraction of double-stranded RNA from viral infected plants. *J Virol Methods* 6: 1-8.
- BATES, P J, Sanderson, G, Holgate, S T, e Johnston, S L (1997) A comparison of RT-PCR, *in-situ* hybridisation and *in-situ* RT-PCR for the detection of rhinovirus infection in paraffin sections. *J Virol Methods* 67: 153-160.
- BEN-EZARA, J, Johnson, D A, Rossi, J, Cook, N, e Wu, A (1991) Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem* 39: 351-354.
- BJARNASON, E N, Hanger, B C, Moran, J R, e Cooper, J A (1985) Production of prunus Necrotic Ringspot virus-free roses by heat treatment and tissue culture. *New Zealand J Agric Res* 28: 151-156.
- BOEHRINGER MANNHEIM *Biochemica* (1996) Nonradioactive *In situ* Hybridization. Application Manual. Boehringer Mannheim GmbH, *Biochemica*, Germany, pp 36.
- BOMBELLI, L, Doneda, L, Tonelli, C, e Dolfini, S (1998) *In situ* reverse transcription-PCR in plant tissues. Elsevier. Trends Journals Technical Tips on line, tto.trends.com/cgi-bin/tto/pr/pg...1229|/cgi-bin/tto/pr/pg-cat.cgi?cc=CATI.

- BOURGIN, J P, e Nitsch, J P (1967) Production of haploid *Nicotiana* from excised stamens. *Ann Physiol Veg* 9: 377-382.
- BRUNT, A, Crabtree, K, Dallwitz, M, Gibbs, A, e Watson, L (1996) Viruses of plants - Descriptions and Lists from the VIDE Database, CAB International, pp 4-1046.
- CABONI, E, e Damiano, C (1994) Rooting in two almond genotypes. *Plant Sci* 96: 163-165.
- CABONI, E, e Monastra, F (1997) New almond selections as putative rootstocks for peach and almond. Proc 2th International Symposium on Pistachios and Almonds, August 24-29. Ferguson, L e Kester, D (eds), Davis, California, USA. *Acta Hort* 470: 188-194.
- CABONI, E, Tonelli, M G, Lauri, P, e Damiano, C (1998) Factors affecting adventitious rooting in almond. *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century*, IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, June 14-19, Abstracts, Jerusalem, Israel.
- CABONI, E, Tonelli, M G, Lauri, P, Iacovacci, P, Kevers, C, Damiano, C, e Gaspar, T (1997) Biochemical aspects of almond microcuttings related to *in vitro* rooting ability. *Biol Plantarum* 39: 91-97.
- CANDRESSE, T, Lanneau, M, Revers, F, Macquaire, G, German, S, Grasseau, N, e Malinovsky, T (1995a) An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus. *Acta Hort* 386: 136-143.
- CANDRESSE, T (1995b) Recent developments in plant viruses detection. *Acta Hort* 386: 601-605.
- CARRINGTON, J C, Kasschau, K D, Mahajan, S K, e Schaad, M C (1996) Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *The Plant Cell* 8: 1669-1681.
- CARVALHO, M, e Pereira, A M N (1997) Serological detection of double-stranded RNA from grapevine viruses. Proc. 12th ICVG MEETING, Lisbon (P), pp 99-100.
- CASSAB, G I, e Varner, J E (1987) Immunocytolocalization of extensin in developing soybean seed coats by immunogold-silver staining and by tissue printing on nitrocellulose paper. *J Cell Biol* 105: 2581-2588.
- CHEN, R H, e Fuggle, S V (1993) *In situ* cDNA polymerase chain reaction. A novel technique for detecting mRNA expression. *Am J Pathol* 143: 1527-1534.
- CHIU, K-P, Cohen, S, Morris, D, e Jordan, G (1992) Intracellular amplification of proviral DNA in tissue sections using the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem* 40: 333-341.

- CLARK, M F, Adams, A N, Thresh, J M, e Casper, R (1976) The detection of Plum Pox and other viruses in woody plants by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Acta Hort* 67: 51-57.
- CLARK, M F, e Adams, A N (1977) Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34: 475-483.
- CORDEIRO, V M P, e Monteiro, A M (1997) Amendoeira. Normas de plantação e técnicas culturais. Direcção Regional da Agricultura de Trás-os-Montes, Divisão de Produção Agrícola, Centro Experimental da Terra Quente, Quinta do Valongo, Mirandela, 4 pp.
- CORVO, L M, Sousa Santos, M, e Nolasco, G (1995) Detection of Plum Pox Virus using a simplified Polymerase Chain Reaction procedure. *Acta Hort* 386: 383-389.
- CRESCENZI, A, Nuzzaci, M, Levy, L, Piazzolla, P, e Hadidi, A (1995) Plum Pox Virus (PPV) in sweet cherry. *Acta Hort* 386: 219-225.
- DEEKEN, R, e Kaldenhoff, R (1997) Light-repressible receptor protein kinase: a novel photo-regulated gene from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 202: 479-486.
- DE KLERK, G J, e Ter Brugge, J (1992) Factors affecting adventitious root formation in microcuttings of *Malus*. *Agronomie* 12: 747-755.
- DE KLERK, G-J (1998) From target cells to roots able to interact with microbes (Abstr). *In: The Establishment of the Beneficial Rhizosphere*. InterCOST Meeting of actions 8.21, 8.22, 8.30 and 8.31, 17-19 September, Edimburg, Scotland.
- DIGIARO, M, Savino, V, Di Terlizzi, B, e Martelli, G P (1992) The relationship of Ilarviruses to Almond Mosaic. *Adv Hort Sci* 6: 161-166.
- DIGIARO, M, e Savino, V (1992) Role of pollen and seeds in the spread of Ilarviruses in almond. *Adv Hort Sci* 6: 134-136.
- DRUART, P (1992) *In vitro* culture and micropropagation of Plum (*Prunus* spp.). *In: Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 18. High-Tech and Micropropagation II. Bajaj, Y P S (ed), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 278-303.
- EMBRETSON, J, Zupancic, M, Beneke, J, Till, M, Wolinsky, S, Ribas, J, Burke, A, e Haase, A (1993) Analysis of human immunodeficiency virus-infected tissues by amplification and *in situ* hybridization reveals latent and permissive infections at single-cell resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 357-361.
- ERLICH, H A, Gelfand, D, e Sninsky, J J (1991) Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252, 1643-1651.

- FEDER, N, e O'Brien, T P (1968) Plant microtechnique: some principles and new methods. *Am J Bot* 55: 123-142.
- FEIJÓ, J A, Certal, A C, Boavida, L, Van Nerum, I, Valdivieso, T, Oliveira, M M, e Broothaerts, W. Advances on the study of sexual reproduction in chestnut cork tree and some *Rosaceae* (apple and almond): perspectives for genetic improvement of important economic fruit producing trees. *In: Sexual Plant Reproduction and Biotechnological Applications: Recent Advances by Molecular Biology, Biochemistry and Morphology*. Cai, G, e Cresti, M (eds), Springer-Verlag, Berlin (in press).
- FULTON, R W (1970) Prune Dwarf Virus. C. M. I./A. A. B. Descriptions of Plant Viruses, pp 406-411.
- FULTON, R W (1981) Ilarviruses. *In: Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*, Kurstak, E (ed), Elsevier, North-Holland, pp 377-413.
- FULTON, R W (1983) Ilarvirus group. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses 275.
- GASPAR, T, Kevers, C, Penel, C, Greppin, H, Reid, D M, e Thorpe, T A (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 32: 272-289.
- GREER, C E, Peterson, S L, Kiviat, N B, e Manos, M M (1991) PCR amplification from paraffin-embedded tissues: effects of fixative and fixation time. *Am J Clinical Pathol* 95: 117-124.
- GRIBAUDO, I, Mannini, F e Lenzi, R (1997) Virus elimination in grapevine cultivars of North-Western Italy through meristem culture and *in vitro* thermotherapy. *Proc 12th ICVG MEETING, Lisbon (P)*, pp 165-166.
- GU, J (1995) *In situ* PCR – an overview *In situ* polymerase chain reaction and related technology. *In: In Situ Polymerase Chain Reaction and Related Technology*. Gu, J (ed), Eaton Publishing, Boston, pp 1-21.
- HAASE, A T, Retzel, E F, e Staskus, K A (1990) Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4971-4975.
- HADIDI, A, e Yang, X (1990) Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification. *J Virol Methods* 30: 21-270.
- HADIDI, A, Montasser, M S, Levy, L, Goth, R W, Converse, R H, Madkour, M A, e Skrezeckowski, L J (1993). Detection of potato leafroll and strawberry mild yellow edge luteoviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. *Plant Dis* 77: 595-601.

- HALK, E L, e Fulton, R W (1978) Stabilization and particle morphology of Prune Dwarf Virus. *Virology* 91: 434-443.
- HANSEN, A J, e Lane, W D (1985) Elimination of Apple Chlorotic Leafspot Virus from apple shoot cultures by ribavirin. *Plant Dis* 69: 134-135.
- HANSEN, A J (1988) Chemotherapy of Apple Stem Pitting and Pear Stony Pit with ribavirin. *Acta Hort* 235: 333.
- HARTMANN, H, Kester, D, e Davies, F (1990) Propagation methods and rootstock for the important fruit and nut species. *In: Plant Propagation, Principles and Practices*. 5th ed Hartmann, H, Kester, D, e Davies, F (eds), Prantice-Hall Inc, Englewood, NJ, pp 527-565.
- HÖFLER, H, Pütz, B, Mueller, J D, Neubert, W, Sutter, G, e Gais, P (1995) Methods in laboratory Investigation. *In situ* amplification of measles virus RNA by the self-sustained sequence replication reaction. *Laboratory Investigation* 73: 577-585.
- HOLLAND, P M, Abramson, R D, Watson, R, e Gelfand, D H (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7276-7280.
- HOLLINGS, M (1965) Disease control through virus-free stock. *Ann Rev Phytopathol* 3: 367-396.
- HORST, R K, e Cohen, D (1980) Amantadine supplemented tissue medium: a method for obtaining chrysanthemums free of chrysanthemum stunt viroid. *Acta Hort* 110: 315-319.
- HORST, R K (1988) Production of plants free of virus and prevention of reinfection. *Acta Hort* 234: 393-402.
- HU, J S, Li, H P, Barry, K, e Wang, M (1995) Comparison of Dot blot, ELISA and RT-PCR assays for detection of two Cucumber Mosaic Virus isolates infecting Banana in Hawaii. *Plant Dis* 79: 902-906.
- IMAIAA (1994). Anuário Hortofrutícola 94. Instituto dos Mercados Agrícolas e de Indústria Agroalimentar. Ministério da Agricultura, p 60.
- INNIS, M A, e Gelfand, D H (1990). Optimization of PCRs. *In: PCR Protocols*. Innis, A I, Gelfand, D H, Sninsky, J J, e White, T J (eds), Academic Press, San Diego, California.
- JACOBI, V, Bachand, G D, Hamelin, R C, e Castello, J D (1998) Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamoviruses. *J Virol Methods* 74: 167-178.

- JACKSON, D (1989) *In situ* hibridization in plants. *In: Molecular Plant Pathology: A Practical Approach*. Burries, D J, Gurr, G J, e Macthereson, M (eds), Oxford University Press, England, pp 163-174.
- JOHANSEN, B (1997_a) *In situ* PCR on plant material with sub-cellular resolution. *Ann Botany* 80: 697-700.
- JOHANSEN, B (1997_b) *In situ* PCR on plant material – protocols and references. Internet, www.bot.ku.dk/staff/boj.htm.
- JORDAN, R L, Dodds, J A, e Ohr, H D (1983) Evidence of viruslike agents in avocado. *Phytopathol* 73: 1130-1135.
- JUÁREZ, J, Arregui, J M, Camarasa, E, Cambra, M, Llácer, G, Ortega, C, Ortega, V, e Navarro, L (1988) Recovery of virus-free peach trees from selected clones by shoot-tip grafting *in vitro*. *Acta Hortic* 235: 77-83.
- KARTHA, K K (1986) Production and indexing of disease-free plants. *In: Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*. Withers, L A, e Aldson, P G (eds), Butterworths, London, pp 219-238.
- KELLEY, R D, e Cameron, H R (1986) Location of Prune Dwarf and Prunus Necrotic Ringspot Viruses associated with sweet cherry pollen and seed. *Phytopathol* 76: 317-322.
- KESTER, D E, Liu, L, Fenton, C A L, e Durzan, D J (1986) Almond (*Prunus dulcis* (Miller) D A Webb). *In: Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Bajaj, Y P S (ed), Springer-Verlag, Berlin, Germany, vol. I, pp 414-430.
- KESTER, D E, e Ross N W (1996) History. *In: Almond Production Manual*, Micke, W C (ed), University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, pp 1-2.
- KNAPP, E, Hanzer, V, Weiss, H, da Câmara Machado, A, Wang, Q, Weiss, B, Katinger, H, e Laimer da Câmara Machado, M (1995a) Distribution of Apple Chlorotic Leafspot Virus in apple shoots cultivated *in vitro*. *Acta Hortic* 386: 187-194.
- KNAPP, E, Hanzer, V, Weiss, H, da Câmara Machado, A, Weiss, B, Wang, Q, Katinger, H, e Laimer da Câmara Machado, M (1995b) New aspects of virus elimination in fruit trees. *Acta Hortic* 386: 409-418.
- KRCZAL, G, e Avenarius, U (1995) Detection and characterization of Plum Pox Virus (PPV) isolates from Southern Germany by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Acta Hortic* 386: 370-375.
- KOKKO, H I, Kivineva, M, e Kärenlampi, S O (1996) Single-step immunocapture RT-PCR in the detection of Raspberry Bushy Dwarf Virus. *Biotechniques Euro Ed*, July/August: 47-50.

- KOMMINOTH, P, e Long, A A (1994) Questioning *in-situ* PCR. Detection of epidermal growth factor receptor mRNA in tissue sections from biopsy specimens using *in-situ* polymerase chain reaction (Lett). *Am J Pathol* 145: 742-748.
- KOMMINOTH, P, e Long, A A (1995) Review: *In situ* polimerase chain reaction – methodology, applications and nonspecific pathways. *In* PCR Applications Manual. Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, Germany, pp 97-106.
- LANKES, C (1995) Elimination of Raspberry Bushy Dwarf Virus. *Acta Horti* 385: 70-75.
- LEARY, J L, Brigate, D J, Ward, D C (1983) Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bioblots. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4045-4049.
- LIN, N S, Hsu, Y H, e Hsu, H T (1990) Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathol* 80: 824-828.
- LING, K S, Zhu, H Y, Petrovic, N, McFerson, J R, e Gonsalves, D (1997) Comparative effectiveness of ELISA and PCR for detection of grapevine leafroll associated closterovirus 3. *Proc 12th ICVG MEETING, Lisbon (P)*, p 90.
- LION, T, e Haas, O A (1990) Nonradioactive labeling of probe with digoxigenin by polymerase chain reaction. *Ann Biochem* 188: 335-337.
- LEVY, I, Lee, I-M, e Hadidi, A (1994) Simple and rapid preparation of infected plant tissue extracts for PCR amplification of virus, viroid, and MLO nucleic acids. *J Virol Methods* 49: 295-304.
- LEVY, I, Hadidi, A, Kolber, M, Tokes, G, e Nemeth, M (1995) 3' non-coding region RT-PCR detection and molecular hybridization of Plum pox virus in anthers of infected stone. *Acta Horti* 386: 331-339.
- LOZOYA-SALDANA, H, e Dawson, W O (1982) Effect of alternating temperature regimes on reduction or elimination of viruses in plant tissues. *Phytopathol* 72: 1059-1064.
- LONG, R D, e Cassells, A C (1986) Elimination of viruses from tissue cultures in the presence of antiviral chemicals. *In: Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*. Withers, L. A. e Aldson, P. G. (eds), Butterworths, London, pp 239-248.
- LONG, A A, Komminoth, P, Lee, E, Wolfe, H (1993) Comparison of indirect and direct *in-situ* polymerase chain reaction in cell preparations and tissue sections. Detection of viral DNA, gene rearrangements and chromosomal translocations. *Histochem* 99: 151-162.

- LONG, A A, e Komminoth, P (1995) *In situ* PCR: general methodology and recent advances. *In: In situ* Polymerase Chain Reaction and Related Technology. Gu, J (ed), Eaton Publishing, Boston, pp 23-33.
- MACKENZIE, D J, McLean, M A, Mukerji, S, e Green, M (1997) Improved RNA extraction from woody plants for the detection of vital pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Plant Dis* 81: 222-226.
- MARTIN, R, Hoover, Hoover, C, Grimme, S, Grogan, C, Holtke, J, e Kessler, C (1990) A highly sensitive, nonradioactive DNA labeling and detection system. *Biotechniques* 9: 762-768.
- MARTINEZ, A, Miller, M-J, Quinn, K, Unsworth, E J, Ebina, M, e Cuttitta, F (1995) Non Radioactive localization of nucleic acids by direct *in situ* PCR and *in situ* RT-PCR in paraffin-embedded sections. *J Histochem Cytochem* 43: 739-747.
- MARTINEZ, A, Miller, M-J, Unsworth, E J, e Cuttitta, F (1995) Protocol for *in situ* RT-PCR. Proc 3th Analytical Morphology Meeting, Atlantic City, N J, www.hybaid.co.uk/apps/insapp/rtpcr.html.
- MATTHEWS, R E F (1991) *Plant Virology*. 3rd Ed, Academic Press, New York, 835 pp.
- MIGUEL, C M, Druart, P, e Oliveira, M M (1996) Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (*Prunus dulcis* Mill.) explants. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 32: 148-153.
- MIGUEL, C M (1999) Adventitious regeneration and genetic transformation of almond (*Prunus dulcis* Mill.). Tese de Doutorado. F.C.U.L., Lisboa.
- MIGUEL, C M, Sánchez, A M, e Oliveira, M M. Histology-based search for transformation/regeneration competence in almond (*Prunus dulcis* Mill.). Submetido a *Plant Science*.
- MINAFRA, A, e Hadidi, A (1994). Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll-associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *J Virol Methods* 47: 175-188.
- MINK, G I, e Aichele, M D (1984) Detection of *Prunus* Necrotic Ringspot and Prune Dwarf viruses in *Prunus* seed and seedlings by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Plant Dis* 68 (5): 378-380.
- MOENCH, T R, Gendelman, H E, Clements, J E, Narayan, O, e Griffin, D E (1985) Efficiency of *in situ* hibridization as a function of probe size and fixation technique. *J Virol Methods* 11: 119-130.
- MORRIS, T J, e Dodds, J A (1979) Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus infected plant and fungal tissue. *Phytopathol* 69: 854-858.

- MORRIS, T J, Dodds, J A, Hillman, B, Jordan, R L, Lommel, S A, e Tamaki, S J (1983) Viral specific dsRNA: diagnostic value for plant virus disease identification. *Plant Mol Biol Rep* 1: 27-30.
- MURASHIGE, T, e Skoog, F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- MURO-CACHO, C A (1997) *In situ* PCR. Overview of procedures and applications. Medline Query, www3.ncbi.nlm.nih.gov/80/htbin-post/Entrez/query?uid=9281304&db=m&Dopt=b.
- NEMCHINOV, L, Hadidi, A, e Verdervskaya, T. (1995) Detection and parcial characterization of a Plum Pox Virus isolate from infected sour cherry. *Acta Horti* 386: 226-236.
- NEMCHINOV, L, Hadidi, A, Foster, J A, Candresse, T, e Verderevskaya, T (1995) Sensitive detection of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus from infected apple or peach tissue using RT-PCR, IC/RT-PCR, or multiplex IC/RT-PCR. *Acta Horti* 386: 51-61.
- NOLASCO, G, Neves, M A, e Faria, E A (1991) Distribuição no Algarve de vírus do grupo Ilarvírus em amendoeira e suas consequências na produção - 1ª aproximação. *Rev Ciências Agrárias* 15: 33-37.
- NOLASCO, G, de Blas, C, Torres, V, e Ponz, F (1993) A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *J Virol Methods* 45: 201-218.
- NOLASCO, G (1996) "Immunocapture reverse transcriptional polymerase chain reaction" (IC/RT-PCR) no diagnóstico e tipificação molecular. Curso de Iniciação à Engenharia Genética de Plantas, Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (IBET), 15-28 Setembro, Oeiras.
- NUOVO, G J, e Silverstein, S J (1988) Methods in Laboratory Investigation. Comparison of formalin, buffered formalin, and Bouin's fixation on the detection of human papillomavirus deoxiribonucleic acid from genital lesions. *Laboratory Investigation* 59: 720-724.
- NUOVO, G J, MacConnel, P, Forde, A, e Delvenne, P (1991) Detection of human papillomavirus DNA in formalin-fixed tissues by *in situ* hybridization after amplification by polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 139: 847-854.
- NUOVO, G J (1992) *In situ* hybridization analysis. *Am J Pathol* 134: 837-842.
- NUOVO, G J, Gallery, F, Hom, R, MacConnel, P, e Bloch, W (1993) Importance of different variables for optimizing *in situ* detection of PCR-amplification. *PCR Methods Appl* 2: 305-312.

- NUOVO, G J, Lindonnici, P, MacConnell, P, e Lane, B (1993) Intracellular localization of polymerase chain reaction (PCR)-amplified hepatitis-C. *Am J Surgery Pathol* 17: 683-690.
- NUOVO, G J (1995) *In situ* PCR. *In: PCR primer – A Laboratory Manual*. Dieffenbach, C W, e Dveksler, G S (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 235-249.
- NUOVO, G J (1996) The foundation of successful RT *in situ* PCR. *Front BioSci* 1, www.bioscience.org:80/1996/v1/c/nuovo1/htmls.
- OLMOS, A, Cambra, M, Dasi, M A, Candresse, T, Esteban, O, Gorris, M T, e Asensio, M (1997) Simultaneous detection and typing of Plum Pox Potyvirus (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. *J Virol Methods* 68: 127-137.
- PARAKH, A M, Shamloul, A M, Hadidi, A, Waterworth, H E, Scott, S W, Howell, H E, e Mink, G I (1995) Detection of Prune Dwarf Virus from infected stone fruits using reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Hortic* 386: 421-427.
- PATTERSON, B K, Till, M, Otto, P, Goolsby, C, Furtado, M R, McBride, L J, e Wolinsky, S M (1993) Detection of HIV-1 DNA and messenger RNA in individual cells by PCR-driven *in situ* hybridization and flow cytometry. *Science* 260: 976-979.
- PETRUSKA, J, Goodman, M F, Boosalis, M S, Sowers, L C, Chaejoon, C, Tinoco, I (1988) Comparison between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6252-6256.
- PIERIK, R L M (1987) *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 169-181.
- PUSEY, P L, e Yadava, U L (1991) Influence of Necrotic Ringspot Virus on growth, productivity and longevity of peach trees. *Plant Dis* 75 (8): 847-851.
- QUAK, F (1977) Meristem culture and virus-free plants. *In: Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Reinert, J, e Bajaj, Y P S (eds), Springer-Verlag, Berlin, pp 598-615.
- RAMPITSCH, C, Eastwell, K C, e Hall, J (1995) Setting confidence limits for the detection of Prune Dwarf Virus in *Prunus avium* with a monoclonal antibody-based triple antibody-sandwich ELISA. *Ann Appl Biol* 126: 485-491.
- RAQUEL, M H T (1998). Diagnose de infecções virais, saneamento de cultivares portuguesas de amendoeira e pesquisa de estratégias para introdução de resistência a vírus. Tese de Mestrado. F.C.U.L., Lisboa.
- REEVES, J C (1998). Molecular diagnostics for pathogen detection in seeds and planting materials. *Plant Cell, Org Tiss Cult* 52: 33-39.

- REGNER, F, e Stadlhuber, A (1997). Virus elimination by thermotherapy - early screening and improved diagnosis with IC-PCR. Proc 12th ICVG MEETING, 151.
- REIL, W, e Sutter, E (1996). *In: Almond Production Manual*. Micke, W C (ed), University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, 289 pp.
- RIBAS, L L F, e Zanette, F (1992) Propagação da macieira cv Gala através da cultura de meristemas. R Bras Fisiol Veg 4: 39-43.
- ROSNER, A, Stein, A, Levy, S, e Lilien-Kipnis, H (1994) Evaluation of linked PCR-transcription amplification procedure for Bean Yellow Mosaic Virus detection in gladioli. J Virol Methods 47: 227-236.
- ROSNER, A, Maslenin, L, e Spiegel, S (1997). The use of short and long PCR products for improved detection of Prunus Necrotic Ringspot Virus in woody plants. J Virol Methods 67: 135-141.
- ROUX, N (1987) Essais d'assainissement par thermotherapie et culture de meristeme de cerisiers et de pruniers viroses. Institut Superieur Industriel de L'Etat, Huy, 99 pp.
- ROWHANI, A, Chay, C, Golino, D A, e Falk, B (1993) Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of Grapevine Fanleaf Virus in grapevine tissue. Phytopathol 83: 749-753.
- ROWHANI, A, Maningas, M A, Lile, L S, Daubert, S D, e Golino, D A (1995). Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. Phytopathol 85 (3): 347-352.
- RUGINI, E, e Verma, D C (1982) Micropropagation and cell suspensions of a difficult to propagate almond (*Prunus amygdalus*, Batch) cultivar. Proc 5th International Congress in Plant Tissue and Cell Culture, pp 741-742.
- RUGINI, E (1983) Almond. *In: Handbook of Plant Cell Culture*. Vol. 4. Techniques and applications, Evans, D A, Sharp, W R, Ammirato, P V (eds), Macmillan, New York, pp 574-611.
- RUGINI, E, e Verma, D C (1983) Micropropagation of difficult-to-propagate almond (*P. amygdalus* Batch.) cultivar. Plant Sci Lett 28: 273-281.
- RUGINI, E, Jacoboni, A, e Luppino, M (1993) Role of basal shoot darkening and exogenous putrescine treatments on *in vitro* rooting and on endogenous polyamine changes in difficult-to-root woody species. Scientia Hortic 53: 63-72.
- SAIKI, R K, Gyllensten, U B, e Erlich, H A (1988) The polymerase chain reaction. *In: Genome analysis a practical approach*. Davies, K. E. (ed), IRL press, Oxford, pp 141-152.

- SÅLLSTRÖM, J, e Zehbe, I (1997) First Nordic Workshop on *in situ* PCR. University of Uppsala, Department of Pathology, Sweden, 3 pp.
- SÁNCHEZ, A M (1995) A amendoeira. Estudo histológico da organogénese e embriogénese somática e estudos preliminares sobre a auto-incompatibilidade. Relatório de Estágio em Biologia Vegetal Aplicada. F.C.U.L., Lisboa.
- SANGWAN-NORREEL, B, Dubois, F, Flandre, F, Lavieville, L, Paul, H, e Sangwan, R (1991). *In vitro* culture and plant improvement. Acta Hortic, 289: 19-32.
- SCHUSTER, G, e Huber S (1991). Synthetic antiphytoviral substances. Appl Virol Res 1: 265-284.
- SCOTT, S W, Miller, R W, e Bachman, E J (1992a) Evidence of the spread of Prunus Necrotic Ringspot Virus and the presence of Prune Dwarf Virus in selected peach orchards in South Carolina. Acta Hortic 309: 73-78.
- SCOTT, S W, Bowman-Vance, V, e Bachman, E J (1992b) The use of nucleic acid probes for the detection of Prunus Necrotic Ringspot Virus and Prune Dwarf Virus. Acta Hortic 309: 79-83.
- SIMPKINS, I, Walkey, D G A, e Neely, H A (1981) Chemical suppression of virus in cultured plant tissues. Ann Appl Biol 99: 161-169.
- SINGH, M, e Singh, R P (1995) Digoxigenin-labelled cDNA probes for the detection of Potato Virus Y in dormant potato tubers. J Virol Methods 52: 133-143.
- SINGH, R P, Kurz, J, Boiteau, G, e Bernard, G (1995) Detection of Potato Leafroll Virus in single aphids by the reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. J Virol Methods 55: 133-143.
- SINGH, M, e Singh, R P (1996) Factors affecting detection of PVY in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction and nucleic acid spot hybridization. J Virol Methods 60: 47-57.
- SINGH, R P (1998) Reverse-transcription polymerase chain reaction for the detection of viruses from plants and aphids. J Virol Methods 74: 125-138.
- SINGH, R P, Singh, M, e King, R R (1998) Use of citric acid for neutralizing polymerase chain reaction inhibition by chlorogenic acid in potato extracts. J Virol Methods 74: 231-235.
- SNIR, I, e Stein, A (1985) *In vitro* detection and elimination of Prunus Necrotic Ringspot Virus in sweet cherry (*Prunus avium*). Riv Ortoflorofruit It 69: 191-194.
- SOCIAS i Company, R (1997) Almendro: variedades y mejora. *In: Jornadas de Frutos Secos, Programa e Resumos*. Vila Real, 13-15 de Novembro, pp 8-24.

- SOUSA, R M (1990) A nova cultura da amendoeira em Portugal. 1º Congresso Nacional de Fruticultura , Alcobaça, 3-4 de Fevereiro, pp 83-87.
- SPIEGEL, S, Frison, E A, e Converse, R H (1993) Recent developments in therapy and virus-detection procedures for international movement of clonal plant germ plasm. *Plant Dis* 77(12): 1176-1180.
- SPIEGEL, S, Stein, A, e Tam, Y (1995). *In vitro* thermotherapy of rosaceous fruit trees. *Acta Hort* 386: 419-420.
- SPIEGEL, S (1996). Control of virus diseases in vegetatively propagated ornamental crops. *Acta Hort* 432: 156-162.
- SRISKANDARAJAH, S, Mullins, M G, e Nair, Y (1982) Induction of adventitious rooting *in vitro* difficult-to-propagate cultivars of apple. *Plant Sci Lett* 24: 1-9.
- STASKUS, K, Couch, L, Bitterman, P, Retzel, E, Zupancic, M, List, J, e Haase, A (1991) *In situ* amplification of visna virus DNA in tissue sections reveals a reservoir of latently infected cells. *Microb Pathog* 11: 67-76.
- STEEL, J H, e Poulson, R (1997). Making sense out of *in situ* PCR. *J Pathol* 182: 11-12.
- STEIN, A, Spiegel, S, Faingersh, G, e Levy, S (1991) Responses of micropropagated peach cultivars to thermotherapy for the elimination of Prunus Necrotic Ringspot Virus. *Ann Appl Biol* 119: 265-271.
- TABACHNIK, L, e Kester, D E (1977) Shoot culture for almond and almond-peach hybrid clones *in vitro*. *HortSci* 12 (6): 545-547.
- TEO, I A, e Shaunak, S (1995) Polymerase chain reaction *in situ*: an appraisal of an emerging technique. *J Histochem* 27: 647-659.
- THOMSON, D, e Dietzgen, R G (1995) Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. *J Virol Methods* 54: 85-95.
- TORRANCE, L, e Dolby, C A (1984) Sampling conditions for reliable routine detection by enzyme-linked immunosorbent assay of three Ilarviruses in fruit trees. *Ann Appl Biol* 104: 267-276.
- TORRANCE, L (1998) Developments in serological methods to detect and identify plant viruses. *Plant Cell, Tiss Org Cult* 52: 27-32.
- TRINDADE, H, e Pais, M S (1997) *In vitro* studies on *Eucalyptus globulus* rooting ability. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 33: 1-5.

- UYEMOTO, J K, e Scott, S W (1992) Important diseases of *Prunus* caused by viruses and other graft-transmissible pathogens in California and South Carolina. *Plant Dis* 76: 5-11.
- VALVERDE, R A, Dodds, J A, e Heick, J A (1986) Double-stranded ribonucleic acid from plants infected with viruses having elongated particles and undivided genomes. *Phytopathol* 76: 459-465.
- VALVERDE, R A, Nameth, S T, e Jordan, R L (1990) Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Dis* 74: 255-258.
- VARELA, S. (1997) A produção dos frutos secos – Portugal, a Europa e o Mundo. *In: Jornadas de Frutos Secos, Programa e Resumos*. Vila Real, 13-15 de Novembro, pp 1-6.
- VUNSH, R, Rosner, A, e Stein, A (1991) Detection of bean yellow mosaic virus in gladioli corms by the polymerase chain reaction. *Ann Appl Biol* 119: 289-294.
- WATERWORTH, H (1993) Processing foreign plant germ plasm at the National Plant Germplasm Quarantine Center. *Plant Dis* 77: 854-860.
- WATERWORTH, H E (1994) Viruses detected in stone fruit germplasm entering the United States, *HortSci* 29: 917.
- WHITE, J H, e Kaper, J M (1989) A simple method for detection of viral satellite RNAs in small plant tissue samples. *J Virol Methods* 23: 83-94.
- WELLS, J M, e Kirkpatrick, H C (1986) Symptomatology and incidence of *Prunus* Necrotic Ringspot Virus on peach orchards in Georgia. *Plant Dis* 70: 444-447.
- WETZEL, T, Candresse, T, Macquaire, G, Ravelonandro, M, e Dunez, J (1992) A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for Plum Pox Potyvirus detection. *J Virol Methods* 39: 27-37.
- WYATT, S D, Druffel, K, e Berger, P H (1993) *In vitro* destabilization of plant viruses and cDNA synthesis. *J Virol Methods* 44: 211-220.
- WU, D Y, Ugozzoli, L, Pal, B K, Qian, J, e Wallace, B (1991) The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA and Cell Biol* 10: 233-238.
- ZEHBE, I, Hacher, G, Rylander, E, Sällstrom, J, e Wilander, E (1992) Detection of single HPV copies in SiHa cells by *in situ* polymerase chain reaction (*in situ* PCR) combined with immunoperoxidase and immunogold-silver straining (IGSS) techniques. *Anticancer Res* 12: 2165-2168.

- ZEHBE, I., Sällström, J, Hacker, G, Rylander, E, e Wylander, E (1995) *In situ* PCR for the detection of human papillomavirus in cells and tissue sections. *In: In situ* Polymerase Chain Reaction and Related Technology. Gu, J (ed), Eaton Publishing, Boston, pp 69-75.
- ZEVALLOS, E A, Bard, E, Anderson, V M, Choi, T-S, e Gu, J (1995) Conventional PCR, *in situ* PCR and reverse transcription *in situ* PCR for HIV detection. *In: In situ* Polymerase Chain Reaction and Related Technology. Gu, J (ed), Eaton Publishing, Boston, pp 77-98.
- ZHANG, X Y, e Ehrlich, M (1994) Detection and quantitation of low numbers of chromosomes containing *bcl-2* oncogene translocations using heminested PCR. *Biotechniques* 16: 502-507.

VI - ADENDA

EQUIPAMENTOS

Autoclave e bidestilador

Balanças: Balança de prato

Balança de precisão (SCALTEC SBA 32)

Câmaras: Câmara de cultura equipada com lâmpadas de luz branca (Sylvania GRO-LUX F36W/GRO, W. Germany), com fotoperíodo de 16 h luz e temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$

Câmara de termoterapia equipada com lâmpadas de luz branca (Sylvania GRO-LUX F36W/GRO, W. Germany), com fotoperíodo de 16 h luz e temperatura de $31\pm 2^{\circ}\text{C}$ (luz) e de $38\pm 2^{\circ}\text{C}$ (escuras).

Câmara de fluxo laminar horizontal (BBH6 BRAUN HORIZONTAL)

Câmaras frigoríficas (4°C , -20°C e -80°C)

Centrífuga de bancada, com arrefecimento e rotor de ângulo fixo para tubos Eppendorf (B. BRAUN SIGMA 3K10)

Estufas, incubadoras (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC innova™ 4000 INCUBATOR SHAKER) e banho termostatzado (B. Braun Biotech International CERTOMAT® WR)

Fonte para electroforese (Pharmacia Biotech Electrophoresis Power Supply EPS-200)

Forno de micro-ondas

Máquina fotográfica com macro-objectiva (Minolta)

Medidor de pH (CRISON micro pH 2000)

Microscópios ópticos (Nikon) e Lupa (Leica)

Micrótomo de Minot (Jung Reichert)

Placa de aquecimento com agitador magnético

Pipetador automático

Termociclador (BIOMETRA UNO-Thermoblock™) e placa para adaptação do termociclador ao RT-PCR *in situ*

Tinas para electroforese em gel de agarose (BioRAD MINI-SUB@CELL GT e BIO ZYM Midigel SuperCast, fonte BioRAD) ou gel de poliacrilamida (Hofer Scientific Mighty Smal II SE 250, fonte BIO-RAD Model 200/2.0 power)

Transiluminador (ULTRA LUM modelo MUVB - 20)

Vortex (B. Braun Biotech International Certomat®MV)



MATERIAL ACESSÓRIO

Balões volumétricos

Bisturis

Boiões de cultura (com 8 cm de diâmetro por 9 cm de altura) com tampas plásticas brancas, com rosca de aperto

Caixas de Petri de vidro e de plástico (com 9 cm de diâmetro)

Caixas para gelo (de esferovite)

Câmaras de reacção de PCR *in situ* - moldura autocolante e lamela protectora de poliéster (Hybaid)

Espátulas para pesagem

Filmes fotográficos, revelação e obtenção de positivos

Positivos a cores - A revelação dos negativos e a ampliação dos slides foram obtidas em casas fotográficas.

Fixador Unifix (Kodak)

Folha de Alumínio

Funis de plástico

Goblets de plástico e de vidro (100 ml-3l)

Kits: Gene Images CDP-Star detection module (Amersham LIFE SCIENCE)

Gene Images random prime labelling module (Amersham LIFE SCIENCE)

QIAquick Spin Handbook (Qiagen)

Lamelas de vidro 24x 32 mm² n°1 (Marienfeld)

Lâminas de vidro “porta-objectos” com cantos esmerilados, limpiados, 75x25 mm² (Marienfeld)

Lâminas de vidro revestidas “*In situ* PCR” (Perkin Elmer)

Lâminas descartáveis para micrótomo (Leica)

Luvas de cirurgia

Membrana Hybond N+ (Amersham)

Micropipetas (Gilson P10, P20, P100, P200 e P1000)

Papel de filtro comercial

Papel de embrulho

Papel 3MM

Parafilm “M” (American National CanTM)

Parafina

Pilão de almofariz

Pinças

Pipetas de Pasteur

Pipetas graduadas

Placas de vidro

Pontas para as micropipetas

Revelador (Kodak)

Sacos de plástico

Secador de geles Slab Gel dryer Hoefer Scientific Model SE 1160

Suportes autoclaváveis para tubos de cultura

Tinas de vidro (Ornela)

Toalhetes de papel

Tubos de cultura

Tubos Eppendorf (1,5 ml e 2 ml)

Tubos PCR (0,2 ml) (ALFA GENE)

Turfa e areia

Vasos

Varetas de vidro

d