



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

**FILODINÂMICA DO VÍRUS DA TRISTEZA DOS CITRINOS:
EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E BIOLOGIA EVOLUTIVA**

Doutoramento em Ciências Biológicas

Área de Especialização: Virologia

Gonçalo Silva

FARO

2011



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

**FILODINÂMICA DO VÍRUS DA TRISTEZA DOS CITRINOS:
EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E BIOLOGIA EVOLUTIVA**

Doutoramento em Ciências Biológicas

Área de Especialização: Virologia

Gonçalo Silva

Orientador: Professor Doutor Gustavo Nolasco

Coorientador (Capítulo 3): Professora Doutora Filomena Fonseca

FARO

2011

AGRADECIMENTOS

Quero expressar a minha sincera gratidão a todas as pessoas que, de uma maneira ou outra, contribuíram para a realização desta tese.

Em primeiro lugar quero agradecer às duas pessoas que tornaram possível a realização deste projeto, os meus orientadores, Prof. Dr. Gustavo Nolasco e Prof. Dr.^a Filomena Fonseca.

Professor Gustavo, muito obrigado pela oportunidade que me deu de realizar o meu doutoramento no Laboratório de Virologia. Obrigado por todas as reuniões e discussões durante a elaboração do trabalho. Quero também agradecer por todo o seu empenho como orientador e pela excelente revisão da tese que foram essenciais à concretização da minha tese de doutoramento.

Obrigado, Filomena, pela orientação e apoio constantes durante todos estes anos. Obrigado por me transmitires a tua experiência e conhecimento e por teres sempre uma resposta às minhas perguntas. Muito obrigado pela tua amizade!

Quero deixar também um reconhecimento à Fundação para a Ciência e Tecnologia por ter concedido a bolsa de doutoramento.

Durante os quatro anos de doutoramento tive a sorte de conviver com pessoas, dentro e fora do Laboratório, que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho. À Carla Santos, ao Paulo Gouveia, à Filipa Esteves, à Susana Anahi, à Ângela Costa, à Mónica Martins, ao Anselmo Fernandes e à Rute Lopes um muito obrigado por todos os bons momentos e pelo vosso apoio e sugestões.

Ao “Clã Pan” que embora distante, quando estamos juntos parece que os anos não passam. O meu muito obrigado por todo o apoio! Ao Miguel Bento, ao João Sobral e ao João Pardão um obrigado com “o” grande!

Por fim, dedico esta tese de doutoramento às pessoas que estão em primeiro no meu coração.

À pessoa que esteve sempre a meu lado, que me transmitiu a força necessária para ultrapassar os momentos mais difíceis, que me brindou com todo o seu amor, carinho e

compreensão, Celine Xavier, o meu muitíssimo obrigado! Sem ti esta tese não existia. Obrigado por seres quem és! EAT!!!

Ao melhor Irmão do mundo, à minha Cunhada, à minha Princesinha, ao meu Puto cineasta, à minha Prima/Irmã e futura mamã, ao meu Primo emprestado e às minhas queridas Avó e Tia, muito mas mesmo muito obrigado! Podem não ter percebido, mas digo-vos agora que contribuíram de forma inigualável para a realização deste trabalho. Adoro-vos a todos!

Pai e Mãe, sem vocês não teria sido possível chegar até onde cheguei. Apesar da distância estiveram sempre presentes e, nos momentos menos bons eram as vossas palavras que me conseguiam animar e acalmar. Sempre me apoiaram nas minhas decisões e as palavras não são suficientes para agradecer a vida que me deram e por tudo o que continuam a fazer por mim. Obrigado!! Adoro-vos muito!

A ti meu Avô, por teres sido um Pai para mim, por me ensinares até ao último minuto da tua vida, a ter a força e a coragem necessárias para enfrentar qualquer obstáculo, muito obrigado! Esta tese é especialmente dedicada a ti! Fazes-me falta! Adoro-te para sempre! Espera por mim!

ABREVIATURAS

APET	PCR assimétrico-ELISA
BEAST	“Bayesian evolutionary analysis by sampling trees”
BF	Fator de Bayes
BYV	<i>Beet yellow virus</i>
CP	Proteína da cápside
CPd	Proteína da cápside duplicada
CTV	<i>Citrus tristeza virus</i>
d	Diversidade genética
d _N	Diversidade considerando apenas as substituições não sinónimas
D-RNA	RNA defetivo
d _S	Diversidade considerando apenas as substituições sinónimas
dsRNA	RNA de cadeia dupla
EPPO	Organização Europeia e Mediterrânica para a Proteção das Plantas
ESS	Tamanho efetivo da amostra
FEL	“Fixed Effects Likelihood”
GARD	“Genetic algorithm recombination detection”
GLRaV-3	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i>
HK85	Hasegawa-Kishino-Yano
ISIA	Imuno-ensaio <i>in situ</i>
K80	Kimura 2 parâmetros
MCMC	Monte Carlo via cadeias de Markov
MMM	Múltiplos marcadores moleculares
ORF	“Open reading frame”
PDR	Resistência derivada de um agente patogénico
PTGS	Silenciamento genético pós-transcricional
RDP3	“Recombination detection program”
RdRp	RNA polimerase RNA dependente
siRNA	“Small-interfering RNA”
SSCP	Polimorfismos conformacionais de cadeia simples
TMRCa	“Time to the most recent common ancestor”

RESUMO

O *Citrus tristeza virus* (CTV), responsável por várias doenças em citrinos, é um dos maiores condicionantes da citricultura a nível mundial. Existem diversos isolados de CTV com diferentes características biológicas e moleculares, sendo que os sintomas causados pelo vírus dependem essencialmente do isolado viral e da combinação variedade/porta-enxerto. A implementação de medidas de controlo da doença depende, em grande parte, do tipo de isolados presentes numa dada região. No Capítulo 2, efetuou-se uma análise comparativa entre dois métodos de tipificação de isolados de CTV e verificou-se que a caracterização por PCR assimétrico-ELISA, que considera a existência de sete grupos, é mais adequada à descrição da estrutura genética de CTV. Estes resultados foram complementados com o estudo da dinâmica de colonização de cada grupo filogenético através de um imuno-ensaio *in situ* (Capítulo 3). Os resultados obtidos sugerem que os isolados de CTV diferem na quantidade de células infetadas e que essa diferença parece estar relacionada com a severidade do isolado. No Capítulo 4, o estudo da variabilidade genómica da região 3' terminal permitiu verificar que a estrutura de grupos obtida para o gene da proteína da cápside (CP) é extensível a toda a região 3' terminal que contém os genes mais fortemente implicados na interação com o hospedeiro. A estabilidade da estrutura genética nesta região foi também inferida a partir da pesquisa de eventos de recombinação. Os resultados sugerem uma baixa frequência de recombinação entre isolados de CTV, mesmo em isolados contendo mistura de haplótipos e mantidos há mais de 12 anos no mesmo hospedeiro. Adicionalmente, foi estimada a taxa de evolução de CTV através de um método estatístico Bayesiano (Capítulo 5). Para tal, foram usadas sequências do gene da CP de isolados de diversas regiões do mundo, pertencentes a diferentes grupos filogenéticos e obtidas entre 1990 e 2010. A taxa média de evolução estimada foi de $1,58 \times 10^{-4}$ substituições nucleotídicas / ano. No geral, os resultados destes dois capítulos mostram que os isolados de CTV mantêm uma elevada estabilidade genética ao longo do tempo. Finalmente, no Capítulo 6, foi estudada a situação epidemiológica de CTV em Portugal continental a partir de isolados de CTV recolhidos no campo, onde se verificou que a maioria das árvores infetadas era composta por isolados de CTV pertencentes ao grupo M, ou seja isolados considerados suaves e que não provocam sintomas severos.

Palavras-chave: Tristeza; Citrinos; Evolução; Vírus; Portugal; Tipificação; Epidemiologia

ABSTRACT

Citrus tristeza virus (CTV) is the causal agent of various diseases with dramatic effects on citrus crops. The virus exists as multiple strains with different biological and molecular properties and depending on virus strains and on the species or scion–rootstock combinations, CTV may cause distinct syndromes. Knowledge of the strains present in a certain region is fundamental to the design of an adequate strategy of disease control. In Chapter 2, a comparison was made between two typing systems. It was shown that the asymmetric PCR-ELISA, which distinguishes seven groups, showed a better ability to resolve haplotypes.

In addition, the distribution of infected cells using isolates which belong to different phylogenetic groups was studied using an *in situ* immunoassay (Chapter 3). It was observed that the severe and mild isolates differed in the distribution pattern and in the number of clusters of infected cells, in which the former presented a higher number of clusters of cells surrounding the entire phloem region.

In Chapter 4, it was studied the genetic variability of the 3' end proximal region of CTV genome. The analysis of this region is of paramount importance since it encodes genes that modulate the interaction with the host. By phylogenetic analysis it was shown that the genetic structure that exists for the coat protein gene (CP) is maintained throughout this region. The stability of the genetic structure in this region was also inferred from the search for recombination events. The results suggest a relative low recombination rate between CTV isolates even in isolates harbouring a mixture of haplotypes and co-habiting the same host for more than 12 years.

Moreover, the CP gene was used to estimate the rate of evolution (Chapter 5). This was obtained from a large set of heterochronous CP gene sequences using a Bayesian coalescent approach. The best fitting evolutionary and population models pointed to an evolutionary rate of 1.58×10^{-4} nt/ site/ year. These results suggest that CTV isolates maintain a high level of stability over time.

Finally, in Chapter 6, the epidemiological situation of CTV in Portugal was studied by conducting surveys in different orchards. It was shown that most of the infected trees harboured mild variants.

Keywords: Tristeza; Citrus; Evolution; Virus; Portugal; Typing; Epidemiology

ÍNDICE

CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 2	
COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE TIPIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE CTV	21
CAPÍTULO 3	
ESTUDO DA CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO DOS DIFERENTES GRUPOS	
FILOGENÉTICOS	39
CAPÍTULO 4	
VARIABILIDADE GENÉTICA E EVENTOS DE RECOMBINAÇÃO NA REGIÃO 3'	
TERMINAL DO GENOMA DE CTV	47
CAPÍTULO 5	
ESTIMATIVA DA TAXA DE EVOLUÇÃO DE CTV	71
CAPÍTULO 6	
TIPIFICAÇÃO MOLECULAR DE CTV EM PORTUGAL CONTINENTAL	93
CAPÍTULO 7	
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL



1.1 ORIGEM DA “TRISTEZA”

O vírus da tristeza dos citrinos (CTV – *Citrus tristeza virus*) é o agente causal de uma das mais graves doenças em citrinos, a Tristeza. Esta doença afeta a maioria das regiões produtoras de citrinos e continua a ser um dos principais problemas da citricultura mundial (Moreno *et al.*, 2008). Hoje em dia, pode-se afirmar que a doença se encontra amplamente distribuída por todos os países produtores de citrinos, apesar de alguns países ainda não ter ocorrido a propagação da mesma, sendo que o vírus pode estar presente de forma assintomática em hospedeiros enxertados em porta-enxertos tolerantes.

Supõe-se que a tristeza seja originária da China (Roistacher, 1991), local de onde são nativas as várias espécies do género *Citrus* (Webber, 1967), sendo disseminada para outras partes do mundo através de material vegetal infetado e de vetores.

Inicialmente, os citrinos foram introduzidos na Europa e na América principalmente na forma de sementes, o que impossibilitou a transmissão de CTV nessa altura, visto que o vírus não é transmitido por sementes (Bar-Joseph *et al.*, 1989). Provavelmente, esta disseminação ocorreu no final do século XIX quando surgiu um enorme interesse comercial em citrinos e, devido aos progressos alcançados ao nível dos transportes marítimos, plantas completas foram transportadas da Ásia para todo o mundo (Moreno *et al.*, 2008). É possível que as árvores importadas do Japão para a Califórnia e Florida em 1880 estivessem infetadas com CTV e com o seu vetor *Toxoptera citricida* (Tanaka, 1952).

No século XIX, uma grave epidemia de *Phytophthora*, que provoca podridão radicular, destruiu milhares de plantas de laranjeira doce (*Citrus sinensis*) inicialmente no Arquipélago dos Açores e mais tarde nos países do mediterrâneo. Este acontecimento impôs uma alteração no cultivo de citrinos, deixando de ser efetuado o método de cultivo em pé franco passando as variedades de citrinos a ser enxertadas em porta-enxertos. Começou então a ser utilizada a laranjeira azeda (*Citrus aurantium*) como porta-enxerto que, por ser resistente à *Phytophthora* (Bar-Joseph *et al.*, 1989) se tornou rapidamente o porta-enxerto predominante em várias partes do mundo. No entanto, problemas associados ao uso do porta-enxerto laranjeira azeda começaram a ser observados em algumas regiões como Java, África do Sul e Austrália (Fraser e Broadbent, 1979). Nestes países, verificou-se que combinações de laranjas doces sobre a laranjeira azeda não eram bem sucedidas e que entravam em colapso. Durante anos

atribuiu-se o insucesso da propagação nestes países a uma incompatibilidade entre o porta-enxerto e o garfo. Mais tarde, Toxopeus (1937) sugeriu que esta incompatibilidade era devido a uma substância que se formava no tronco da laranjeira doce e que era letal para o porta-enxerto quando transportada através da união entre ambos. No entanto, foi Webber (1943) o primeiro a sugerir que esta doença era causada por um vírus e transmitida por vetores. Em 1946, Meneghini demonstrou a transmissão de CTV por afídeos, usando centenas de afídeos por planta para transmitir o vírus.

O termo “tristeza” foi pela primeira vez usado por Moreira (1942), para descrever os sintomas de declínio e a morte de laranjeiras doces enxertadas em laranjeira azeda observada desde 1937 no Brasil (Müller, 1976).

Após a primeira epidemia mais destrutiva de tristeza relatada na Argentina em meados de 1930 (Figura 1.1.1), diversos outros surtos ocorreram na Califórnia, Espanha, Estados Unidos, Israel e Venezuela, entre 1950 e 1980 (Roistacher, 1991).

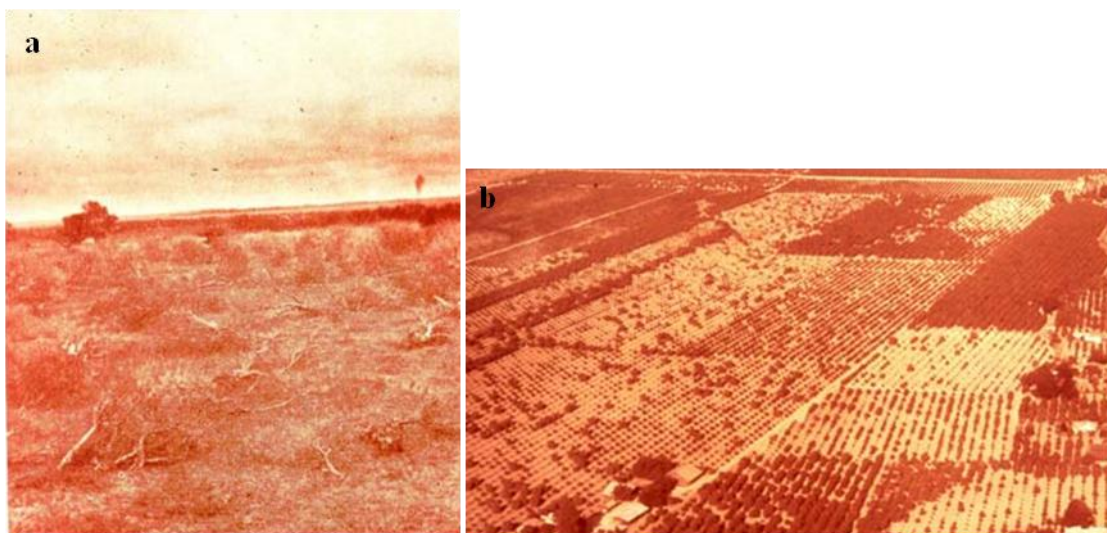


Figura 1.1.1 - Fotografias da **a**) devastação causada pela tristeza na Argentina em meados da década de 1930 e **b**) do desastre em pomares de laranjeira na Califórnia na década de 1960. (Fonte: Roistacher, C.N. em “Citrus Resources in Ecoport”)

Portugal tem grandes tradições na cultura de citrinos. Estima-se que a área ocupada por esta cultura neste país é cerca de 26200 hectares (Anónimo, 2007). O CTV foi identificado pela primeira vez em Portugal em 1988 em material de propagação vegetativa certificado de origem Espanhola. Contudo admite-se que já antes existiria em Portugal, pois por essa altura foi também identificado numa coleção varietal instalada em Setúbal (Nolasco, 2009). Atualmente, o vírus está presente em várias regiões do país, mas encontra-se essencialmente na região algarvia, a principal região de produção de citrinos representando cerca de 70% da produção nacional (Anónimo, 2007). Em



2004, o vetor *Toxoptera citricida* foi identificado no norte de Portugal e Espanha (Ilharco *et al.*, 2005), colocando em risco epidemiológico todos os países da bacia mediterrânica.

1.2 CLASSIFICAÇÃO DO VÍRUS DA TRISTEZA DOS CITRINOS

O CTV pertence a família *Closteroviridae*, género *Closterovirus*. O vírus tipo deste género é o *Beet yellow virus* (BYV). Os membros pertencentes a este género partilham algumas características comuns, nomeadamente de serem partículas com um comprimento entre 1250 e 2200 nm e de terem um genoma constituído por uma cadeia simples de RNA com um tamanho entre 15,5 e 19,3 kb. Contêm também uma principal proteína da cápside (CP) de 22 a 25 kDa, que cobre a maior parte da partícula viral, e uma proteína da cápside duplicada (CPd) de 24 a 27 kDa, que cobre um pequeno segmento numa das extremidades da partícula. Ao contrário do que acontece nos outros géneros da família (*Ampelovirus* e *Crinivirus*), nos *Closterovirus*, o gene que codifica para a CPd encontra-se a montante do gene codificante da CP (Martelli *et al.*, 2002).

No caso particular do CTV, as partículas virais têm uma estrutura flexível com cerca de 2000 nm comprimento e 11 nm de diâmetro e estão cobertas por duas proteínas da cápside (Figura 1.2.1). A proteína da cápside p25 (ou CP) cobre cerca de 95% da partícula viral e a proteína da cápside p27 cobre apenas uma extremidade. (Febres *et al.*, 1996).

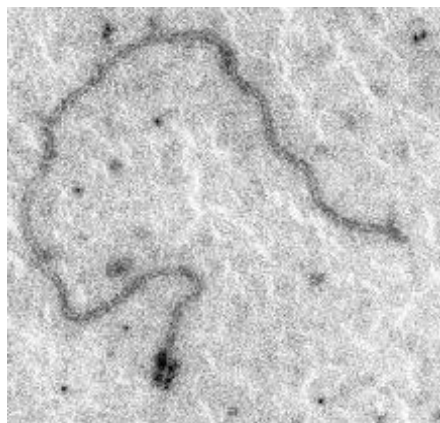


Figura 1.2.1 - Partícula viral de CTV vista ao microscópio eletrónico. (Fonte: Niblett *et al.*, 2000)

O género *closterovirus* contém vírus que são transmitidos por afídeos numa maneira semipersistente e que se encontram associados às células do floema das plantas infetadas (Karasev, 2000; Martelli *et al.*, 2002).

1.3 HOSPEDEIROS E SINTOMATOLOGIA

A maioria das espécies e híbridos do género *citrus* e outros géneros da família *Rutaceae* são suscetíveis de infeção pelo CTV (Moreno *et al.*, 2008; Müller, 1976). Outros hospedeiros incluem espécies como *Passiflora gracilis* e *Passiflora coerulea* pertencentes à família *Passifloraceae* (Roistacher e Bar-Joseph, 1984).

Os sintomas causados pelo CTV dependem essencialmente do isolado viral e da combinação variedade/porta-enxerto. São três os principais quadros sintomatológicos provocados por CTV: Declínio rápido ou tristeza propriamente dita, “Stem Pitting” e “Seedling Yellows”.

1.3.1 Sintoma tipo Declínio rápido

Este tipo de sintoma observa-se quando se enxerta sobre laranjeira azeda ou limoeiro (*Citrus limon*) uma espécie suscetível ao vírus, como laranjeira doce ou toranja (*Citrus paradisi*) (Figura 1.3.1). Neste caso, ocorre uma incompatibilidade entre o porta-enxerto e a variedade enxertada induzida pela presença do vírus e que se traduz na necrose do floema imediatamente abaixo da zona de enxertia, provocando o declínio rápido da planta. Por vezes, a manifestação de declínio pode levar muitos anos a aparecer o que leva à morte progressiva do sistema radicular provocando o declínio lento da planta.



Figura 1.3.1 – Exemplo de uma árvore com sintomas de declínio sobre porta-enxerto laranjeira azeda. (Fonte: Richard Lee – Ecoport)

O sintoma de declínio num porta-enxerto de laranjeira azeda está por vezes associado a uma condição denominada de “inverse pitting” ou “honeycombing” (Figura 1.3.2), que corresponde à lenhificação dos raios de parênquima associados ao floema. Removendo uma porção de casca imediatamente abaixo da zona de enxertia, observa-se um grande número de projeções de lenho em forma de pequenos espinhos.



Figura 1.3.2 – “Inverse pitting” ou “honeycombing” induzido por CTV abaixo da zona de enxertia de laranjeira doce sobre laranjeira azeda. (Fonte: L. Navarro, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Bugwood.org)

Nas últimas décadas, de modo a prevenir o declínio, tem-se efetuado a substituição do porta-enxerto de laranjeira azeda por outros porta-enxertos tolerantes, sendo que estes podem ser suscetíveis a outras doenças ou mostrar um pior desempenho agrícola em solos calcários, a que a laranjeira azeda é particularmente tolerante (Albiach-Marti *et al.*, 2010).

1.3.2 Sintoma tipo “Stem Pitting”

Este sintoma é caracterizado pela presença de caneladuras no lenho (Figura 1.3.3) que, se forem de pequenas dimensões, são apenas visíveis por baixo da casca. A este sintoma está também associado o aclaramento das nervuras das folhas (Figura 1.3.3). Ao contrário do sintoma de declínio, o sintoma “Stem Pitting” não provoca a morte da planta, mas afeta o seu crescimento e a produtividade, resultando em enormes perdas económicas. As espécies que podem apresentar este tipo de sintoma são a limeira mexicana, a toranja e a laranjeira doce.



Figura 1.3.3 - Presença de caneladuras no lenho em limão rugoso (*Citrus Jhambiri*) e aclaramento das nervuras em folhas jovens. (Fonte: Richard Lee – Ecoport)

1.3.3 Sintoma tipo “Seedling Yellows”

“Seedling yellows” afeta essencialmente plantas de laranjeira azeda, toranja ou limoeiro (*Citrus limon* (L.) Burn. f.). É caracterizado por nanismo e clorose foliar, sendo que as folhas vão adquirindo uma coloração amarela podendo ocorrer também a interrupção completa do crescimento (Figura 1.3.4). Este tipo de sintoma pode ser transitório, uma vez que após alguns meses, as árvores podem retomar o crescimento normal (Moreno *et al.*, 2008).



Figura 1.3.4 – Sintoma de “seedling yellows” em limoeiro. (Fonte: Roistacher, C.N. em “Citrus Resources in Ecoport”)

Os isolados de CTV são agrupados de acordo com as suas propriedades biológicas, particularmente nos sintomas causados nas plantas hospedeiras. Deste modo, os isolados que provocam os sintomas acima descritos são chamadas de isolados severos. No entanto, existem também isolados de CTV que não causam efeitos visíveis e são denominados de isolados suaves ou “mild”. Este tipo de isolados apenas provoca sintomas em plantas indicadoras, como a limeira mexicana.



1.4 TRANSMISSÃO

A propagação da doença a longas distâncias tem sido efetuada pelo Homem, através da comercialização de material de propagação infetado, resultando em epidemias devastadoras, causando debilidade e morte a muitos milhões de citrinos. A nível local, a transmissão do vírus da tristeza dos citrinos por intermédio de vetores assume um papel primordial. O CTV já foi experimentalmente transmitido a plantas sãs por inoculação mecânica (Garnsey *et al.*, 1977; Karasev, 2000) mas o protocolo é trabalhoso e pouco eficiente.

O CTV é transmitido naturalmente e de forma semipersistente por diversas espécies de afídeos, nomeadamente *Toxoptera citricida*, *Aphis gossypii*, *Toxoptera aurantii*, *Aphis spiraeicola*, sendo que o primeiro é considerado o afídeo mais eficiente (Michaud, 1998; Rocha-Peña *et al.*, 1995). Yokomi *et al.* (1994) fizeram um estudo comparativo de transmissão de vários isolados de CTV usando *T. citricida* e *A. gossypii* e verificaram que *T. citricida* é cerca de 6 a 25 vezes mais eficiente na transmissão.

Na transmissão de CTV por *T. citricida* os tempos de aquisição e inoculação são de pelo menos 30 minutos (Bar-Joseph *et al.*, 1989). Após aquisição, os afídeos podem transmitir o vírus durante pelo menos 24 horas, sendo que a infecciosidade é geralmente perdida dentro de 48 horas.

T. citricida está presente em várias regiões produtoras de citrinos, tais como Ásia, Austrália, África do Sul, América Central e do Sul e foi o principal responsável pela disseminação do vírus nestas regiões. Este vetor, foi detetado na Ilha da Madeira em 1994, tendo sido encontrado em Portugal Continental primeiro em 2003 (Ilharco *et al.*, 2005) e mais tarde por Nolasco *et al.* (2008) onde se comprovou a presença de CTV nos afídeos (Figura 1.4.1). Em Espanha foi detetado pela primeira vez em 2004 (Ilharco *et al.*, 2005).



Figura 1.4.1 – Afídeos de *Toxoptera citricida* capturados por Nolasco *et al.* (2008) e visualizados à lupa com uma ampliação de 500x.

A presença de *T. citricida* nestes países pode ser problemática, pois a introdução deste afídeo numa determinada área resulta na disseminação de isolados mais severos de CTV (Halbert *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2000) e pode alterar a composição da população de CTV nessa área (Albiach-Marti *et al.*, 2000a; Nolasco *et al.*, 2008).

A eficiência de transmissão de CTV é afetada por vários fatores, nomeadamente pela espécie de afídeo, pelo isolado de CTV e pela suscetibilidade da variedade de citrino (Moreno *et al.*, 2008). Variedades de laranja doce são mais adequadas para a aquisição e mais suscetíveis de serem infetadas quando comparadas com toranjas ou limoeiro (Bar-Joseph *et al.*, 1989).

1.5 ORGANIZAÇÃO E EXPRESSÃO GENÓMICA DE CTV

O genoma do CTV é constituído por uma cadeia simples de RNA com aproximadamente 19,3 kb, que faz deste vírus o maior entre os vírus de RNA de plantas (Karasev *et al.*, 1995). O genoma está organizado em 12 ORFs (“Open Reading Frame” – região genómica codificante) que codificam pelo menos 19 proteínas, com duas regiões não traduzidas nas extremidades 5’ e 3’ (Karasev, 2000) (Figura 1.5.1). Na região 5’ a ORF é traduzida diretamente a partir do RNA genómico e codifica proteínas relacionadas com a replicação. ORF 1a codifica uma poliproteína de 349 kDa que contém os domínios característicos de duas proteases tipo papaína (L1 e L2), uma metiltransferase (MET) e uma helicase (HEL). A região entre os domínios MET e HEL tem uma função genómica desconhecida e apresenta muita variabilidade. ORF 1b

codifica para uma proteína com domínio típico da RNA polimerase RNA dependente (RdRp) expressa por +1 ribossomal frameshift (Karasev *et al.*, 1995). O vírus BYV tem uma organização similar à exceção de possuir apenas uma protease tipo papaína.

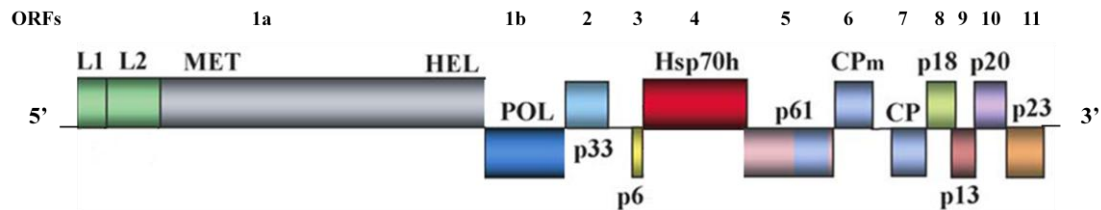


Figura 1.5.1 – Esquema representativo do genoma de CTV. Estão indicadas as diferentes regiões codificantes. Não está desenhado à escala. (Adaptado de Dolja *et al.*, 2006)

As restantes 10 ORFs, que são expressas através RNAs subgenômicos coterminais na região 3', codificam proteínas estruturais e não estruturais (Hilf *et al.*, 1995). Estas regiões codificantes incluem um módulo de 5 genes (p6, p65, p61, p27 e p25) que codificam proteínas envolvidas na encapsidação e transporte dos viriões e que são conservados em todos os membros família *Closteroviridae* (Dolja *et al.*, 2006; Karasev, 2000), o gene da p20 que é homólogo ao gene p21 do BYV e 4 genes que codificam proteínas sem homologia noutros closterovirus (p33, p18, p13 e p23). A ORF 3 codifica uma proteína hidrófoba de 6 kDa (p6) e transmembranar que se localiza no retículo endoplasmático e está associada ao transporte do vírus célula a célula (Dolja *et al.*, 2006). p65 é uma proteína homóloga à proteína “heat shock” HSP70h, que, juntamente com a proteína p61 e as duas proteínas da cápside, é essencial para uma eficiente encapsidação dos viriões (Satyanarayana *et al.*, 2000).

A proteína p20, codificada pela ORF 10, é o componente maioritário acumulado nos corpos de inclusão das células infetadas por CTV (Gowda *et al.*, 2000). Além disso, é uma das proteínas envolvidas na supressão do silenciamento (Lu *et al.*, 2004; Tatineni *et al.*, 2008). A ORF 11 está localizada junto à extremidade 3' e codifica para a proteína p23 para a qual não existe homologia dentro dos closterovirus (Lu *et al.*, 2004). É uma proteína de ligação a RNA com um domínio “Zinc Finger” (Lopez *et al.*, 2000) e está envolvida na produção de um maior número de cadeias positivas do que negativas (Satyanarayana *et al.*, 2002). A proteína p23, assim como a p20 e a p25, funciona como supressora do mecanismo de defesa de plantas baseado no silenciamento de RNA (Lu *et al.*, 2004). Recentemente, Albiach-Marti *et al.* (2010) mapearam determinantes de patogenicidade do sintoma de “Seedling Yellows” associados ao gene da p23.

As proteínas p33, p18 e p13 são dispensáveis na infecção e no movimento de CTV e as suas funções ainda permanecem desconhecidas (Tatineni *et al.*, 2008).

Nas plantas infetadas com CTV, além de se encontrarem moléculas de RNA genómico e subgenómico (Hilf *et al.*, 1995), também se encontram outras moléculas chamadas RNAs defetivos (D-RNAs) que são constituídas por segmentos das regiões terminais 5' e 3' do RNA genómico com extensas deleções internas (Ayllon *et al.*, 1999; Mawassi *et al.*, 1995). Normalmente, estas moléculas apresentam dimensões entre 2 kb e 5 kb. No entanto, já foram reportadas moléculas maiores, com aproximadamente 12 kb (Che *et al.*, 2002).

A expressão do genoma de CTV inclui 3 mecanismos normalmente usados pelos vírus de RNA de cadeia simples e polaridade positiva: processamento proteolítico, mudança do quadro de leitura (“translational frameshifting”) e formação de RNAs subgenómicos (Hilf *et al.*, 1995; Karasev *et al.*, 1997). Os dois primeiros são utilizados para expressar proteínas codificadas pela ORF 1a e 1b presente na extremidade 5', sendo que o último mecanismo é usado para expressar as ORFs 2 a 11 localizadas na extremidade 3'.

A organização do genoma e os mecanismos de expressão de CTV são semelhantes aos dos *Coronavirus* (Karasev *et al.*, 1997), um grupo de vírus de animais que possui os maiores genomas de RNA de cadeia simples (variam entre 26 kb e 32 kb) (Eckerle *et al.*, 2010).

1.6 VARIABILIDADE GENÓMICA

Existem diversos isolados de CTV que diferem no tipo e intensidade de sintomas que provocam em diferentes espécies de citrinos e na sua transmissibilidade por afídeos. A análise de sequências nucleotídicas é a melhor maneira de diferenciar os isolados de CTV e estimar a variabilidade genética (Rubio *et al.*, 2001). Até a data, foram determinadas as sequências completas do genoma de diversos isolados de CTV de diferentes origens geográficas e que induzem diferentes sintomas nos hospedeiros (Albiach-Marti *et al.*, 2000b; Harper *et al.*, 2009; Karasev *et al.*, 1995; Mawassi *et al.*, 1996; Melzer *et al.*, 2010; Roy e Brlansky, 2010; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006; Suastika *et al.*, 2001; Vives *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). A análise destes isolados revela que a variação genética se encontra desigualmente distribuída ao longo do RNA genómico (Lopez *et al.*, 1998), sendo a região 3' mais conservada e havendo um aumento da



heterogeneidade nucleotídica na direção 5' do genoma atingindo valores de identidade nucleotídica abaixo dos 60% (Mawassi *et al.*, 1996).

Um isolado natural de CTV não consiste apenas numa sequência única de RNA. É constituído por uma sequência predominante e por uma mistura de variantes genómicas (ou haplótipos) próximas, a nível nucleotídico, da variante principal (Ayllon *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2000).

São vários os fatores que têm sido considerados para a variabilidade e evolução dos isolados de CTV, nomeadamente mutação, devido à ausência de atividade corretora de erros da RNA polimerase RNA dependente (RdRp), recombinação, pressão seletiva, transmissão por afídeos e enxertia (Moreno *et al.*, 2008).

Os citrinos são árvores que duram muitos anos no campo e que podem ser repetidamente inoculadas por afídeos com variantes genéticas divergentes de CTV, possibilitando assim um aumento da diversidade genética em cada hospedeiro (Ayllon *et al.*, 2006). Além disso, as variantes genómicas encontram-se distribuídas de maneira irregular na planta infetada (d'Urso *et al.*, 2000). Sendo assim, poderá ocorrer uma segregação de variantes genómicas aquando da aquisição e transmissão por afídeos proporcionando efeitos de estrangulamento genético (“bottlenecks”) (Nolasco *et al.*, 2008) contribuindo para a alteração da população viral.

A presença de múltiplos haplótipos de CTV filogeneticamente distintos num único hospedeiro pode originar eventos de recombinação, contribuindo também para o aumento da diversidade (Sentandreu *et al.*, 2006; Weng *et al.*, 2007). Um dos exemplos de recombinação não-homóloga é a produção de RNAs defeituosos (Ayllon *et al.*, 1999; Che *et al.*, 2003). Evidência de recombinação homóloga em CTV foi também sugerida por diversos autores (Martin *et al.*, 2009; Roy e Brlansky, 2010; Rubio *et al.*, 2001; Vives *et al.*, 2005; Weng *et al.*, 2007). O estudo de recombinação em CTV é abordado no capítulo 4.

É, no entanto paradoxal que as sequências dos isolados de CTV parecem ser involuntariamente estáveis. Por exemplo, estudos efetuados por Albiach-Marti *et al.* (2000b) e Lbida *et al.* (2004) mostraram que isolados de CTV com uma origem em comum e geograficamente separados durante várias décadas apresentam sequências nucleotídicas muito idênticas. Este assunto é abordado em pormenor no capítulo 5.

1.7 DETEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS

A indexagem biológica é um método tradicional de diagnóstico de infecção com CTV (Roistacher, 1991), onde a variabilidade de sintomas desenvolvidos em plantas indicadoras, como a limeira mexicana, é usado para diferenciar os isolados de CTV. No entanto, este método é moroso e dispendioso (Niblett *et al.*, 2000). Deste modo, foram desenvolvidos outros métodos, serológicos e moleculares, que permitem a deteção e caracterização de isolados de CTV.

Após a purificação de CTV, vários anticorpos, policlonais e monoclonais (Nikolaeva *et al.*, 1996; Permar *et al.*, 1990), foram obtidos que permitem uma deteção rápida e rotineira de CTV por ensaios imunoenzimáticos. O “Tissue print-ELISA” (Cambra *et al.*, 2000) consiste na impressão de tecido vegetal numa membrana de nitrocelulose sendo o vírus posteriormente detetado com anticorpos específicos. Este método é muito usado pois permite a análise de centenas de amostras de forma simples e sem a necessidade de preparar extratos. O imuno-ensaio *in situ* (ISIA) (Lin *et al.*, 2000) é um ensaio semelhante ao “Tissue Print-ELISA”, mas neste caso são cortadas secções de tecido vegetal que, após incubadas com anticorpos específicos, são visualizadas ao microscópio ótico. Deste modo, o vírus é detetado diretamente no tecido vegetal. A maior vantagem do ISIA é a possibilidade de observar a distribuição de CTV nas células hospedeiras o que poderá ser importante para medidas de controlo da doença. A aplicação deste método encontra-se descrita no capítulo 3.

Foram também desenvolvidos métodos moleculares baseados na reação de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) para a deteção de CTV, tais como a imunocaptura seguida de transcrição reversa e amplificação (IC/RT-PCR) (Nolasco *et al.*, 1993) e ensaios de multiplex RT-PCR (Roy *et al.*, 2010). Outra metodologia aplicada ao diagnóstico de CTV é o ensaio de RT-PCR em tempo real (“Real-Time RT-PCR”) (Bertolini *et al.*, 2008; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007; Saponari *et al.*, 2008) que, além de aumentar a sensibilidade da deteção, permite a quantificação de CTV nos tecidos das plantas infetadas e em afídeos.

Para um melhor conhecimento da doença e de modo a poder tomar medidas de controlo adequadas, é também fundamental caracterizar e diferenciar os isolados de CTV. O anticorpo monoclonal MCA-13 tem sido usado para diferenciar entre isolados severos e suaves (Permar *et al.*, 1990). A reação com este anticorpo depende da presença de um resíduo de fenilalanina na posição 124 na proteína da cápside (CP). Este resíduo

encontra-se presente em todos os isolados severos, sendo que nos isolados suaves é substituído por tirosina (Niblett *et al.*, 2000). Outra estratégia de diferenciar os isolados de CTV consiste na análise dos mapas de restrição do gene da CP obtidos pela digestão com enzimas de restrição (Gillings *et al.*, 1993; Roy *et al.*, 2003). A análise de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (“single-strand conformation polymorphism” – SSCP) também tem sido amplamente usada na caracterização da diversidade genética de isolados de CTV (Ayllon *et al.*, 2006; Roy e Brlansky, 2009; Rubio *et al.*, 1996; Sambade *et al.*, 2003).

Hilf *et al.* (2005) desenvolveram um método que permite diferenciar os isolados de CTV através da análise de marcadores moleculares na região 5' do genoma. Através deste sistema, Hilf *et al.* (2005) consideram a existência de 4 grupos (ou genótipos). Por seu lado, Nolasco *et al.* (2009), desenvolveram um sistema de tipificação baseado no gene da CP. Estes autores consideram 7 grupos filogenéticos e, através de PCR assimétrico-ELISA e usando um conjunto de sondas de hibridação conseguiram distinguir entre estes grupos.

Os sistemas desenvolvidos por Hilf *et al.* (2005) e Nolasco *et al.* (2009) encontram-se descritos mais detalhadamente no capítulo 2, onde se procedeu à comparação entre estes dois métodos na caracterização de um conjunto de isolados de CTV.

1.8 MEDIDAS DE CONTROLO DA DOENÇA

Atualmente, existem diversas estratégias para tentar controlar os efeitos da doença causada por CTV, sendo que a implementação dessas estratégias depende essencialmente da incidência e do tipo de isolado de CTV e da variedade de citrinos presentes em cada região (Moreno *et al.*, 2008).

Nas regiões onde a propagação dos citrinos ainda é efetuada em porta-enxertos de laranjeira azeda, é necessária a implementação de programas de quarentena e certificação de material propagativo, de modo a evitar a introdução e a disseminação do vírus em regiões livres de infeção por CTV (Moreno *et al.*, 2008). Por outro lado, em regiões onde a incidência de CTV é baixa e o foco da infeção é limitado a um pequeno grupo de árvores, a erradicação das árvores infetadas é a prática mais eficaz para evitar ou atrasar o início de uma epidemia (Bar-Joseph *et al.*, 1989).

Quando os programas de certificação não são eficazes e a erradicação se torna inviável devido a uma eficiente dispersão de CTV por vetores, a única opção para controlar a

doença e para não ocorrer declínio é a utilização de porta-enxertos tolerantes ou resistentes a tristeza (Moreno *et al.*, 2008). Um destes porta-enxertos e o mais usado é *Poncirus trifoliata* e os híbridos *Carrizo* e *Troyer citrange*. *P. trifoliata* tem sido usado como porta-enxerto na Nova Zelândia nos últimos 40 anos o que permite um controlo de isolados que provocam declínio (Harper *et al.*, 2010). No entanto, já foram encontrados isolados de CTV com capacidade de superar a resistência de *P. trifoliata* provocando sintomas de “Stem Pitting” (Dawson e Mooney, 2000; Harper *et al.*, 2010). Sendo assim é necessário ter em atenção a isolados de CTV severos que provocam “Stem Pitting” na variedade enxertada independentemente da tolerância do porta-enxerto. Atualmente, ainda não foi obtida uma combinação de variedade resistente a CTV enxertada sobre *P. trifoliata*, que permitisse obter frutos e árvores de qualidade (Albiach-Marti *et al.*, 2004). Deste modo, se ocorrer uma dispersão de isolados que provoquem “Stem Pitting” é necessário recorrer à proteção cruzada das variedades através de isolados suaves.

A proteção cruzada consiste em infetar uma planta com um isolado suave que, posteriormente a irá proteger contra infeções causadas por isolados mais severos. (Gonsalves e Garnsey, 1989). Este tipo de proteção foi usada com sucesso na comercialização de laranja doce e lima no Brasil (Costa e Muller, 1980) e de toranja na África do Sul (Van Vuuren *et al.*, 1993). No entanto, a identificação de isolados protetores é difícil e era efetuada de forma empírica. Nos casos do Brasil e África do Sul, os isolados eram selecionados do mesmo pomar onde as árvores permaneciam durante anos sem manifestar qualquer tipo de sintoma e onde era assumido que essas árvores estavam protegidas contra infeções de isolados mais severos e que então podiam ser usadas para propagar novas plantas. No entanto, na África do Sul a proteção cruzada tem falhado (Van Vuuren e Van der Vyver, 2000) pois árvores de uma variedade de toranja (“Star Ruby”) pré-inoculadas com um isolado suave mostraram sintomas de “Stem Pitting”. Van Vuuren *et al.* (2000) verificaram que, após a separação de haplótipos por transmissão por afídeos, o isolado protetor era constituído por uma mistura de haplótipos, alguns dos quais severos. Uma alteração das condições ambientais poderá levar a que estes haplótipos severos se tornem dominantes provocando assim, os sintomas de “Stem Pitting” no hospedeiro. Deste modo, para uma proteção eficaz, é essencial que o isolado protetor permaneça estável no hospedeiro.

Um isolado protetor numa dada região não significa que seja eficaz noutra, visto que a proteção cruzada depende da variedade de citrino, do isolado de CTV e das condições

ambientais que prevalecem em cada região (Folimonova *et al.*, 2010; Moreno *et al.*, 2008). Além disso, Folimonova *et al.* (2010) mostraram que a proteção só acontece entre variantes genéticas do mesmo isolado, ou seja, quando um haplótipo do mesmo isolado é usado para efetuar uma segunda inoculação na planta, a infecção primária fornece proteção contra esse segundo haplótipo. Se a segunda inoculação fosse com um haplótipo de um isolado diferente a proteção oferecida pelo primeiro já não era eficaz.

Folimonova *et al.* (2008) mostrou que o CTV infeta apenas um pequeno número de células no floema e que os movimentos célula a célula ou a longa distância são limitados. No entanto, Folimonova *et al.* (2010) verificaram que a proteção era completa, isto é, não se limitava apenas às células infetadas mas que as células não infetadas também estavam protegidas. Contudo, ainda não se conhece o mecanismo biológico que permita explicar a “transmissão” da proteção a células não infetadas.

Uma possível explicação poderá advir do mecanismo natural de defesa das plantas contra infecções virais estar relacionado com o silenciamento genético pós-transcricional (“post-transcriptional gene silencing”, PTGS) (Fagoaga *et al.*, 2006). As regiões do genoma com estrutura secundária ou as resultantes da replicação do genoma envolvem RNAs de cadeia dupla (dsRNA) que posteriormente são transformados em pequenos RNAs com cerca de 21 a 24 nucleótidos, chamados de “small-interfering RNAs” (siRNA). De seguida, estes siRNA medeiam a degradação de sequências complementares, inibindo a infecção viral (Sambade *et al.*, 2007). Deste modo, a presença de siRNA específicos de vírus é essencial para a resposta natural de defesa antiviral. De facto, já foram observados siRNA específicos de vírus em plantas infetadas com CTV (Fagoaga *et al.*, 2006) o que sugere o desencadeamento de uma resposta natural antiviral nesses hospedeiros. Sendo assim, pode-se especular que durante a proteção cruzada, os siRNA provenientes do isolado protetor suave possam prevenir uma subsequente infecção por um isolado severo (Sambade *et al.*, 2007).

Outra estratégia de controlo de CTV em citrinos é a resistência derivada de um agente patogénico (“Pathogen-derived resistance” (PDR)), usando plantas transgênicas que expressam genes virais (Dominguez *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2008). Vários trabalhos têm sido efetuados para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a CTV pela expressão de sequências do genoma viral (Dominguez *et al.*, 2002; Fagoaga *et al.*, 2006; Febres *et al.*, 2008; Febres *et al.*, 2003). No entanto, os resultados obtidos têm sido inconsistentes. Os trabalhos desenvolvidos por Dominguez *et al.* (2002) e Fagoaga *et al.* (2006), mostraram que em plantas de limeira mexicana transgênicas a expressão dos

genes da CP ou p23 permitiu conferir resistência, sendo que esta resistência era parcial na medida em que apenas um pequeno número de plantas derivadas da linhagem transgênica era resistente.

1.9 OBJETIVOS E VISÃO GLOBAL DA TESE

O CTV pode provocar enormes perdas económicas em países produtores de citrinos pois além de poder afetar o crescimento e a produtividade das árvores pode também provocar a destruição total de pomares.

Neste trabalho pretende-se aprofundar o conhecimento da filodinâmica de CTV, isto é do processo que integra o estudo da epidemiologia e evolução molecular do vírus. Este objetivo geral é consubstanciado através dos objetivos específicos abaixo descritos.

Em consequência da disseminação mundial de CTV, o desenvolvimento de métodos rápidos de discriminação de isolados do vírus é essencial para definir estratégias de controlo da doença. Um dos métodos frequentemente utilizados tem sido o sistema baseado em marcadores genéticos visando diversas regiões do genoma de CTV (Hilf *et al.*, 2005). Dada a aparente discrepância entre este método que considera 4 grupos filogenéticos e o sistema de tipificação baseado no gene da proteína da cápside (Nolasco *et al.*, 2009) que considera 7 grupos, considerou-se importante efetuar uma comparação (**Capítulo 2**), que permita fazer a correspondência entre os resultados de ambos. Esta correspondência é complementada com uma abordagem da dinâmica de colonização de cada grupo filogenético através de um imuno-ensaio *in situ* (**Capítulo 3**).

Tendo-se considerado 7 grupos filogenéticos com base no gene da proteína da cápside quando outros autores consideram um menor número, põe-se a questão de esta maior diversificação ocorrer apenas no gene da CP ou de, pelo contrário, ser extensível a outras regiões do genoma tendo nos outros sistemas sido subestimada a diversificação. Assim considerou-se importante estender o estudo da variabilidade genómica à região 3' terminal em que se concentram os genes mais fortemente implicados na interação com o hospedeiro (**Capítulo 4**). Uma vez que a manutenção de uma dada estrutura genética pode ser anulada com maior ou menor rapidez por fenómenos de recombinação, a pesquisa de eventos de recombinação num dado horizonte temporal é abordada também neste capítulo.



Para além da recombinação, outro fator essencial à evolução viral são as substituições nucleotídicas originadas pelos erros de cópia da RNA polimerase RNA dependente. Dada a escassez de conhecimentos sobre este assunto no âmbito da virologia vegetal, e a aceitação generalizada, frequentemente sem justificação, de que os vírus de RNA têm uma velocidade de evolução elevada considerou-se importante abordar este assunto (**Capítulo 5**). Para além disso, e do ponto de vista prático, o conhecimento da velocidade de evolução de um vírus com o potencial patogénico do CTV é, também, essencial para a definição de uma estratégia de controlo.

Finalmente, no **Capítulo 6**, os conhecimentos anteriores são aplicados à caracterização da situação epidemiológica do CTV em Portugal continental a partir de isolados de CTV recolhidos no campo.

CAPÍTULO 2

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE TIPIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE CTV

Baseado no artigo:

Nolasco, G., Santos, C., Silva, G., Fonseca, F. (2009). Development of an asymmetric PCR-ELISA typing method for *Citrus tristeza virus* based on the coat protein gene. *J Virol Methods* **155**, 97-108.



2.1 INTRODUÇÃO

De modo a definir uma estratégia adequada para o controlo da doença e para a erradicação seletiva de isolados severos é essencial, não só detetar mas também diferenciar e caracterizar os isolados presentes numa dada região.

A indexagem biológica é um método confiável mas torna-se moroso e é dispendioso. Sendo assim, vários métodos moleculares foram desenvolvidos para caracterizar os diversos isolados de CTV (Moreno *et al.*, 2008; Niblett *et al.*, 2000). O anticorpo monoclonal mais usado na discriminação de isolados é o MCA-13, que embora considerado como podendo distinguir entre isolados severos e suaves (Permar *et al.*, 1990) na realidade apenas distingue o grupo M dos restantes. Outros métodos incluem, por exemplo, a análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição (RFLP) (Gillings *et al.*, 1993), a análise dos polimorfismos conformacionais de cadeia simples (SSCP) (Rubio *et al.*, 1996), a análise de mapas peptídicos da proteína da cápside (Albiach-Marti *et al.*, 2000a) e a hibridação com sondas de cDNA (Narvaez *et al.*, 2000). Mais recentemente, Hilf *et al.* (2005) e Nolasco *et al.* (2009) desenvolveram dois métodos de tipificação que permitem diferenciar os isolados de CTV e tentam relacionar com os sintomas que provocam no hospedeiro.

Ayllon *et al.* (2001) ao explorarem a maior diversidade genómica existente na região terminal 5' tiveram como alvo uma pequena região (284 nucleótidos (nt)) que foi amplificada por um conjunto de “primers” específicos para distinguir três grupos (I, II e III), representados pelos isolados T36, VT e T30, respetivamente. Com base nas sequências completas de CTV disponíveis, Hilf e Garnsey (2000) e Hilf *et al.* (2005) reconheceram quatro grupos, tendo adicionado o grupo representado pelo isolado T3 aos grupos propostos por Ayllon *et al.* (2001). No sistema proposto por Hilf, os “primers” usados para identificar estes grupos têm como alvo duas regiões com cerca de 400 - 500 nt perto da extremidade 5' e uma região de aproximadamente 700 nt no gene da polimerase. Deste modo, o sistema desenvolvido por Hilf *et al.* (2005) baseia-se na amplificação de marcadores moleculares onde classificam os isolados de CTV de acordo com os perfis de amplificação desses marcadores. Com o conjunto de “primers” determinaram o perfil de cada isolado de referência (T36, VT, T30 e T3), o qual designam de genótipo. Assim, um isolado é associado a um determinado genótipo baseado na similaridade entre o seu perfil de amplificação e os perfis de amplificação dos isolados de referência. Sendo assim, com este sistema, os autores reconhecem 4

grupos de CTV, cada um correspondente ao genótipo padrão. Este método tem sido usado por vários autores (Biswas, 2010; Garnsey *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2005) na classificação de vários isolados de CTV.

Por outro lado, Nolasco *et al.* (2009) desenvolveram um método de tipificação através de PCR assimétrico-ELISA com base no reconhecimento de sete grupos filogenéticos baseado no gene da proteína da cápside (CP). Esta estrutura filogenética é uma generalização da referida por Niblett *et al.* (2000) e é reconhecida por vários autores (Cerni *et al.*, 2009; Lbida *et al.*, 2004; Papayiannis *et al.*, 2007). O princípio subjacente a este método é que, ao efetuar a reação de PCR, a quantidade de um dos “primers” é de cerca de 10 vezes superior à do outro, o que origina uma grande quantidade de cadeias simples (Nolasco *et al.*, 2002). Durante a amplificação, os produtos PCR são marcados com digoxigenina permitindo a ligação a um conjunto de sondas de hibridação biotiniladas que revestem os poços de uma microplaca de ELISA e que têm como alvo os sete grupos filogenéticos (Gp1, Gp2, Gp3a, Gp3b, Gp4, Gp5 e GpM).

Neste trabalho, vários isolados de CTV de diferentes origens geográficas e cujas sequências nucleotídicas do gene da CP eram conhecidas, foram usados para efetuar uma análise comparativa entre a análise dos múltiplos marcadores moleculares (MMM) de Hilf *et al.* (2005) e a tipificação por PCR assimétrico-ELISA (APET) desenvolvida por Nolasco *et al.* (2009).

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Isolados CTV

No estudo comparativo dos dois métodos de tipificação foram usados 27 isolados de CTV provenientes de diversas origens geográficas (ver Tabela 2.3.3) e que apresentam diferentes características biológicas. Estes isolados, constituídos apenas por um haplótipo ou por misturas de haplótipos previamente conhecidas (algumas artificialmente obtidas), foram mantidos em laranjeira doce Madam Vinous em estufa protegida contra insetos, na Universidade do Algarve ou no “Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari”, Itália.



2.2.2 Síntese de cDNA

O RNA total foi extraído usando o kit “RNAeasy plant mini kit” (Quiagen) servindo de molde para a síntese de cDNA usando uma mistura de “primers” aleatórios de 6 mer (Roche). Para cada reação, 5 µL do RNA total foram misturados com 1 µL de “primers” aleatórios (0,5 µg/µL). Seguidamente desnaturou-se a solução a 95 °C durante 5 minutos e colocou-se imediatamente no gelo. A transcrição reversa foi feita durante 1 h a 39 °C usando a enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante.

O cDNA obtido de cada isolado foi usado quer nos ensaios de tipificação por PCR assimétrico-ELISA quer na análise dos múltiplos marcadores moleculares.

2.2.3 Amplificação do gene da CP

O gene da proteína da cápside (673bp) foi amplificado por PCR usando os “primers” CTV1 (“Forward”: 5’-ATGGACGACGAAACAAAGAA-3’) e CTV10 (“Reverse”: 5’-ATCAACGTGTGTTGAATTTCC-3’) descritos por Sequeira e Nolasco (2002). As reações de amplificação foram feitas num volume final de 50 µL contendo 2,5 mM de MgCl₂ (Fermentas), 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada um dos “primers” e 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) e respetivo tampão. Os ciclos de temperatura aplicados foram os seguintes: 94 °C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de 92 °C durante 30 s, 52 °C durante 30 s e 72 °C durante 30 s, com uma incubação final de 72 °C durante 5 min.

Esta amplificação do gene da CP foi usada para testar a eficiência da síntese de cDNA por transcrição reversa. Se a amplificação com estes “primers” fosse bem sucedida, o mesmo cDNA iria ser usado nos ensaios de PCR assimétrico-ELISA e na análise dos múltiplos marcadores moleculares.

2.2.4 Análise dos múltiplos marcadores moleculares (MMM)

A amplificação dos marcadores moleculares de CTV foi efetuada usando 11 pares de “primers” como descrito por Hilf *et al.* (2005). O cDNA (1 µL) obtido para cada isolado foi amplificado em volumes de reação de 50 µL contendo 2,5 mM de MgCl₂ (Fermentas), 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada um dos “primers” e 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) e respetivo tampão. Os ciclos de temperatura aplicados foram os seguintes: 94 °C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 56 °C durante 60 s e 72 °C durante 60 s, com uma incubação final de 72 °C durante 10 min. Os

produtos resultantes da amplificação por PCR foram analisados em gel de agarose a 1% em tampão TAE. O nome e tamanho dos marcadores moleculares assim como a sequência dos “primers” usados na reação de PCR estão descritos na Tabela 2.2.1.

Tabela 2.2.1 - Sequência dos “primers” usados na amplificação por PCR de marcadores moleculares de CTV.

Marcador Molecular	Tamanho (bp)		Sequência dos “primers” (5'→3')
T36CP	671	F	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTG
		R	TCAACGTGTGTTGAATTTCCCA
T36-5'	500	F	AATTTACAAATTCAACCTG
		R	CTTGCCTGACGGAGGGACC
T36K17	409	F	GTTTTCTCGTTTGAAGCGGAAA
		R	CAACACATCAAAAATAGCTAGT
T36POL	714	F	TGACGCTAACGACGATAACG
		R	ACCCTCGGCTTGTTTTCTTATG
T30-5'	594	F	CGATTCAAATTCACCCGTATC
		R	TAGTTTTCGCAACACGCCTGCG
T30K17	409	F	GTTGTCGCGCCTAAAGTTCGGCA
		R	TATGACATCAAAAATAGCTGAA
T30POL	696	F	GATGCTAGCGATGGTCAAAT
		R	CTCAGCTCGCTTTCTCACAT
VT-5'	492	F	AATTTCTCAAATTCACCCGTAC
		R	CTTCGCCTTGGCAATGGACTT
VTK17	409	F	GTTGTCGCGCTTTAAGTTCGGTA
		R	TACGACGTAAAAATGGCTGAA
VTPOL	695	F	GACGCTAGCGATGGTCAAGC
		R	CTCGGCTCGCTTTCTTACGT
T3K17	409	F	GTTATCACGCCTAAAGTTTGGT
		R	CATGACATCGAAGATAGCCGAA

2.2.5 Tipificação por PCR assimétrico-ELISA (APET)

A microplaca (Microlon 600, Greiner) foi, primeiramente, revestida com streptavidina (10 µg/ml, 100 µl/poço) em tampão carbonato (pH 9,6) durante 90 min a 37° C. Após 3 lavagens com PBS-Tween, foram adicionadas as sondas biotiniladas (20 pmol/poço) em tampão de hibridação (5x SSPE contendo 0,1% n-lauroylsarcosine) a cada linha da microplaca (Tabela 2.2.2) durante 30 min a 37 °C. Seguidamente, a microplaca foi novamente lavada com PBS-Tween e imediatamente utilizada ou mantida seca à temperatura ambiente ou a 4 °C durante várias semanas antes de ser utilizada para hibridação dos produtos PCR marcados com digoxigenina.

Seguidamente efetuou-se a reação de PCR assimétrico com marcação por Digoxigenina. Para tal, foi usado um microlitro do cDNA sintetizado para cada isolado. A reação de PCR assimétrico foi efetuada com os “primers” CTV 43 (“Forward”: 5'-ATGTTGTTGCNGCNGAGTC-3') e CTV 42 (“Reverse”: 5'-



CTCAAATTGCGRTTCTGTCT-3') que emparelham nas posições 59 e 454 do gene da CP do isolado de referência T36 (referência do GenBank: M76485), respectivamente. As reações de amplificação foram feitas num volume final de 50 µL contendo 2,5 mM de MgCl₂ (Fermentas), 80 µM de cada um dATP, dGTP, dCTP, 76 µM de dTTP e 2 µM de Dig-11-dUTP (Roche Applied Science), 200 nM de “primer” CTV43, 20 nM de “primer” CTV42 e 1 U de Taq DNA polymerase (Fermentas). Os ciclos de temperatura aplicados foram os seguintes 94 °C durante 2 min, seguido de 50 ciclos de 92 °C durante 30 s, 52 °C durante 30 s e 72 °C durante 45 s, com uma incubação final de 72 °C durante 5 min.

Para cada amostra, foram misturados 45 µl de produto PCR marcado com digoxigenina com 855 µl de tampão de hibridação. Seguidamente, distribuíram-se 100 µl da solução por poço de cada coluna e incubou-se a microplaca a 45 °C durante 90 min. Deste modo, usa-se uma coluna por cada amostra a ser tipificada. Posteriormente, a microplaca foi lavada 3 vezes com um tampão de baixa molaridade (Tris-HCl 10 mM, pH 8, NaCl 15 mM) pré-aquecido a 45 °C.

Tabela 2.2.2 - Localização, especificidade e sequência das sondas biotiniladas usadas no ensaio de APET.

Sonda	Linha ^a	Sequência da Sonda ^b	Localização no gene da CP	Especificidade
B1	A	CGTTATACCCGTGGCG	297-312	Gp1
B2	B	ACGCACGTCATTCATCG	122-138	Gp2
B3a	C	TGCCCGTGGTGTCGT	293-307	Gp3a, GpM
B10	D	TCTTTATCAGACAAATTAGGA	204-224	Gp3b, Gp3a
III	E	CCACTTCGACGCCCT	323-337	Gp3b
B4	F	CTCCCGAGTATATGTTATGC	305-324	Gp4
B5	G	CACCCGTGGTATCATCG	291-307	Gp5
B8	H	AGGCTAAGTAAAGAGCATCG	429-448	GpM

^a Colocação da sonda na microplaca

^b As sondas estão biotiniladas na extremidade 5'.

Para a determinação da eficiência de hibridação, foi adicionado anti-DIG-F(ab')₂ conjugado com a fosfatase alcalina (Roche), 0,075 unidades por poço em 100 µl de tampão conjugado ELISA (PBS-Tween contendo 2% PVP-40 e 0,2% BSA). Seguidamente, incubou-se a microplaca durante 30 min a 37 °C e lavou-se 5 vezes com PBS-Tween. O substrato (p-nitrofenil-fosfato), 1 mg/ml, foi então adicionado em tampão substrato ELISA, 100 µl/poço. Os valores de absorvância a 405 nm foram registados durante 60 min com 3 min de intervalo.

A análise dos resultados é feita em duas etapas usando o software CalcType desenvolvido e explicado por Nolasco *et al.* (2009). Em primeiro lugar, os dados são importados para uma folha de Excel com uma aplicação de visual basic onde é calculada uma matriz com as taxas iniciais de hidrólise do substrato de um determinado isolado. Seguidamente, essa matriz é comparada com uma matriz com as taxas de hidrólise obtida a partir de haplótipos padrão (que se encontram armazenadas no software), sendo determinada a composição do isolado em termos de presença de haplótipos de cada um dos grupos filogenéticos.

2.3 RESULTADOS

De modo a testar a eficiência da síntese de cDNA dos diversos isolados de CTV foi efetuada uma amplificação do gene da CP com os “primers” CTV1 e CTV10 (Figura 2.3.1). Após confirmação de uma amplificação bem sucedida de todos os isolados, os mesmos cDNAs foram usados na análise dos MMM e nos ensaios de APET.

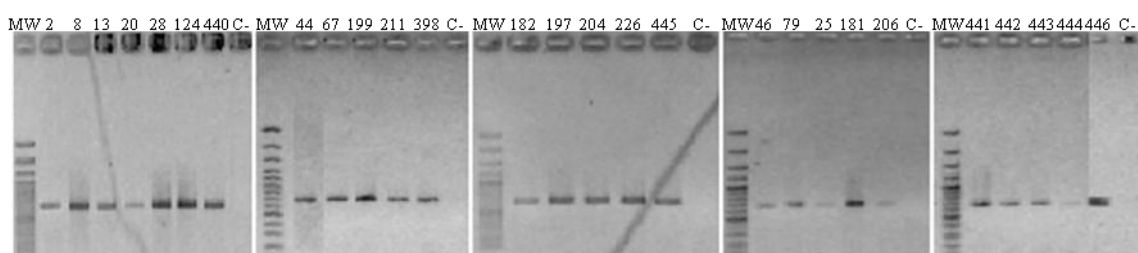


Figura 2.3.1 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de cDNAs para o gene da CP (673bp) de diversos isolados usando os “primers” CTV1 e CTV10. MW corresponde ao marcador de 100bp e C- é o controlo negativo de cada uma das reações de amplificação.

2.3.1 Análise dos múltiplos marcadores moleculares (MMM)

Os isolados de CTV foram caracterizados através da amplificação de marcadores moleculares usando os pares de “primers” descritos por Hilf *et al.* (2005) (Tabela 2.2.1). Segundo aqueles autores, a associação de um isolado a um determinado genótipo tem em conta algumas considerações acerca dos marcadores moleculares. Em primeiro lugar, o marcador T36CP serve apenas como controlo positivo, não sendo usado para determinar o genótipo de um isolado. Deste modo, para designar um isolado como pertencente ao genótipo T36 é suficiente a amplificação do marcador T36POL. Relativamente ao genótipo T30, o marcador T30POL é único deste genótipo. Portanto um isolado positivo para T30POL, mesmo na ausência dos marcadores T30-5’ e



T30K17, é considerado como pertencente ao genótipo T30. Finalmente, o marcador VTPOLE é comum aos genótipos T3 e VT e, deste modo, o marcador T3K17 é o que permite distinguir entre os genótipos T3 e VT.

Tendo em conta as apreciações acima descritas, apenas se apresentam os resultados das amplificações correspondentes aos marcadores essenciais na determinação do genótipo de cada um dos isolados (Figura 2.3.2), embora os resultados com todos os marcadores sejam apresentados na Tabela 2.3.3. Os isolados foram divididos em 5 conjuntos pelo que se apresentam, separadamente, os géis de agarose correspondente a cada conjunto nos diferentes marcadores.

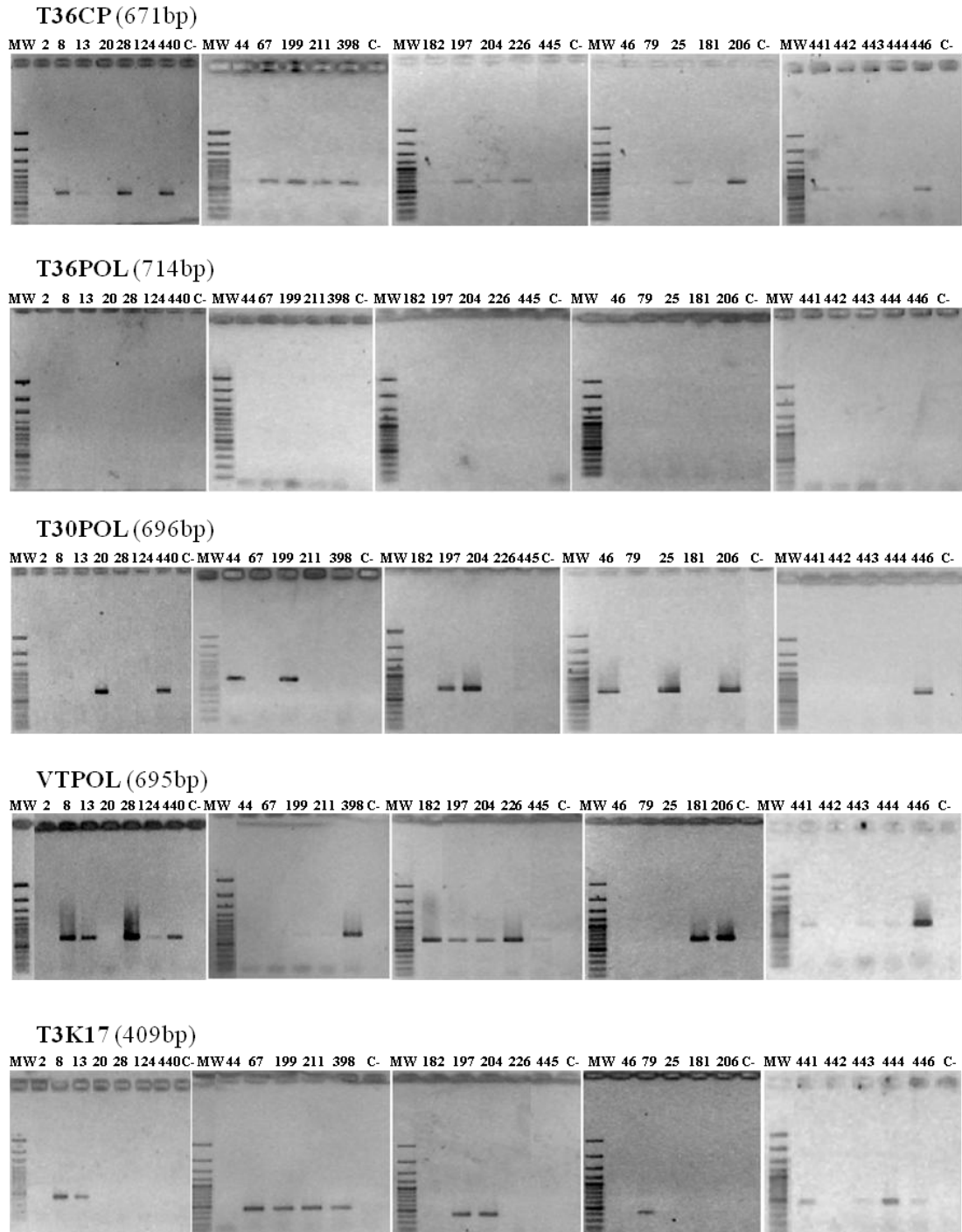


Figura 2.3.2 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de cDNAs obtidos para os diversos marcadores moleculares. MW corresponde ao marcador de 100bp e C- é o controle negativo de cada uma das reações de amplificação.

Houve alguns casos em que não se conseguiu associar um isolado a nenhum dos genótipos, como são os casos dos isolados 2 e 442. Isto acontece pois estes isolados não foram detetados por nenhum dos marcadores moleculares à exceção dos marcadores T36-5' (marcador não essencial) e T36CP que, como referido anteriormente, é um marcador não específico. Além disso, este marcador, que deveria servir como controle



positivo do ensaio de MMM, não foi amplificado em vários isolados (isolados 443, 444 e 445 da Croácia e isolados 79 e 124 da Ilha da Madeira e da Ilha da Reunião, respetivamente), ou foi detetado com um sinal muito fraco, como aconteceu com os isolados 44, 46, 181 e 182 de Portugal, isolado 2 da Ilha da Madeira e isolado 20 de Espanha. Verificou-se também, que nenhum dos isolados foi detetado pelos “primers” T36POL. Os restantes isolados amplificaram com um ou mais pares de “primers” sugerindo que alguns destes isolados são constituídos por misturas de haplótipos.

Os resultados finais da determinação do genótipo de cada isolado encontram-se na Tabela 2.3.3.

2.3.2 Tipificação por PCR assimétrico-ELISA (APET)

O mesmo conjunto de cDNAs usado no ensaio de MMM foi tipificado por PCR-assimétrico-ELISA usando o conjunto de 8 sondas de hibridação (Tabela 2.2.2).

Na Tabela 2.3.1, estão apresentadas as taxas iniciais de hidrólise obtidas para o gene da CP de um conjunto de haplótipos de CTV representativos de cada um dos 7 grupos filogenéticos. Esta corresponde à matriz padrão que é inserida no software CalcType e é a partir desta que se determina, por sucessivas iterações, a presença de haplótipos de cada um dos grupos filogenéticos ao analisar uma amostra desconhecida.

Tabela 2.3.1 - Taxas iniciais de hidrólise* de um conjunto de haplótipos de CTV representativos de cada um dos 7 grupos filogenéticos.

	1.1TT (Gp1)	13.3 (Gp2)	BB6 (Gp3a)	28C (Gp3b)	134a (Gp4)	010.8 (Gp5)	20.2 (GpM)
B1	0.643	0.006	0.006	0.007	0.006	0.010	0.006
B2	0.005	0.488	0.006	0.007	0.003	0.011	0.007
B3a	0.031	0.010	0.219	0.022	0.048	0.006	0.094
B10	0.009	0.005	0.071	0.299	0.002	0.002	0.002
III	0.005	0.009	0.031	0.278	0.018	0.002	0.002
B4	0.007	0.006	0.007	0.003	0.443	0.004	0.005
B5	0.005	0.003	0.004	0.008	0.013	0.552	0.003
B8	0.000	0.031	0.007	0.006	0.013	0.055	1.426

*Estas taxas foram obtidas usando preparações com concentrações idênticas de cada isolado.

O valor obtido para cada isolado é comparado com um valor de limiar, sendo considerado positivo ou negativo para cada grupo filogenético. Os resultados da tipificação dos diversos isolados encontram-se na Tabela 2.3.2.

Tabela 2.3.2 - Valores absolutos da tipificação por APET dos isolados CTV.

	2	8	13*	20	28	124	440	44*	67*
Gp1	0.000	0.001		0.001	0.003	0.007	0.000		
Gp2	0.013	0.007		0.005	0.000	0.000	1.729		
Gp3a	0.000	3.531	+	0.000	0.014	0.000	0.000		+
Gp3b	0.000	0.067	+	0.000	2.896	0.000	0.000		
Gp4	0.003	0.007		0.009	0.000	1.392	0.000		
Gp5	1.707	0.012		0.019	0.001	0.820	0.000		+
GpM	0.000	0.001		1.388	0.000	0.000	0.199	+	

	199	211	398*	182	197	204*	226	445	46
Gp1	0.003	0.006		0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
Gp2	0.000	0.000	+	0.007	0.000		0.000	3.696	0.000
Gp3a	0.305	0.203	+	0.000	0.359	+	0.000	0.000	0.000
Gp3b	0.013	0.000	+	0.994	0.013		3.480	0.000	0.000
Gp4	0.014	0.000		0.000	0.012		0.002	0.006	0.000
Gp5	0.463	0.252		0.002	0.655		0.041	0.007	0.000
GpM	0.376	0.029		0.000	0.325	+	0.019	0.002	0.494

	79*	25	181	206	441*	442*	443*	444*	446*
Gp1		0.008	0.009	0.005					
Gp2		0.014	0.003	0.007			+		+
Gp3a	+	0.000	0.017	0.000				+	+
Gp3b		0.000	0.222	0.000					
Gp4		0.008	0.000	0.081	+		+		
Gp5		0.012	0.002	0.327		+		+	
GpM		1.003	0.000	0.116					

* Não se apresentam os valores absolutos para estes isolados, pois apesar da metodologia ser a mesma foram analisados com um software mais antigo, no qual se considerava um isolado positivo ou negativo para cada grupo filogenético.

Por este método foi possível identificar haplótipos de todos os grupos (à exceção do grupo 1) quer estes estivessem presentes individualmente ou em misturas de 2 ou 3 grupos. O resultado da tipificação por APET de todos os isolados encontra-se resumido na Tabela 2.3.3.

2.3.3 Comparação entre MMM e APET

Os resultados comparativos das duas análises estão apresentados na Tabela 2.3.3. Todos os isolados constituídos pelo GpM ou pelo Gp2 no ensaio de APET foram classificados como pertencentes ao genótipo T30 no sistema MMM. Isolados do Gp3b foram incluídos no genótipo VT, mas o inverso não é verdadeiro: o genótipo VT pode corresponder aos Gp2, Gp3b e Gp4. Por sua vez, o genótipo T3 aparece frequentemente associado ao genótipo VT e corresponde quer ao Gp3a quer ao Gp4. Verificou-se também que isolados pertencentes ao Gp5 não têm equivalência no sistema de Hilf (por



exemplo, isolados 2 da Madeira e 442 da Croácia). Devido à ausência de isolados do Gp1 na nossa coleção durante a realização deste estudo, o Gp1 não poderia ser diretamente comparado com o genótipo T36. No entanto, como este genótipo também não foi detetado pelo sistema de Hilf poderá ser uma indicação de que eles são equivalentes.

Um problema adicional foi originado pelo marcador T36CP que deveria comportar-se como um marcador não específico, mas não o fez. Em vários isolados, a amplificação com os “primers” T36CP foi muito fraca ou inexistente sendo que, os mesmos cDNAs quando amplificados com os “primers” CTV1 e CTV10 deram sinal positivo.

Tabela 2.3.3 - Comparação entre a análise dos múltiplos marcadores moleculares e a tipificação por PCR assimétrico-ELISA.

Isolados	CTV1/ CTV10	T36 CP	T36 5'	T36 K17	T36 POL	T30 5'	T30 K17	T30 POL	VT 5'	VT K17	VT POL	T3 K17	MMM	APET
Portugal														
28	+	+					+			+	+		VT	3b
44	+	+*				+	+	+					T30	M
46	+	+*				+	+	+					T30	M
181	+	+*					+			+	+		VT	3b
182	+	+*					+			+	+		VT	3b
Espanha														
20	+	+*				+	+	+					T30	M
25	+	+				+	+	+					T30	M
Croácia														
440	+	+						+			+		T30+VT	2+M
441	+	+	+				+				+	+	T3 + VT	4
442	+	+	+										**	5
443	+		+				+				+	+	T3 + VT	2+4
444	+										+	+	T3 + VT	5+3a
445	+							+			+		T30+VT	2
446	+	+	+				+	+			+	+	T30+T3+VT	2+3a
Ilha da Madeira														
2	+	+*	+										**	5
8	+	+					+				+	+	T3 + VT	3a
13	+	+					+				+	+	T3 + VT	3a+3b
67	+	+	+									+	T3	3a+5
79	+											+	T3	3a
211	+	+	+				+				+	+	T3 + VT	3a+5
226	+	+					+			+	+		VT	3b
Ilha da Reunião														
124	+					+	+				+		VT	4+5
Marrocos														
398	+	+									+	+	T3 + VT	2+3a+3b
Misturas Artificiais														
199 (3a+5+M)	+	+	+			+	+	+			+	+	T30+T3+VT	3a+5+M
197 (3a+5+M)	+	+	+			+	+	+			+	+	T30+T3+VT	3a+5+M
206 (4+5+M)	+	+	+			+	+	+			+		T30+VT	4+5+M
204 (3a+M)	+	+				+	+	+			+	+	T30+T3+VT	3a+M

* Resultado positivo mas muito fraco.

** Não se conseguiu associar nenhum genótipo.



2.4 DISCUSSÃO

Neste estudo foi efetuada uma comparação entre dois sistemas de tipificação, a análise dos MMM de Hilf *et al.* (2005) e o ensaio de APET desenvolvido por Nolasco *et al.* (2009). Os isolados de CTV usados neste estudo já tinham sido previamente caracterizados por análise filogenética e sendo assim pretendeu-se verificar qual dos métodos revela melhor capacidade para a caracterização de isolados de CTV.

Hilf *et al.* (2005) propõem que os isolados de CTV sejam agrupados e que estejam associados a um genótipo específico baseado nos padrões obtidos pelos marcadores moleculares. Estes autores reconhecem a existência de 4 genótipos de CTV usando um conjunto de “primers” localizados na região 5’ do genoma de CTV, apesar desta região ser muito variável, com apenas cerca de 70% de identidade (Lopez *et al.*, 1998). Pelo contrário, Nolasco *et al.* (2009) desenvolveram o ensaio APET desenhando sondas na região correspondente ao gene da CP. A estrutura genética que existe no gene da CP pode ser extrapolada para toda a região terminal 3’ (ver discussão no capítulo 4), na qual se encontram os genes envolvidos na interação com o hospedeiro (Folimonova *et al.*, 2008). Isto sugere que o gene da CP poderá ser efetivamente usado para ensaios de tipificação, mesmo sem saber o local exato dos determinantes patogénicos.

A comparação dos dois sistemas mostrou que isolados pertencentes ao Gp3b correspondem ao genótipo VT e que isolados do GpM correspondem ao genótipo T30. No entanto, os resultados obtidos mostraram muitas incoerências entre os dois sistemas. O genótipo VT, além de corresponder ao grupo 3b também pode corresponder aos Gp2 e Gp4. Além disso, isolados pertencentes ao Gp4 correspondem quer ao genótipo VT quer ao genótipo T3. Verificou-se também estes dois genótipos se encontram associados na maioria dos casos quando um isolado é tipificado com o grupo 3a. Isolados do Gp5 não têm correspondência com o sistema proposto por Hilf, pois os isolados monofiléticos deste grupo não foram amplificados por nenhum dos marcadores. Devido à ausência de isolados do Gp1 na nossa coleção durante a realização destes ensaios, não foi possível tipificar isolados deste grupo. No entanto, poderá supor-se que este grupo é equivalente ao genótipo T36 pois também não houve amplificação por parte deste genótipo. Na seguinte tabela encontra-se a síntese das correspondências entre os dois métodos.

Tabela 2.4.1 - Correspondências entre os dois métodos de tipificação.

APET	MMM
Gp1*	T36*
GpM; Gp2	T30
Gp2; Gp3b; Gp4	VT
Gp3a; Gp4	VT + T3
Gp5	Sem correspondência

* Esta correspondência é apenas uma suposição pois nenhum dos isolados estudados foi caracterizado por este grupo/genótipo.

Um resultado curioso aconteceu com o marcador T36CP, que deveria comportar-se como um marcador não específico (Hilf *et al.*, 2005). Verificou-se que alguns dos isolados não amplificaram com este marcador (Figura 2.3.2), apesar de terem dado sinal positivo na amplificação com os “primers” CTV1/CTV10 (Figura 2.3.1). Ao comparar as sequências dos “primers” verifica-se que o “primer” T36CP-F tem mais 4 nucleótidos na extremidade 3’ do que o “primer” CTV1 e que o “primer” T36CP-R tem um nucleótido a menos na extremidade 5’ e 2 a mais na extremidade 3’ do que o “primer” CTV10. Numa análise *in silico* das sequências foi possível verificar que todos os “primers” se encontram em zonas homólogas a todos os grupos. No entanto, na prática, estas diferenças nucleotídicas dos “primers” podem ser determinantes para o sucesso ou fracasso da amplificação.

Tendo em conta os resultados obtidos, podemos assumir que o sistema proposto por Hilf *et al.* (2005) apresenta algumas limitações. O facto de alguns isolados não se associarem a nenhum dos genótipos sugere que possam existir mais genótipos além dos descritos pelos autores ou a existência de genomas recombinantes (Garnsey *et al.*, 2005; Hilf *et al.*, 2005). Além disso, estudos desenvolvidos por Roy *et al.* (2005) mostram que em isolados classificados como pertencentes ao genótipo T30, quando se obtêm e analisam as suas sequências nucleotídicas revelam uma semelhança com o genótipo VT. Sendo assim, a classificação de isolados baseado em MMM, sem a análise de sequências, pode levar a classificações erróneas não refletindo adequadamente quais os genótipos presentes no isolado. Por estes motivos, pela análise dos MMM torna-se difícil associar um sintoma a um determinado genótipo (Hilf *et al.*, 2005).

A tipificação efetuada por APET permitiu detetar todos os grupos que tinham sido previamente determinados por sequenciação. Nolasco *et al.* (2009) referem que por este método é possível detetar grupos filogenéticos para os quais não foram encontrados haplótipos por SSCP seguido de sequenciação (principalmente quando o número de clones por isolado analisados por SSCP era inferior a 10). Estes autores referem que



através da análise por APET é possível encontrar uma relação entre grupos filogenéticos e os sintomas, apesar da predição de que uma árvore irá apresentar um determinado sintoma ter que ser feita com cuidado, essencialmente na presença de misturas de isolados.

Do ponto de vista prático, o ensaio de APET pode ser tão automatizado como é um ensaio de ELISA, reduzindo o tempo e o trabalho de laboratório em comparação com o ensaio de MMM dependente da análise de géis de várias reações de PCR. Sendo assim, o APET é considerado uma ferramenta mais adequada para a caracterização de isolados e que pode ser útil na definição de uma estratégia adequada para o controlo da doença. Este método pode ser usado para tipificar qualquer espécie viral, como foi recentemente demonstrado na caracterização de isolados do vírus da videira associado ao enrolamento 3 (*Grapevine leafroll-associated virus 3 - GLRaV-3*) (Gouveia *et al.*, 2011).

CAPÍTULO 3

ESTUDO DA CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO DOS DIFERENTES GRUPOS FILOGENÉTICOS



3.1 INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a distribuição do vírus na planta assume uma elevada importância epidemiológica na medida em que poderá fornecer informações essenciais para a compreensão das características da transmissão e das causas de eventuais “genetic bottlenecks”. Bransky e Lee (1990) através de microscopia ótica e usando o corante Azure A tentaram, em diferentes hospedeiros, associar a severidade dos isolados com o número de células infetadas. Estes autores verificaram que, em laranja doce, os isolados severos formavam um maior número de aglomerados de células infetadas que os isolados suaves. No entanto esta associação não foi observada em hospedeiros de laranja azeda. Folimonova *et al.* (2008) recorrendo a um clone infeccioso de CTV também verificaram que o número de células infetadas aumentava de acordo com a suscetibilidade do hospedeiro.

Lin *et al.* (2000) descreveram um método de imuno-ensaio *in situ* (ISIA) que permite detetar diretamente CTV em tecidos de plantas infetadas com o auxílio de um microscópio ótico e sem recorrer a marcadores fluorescentes. Mais tarde, Lin *et al.* (2002) recorreram a este método para a identificar isolados considerados severos e suaves presentes em infeções mistas em árvores de toranja sob proteção cruzada.

Neste trabalho, pretendeu-se ilustrar as diferenças entre cada um dos 7 grupos filogenéticos descritos por Nolasco *et al.* (2009) estudando as características de colonização de cada grupo. Para tal, isolados monofiléticos previamente caracterizados e mantidos em hospedeiros de laranja doce foram usados num imuno-ensaio *in situ* baseado no método descrito por Lin *et al.* (2000). Este método permitiu detetar a presença da CP do vírus no floema das plantas infetadas e visualizar a distribuição dos aglomerados de células infetadas.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Isolados CTV

Foram usados isolados de CTV selecionados no âmbito de trabalhos anteriores e que eram constituídos apenas por uma variante de um dos 7 grupos filogenéticos. Estes isolados foram mantidos em laranja doce Madam Vinous em estufa protegida contra

insetos, na Universidade do Algarve ou no “Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari”, Itália.

3.2.2 Imuno-ensaio *in situ* (ISIA)

Pecíolos de plantas saudáveis e infetadas com CTV foram fixados com etanol a 70% durante 20 min. Após este tempo, foram lavados com água destilada durante 3 min. Seguidamente, os pecíolos foram colocados num suporte e envolvidos numa matriz (“Tissue Freezing Medium – Jung”, Leica) que permite efetuar cortes em crióstato. O suporte foi colocado no crióstato “CM3050 S” (Leica), mantido a uma temperatura de -28 °C, e orientado de modo a ser possível efetuar cortes transversais seriados. Foi definida uma grossura de corte de 35 µm.

Seguidamente, as secções foram fixadas a uma lâmina de microscópio, sobre a qual se dispôs uma pequena quantidade de Merckoglass (Merck) e incubadas com o anticorpo anti-CTV SP7 (1 mg/ml), obtido a partir da proteína da cápside recombinante expressa em *E. coli* (Sequeira e Nolasco, 2002), diluído 1:500 em PBS 1x, durante 2 h à temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS-Tween, as secções foram incubadas com uma solução de anticorpo anticoelho conjugado com a fosfatase alcalina (Sigma), diluído 1:1000 em PBS 1x, durante 2 h à temperatura ambiente. Seguidamente, lavaram-se as secções com TBS-Tween e adicionou-se o substrato NBT/BCIP durante aproximadamente 10 min. Finalmente, interrompeu-se a reação com água destilada e visualizaram-se as secções ao microscópio ótico com uma ampliação de 100X. O aparecimento de uma cor púrpura na zona do floema indica uma reação positiva.

3.3 RESULTADOS

Os isolados de CTV usados nos ensaios de ISIA foram os seguintes: Q3 (Gp1), 445 (Gp2), 8 (Gp3a), Q32 (Gp3b), Q57 (Gp4), 2 e 442 (ambos do Gp5) e 44 (GpM). Os resultados obtidos para cada um destes isolados encontram-se na Figura 3.3.1. Isolados dos grupos 1, 3a, 3b e 4 estão associados a sintomas severos. As reações de ISIA destes isolados mostram um grande número de aglomerados de células infetadas na zona do floema. O isolado do grupo 2 também apresentou vários aglomerados de células infetadas a circundar toda a zona do floema, apesar de isolados deste grupo serem considerados suaves.



Relativamente ao grupo 5, foram usados dois isolados, um associado a sintomas severos (isolado 2) e outro considerado suave (isolado 442), o que mostrou estar relacionado com a quantidade de aglomerados de células infetadas observadas: vários aglomerados para o isolado severo e menos de três para o suave.

O isolado 44 não provoca efeitos visíveis no hospedeiro sendo considerado suave. Da análise deste isolado verificou-se que as secções apresentavam no máximo 2 a 3 aglomerados de células infetadas por secção.

A planta não infetada com CTV, usada como controlo negativo da reação de ISIA (Figura 3.3.1), não apresentou indícios de aglomerados de células infetadas na região do floema, confirmando a inexistência de reações inespecíficas dos anticorpos que pudessem interferir na interpretação dos resultados.

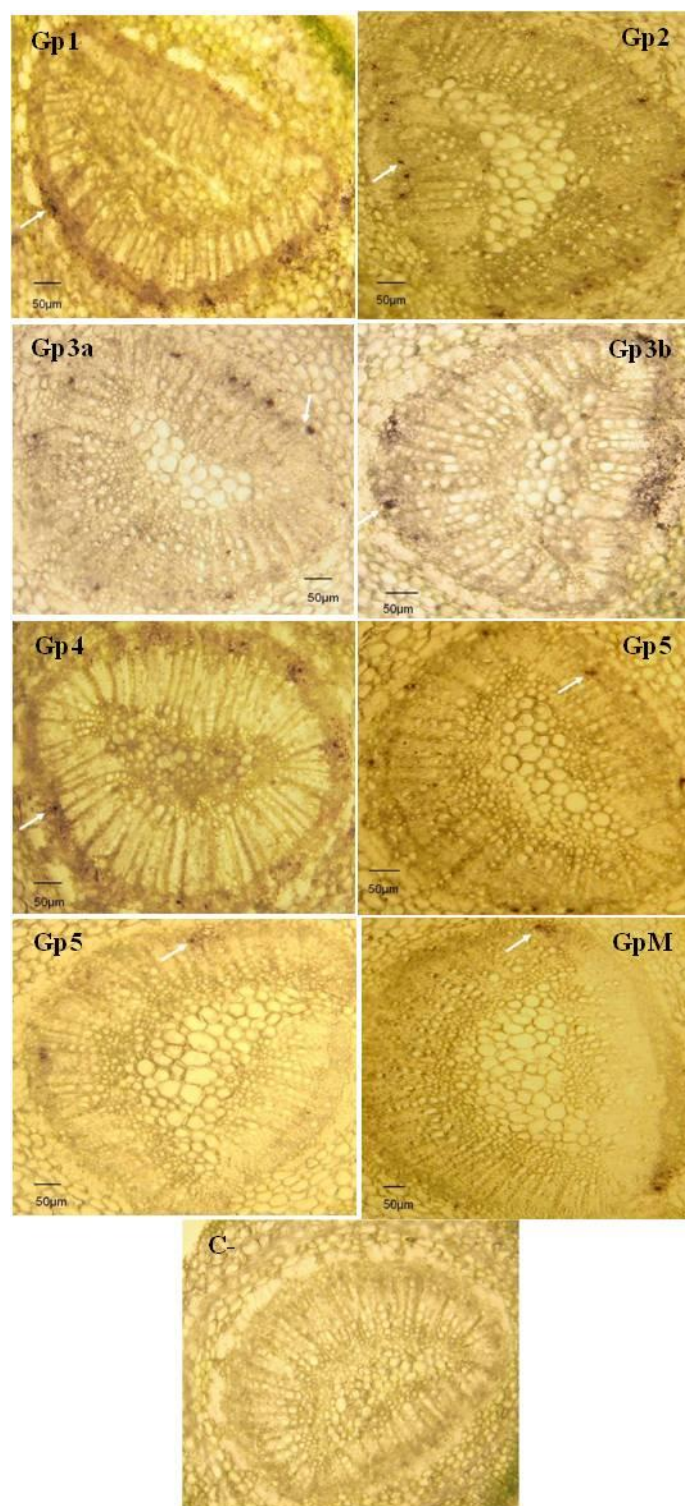


Figura 3.3.1 - Reações de ISIA em secções transversais de pecíolos de plantas infetadas ou livres de infecção com CTV. As setas indicam a presença de CTV na zona do floema. Os grupos severos (Gp1, Gp3a, Gp3b, Gp4) apresentam vários aglomerados de células infetadas ao passo que os isolados suaves (GpM) apresentam apenas 2 a 3 aglomerados de células infetadas. O Gp2 é considerado suave mas apresenta resultados semelhantes aos obtidos para isolados severos. As secções do Gp5 são de dois isolados com comportamentos distintos. As fotos foram tiradas com uma ampliação de 100X.



3.4 DISCUSSÃO

A simplicidade e a utilidade do imuno-ensaio *in situ* na detecção de CTV em tecidos de plantas infetadas já haviam sido demonstradas por outros autores (Lin *et al.*, 2000). Além disso, este método também permite determinar a distribuição do vírus no hospedeiro, que poderá estar relacionada com a transmissibilidade por afídeos.

Os resultados obtidos com os isolados do grupo M mostraram que os aglomerados se encontram em pouca quantidade e por isso a sua distribuição no floema é mais pontual, ao contrário do que acontece com o isolado 8 (grupo 3a), onde a distribuição de células infetadas com CTV abrange praticamente toda a zona do floema. Estes resultados mostram claramente uma diferença nas características de colonização entre os isolados dos grupos M e 3a, ou seja entre isolados considerados suaves e severos, respetivamente.

Brlansky e Lee (1990) estudaram diferentes hospedeiros infetados por cinco isolados de CTV (T3, T36, T4, T30 e T26) para verificar se havia alguma associação entre a severidade dos isolados e o número de células infetadas. De acordo com o sistema de classificação definido por Nolasco *et al.* (2009) e os dados obtidos por Pappu *et al.* (1993) o isolado T3 pertence ao grupo 4, o isolado T36 pertence ao grupo 1 e os isolados T4, T30 e T26 pertencem ao grupo M. Apesar de em laranja azeda não ter sido possível associar a severidade do isolado com o número de células infetadas, Brlansky e Lee (1990) verificaram essa associação em laranja doce, pois os isolados severos (T3 e T36) formavam um maior número de aglomerados de células infetadas que os isolados suaves (T4, T26 e T30). Como o hospedeiro usado no presente trabalho foi laranja doce podemos considerar que os resultados obtidos neste trabalho veem de encontro aos obtidos por Brlansky e Lee (1990). No entanto, no estudo efetuado por estes autores não há referência se os isolados usados eram monofiléticos, isto é, constituídos apenas por um grupo filogenético, o que poderá resultar em dificuldades de interpretação dos resultados.

O isolado 445, constituído por um isolado do grupo 2, apresenta um resultado contraditório, na medida em que é considerado isolado suave mas as secções mostram um comportamento semelhante ao obtido para o isolado 8, constituído por um isolado severo. Estes resultados podem não ser conclusivos, na medida em que o grupo 2 é o que apresenta maior diversidade ao nível do gene da CP (Nolasco *et al.*, 2009) e deste modo é necessária uma maior caracterização biológica de isolados constituídos por este

grupo. Relativamente ao grupo 5, os resultados obtidos neste trabalho mostram 2 isolados com comportamentos distintos, pois apesar de isolados deste grupo estarem associados a sintomas severos, já foram identificados isolados suaves associados a este grupo (Nolasco *et al.*, 2009).

Folimonova *et al.* (2008) estudaram a distribuição de CTV em diferentes hospedeiros. Usando um clone infeccioso derivado do isolado severo T36 (grupo 1), estes autores observaram que em hospedeiros mais suscetíveis (limeira mexicana) o número de aglomerados de células infetadas era superior em relação ao encontrado em hospedeiros menos suscetíveis (laranjeira azeda), nos quais a infeção era limitada a células individuais. Os resultados de ISIA neste trabalho, completam o estudo efetuados por Folimonova *et al.* (2008), na medida em que usando um único hospedeiro (laranjeira doce), que é um hospedeiro com uma suscetibilidade moderada à infeção, foi mostrado que o padrão de distribuição dos aglomerados de células infetadas depende também do grupo filogenético do isolado e poderá estar relacionado com a severidade do mesmo, como aconteceu com os isolados dos grupos M e 3a.

Tendo em conta estes resultados e como sugerido por d'Urso *et al.* (2000), pode-se especular que a distribuição não uniforme do vírus na planta pode originar efeitos de “genetic bottleneck” aquando da transmissão por afídeos. Este efeito foi comprovado por Nolasco *et al.* (2008) que mostraram a ocorrência de eventos de “bottleneck” aquando da transmissão de CTV por *T. citricida* comparando a diversidade nucleotídica do gene da CP de variantes genéticas presentes nas árvores infetadas com as variantes genéticas obtidas de afídeos individuais.

CAPÍTULO 4

VARIABILIDADE GENÉTICA E EVENTOS DE RECOMBINAÇÃO NA REGIÃO 3' TERMINAL DO GENOMA DE CTV



4.1 INTRODUÇÃO

A enorme diversidade de vírus de RNA resulta da combinação de vários fatores evolutivos, nomeadamente mutações pontuais, devido à ausência de atividade corretora de erros da RNA polimerase RNA dependente (RdRp), e recombinação, essencialmente devida a um processo em que a RdRp troca de cadeia molde durante a síntese de RNA (um mecanismo conhecido por “copy-choice”). Ambos os processos contribuem para a evolução dos vírus, permitindo a sua adaptação a novos ambientes. No caso do CTV, que provoca uma infeção persistente na planta hospedeira, um único hospedeiro pode, ao longo do tempo, ficar infetado com mais do que um haplótipo de CTV. É concebível que esta coabitação de múltiplos haplótipos de CTV possa originar efeitos de recombinação. Sendo assim, estudos acerca de infeções múltiplas são essenciais para perceber e monitorizar os efeitos de recombinação na evolução dos vírus.

A existência de recombinação em isolados de CTV tem sido sugerida por diversos autores (Martin *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2001; Vives *et al.*, 2005). Estes autores consideram que a recombinação pode ter efeitos positivos na população viral, na medida em que, além de contribuir para um aumento da variabilidade genética e da adaptabilidade, também funciona como um mecanismo compensador da acumulação de mutações prejudiciais ao equilíbrio da população.

Nolasco *et al.* (2009) estudaram a variabilidade do gene da principal proteína da cápside (CP) de isolados CTV de diferentes origens. Através de análise filogenética mostraram a existência de 7 grupos filogenéticos (Gp1, Gp2, Gp3a, Gp3b, Gp4, Gp5 e GpM), que se podem relacionar com os sintomas que provocam no hospedeiro.

De modo a obter um conhecimento mais profundo acerca da epidemiologia e de aspetos evolutivos de CTV, neste trabalho, foi analisada a região genómica entre o início do gene da CP e o fim do gene da p23 (numa extensão de aproximadamente 3000 nucleotídeos (nt)) de diversos isolados, contendo apenas um haplótipo ou uma mistura de haplótipos, com o objetivo de verificar se a estrutura de grupos obtida para a CP se mantém ao longo de toda a região terminal 3'. O estudo desta parte do genoma assume elevada importância na medida em que é nesta região que se encontram os genes relacionados com a interação com o hospedeiro (Folimonova *et al.*, 2008). Marques (2003), utilizando isolados de alguns grupos, analisou os genes desta região individualmente e verificou que, para cada gene, os isolados se distribuem por grupos que se aproximam aos que ocorrem na CP. Contudo, no trabalho desenvolvido por

Marques (2003), por os genes terem sido obtidos isoladamente, não há possibilidade, principalmente em misturas de haplótipos do vírus, de atribuir inequivocamente uma dada sequência de um gene a uma dada do vírus, inviabilizando ilações acerca de recombinação se esta ocorrer em regiões intergênicas. Para ultrapassar essa limitação, neste trabalho, teve-se o cuidado de basear a sequenciação em fragmentos genômicos sobreponíveis de modo a poder identificar o haplótipo a que pertencem. Dado o melhor conhecimento atualmente existente sobre a diversidade do vírus, estudaram-se haplótipos pertencentes a cada um dos 7 grupos filogenéticos.

Para se investigar a ocorrência de eventos de recombinação entre os haplótipos foram, nalguns casos, utilizados isolados contendo misturas de haplótipos (identificados previamente) e mantidos há mais de 12 anos em plantas de laranja doce Madam Vinous.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal

Neste estudo foram usados isolados CTV provenientes de diversas origens geográficas e que apresentam diferentes características biológicas. Estes isolados, constituídos apenas por um haplótipo ou por misturas de haplótipos (alguns artificialmente obtidos), foram mantidos em laranja doce Madam Vinous em estufa protegida contra insetos, na Universidade do Algarve ou no “Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari”, Itália (prefixo Q) (Tabela 4.2.1).



Tabela 4.2.1 - Composição e origem dos isolados CTV.

Isolado	Coinoculação	Origem	Data de Inoculação	Grupo Filogenético*
124	-----	Ilha de Reunião		Gp4 e Gp5
199	Isolado 25 e	Isolado 25: Espanha	1997	Isolado 25: GpM
	Isolado 15	Isolado 15: Ilha da Madeira		Isolado 15: Gp3a + Gp5
201	Isolado 25 e	Isolado 25: Espanha	1997	Isolado 25: GpM
	Isolado 8	Isolado 8: Ilha da Madeira		Isolado 8: Gp3a
206	Isolado 25 e	Isolado 25: Espanha	1997	Isolado 25: GpM
	Isolado 125	Isolado 125: Ilha de Reunião		Isolado 125: Gp4 + Gp5
440	-----	Croácia		Gp2
Q3	-----	Albânia		Gp1
Q32	-----	Portugal		Gp3b
Q57	-----	Egito		Gp4

* De acordo com a tipagem baseada na CP (Nolasco *et al.*, 2009)

4.2.2 Síntese de cDNA e Amplificação por PCR

Para cada um dos isolados, obtiveram-se fragmentos cobrindo toda a região genómica compreendida entre a CP e a p23, numa extensão de cerca de 3000 nt. Para tal, o RNA total foi extraído usando o kit “RNAeasy plant mini kit” (Quiagen), servindo de molde para a síntese de cDNA usando uma mistura de “primers” aleatórios de 6 mer (Roche). Posteriormente, esta região foi coberta com amplificações por PCR usando os “primers” referidos na Tabela 4.2.2. Os “primers” foram desenhados em trabalhos anteriores onde se verificou permitirem a amplificação de haplótipos de todos os grupos filogenéticos. Para cada uma das regiões, as reações de amplificação foram feitas num volume final de 50 µL contendo 2,5 mM de MgCl₂ (Fermentas), 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada um dos “primers” (Tabela 4.2.2) e 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) e respetivo tampão. Os ciclos de temperatura aplicados foram os seguintes: 94 °C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de 92 °C durante 30 s, 52 °C durante 60 s e 72 °C durante 60 s, com uma incubação final de 72 °C durante 10 min.

Tabela 4.2.2 – “Primers” usados na amplificação das várias regiões genômicas de CTV.

Região Genômica	Tamanho do fragmento (bp)	Nome do “Primer”	Sequencia dos “Primers” (5’ – 3’)	Localização no genoma (bp)*
p25 - p18	1169	CTV1 (“Primer Forward”)	ATGGACGACGAAACAAAGAA	16155
		CTV34 (“Primer Reverse”)	GCATTGAATCCGAACAG	17307
p18 - p13	926	CTV33 (“Primer Forward”)	GGCTGATGATGTCGTAGT	16769
		DCN16 (“Primer Reverse”)	<u>AGATCTCTAGTTATCGCAAGGTAAG</u>	17670
p13 - p20	997	CTV36 (“Primer Forward”)	TTCAATTGCTGCAAT	17316
		CN183 (“Primer Reverse”)	CTACACGCAAGATGGAGAG	18294
p20 - p23	1279	CN182 (“Primer Forward”)	<u>AAGCTTCTAGAACCATGCGAGCTTACTTTAGTG</u>	17764
		CTV28 (“Primer Reverse”)	CTTATTCCGTCCTCACTCAA	19024
p18 - p20	1544	CTV33 (“Primer Forward”)	GGCTGATGATGTCGTAGT	16769
		CN183 (“Primer Reverse”)	CTACACGCAAGATGGAGAG	18294

*Relativamente à referência do Genbank NC001661 (isolado T36).

4.2.3 Clonagem e Análise por SSCP

Após a obtenção dos fragmentos correspondentes a cada uma das regiões genômicas amplificadas, procedeu-se à clonagem desses fragmentos no vetor pTZ57R/T (Fermentas, ref. K1214) pelo sistema “TA Cloning”. Foram selecionados 10 clones por isolado em cada uma das regiões genômicas, os quais foram amplificados por PCR, usando as condições acima descritas, de modo a confirmar a presença do respectivo fragmento.

Posteriormente, efetuou-se a análise por polimorfismos conformacionais de cadeia simples (“Single Strand Conformation Polymorphism” - SSCP) dos fragmentos clonados, de modo a avaliar a diversidade genética em cada isolado. Para tal, adicionou-se solução desnaturante de formamida (95% Formamida, 20 mM EDTA pH 8, 0,05% Azul de Bromofenol) a 1-3 µL de produto PCR de modo a perfazer 10 µL. Desnaturou-se a solução a 90 °C durante 5 min e colocaram-se as amostras em gelo. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% não desnaturante em TBE durante 3 h a 4 °C e a 200 V. As bandas de DNA foram visualizadas através da coloração por nitrato de prata. Os haplótipos representativos de cada padrão de SSCP foram selecionados e sequenciados.

4.2.4 Análise de Sequências Nucleotídicas e Filogenia

A sequência nucleotídica dos clones selecionados foi determinada em ambas as direções tendo sido realizada na empresa Macrogen (Seoul, Coreia do Sul).

A análise e o alinhamento das sequências foram efetuados com o software BioEdit (Hall, 1999) e Vector NTI Advance 11 (Invitrogen). As diversas sequências obtidas para cada região genômica de cada isolado, permitiram formar “contigs” que representam uma região com aproximadamente 3000 nucleótidos entre a CP e a p23 (Figura 4.3.2). Estas sequências foram usadas para determinar a diversidade genética (d) ao longo da região em análise. Para tal, foram usados segmentos sucessivos de 100 bases com uma extensão de sobreposição de 50 bases. Este cálculo foi efetuado utilizando o modelo de substituição nucleotídica “Kimura 2 parameters” disponível no software MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007).

Sequências completas de isolados de CTV foram retiradas do GenBank e usadas para comparação: T36 (NC001661), Qaha (AY340974), NUagA (AB046398), SY568 (AF001623), T318A (DQ151548), VT (U56902), T30 (AF260651), T385 (Y18420), B165 (EU076073), B301 (JF957196), HA16-5 (GQ454870), HA18-9 (GQ454869), NZ-M16 (EU857538) e NZ-B18 (FJ525435).

As análises filogenéticas foram efetuadas com o software MEGA 4, com o qual se construíram árvores filogenéticas através do método “Neighbour-Joining” deduzido a partir da matriz de distâncias obtidas pelo modelo de “Kimura 2 parameters”. Os valores de diversidade de substituições sinónimas (d_S) e não sinónimas (d_N) foram calculados usando o método de Nei-Gojobori (implementado no software MEGA 4). Para a detecção de codões que estão sob seleção positiva ou negativa, foi usado o método da máxima verosimilhança desenvolvido através do software FEL (Fixed Effects Likelihood) (Pond e Frost, 2005) disponível no servidor Datamonkey (<http://www.datamonkey.org>). Foram também criados gráficos de similaridade nucleotídica entre as sequências dos diversos isolados com o software Simplot (Lole *et al.*, 1999). O estudo de recombinação entre as sequências foi feito com o software RDP3 (Martin *et al.*, 2010), que incorpora diversos algoritmos de detecção de recombinação, e com o programa GARD (Pond *et al.*, 2006) usando o modelo de substituição HKY85 disponível no servidor Datamonkey.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Diversidade Genética da População de CTV

A análise de SSCP foi efetuada de modo a avaliar a estrutura da população de CTV nas diferentes regiões genômicas analisadas. A Figura 4.3.1 exemplifica o resultado de SSCP obtido para dois isolados CTV: isolado 206, contendo mistura de haplótipos, e isolado Q3, constituído apenas por um haplótipo.

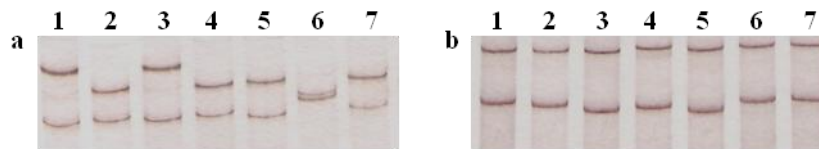


Figura 4.3.1 – (a) Padrão de SSCP obtido para a região p20+p23 do isolado 206, constituído por misturas de haplótipos; (b) Padrão de SSCP obtido para a região p18+p13 do isolado monofilético Q3.

A análise SSCP do isolado 206 (Figura 4.3.1a) permite observar 3 padrões de SSCP diferentes que correspondem a cada um dos haplótipos que constituem o isolado 206 (Tabela 4.2.1). Os resultados de SSCP para os isolados com misturas de haplótipos permitiram separar os haplótipos existentes e deste modo obter sequências de cada um dos haplótipo em cada região. Na Figura 4.3.1b, os padrões de SSCP são todos semelhantes o que confirma a natureza monofilética do isolado Q3. É de notar que os padrões não são exatamente iguais. Contudo, por experiência, sabia-se *a priori* que pequenas variações como as que estão patentes na Figura 4.3.1b não correspondem a haplótipos de grupos diferentes. Um resultado semelhante foi obtido para os restantes isolados constituídos apenas por um haplótipo. A título de exemplo, para o isolado 206 foram empregues para sequenciar os clones correspondentes aos padrões 1, 2 e 6 e para o isolado Q3 os padrões 1 e 3.

A amplificação das regiões genômicas dos diferentes isolados de CTV permitiu obter sequências com aproximadamente 3000 nt correspondentes à parte terminal 3' do genoma, compreendidas entre a CP e a p23. A Figura 4.3.2 exemplifica um “contig” obtido do isolado Q3, feito a partir das diversas sequências obtidas para cada uma das regiões genômicas.

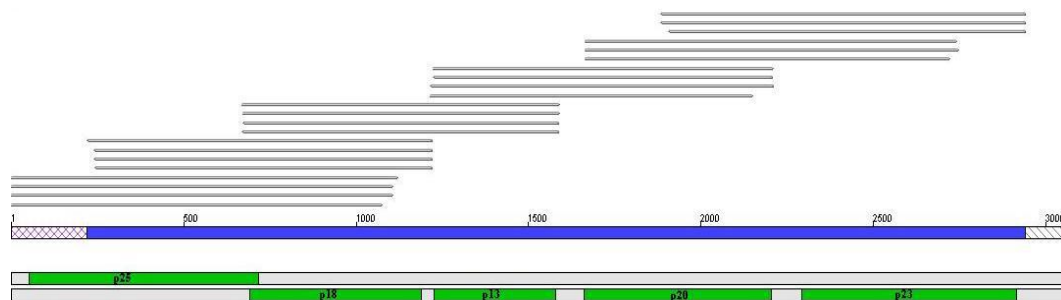


Figura 4.3.2 – “Contig” do isolado Q3, mostrando as sequências obtidas para cada região genômica a partir das quais se construiu o “contig” (linha azul) e a localização das ORFs (segmentos a verde) ao longo da sequência. No final obteve-se uma sequência com aproximadamente 3000 nt entre a CP e a p23.

Para todos os isolados, obtiveram-se “contigs” bem definidos. No caso de isolados compostos por misturas de haplótipos pertencentes a diferentes grupos filogenéticos, as longas regiões de sobreposição dos fragmentos amplificados permitiram inequivocamente identificar e justapôr as sequências correspondentes a cada haplótipo. As sequências entre a CP e p23 de cada haplótipo foram alinhadas juntamente com as sequências usadas como referência tendo-se construído um dendrograma baseado nas distâncias nucleotídicas. O resultado encontra-se na Figura 4.3.3.

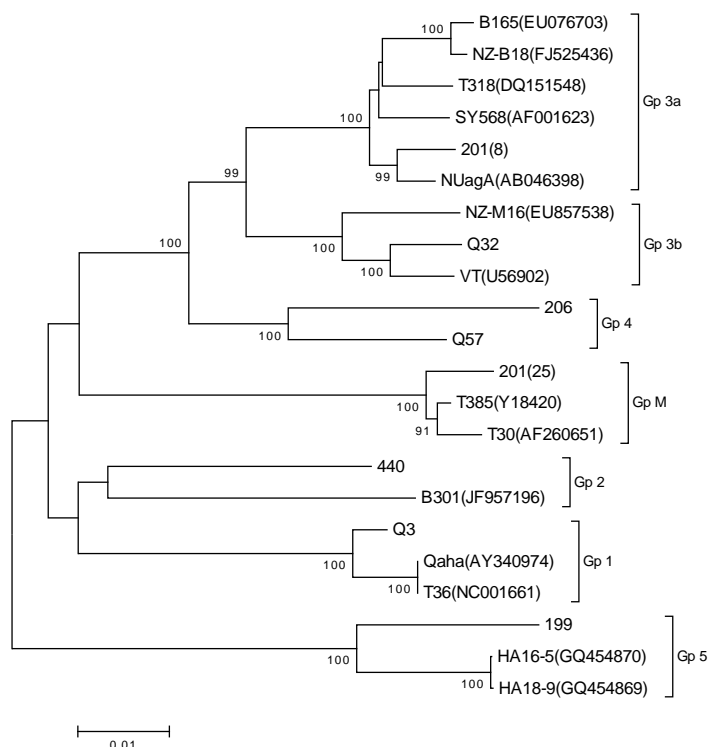


Figura 4.3.3 – Dendrograma da região genômica entre a CP e p23 baseado nas distâncias nucleotídicas entre as sequências. O método utilizado foi o de “Neighbour-Joining” deduzido a partir da matriz de distâncias obtida com base no modelo de “Kimura 2 parameters”. As sequências dos grupos 3a e M foram ambas obtidas do isolado 201.

Pela análise do dendrograma da Figura 4.3.3 verifica-se que os haplótipos se agrupam de modo a constituir os 7 grupos filogenéticos existentes para a CP, perfeitamente resolvidos entre si e com valores de bootstrap acima dos 90% nos nodos principais.

Em cada grupo filogenético foi possível sequenciar completamente (CP - p23) pelo menos um haplótipo. À exceção dos haplótipos pertencentes ao grupo 4, para os quais não se encontra no GenBank qualquer sequência completa correspondente a este grupo, todos os haplótipos pertencentes aos restantes grupos filogenéticos agrupam com sequências existentes no GenBank.

As sequências obtidas para cada um dos sete grupos filogenéticos foram usadas para estimar a diversidade genética (d) ao longo de toda a região terminal 3' (Figura 4.3.4).

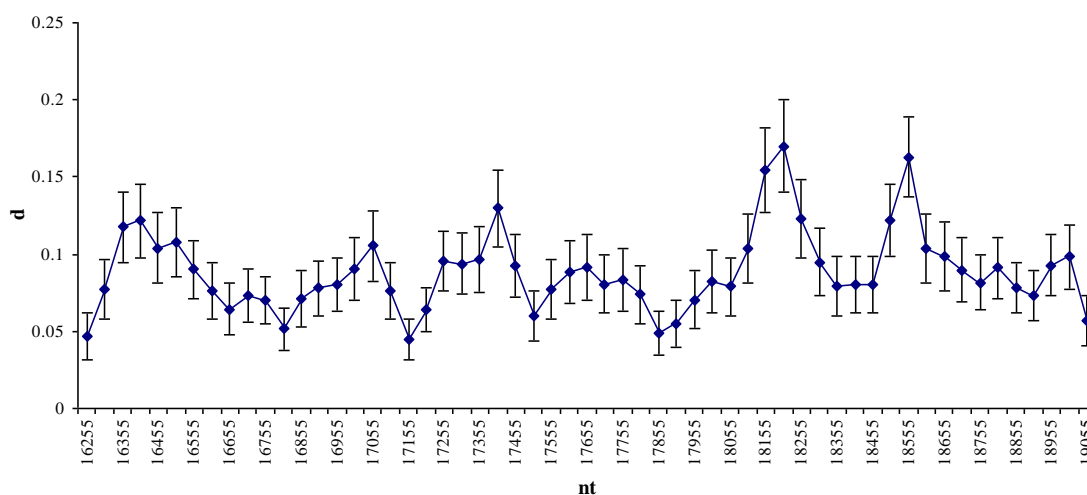


Figura 4.3.4 – Diversidade média dos haplótipos dos 7 grupos filogenéticos ao longo da região terminal 3', entre a CP e p23. Foram usadas janelas de 100 bp com uma extensão de sobreposição de 50 bp. As barras representam o desvio padrão.

No geral, a diversidade média é aproximadamente constante ao longo da região analisada, verificando-se apenas dois picos, aproximadamente nas posições 18205 e 18555, em regiões pertencentes aos genes da p20 e p23, respetivamente.

4.3.2 Variabilidade genética nos 5 genes que compõem a região terminal 3'

De modo a estudar a variabilidade e estimar o nível das pressões seletivas nos 5 genes abrangidos neste estudo, foram determinados os valores médios de diversidade de substituições sinónimas (d_S) e não sinónimas (d_N) para cada gene separadamente. Para esta análise, além das sequências de referência retiradas do GenBank e das obtidas anteriormente, foram incluídas cerca de 30 sequências obtidas de 17 isolados (obtidas por Marques (2003) e em outros trabalhos). Os resultados encontram-se na Tabela 4.3.1.



Tabela 4.3.1 - Valores de diversidade nucleotídica (d) e de diversidade de substituição sinónimas (d_S) e não sinónimas (d_N) para os 5 genes da parte 3' terminal do genoma viral.

Gene	Diversidade Média (d)	$d_S \pm$ Erro Padrão	$d_N \pm$ Erro Padrão	d_N / d_S	Número de codões sob seleção positiva*	Número de codões sob seleção negativa*
CP (223 codões)	0,065 \pm 0,006	0,214 \pm 0,017	0,015 \pm 0,003	0,070	2 (0,90%)	50 (22,4%)
p18 (167 codões)	0,073 \pm 0,007	0,202 \pm 0,020	0,028 \pm 0,004	0,139	1 (0,60%)	40 (23,9%)
p13 (119 codões)	0,088 \pm 0,010	0,228 \pm 0,027	0,038 \pm 0,007	0,167	1 (0,84%)	24 (20,2%)
p20 (182 codões)	0,073 \pm 0,007	0,231 \pm 0,021	0,020 \pm 0,004	0,087	0	46 (25,3%)
p23 (209 codões)	0,082 \pm 0,007	0,199 \pm 0,019	0,038 \pm 0,005	0,191	3 (1,43%)	41 (19,6%)

*Os codões sob seleção positiva ou negativa foram estimados usando o método FEL.

O valor de d_S é muito semelhante nos 5 genes analisados. Por sua vez, o valor de d_N é inferior ao de d_S e é mais variável. Pelos valores obtidos a partir da razão entre d_N / d_S , verifica-se uma pressão de seleção negativa em todos os genes. Pela Tabela 4.3.1, verifica-se também que a diversidade nucleotídica média nos 5 genes é muito semelhante.

4.3.3 Pesquisa de Eventos de Recombinação

Para pesquisar a ocorrência de recombinação, as sequências dos isolados de CTV obtidas neste trabalho (Q3, Q32, Q57, 199, 201(8), 201(25), 206 e 440) foram numa primeira fase analisadas com o software Simplot (Lole *et al.*, 1999) que permite avaliar a similaridade nucleotídica entre um haplótipo e os restantes ao longo do genoma. A Figura 4.3.5 mostra uma comparação entre a sequência do isolado Q3 (Gp 1, monofilético) e os haplótipos pertencentes aos restantes grupos filogenéticos: 440 (Gp 2), 201(8) (Gp 3a), Q32 (Gp 3b), Q57 e 206 (Gp 4), 199 (Gp 5) e 201(25) (Gp M). Como se pode observar pela figura, a similaridade é relativamente constante, entre 82% e 98%, ao longo de toda a região genómica entre a CP e p23, não havendo variações bruscas que indiquem ocorrência de recombinação entre as sequências. De referir que o resultado obtido no gráfico da Figura 4.3.5, onde se compara a similaridade entre o Gp 1 e os restantes grupos, é semelhante às análises feitas com os grupos Gp 2, Gp 3a, Gp 5 e Gp M (resultados não mostrados).

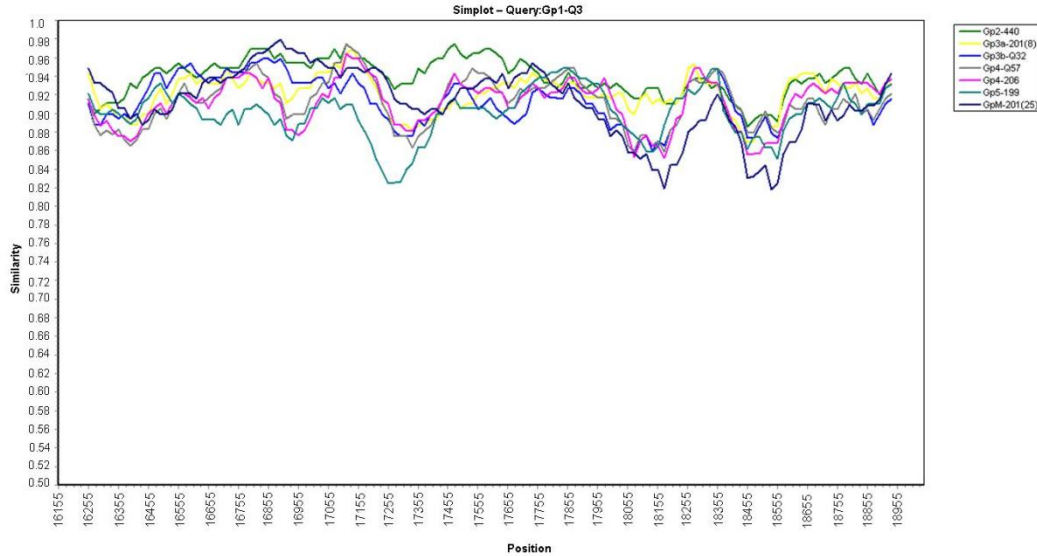


Figura 4.3.5 – Gráfico de similaridade nucleotídica entre haplótipos de CTV pertencentes a cada um dos 7 grupos filogenéticos na região terminal 3'. Neste caso, é comparada a similaridade entre Q3 (Gp 1) e haplótipos dos restantes grupos.

Relativamente à análise dos grupos 3b e 4, os gráficos de similaridade nucleotídica apresentam duas partes distintas. Através do gráfico da Figura 4.3.6, que mostra uma comparação entre os dois haplótipos do grupo 4 (Q57 e 206) e o haplótipo Q32 pertencente ao grupo 3b, verifica-se que, aproximadamente até ao nucleótido 17755, o haplótipo Q57 apresenta uma similaridade superior com o haplótipo 206, da ordem dos 96% a 98% enquanto que a similaridade entre Q57 e Q32 ronda os 90% a 92%. No entanto, a partir dessa região, correspondente ao final da região intergénica entre p13 e p20, há um acréscimo acentuado da similaridade com Q32, que se torna próxima dos 100% nas regiões a jusante, p20 e p23.

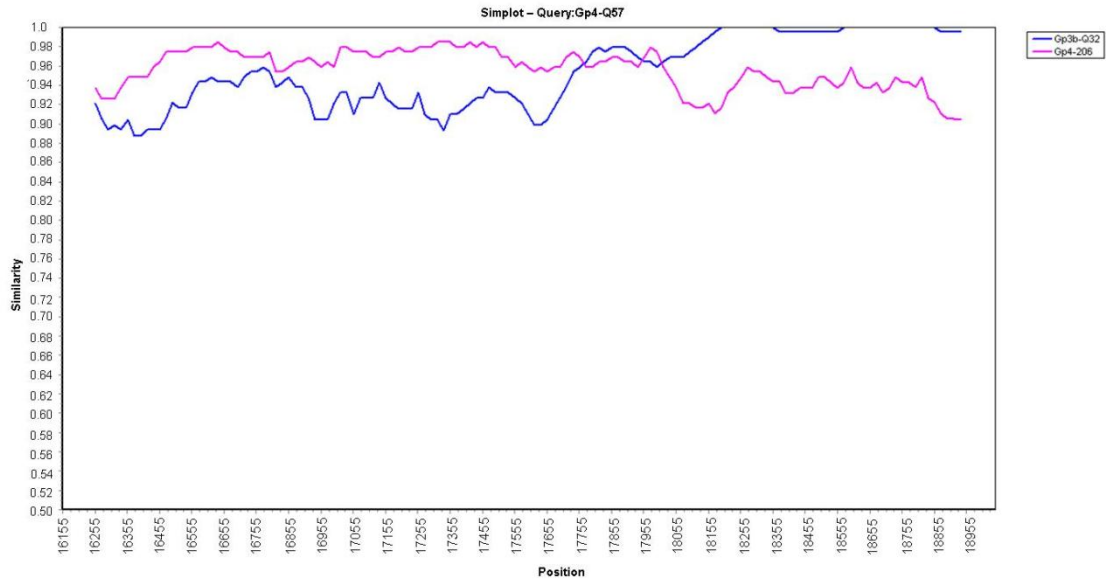


Figura 4.3.6 – Gráfico de similaridade nucleotídica entre o haplótipo Q57 (Gp 4) e os haplótipos 206 (Gp4) e Q32 (Gp 3b) na região terminal 3'.

De facto, ao analisar-se as relações filogenéticas entre os vários haplótipos CTV para cada um dos genes individualmente (Figura 4.3.7), constata-se que o haplótipo Q57 (Gp 4) nas regiões correspondentes à CP, p18 e p13 agrupa com o haplótipo 206 formando um grupo claramente distinto dos restantes com valores de bootstrap acima dos 95%, sendo que, nos genes da p20 e p23, o haplótipo Q57 passa definitivamente a pertencer ao grupo 3b, afastando-se do haplótipo 206.

Os haplótipos dos restantes grupos filogenéticos mantêm a sua posição relativa nos 5 genes compreendidos entre a CP e a p23.

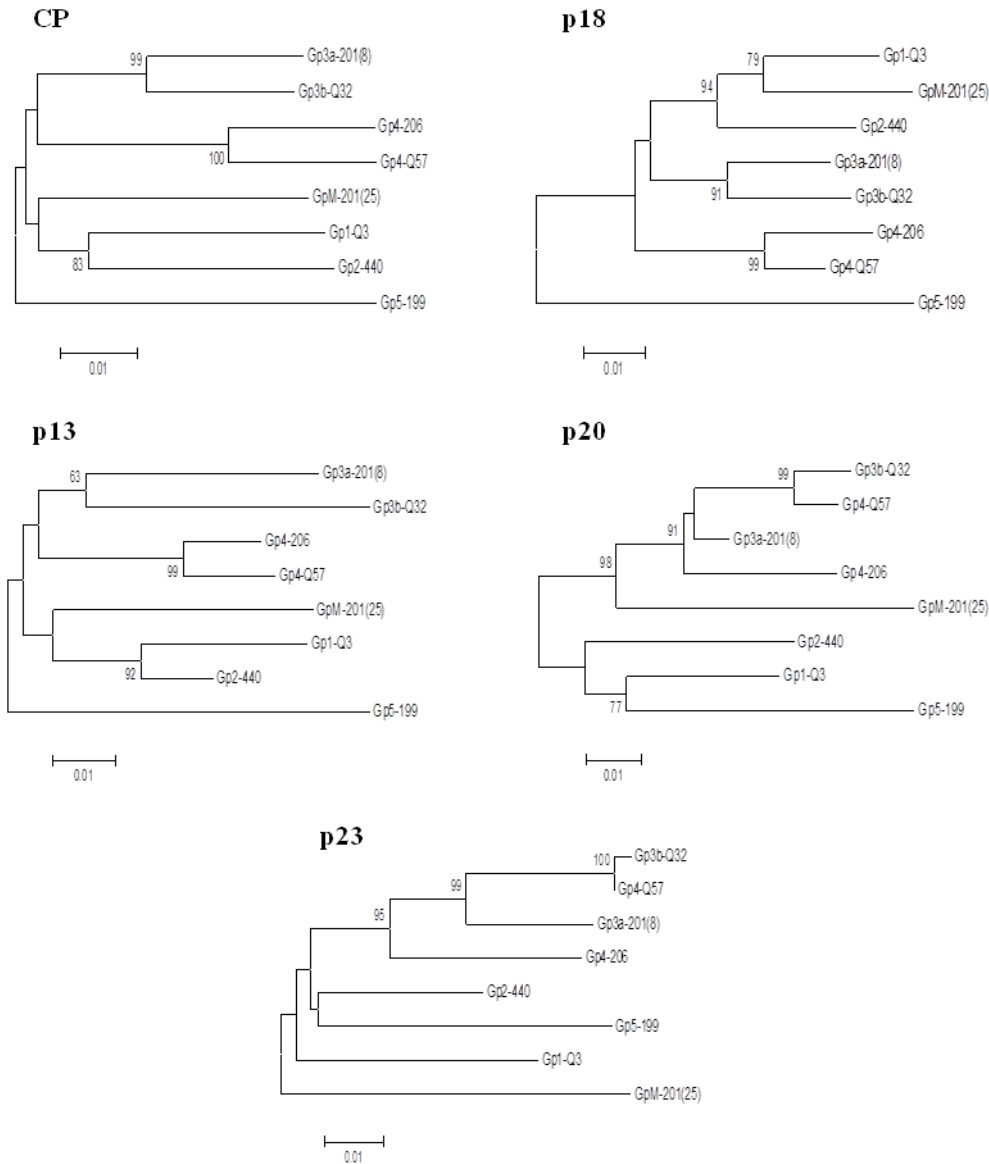


Figura 4.3.7 - Dendrogramas dos 5 genes que compõem a região terminal 3', baseado nas distâncias nucleotídicas das sequências. O método utilizado foi o de “Neighbour-Joining” deduzido a partir da matriz de distancias obtida com base no modelo de “Kimura 2 parameters”.

A alteração da posição filogenética de Q57 do grupo 4 para o grupo 3b poderá indicar a ocorrência de recombinação. Esta foi também pesquisada com o software RDP3, que permite identificar possíveis recombinantes a partir dum conjunto de sequências através da implementação de vários métodos de detecção de recombinação (Martin *et al.*, 2010).



Figura 4.3.8 - Detecção de recombinação no isolado Q57 (Gp4) numa análise de bootscan gerada pelo programa RDP3.

Usando os parâmetros de configuração padrão dos diferentes métodos, a análise das sequências dos diversos isolados apenas detetou um evento de recombinação significativo, na medida em que é detetado por todos os métodos com um valor de p muito inferior a 0,001. A Figura 4.3.8 mostra o gráfico representativo da análise bootscan, onde se verifica que a sequência de Q57 é uma possível recombinante entre sequências dos grupos 4 e 3b (semelhantes às dos haplótipos 206 e Q32 usadas nesta análise). O local onde ocorre a eventual recombinação corresponde ao final da região intergênica entre p13 e p20 (a mudança ocorre aproximadamente no nucleótido 17755). Este resultado comprova o resultado obtido na análise filogenética da Figura 4.3.7, na qual se observa uma alteração da posição filogenética do isolado Q57 entre as regiões p13 e p20.

O mesmo conjunto de sequências foi analisado com o programa GARD (implementado no servidor Datamonkey). Este programa permite identificar possíveis locais de recombinação ao longo de todo o alinhamento, procurando incongruências filogenéticas (isto é, alterações na topologia da árvore) ao longo da região em estudo.

Foram detetados 3 locais possíveis de ocorrer recombinação, permitindo definir quatro segmentos, cada um constituído por uma árvore filogenética diferente (resultados não mostrados). Os segmentos são: de 16155 nt até 17589 nt, de 17590 nt até 18075 nt, de 18076 nt até 18246 nt e de 18247 nt até 19043 nt. Ao analisar as árvores filogenéticas produzidas em cada segmento verificou-se que, no primeiro segmento a árvore filogenética é muito semelhante à da Figura 4.3.3. No entanto, a partir do segundo segmento (de 17590 nt até 18075 nt) há uma alteração na topologia das árvores, na medida em que o haplótipo Q57 se aproxima consideravelmente dos isolados Q32 e VT,

correspondentes ao grupo 3b, distanciando-se do haplótipo 206. Nos 2 segmentos finais, o isolado Q57 agrupa definitivamente com o grupo 3b.

O segmento definido entre os nucleótidos 17590 e 18075 abrange as regiões da p13 e da p20, o que permite presumir que o possível local de recombinação ocorra na região intergênica entre estes 2 genes, corroborando os resultados obtidos nos métodos anteriores.

É de notar que o evento de recombinação encontrado ocorre num isolado monofilético e, portanto, será derivado de um evento antigo (desapareceram as cadeias parentais no isolado em estudo).

4.3.4 Análise de Recombinação em isolados contendo misturas de haplótipos

Seguidamente, teve-se como objetivo a pesquisa de ocorrência de recombinação em isolados contendo misturas de haplótipos (Figura 4.3.9). O isolado 124 (Tabela 4.2.1) é constituído por uma mistura natural de haplótipos dos grupos 4 e 5. Pretendeu-se estudar a ocorrência de recombinação na região compreendida entre a p13 e a p20 e, para tal, procedeu-se à amplificação por PCR desta região usando os “primers” da Tabela 4.2.2. Após a obtenção de diversos clones, as respetivas sequências nucleotídicas foram determinadas e analisadas. Constatou-se que algumas destas sequências apresentavam uma similaridade nucleotídica superior com o grupo 5 até aproximadamente ao nucleótido 17742 (final da região intergênica entre p13 e p20), sendo a partir desse local, mais semelhante ao grupo 4 (Figura 4.3.9).

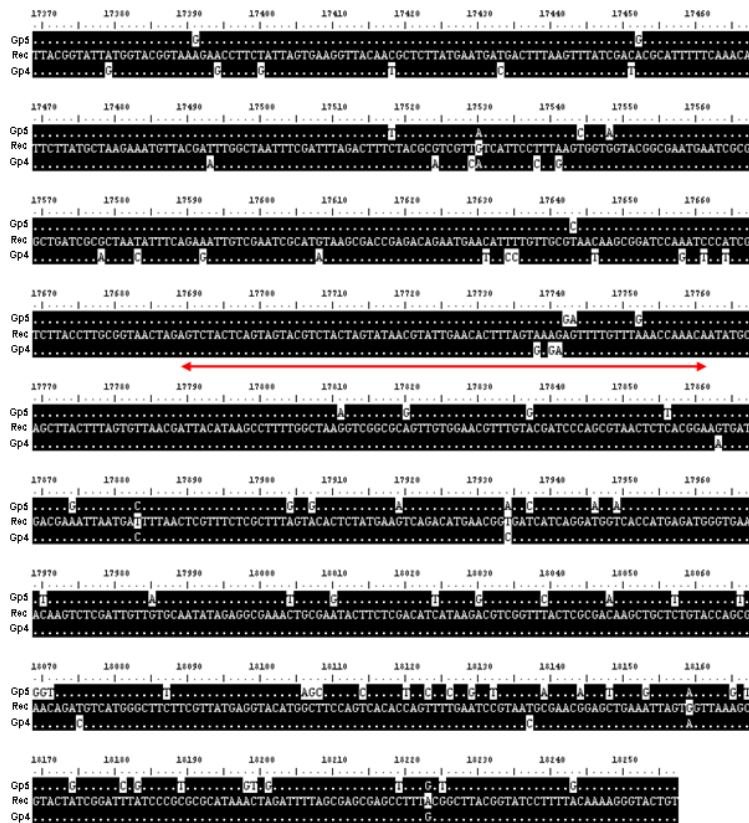


Figura 4.3.9 - Comparação nucleotídica entre uma possível sequência recombinante (Rec) e os respectivos parentes (Gp4 e Gp5). Os nucléotidos a branco apresentam as variações nucleotídicas entre as sequências em estudo. A região delimitada a vermelho corresponde à região intergênica entre p13 e p20.

Apesar de, através do alinhamento, ser muito claro a alteração de comportamento das possíveis sequências recombinantes, estas foram analisadas com os programas RDP3 e GARD, tendo todos os métodos indicado como possível local de recombinação a região intergênica entre p13 e p20 (resultados não mostrados).

No entanto, no isolado 124 a mistura de haplótipos é natural (isto é, já existia no isolado em causa) e a recombinação poderá ter ocorrido há muito tempo. Para verificar se num dado horizonte temporal se poderia obter recombinação, estudaram-se haplótipos obtidos de plantas em que se fizeram misturas artificiais de diversos grupos.

Os isolados 199 e 206 são ambos constituídos por uma mistura artificial de haplótipos (Tabela 4.2.1). O isolado 199 é constituído por uma mistura artificial entre os isolados 25 (grupo M) e 15 (grupos 3a e 5), enquanto que o isolado 206 é constituído por uma mistura artificial do isolado 125 (grupos 4 e 5) e do isolado 25 (grupo M). De modo a estudar exhaustivamente possíveis eventos de recombinação na região compreendida entre a p13 e a p20 foram obtidos mais 30 clones de esta região de cada um dos isolados (Figura 4.3.10).

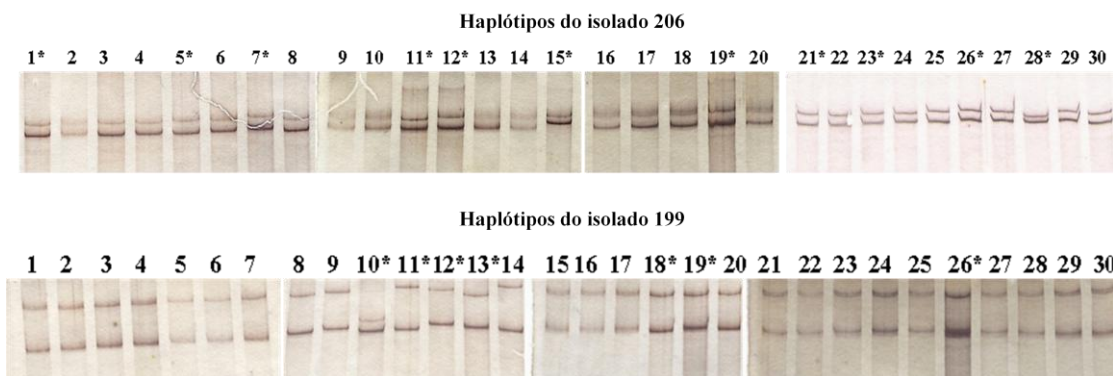


Figura 4.3.10 - Padrões de SSCP correspondentes aos diversos haplótipos obtidos a partir dos isolados 206 e 199 para a região p13+p20. Foram selecionados para sequenciar os haplótipos marcados com *.

Após a análise de SSCP dos diversos clones obtidos para cada um dos isolados, as sequências nucleotídicas dos haplótipos representativos de cada padrão de SSCP foram determinadas. Seguidamente, as sequências dos haplótipos de 199 e 206 foram alinhadas juntamente com as sequências obtidas anteriormente (as que permitiram construir a árvore filogenética da Figura 4.3.3).

A análise do alinhamento permitiu constatar que as sequências dos haplótipos do isolado 206 apresentavam uma similaridade nucleotídica superior com o grupo 5 no gene da p13, sendo no gene da p20 mais semelhante ao grupo 4 (Figura 4.3.11).

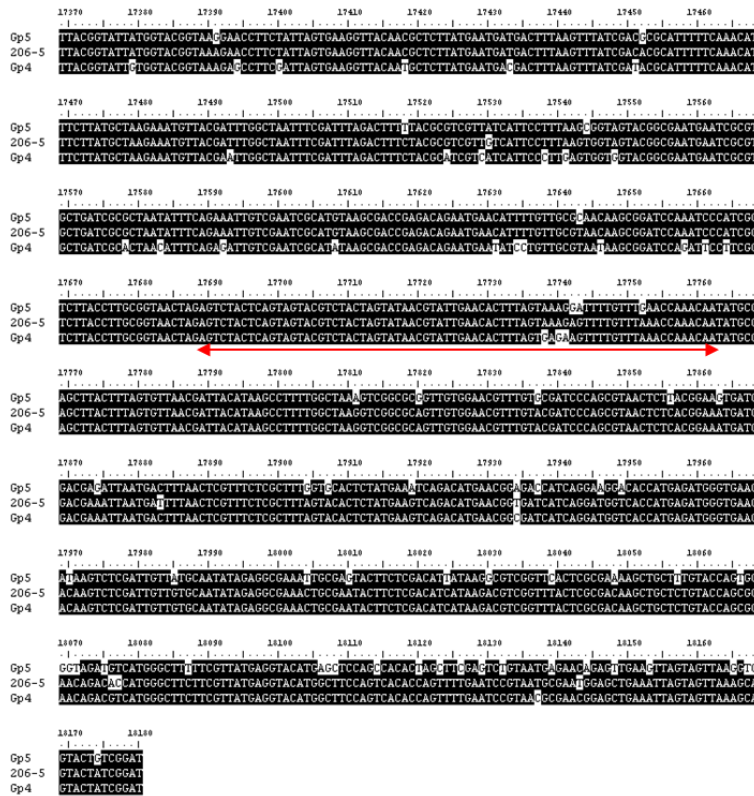


Figura 4.3.11 - Comparação nucleotídica entre a sequência de um dos haplótipos do isolado 206 (possível sequência recombinante) e os respectivos parentes (Gp4 e Gp5). Os nucléotidos a branco apresentam as variações nucleotídicas entre as sequências em estudo. A região delimitada a vermelho corresponde à região intergênica entre p13 e p20.

De facto, a análise filogenética das sequências confirma a alteração de comportamento dos haplótipos do isolado 206 (Figura 4.3.12). Tal como referido na análise das sequências dos haplótipos de 124, o local onde ocorre a possível recombinação entre os haplótipos do Gp4 e Gp5 do isolado 206 corresponde também à região intergênica entre p13 e p20. Na análise dos haplótipos deste isolado não se encontraram evidências de recombinação envolvendo o grupo M.

Por seu lado, os haplótipos de 199 mantêm a sua posição relativa quer no gene da p13 quer no gene da p20 (Figura 4.3.12). Neste isolado, as sequências dos haplótipos obtidos não mostraram quaisquer sinais de recombinação entre nenhum dos grupos que compõem o isolado.

No geral, foi encontrada uma maior frequência de recombinação entre os grupos 4 e 5 em comparação com os grupos 3a e 5 ou mesmo 3a e M para os quais não se encontraram sinais de recombinação. Sendo assim, 12 anos de co-habitação não foram suficientes para encontrar recombinação envolvendo os grupos 3a e M.

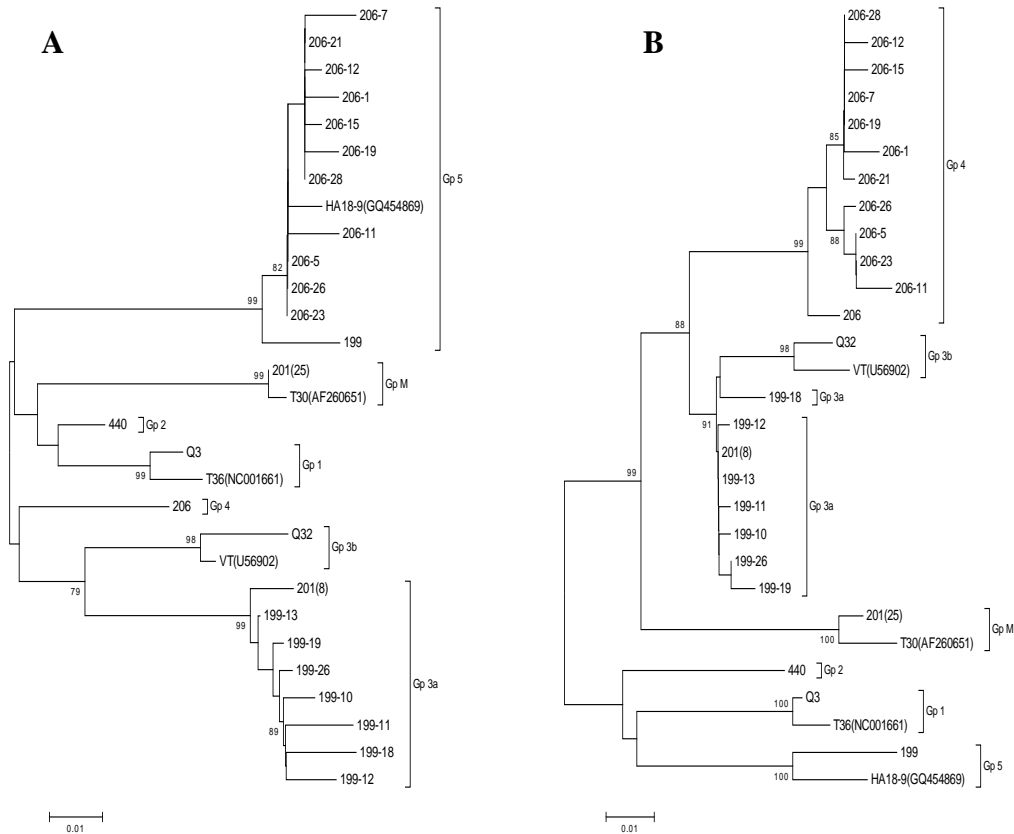


Figura 4.3.12 – Dendrogramas correspondentes aos genes da p13 (a) e p20 (b) baseado nas distâncias nucleotídicas das sequências. O método utilizado foi o de “Neighbour-Joining” deduzido a partir da matriz de distancias obtida com base no modelo de “Kimura 2 parameters”. Verifica-se a alteração de grupo dos haplótipos do isolado 206 do Gp 5 no gene da p13 (a) para o Gp 4 no gene da p20. Os haplótipos do isolado 199 mantêm a sua posição relativa quer em p13 quer em p20.

4.4 DISCUSSÃO

De modo a estudar a variabilidade genética de CTV, foram obtidas e comparadas sequências de 7 isolados CTV, constituídos apenas por um haplótipo ou por misturas de haplótipos, correspondentes à parte terminal 3’ do genoma viral, compreendidas entre a CP e a p23. Esta região do genoma é considerada mais conservada, tendo aproximadamente 90% identidade nucleotídica, comparada com os cerca de 70% de identidade na parte terminal 5’ (Lopez *et al.*, 1998; Roy *et al.*, 2005). A região 3’ do genoma de CTV é de elevada importância visto ser nesta região que se encontram as proteínas envolvidas na interação com o hospedeiro, nomeadamente proteínas envolvidas na encapsidação dos viriões (Satyanarayana *et al.*, 2000) e proteínas supressoras de silenciamento de RNA (Lu *et al.*, 2004).

Neste trabalho, obtiveram-se “contigs” com aproximadamente 3000 nucleótidos de diversos haplótipos de CTV. Inclusive nos isolados com misturas de haplótipos, foi



possível construir “contigs” individuais e bem definidos pelo menos para um dos haplótipos presentes no isolado.

Nolasco *et al.* (2009) estudaram a variabilidade do gene da principal proteína da cápside mostrando a existência de 7 grupos filogenéticos em que os isolados se agrupam de acordo com o tipo de sintomas provocados nas plantas hospedeiras. Neste estudo, usando uma região genômica mais extensa do que a usada por Nolasco *et al.* (2009) e contínua, verificou-se que as sequências dos haplótipos também se agrupam de modo a constituir 7 grupos filogenéticos perfeitamente definidos suportados por valores elevados de bootstrap nos nodos principais (Figura 4.3.3). Embora em estudos anteriores (Marques, 2003) se tenha verificado que os genes a jusante da CP, obtidos de diversos isolados, se agrupavam com uma topologia semelhante à da CP, não havia nesse estudo a garantia de que haplótipos, que para um dado gene estavam num dado grupo, não apareceriam noutro gene representados noutro grupo, pois as regiões em análise haviam sido obtidas independentemente. Pelo contrário, neste trabalho, houve o cuidado de obter “contigs” com sobreposições sucessivas de modo a ter a certeza de seguir sempre o mesmo haplótipo (ou porventura um muito semelhante) ao longo da região em análise. Ficou assim demonstrado que a mesma topologia de 7 grupos existente na CP, se mantém em toda a região a jusante.

A árvore filogenética da Figura 4.3.3 revela também que os haplótipos pertencentes ao grupo 4 obtidos dos isolados Q57 e 206 não se encontram agrupados com nenhuma sequência de referência existente no GenBank. Isto deve-se a que, até ao momento, estas foram as primeiras sequências completas obtidas para a região em análise, não havendo por isso sequências nucleotídicas disponíveis na bibliografia para comparação. O estabelecimento desta topologia filogenética abre também o caminho à compreensão da relação entre sintomas e grupos filogenéticos. Lu *et al.* (2004) mostraram a existência de 3 supressores de silenciamento de RNA (CP, p20 e p23) nesta região. Admite-se (Fagoaga *et al.*, 2005) que alguns sintomas originados pela infecção viral possam ser devidos à interferência da atividade supressora de origem viral. Albiach-Marti *et al.* (2010) mostraram que substituindo o gene da p23 e a região não traduzida 3' do isolado T30 para o clone infeccioso T36, resultou num vírus híbrido sem capacidade de induzir “seedling yellows”. Sendo p23 um supressor de silenciamento de RNA, poderá interromper o metabolismo de micro-RNA induzindo assim o sintoma de “seedling yellows”.

A diversidade média entre os diferentes grupos, ao longo de toda a região terminal 3', foi também determinada e verificou-se que é relativamente constante, permitindo supor que existe um certo conservadorismo da população de CTV nesta região do genoma.

Para a análise das características de variabilidade nos 5 genes que compõem a região terminal 3', entre a CP e p23, foram determinados os valores de d_S e d_N . Constatou-se que nos 5 genes abrangidos neste estudo, a maioria dos codões sujeitos a pressões seletivas sofrem uma pressão de seleção negativa, o que vem de encontro aos valores obtidos em estudos anteriores e na ordem de valores calculados para outros vírus de plantas (Garcia-Arenal *et al.*, 2001). O gene da CP revelou uma elevada pressão de seleção negativa (valor mais baixo de d_N/d_S) nas alterações de aminoácidos provavelmente por ser a principal proteína da cápside e deste modo ser fundamental na sobrevivência do vírus. As proteínas da p20 e da p23 funcionam como supressoras de silenciamento (Lu *et al.*, 2004), sendo que dentro da p20 existem aminoácidos extremamente conservados entre os supressores de silenciamento dos closterovirus (Reed *et al.*, 2003). A p23, uma proteína de ligação de RNA com um domínio "Zinc Finger" (Lopez *et al.*, 2000) é necessária à acumulação assimétrica de cadeias de RNA e contém aminoácidos conservados envolvidos nesta atividade (Satyanarayana *et al.*, 2002). As proteínas p13 e p18 são dispensáveis na infecção e no movimento de CTV pelo que as suas funções ainda permanecem desconhecidas (Tatineni *et al.*, 2008) não se percebendo qualquer razão especial para serem conservados.

As sequências de cada um dos grupos filogenéticos obtidas neste trabalho foram também analisadas com o intuito de procurar eventos de recombinação. Inicialmente, efetuou-se a análise Simplot que permite definir quais as regiões genómicas que exibem maiores percentagens de identidade nucleotídica, dando indicações de possíveis evidências de recombinação na região genómica em análise. A comparação de cada uma das sequências dos grupos 1, 2, 3a, 5 e M com todos os grupos não detetou quaisquer indícios de recombinação entre nenhuma das sequências. Por sua vez, o haplótipo Q57 (Gp 4) revelou uma alteração no comportamento, na medida em que a partir da região intergénica entre p13 e p20, este haplótipo passa a apresentar uma similaridade muito próxima dos 100% com o haplótipo Q32, pertencente ao grupo 3b. Este comportamento pode evidenciar um sinal de recombinação na sequência do haplótipo Q57 (Lole *et al.*, 1999), que poderá ser resultante da interação de haplótipos com sequências muito semelhantes às dos haplótipos 206 e Q32 obtidas neste trabalho. Deste modo, foi



necessário efetuar uma análise mais detalhada com estes haplótipos para confirmar os resultados obtidos na análise Simplot.

A análise resultante dos programas RDP3 e GARD mostrou que o local onde é detetado o sinal de recombinação corresponde à região intergênica entre p13 e p20. Em estudos anteriores de procura de eventos de recombinação em CTV (Martin *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2001; Vives *et al.*, 2005) nunca foram detetados eventos de recombinação nesta região intergênica, talvez por nunca ter sido analisado um fragmento tão longo na região terminal 3'. Vives *et al.* (2005) encontrou múltiplos eventos de recombinação entre dois haplótipos de CTV na parte 5' do genoma. Como referido anteriormente, esta região é muito mais variável e, por isso, poderá ser sujeita a mais eventos de recombinação. No caso dos estudos efetuados por Rubio *et al.* (2001) e Martin *et al.* (2009), a recombinação foi detetada em genes individuais, nomeadamente em p20 e p23, através de relações filogenéticas incongruentes, confirmada por vários métodos de deteção de recombinação. Neste estudo, e como se pode observar pela Figura 4.3.7, também se obtiveram relações filogenéticas incongruentes em dois genes, nomeadamente nos genes da p13 e p20. No entanto, ao analisar estes dois genes individualmente com os programas RDP3 e GARD, não foram detetados indícios de recombinação. Apenas quando se analisa o fragmento completo (com aproximadamente 3000 nt) é que é detetado um evento de recombinação no local correspondente a região intergênica entre p13 e p20. De notar que, das sequências completas obtidas para a região terminal 3' apenas uma apresentou sinais evidentes de ser uma possível recombinante, reforçando o elevado grau de conservadorismo desta região. A ausência de sinais de recombinação nas outras sequências valida a árvore filogenética da Figura 4.3.3, na medida em que se existissem múltiplos eventos de recombinação o modelo evolutivo usado não seria válido (Posada e Crandall, 2002).

O estudo da ocorrência de recombinação foi também efetuado em isolados compostos por misturas de haplótipos. O estudo efetuado com o isolado 124, constituído por uma mistura natural de haplótipos dos grupos 4 e 5, permitiu obter haplótipos com sequências pertencentes unicamente aos grupo 4 ou 5, mas também revelou a existência de haplótipos com sequências recombinantes entre os dois grupos. A análise das sequências recombinantes mostrou que o local onde ocorre a recombinação corresponde à região intergênica entre p13 e p20.

Os eventos de recombinação detetados quer no isolado Q57, por se tratar dum isolado monofilético, quer no isolado 124, constituído por uma mistura natural de haplótipos, poderão ter ocorrido há muito tempo atrás.

Para verificar se num horizonte temporal relativamente recente se poderia obter recombinação estudaram-se exaustivamente isolados com misturas artificiais de haplótipos (199 e 206). A análise do isolado 206, constituído por haplótipos dos grupos 4 e 5 (provenientes de uma mistura natural no isolado 125) e M (obtido do isolado 25), mostrou, como se esperava, a existência de sequências recombinantes entre os grupos 4 e 5, mas não foram encontrados quaisquer indícios de recombinação envolvendo sequências do grupo M. Mais uma vez, o local sinalizado de ocorrência de recombinação correspondeu à região intergénica entre p13 e p20. Assim, 12 anos não aparenta ser tempo suficiente para originar neste local uma recombinação com o grupo M. Para além disso, a análise das sequências obtidas para o isolado 199 (Gp 3a, Gp5, GpM) também não detetou neste período indícios de recombinação entre nenhum dos haplótipos que constituem o isolado.

No geral, os casos de sequências recombinantes encontrados em isolados contendo misturas de haplótipos, foram muito escassos. Além disso, dos recombinantes encontrados, quer entre mistura de haplótipos originada naturalmente quer entre misturas artificiais, apenas estavam envolvidos os grupos 4 e 5, sendo a região intergénica entre p13 e p20 o local onde ocorre a recombinação.

É necessário ter em atenção que um sinal frequente de recombinação com misturas de isolados pode ser um artefacto da reação de PCR (Bradley e Hillis, 1997; Posada *et al.*, 2002), levando a resultados e a conclusões erróneas. Neste caso, o facto de se encontrar indícios de recombinação (quer em isolados monofiléticos quer em misturas de haplótipos) em diferentes grupos mas sempre na mesma região (região intergénica entre p13 e p20), pode significar que este local seja um “hot-spot” de recombinação. A análise das sequências mostra que, nesta região intergénica existe um elevado teor de AU (cerca de 70% em AU). Esta particularidade nas sequências é descrita como um “hot-spot” de recombinação, em que a recombinação ocorre por um mecanismo de “template switching” ou “copy-choice” (Shapka e Nagy, 2004).

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os isolados CTV mantêm um elevado nível de estabilidade ao longo do tempo. Este aspeto irá ser analisado no capítulo seguinte.

CAPÍTULO 5

ESTIMATIVA DA TAXA DE EVOLUÇÃO DE CTV

Os resultados deste capítulo foram publicados no artigo:

Silva, G., Marques, N., Nolasco, G. (2011). The evolutionary rate of *Citrus tristeza virus* ranks among the rates of the slowest RNA viruses. *J Gen Virol*. DOI: 10.1099/vir.0.036574-0.



5.1 INTRODUÇÃO

Desde a primeira grande epidemia de “tristeza” ocorrida na Argentina e no Brasil há cerca de 80 anos que se verificam enormes perdas económicas na maioria das regiões produtoras de citrinos em todo o mundo (Moreno *et al.*, 2008). Desde então, o CTV tem sido muito estudado, tanto ao nível molecular como acerca da transmissão e epidemiologia, mas a informação acerca da taxa de evolução temporal é praticamente inexistente.

Grande número de autores, por exemplo Moya *et al.* (2000) e Roossinck (2003), assume implicitamente que quando se estudam vírus de RNA, quer de animais quer de plantas, estes podem ter uma taxa de evolução rápida, em parte, devido à ausência de atividade corretora de erros da RNA polimerase RNA dependente. No entanto, as primeiras estimativas das taxas de evolução de vírus de plantas apontam para uma maior estabilidade genética (Garcia-Arenal *et al.*, 2003). Por exemplo, foi referido que isolados de tobamovirus recolhidos ao longo de um período de 100 anos mostraram uma notável estabilidade genética apontando para uma taxa evolutiva de 1×10^{-8} substituições nucleotídicas por ano (Fraile *et al.*, 1997), embora uma revisão destas taxas usando métodos semelhantes aos usados neste trabalho, aponte para valores mais elevados (Pagan *et al.*, 2010). Um estudo acerca da taxa de evolução a longo prazo baseado na comparação de sequências de *Turnip yellow mosaic virus* que codivergiram juntamente com o seu hospedeiro há 12000 anos estima uma taxa de evolução para o gene da proteína da cápside de 1×10^{-6} substituições nucleotídicas / ano (Blok *et al.*, 1987). Mais recentemente, foram estimadas taxas a curto prazo para sequências genómicas obtidas em diferentes momentos através de métodos de inferência estatística, aplicando a teoria da coalescência através de métodos Bayesianos implementados em software introduzido por Drummond *et al.* (2003). A maioria das taxas de evolução estimadas para vírus de RNA de animais apontam para valores entre 1×10^{-2} e 1×10^{-5} substituições nucleotídicas / ano (Hanada *et al.*, 2004; Jenkins *et al.*, 2002). Por seu lado, a estimativa das taxas de evolução a curto prazo dos poucos vírus de plantas estudados até hoje andam na ordem de 10^{-4} substituições nucleotídicas / ano (Gibbs *et al.*, 2010).

Albiach-Marti *et al.* (2000b) e Lbida *et al.* (2004) referem que isolados de CTV com uma origem em comum e geograficamente separados durante várias décadas apresentam sequências nucleotídicas muito idênticas. Num estudo recente, Weng *et al.* (2010)

determinaram as variações nucleotídicas na descendência de um clone infeccioso de CTV (isolado T36) e estimaram a taxa de evolução do vírus entre os 4 e 8×10^{-5} substituições nucleotídicas / ano.

Neste capítulo, foi estimada a taxa de evolução de CTV. Numa primeira fase, foram incluídos isolados mantidos em estufa, cujas primeiras sequências do gene da CP tinham sido obtidas há cerca de dez anos tendo sido recentemente sequenciados, no que se costuma designar por estimativa direta. Uma condição essencial para a aplicação da teoria da coalescência através de métodos Bayesianos é a demonstração de existência de estrutura temporal dos dados, ou seja se o intervalo de tempo em que o conjunto de dados foi obtido é suficiente para explicar as variações nucleotídicas entre as sequências. A inexistência de estrutura temporal de um conjunto de dados é denunciada por taxas de evolução que se aproximam de zero. Contudo, não foi possível demonstrar a existência desta estrutura para os dados de observação direta, pelo que foram retirados da análise Bayesiana. Assim, os dados de observação direta foram empregues numa primeira análise não Bayesiana e para esta foi usado um conjunto de 107 sequências do gene da CP de isolados de todo o mundo obtidas entre 1990 e 2010. Com este conjunto de sequências, já foi possível demonstrar a existência de um sinal temporal.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Isolados de CTV mantidos em estufa

Neste estudo foram usados isolados de CTV provenientes de diversas origens geográficas e que apresentam diferentes características biológicas. Alguns destes isolados, caracterizados previamente, eram constituídos apenas por um haplótipo enquanto outros continham uma mistura de haplótipos de diferentes grupos filogenéticos como descrito por Nolasco *et al.* (2009). Alguns dos isolados polifiléticos eram misturas artificiais que haviam sido obtidas por coinoculação de outros isolados previamente caracterizados (Tabela 5.3.1 e Tabela 5.3.2). Os isolados 196 e 199 foram obtidos por coinoculação dos isolados 25 (Grupo M) e 15 (Grupo 5 + Grupo 3a); os isolados 201 e 204 foram obtidos por coinoculação dos isolados 25 (Grupo M) e 8 (Grupo 3a). Todos os isolados foram mantidos em laranjeira doce Madam Vinous em estufa protegida contra insetos, na Universidade do Algarve.



5.2.2 Amplificação e caracterização do gene da CP

O RNA total foi extraído usando o kit “RNAeasy plant mini kit” (Quiagen) servindo de molde para a síntese de cDNA usando uma mistura de “primers” aleatórios de 6 mer (Roche). Posteriormente, o gene da proteína da cápside (CP) foi amplificado por PCR usando os “primers” CTV1 e CTV10 descritos por Sequeira e Nolasco (2002) e os produtos PCR resultantes foram clonados no vetor pTZ57R/T (Fermentas) pelo sistema “TA Cloning”. Foram selecionados 10 clones por isolado que foram posteriormente analisados por SSCP de modo a avaliar a diversidade genética em cada isolado. Os haplótipos representativos de cada padrão de SSCP foram selecionados e sequenciados pela empresa Macrogen (Seoul, Coreia do Sul). O procedimento para a obtenção dos haplótipos anteriores a 2000 foi ligeiramente distinto. Nestes casos, as sequências foram obtidas pelo método clássico de marcação radioativa seguida de eletroforese.

5.2.3 Análise das Sequências Nucleotídicas

A análise e o alinhamento das sequências foram efetuados com o software BioEdit (Hall, 1999). Nas sequências obtidas dos isolados mantidos na estufa assim como nas sequências do gene da CP retiradas do GenBank foram removidos 21 nucleótidos em cada extremidade correspondentes à região dos “primers”. De modo a determinar possíveis sequências recombinantes, foi usado o programa RDP3 (Martin *et al.*, 2010), que incorpora diversos algoritmos de detecção de recombinação. As possíveis sequências recombinantes foram retiradas da análise.

5.2.4 Reconstrução filogenética através de uma análise Bayesiana

Para este estudo foram usadas: *i*) sequências do gene da CP obtidas neste estudo, *ii*) sequências do gene da CP retiradas do GenBank e *iii*) outras sequências do gene da CP obtidas de trabalhos anteriores no laboratório. Foram apenas consideradas sequências para as quais se sabia a data de isolamento. No total, foram usadas 107 sequências do gene da CP de haplótipos de diversas regiões do mundo, pertencentes a diferentes grupos filogenéticos e obtidas entre 1990 e 2010 (Tabela 5.3.2).

A seleção do melhor modelo de substituição nucleotídica foi efetuada com a ajuda do critério de informação Bayesiana (“Bayesian Information Criterion”) implementado no software MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).

A reconstrução filogenética foi efetuada através de uma análise Bayesiana usando o método de Monte Carlo via cadeias de Markov (MCMC) integrado no programa

BEAST (Drummond e Rambaut, 2007). Foi assumida uma distribuição uniforme com valores entre 1×10^{-9} e 1×10^{-2} substituições nucleotídicas / ano como condição *a priori* (“prior”) da taxa média de evolução. Considerou-se que este intervalo, que abrange com alguma folga as taxas de evolução de todos os vírus, não iria influenciar a estimativa posterior.

Os modelos demográficos de tamanho constante e “Bayesian skyline”, que não impõe *a priori* um modelo de crescimento, antes o faz depender dos próprios dados a analisar (Drummond *et al.*, 2005), foram combinados com um relógio molecular estrito ou com um relógio molecular relaxado modelado por uma distribuição lognormal (Drummond *et al.*, 2006). O conjunto de sequências foi analisado como uma única partição ou como duas partições definidas pelas posições dos nucleótidos em cada codão (1° + 2°) e 3°. A taxa de evolução obtida para os nucleótidos na 3ª posição do codão foi usada como a taxa de substituições sinónimas (Fargette *et al.*, 2008). A relação entre a taxa evolutiva de cada partição e a taxa de evolução global foi dada pelo parâmetro “mu” no software BEAST. Dentro dos diversos modelos considerados, a escolha do modelo que mais se adequava ao conjunto de sequências foi efetuada comparando os valores obtidos pelo fator de Bayes (BF) (Suchard *et al.*, 2001) e categorizados de acordo com Kass e Raftery (1995). Para cada análise, o número de gerações no método MCMC foi de pelo menos 50 milhões de gerações com amostragem em cada 5000 gerações, de modo a que a dimensão efetiva da amostra (“effective sample size – ESS) para cada parâmetro fosse superior a 100; procedeu-se sempre à remoção de 10% das simulações iniciais (“burn-in”) para garantir que o desenvolvimento da cadeia não seja afetado pelas condições iniciais. Nalguns casos, o tamanho das gerações foi aumentado para 100 milhões de gerações através da combinação de 2 cadeias de 50 milhões para obter valores finais de ESS acima dos 200.

Para avaliar se o conjunto de sequências continha estrutura temporal, foram construídos cinco conjuntos de dados nos quais se mantiveram as sequências mas onde foi atribuído aleatoriamente uma data a cada sequência. Estes conjuntos de dados aleatórios foram analisados no programa BEAST usando condições idênticas às do modelo que melhor se ajustou ao conjunto de dados reais (Duffy e Holmes, 2009; Ramsden *et al.*, 2009). A evidência de estrutura temporal foi considerada significativa se o valor da taxa média de evolução do conjunto de dados reais estivesse fora do intervalo de confiança de 95% (95% HPD) das taxas de evolução dos conjuntos de dados aleatórios (Duffy e Holmes, 2009).



5.3 RESULTADOS

5.3.1 Estimativa direta da taxa de evolução de isolados de CTV mantidos em estufa

Numa primeira abordagem para estimar a taxa de evolução molecular, foram analisadas as variações nucleotídicas do gene da CP de isolados de CTV mantidos em estufa durante aproximadamente 10 anos. Para tal, entre 2003 e 2007 foram obtidas várias sequências do gene da CP de haplótipos de CTV de diferentes grupos filogenéticos. Estes haplótipos são descendentes de isolados mais antigos, dos quais se obtiveram as primeiras sequências do mesmo gene nos anos de 1995 e 1998. A distância genética entre os haplótipos iniciais e os descendentes foi determinada usando o modelo de Kimura 2 parâmetros (K80) (Tabela 5.3.1).

A descendência da maior parte dos isolados foi obtida da mesma planta. No entanto, para outros isolados, os haplótipos descendentes foram analisados a partir de misturas artificiais obtidas por coinoculação de isolados de diferentes grupos filogenéticos. No caso de isolados constituídos por haplótipos de grupos filogenéticos distintos, a comparação das sequências foi feita com os haplótipos iniciais do respectivo grupo.

Tabela 5.3.1 - Distâncias genéticas (K80) entre os haplótipos iniciais e descendentes.

Isolado	Grupo Filogenético	Haplótipo Inicial (Ano)	Haplótipo Descendente (Ano)	Distância Genética
2	5	2_98 (1995)	2_1 (2005)	0,008
8	3a	8_1 (1998)	8_1 (2007)	0,006
			8_7 (2007)	0,002
13	3a	13C (1995)	13_2 (2005)	0,000
			13_4 (2005)	0,003
			14_25 (2006)	0,002
15	3a	15a (1995)	196_7 (2006) ¹	0,003
			196_12 (2006) ¹	0,011
			196_16 (2006) ¹	0,003
			211_10 (2006)	0,003
			212_9 (2006)	0,000
			196_1 (2004) ¹	0,005
			196_6 (2006) ¹	0,008
			196_13 (2006) ¹	0,003
			199_23 (2006) ¹	0,002
			199_26 (2006) ¹	0,003
20	M	20_2 (1998)	211_13 (2006)	0,002
			211_32 (2004)	0,000
			212_8 (2006)	0,003
			212_15 (2006)	0,002
			212_16 (2006)	0,003
			20_25 (2005)	0,000
25	M	25_120 (1995)	25_24 (2004)	0,000
			199_16 (2006) ¹	0,000
			201_22 (2006) ¹	0,000
			201_26 (2006) ¹	0,005
			201_52 (2006) ¹	0,003
28	3b	28C (1995)	201_53 (2006) ¹	0,002
			204_22 (2004) ¹	0,000
			28_1 (2007)	0,003
			28_3 (2005)	0,005

(¹) Sequências obtidas de isolados contendo misturas artificiais (ver materiais e métodos).

Pela Tabela 5.3.1, é possível verificar que as variações nucleotídicas durante o tempo analisado, aproximadamente 10 anos, foram, no geral, mínimas. Para cada haplótipo descendente, a distância genética para o haplótipo inicial foi dividida pelo número de anos que decorreu entre a obtenção dos dois haplótipos. A estimativa das taxas médias e medianas de evolução foram de $2,8 \times 10^{-4}$ e $2,7 \times 10^{-4}$ substituições nucleotídicas / ano, respectivamente, com um desvio padrão de $2,5 \times 10^{-4}$. Assumindo uma distribuição normal das estimativas, o intervalo de confiança de 95% está entre $1,9 \times 10^{-4}$ e $3,7 \times 10^{-4}$ substituições nucleotídicas / ano.

Estas sequências foram posteriormente analisadas com o programa BEAST (resultados não mostrados) e verificou-se que o intervalo do limite inferior do 95% HPD era muito grande (começava na ordem dos 1×10^{-16}) apontando para a inexistência de sinal temporal detetável pelo método Bayesiano. Sendo assim, as sequências dos haplótipos



descendentes dos isolados mantidos em estufa foram retiradas do conjunto de sequências para as análises seguintes.

5.3.2 Reconstrução filogenética através de uma análise Bayesiana

A taxa de evolução e o tempo para o antepassado comum mais recente (TMRCA – “Time to the most recent common ancestor”) foram estimados através de uma análise Bayesiana. Para tal, foram reunidas 107 sequências do gene da CP, obtidas neste trabalho e retiradas do GenBank (Tabela 5.3.2) obtidas em diferentes momentos ao longo de 20 anos (entre 1990 e 2010). As sequências foram previamente analisadas para detetar possíveis eventos de recombinação, sendo que nenhuma deu sinal de recombinação.

Tabela 5.3.2 - Origem geográfica e data de isolamento das sequências do gene da CP usadas na análise Bayesiana.

Haplótipo	Data de Isolamento	Origem Geográfica	Número de Acesso GenBank
Q8_1	2003	Albânia	EU660916
Q8_3	2003	Albânia	EU660918
Q8_5	2003	Albânia	EU660917
59M_33	2003	Albânia	EU579396
F5	2004	Angola	DQ660346
O2	2004	Angola	DQ660348
O6	2004	Angola	DQ660349
O7	2004	Angola	DQ660350
P2	2004	Angola	DQ660351
P9	2004	Angola	DQ660352
Q4	2004	Angola	DQ660353
Q8	2004	Angola	DQ660354
Q14	2004	Angola	DQ660355
BaraoB_4	2003	Brasil	EU579363
BaraoB_6	2003	Brasil	EU579362
I141_55	2003	Brasil	EU579356
I141_59	2003	Brasil	EU579358
PeraIAC_31	2003	Brasil	EU579354
B274*	1991	Colômbia	
399_38	2005	Croácia	
440_4	2005	Croácia	EU579415
440_6	2005	Croácia	EU579416
440_10	2005	Croácia	EU579417
443_4	2003	Croácia	AY791844
446_7	2003	Croácia	EU579424
L192GR	2010	Grécia	HQ270182
M8GR	2009	Grécia	HQ270183
CTV1	2000	Grécia	HQ270184
B165*	1991	Índia	
CTV_B2	2007	Índia	EU869297
CTV_B3	2007	Índia	EU869298
CTV_B4	2007	Índia	EU869299
CTV_B5	2007	Índia	EU869300
K18	2010	Índia	HM853684
2_93	1995	Ilha da Madeira	AF184116
2_98	1995	Ilha da Madeira	AF184117
8_1	1998	Ilha da Madeira	
8_2	1998	Ilha da Madeira	
8_3	1998	Ilha da Madeira	
8_6	2005	Ilha da Madeira	
13A	1995	Ilha da Madeira	
13C	1995	Ilha da Madeira	AF184113
13_117	1995	Ilha da Madeira	
15_118	1995	Ilha da Madeira	AY660009
15a	1995	Ilha da Madeira	
7_1	1998	Ilha da Madeira	
7_2	1998	Ilha da Madeira	
8a	1997	Ilha da Madeira	
7_3	1998	Ilha da Madeira	
10c	2000	Ilha da Madeira	
10e	2000	Ilha da Madeira	
15c	1995	Ilha da Madeira	
67i	1998	Ilha da Madeira	
67J	1998	Ilha da Madeira	
67N	1998	Ilha da Madeira	

Tabela 5.3.2 – cont.

Haplótipo	Data de Isolamento	Origem Geográfica	Número de Acesso GenBank
AMJ31	2010	Malásia	HM131219
398A	2000	Marrocos	
398_2	2000	Marrocos	EU579434
398_3	2000	Marrocos	EU579433
398_4	2000	Marrocos	EU579431
398_6	2000	Marrocos	EU579432
P1_3	2003	Marrocos	
MZ3_8	2003	Marrocos	
MZ3_5	2003	Marrocos	
108	2008	Paquistão	HQ329188
109	2008	Paquistão	HQ329189
135	2008	Paquistão	HQ329191
142	2008	Paquistão	HQ329192
143	2008	Paquistão	HQ329193
146	2008	Paquistão	HQ329194
159	2008	Paquistão	HQ329195
160	2008	Paquistão	HQ329196
179	2008	Paquistão	HQ329197
183	2008	Paquistão	HQ329198
28_121	1995	Portugal	
28C	1995	Portugal	AF184118
34c	1995	Portugal	
40d	1998	Portugal	
399_5	2000	Portugal	
QN_1	2005	Portugal	
3220_42	2005	Portugal	
225A	2000	Portugal	
Tr11_a	1995	Ilha da Reunião	AY660010
124_18	2006	Ilha da Reunião	
6_5	2004	S. Tomé e Príncipe	DQ660340
6_7	2004	S. Tomé e Príncipe	DQ660341
15_8	2004	S. Tomé e Príncipe	DQ660342
15_10	2004	S. Tomé e Príncipe	DQ660343
15_11	2004	S. Tomé e Príncipe	DQ660344
15_14	2004	S. Tomé e Príncipe	DQ660345
B7*	1991	África do Sul	
19_121	1995	Espanha	AF184114
19a	1995	Espanha	
19b	1995	Espanha	
20_2	1998	Espanha	EU579429
25_120	1995	Espanha	AF184115
P2_5	2003	Espanha	
P2_8	2003	Espanha	
R1_2	2003	Espanha	
SYR_A2	2008	Síria	FN667582
T36	1990	EUA	M76485
T3*	1991	EUA	
T30	1991	EUA	AF260651
CanTho1	2007	Vietname	FN811556
DongThap3	2007	Vietname	FN811557
B249*	1991	Venezuela	
065_17	2003	Venezuela	EU579366

* Sequências gentilmente cedidas pelo Dr. C.L. Niblett. A data de isolamento poderá variar de 1988 a 1991.

De acordo com o software MEGA5, o modelo de substituição nucleotídica que melhor se adequava ao conjunto de sequências foi o de Kimura 2 parâmetros (K80) com distribuição gama seguido de vários modelos derivados do modelo mais geral Hasegawa-Kishino-Yano (HK85), que se encontrava em 7º lugar. Assim, os modelos K80 e HK85 foram implementados em corridas com 50 milhões de gerações em várias combinações de relógios moleculares, modelos demográficos e partição de codões, apresentando-se na Tabela 5.3.3 os resultados obtidos com estes modelos ordenados de acordo com o fator de Bayes (BF). Para as 5 primeiras combinações foram efetuadas corridas adicionais de 50 milhões de gerações para combinar com as primeiras, aumentando assim o tamanho efetivo da amostra para todos os parâmetros para valores superiores a 200. A combinação que melhor se adequou ao conjunto de sequências foi a implementada com duas partições (1ª + 2ª posição de codões e a 3ª posição de codões), o modelo demográfico “Bayesian skyline” com relógio molecular relaxado modelado por uma distribuição lognormal e o modelo de substituição nucleotídica K80 com 5 classes gama. Com esta combinação, a taxa média de evolução é de $1,58 \times 10^{-4}$ substituições nucleotídicas / ano (95% HPD: $1,73 \times 10^{-5} - 3,16 \times 10^{-4}$) e o TMRCA de 838 anos (95% HPD: 122 – 1450).

Tabela 5.3.3 - Resumo dos resultados obtidos com os diversos modelos, classificados de acordo com os valores de fator de Bayes.

	Relógio Molecular	Modelo Demográfico	Modelo de Substituição	Classes Gama	Ln BF	Taxa média (nt/ano) (95% HPD)	TMRCAs (anos) (95% HPD)
Duas Partições (1ª + 2ª posição de códons e 3ª posição de códon)	UncILN	SK	K80	5	0	1,58 X 10 ⁻⁴ (1,73 X 10 ⁻⁵ - 3,16 X 10 ⁻⁴)	838 (122 - 1450)
	UncILN	SK	HK85	5	0,250	1,61 X 10 ⁻⁴ (1,24 X 10 ⁻⁵ - 3,19 X 10 ⁻⁴)	550 (110 - 1274)
	UncILN	SK	HK85	4	1,465	1,62 X 10 ⁻⁴ (2,86 X 10 ⁻⁶ - 3,17 X 10 ⁻⁴)	634 (120 - 1413)
	UncILN	SK	K80	4	1,899	1,56 X 10 ⁻⁴ (5,00 X 10 ⁻⁶ - 3,17 X 10 ⁻⁴)	669 (115 - 1675)
	UncILN	CS	K80	5	3,255	3,01 X 10 ⁻⁴ (1,62 X 10 ⁻⁴ - 4,41 X 10 ⁻⁴)	250 (124 - 411)
	UncILN	CS	K80	4	3,720	2,98 X 10 ⁻⁴ (1,57 X 10 ⁻⁴ - 4,49 X 10 ⁻⁴)	253 (118 - 409)
	UncILN	CS	HK85	5	3,920	2,95 X 10 ⁻⁴ (1,69 X 10 ⁻⁴ - 4,40 X 10 ⁻⁴)	255 (125 - 411)
	UncILN	CS	HK85	4	4,183	3,00 X 10 ⁻⁴ (1,58 X 10 ⁻⁴ - 4,36 X 10 ⁻⁴)	251 (126 - 413)
	Strict	SK	K80	5	15,345	9,32 X 10 ⁻⁵ (2,70 X 10 ⁻⁶ - 1,92 X 10 ⁻⁴)	1213 (190 - 3684)
	Strict	SK	HK85	5	15,520	9,65 X 10 ⁻⁵ (1,63 X 10 ⁻⁶ - 1,93 X 10 ⁻⁴)	1190 (178 - 3454)
	Strict	SK	HK85	4	16,220	1,04 X 10 ⁻⁴ (1,82 X 10 ⁻⁶ - 2,05 X 10 ⁻⁴)	1006 (179 - 2413)
	Strict	CS	K80	5	17,773	2,42 X 10 ⁻⁴ (1,32 X 10 ⁻⁴ - 3,48 X 10 ⁻⁴)	275 (160 - 425)
	Strict	CS	HK85	5	18,920	2,38 X 10 ⁻⁴ (1,23 X 10 ⁻⁴ - 3,50 X 10 ⁻⁴)	281 (162 - 450)
	Strict	CS	HK85	4	19,120	2,34 X 10 ⁻⁴ (1,22 X 10 ⁻⁴ - 3,41 X 10 ⁻⁴)	284 (163 - 438)
Uma partição (1ª + 2ª + 3ª posição de códons)	UncILN	SK	HK85	5	69,420	1,42 X 10 ⁻⁴ (1,75 X 10 ⁻⁵ - 2,80 X 10 ⁻⁴)	689 (150 - 1590)
	UncILN	SK	HK85	4	70,320	1,56 X 10 ⁻⁴ (1,57 X 10 ⁻⁵ - 3,08 X 10 ⁻⁴)	612 (119 - 1598)
	UncILN	CS	HK85	5	72,920	3,03 X 10 ⁻⁴ (1,62 X 10 ⁻⁴ - 4,54 X 10 ⁻⁴)	253 (123 - 416)
	UncILN	CS	HK85	4	73,920	3,09 X 10 ⁻⁴ (1,60 X 10 ⁻⁴ - 4,58 X 10 ⁻⁴)	248 (115 - 407)
	Strict	SK	HK85	4	83,020	1,01 X 10 ⁻⁴ (1,01 X 10 ⁻⁶ - 2,03 X 10 ⁻⁴)	1363 (156 - 3602)
	Strict	SK	HK85	5	83,720	1,08 X 10 ⁻⁴ (1,04 X 10 ⁻⁶ - 2,17 X 10 ⁻⁴)	1018 (143 - 2631)
	Strict	CS	HK85	4	86,820	2,44 X 10 ⁻⁴ (1,32 X 10 ⁻⁴ - 3,54 X 10 ⁻⁴)	274 (163 - 424)
	Strict	CS	HK85	5	87,120	2,43 X 10 ⁻⁴ (1,31 X 10 ⁻⁴ - 3,60 X 10 ⁻⁴)	279 (156 - 434)

Abreviaturas: **UncILN**: relógio molecular relaxado modelado por uma distribuição lognormal; **Strict**: relógio molecular estrito; **SK**: “Bayesian skyline”; **CS**: tamanho constante; **K80**: Kimura 2 Parâmetros; **HK85**: Hasegawa-Kishino-Yano; **Classes Gama**: número de classes gama; **HPD 95%**: valores mínimos e máximos de um intervalo de confiança de 95%; **Ln BF**: logaritmo natural do fator de Bayes.

Considerando a tabela de categorização do fator de Bayes apresentada por Kass e Raftery (1995), estes dados podem ser interpretados como havendo uma evidência muito forte ($2 \cdot \text{Ln BF} > 10$) contra os modelos implementados com uma única partição ou com relógio molecular estrito e uma forte evidência ($10 > 2 \cdot \text{Ln BF} > 6$) contra o modelo demográfico de tamanho constante. Há também uma evidência positiva ($6 > 2 \cdot \text{Ln BF} > 2$) que favorece os modelos implementados com 5 classes gama em relação

aos implementados com 4 classes. No entanto, a diferença para a segunda melhor combinação, implementada com o modelo de substituição nucleotídica HK85 em vez de K80, não é significativamente diferente. As taxas médias de ambas as estimativas diferem em menos de 2%. Apesar de existir uma incerteza na data de obtenção das sequências de 5 dos haplótipos (Tabela 5.3.2), as estimativas não foram alteradas, como confirmado após a repetição das corridas MCMC.

De modo a obter uma estimativa livre dos efeitos de seleção negativa que atuam sobre o gene da CP, foi estimada a taxa de evolução das substituições sinónimas através da taxa de substituição da partição que constitui o 3º nucleótido em cada codão. A relação entre a taxa evolutiva de cada partição e a taxa de evolução global foi dada pelo parâmetro “mu” no software BEAST. Neste caso, esse valor foi 1,859 com um intervalo de confiança de 95% entre 1,700 e 2,028, o que implica uma taxa de evolução das substituições sinónimas de $2,94 \times 10^{-4}$ substituições nucleotídicas / ano (95% HPD: $2,69 - 3,20 \times 10^{-4}$ substituições nucleotídicas / ano).

5.3.3 Avaliação da Estrutura Temporal

A validade dos resultados acima descritos é garantida apenas se for possível mostrar que a taxa de evolução estimada é o resultado de um sinal temporal contido no conjunto de sequências e não um resultado de alterações nucleotídicas aleatórias devido aos métodos usados na sua obtenção. Para avaliar esta questão, a taxa de evolução do conjunto de dados reais foi comparada com taxas obtidas a partir de 5 conjuntos de dados aleatórios, nos quais a data de isolamento de cada sequência foi aleatoriamente trocada pelas datas das outras sequências do conjunto, como descrito em Ramsden *et al.* (2009) e em Duffy e Holmes (2009). As taxas de evolução para os conjuntos de dados aleatórios foram estimadas usando as mesmas condições que para o modelo mais adequado para o conjunto de dados reais. Como já referido anteriormente, a inexistência de estrutura temporal de um conjunto de dados é denunciada por taxas de evolução que se aproximam de zero. Na Figura 5.3.1 é confirmada a perda de estrutura temporal nos conjuntos de dados aleatórios devido à maior extensão da parte inferior do limite de confiança de 95%, com valores de $2,3 \times 10^{-7}$ até $8,0 \times 10^{-9}$. Por outro lado, evidência de estrutura temporal no conjunto de dados reais deve aparecer como uma diferença significativa entre as taxas médias dos conjuntos de dados reais e aleatórios. Apesar de haver uma sobreposição parcial dos limites inferiores de confiança a 95%, a taxa média do conjunto de dados reais ($1,58 \times 10^{-4}$ substituições nucleotídicas / ano) encontra-se

fora dos limites superiores de confiança de 95% dos 5 conjuntos de dados aleatórios que são de 1,38; 1,35; 1,46; 1,36 e 0,84 X 10⁻⁴ substituições nucleotídicas / ano, respectivamente. De acordo com Duffy e Holmes (2009) e Pagan *et al.* (2010), este resultado é considerado uma evidência significativa da existência de estrutura temporal.

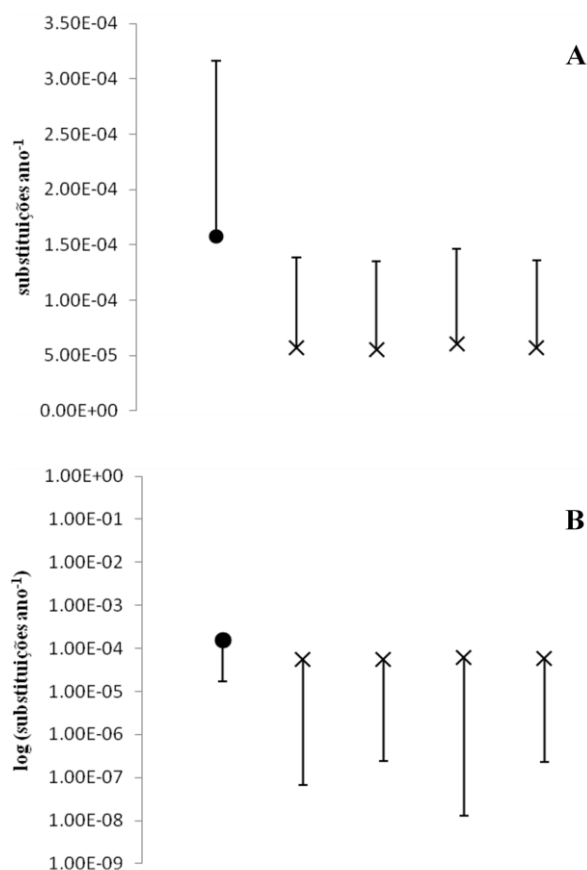


Figura 5.3.1 – Taxas médias de substituição e intervalos de confiança a 95% estimados para o conjunto de dados reais (●) e aleatórios (×) usando as mesmas condições das corridas MCMC. **Gráfico A**, limites superiores do 95% HPD em escala linear. **Gráfico B**, limites inferiores do 95% HPD em escala logarítmica.

5.3.4 Reconstrução Filogenética

Na Figura 5.3.2 encontra-se representada a árvore filogenética obtida para o modelo evolutivo que mais se adequa ao conjunto de sequências. Como se pode verificar, a topologia da árvore revela a existência de 7 grupos filogenéticos claramente definidos tal como descrito por Nolasco *et al.* (2009). Verifica-se uma separação de dois ramos principais desde a raiz, um deles dando origem aos grupos 1,2 e M e outro aos grupos 3a, 3b, 4 e 5. A Figura 5.3.2 mostra que a diversificação dentro de cada grupo filogenético começou nos últimos 100 – 300 anos, exceto para os grupos 1 e M cuja individualização surge mais recentemente.

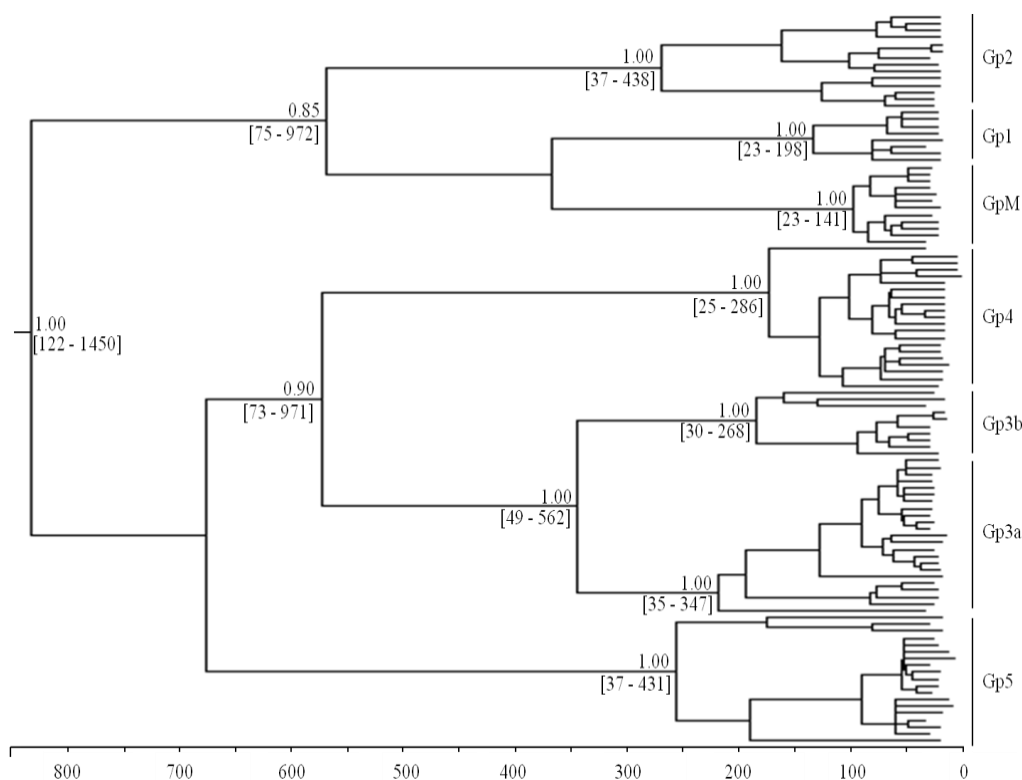


Figura 5.3.2 - Árvore filogenética inferida a partir de sequências do gene da CP de 107 haplótipos de CTV coletadas entre 1990 e 2010 sob o modelo evolutivo com o valor de fator de Bayes mais elevado. A escala de tempo em anos está representada na parte inferior. Para os nodos principais estão indicados o intervalo de tempo com 95% HPD (entre parêntesis) e a probabilidade nos casos em que é acima de 0,85. Estão também indicados os sete grupos filogenéticos.

5.4 DISCUSSÃO

5.4.1 Existência de Estrutura temporal no conjunto de dados

São várias as causas que podem contribuir para a perda de sinal temporal no conjunto de sequências. Como indicado anteriormente, os resultados diretamente obtidos dos isolados mantidos em estufa não mostraram ter estrutura temporal. Isto pode dever-se ao número limitado de isolados, ao curto intervalo de tempo decorrido (aproximadamente 10 anos) e condições artificiais de seleção das variantes virais. Outras causas que podem explicar o desaparecimento de estrutura temporal podem incluir o uso inapropriado de condições *a priori* (Duffy e Holmes, 2009) ou eventos de recombinação que possam passar despercebidos (Lefeuvre *et al.*, 2011). Além disso, os erros aleatórios derivados da reação de transcrição reversa, da reação de PCR e da sequenciação também podem contribuir para a ausência de estrutura temporal. Estes fatores podem ser muito difíceis de controlar, especialmente se as sequências forem obtidas em diferentes condições

como as obtidas do GenBank, como grande parte das sequências analisadas neste trabalho. Segundo Firth *et al.* (2010), estes fatores podem ser decisivos para a perda de sinal temporal se as sequências forem obtidas num curto intervalo de tempo e se a taxa de evolução for baixa.

Neste trabalho, em vez de se avaliar o efeito de cada fator individualmente, foi verificada a existência de estrutura temporal no conjunto de sequências comparando os resultados obtidos com os dos conjuntos de dados aleatórios, nos quais não existe estrutura temporal, como sugerido por Ramsden *et al.* (2009) e Duffy e Holmes (2009). Como demonstrado na secção dos resultados, foi encontrada uma evidência significativa de estrutura temporal para as 107 sequências objeto da análise Bayesiana de acordo com os critérios definidos por Duffy e Holmes (2009) e Pagan *et al.* (2010).

5.4.2 Estimativas da taxa de evolução de CTV

Estudos anteriores mostraram que isolados de CTV geograficamente separados há décadas revelaram sequências praticamente idênticas. Estas conclusões foram obtidas por Albiach-Martí *et al.* (2000b) e Lbida *et al.* (2004) através de comparações casuais entre haplótipos dos grupos M e 5, respetivamente. Neste trabalho, foi estudada a variação nucleotídica das sequências de haplótipos descendentes de isolados mais antigos, mantidos no mesmo hospedeiro ou presentes em misturas artificiais. Além de haplótipos dos grupos 5 e M, foram também incluídos haplótipos dos grupos 3a e 3b. Este estudo permitiu obter uma estimativa direta da taxa de evolução média de $2,8 \times 10^{-4}$ substituições nucleotídicas / ano. No entanto, quando estas sequências foram submetidas a análise Bayesiana verificou-se a inexistência de estrutura temporal. Além das razões acima discutidas, a ausência de sinal temporal pode ser explicado pelas limitações do ensaio; os haplótipos descendentes não estiveram sujeitos a efeitos de estrangulamento genético (“bottlenecks”) provocados pela transmissão por afídeos (Nolasco *et al.*, 2008) e pode não ser tempo suficiente para eliminar mutações letais através de seleção negativa. Weng *et al.* (2010) tiveram uma abordagem diferente na estimativa direta da taxa de evolução. Estes autores analisaram, um a seis anos mais tarde, as sequências de haplótipos descendentes de um clone infeccioso de CTV e estimaram uma taxa entre 4×10^{-5} e 8×10^{-5} substituições nucleotídicas / ano. No entanto, estes valores parecem ser muito baixos para um período tão curto de amostragem e, por outro lado, aqueles autores também não investigaram a existência de estrutura temporal no seu conjunto de dados.

Para ultrapassar as limitações da estimativa direta, a taxa de evolução de CTV foi estimada através de uma análise Bayesiana, na qual foram usadas 107 sequências de haplótipos de CTV coletadas entre 1990 e 2010.

Como se verificou (Tabela 5.3.3), foi obtida uma forte evidência favorecendo duas partições, um relógio molecular relaxado e um modelo demográfico “Bayesian skyline” em relação a uma partição, um relógio molecular estrito e tamanho de população constante. O efeito do modelo de substituição nucleotídico, entre K80 e HK85, foi pequeno. A taxa média de evolução estimada sob o melhor modelo (K80) foi de $1,58 \times 10^{-4}$ substituições nucleotídicas / ano. Os limites inferior e superior do intervalo de confiança a 95% estendem-se para menos de uma ordem de magnitude em cada direção, o que pode ser considerado uma distribuição estreita (Firth *et al.*, 2010), isto é, uma boa estimativa.

Comparando com a estimativa direta obtida a partir da descendência de um clone infeccioso de CTV (Weng *et al.*, 2010), verifica-se que o limite inferior do intervalo de confiança de 95% sobrepõe-se completamente ao intervalo dessa estimativa. Além disso, o limite superior do intervalo de confiança de 95% da estimativa Bayesiana sobrepõe-se ao valor da estimativa direta obtida neste trabalho. Deste modo, o valor da taxa de evolução obtido na análise Bayesiana não pode ser considerado significativamente diferente dos obtidos pelas estimativas diretas. No entanto, é menor quando comparado com os poucos resultados referentes à estimativa da taxa de evolução de vírus de plantas (Gibbs *et al.*, 2010).

5.4.3 Comparação com taxas de evolução de outros vírus de RNA

As proteínas da cápside dos vírus transmitidos por afídeos estão sujeitas a uma elevada pressão de seleção negativa (Chare e Holmes, 2004), um facto que já foi referido para o CTV (Rubio *et al.*, 2001) e como ficou demonstrado no capítulo 4. Para efetuar uma comparação imparcial com taxas de evolução de outros vírus de RNA, independentemente das restrições que possam atuar ao nível da proteína, Jenkins *et al.* (2002) e Hanada *et al.* (2004), consideraram as taxas de evolução das substituições sinónimas. Neste trabalho, a estimativa da taxa de evolução das substituições sinónimas para CTV foi de $2,94 \times 10^{-4}$ substituições nucleotídicas / ano. Considerando as taxas obtidas para vírus de animais referidas em Jenkins *et al.* (2002) e Hanada *et al.* (2004), depois de eliminados os casos em que essa taxa não era significativamente diferente de zero, e considerando também o valor obtido para o único vírus de plantas para o qual

esta taxa foi estimada (*Rice yellow mottle virus*, Fargette *et al.*, 2008), foram reunidas 88 taxas de evolução de substituições sinónimas que se encontram entre $5,2 \times 10^{-6}$ e $6,2 \times 10^{-2}$ substituições nucleotídicas / ano. Tendo em conta este intervalo, a taxa obtida para CTV encontra-se no 10º percentil (varia entre o 9º e o 11º se se considerar o 95% HPD) a contar das taxas mais baixas, embutida entre os vírus de RNA de animais mais lentos. Por seu lado, o único vírus de plantas para o qual há dados comparáveis, *Rice yellow mottle virus* (Fargette *et al.*, 2008), encontra-se no percentil 32. Deste modo, é possível afirmar que apesar de CTV ter uma taxa de evolução baixa, esta não é exceção quando comparada com outros vírus de RNA, ao contrário do que era sugerido por Weng *et al.* (2010).

5.4.4 Mecanismos que possam explicar a taxa de evolução baixa

Existe uma fraca correlação negativa entre o tamanho do genoma de vírus de RNA e as taxas de evolução (Jenkins *et al.*, 2002) ou de mutação (Sanjuan *et al.*, 2010). Sendo assim, a baixa taxa de evolução de CTV encontrada neste trabalho não é surpreendente, uma vez que CTV tem um genoma de 19,3 Kbp, que é um dos maiores genomas de RNA de cadeia simples além dos genomas de *Coronaviridae* e *Roniviridae* que variam entre 26 Kbp e 32 Kbp.

Os coronavirus codificam para uma exorribonuclease 3'-5' com atividade corretora de erros durante a replicação do genoma (Eckerle *et al.*, 2010), que poderá compensar a elevada probabilidade de incorporação de erros devido ao tamanho do genoma (Gorbalenya *et al.*, 2006). Homólogos desta exorribonuclease já foram descritos na família *Roniviridae* (Gorbalenya *et al.*, 2006). Apesar dos closterovirus partilharem alguns aspetos, relativamente à organização e replicação do genoma, com os coronavirus (Dolja *et al.*, 2006), nenhum dos motivos conservados característicos desta família de exonucleases (Eckerle *et al.*, 2010) foi encontrado a partir da tradução *in silico* do genoma de CTV (resultados não mostrados). Sendo assim, as taxas de erro que podem ocorrer durante a replicação de CTV deverão ser compensadas de outra maneira. Drake e Holland (1999), referindo-se a vírus de animais, consideraram que as diferenças na frequência de replicação deveriam ser a principal fonte de variação das taxas de evolução sinónimas. Numa revisão acerca da evolução do *Wheat streak mosaic virus*, French e Stenger (2003) propuseram que, para vírus de plantas para os quais ainda não foi encontrada uma exonuclease corretora de erros, a melhor estratégia de replicação seria uma replicação lenta e linear (“stamping machine model”), em que a cadeia

negativa é usada como molde para a síntese da maioria das cadeias da descendência (isto é, ao contrario da replicação exponencial, em que também as cadeias positivas são usadas como molde de novas cadeias negativas). No caso do CTV, a proporção entre cadeias positivas e negativas encontra-se entre 10:1 e 50:1 (NavasCastillo *et al.*, 1997; Satyanarayana *et al.*, 2002) três a quatro dias após infecção. Estes valores sugerem que a replicação, nesta fase, é linear em vez de exponencial (neste caso a proporção seria de 1:1 (Baltimore *et al.*, 1966). A proporção entre cadeias positivas e negativas é controlada pela proteína p23 (Satyanarayana *et al.*, 2002), uma proteína que está presente no início da infecção (NavasCastillo *et al.*, 1997) e que também está envolvida na supressão intracelular do silenciamento genético pós-transcricional (Lu *et al.*, 2004). Deste modo, ao reduzir a quantidade relativa de cadeias negativas, a p23 impede o vírus de se replicar de forma exponencial, minimizando assim os erros de replicação. Uma taxa de evolução baixa também pode estar relacionada com fatores relacionados com o hospedeiro. A restrição da infecção às células do floema resulta numa carga viral leve que contribui para um número efetivo de partículas baixo. Além disso, a deficiente capacidade de movimento célula a célula limita a capacidade de colonização do vírus ao movimento sistêmico (Folimonova *et al.*, 2008), o que pode originar efeitos de “bottleneck” (Li e Roossinck, 2004; Sacristan *et al.*, 2003). Formella *et al.* (2000) ao estudar *Borna disease virus* mostraram que a superinfecção de células por variantes geneticamente semelhantes levava à eliminação da segunda variante, mantendo assim a estabilidade viral. Recentemente, Folimonova *et al.* (2010) demonstraram este tipo de exclusão por superinfecção em infecções com CTV e sugeriram que este mecanismo poderá moldar a evolução de CTV por eliminar variantes geneticamente semelhantes resultantes dos erros de replicação.

No geral, estes dados sugerem que a baixa taxa de evolução do CTV é mantida através de mecanismos que operam em diversos níveis e que não são diferentes do que tem sido encontrado em outros vírus RNA.

5.4.5 A história da citricultura e a evolução de CTV

A maioria das espécies e híbridos do género *citrus* e outros géneros da família *Rutaceae* são suscetíveis de infecção pelo CTV, sendo geralmente aceite uma coevolução entre o vírus e os hospedeiros no sudeste asiático (Bar-Joseph *et al.*, 1989). Tem também sido aceite que no passado a propagação de citrinos era apenas efetuada na forma de sementes. Sendo que o CTV não é transmitido por sementes, poderá supor-se que, antes



do início da citricultura moderna, a transmissão do vírus era feita por afídeos (Moreno *et al.*, 2008). No entanto, torna-se difícil explicar e perceber como ocorreu a disseminação a longa distância no passado, visto que os afídeos estão associados a transmissões locais.

Por outro lado, um relato de 1936 acerca da citricultura no sul da China (Condit *et al.*, 1936) refere que a propagação por sementes era apenas utilizada para alguns tipos de citrinos. Em vez disso, a alporquia (método que consiste em estimular o crescimento de raízes nos ramos de uma planta adulta) era amplamente utilizado para obter porta-enxertos e que a enxertia de encosto (“inarching”) foi usada durante séculos para a propagação de citrinos. Deste modo, é concebível que, antes das relações comerciais terem sido estabelecidas com a Europa, o CTV tenha sido disseminado por todo o sudeste asiático e ilhas do Oceano Índico através de material de propagação vegetativa.

O estabelecimento das rotas de comércio marítimo entre a Europa e a África Oriental e Ásia levou à introdução de laranjeira doce e outros tipos de citrinos na Europa acerca de 400 – 500 anos, seguindo-se uma rápida disseminação de citrinos na América. A falta do domínio de práticas adequadas no cultivo de citrinos ou as longas viagens por mar podem ter favorecido o uso de sementes como o material de propagação predominante, resultando num atraso da entrada de CTV no Mediterrâneo e provavelmente nas Américas e Austrália até metade do século XIX. Durante este período, já havia ocorrido uma importante separação (95% HPD: 122 – 1450 anos) entre os dois ramos que levaram aos grupos 1,2 e M e aos grupos 3a, 3b, 4 e 5. É provável que anteriormente já tivesse ocorrido um grau ainda maior de diferenciação, pois há evidências de que variantes do grupo M já existiam individualizadas como grupo há 100 anos (Albiach-Martí *et al.*, 2000b) e que o grupo 5 existia há 80 anos (Lbida *et al.*, 2004). Evidências indiretas para uma maior especiação vêm também a partir da introdução generalizada de laranja azeda como porta-enxerto na segunda metade do século 19 em consequência da podridão radicular provocada por *Phytophthora* (Webber, 1967). Os isolados dos grupos 1 e 3a provocam um declínio rápido seguido de morte das árvores enxertadas neste porta-enxerto e, deste modo é difícil compreender como é que estes grupos se puderam diferenciar após a introdução da laranja azeda. Por outro lado, antes da introdução da laranja azeda, a sintomatologia induzida por todos os grupos de CTV deveria ser essencialmente ligeira e, portanto, não atuava como fator de seleção negativa por parte dos agricultores.

O uso da enxertia para a propagação de citrinos começou na primeira metade do século XIX (Webber, 1967), sendo que a partir da segunda metade deste século já era o método de propagação predominante. O transporte de material de propagação vegetativa a longa distância acompanhou esta tendência resultando numa disseminação de CTV a nível mundial. A diferenciação dos grupos filogenéticos e a baixa taxa de evolução antes da disseminação mundial de CTV permitem explicar o porquê da população atual de CTV ser panmítica.

É curioso observar que a separação dos ramos principais desde a raiz ocorre entre dois grandes conjuntos de grupos: um constituído por isolados que provocam “Stem Pitting” em laranja doce e toranja (grupos 3a, 3b, 4 e 5), que no esquema proposto por Hilf *et al.* (2005) correspondem aos grupos VT e T3; e outro constituído por isolados dos grupos 1, 2 e M que, se não estiverem enxertados em laranja azeda, não provocam sintomas nestes hospedeiros e que correspondem aos grupos T30 e T36 na terminologia definida por Hilf. No entanto, as razões para esta separação são ainda desconhecidas.

No geral, este estudo demonstrou que os isolados de CTV mantêm uma elevada estabilidade genética ao longo do tempo e que estes resultados poderão ser usados no desenvolvimento de medidas de controlo.

CAPÍTULO 6

TIPIFICAÇÃO MOLECULAR DE CTV EM PORTUGAL CONTINENTAL



6.1 INTRODUÇÃO

Portugal tem grandes tradições na prática da citricultura. Estima-se que a área ocupada por esta cultura é de 26200 hectares, sendo que cerca de 70% se localizam no Algarve, fazendo desta região a maior e principal produtora de citrinos em Portugal (Anónimo, 2007). O primeiro foco de infeção pelo CTV registado em Portugal foi no ano de 1988 em plantas certificadas vindas de Espanha (Nolasco, 2009). Portugal tem em relação ao CTV, o estatuto EPPO (Organização Europeia e Mediterrânica para a Proteção das Plantas) de zona protegida, o que implica a execução de rastreios periódicos e a eliminação num curto período dos focos detetados. No entanto, a contínua importação ilegal de material de propagação infetado levou à disseminação de CTV por todo o território nacional. A presença de CTV, juntamente com a presença do seu mais eficiente vetor (*T. citricida*) na região noroeste de Portugal Continental (Ilharco *et al.*, 2005; Nolasco *et al.*, 2008) pode provocar enormes prejuízos económicos, não só em Portugal mas em todos os países do mediterrâneo, como aconteceu na Argentina ou no Brasil na década de 1930 (Moreno *et al.*, 2008).

Vários métodos serológicos e moleculares foram desenvolvidos para detetar CTV (Niblett *et al.*, 2000). No entanto, para permitir tomar medidas de controlo da doença, é necessário não só detetar mas também caracterizar os isolados existentes. O método de tipificação por PCR assimétrico-ELISA (APET) desenvolvido por Nolasco *et al.* (2009) permite efetuar uma caracterização bastante eficiente, como demonstrado no capítulo 2. Rastreios efetuados em cooperação com os serviços de agricultura permitiram diagnosticar e caracterizar plantas infetadas recolhidas em pomares de todo o país. Até 2000, a maioria dos isolados que se encontravam no campo eram considerados suaves. Infelizmente, a intensidade de rastreios efetuados nos últimos anos foi reduzida, impossibilitando assim de seguir adequadamente a distribuição do vírus em Portugal Continental. Sendo assim, neste trabalho efetuou-se a caracterização de isolados de CTV obtidos de diversos locais de Portugal Continental de modo a atualizar o conhecimento da situação no país.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Material Vegetal

Entre 2009 e 2011 os serviços regionais de agricultura efetuaram rastreios em diferentes pomares em vários locais do Algarve e na região de Coimbra, durante os quais foram recolhidas diversas amostras de material vegetal. Os serviços regionais de agricultura analisaram por ELISA essas amostras, entregando no nosso laboratório apenas as amostras positivas (72 amostras) para posteriores ensaios moleculares e para identificar os isolados de CTV presentes nestas amostras. Estas amostras abrangem várias localidades nomeadamente, Coimbra, Lagoa, Silves, Alcantarilha, Patação, Bela Salema (Faro), Tavira e Vila Real de Santo António.

Em 2010, a equipa do laboratório também recolheu amostras, sendo que a colheita de material vegetal foi feita de forma aleatória em vários pomares na zona de Santa Catarina. Foram recolhidas 272 amostras.

No total, entre as amostras recolhidas pela equipa do laboratório e as entregues pela direção regional de agricultura, foram analisadas 344 amostras (Tabela 6.2.1).



Tabela 6.2.1 - Origem e ano de recolha das diversas amostras usadas neste estudo.

Ano de Recolha	Origem	Amostras
2009	Coimbra	CTV DN
		CTV79
		CTV84
		AM N°35
		AM N°44
	Bela Salema Tavira Vila Real Santo António Patacão Alcantarilha	BS3 a BS5
		CET6,7,8,9,10,14,15
		VRS19 a VRS21
		Pata22,23,26,38,39
		6.42,6.43,6.48,6.49 7.52,7.53,7.58,7.59
2010	Santa Catarina*	1.1 a 1.14
		2.1 a 2.20
		3.1 a 3.24
		4.1 a 4.32
		5.1 a 5.30
		QM1 a QM63
		2p1 a 2p24
		2B1 a 2B8
		2E1 a 2E25
		2A1 a 2A10 X1 a X22
2011	Lagoa	11-1
	Silves	11-2
	Patacão	11-3 a 11-40

*As amostras recolhidas em Santa Catarina são obtidas de diferentes pomares relativamente próximos uns dos outros. Cada número indica um pomar diferente. As amostras que começam com o número 2, QM e X são todos de pomares do mesmo local.

6.2.2 Detecção de CTV por “Immuno-Tissue Printing”

A presença de CTV nos tecidos das 272 amostras recolhidas pela equipa do laboratório foi primeiramente diagnosticada por “Immuno-Tissue Printing”. O antígeno foi imobilizado pressionando cuidadosamente secções de caule em membranas de nitrocelulose de 0,2 µm (BioRad, EUA). As membranas foram bloqueadas com uma solução de BSA 1% em PBS 1x durante 2 h à temperatura ambiente. Seguidamente, as impressões foram incubadas com uma solução contendo o anticorpo SP7 anti-CTV (1 mg/ml) (Sequeira e Nolasco, 2002) e o anticorpo anticoelho conjugado com a fosfatase alcalina (Sigma), diluídos 1:500 e 1:1000, respetivamente em PBS 1x. Incubaram-se as impressões durante 2 h à temperatura ambiente. Seguidamente, lavaram-se as membranas 2 vezes com TBS-Tween e adicionou-se o substrato NBT/BCIP deixando decorrer a hidrólise durante um intervalo de 10 min, até ao aparecimento de uma cor púrpura na zona do floema das amostras infetadas. Finalmente, interrompeu-se a reação com água destilada.

6.2.3 IC/RT-PCR

As amostras positivas por “Immuno-Tissue Printing” ou provenientes dos serviços de agricultura foram, posteriormente, analisadas por imunocaptura seguida de transcrição reversa e amplificação num só passo (IC/RT-PCR). As amostras positivas resultantes desta análise foram posteriormente caracterizadas por PCR assimétrico-ELISA como descrito por Nolasco *et al.* (2009).

Foram preparados extratos de todas as amostras. Para tal, pedaços de casca do caule foram macerados com tampão de extração (PBS contendo 2% PVP-40 e 0,05% Tween 20) na proporção de 1/10 a 1/20 (p/v) adicionando carborundum. Os extratos foram clarificados por centrifugação a 5000 g durante 5 min e a 4 °C.

A amplificação do gene da proteína da cápside (CP) foi efetuada através de IC/RT-PCR, usando num só passo transcrição reversa e amplificação baseada em métodos previamente descritos (Nolasco *et al.*, 1993). A imunocaptura foi realizada com o anticorpo policlonal anti-CTV (SP7) (Sequeira e Nolasco, 2002), seguida por transcrição reversa e amplificação (RT-PCR) do gene da CP. Os “primers” usados na amplificação do gene da CP completo (673bp) foram os “primers” CTV1 (“Forward”: 5'-ATGGACGACGAAACAAAGAA-3') e CTV10 (“Reverse”: 5'-ATCAACGTGTGTTGAATTTCC-3') descritos por Sequeira e Nolasco (2002). As reações de amplificação foram feitas num volume final de 50 µL contendo 2,5 mM de MgCl₂ (Fermentas), 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada um dos “primers” e 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) e respetivo tampão. Os ciclos de temperatura aplicados foram os seguintes: 94 °C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de 92 °C durante 30 s, 52 °C durante 30 s e 72 °C durante 30 s, com uma incubação final de 72 °C durante 5 min.

6.2.4 Tipificação por PCR assimétrico-ELISA (APET)

O método APET está descrito de forma detalhada por Nolasco *et al.* (2009) e no capítulo 2. Resumidamente, um microlitro resultante do ensaio de IC/RT-PCR foi usado nas reações de PCR assimétrico. Nesta reação a quantidade de um dos “primers” é 10 vezes superior à do outro, o que origina uma grande quantidade de cadeias simples. Além disso, os produtos PCR são marcados com digoxigenina permitindo a ligação a um conjunto de sondas de hibridação biotiniladas (ver a sequência e localização das sondas no capítulo 2) que revestem os poços de uma microplaca de ELISA. Os produtos hibridizados são quantificados através de um ensaio ELISA usando um anticorpo anti-



Dig conjugado com fosfatase alcalina. A análise dos resultados é feita em duas etapas usando o software CalcType desenvolvido e explicado por Nolasco *et al.* (2009).

6.2.5 Clonagem, Análise por SSCP e Sequenciação

Estes procedimentos foram aplicados para comprovar alguns resultados obtidos por APET. Para tal, os produtos PCR resultantes da reação de IC/RT-PCR foram clonados no vetor pTZ57R/T (Fermentas, ref. K1214) pelo sistema “TA Cloning”. Seguidamente, os clones resultantes foram analisados por SSCP e os haplótipos representativos de cada padrão de SSCP foram selecionados e sequenciados.

6.2.6 Análise das Sequências Nucleotídicas

A sequência nucleotídica dos haplótipos selecionados foi determinada em ambas as direções tendo sido realizada no Centro de Ciências do Mar na Universidade do Algarve. A análise e o alinhamento das sequências foram efetuados com o software Geneious (Drummond *et al.*, 2011). De modo a determinar possíveis sequências recombinantes, foram usados os programas RDP3 (Martin *et al.*, 2010), que incorpora diversos algoritmos de deteção de recombinação, e o programa GARD (Pond *et al.*, 2006) disponível no servidor Datamonkey.

Sequências do gene da CP obtidas no âmbito dos trabalhos do capítulo 4 (Q3, 440, 206, 199 e 201(25)) e sequências do gene da CP de isolados de CTV retiradas do GenBank (T36 - NC001661, Qaha - AY340974, NUagA - AB046398, SY568 - AF001623, T318A - DQ151548, VT - U56902, T30 - AF260651 e T385 - Y18420) foram usadas para comparação. As análises filogenéticas foram efetuadas com o software MEGA 5, com o qual se construíram árvores filogenéticas através do método “Neighbour-Joining” deduzido a partir da matriz de distâncias obtidas pelo modelo de “Kimura 2 parameters”

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Amostras infetadas por CTV

As amostras recolhidas em Santa Catarina em 2010 foram primeiramente analisadas por “Immuno-Tissue Printing” para selecionar as infetadas. Foram feitas 3 impressões por isolado (Figura 6.3.1a). Apesar de para algumas amostras, por exemplo 2p17, 2p21 e 2B4, ser perfeitamente visível um conjunto de aglomerados de cor púrpura na zona do

floema, sinal da presença de CTV, para outras, o resultado era duvidoso, como as amostras 2p7 ou 2p9. Deste modo, foi necessário comprovar alguns resultados obtidos por esta técnica por IC/RT-PCR (Figura 6.3.1b). Sendo assim, foram preparados extratos das amostras que deram quer um sinal positivo quer um sinal duvidoso por “Immuno-Tissue Printing” para serem analisados por IC/RT-PCR.

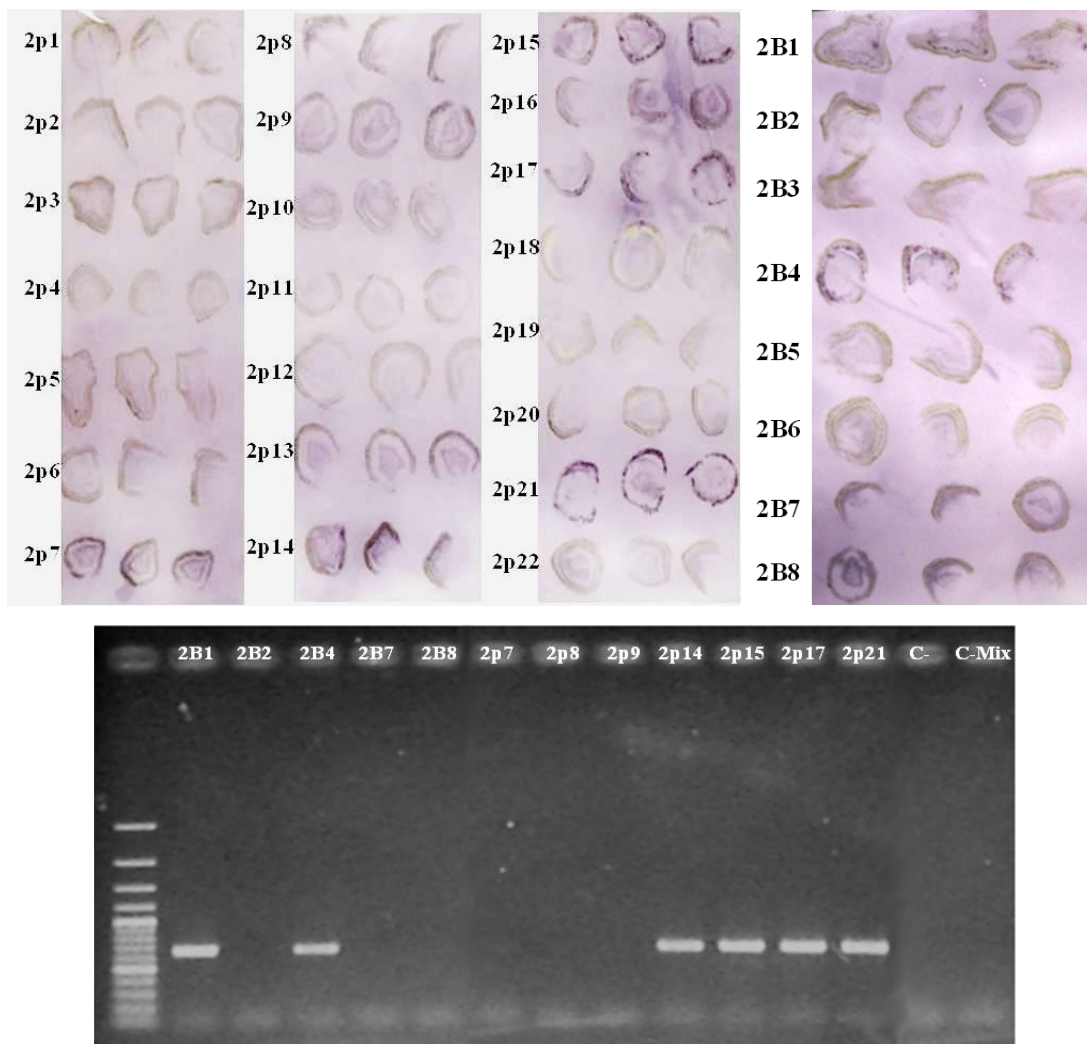


Figura 6.3.1 - a) Resultados de “Immuno-Tissue Printing” de algumas amostras obtidas em S. Catarina em 2010. É possível verificar a presença de imunoprecipitados na área vascular das secções imprimidas do caule em algumas das amostras. **b)** Confirmação dos resultados de “Immuno-Tissue Printing” por IC/RT-PCR por análise electroforética em gel de agarose a 1%. As amostras 2B1, 2B4, 2p14, 2p15, 2p17 e 2p21 mostram um sinal de amplificação com aproximadamente 673bp, correspondente ao gene da CP. C- é o resultado da amplificação dum extrato obtido dum planta que se sabia *a priori* ser negativa e C-Mix é o controlo negativo da reacção de PCR (sem extrato).

O resultado das reacções de IC/RT-PCR estão visíveis na Figura 6.3.1b. É possível verificar que as amostras que apresentavam aglomerados de cor púrpura na zona do floema originaram um produto de amplificação de aproximadamente 673bp,



correspondente ao gene da proteína da cápside, o que confirma a presença de CTV. Estas amostras são 2B1, 2B4, 2p14, 2p15, 2p17 e 2p21. Por seu lado, as amostras com resultados duvidosos por “Immuno-Tissue Printing” deram sinal negativo na reação de IC/RT-PCR, o que indica que estas amostras não estão infetadas com CTV.

Na Figura 6.3.1 estão apenas representadas 30 amostras. No entanto, para as 272 amostras recolhidas em Santa Catarina em 2010 o procedimento foi o mesmo, isto é, as amostras positivas ou duvidosas por “Immuno-Tissue Printing” foram posteriormente analisadas por IC/RT-PCR. No final, das 272 amostras recolhidas neste local 18 mostraram sinal de infeção por CTV. Estas são todas do mesmo pomar e contem as amostras que começam com o número 2, QM e X (Tabela 6.2.1). Todas as amostras recolhidas nos outros locais eram negativas. Estas 18 amostras foram, posteriormente, tipificadas por APET.

As amostras fornecidas pelos serviços regionais de agricultura tinham sido previamente analisadas por ELISA, sendo positivas para o CTV. Contudo ao fazer-se a amplificação inicial por IC/RT-PCR verificou-se que não era possível amplificar o gene da CP de todas as amostras. No total, das 72 amostras apenas foi possível amplificar 56 (Figura 6.3.2). Estas amostras foram posteriormente tipificadas APET.

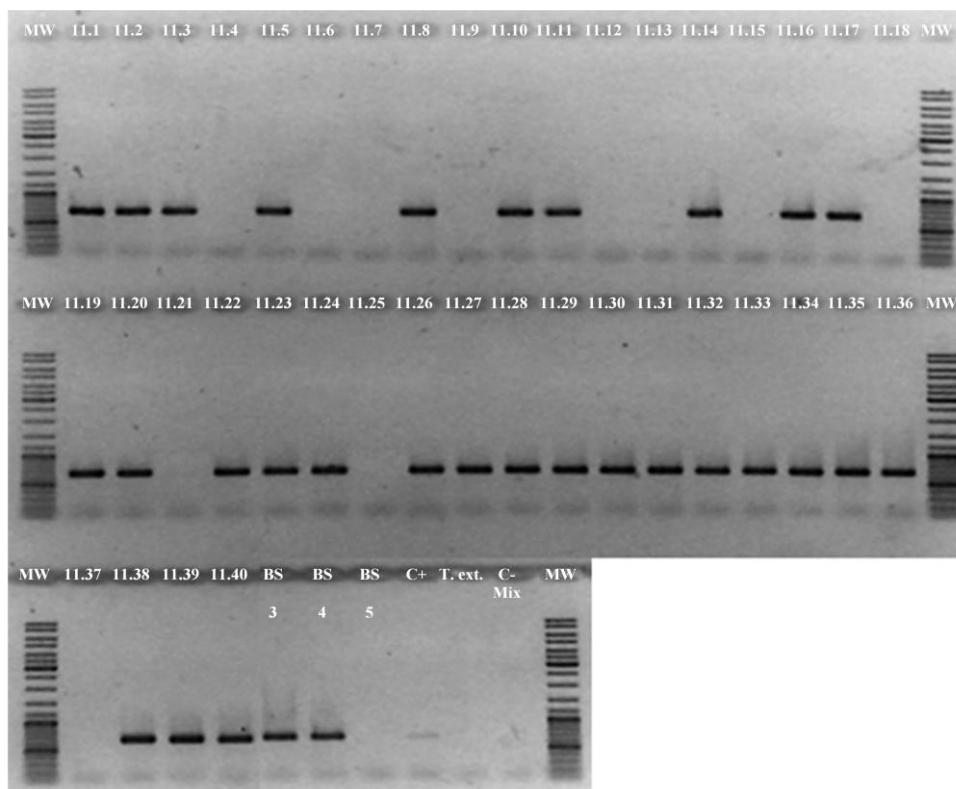


Figura 6.3.2 - Resultados de IC/RT-PCR por análise eletroforética em gel de agarose a 1% dos extratos obtidos de algumas plantas fornecidas pelos serviços de agricultura. A origem das amostras encontra-se na Tabela 6.2.1. C+ corresponde à amplificação de um extrato antigo obtido de uma planta infetada, T.Ext é um controle para verificar se há alguma contaminação no tampão usado na preparação dos extratos e C-Mix é o controle negativo da reação de PCR (sem extrato).

6.3.2 Tipificação por APET

Após a seleção das amostras positivas obtidas nos diferentes locais de recolha, foi efetuada a caracterização das mesmas por APET. Os resultados da tipificação para alguns dos isolados obtidos encontram-se na Tabela 6.3.1.

A quase totalidade das amostras contem unicamente haplótipos pertencentes ao grupo M. No entanto, houve três exceções: as amostras 2E8 e 2E13 recolhidas em Santa Catarina em 2010, que são constituídas por haplótipos pertencentes aos grupos 2 e 3b, respetivamente e a amostra CTV DN recolhida em Coimbra em 2009 que pertence ao grupo 3a.

Verificou-se também que duas das amostras recolhidas no Patacão, uma recolhida em 2009 (Pata39) e outra recolhida em 2011 (11-16), além de reagirem fortemente com a sonda do grupo M, também tiveram uma reação ligeira com a sonda do grupo 4 (Tabela 6.3.1). Por razões epidemiológicas pareceu estranho a existência de haplótipos de um grupo filogenético diferente imersas num pomar em que só apareceram haplótipos do grupo M. Assim, o caso destas amostras foi estudado em mais detalhe.



Tabela 6.3.1 - Exemplo dos resultados da tipificação por APET de alguns isolados CTV obtidos em diferentes locais.

	2E8	2E13	Pata39	CET7	BS4	VRS19	6.49	7.53	11-14	11-16
Gp1	0,012	0,012	0,006	0,004	0,003	0,003	0,007	0,006	0,007	0,004
Gp2	0,412	0,008	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001	0,004	0,007	0,000
Gp3a	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Gp3b	0,000	0,281	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Gp4	0,010	0,011	0,282	0,000	0,000	0,000	0,019	0,000	0,000	0,226
Gp5	0,013	0,006	0,000	0,004	0,000	0,004	0,002	0,000	0,003	0,000
GpM	0,004	0,008	1,585	1,725	2,243	2,823	1,603	0,974	0,859	1,927

6.3.3 Estudo dos casos atípicos

Para verificar se as amostras Pata39 e 11-16 eram constituídas por misturas de haplótipos ou se era apenas uma reação atípica, os fragmentos resultantes da reação de IC/RT-PCR foram clonados e os diversos clones analisados por SSCP (Figura 6.3.3).

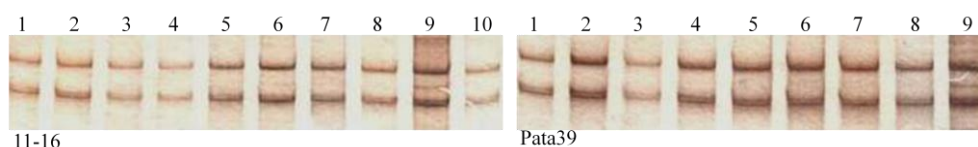


Figura 6.3.3 - Padrões de SSCP obtidos para a região codificante da CP dos isolados Pata39 e 11-16.

Em ambos os isolados, quase todos os clones apresentaram padrões semelhantes, havendo apenas um clone em cada isolado que apresentou um padrão ligeiramente diferente. Sendo assim, foi necessário recorrer à sequenciação para verificar se os padrões ligeiramente diferentes correspondiam ou não ao mesmo grupo filogenético. Foram sequenciados os haplótipos correspondentes aos padrões 5 e 9 de cada um dos isolados.

As sequências obtidas foram alinhadas juntamente com sequências de referência de cada um dos 7 grupos filogenéticos e, através de uma análise filogenética (Figura 6.3.4), constatou-se que os clones dos dois isolados pertencem ao grupo M, o que justifica a forte reação com a sonda do grupo M no ensaio de APET.

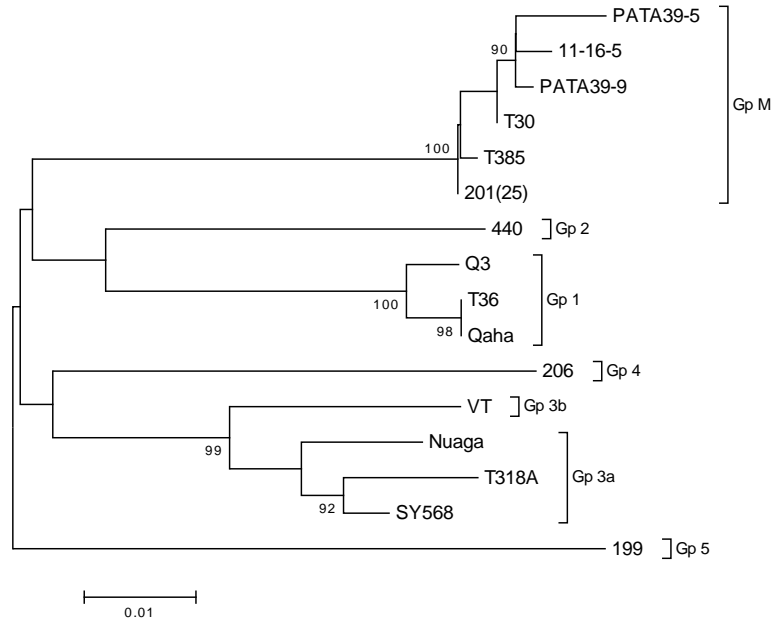


Figura 6.3.4 - Dendrograma da região genômica correspondente à CP baseado nas distâncias nucleotídicas das sequências. O método utilizado foi o de “Neighbour-Joining” deduzido a partir da matriz de distâncias obtida com base no modelo de “Kimura 2 parameters”.

As sequências dos clones de Pata39 e 11-16 foram também analisadas com os programas RDP3 (Martin *et al.*, 2010) e GARD (Pond *et al.*, 2006), para verificar a ocorrência de eventos de recombinação. Não foram, no entanto, encontrados indícios de recombinação em nenhuma das sequências.

Sendo assim, para tentar perceber porque razão estes isolados também reagiram com a sonda do grupo 4, as sequências foram analisadas em pormenor no local de hibridação desta sonda. Sequências pertencentes ao grupo M têm normalmente 2 “mismatch” com a sonda do grupo 4, o que é suficiente para obter uma boa discriminação entre haplótipos destes 2 grupos filogenéticos, conforme determinado anteriormente por Nolasco *et al.* (2009). A Figura 6.3.5 mostra o local de hibridação da sonda do grupo 4 na sequência do isolado T30 (isolado de referência do grupo M) e do haplótipo Pata39-5. Como é possível verificar, a sequência de Pata39-5 apresenta apenas um nucleótido distinto em relação à sequência da sonda do grupo 4. O mesmo resultado foi observado para os outros clones sequenciados.

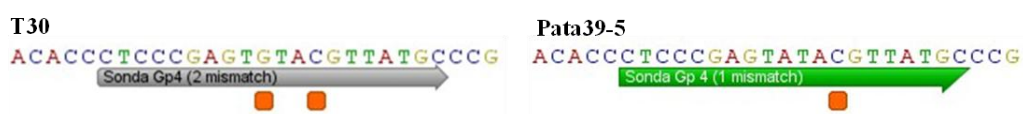


Figura 6.3.5 - Local de hibridação da sonda do grupo 4 nas sequências do isolado T30 (isolado de referência do grupo M) e do haplótipo Pata39-5. Os quadrados por baixo da sonda do grupo 4 indicam os “mismatch” em relação à sequência da sonda.



6.3.4 Distribuição dos grupos filogenéticos em Portugal continental

De modo a ter uma ideia acerca da distribuição de CTV em território nacional, foram agrupados dados obtidos de 2004 a 2011. A representação dos resultados encontra-se na Figura 6.3.6. A grande maioria dos isolados estudados encontra-se na região algarvia, sendo que também foram recolhidos isolados noutros pontos do país, nomeadamente nas regiões Centro e Douro.

Os dados de 2004 são provenientes de uma colaboração entre a Direção Regional de Agricultura do Algarve e o Laboratório de Virologia da Universidade do Algarve, na qual foram tipificados isolados de CTV presentes em material vegetal originário de Tavira e Silves. Quanto aos dados de 2005, estes foram obtidos de Nolasco *et al.* (2008) que recolheram material vegetal de alguns pomares dispersos na região noroeste e procederam à caracterização de CTV presente nessas amostras.

A grande maioria dos isolados encontrados no Algarve são considerados suaves, ou seja pertencem ao grupo M. No entanto, foram também encontrados isolados mais severos e que pertencem ao grupo 3b. Em 2010, foi encontrado num pomar em Santa Catarina um isolado pertencente ao grupo 2.

Noutras regiões do país a variabilidade de isolados encontrados é maior. Na região do Douro em 2005 e na região de Coimbra em 2009 foram encontrados isolados dos grupos 1, 3a, 4 e M.

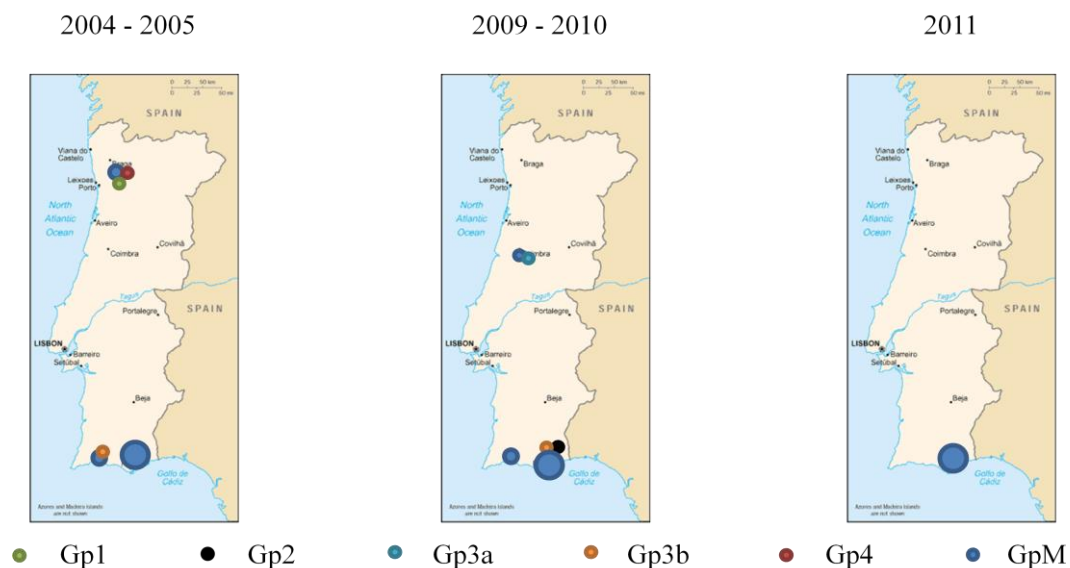


Figura 6.3.6 - Distribuição de isolados de CTV de diferentes grupos filogenéticos ao longo dos anos em Portugal Continental. Em cada ano foram analisados pomares diferentes. O tamanho das bolas está relacionado com o número de isolados encontrados do respetivo grupo.

6.4 DISCUSSÃO

A utilidade e a eficiente caracterização de amostras por APET foram demonstradas e discutidas no Capítulo 2. Neste estudo, recorrendo a esse método para caracterizar as amostras positivas recolhidas no campo de vários locais, constatou-se que a grande maioria é composta por isolados de CTV pertencentes ao grupo M, ou seja isolados considerados suaves que não provocam sintomas severos como “stem-pitting” em laranjeira doce ou declínio de árvores enxertadas em laranjeira azeda.

Na caracterização das amostras por APET foram ainda encontrados dois isolados recolhidos no Patacão, um em 2009 (Pata39) e outro em 2011 (11-16), que reagiram fortemente com a sonda do grupo M e mais ligeiramente com a sonda do grupo 4. Tendo em conta estas reações pensava-se que se poderia estar na presença de dois isolados com misturas de haplótipos. No entanto, por análise filogenética constatou-se que os clones obtidos dos dois isolados agrupavam com as sequências de referência do grupo M. A análise *in silico* de sequências destes clones revelou uma perfeita homologia com a sequência da sonda do grupo M e apenas um nucleótido de diferença em relação à sonda do grupo 4, quando o habitual é haver 2 “mismatch” o que é suficiente para não haver reação da sequência com a sonda do grupo 4 (Nolasco *et al.*, 2009). Deste modo, podemos estar na presença de isolados constituídos por haplótipos atípicos do grupo M, apesar dessa diferença nucleotídica não afetar a expressão em aminoácidos.

Nolasco (2009) numa revisão histórica do CTV em Portugal refere que os primeiros focos de infeção encontrados em Portugal eram constituídos por isolados suaves (grupo M), muito semelhantes (a nível da sequência nucleotídica) ao isolado 25-120 introduzido em Portugal vindo de Espanha em 1988. Em 2010, em Santa Catarina, os focos de infeção encontrados eram todos do mesmo pomar. Além de haplótipos do grupo M, foram detetados haplótipos dos grupos 2 e 3b, considerados suaves e severos (sem provocar “stem pitting” em laranjeira doce), respetivamente. Já em 2004 tinham sido encontrados isolados pertencentes ao grupo 3b em Silves.

Rubio *et al.* (2001) estudaram e compararam a diversidade genética de populações de CTV de Espanha e Califórnia e concluíram que não existe uma correlação entre a origem geográfica e a distância nucleotídica. Estudos efetuados noutros países, tais como Chipre (Papayiannis *et al.*, 2007) ou Jamaica (Tennant *et al.*, 2010), na deteção e caracterização de isolados de CTV, comprovam a ausência de uma especiação



geográfica, na medida em que não existe uma associação evidente entre isolados constituídos por haplótipos de determinado grupo filogenético e a sua origem geográfica. A mesma sugestão é feita por Djelouah *et al.* (2009). Estes autores estudaram a diversidade do gene da proteína da cápside de isolados de CTV na região do mediterrâneo e verificaram a existência de haplótipos do mesmo grupo filogenético nos diferentes países que compõem esta região. Apesar de se encontrarem haplótipos dos 7 grupos filogenéticos em toda a região mediterrânea, Djelouah *et al.* (2009) indicam uma prevalência, nesta região, de haplótipos dos grupos 3b e M. Nos países do médio oriente existe uma predominância de isolados constituídos com grupo 3b e deste modo podem ser a fonte de disseminação deste grupo pelo mediterrâneo. A importação ilegal de plantas contaminadas com haplótipos do grupo M oriundas de Espanha (Nolasco, 2009) assim como os relatos de Lbida *et al.* (2004) que verificaram que os isolados introduzidos em Marrocos constituídos pelo grupo M também eram originários de Espanha, fazem deste país uma possível fonte de disseminação do grupo M pela região do mediterrâneo.

A presença de afídeos, como *Aphis citricola*, *Aphis spiraecola* e *Aphis gossypii* já foi reportada no Algarve, onde se verificou a sua capacidade de aquisição de CTV. O afídeo *Toxoptera citricida* ainda não foi detetado nos pomares algarvios. No entanto, a presença de *T. citricida* no noroeste de Portugal (Ilharco *et al.*, 2005; Nolasco *et al.*, 2008) passa a ser uma ameaça para a citricultura do Algarve, visto que este afídeo está relacionado com a propagação de isolados mais severos (Nolasco *et al.*, 2008). Atualmente, em Portugal já se encontram todos os tipos de isolados de CTV que se podem encontrar noutras regiões citrícolas. No entanto, o Algarve, em comparação com a situação encontrada no norte do país (Nolasco *et al.*, 2008), continua a ter uma baixa diversidade de isolados. Cerni *et al.* (2009) sugerem que a diversidade de CTV poderá estar relacionada com o tipo de citricultura praticada. Em regiões onde a indústria de citrinos está altamente desenvolvida, como é o caso do Algarve, a maior região produtora de citrinos de Portugal, a prevalência de algumas variedades principais poderá proporcionar uma uniformidade dos isolados de CTV presentes no campo.

A redução da intensidade de rastreios sistemáticos e um ineficiente sistema de controlo por parte das autoridades competentes (Nolasco, 2009) impossibilita seguir adequadamente a situação e delinear estratégias de controlo adequadas. Tendo em conta a dispersão de CTV por praticamente todo o território nacional, torna-se impraticável a destruição completa dos pomares afetados. Em vez disso, usando metodologias úteis

como o APET (Nolasco *et al.*, 2009) na caracterização de isolados, pode-se focar a atenção apenas na eliminação dos isolados mais severos e controlar a prevalência de isolados suaves que também podem ser importantes na proteção de variedades comerciais através de proteção cruzada.

CAPÍTULO 7

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES



Este trabalho contribuiu para um melhor conhecimento da filodinâmica de CTV, na medida em que trouxe mais conhecimento acerca da epidemiologia e dos processos evolutivos.

Tendo em conta que existem diversos isolados de CTV e que as árvores infetadas contêm normalmente uma mistura de isolados, torna-se necessário caracterizar os isolados presentes numa dada região de modo a poder tomar as medidas preventivas adequadas ao controlo da doença. Neste trabalho foram comparados dois métodos de diferenciação de isolados de CTV, a análise dos MMM de Hilf *et al.* (2005) e o ensaio de APET desenvolvido por Nolasco *et al.* (2009), com o intuito de verificar qual dos métodos revela melhor capacidade para caracterizar os isolados de CTV. Verificou-se que com o método de MMM, os quatro génotipos não foram suficientes para caracterizar alguns dos isolados e que um único génotipo pode englobar isolados de diferentes características. O génotipo VT reúne, entre outros e segundo Nolasco *et al.* (2009), isolados considerados suaves (Gp2) e isolados que provocam “Stem-Pitting” (Gp4). Por outro lado, com APET foi possível detetar todos os grupos que tinham sido previamente determinados por sequenciação. Deste modo, considerou-se que a estrutura de 7 grupos filogenéticos definida por Nolasco *et al.* (2009) é mais adequada para tipificar os isolados de CTV.

Seguidamente, foi estudada a dinâmica de colonização de cada grupo filogenético. Para tal, foram analisados isolados monofiléticos por um imuno-ensaio *in situ* (ISIA). Este método, previamente desenvolvido por Lin *et al.* (2000) para a deteção de CTV em tecidos de plantas infetadas, foi usado para determinar a distribuição do vírus nas células das plantas infetadas. Os resultados obtidos mostraram que o padrão de distribuição dos aglomerados de células infetadas depende da filogenia do isolado. Foi observado que os isolados de CTV diferem na quantidade de células infetadas e que essa diferença parece estar relacionada com a severidade do isolado, sendo que os isolados severos mostraram um maior número de aglomerados de células infetadas na zona do floema. Estudos prévios (Folimonova *et al.*, 2008) verificaram que o número de células infetadas aumentava de acordo com a suscetibilidade do hospedeiro. Os resultados de ISIA neste trabalho completam estas observações, na medida em que usando o hospedeiro laranjeira doce, foi mostrado que o padrão de distribuição dos aglomerados de células infetadas depende também do grupo filogenético do isolado. O estudo da distribuição de CTV no tecido das plantas infetadas pode ser muito útil para perceber os efeitos de “genetic bottleneck” na transmissão por afídeos.

No capítulo 4 do presente trabalho ficou demonstrado que a estrutura genética da população de CTV que existe para o gene da CP é mantida em toda a região terminal 3' (entre a CP e a p23). Esta região do genoma assume elevada importância na medida em que é nesta região que se encontram as proteínas envolvidas na interação com o hospedeiro (Folimonova *et al.*, 2008). As proteínas p23, p20 e CP funcionam como supressoras do mecanismo de defesa de plantas baseado no silenciamento de RNA (Lu *et al.*, 2004) e, mais recentemente, Albiach-Marti *et al.* (2010) verificaram que os determinantes de patogenicidade do sintoma de “Seedling Yellows” estão associados ao gene da p23.

Neste trabalho, foram obtidas pela primeira vez sequências completas cobrindo toda a região terminal 3' de isolados do grupo 4, sendo que no GenBank existem apenas sequências de genes individuais. Estudos anteriormente efetuados nesta região do genoma focaram apenas genes individuais e uma grande quantidade de sequências destes genes estão disponíveis no GenBank. No entanto, como a maioria dessas sequências foi obtida de forma independente, isto é como genes individuais, não tinha sido possível, até agora, de desvendar toda a estrutura genética desta região.

Tendo em conta que a manutenção da estrutura genética pode ser anulada por fenômenos de recombinação, toda a região entre a CP e a p23 foi analisada com o intuito de procurar sinais de recombinação. Os eventos de recombinação foram detetados apenas na região intergênica entre a p13 e a p20. Além disso, os resultados obtidos no capítulo 4 sugerem uma baixa frequência de recombinação entre os isolados de CTV, mesmo em isolados contendo mistura de haplótipos e mantidos há mais de 12 anos no mesmo hospedeiro. No entanto, quando detetados ocorrem preferencialmente entre os grupos 4 e 5 e sempre na mesma região, a região intergênica entre p13 e p20, sugerindo que este local seja um “hot-spot” de recombinação. De referir que foi a primeira vez que se detetaram eventos de recombinação nesta região do genoma.

No capítulo 5 foi estimada a taxa de evolução temporal de CTV. Numa primeira abordagem, isolados mantidos em estufa protegida contra insetos e cujas primeiras sequências do gene da CP foram obtidas acerca de 10 anos, foram reanalisados para obter uma estimativa direta da taxa de evolução do gene da CP. Porém, não foi possível demonstrar a existência de estrutura temporal para os dados da estimativa direta, pelo que foram retirados da análise Bayesiana. Sendo assim, para esta análise foram usadas 107 sequências de haplótipos de CTV coletadas entre 1990 e 2010. Para este conjunto de sequências já foi possível demonstrar a existência de um sinal temporal. De acordo



com o melhor modelo evolutivo, a taxa de evolução estimada foi de $1,58 \times 10^{-4}$ substituições nucleotídicas / ano. No entanto, para se efetuar uma comparação imparcial com outros vírus de RNA, foi considerada a taxa de evolução das substituições sinónimas. Numa série de 88 taxas de evolução sinónimas, a taxa obtida para CTV encontra-se no décimo percentil a contar das taxas mais baixas, embutida entre os vírus de RNA de animais mais lentos. Quando comparada com o único vírus de plantas para o qual esta taxa foi estimada (Fargette *et al.*, 2008) verificou-se que a taxa obtida para CTV é bastante inferior. Este trabalho também sugere que no momento da disseminação de CTV para a Europa e Novo Mundo, os grupos filogenéticos já estariam definidos, o que poderá explicar a ausência atual de especiação geográfica.

No geral, os resultados, que apontam para eventos de recombinação pouco frequentes e para uma baixa taxa de evolução, mostram que os isolados de CTV mantêm uma elevada estabilidade genética ao longo do tempo.

Finalmente, efetuou-se a caracterização de isolados de CTV obtidos de pomares de diversos locais de Portugal Continental de modo a contribuir para o conhecimento da situação da doença no país. Constatou-se que a grande maioria das árvores infetadas era composta por isolados de CTV pertencentes ao grupo M, ou seja isolados considerados suaves e que não provocam sintomas severos. No entanto, na maior região produtora do país, o Algarve, também se encontram isolados severos, o que coloca a região em elevado risco epidemiológico pois poderá ocorrer a transmissão destes isolados por afídeos. No geral, verifica-se que em Portugal já se encontram todos os tipos de isolados de CTV que se podem encontrar noutras regiões citrícolas.

Os resultados obtidos neste trabalho levantam contudo a seguinte questão: se o CTV tem uma baixa taxa de recombinação e uma baixa taxa de evolução temporal como é que o vírus evolui? Uma possível explicação é o CTV estar bem adaptado ao hospedeiro e não necessitar de grandes alterações para sobreviver nesse ambiente. Talvez seja necessário um melhor conhecimento da interação entre CTV – hospedeiro – vetor para perceber melhor os processos evolutivos de CTV.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albiach-Marti, M. R., Guerri, J., Cambra, M., Garnsey, S. M., Moreno, P. (2000a). Differentiation of *Citrus tristeza virus* isolates by serological analysis of p25 coat protein peptide maps. *J Virol Methods* 88, 25-34.
- Albiach-Marti, M. R., Grosser, J. W., Gowda, S., Mawassi, M., Satyanarayana, T., Garnsey, S. M., Dawson, W. O. (2004). *Citrus tristeza virus* replicates and forms infectious virions in protoplasts of resistant citrus relatives. *Molecular Breeding* 14, 117-128.
- Albiach-Marti, M. R., Robertson, C., Gowda, S., Tatineni, S., Belliure, B., Garnsey, S. M., Folimonova, S. Y., Moreno, P., Dawson, W. O. (2010). The pathogenicity determinant of *Citrus tristeza virus* causing the seedling yellows syndrome maps at the 3'-terminal region of the viral genome. *Mol Plant Pathol* 11, 55-67.
- Albiach-Marti, M. R., Mawassi, M., Gowda, S., Satyanarayana, T., Hilf, M. E., Shanker, S., Almira, E. C., Vives, M. C., Lopez, C., *et al.* (2000b). Sequences of *Citrus tristeza virus* separated in time and space are essentially identical. *J Virol* 74, 6856-6865.
- Anónimo (2007). A Citricultura Algarvia. Publicação on-line pelos serviços regionais de agricultura do Algarve. www.drapalg.min-agricultura.pt.
- Ayllon, M. A., Rubio, L., Sentandreu, V., Moya, A., Guerri, J., Moreno, P. (2006). Variations in two gene sequences of *Citrus tristeza virus* after host passage. *Virus Genes* 32, 119-128.
- Ayllon, M. A., Lopez, C., Navas-Castillo, J., Garnsey, S. M., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P. (2001). Polymorphism of the 5' terminal region of *Citrus tristeza virus* (CTV) RNA: incidence of three sequence types in isolates of different origin and pathogenicity. *Arch Virol* 146, 27-40.
- Ayllon, M. A., Lopez, C., Navas-Castillo, J., Mawassi, M., Dawson, W. O., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P. (1999). New defective RNAs from *Citrus tristeza virus*: evidence for a replicase-driven template switching mechanism in their generation. *J Gen Virol* 80, 817-821.
- Baltimore, D., Girard, M., Darnell, J. E. (1966). Aspects of the synthesis of poliovirus RNA and the formation of virus particles. *Virology* 29, 179-189.
- Bar-Joseph, M., Marcus, R., Lee, R. F. (1989). The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. *Annu Rev Phytopathol* 27, 291-316.

- Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., Olmos, A., de Luis, A., Vidal, E., Perez-Panades, J., Cambra, M. (2008). Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *Eur J Plant Pathol* 120, 177-188.
- Biswas, K. K. (2010). Molecular characterization of *Citrus tristeza virus* isolates from the Northeastern Himalayan region of India. *Arch Virol* 155, 959-963.
- Blok, J., Mackenzie, A., Guy, P., Gibbs, A. (1987). Nucleotide sequence comparisons of Turnip yellow mosaic virus isolates from Australia and Europe. *Arch Virol* 97, 283-295.
- Bradley, R. D., Hillis, D. M. (1997). Recombinant DNA sequences generated by PCR amplification. *Mol Biol Evol* 14, 592-593.
- Brlansky, R. H., Lee, R. F. (1990). Numbers of Inclusion-Bodies Produced by Mild and Severe Strains of *Citrus tristeza virus* in 7 Citrus Hosts. *Plant Dis* 74, 297-299.
- Cambra, M., Gorris, M. T., Román, M. P., Terrada, E., Garnsey, S. M., Camarasa, E., Olmos, A., Colomer, M. (2000). Routine Detection of *Citrus tristeza virus* by Direct Immunoprinting-ELISA Method Using Specific Monoclonal and Recombinant Antibodies. In: *Proc. 14th Conf. IOCV. IOCV, Riverside*.
- Cerni, S., Skoric, D., Ruscic, J., Krajacic, M., Papic, T., Djelouah, K., Nolasco, G. (2009). East Adriatic-a reservoir region of severe *Citrus tristeza virus* strains. *Eur J Plant Pathol* 124, 701-706.
- Chare, E. R., Holmes, E. C. (2004). Selection pressures in the capsid genes of plant RNA viruses reflect mode of transmission. *J Gen Virol* 85, 3149-3157.
- Che, X., Mawassi, M., Bar-Joseph, M. (2002). A novel class of large and infectious defective RNAs of *Citrus tristeza virus*. *Virology* 298, 133-145.
- Che, X., Dawson, W. O., Bar-Joseph, M. (2003). Defective RNAs of *Citrus tristeza virus* analogous to Crinivirus genomic RNAs. *Virology* 310, 298-309.
- Condit, I. J., Benemerito, A. N., Chen, W. H. (1936). Citrus Fruits and their Culture in Kwangtung Province, South China. AgNIC (Agriculture Network Information Center), University of California, Riverside.
- Costa, A. S., Muller, G. W. (1980). Tristeza control by cross protection: a U.S.-Brazil cooperative success. *Plant Dis* 64, 538-541.
- d'Urso, F., Ayllon, M. A., Rubio, L., Sambade, A., de Mendoza, A. H., Guerri, J., Moreno, P., Moreno, P. (2000). Contribution of uneven distribution of genomic RNA variants of *Citrus tristeza virus* (CTV) within the plant to changes in the viral population following aphid transmission. *Plant Pathol* 49, 288-294.

- Dawson, T. E., Mooney, P. A. (2000). Evidence for trifoliolate resistance breaking isolates of *Citrus tristeza virus* in New Zealand. In: Yokomi RK, Lee RF, Da Graca JV (eds) Proc. 14th Conf. IOCV. IOCV, Riverside., pp 69–76.
- Djelouah, K., Cerni, S., Fonseca, F., Santos, C., Silva, G., Yahiaoui, D., D’Onghia, A. M., Nolasco, G. (2009). Diversity of the coat protein gene of *Citrus tristeza virus* (CTV) in the Mediterranean region. *Options Méditerranéennes B/65 CIHEAM Publications. Citrus tristeza virus and Toxoptera citricidus: a serious threat to the Mediterranean citrus industry.*
- Dolja, V. V., Kreuze, J. F., Valkonen, J. P. T. (2006). Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Res* 117, 38-51.
- Dominguez, A., de Mendoza, A. H., Guerri, J., Cambra, M., Navarro, L., Moreno, P., Pena, L. (2002). Pathogen-derived resistance to *Citrus tristeza virus* (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. *Molecular Breeding* 10, 1-10.
- Drake, J. W., Holland, J. J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 13910-13913.
- Drummond, A., Pybus, O. G., Rambaut, A. (2003). Inference of viral evolutionary rates from molecular sequences. *Adv Parasit* 54, 331-358.
- Drummond, A. J., Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7, 214.
- Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B., Pybus, O. G. (2005). Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol* 22, 1185-1192.
- Drummond, A. J., Ho, S. Y., Phillips, M. J., Rambaut, A. (2006). Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol* 4, e88.
- Drummond, A. J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., M., F., Heled, J., Kearse, M., et al. (2011). Geneious v5.4, Available from <http://www.geneious.com/>.
- Duffy, S., Holmes, E. C. (2009). Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. *J Gen Virol* 90, 1539-1547.
- Eckerle, L. D., Becker, M. M., Halpin, R. A., Li, K., Venter, E., Lu, X. T., Scherbakova, S., Graham, R. L., Baric, R. S., et al. (2010). Infidelity of SARS-CoV Nsp14-

- Exonuclease Mutant Virus Replication Is Revealed by Complete Genome Sequencing. *Plos Pathog* 6, e1000896.
- Fagoaga, C., Lopez, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., Pena, L. (2005). Viral-like symptoms induced by the ectopic expression of the p23 gene of *Citrus tristeza virus* are citrus specific and do not correlate with the pathogenicity of the virus strain. *Mol Plant Microbe Interact* 18, 435-445.
- Fagoaga, C., Lopez, C., de Mendoza, A. H., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., Pena, L. (2006). Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of *Citrus tristeza virus* confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. *Plant Mol Biol* 60, 153-165.
- Fargette, D., Pinel, A., Rakotomalala, M., Sangu, E., Traore, O., Sereme, D., Sorho, F., Issaka, S., Hebrard, E., *et al.* (2008). Rice yellow mottle virus, an RNA plant virus, evolves as rapidly as most RNA animal viruses. *J Virol* 82, 3584-3589.
- Febres, V. J., Lee, R. F., Moore, G. A. (2008). Transgenic resistance to *Citrus tristeza virus* in grapefruit. *Plant Cell Rep* 27, 93-104.
- Febres, V. J., Niblett, C. L., Lee, R. F., Moore, G. A. (2003). Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with citrus tristeza closterovirus genes. *Plant Cell Rep* 21, 421-428.
- Febres, V. J., Ashoulin, L., Mawassi, M., Frank, A., BarJoseph, M., Manjunath, K. L., Lee, R. F., Niblett, C. L. (1996). The p27 protein is present at one end of *Citrus tristeza virus* particles. *Phytopathology* 86, 1331-1335.
- Firth, C., Kitchen, A., Shapiro, B., Suchard, M. A., Holmes, E. C., Rambaut, A. (2010). Using Time-Structured Data to Estimate Evolutionary Rates of Double-Stranded DNA Viruses. *Mol Biol Evol* 27, 2038-2051.
- Folimonova, S. Y., Folimonov, A. S., Tatineni, S., Dawson, W. O. (2008). *Citrus tristeza virus*: Survival at the edge of the movement continuum. *J Virol* 82, 6546-6556.
- Folimonova, S. Y., Robertson, C. J., Shilts, T., Folimonov, A. S., Hilf, M. E., Garnsey, S. M., Dawson, W. O. (2010). Strains of *Citrus tristeza virus* do not exclude superinfection by other strains of the virus. *J Virol*. 84, 1314-1325.
- Formella, S., Jehle, C., Sauder, C., Staeheli, P., Schwemmler, M. (2000). Sequence variability of Borna disease virus: resistance to superinfection may contribute to high genome stability in persistently infected cells. *J Virol* 74, 7878.

- Fraile, A., Escriu, F., Aranda, M. A., Malpica, J. M., Gibbs, A. J., GarciaArenal, F. (1997). A century of tobamovirus evolution in an Australian population of *Nicotiana glauca*. *J Virol* 71, 8316-8320.
- Fraser, L. R., Broadbent, P. (1979). Vein enation-woody gall. In: Virus and Virus Related Diseases of Citrus in New South Wales. *Dept. Agric. NSW*, 50-51.
- French, R., Stenger, D. C. (2003). Evolution of Wheat streak mosaic virus: dynamics of population growth within plants may explain limited variation. *Annu Rev Phytopathol* 41, 199-214.
- Garcia-Arenal, F., Fraile, A., Malpica, J. M. (2001). Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annu Rev Phytopathol* 39, 157-186.
- Garcia-Arenal, F., Fraile, A., Malpica, J. M. (2003). Variation and evolution of plant virus populations. *Int Microbiol* 6, 225-232.
- Garnsey, S. M., Gonsalves, D., Purcifull, D. E. (1977). Mechanical Transmission of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* 67, 965-968.
- Garnsey, S. M., Civerolo, E. L., Gumpf, D. J., Paul, C., Hilf, M. E., Lee, R. F., Brlansky, R. H., Yokomi, R. K., Hartung, J. S. (2005). Biological Characterization of an International Collection of *Citrus tristeza virus* (CTV) Isolates. In: *Proc. 16th Conf. IOCV. IOCV, Riverside*.
- Gibbs, A. J., Fargette, D., Garcia-Arenal, F., Gibbs, M. J. (2010). Time - the emerging dimension of plant virus studies. *J Gen Virol* 91, 13-22.
- Gillings, M., Broadbent, P., Indsto, J., Lee, R. F. (1993). Characterisation of isolates and strains of citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 44, 305-317.
- Gonsalves, D., Garnsey, S. M. (1989). Cross-Protection Techniques for Control of Plant-Virus Diseases in the Tropics. *Plant Dis* 73, 592-597.
- Gorbalenya, A. E., Enjuanes, L., Ziebuhr, J., Snijder, E. J. (2006). Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res* 117, 17-37.
- Gouveia, P., Santos, M. T., Eiras-Dias, J. E., Nolasco, G. (2011). Five phylogenetic groups identified in the coat protein gene of *Grapevine leafroll-associated virus 3* obtained from Portuguese grapevine varieties. *Arch Virol* 156, 413-420.
- Gowda, S., Satyanarayana, T., Davis, C. L., Navas-Castillo, J., Albiach-Marti, M. R., Mawassi, M., Valkov, N., Bar-Joseph, M., Moreno, P., *et al.* (2000). The p20 gene

- product of *Citrus tristeza virus* accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology* 274, 246-254.
- Halbert, S. E., Genc, H., Cevik, B., Brown, L. G., Rosales, I. M., Manjunath, K. L., Pomerinke, M., Davison, D. A., Lee, R. F., *et al.* (2004). Distribution and characterization of *Citrus tristeza virus* in South Florida following establishment of *Toxoptera citricida*. *Plant Dis* 88, 935-941.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.
- Hanada, K., Suzuki, Y., Gojobori, T. (2004). A large variation in the rates of synonymous substitution for RNA viruses and its relationship to a diversity of viral infection and transmission modes. *Mol Biol Evol* 21, 1074-1080.
- Harper, S. J., Dawson, T. E., Pearson, M. N. (2009). Complete genome sequences of two distinct and diverse *Citrus tristeza virus* isolates from New Zealand. *Arch Virol* 154, 1505-1510.
- Harper, S. J., Dawson, T. E., Pearson, M. N. (2010). Isolates of *Citrus tristeza virus* that overcome *Poncirus trifoliata* resistance comprise a novel strain. *Arch Virol* 155, 471-480.
- Hilf, M. E., Garnsey, S. M. (2000). Characterization and classification of *Citrus tristeza virus* isolates by amplification of multiple molecular markers. *In: Proc. 14th Conf. IOCV. IOCV, Riverside.*, pp 18-27.
- Hilf, M. E., Mavrodieva, V. A., Garnsey, S. M. (2005). Genetic marker analysis of a global collection of isolates of *Citrus tristeza virus*: Characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. *Phytopathology* 95, 909-917.
- Hilf, M. E., Karasev, A. V., Pappu, H. R., Gumpf, D. J., Niblett, C. L., Garnsey, S. M. (1995). Characterization of *Citrus tristeza virus* Subgenomic RNAs in Infected Tissue. *Virology* 208, 576-582.
- Ilharco, F. A., Sousa-Silva, C. R., Alvarez, A. A. (2005). First report on *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) in Spain and Continental Portugal. *Agronomia Lusitana* 51, 19-21.
- Jenkins, G. M., Rambaut, A., Pybus, O. G., Holmes, E. C. (2002). Rates of molecular evolution in RNA viruses: A quantitative phylogenetic analysis. *J Mol Evol* 54, 156-165.

- Karasev, A. V. (2000). Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annu Rev Phytopathol* 38, 293-324.
- Karasev, A. V., Hilf, M. E., Garnsey, S. M., Dawson, W. O. (1997). Transcriptional strategy of closteroviruses: Mapping the 5' termini of the *Citrus tristeza virus* subgenomic RNAs. *J Virol* 71, 6233-6236.
- Karasev, A. V., Boyko, V. P., Gowda, S., Nikolaeva, O. V., Hilf, M. E., Koonin, E. V., Niblett, C. L., Cline, K., Gumpf, D. J., *et al.* (1995). Complete Sequence of the *Citrus tristeza virus*-Rna Genome. *Virology* 208, 511-520.
- Kass, R. E., Raftery, A. E. (1995). Bayes Factors. *J Am Stat Assoc* 90, 773-795.
- Kong, P., Rubio, L., Polek, M., Falk, B. W. (2000). Population structure and genetic diversity within California *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates. *Virus Genes* 21, 139-145.
- Lbida, B., Fonseca, F., Santos, C., Zemzami, M., Bennani, A., Nolasco, G. (2004). Genomic variability of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates introduced into Morocco. *Phytopathol Mediterr* 43, 205-210.
- Lefeuvre, P., Harkins, G. W., Lett, J. M., Briddon, R. W., Chase, M. W., Moury, B., Martin, D. P. (2011). Evolutionary time-scale of the begomoviruses: evidence from integrated sequences in the Nicotiana genome. *PLoS One* 6, e19193.
- Li, H., Roossinck, M. J. (2004). Genetic bottlenecks reduce population variation in an experimental RNA virus population. *J Virol* 78, 10582-10587.
- Lin, Y. J., Rundell, P. A., Powell, C. A. (2002). In situ immunoassay (ISIA) of field grapefruit trees inoculated with mild isolates of *Citrus tristeza virus* indicates mixed infections with severe isolates. *Plant Dis* 86, 458-461.
- Lin, Y. J., Rundell, P. A., Xie, L. H., Powell, C. A. (2000). In situ immunoassay for detection of *Citrus tristeza virus*. *Plant Dis* 84, 937-940.
- Lole, K. S., Bollinger, R. C., Paranjape, R. S., Gadkari, D., Kulkarni, S. S., Novak, N. G., Ingersoll, R., Sheppard, H. W., Ray, S. C. (1999). Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 73, 152-160.
- Lopez, C., Navas-Castillo, J., Gowda, S., Moreno, P., Flores, R. (2000). The 23-kDa protein coded by the 3'-terminal gene of *Citrus tristeza virus* is an RNA-binding protein. *Virology* 269, 462-470.

- Lopez, C., Ayllon, M. A., Navas-Castillo, J., Guerri, J., Moreno, P., Flores, R. (1998). Molecular variability of the 5' and 3'-terminal regions of *Citrus tristeza virus* RNA. *Phytopathology* 88, 685-691.
- Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W. X., Falk, B. W., Dawson, W. O., Ding, S. W. (2004). Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15742-15747.
- Marques, N. (2003). Variabilidade Genômica de *Citrus tristeza virus* e Transformação Genética de *Citrus aurantium* L. com vista a à obtenção de resistência. *Tese de doutoramento, Universidade do Algarve*.
- Martelli, G. P., Agranovsky, A. A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R. H., Dolja, V. V., Falk, B. W., Gonsalves, D., et al. (2002). The family Closteroviridae revised. *Arch Virol* 147, 2039-2044.
- Martin, D. P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D., Lefevre, P. (2010). RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26, 2462-2463.
- Martin, S., Sambade, A., Rubio, L., Vives, M. C., Moya, P., Guerri, J., Elena, S. F., Moreno, P. (2009). Contribution of recombination and selection to molecular evolution of *Citrus tristeza virus*. *J Gen Virol* 90, 1527-1538.
- Mawassi, M., Mietkiewska, E., Gofman, R., Yang, G., BarJoseph, M. (1996). Unusual sequence relationships between two isolates of *Citrus tristeza virus*. *J Gen Virol* 77, 2359-2364.
- Mawassi, M., Karasev, A. V., Mietkiewska, E., Gafny, R., Lee, R. F., Dawson, W. O., Barjoseph, M. (1995). Defective Rna Molecules Associated with *Citrus tristeza virus*. *Virology* 208, 383-387.
- Melzer, M. J., Borth, W. B., Sether, D. M., Ferreira, S., Gonsalves, D., Hu, J. S. (2010). Genetic diversity and evidence for recent modular recombination in Hawaiian *Citrus tristeza virus*. *Virus Genes* 40, 111-118.
- Michaud, J. P. (1998). A review of the literature on *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Homoptera : Aphididae). *Florida Entomologist* 81, 37-61.
- Moreira, S. (1942). Observações sobre a "tristeza" dos citrus ou podridão das radículas. *O Biológico* 8, 269-276.
- Moreno, P., Ambros, S., Albiach-Marti, M. R., Guerri, J., Pena, L. (2008). Plant diseases that changed the world - *Citrus tristeza virus* : a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol Plant Pathol* 9, 251-268.

- Moya, A., Elena, S. F., Bracho, A., Miralles, R., Barrio, E. (2000). The evolution of RNA viruses: A population genetics view. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6967-6973.
- Müller, G. W. (1976). A tristeza dos Citrus. *Summa Phytopathologica* 2, 245-263.
- Narvaez, G., Skander, B. S., Ayllon, M. A., Rubio, L., Guerri, J., Moreno, P. (2000). A new procedure to differentiate *Citrus tristeza virus* isolates by hybridisation with digoxigenin-labelled cDNA probes. *J Virol Methods* 85, 83-92.
- NavasCastillo, J., AlbiachMarti, M. R., Gowda, S., Hilf, M. E., Garnsey, S. M., Dawson, W. O. (1997). Kinetics of accumulation of *Citrus tristeza virus* RNAs. *Virology* 228, 92-97.
- Niblett, C. L., Genc, H., Cevik, B., Halbert, S., Brown, L., Nolasco, G., Bonacalza, B., Manjunath, K. L., Febres, V. J., *et al.* (2000). Progress on strain differentiation of *Citrus tristeza virus* and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease. *Virus Res* 71, 97-106.
- Nikolaeva, O. V., Karasev, A. V., Powell, C. A., Gumpf, D. J., Garnsey, S. M., Lee, R. F. (1996). Mapping of epitopes for *Citrus tristeza virus*-specific monoclonal antibodies using bacterially expressed coat protein fragments. *Phytopathology* 86, 974-979.
- Nolasco, G. (2009). Historical review of *Citrus tristeza virus* in Portugal. *Options Méditerranéennes B/65 CIHEAM Publications. Citrus tristeza virus and Toxoptera citricidus: a serious threat to the Mediterranean citrus industry.*
- Nolasco, G., Fonseca, F., Silva, G. (2008). Occurrence of genetic bottlenecks during *Citrus tristeza virus* acquisition by *Toxoptera citricida* under field conditions. *Arch Virol* 153, 259-271.
- Nolasco, G., Deblas, C., Torres, V., Ponz, F. (1993). A Method Combining Immunocapture and Pcr Amplification in a Microtiter Plate for the Detection of Plant-Viruses and Subviral Pathogens. *J Virol Methods* 45, 201-218.
- Nolasco, G., Santos, C., Silva, G., Fonseca, F. (2009). Development of an asymmetric PCR-ELISA typing method for *Citrus tristeza virus* based on the coat protein gene. *J Virol Methods* 155, 97-108.
- Nolasco, G., Sequeira, Z., Soares, C., Mansinho, A., Bailey, A. M., Niblett, C. L. (2002). Asymmetric PCR ELISA: Increased sensitivity and reduced costs for the detection of plant viruses. *Eur J Plant Pathol* 108, 293-298.

- Pagan, I., Firth, C., Holmes, E. C. (2010). Phylogenetic analysis reveals rapid evolutionary dynamics in the plant RNA virus genus tobamovirus. *J Mol Evol* 71, 298-307.
- Papayiannis, L. C., Santos, C., Kyriakou, A., Kapari, T., Nolasco, G. (2007). Molecular characterization of *Citrus tristeza virus* isolates from Cyprus on the basis of the coat protein gene. *J Plant Pathol* 89, 291-295.
- Pappu, H., Pappu, S., Niblett, C., Lee, R., Civerolo, E. (1993). Comparative sequence analysis of the coat proteins of biologically distinct citrus tristeza closterovirus isolates. *Virus Genes* 7, 255-264.
- Permar, T. A., Garnsey, S. M., Gumpf, D. J., Lee, R. F. (1990). A monoclonal antibody that discriminates strains of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* 80, 224-228.
- Pond, S. L. K., Frost, S. D. W. (2005). Not so different after all: A comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol Biol Evol* 22, 1208-1222.
- Pond, S. L. K., Posada, D., Gravenor, M. B., Woelk, C. H., Frost, S. D. W. (2006). GARD: a genetic algorithm for recombination detection. *Bioinformatics* 22, 3096-3098.
- Posada, D., Crandall, K. A. (2002). The effect of recombination on the accuracy of phylogeny estimation. *J Mol Evol* 54, 396-402.
- Posada, D., Crandall, K. A., Holmes, E. C. (2002). Recombination in evolutionary genomics. *Annu Rev Genet* 36, 75-97.
- Ramsden, C., Holmes, E. C., Charleston, M. A. (2009). Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for codivergence. *Mol Biol Evol* 26, 143-153.
- Reed, J. C., Kasschau, K. D., Prokhnevsky, A. I., Gopinath, K., Pogue, G. P., Carrington, J. C., Dolja, V. V. (2003). Suppressor of RNA silencing encoded by Beet yellows virus. *Virology* 306, 203-209.
- Rocha-Peña, M. A., Niblett, C. L., Lee, R. F., Ochoa-Corona, F. M., Lastra, R., Garnsey, S. M., Yokomi, R. K. (1995). CTV and its aphid vector *Toxoptera citricida* - threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Dis* 79, 437-444.
- Roistacher, C. N. (1991). Graft-Transmissible Diseases of Citrus. *Handbook for Detection and Diagnosis*. Rome: FAO.

- Roistacher, C. N., Bar-Joseph, M. (1984). Transmission of tristeza and seedling yellows tristeza by small populations of *Aphis gossypii*. *Plant Dis* 68, 494-496.
- Roossinck, M. J. (2003). Plant RNA virus evolution. *Curr Opin Microbiol* 6, 406-409.
- Roy, A., Brlansky, R. H. (2009). Population dynamics of a Florida *Citrus tristeza virus* isolate and aphid-transmitted subisolates: identification of three genotypic groups and recombinants after aphid transmission. *Phytopathology* 99, 1297-1306.
- Roy, A., Brlansky, R. H. (2010). Genome analysis of an orange stem pitting *Citrus tristeza virus* isolate reveals a novel recombinant genotype. *Virus Res* 151, 118-130.
- Roy, A., Ramachandran, P., Brlansky, R. H. (2003). Grouping and comparison of Indian *Citrus tristeza virus* isolates based on coat protein gene sequences and restriction analysis patterns. *Arch Virol* 148, 707-722.
- Roy, A., Manjunath, K. L., Brlansky, R. H. (2005). Assessment of sequence diversity in the 5'-terminal region of *Citrus tristeza virus* from India. *Virus Res* 113, 132-142.
- Roy, A., Ananthkrishnan, G., Hartung, J. S., Brlansky, R. H. (2010). Development and application of a multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction assay for screening a global collection of *Citrus tristeza virus* isolates. *Phytopathology* 100, 1077-1088.
- Rubio, L., Ayllon, M. A., Guerri, J., Pappu, H., Niblett, C., Moreno, P. (1996). Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. *Ann Appl Biol* 129, 479-489.
- Rubio, L., Ayllon, M. A., Kong, P., Fernandez, A., Polek, M., Guerri, J., Moreno, P., Falk, B. W. (2001). Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: Evidence for mixed infections and recombination. *J Virol* 75, 8054-8062.
- Ruiz-Ruiz, S., Moreno, P., Guerri, J., Ambros, S. (2006). The complete nucleotide sequence of a severe stem pitting isolate of *Citrus tristeza virus* from Spain: comparison with isolates from different origins. *Arch Virol* 151, 387-398.
- Ruiz-Ruiz, S., Moreno, P., Guerri, J., Ambros, S. (2007). A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of *Citrus tristeza virus* in different plant tissues. *J Virol Methods* 145, 96-105.
- Sacristan, S., Malpica, J. M., Fraile, A., Garcia-Arenal, F. (2003). Estimation of population bottlenecks during systemic movement of tobacco mosaic virus in tobacco plants. *J Virol* 77, 9906-9911.

- Sambade, A., Lopez, C., Rubio, L., Flores, R., Guerri, J., Moreno, P. (2003). Polymorphism of a specific region in gene p23 of *Citrus tristeza virus* allows discrimination between mild and severe isolates. *Arch Virol* 148, 2325-2340.
- Sambade, A., Ambros, S., Lopez, C., Ruiz-Ruiz, S., de Mendozsa, A. H., Flores, R., Guerri, J., Moreno, P. (2007). Preferential accumulation of severe variants of *Citrus tristeza virus* in plants co-inoculated with mild and severe variants. *Arch Virol* 152, 1115-1126.
- Sanjuan, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M., Belshaw, R. (2010). Viral mutation rates. *J Virol* 84, 9733-9748.
- Saponari, M., Manjunath, K., Yokomi, R. K. (2008). Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan (R)). *J Virol Methods* 147, 43-53.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllon, M. A., Albiach-Marti, M. R., Rabindran, S., Dawson, W. O. (2002). The p23 protein of *Citrus tristeza virus* controls asymmetrical RNA accumulation. *J Virol* 76, 473-483.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Mawassi, M., Albiach-Marti, M. R., Ayllon, M. A., Robertson, C., Garnsey, S. M., Dawson, W. O. (2000). Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology* 278, 253-265.
- Sentandreu, V., Castro, J. A., Ayllon, M. A., Rubio, L., Guerri, J., Gonzalez-Candelas, F., Moreno, P., Moya, A. (2006). Evolutionary analysis of genetic variation observed in *Citrus tristeza virus* (CTV) after host passage. *Arch Virol* 151, 875-894.
- Sequeira, Z., Nolasco, G. (2002). Bacterial expressed coat protein: development of a single antiserum for routine detection of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathologia Mediterranea* 41, 55-62.
- Shapka, N., Nagy, P. D. (2004). The AU-rich RNA recombination hot spot sequence of Brome mosaic virus is functional in tombusviruses: implications for the mechanism of RNA recombination. *J Virol* 78, 2288-2300.
- Suastika, G., Natsuaki, T., Terui, H., Kano, T., Ieki, H., Okuda, S. (2001). Nucleotide sequence of *Citrus tristeza virus* seedling yellow isolate. *J Gen Plant Pathol* 67, 73-77.
- Suchard, M. A., Weiss, R. E., Sinsheimer, J. S. (2001). Bayesian selection of continuous-time Markov chain evolutionary models. *Mol Biol Evol* 18, 1001-1013.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28, 2731-2739.
- Tanaka, T. (1952). Monograph on the satsuma orange (History of the introduction of the satsuma orange into the United States). pp 31-32.
- Tatineni, S., Robertson, C. J., Garnsey, S. M., Bar-Joseph, M., Gowda, S., Dawson, W. O. (2008). Three genes of *Citrus tristeza virus* are dispensable for infection and movement throughout some varieties of citrus trees. *Virology* 376, 297-307.
- Tennant, P. F., Fisher, L. C., McLaughlin, W. A. (2010). Detection and characterization of *Citrus tristeza virus* stem pitting isolates in Jamaica. *Eur J Plant Pathol* 127, 1-6.
- Toxopeus, H. J. (1937). Stock-scion incompatibility in citrus and its cause. *J Pomol Hort Sci* 14, 360-364.
- Tsai, J. H., Liu, Y. H., Wang, J. J. (2000). Recovery of orange stem pitting strains of *Citrus tristeza virus* (CTV) following single aphid transmissions with *Toxoptera citricida* from a Florida decline isolate of CTV. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 113, 75-78.
- Van Vuuren, S. P., Van der Vyver, J. (2000). Comparison of South African pre-immunizing citrus tristeza isolates with foreign isolates in three grapefruit selections. In: Yokomi RK, Lee RF, Da Graca JV, eds. *Proc. 14th Conf. IOCV. IOCV, Riverside.*, pp 50-56.
- Van Vuuren, S. P., Collins, R. P., da Graca, J. V. (1993). Evaluation of *Citrus tristeza virus* Isolates for Cross Protection of Grapefruit in South-Africa. *Plant Dis* 77, 24-28.
- Van Vuuren, S. P., Van der Vyver, J. B., Luttig, M. (2000). Diversity among sub-isolates of cross protecting *Citrus tristeza virus* isolates in South Africa. In: Yokomi RK, Lee RF, Da Graca JV, eds. *Proc. 14th Conf. IOCV. IOCV, Riverside.*, pp 103-109.
- Vives, M. C., Rubio, L., Sambade, A., Mirkov, T. E., Moreno, P., Guerri, J. (2005). Evidence of multiple recombination events between two RNA sequence variants within a *Citrus tristeza virus* isolate. *Virology* 331, 232-237.

- Vives, M. C., Rubio, L., Lopez, C., Navas-Castillo, J., Albiach-Marti, M. R., Dawson, W. O., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P. (1999). The complete genome sequence of the major component of a mild *Citrus tristeza virus* isolate. *J Gen Virol* 80, 811-816.
- Webber, H. J. (1943). The tristeza disease of sour-orange rootstock. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 43, 160-167.
- Webber, H. J. (1967). History and development of the Citrus Industry, p. 1-39. In W. R. (ed.) *The Citrus Industry, Vol. I, Univ. Calif. Div. Agr. Sci., Riverside*
- Weng, Z., Barthelson, R., Gowda, S., Hilf, M. E., Dawson, W. O., Galbraith, D. W., Xiong, Z. (2007). Persistent infection and promiscuous recombination of multiple genotypes of an RNA virus within a single host generate extensive diversity. *PLoS ONE* 2, e917.
- Weng, Z., Liu, X., Gowda, S., Barthelson, R., Galbraith, D., Dawson, W., Xiong, Z. (2010). Extreme genome stability of *Citrus tristeza virus*. In: *Book of abstracts of the 18th IOCV Conference, November 07-12, 2010, Campinas, SP, Brazil.*
- Yang, Z. N., Mathews, D. M., Dodds, J. A., Mirkov, T. E. (1999). Molecular characterization of an isolate of *Citrus tristeza virus* that causes severe symptoms in sweet orange. *Virus Genes* 19, 131-142.
- Yokomi, R. K., Lastra, R., Stoetzel, M. B., Damsteegt, V. D., Lee, R. F., Garnsey, S. M., Gottwald, T. R., Rocha-Peña, M. A., Niblett, C. L. (1994). Establishment of the Brown Citrus Aphid (Homoptera, Aphididae) in Central-America and the Caribbean Basin and Transmission of *Citrus tristeza virus*. *J Econ Entomol* 87, 1078-1085.