



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

**Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais**

**VARIABILIDADE GENÓMICA DE *Citrus tristeza virus*  
E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Citrus aurantium* L. COM VISTA  
À OBTENÇÃO DE RESISTÊNCIA**

**NATÁLIA TOMÁS MARQUES**

**FARO**

2003



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

**Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais**

**VARIABILIDADE GENÓMICA DE *Citrus tristeza virus*  
E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Citrus aurantium* L. COM VISTA  
À OBTENÇÃO DE RESISTÊNCIA**

**NATÁLIA TOMÁS MARQUES**

Dissertação apresentada na Universidade do Algarve para obtenção do grau de doutor no Ramo de Biologia, Especialidade de Biotecnologia.

**FARO**

2003

## AGRADECIMENTOS

Desejo expressar o meu agradecimento ao Professor Doutor Gustavo Nolasco, meu orientador, a quem devo a proposta do tema da presente dissertação e a formação que adquiri ao longo destes anos. Os ensinamentos e o apoio constantes, bem como as condições materiais que me proporcionou durante a execução prática deste trabalho foram essenciais à sua concretização. Agradeço-lhe também a revisão cuidada e os comentários ao texto da tese.

Ao Professor Doutor José Manuel Leitão, co-orientador da presente dissertação, quero agradecer a sua disponibilidade e o estímulo constantes. Os conhecimentos que me transmitiu e as condições materiais que me disponibilizou permitiram levar a bom termo o presente trabalho. Agradeço-lhe ainda a análise crítica da presente tese.

À Prof. Doutora Leonor Faleiro quero agradecer as preciosas sugestões na elaboração de protocolos de microbiologia. Estes agradecimentos são ainda extensíveis aos colegas Prof. Doutor Amílcar Duarte, Prof. Doutora Filomena Fonseca e Prof. Doutora Graça Miguel pela pronta colaboração que me ofereceram.

Também quero deixar expresso o meu agradecimento à Prof. Doutora Deborah Power por ter disponibilizado as condições materiais para realizar a técnica Southern Blot pelo método radioactivo. Agradeço à Mestre Rute Martins por me ter acompanhado e orientado durante a realização dessa técnica.

À Direcção Regional de Agricultura, na pessoa do Eng. Celso Mendes, o meu muito obrigado pelas facilidades que me proporcionaram na sementeira e manutenção das plantas de *Citrus aurantium* cv. Brazilian, sem as quais este trabalho não teria sido possível.

Agradeço à Prof. Doutora Margarida Oliveira da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa as estirpes bacterianas que me forneceu, necessárias à execução deste trabalho. Agradeço-lhe igualmente os conselhos que me proporcionou.

Agradeço ao Prof. Doutor Rogério Tenreiro, que amigavelmente permitiu a utilização de software específico para algumas das análises de variabilidade genómica.

Também agradeço aos colegas de laboratório e especialmente à Lic. Carla Santos, ao Rui Canário e à Mestre Teresa Sancho a sua valorosa ajuda no dia a dia de trabalho no laboratório, que muito contribuíram para a concretização desta tese. À Lic. Patrícia Dias agradeço a sua preciosa colaboração na extracção de centenas de amostras de DNA genómico.

Agradeço a todos os que, embora não sejam mencionados, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

No presente trabalho foi estudada a variabilidade genómica da região terminal 3' do CTV com o objectivo de conhecer quais as regiões mais conservadas que podem ser usadas em transformação genética para obter resistência contra o vírus.

A partir de um painel de isolados de diferentes origens geográficas e com diversas características biológicas, foram analisados os genes das proteínas p18, p13, p20, p23 e a região 3'UTR. Na maioria dos isolados analisados foi detectado a existência de múltiplas variantes genómicas com uma estrutura do tipo “quasispecies”, por Single Stranded Conformation Polymorphisms (SSCP). Por sequenciação genómica confirmaram-se os dados de SSCP e foram estabelecidos agrupamentos de sequências de acordo com as características biológicas. A região 3'UTR distinguiu-se como a região genómica mais conservada, sendo assim a mais indicada a usar num processo de transformação genética.

Os isolados e clones do gene da p25 (ou gene da proteína do capsídeo) foram analisados pela técnica Cleavase Fragment Length Polymorphism (CFLP) e agruparam-se segundo a origem geográfica e as propriedades biológicas. Foi notória a capacidade do CFLP na discriminação e tipificação de isolados diferentes de CTV.

A transformação genética do porta-enxerto *Citrus aurantium* cv. Brazilian, mediada pelo vector natural *Agrobacterium tumefaciens*, foi conseguida por dois processos distintos. Determinou-se a densidade bacteriana das estirpes C58 (nopalina) ou EHA105 (L,L-succinamopina) transportando o plasmídeo p35SGUSINT, associada à frequência mais elevada de transformação. Foram transformados rebentos adventícios com o gene *uidA*, baseado no estabelecimento de um sistema de regeneração *de novo* a partir de segmentos de entrenós provenientes de plantas com cerca de 12 meses. Outro processo de transformação genética simplificado e que evita a manutenção de culturas *in vitro*, foi testado em embriões de sementes com 1, 5 e 7 dias de germinação. As plantas foram transformadas com uma construção que contém o gene da CP do CTV de uma estirpe tipificada de “mild”, sob a acção de uma sequência  $\Omega$  e de um “enhancer”, os quais aumentam a tradução e a expressão do gene.

**Palavras chave:** variabilidade genómica; *Citrus tristeza virus*; SSCP; CFLP; transformação genética; *Citrus aurantium*; *Agrobacterium tumefaciens*.

## ABSTRACT

The genomic variability of the 3' terminal region of *Citrus tristeza virus* (CTV) was studied in order to identify the most conserved regions, which could be used for resistance induction against the virus by genetic transformation.

From a panel of isolates with different origins and displaying different biological properties, genomic regions coding for proteins p18, p13, p20, p23 and the 3'UTR region were studied. In the most of the isolates, a population of genomic variants with a "quasispecies" structure was detected by Single Stranded Conformation Polymorphisms (SSCP) analysis. Moreover, some isolates were composed by two mixed populations. After sequence analysis, the most frequent variants from each isolate and some of the less frequent variants, were grouped according to its biological characteristics. 3'UTR region was found to be the most conserved region, and therefore indicated to use in a genetic transformation.

Cleavase Fragment Length Polymorphism (CFLP) was used to analyse isolates and clones of the CP gene (p25). Isolates were grouped, according to their geographic origin and biological properties using this technique revealing to be a notorious tool in CTV discrimination and typification.

The genetic transformation of the rootstock *Citrus aurantium* cv. Brazilian, was carried out successfully by two different procedures using the natural vector *Agrobacterium tumefaciens*. The more adequate bacterial density to use in a transformation process was determined and the optimal value achieved was 0.6. Transformation efficiency of two strains, EHA105 (L, L-succinamopine) and C58 (nopaline) carrying both plasmid p35SGUSINT, was determined and similar values for both strains were registered. Adventitious shoots from internode segments of 12 months old plants were transformed with the *uidA* gene. A simpler process, which avoids the *in vitro* culture, was developed based on transformation of seedlings with 1, 5 and 7 germination days. In this transformation process CP gene from a "mild" isolate was used. Previously to the transformation CP gene was inserted in the T-DNA of the pBI121 vector, carrying a  $\Omega$  sequence and an enhancer to increase the transduction efficiency and gene expression.

**Key words:** Genomic variability; *Citrus tristeza virus*; SSCP; CFLP; genetic transformation; *Citrus aurantium*; *Agrobacterium tumefaciens*.

## Símbolos e Abreviaturas

A	- Absorvância	<i>npt</i> II	- Gene codificante da neomicina fosfotransferase II
A.C.	- Antes de Cristo	nt	- nucleótido
Amp	- Antibiótico ampicilina	ORF	- "Open reading frame"
ATP	- Adenosina trifosfato	p/v	- peso/volume
BA	- 6-Benzilaminopurina (benziladenina)	pBI 121	- Plasmídeo de 13 Kb
BCIP	- 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato	PBS	- "Phosphate Buffered Saline"
BSA	- "Bovine serum albumin"	pb	- pares de bases
BYV	- " <i>Beet yellow virus</i> "	PCR	- "Polymerase chain reaction"
CaMV	- Vírus do mosaico da couve-flor	PVP	- Polivinilpirrolidona
Can	- Antibiótico canamicina	RB	- "Right border" do T-DNA
Cap.	- Capítulo	Ref.	- Referência
cDNA	- DNA complementar	RNA	- Ácido ribonucleico
Cef	- Antibiótico cefotaxima	mRNA	- Ácido ribonucleico mensageiro
CFLP	- "Cleavase fragment length polymorphism"	RNase	- Ribonuclease
cm	- Centímetro	rpm	- Rotações por minuto
CP	- Proteína do capsídeo ("coat protein")	RT-PCR	- "Reverse Transcriptional - Polimerase Chain Reaction"
CTV	- " <i>Citrus tristeza virus</i> "	SDS	- Dodecil sulfato de sódio
D.O.	- Densidade óptica	Sec.	- Secção
DIG-11-dUTP	- Digoxigenina-11-2'-desoxi-uridina-5'-trifosfato.	Séc.	- Século
DNA	- Ácido desoxirribonucleico	seg	- Segundos
d.p.	- Desvio padrão	siRNA	- "Small interfering RNA"
ds	- Cadeia bicatenária (de DNA/RNA)	ss	- Cadeia monocatenária (de DNA/RNA)
DTT	- Ditiotreitól	SSCP	- Polimorfismos conformacionais monocatenários ("Single Stranded Conformation Polymorphisms")
EDTA	- Tetra-acetato de etileno diamina	TAE	- Tampão Tris-acetato-EDTA
ELISA	- "Enzyme linked immunosorbent assay"	<i>Taq</i> DNA Polimerase	- Polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
<i>E. coli</i>	- Bactéria <i>Escherichia coli</i>	TBE	- Tampão Tris-borato-EDTA
Est.	- Estampa	T-DNA	- Fragmento de DNA do plasmídeo Ti de <i>Agrobacterium</i> que é integrado no genoma vegetal
<i>et al.</i>	- <i>et alia</i>	TEMED	- N,n,n',n', tetrametiletilendiamina
Fig.	- Figura	Ti	- Plasmídeo nativo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
g	- Grama	Tris	- Tris (hidroximetil) aminometano
GUS	- β-Glucuronidase	Triton X-100	- Éter de polioxietileno
h	- Horas	Tween 20	- Polioxietileno sorbitanomono-oleato
IC/RT-PCR	- "Immunocapture/Reverse transcriptional-polymerase chain reaction"	ufc	- Unidades formadoras de colónias
IgG	- Imunoglobulina G	<i>uidA</i>	- Gene codificante da β-Glucuronidase
InvαF'	- Designação de um genótipo de <i>E. coli</i>	UTR	- Região terminal não traduzida
kDa	- kilodalton	UV	- Radiação ultravioleta
Kb	- kilobases	v/v	- volume/volume
l	- litro	Vol.	- Volume
LB	- "left border" do T-DNA	X-gal	- 5-bromo-4 cloro-3 indolyl-β-D-galactopiranosídeo
LB (meio de cultura)	- Meio de cultura Luria Bertani	X-Gluc	- Ácido 5-bromo, 4-cloro, 3-indolil, β-D-glucurónido
ml	- Mililitro	μl	- Microlitro
M	- Molar	μg	- Micrograma
mbar	- milibar	μM	- Micromolar
min	- Minutos	°C	- Grau centígrado
MM	- Massa molar	β	- Beta
mM	- Milimolar	λ	- Comprimento de onda (lambda)
MOPS	- ácido 3-(N-morfolino propano sulfónico)	Ω	-Omega
MUG	- 4-Metilumbeliferil β-D-glucurónido		
NAA	- Ácido α-naftaleno 1-acético		
NBT	- cloreto de 4-nitroblue tetrazolium		
ng	- Nanograma		
<i>nos</i>	- Gene codificante da nopalina sintase		
NPT II	- Neomicina fosfotransferase II		

# ÍNDICE

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	IV
Símbolos e Abreviaturas	V
<b>Capítulo 1</b>	
<b>Introdução Geral</b>	1
1.1 - A Tristeza e a citricultura	1
1.2 - Transmissão e vectores do CTV	2
1.3 - Sintomas da Tristeza e plantas indicadoras	3
1.3.1 – Sintomas “quick decline”	4
1.3.2 - Sintomas “seedling yellows”	4
1.3.3 – Sintomas ” stem pitting”	5
1.3.4 - Sintomas atenuados ou “mild”	6
1.4 - Espécies hospedeiras do CTV	6
1.5 - Controlo e diagnóstico da Tristeza	6
1.6 – Organização genómica do CTV	8
1.7 - Replicação e expressão do genoma do CTV	10
1.8 - Variabilidade genómica	11
1.8.1 – Causas intrínsecas da variabilidade genómica	12
1.8.2 - Factores exteriores que afectam a variabilidade genómica ao nível da população de CTV	13
1.9 - Transformação genética com vista à obtenção de resistência	14
1.9.1 - Mecanismos responsáveis pela indução de resistência	16
1.9.2 - Transformação genética mediada pelo <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
1.9.3 - A transformação genética de plantas do género <i>Citrus</i>	21
<b>Objectivos do presente trabalho</b>	27
<b>Capítulo 2</b>	
<b>Material e Métodos</b>	
2.1 – Designação científica das espécies de <i>Citrus</i>	29
2.2 - Caracterização dos isolados de CTV analisados	29
2.3 – Composição de algumas soluções e meios de cultura	30
2.4 – Amplificação de genes virais por “Immunocapture/Reverse Transcriptional-Polymerase Chain Reaction” (IC/RT-PCR), a partir de plantas infectadas	32
2.4.1 - Preparação do material vegetal	32
2.4.2 – IC/RT-PCR	32
2.5 - Amplificação por “Polymerase Chain Reaction” (PCR)	33
2.5.1 - Amplificação a partir de DNA plasmídico ou genómico	33
2.5.2 - Amplificação por PCR simultânea com “5’ exonuclease assay” (TaqMan)	33
2.6 - Concepção de “primers”	34
2.7 - Visualização e quantificação de DNA	36
2.8 - Clonagem dos produtos de PCR	38
2.8.1 - Ligação	38
2.8.2 – Digestão enzimática	39
2.8.3 - Preparação de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	39
2.8.4 - Transformação de células competentes de <i>E. coli</i>	40
2.8.5 - Selecção de transformantes	40
2.9 - Purificação e extracção de fragmentos de DNA e de RNA	41
2.9.1 – Extracção de DNA de géis de agarose	41

2.9.2 - Extração de DNA plasmídico em pequena escala (“miniprep”) pelo kit “Wizard®Plus Minipreps”	41
2.9.3 - Extração de DNA genómico de tabaco e de citrinos	42
2.9.4 - Extração de RNA	43
2.9.5 – Purificação de fragmentos de DNA pelo kit “MicroSpin™ Columns”	43
2.9.6 – Precipitação de DNA plasmídico	43
2.10 – Immunodot Blot	44
2.11 - Southern Blot	44
2.12 – Análise da variabilidade genómica do CTV	46
2.12.1 - Single stranded conformation polymorphisms (SSCP)	46
2.12.2 - Cleavase Fragment Length Polymorphism (CFLP)	47
2.12.3 - Sequenciação	47
2.13 - Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por conjugação triparental	48
2.14 - Curva de crescimento das estirpes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> usadas na transformação genética	49
2.15 – Indução da formação de rebentos adventícios a partir de segmentos de entrenós	49
2.15.1 – Preparação do material vegetal	49
2.15.2 – Meio de cultura testado e condições de incubação	50
2.15.3 – Quantificação dos resultados	50
2.16 - Tolerância dos segmentos de entrenós aos antibióticos cefotaxima e canamicina	51
2.17 – Transformação genética mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	51
2.17.1 - Material vegetal, meios de cultura e condições de incubação	51
2.17.1.1 - Condições de cultura de <i>Nicotiana tabacum</i>	51
2.17.1.2 - Condições de cultura de <i>Citrus aurantium</i>	52
2.17.2 – Transformação genética	52
2.17.2.1 - Transformação de <i>Nicotiana tabacum</i>	52
2.17.2.2 – Transformação genética de laranjeira azeda cv. Brazilian	53
2.17.2.2.1 - Transformação de rebentos adventícios	53
2.17.2.2.2 – Transformação de sementes germinadas	54
2.18 - Processos de enxertia dos rebentos adventícios	55
2.18.1 - Microenxertia	55
2.18.2 - Enxertia	56
2.19 – Detecção da enzima $\beta$ -glucuronidase	56
2.20 – Tratamento estatístico	56

### Capítulo 3

#### Diversidade genómica da população de CTV

3.1 - Introdução	59
3.1.1 - Single Stranded Conformation Polymorphisms (SSCP)	59
3.1.2 - Cleavase Fragment Length Polymorphism (CFLP)	60
3.2 – Estudo da variabilidade genómica da região terminal 3’ do CTV por SSCP e sequenciação genómica	61
3.2.1 - Amplificação das regiões genómicas	61
3.2.2 - Caracterização dos padrões de SSCP	64
3.2.3 - Variabilidade da região terminal 3’ (genes codificantes das proteínas p18, p13, p20 e p23 e região 3’UTR)	67
3.2.3.1 - Frequência relativa das variantes genómicas	67
3.2.3.2 - Análise das sequências	68
3.2.3.3 – Estudo quantitativo da variabilidade genómica do CTV	70
3.2.4 – Estudo da relação entre isolados	72
3.2.5 - Discussão	76
3.2.5.1 - Caracterização dos padrões de SSCP	76
3.2.5.2 - Factores que afectam a detecção da variabilidade genómica na análise de SSCP	77

3.2.5.2.1 - Condições de electroforese	77
3.2.5.2.2 - Dimensão do fragmento de DNA a analisar	77
3.2.5.2.3 – Erros introduzidos pelas enzimas de polimerização de ácidos nucleicos <i>Rtase</i> e <i>Taq</i> DNA polimerase	78
3.2.5.2.4 - Amplificação selectiva através dos “primers”	79
3.2.5.3 – Capacidade de discriminação de variantes genómicas por SSCP	79
3.2.5.4 - Análise da variabilidade genómica	80
3.3 – Estudo da variabilidade genómica do gene da CP do CTV por CFLP	84
3.3.1 – Amplificação do gene da CP	84
3.3.2 - Optimização da temperatura de digestão da <i>Cleavase</i> e reprodutibilidade dos resultados	85
3.3.3 - Análise de clones do gene da CP por CFLP	86
3.3.4 – Tipificação de material vegetal infectado com base na análise de CFLP	89
3.3.5 - Análise dos 16 clones do gene da CP por SSCP	92
3.3.6 – Discussão	92
3.3.6.1 - Optimização da técnica CFLP e digestão pela <i>Cleavase</i>	92
3.3.6.2 - Capacidade de análise do CFLP na distinção e agrupamento das sequências nucleotídicas em comparação com o SSCP	93
3.3.6.3 - Capacidade de análise do CFLP na tipificação de isolados de CTV	94

## Capítulo 4

### Preparação de um vector de transformação com o gene da proteína do capsídio do CTV e ensaio em *Nicotiana tabacum*

4.1 - Introdução	97
4.2 – Preparação do vector de transformação	98
4.3 - Transformação de uma planta modelo, <i>Nicotiana tabacum</i>	102
4.3.1 - Detecção da presença e expressão do gene da CP	102
4.4 – Discussão	104

## Capítulo 5

### Transformação de *Citrus aurantium* L. cv. Brazilian mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

5.1 - Introdução	105
5.2 - Ensaio prévios	106
5.2.1 - Indução da formação de rebentos adventícios	106
5.2.1.1 – Avaliação da concentração hormonal mais adequada à neoformação de rebentos adventícios	107
5.2.1.2 – Análise da capacidade organogénica dos segmentos de entrenós em função da posição no ramo e da idade da planta	109
5.2.1.3 – Enraizamento dos rebentos adventícios	110
5.2.1.4 – Discussão	111
5.2.2 - Curva de crescimento da bactéria <i>Agrobacterium tumefaciens</i> estirpes EHA 105 e C58	113
5.2.2.1 – Discussão	115
5.2.3 - Tolerância aos antibióticos canamicina e cefotaxima	116
5.2.3.1 – Discussão	117
5.3 - Estudos de transformação genética	118
5.3.1 – Transformação genética de segmentos de entrenós	118
5.3.1.1. - Análise da eficiência de transformação	118
5.3.1.2 - Análise da expressão do gene <i>uidA</i>	121
5.3.1.2.1 - Amplificação por PCR do gene <i>uidA</i>	121
5.3.1.2.2 - Amplificação por PCR do gene <i>npt II</i>	121
5.3.1.2.3 - Análise Southern Blot	122
5.3.1.2.4 - Análise ao mRNA	123

5.3.2 - Transformação de sementes germinadas	124
5.3.2.1 - Análise da eficiência de transformação	124
5.3.2.2 - Análise da expressão do gene da CP	124
5.3.2.2.1 - Amplificação por PCR do gene da CP	124
5.3.2.2.2 - Análise TaqMan ou “5’ exonuclease assay”	126
5.3.2.2.3 - Análise por sequenciação	127
5.3.2.2.4 - Análise Southern Blot	129
5.3.2.2.5 – Análise ao mRNA	130
5.3.2.2.6 – Análise Immunodot Blot	131
5.3.3 - Discussão	132
5.3.3.1 - Aspectos gerais	132
5.3.3.2 - Transformação de segmentos de entrenós	132
5.3.3.3 - Transformação de sementes germinadas	138
<b>Conclusão final</b>	141
Anexo I	145
Anexo II	147
Anexo III	159
<b>Bibliografia</b>	163

# INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 - A TRISTEZA E A CITRICULTURA

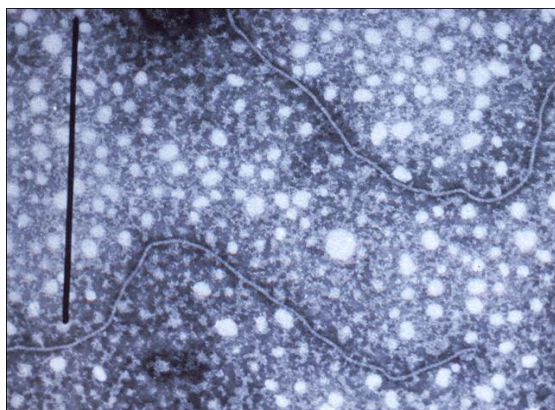
Os citrinos tiveram origem provavelmente na Ásia oriental, numa região que se estende desde a vertente meridional dos Himalaias até à China meridional (Agusti, 2000). A sua introdução na Europa foi feita ao longo dos séculos. No final do séc. XV, após a descoberta da rota do Cabo da Boa Esperança até à Índia, os portugueses introduziram a laranjeira doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] na Europa (Carrero, 1981).

Os citrinos eram inicialmente propagados em pé franco, por semente, mas uma epidemia de *Phytophthora* spp., no séc. XIX, provocou a morte de milhares de laranjeiras doces e induziu a alteração nos métodos de cultura. Esta deixou de ser feita em pé franco e as variedades de interesse passaram a ser enxertadas em porta-enxertos. A laranjeira azeda (*C. aurantium* L.) tornou-se o porta-enxerto mais difundido nas regiões citrícolas por ser tolerante ao fungo *Phytophthora* spp. (Bar-Joseph *et al.*, 1989). As características de boa adaptabilidade a solos calcários, o vigor que transmite à variedade enxertada, o aumento da produção e da qualidade do fruto, foram responsáveis pela sua larga difusão na Bacia Mediterrânica. Adicionalmente, a resistência a outras doenças de origem viral como a xiloporosis, a psoriasis e a exocortis, assim como a compatibilidade demonstrada com a maior parte das variedades de citrinos, fizeram desta espécie uma das mais utilizadas como porta-enxerto (Agusti, 2000).

O termo Tristeza surgiu em 1937 no Brasil (Moreira, 1942). A distribuição desta doença de origem viral é ampla, afectando a maioria das zonas citrícolas do mundo (Acosta *et al.*, 1994). No entanto, há países onde ainda não ocorreram graves epidemias da doença. A manifestação de um determinado quadro sintomatológico e a intensidade particular da Tristeza numa dada região depende das variedades/porta-enxerto presentes, das condições climáticas, dos vectores e dos isolados do *Citrus tristeza virus* (CTV) existentes, o agente causal da doença. A Tristeza pode também estar presente de uma forma assintomática, em espécies como a laranjeira doce [*C. sinensis* (L.) Osbeck], a tangerineira (*C. reticulata* Blanco) e a toranjeira (*C. paradisi* Macfad.), em pé franco ou enxertadas em porta-enxertos tolerantes. Manifestações destrutivas do CTV em grande escala ocorreram na Argentina, Califórnia e Brasil,

onde se refere, desde 1930, o declínio e a morte de milhares de árvores de laranjeira doce enxertadas em laranjeira azeda, traduzido em grandes impactos económicos (Bar-Joseph *et al.*, 1979a; Rocha-Peña *et al.*, 1995; Morera, 1997). Em Portugal e na maioria dos países da região Mediterrânica, o CTV está presente e foram já identificados isolados atenuados e severos. A progressiva propagação da Tristeza a nível mundial e a sensibilidade da laranjeira azeda ao CTV vieram a ter como consequência a substituição da laranjeira azeda por porta-enxertos tolerantes ao vírus (Rocha-Peña *et al.*, 1995).

Kitajima *et al.* (1963) associaram, pela primeira vez, o quadro sintomatológico da Tristeza à presença de partículas virais filamentosas. O CTV é um membro do género *Closterovirus*, pertencente à família *Closteroviridae*. Na planta infectada, o vírus encontra-se preferencialmente nas células floémicas (Bar-Joseph *et al.*, 1970; Zhou *et al.*, 2002), onde se acumula sob a forma de inclusões amorfas (Schneider, 1954). As partículas de CTV têm uma estrutura flexível (Fig. 1.1) com cerca de 2000 nm de comprimento x 11 nm de largura (Acosta *et al.*, 1994), com simetria helicoidal (Dolja *et al.*, 1994). A partícula viral de CTV é coberta pelas duas proteínas da cápside viral. A proteína do capsídio p25 (CP) cobre cerca de 95% do vírus, enquanto a proteína do capsídio p27 (dCP) cobre a extremidade 5' da partícula viral (Febres *et al.*, 1996; Zinovkin *et al.*, 1999, citado em Hull, 2002).



**Fig. 1.1** - Partícula viral do CTV numa fotografia tirada ao microscópio electrónico de transmissão.

A barra a preto corresponde a 55 nm.

Roberts, P.D., McGovern, R.J., Lee, R.F., Niblett, C.L., *in*: [http://edis.ifas.ufl.edu/BODY\\_CH089](http://edis.ifas.ufl.edu/BODY_CH089), 16.4.03.

## 1.2 - TRANSMISSÃO E VECTORES DO CTV

O CTV é transmitido naturalmente por um conjunto diverso de afídios. A transmissão faz-se de forma semipersistente (Lee *et al.*, 1994) e pode ocorrer nos 30 a 60 min após a sua aquisição (Bar-Joseph *et al.*, 1979a).

O afídio mais eficiente é o *Toxoptera citricida* (Kirk.) (Lee *et al.*, 1994). Actualmente encontra-se presente na América do Sul, na América Central, na Florida,

Califórnia, na África do Sul, na Austrália, na Ásia, no Japão e na China (Bar-Joseph et al., 1979a; Lee et al., 1994). Em Espanha e em Portugal Continental o *T. citricida* ainda não foi detectado, mas na Ilha da Madeira foi observada a sua presença desde 1994 (Aguiar et al., 1994). Em Portugal continental encontram-se todas as outras espécies descritas como transmissoras do CTV (Ilharco, 1978). Segundo Ramos et al. (2000), na região do Algarve, na zona do barlavento, o vector predominante é o *T. aurantii* Boyer de Fonscolombe, enquanto no sotavento é predominante o *A. citricola* (Van der Goot) (anteriormente designado de *A. spiraecola* Patch). O vector *A. craccivora* (Koch) é o menos frequente na região do Algarve (Ramos et al., 2000). Estes e outros afídios também associados à transmissão do CTV como o *Myzus persicae* (Lube.) e o *Uroleucon jaceae* (Linnaeus), apresentam uma eficiência de transmissão menor que o *T. citricida* (Hermozo de Mendoza et al., 1984).

Apesar dos afídios serem o principal factor de transmissão do CTV, o Homem, através da comercialização e transporte de material de propagação infectado, tem sido o responsável pela propagação da doença a grande distância. A enxertia constitui assim uma via de transmissão. O vírus também pode infectar a planta por corte da mesma com lâminas infectadas com preparações purificadas do vírus (Garnsey et al., 1977). Não há evidência de transmissão por semente (Bar-Joseph et al., 1979a).

### **1.3 – SINTOMAS DA TRISTEZA E PLANTAS INDICADORAS**

Os sintomas causados pelo CTV dependem do isolado, da planta hospedeira, do estágio de desenvolvimento da planta e da combinação variedade/porta-enxerto. Para um conhecimento das características biológicas de um isolado, é assim necessário a sua inoculação em várias plantas indicadoras, nomeadamente a limeira mexicana [*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle], a toranjeira, a laranjeira doce e a laranjeira doce sobre o porta-enxerto laranjeira azeda (Garnsey et al., 1987). A limeira mexicana é a espécie indicadora mais sensível, uma vez que, à excepção de isolados de CTV extremamente atenuados como o isolado K (Bove et al., 1988), todos os isolados provocam o aparecimento de sintomas (Garnsey et al., 1987). Alguns dos sintomas observados nesta espécie consistem em aclaramento irregular das nervuras (“vein clearing”), as folhas em forma de colher (“leaf cupping”), as caneladuras do lenho (“stem pitting”) e a suberificação das nervuras (“vein corking”). Muitos isolados apenas causam estes sintomas em algumas espécies indicadoras.

### 1.3.1 – Sintomas “quick decline”

O “quick decline”, também designado de “tristeza sensu stricto”, consiste na incompatibilidade entre o porta-enxerto laranjeira azeda ou limoeiro [*C. limon* (L.) Burm.f] e a variedade enxertada (excepto laranjeira azeda sobre laranjeira azeda ou limoeiro sobre limoeiro). A necrose do floema na zona de união da enxertia leva à morte progressiva do sistema radicular, provocando o declínio da árvore (Fig. 1.3), o qual pode ser gradual ou muito rápido, levando à morte da planta (Fig. 1.2). Abaixo da união de enxertia podem observar-se também projecções do xilema na parte interna da casca, sintomas descritos como “pinholing” (ou “inverse-stem-pitting” ou “honeycombing”) (Wallace, 1978). A planta indicadora do “quick decline” é a laranjeira doce enxertada em laranjeira azeda.



**Fig. 1.2** – À direita: laranjeira doce enxertada em laranjeira azeda com sintomas de “quick decline”. À esquerda: árvore saudável enxertada em citranjeira Troyer, tolerante à Tristeza. Fotografia de Roistacher, C.N. *in*: [http://www.ecoport.org/EP.exe\\$PassCheckStart?ID=S97](http://www.ecoport.org/EP.exe$PassCheckStart?ID=S97) (05.10.03).



**Fig. 1.3** - Árvore zona de enxertia. laranjeira doce R.F., *in*:

infectada pelo CTV apresenta saliência no caule, na Este sintoma “quick decline” está presente numa enxertada em laranjeira azeda. Fotografia de Lee,

[http://www.ecoport.org/EP.exe\\$PassCheckStart?ID=S97](http://www.ecoport.org/EP.exe$PassCheckStart?ID=S97) (05.10.03).

### 1.3.2 – Sintomas “Seedling yellows”

O conjunto de sintomas “seedling yellows” está normalmente associado a plântulas ou plantas mantidas em estufa e traduz-se na clorose e declínio da planta. As folhas apresentam torção longitudinal e crescimento desigual de ambos os lados da nervura central. Mais tarde as folhas tornam-se cloróticas e de comprimento reduzido (Fig. 1.4). A parte radicular da planta também é afectada, com a morte de numerosas radículas e com a concomitante paragem do crescimento. Embora estes sintomas

possam culminar na morte da planta, é mais frequente prolongarem-se durante meses e anos, podendo atenuar-se e as plantas recuperarem o crescimento e o aspecto normal (Wallace, 1978). Plântulas de laranjeira azeda, de limoeiro e de toranjeira são plantas indicadoras dos sintomas “seedling yellows”.



**Fig. 1.4** - Folhas cloróticas (“seedling yellows”) de um limoeiro mantido em estufa, provocado por um isolado de Israel. Fotografia de Roistacher, C.N., *in*: [http://www.ecoport.org/EP.exe\\$PassCheckStart?ID=S102](http://www.ecoport.org/EP.exe$PassCheckStart?ID=S102) (05.10.03).

### 1.3.3 – SINTOMAS “STEM PITTING”

Os isolados causadores de “stem pitting” em laranjeira doce, toranjeira (*C. paradisi* Macfad.) e tangerineira, afetam o crescimento da árvore e a sua produtividade, mas não causam a morte da planta. Um dos sintomas é a presença de caneladuras longitudinais no lenho (Fig. 1.5). Se forem de pequenas dimensões, só são visíveis por baixo da casca da árvore. Outro sintoma é o aclaramento irregular das nervuras da folha (“vein clearing”). A suberificação e o fendilhamento das nervuras também pode ocorrer (“vein corking”). Estes isolados são conhecidos como os mais severos, uma vez que provocam a degeneração do sistema radicular e o enfraquecimento dos ramos que se quebram com o vento, ou com o peso da fruta. Também podem provocar a redução na produtividade da planta e redução na dimensão e qualidade dos frutos, que apresentam um baixo teor em sumo e uma acidez elevada (Wallace, 1978). As plantas indicadoras dos sintomas “stem pitting” são a toranjeira *C. paradisi* Macfad. cv. Duncan e a laranjeira doce cv. Madam Vinous (Lee *et al.*, 1994).



**Fig. 1.5** - Caneladuras longitudinais no lenho (“stem pitting”) do caule de laranjeira doce cv. Madam Vinous, um sintoma induzido pelo isolado 12B. Fotografia de Roistacher, C.N. *in*: [http://www.ecoport.org/EP.exe\\$PassCheckStart?ID=S103](http://www.ecoport.org/EP.exe$PassCheckStart?ID=S103) (05.10.03).

### 1.3.4 - Sintomas atenuados ou “mild”

Os isolados “mild” de CTV muitas vezes não causam sintomas noutras espécies para além da limeira mexicana. Nesta, os sintomas consistem em “stem pitting” e aclaramento das nervuras pouco intenso (Fig. 1.6).

Os isolados “mild” são usados na protecção cruzada. Esta baseia-se na infecção de plantas sãs com isolados “mild” para as proteger de eventuais infecções que venham a ocorrer com isolados severos que provocam “stem pitting” ou “quick decline”.



**Fig. 1.6** - Sintoma de aclaramento das nervuras (“vein clearing”) em folhas de limeira mexicana.

Fotografia de Roistacher, C.N., in: [http://www.ecoport.org/EP.exe\\$PassCheckStart?ID=S98](http://www.ecoport.org/EP.exe$PassCheckStart?ID=S98) (05.10.03).

## 1.4 - ESPÉCIES HOSPEDEIRAS DO CTV

O CTV afecta a maioria das espécies, variedades e híbridos da família *Rutaceae* (Acosta *et al.*, 1994). Outros hospedeiros que não pertencem ao género *Citrus*, mas que pertencem à família *Rutaceae* são a *Aeglopsis chevalieri* Swing., a *Afraegle paniculata* (Schum.) Engl. e a *Pamburus missiones* (Wt.) Swing. (Knorr, 1956 e McClean, 1961, citados por Müller e Garnsey, 1984). Outra espécie hospedeira é a *Passiflora gracilis* Jacq., pertencente à família *Passifloraceae* (Bar-Joseph *et al.*, 1989), assim como algumas espécies de *Cuscuta* (Bar-Joseph *et al.*, 1979a; Acosta *et al.*, 1994).

## 1.5 - CONTROLO E DIAGNÓSTICO DA TRISTEZA

O progresso no controlo da Tristeza passa pelo desenvolvimento e aceitação, a nível internacional, de medidas de quarentena, de certificação e garantia de intercâmbio de germoplasma de citrinos livre de organismos patogénicos (Lee e Garnsey, 1996). A obtenção de material de propagação não contaminado por vírus tornou-se mais fácil

após o desenvolvimento da técnica da microenxertia combinada com técnicas de termoterapia (Navarro, 1981).

A substituição do porta-enxerto laranjeira azeda por outros porta-enxertos chamados tolerantes ou resistentes ao CTV como as citranjeiras (por exemplo, Carrizo e Troyer), pode ser considerada como uma medida de prevenção contra a “tristeza sensu stricto”, embora estas plantas possam ser afectadas por estirpes causadoras de “stem pitting”. Uma solução adoptada no controlo do CTV em regiões onde se sabe que existem isolados severos endémicos é a pré-imunização ou protecção cruzada. Alguns estudos efectuados referem o benefício desta técnica na protecção dos citrinos (Müller *et al.*, 1986), a qual tem sido largamente aplicada no Brasil, na África do Sul e na Austrália (Spiegel-Roy e Goldschmidt, 1996). Apesar da actual aplicação da protecção cruzada, continua a não haver uma explicação da forma como um isolado “mild”, inoculado na planta hospedeira, pode minimizar uma infecção provocada por um isolado severo.

A manipulação genética de plantas com o objectivo de criar resistência a vírus constitui também uma estratégia promissora no controlo de viroses. Geralmente envolve a transformação de células vegetais com genes virais, tendo sido o gene da proteína do capsídeo o mais utilizado.

O controlo da Tristeza, numa dada região, passa também pelo conhecimento da situação, para o que são fundamentais métodos rápidos de detecção precoce da doença. Dos testes serológicos, o teste ELISA, directo (ELISA-DAS) e indirecto (ELISA-DASI), têm sido os métodos mais frequentemente utilizados no diagnóstico do CTV e baseiam-se no uso de anticorpos policlonais (Bar-Joseph *et al.*, 1979b) e monoclonais (Vela *et al.*, 1986; Shalitin *et al.*, 1994).

Para além da detecção é necessário caracterizar os isolados. A indexagem continua a ser a única forma de caracterização biológica, mas por ser muito morosa, diversos métodos têm sido desenvolvidos para a caracterização a nível molecular. O uso do anticorpo monoclonal MCA-13 permitiu diferenciar os isolados severos dos isolados “mild” de CTV na Florida (Permar *et al.*, 1990). Outros métodos aplicados na caracterização de isolados são a análise de RNA em cadeia dupla (Moreno *et al.*, 1990; Guerri *et al.*, 1991; Moreno *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 1996), a análise de polimorfismos de locais de restrição (RSP) (Gillings *et al.*, 1993; Nolasco, 1994; Nolasco *et al.*, 1995), a análise de polimorfismos conformacionais monocatenários (“Single Stranded Conformation Polymorphisms” - SSCP) (Rubio *et al.*, 1996; Nolasco, 1994; Nolasco e Sequeira, 1997a; Ayllón *et al.*, 1999b; Gago-Zachert *et al.*, 1999; Kong *et al.*, 2000), a síntese aleatória de cDNA (SAcDNA) (Nolasco, 1994; Nolasco e Sequeira., 1997a), o “Exonuclease Fluorescent Probe Assay” (Nolasco *et al.*, 1997b), a hibridação com sondas de DNA longas (Rosner *et al.*, 1986; Narvaez *et al.*, 2000) ou

curtas (Niblett *et al.*, 2000,) e a análise de mapas peptídicos da proteína do capsídeo (Guerri *et al.*, 1990; Albiach-Martí *et al.*, 2000a).

## 1.6 - ORGANIZAÇÃO GENÓMICA DO CTV

O genoma do CTV é constituído por uma cadeia simples de RNA com actividade mensageira que contém, dependendo dos isolados existentes, entre 19226 (isolado VT de Israel, Mawassi *et al.*, 1996) a 19296 nucleótidos (isolado T36 da Florida, Karasev *et al.*, 1995). A sequenciação completa do isolado T36 da Florida (Karasev *et al.*, 1995) e os estudos de Pappu *et al.* (1994) permitiram conhecer a organização do genoma do CTV. Da constituição do CTV fazem parte genes que codificam para as proteínas activadoras da replicação, para as proteínas reguladoras do movimento e para proteínas com função estrutural ou com função desconhecida. As regiões genómicas que constituem o genoma do CTV estão descritas na Tabela 1.1 e esquematizadas na Fig. 1.7. O genoma do CTV está organizado em 11 ORFs (“open reading frame”-região genómica codificante) (Pappu *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995; Mawassi *et al.*, 1996; Vives *et al.*, 1999). A região 5' UTR (região terminal 5' não traduzida) apresenta cerca de 107 nucleótidos (nt), seguindo-se o ORF1 que codifica para uma poliproteína com 401 kDa. Este subdivide-se em dois ORFs. O ORF1a (com 349 kDa) codifica uma poliproteína constituída por duas proteases do tipo papaína (Pro1 e Pro2), uma metiltransferase (MT) e uma helicase (HEL) (Karasev e Hilf, 1997). A MT e a HEL estão separadas por uma região genómica de função desconhecida, à semelhança do *Beet yellow virus* (BYV), um outro vírus membro do mesmo género *Closterovirus* (Dolja, 2003). O ORF1b codifica para a proteína RNA Polimerase RNA dependente (RdRp).

**Tabela 1.1** - Designação dos ORFs constituintes do genoma do CTV. Pro: protease; MT: metiltransferase; Hel: helicase; HSP70: proteína homóloga da “heat shock protein”; dCP: proteína semelhante à proteína do capsídeo; CP: proteína do capsídeo.

ORF	Dimensão (kDa)	Designação o da	Função	Referência
1a	349	Pro1 e	Proteases do tipo papaína	Karasev e Hilf, 1997
		MT	Replicação	Karasev <i>et al.</i> , 1995
		Hel	Relicção	Karasev <i>et al.</i> , 1995
1b	57	RdRp	Polimerase	Karasev <i>et al.</i> , 1995
2	33	p33	Desconhecida	Pappu <i>et al.</i> , 1994
3	6	p6	Associada às membranas, mas com função desconhecida	Pappu <i>et al.</i> , 1994
4	65	HSP70	Interacção proteína-proteína nos movimentos intracelulares; “folding” das proteínas; participa na encapsidação da partícula viral.	Pappu <i>et al.</i> , 1994
5	61	p61	Participa na encapsidação da partícula viral	Satyanarayana <i>et al.</i> , 2000
6	27	dCP	Faz parte da cápside viral; poderá participar no movimento intercelular e na transmissão por afídios	Satyanarayana <i>et al.</i> , 2000 Febres <i>et al.</i> , 1994; Febres <i>et al.</i> , 1996
7	25	CP	Faz parte da cápside viral	Satyanarayana <i>et al.</i> , 2000
8	18	p18	Desconhecida	Pappu <i>et al.</i> , 1994; Yang <i>et al.</i> , 1999
9	13	p13	Desconhecida	Pappu <i>et al.</i> , 1994; Yang <i>et al.</i> , 1999
10	20	p20	Desconhecida	Pappu <i>et al.</i> , 1994; Yang <i>et al.</i> , 1999
11	23	p23	Proteína de ligação ao RNA; encontra-se no citoplasma; participa na regulação do ciclo viral pelo controlo da acumulação assimétrica dos RNAs subgenómicos	Dolja <i>et al.</i> , 1994; Pappu <i>et al.</i> , 1997; López <i>et al.</i> , 2000; Satyanarayana <i>et al.</i> , 2002b

A região a jusante (cerca de metade) do genoma apresenta 10 ORFs (2 a 11) que codificam para um conjunto de produtos proteicos (Fig. 1.7). Algumas proteínas actuam em conjunto nos mecanismos da replicação viral. A proteína p65, uma proteína homóloga da proteína “heat shock” HSP70, juntamente com a proteína p61 e a proteína p6, poderão estar envolvidas, por analogia com o BYV, no movimento intercelular do vírus (Alzhanova *et al.*, 2000). A proteína p65 está envolvida na encapsidação do genoma viral, assim como a proteína p61, a proteína que se assemelha à proteína do capsídeo (dCP) e a proteína do capsídeo (CP) (Satyanarayana *et al.*, 2000). Na extremidade 3’ estão 4 ORFs que codificam para as proteínas p18, p13, p20 e p23 (Pappu *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1999). A função das proteínas p18, p13 e p20 no ciclo infeccioso do vírus permanece por elucidar. Das 3 proteínas, sabe-se apenas que a proteína p20 está presente nas células infectadas (Pappu *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1999, Febres *et al.*, 1996) e que se auto-agrega e acumula sob a forma de inclusões amorfas (Gowda *et al.*, 2000). No entanto, por analogia com a função da proteína p20 do BYV, esta poderá fazer parte da

extremidade da partícula viral e participar no movimento do vírus célula a célula (Prokhnevsky et al., 2002, citado em Dolja, 2003). À proteína p23 está associado um conjunto de funções, referidas na Tabela 1.1. A região terminal 3'UTR (região terminal 3' não traduzida) tem, segundo Karasev et al. (1995) 275 nt, enquanto Pappu et al. (1994) a referem como tendo 277 nt.

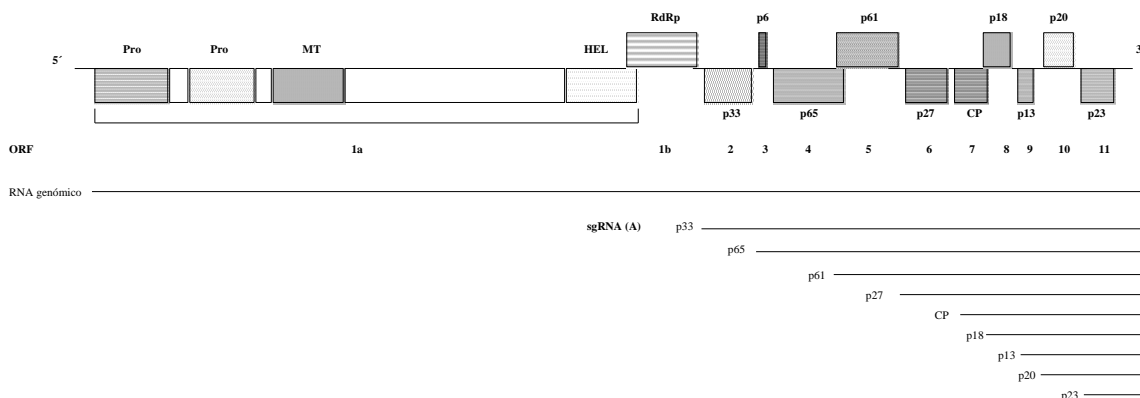


Fig. 1.7 – Esquema da organização do genoma do CTV. A linha simples representa a cadeia positiva simples do genoma em RNA. Cada área a sombreado constitui uma região codificante (ORF) e as proteínas codificadas são as seguintes: Pro, protease; MT, metiltransferase; HEL, helicase; RdRp, RNA Polimerase RNA dependente. Conjunto de proteínas da região terminal 3': p33, p6, p65, p61, p27, CP (proteína do capsídeo), p18, p13, p20 e p23. Na parte inferior está esquematizado a dimensão do RNA genômico e dos RNAs subgenômicos formados durante a replicação do vírus. Não está desenhado à escala. Adaptado de Navas-Castillo et al. (1997).

A função de muitas proteínas do CTV ficou conhecida por analogia com as regiões codificantes do BYV que apresentam uma sequência muito semelhante à do CTV. As diferenças ao nível do genoma que distinguem o CTV do BYV são a presença no CTV de 2 proteases na região terminal 5' (Pro1 e Pro2) (Karasev et al., 1995) e a presença, na região terminal 3', de 4 ORFs que codificam para as proteínas p33, p18, p13 e p23 (Karasev et al., 1995).

## 1.7 - REPLICAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENOMA DO CTV

A região 5'UTR, em conjunto com a região 3'UTR, são regiões necessárias à replicação do RNA genômico (Satyanarayana et al., 1999). A replicase liga-se especificamente à região 3'UTR para iniciar a síntese da cadeia complementar negativa, a partir da qual são depois sintetizadas novas cadeias positivas, na direção 3'-5'. A região 3'UTR é formada por 10 estruturas “stem-and-loop”, um sistema que parece envolvido na replicação e que é diferente do que tem sido referido noutros

vírus da família *Closteroviridae*. Associada à região 3'UTR está também a regulação da tradução, a estabilidade do RNA e a inibição da formação de cadeias simples negativas nos estádios finais da infecção (Satyanarayana *et al.*, 2002a).

A expressão do genoma do CTV inclui processos distintos. A sobreposição em 123 nucleótidos entre o ORF1a e o ORF1b, leva a que possa ocorrer o processo designado de “+1 ribossomal frameshift” e que se baseia na expressão do ORF1 por deslocação do quadro de leitura do ORF1a sobre o ORF1b. As proteases virais Pro1 e Pro2 fazem a proteólise da poliproteína formada pelo ORF1, gerando cinco produtos proteicos (Karasev *et al.*, 1995). A expressão do CTV também origina um conjunto de 10 RNAs subgenómicos que variam entre 0,9 a 8 Kb e que são transcritos a partir da extremidade 5' da cadeia negativa. Estes RNAs subgenómicos correspondem aos ORFs 2 a 11 e são co-terminais na região 3' (Pappu *et al.*, 1994; Hilf *et al.*, 1995; Mawassi *et al.*, 1995a; Karasev *et al.*, 1997; Miller e Koev, 2000) (ver Fig. 1.7). Estes tipos diferentes de expressão de genes da cadeia viral do CTV resultam na formação, na totalidade, de 17 proteínas, segundo Mawassi *et al.* (1996), ou 19 proteínas, segundo Karasev e Hilf (1997).

Numa célula infectada podem ser detectadas partículas encapsidadas de RNA em cadeia simples positiva de 20 Kb, RNA em cadeia dupla que corresponde à forma replicativa do CTV, RNA em cadeia simples complementar ao RNA genómico numa concentração muito baixa (Navas-Castillo *et al.*, 1997) e um conjunto de RNAs subgenómicos em cadeia simples e dupla, alguns dos quais encapsidados (Hilf *et al.*, 1995; Mawassi *et al.*, 1995a). Na célula infectada acumulam-se também RNAs defectivos (D-RNA) com dimensões que variam entre 1,5 Kb a mais de 10 Kb (Ayllón *et al.*, 1999a; Mawassi *et al.*, 1995c; Mawassi *et al.*, 2000), com encapsidação pela proteína p25 e p27. A sequência nucleotídica dos RNAs defectivos sugere que foram originados do genoma do CTV, com uma deleção interna extensa e mantendo a extremidade 5' e 3' (Mawassi *et al.*, 1995b; Mawassi *et al.*, 1995c; Yang *et al.*, 1997; Ayllón *et al.*, 1999a) (Fig. 1.7).

## 1.8 - VARIABILIDADE GENÓMICA

A sequenciação do genoma completo de alguns isolados do CTV com origens geográficas e propriedades biológicas diferentes, veio trazer algum conhecimento sobre a variabilidade genómica do CTV. A comparação dos primeiros genomas que foram sequenciados, o genoma do isolado T36 da Florida (Karasev *et al.*, 1995) e do isolado VT de Israel (Mawassi *et al.*, 1996), mostrou que a região terminal 3' é muito

conservada, havendo um aumento gradual da divergência na direcção 5', com menos de 50% de identidade nucleotídica na região 5'UTR (Mawassi *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1999). A comparação posterior dos isolados T36 e VT com 9 isolados de características biológicas e geográficas diversas, revelou que a variabilidade ao longo do genoma pode ser menos acentuada (Hilf *et al.*, 1999). Na região terminal 5', as regiões mais conservadas correspondem às proteases (Pro1 e Pro2), à metiltransferase (MT), à helicase (HEL) e à RNA Polimerase RNA dependente (RdRp), esta última com uma homologia de 90% (Mawassi *et al.*, 1996). Também os genes das proteínas p65, p61, p27 e p25 (CP) são muito conservados (Pappu *et al.*, 1994). A proteína p33 apresenta-se como a menos conservada das proteínas virais (Yang *et al.*, 1999). Na região terminal 3', os dois isolados T36 e VT apresentam uma semelhança nucleotídica superior a 90% (Mawassi *et al.*, 1996).

Cada isolado de CTV é constituído por uma população de variantes genómicas. Estas variantes intra-isolados são, a nível nucleotídico, muito próximas da variante mais comum a que se poderá chamar a sequência principal. Esta distribuição foi descrita no geral como uma estrutura “quasispecies” (Holland, 1982; Domingo *et al.*, 1999). Estabelece-se assim uma população de variantes genómicas que se mantêm ao longo do tempo em função das mutações que vão ocorrendo e das pressões de selecção existentes.

### **1.8.1 – Causas intrínsecas da variabilidade genómica**

Um dos factores que pode contribuir para a variabilidade genómica do CTV são as elevadas frequências de mutações que ocorrem nos genomas em RNA, durante a replicação do genoma, devido à ausência de funções de “proofreading” e de reparação de RNA por parte da RNA Polimerase RNA dependente. Outro factor a considerar é a recombinação entre genomas virais (Dolja *et al.*, 1994), que se supõe poder ocorrer devido às sucessivas infecções que ocorrem ao longo do tempo por diferentes populações de afídios (Gago-Zachert *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2001). Perante a coexistência numa mesma célula de várias variantes genómicas, pode ocorrer um mecanismo de recombinação designado de “copy choice”, que se refere à mudança ou salto da RdRp, da cadeia de RNA que estava a ser transcrita, para uma nova cadeia de RNA que esteja próxima (Biebricher, 1999).

### 1.8.2 - Factores exteriores que afectam a variabilidade genómica ao nível da população de CTV

As variantes genómicas de CTV presentes numa planta podem ser segregadas por enxertia e através da transmissão por afídios (Moreno *et al.*, 1993; López *et al.*, 1998; Ayllón *et al.*, 1999b; Albiach-Martí *et al.*, 2000b; Kong *et al.*, 2000). Após a transmissão para um novo hospedeiro, a alteração da frequência relativa ou até da composição das variantes genómicas, quando comparadas com o isolado original, pode originar sintomas diferentes no novo hospedeiro (Albiach-Martí *et al.*, 2000b; d'Urso *et al.*, 2000). Ayllón *et al.* (1999b) também verificaram que a transmissão por enxertia de um isolado podia dar origem a uma nova “quasispecies” à volta de um padrão diferente do isolado original.

Outro factor que pode contribuir para alterar a população de RNA genómico no processo de transmissão por afídios, resulta de uma distribuição não uniforme das variantes genómicas na planta. Gera-se então a possibilidade do afídio poder transmitir uma variante genómica em detrimento de outra. Esta situação foi observada no CTV (d'Urso *et al.*, 2000) e promove uma segregação ao acaso da população inicial de variantes genómicas de um vírus, dando origem a um “bottleneck” genético.

Os afídios apresentam diferentes eficiências de aquisição do vírus, sendo também variável a capacidade de o transmitir (Reis *et al.*, 2000). Desta forma, a população de vectores existente numa região pode afectar a predominância de um isolado sobre os outros. A introdução, numa região, do afídio *Toxoptera citricida* (Kirk.) pode favorecer o “bottleneck” genético, por este ter uma elevada eficiência de transmissão. O afídio *T. citricida* leva também a uma maior dispersão dos isolados de CTV (Gottwald *et al.*, 1997).

Muitos isolados “mild” que se encontram em campo e cujas plantas hospedeiras se apresentam assintomáticas, podem conter variantes que induzem sintomas severos do tipo “stem pitting”, quando são segregados do isolado-mãe (Grant e Higgins, 1956; Moreno *et al.*, 1993). Desta forma outra variante pode surgir como principal num novo hospedeiro (Moreno *et al.*, 1991; Ayllón *et al.*, 1999b; Albiach-Martí *et al.*, 2000b; d'Urso *et al.*, 2000).

## 1.9 - TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA COM VISTA À OBTENÇÃO DE RESISTÊNCIA

A transformação genética de plantas é o processo pelo qual é conseguida a integração estável e a expressão de genes, por meios que não sejam a fusão de gâmetas ou de outras células (Birch, 1997). A transformação genética tem sido largamente aplicada ao melhoramento de culturas importantes do ponto de vista económico, induzindo a resistência a doenças, virais ou outras.

O melhoramento de plantas do género *Citrus* pelos métodos convencionais está limitado pelas características genéticas e reprodutivas de muitas das espécies pertencentes ao género, como seja a auto-incompatibilidade e a incompatibilidade cruzada, a apomixia, a androgenia, uma elevada heterozigotia e longos períodos de juvenilidade, quer a plântula seja de origem nucelar ou sexual (Spiegel-Roy e Goldschmidt, 1996). A transformação genética oferece assim uma importante alternativa para o seu melhoramento, sendo um dos objectivos actuais a protecção dos citrinos contra o *Citrus tristeza virus*, pela indução de resistência com genes do próprio vírus.

O conceito de criar culturas resistentes a vírus através da expressão na planta de sequências do genoma viral evoluiu a partir dos conhecimentos da protecção cruzada, usada para proteger culturas como as de tomateiros, citrinos, cucúrbitas e papaias (Fraser, 1998). A protecção cruzada baseia-se em mecanismos moleculares ainda desconhecidos e apresenta algumas desvantagens, entre as quais a infecção de uma planta com uma partícula viral intacta. Se forem usados vírus de RNA, este pode apresentar numerosas variantes genómicas e corre-se o risco de ocorrer alterações que favorecem o aparecimento de sintomas severos na planta (Lee *et al.*, 1995).

A transformação genética de plantas com vista à resistência a vírus teve o seu início com a utilização do gene da proteína do capsídio (CP) do *Tobacco mosaic virus* (TMV) nos estudos feitos por Powell-Abel *et al.* (1986). A expressão da CP traduziu-se, em comparação com as plantas não transformadas, num atraso no aparecimento de sintomas ou mesmo na sua ausência nas plântulas que expressavam a CP do TMV. Nestas últimas plantas também foi notada uma reduzida acumulação do vírus e dos locais de infecção, mostrando que a difusão da infecção era baixa (Powell-Abel *et al.*, 1986). Nalguns processos de transformação, parece haver uma relação directa entre a expressão da proteína do capsídio nas plantas e a eficácia da resistência mediada pela CP (Powell *et al.*, 1990).

A protecção mediada pela proteína do capsídio tem sido a mais aplicada na indução de resistência a vírus em citrinos (Tabela 1.2, pág. 24), uma vez que se sabe ser esta proteína muito conservada entre os vários isolados. Os estudos de Domínguez

*et al.* (2002b) mostraram, pela primeira vez, que a transformação mediada pela CP do CTV em limeira mexicana pode, tal como foi observado em plantas de tabaco, provocar um atraso no aparecimento dos sintomas e na acumulação do vírus e também um grau de resistência que se reflecte na total ausência de sintomas.

Nos últimos anos tem sido referida a eficiência na indução de resistência a vírus mediada por outras sequências virais que codificam para a expressão de proteínas como a replicase, a proteína do movimento e proteases. Estas proteínas são expressas truncadas ou modificadas com o objectivo de não serem funcionais. Segundo Braun e Hemenway (1992) e Tenllado *et al.* (1995), a replicase confere à planta quase imunidade ao vírus do qual o gene derivou. No entanto, a resistência é muito específica, quase sempre restrita ao mesmo vírus (Golemboski *et al.*, 1990; MacFarlane e Davies, 1992; Zaitlin *et al.*, 1994). Em citrinos, segmentos do gene da replicase truncados foram usados na transformação de citrangeira Carrizo (Piestun *et al.*, 2000) e de toranjeira (*C. paradisi* Macfad.) (Moore *et al.*, 2000a; Febres *et al.*, 2003).

A resistência mediada pela proteína do movimento, que altera as propriedades de exclusão dos plasmodesmos, aumentando o seu diâmetro (Zaccomer *et al.*, 1993), inclui a redução do movimento do vírus nas plantas infectadas (Walsh, 2000). Este tipo de resistência confere um elevado espectro de resistência, mesmo a vírus não relacionados (Ares *et al.*, 1998). Outros genes virais que têm vindo a ser usados na indução de resistência são o RNA satélite (Gerlach *et al.*, 1987) e os RNAs defectivos (defective interfering RNA) (Kollár *et al.*, 1993).

As estratégias que induzem resistência através de genes não virais incluem, entre outras, a expressão de anticorpos por parte do genoma da célula vegetal (Tavladoraki *et al.*, 1993), assim como a expressão antisense de genes da planta que podem ser essenciais ao ciclo viral do vírus (Bejarano e Lichtenstein, 1992). A expressão do interferão foi sugerido por Truve *et al.* (1993) (citado em Pappu *et al.*, 1995), poder conferir uma resistência alargada a diversos grupos de vírus. Alguns genes de origem vegetal têm vindo também a ser testados, tais como os genes que codificam para proteínas inactivadoras de ribossomas e genes de resistência a doenças bacterianas e fúngicas (Hammond-Kosack e Jones, 1997). Na espécie *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. foi mapeado o gene que confere resistência ao CTV (Gmitter Jr *et al.*, 1996). Esta resistência é transmitida à descendência, em particular a híbridos interespecíficos como a citranjeira Carrizo ou Troyer [*P. trifoliata* (L.) Raf. x *C. sinensis* (L.) Osbeck] ou o citrumelo [*P. trifoliata* (L.) Raf. x *C. paradisi* (Macfad.)] (Bar-Joseph *et al.*, 1989). A resistência mediada por proteínas não virais

tem a vantagem de não colocar riscos relacionados com a transencapsidação ou a recombinação de genes virais em plantas.

### **1.9.1 - Mecanismos responsáveis pela indução de resistência**

Na resistência mediada pela proteína do capsídio, alguns estudos apontam para a resistência se dever a algum evento no início do processo infeccioso, impedindo a desencapsidação do vírus, estando a CP, que é expressa nas plantas, envolvida no processo de uma forma ainda desconhecida (Walsh, 2000).

A indução de resistência também tem sido explicada com base nos mecanismos de silenciamento génico, quer a nível da transcrição (TGS-“transcriptional gene silencing”), por ausência da sua iniciação devido a fenómenos de metilação ou condensação da cromatina, quer a nível da pós-transcrição (PTGS-“post-transcriptional gene silencing”), que resulta na degradação do mRNA “sense” aberrante, “antisense”, formas de dsRNA ou de mRNA não traduzível (Fagard e Vaucheret, 2000). Estes mecanismos do genoma das células vegetais constituem defesas da célula para dar resposta a situações como a integração estável de DNA estranho e a replicação extracromossómica de genomas virais (Fagard e Vaucheret, 2000).

O processo pós-transcricional de degradação do RNA, em que se baseia a resistência mediada por RNA, deve-se a mecanismos que começam a ser desvendados. Um dos mecanismos é a resistência dependente de homologia, que ocorre no citoplasma pela degradação de sequências de RNA que são homólogas com a sequência de RNA transgénica (Baulcombe, 1996). Neste caso, o transcrito é formado, mas não se acumula por ser rapidamente degradado. Uma explicação para este mecanismo de silenciamento génico pós-transcricional (PTGS) deve-se à formação de dsRNA, o qual se estabelece na presença de uma sequência homóloga ao transgene, ou quando é introduzido directamente na célula, por exemplo, por infecção viral (Hamilton e Baulcombe, 1999). Este mecanismo baseia-se na degradação do dsRNA em fragmentos de 19 a 25 pb, designados de siRNA (“small interfering RNAs”), os quais irão instruir o “RNA-induced silencing complex” (RISC) no reconhecimento e degradação do mRNA endógeno complementar ao siRNA (Elbashir *et al.*, 2001). O RISC é um complexo formado por proteínas, moléculas de siRNA e por nucleases, e reconhece a constituição de duplexes entre o siRNA e o mRNA homólogo. O PTGS após ser activado, é difundido na planta através de moléculas que actuam em *trans*, de uma forma ainda desconhecida (Elbashir *et al.*, 2001). Quando o vírus, que tem a mesma sequência do transgene, penetra na célula vegetal, activa os mesmos mecanismos e ocorre a degradação do RNA viral (Tenllado e Díaz-Ruíz, 2001). Domínguez *et al.* (2002b)

referem a resistência mediada por RNA em limeira mexicana. Em toranjeira (*C. paradisi* Macfad.), este tipo de resistência foi induzido através da transformação com o gene da CP não traduzível e sequências genómicas como a região 3'UTR (Febres *et al.*, 2003). Este processo de indução de resistência diminui as possibilidades de recombinações indesejadas entre o transgene transcrito e os vírus que infectam a planta (Prins e Goldbach, 1996).

### **1.9.2 - Transformação genética mediada pelo *Agrobacterium tumefaciens***

A técnica de transformação genética mediada pelas bactérias gram negativas do género *Agrobacterium* e, em particular, pela espécie *Agrobacterium tumefaciens*, baseia-se num sistema que apresenta uma capacidade única de transferir uma porção do seu DNA (T-DNA) para o genoma das células vegetais, propriedade que tem sido explorada com o objectivo de inserir novos genes em plantas. A limitação da aplicação deste método aos hospedeiros naturais da bactéria *A. tumefaciens* que são maioritariamente plantas dicotiledóneas, levou ao desenvolvimento de outras técnicas designadas de directas. Estas fazem geralmente uso de protoplastos, sendo o DNA introduzido directamente na célula vegetal por diversos mecanismos: por transferência mediada por polietilenoglicol (PEG), que aumenta a permeabilidade da membrana celular ao DNA; por electroporação que através de uma descarga eléctrica aumenta a permeabilidade da membrana plasmática; por microinjecção, em que o DNA é introduzido directamente no protoplasto. Outra técnica, a biolística, pode ser usada em estruturas pluricelulares e faz uso de micropartículas de ouro ou tungsténio envoltas em DNA, que são bombardeadas para o interior das células. A transformação mediada pelo *Agrobacterium*, em contraposição às técnicas referidas acima, é designada por transferência indirecta.

A bactéria *Agrobacterium tumefaciens* é o agente causal do “crown gall”, um tumor que afecta muitas plantas gimnospermas, plantas dicotiledóneas e também algumas plantas monocotiledóneas (De Cleene e De Ley, 1976). A transformação mediada por *A. tumefaciens* faz uso de um dos plasmídios que transporta, o Ti (“tumor inducing”), para, de uma forma natural, integrar covalentemente um segmento do referido plasmídio, o T-DNA, no genoma da célula vegetal (Chilton *et al.*, 1980). Em resposta a compostos fenólicos como a acetoseringona e a monossacáridos, produzidos por células vegetais feridas, ocorre a ligação de *Agrobacterium* à célula vegetal através da síntese de fibrilhas de celulose por parte da bactéria (Gelvin, 2000), estando ainda por elucidar o papel de proteínas da célula vegetal nessa ligação (Gelvin, 2000). Inicia-se também a indução dos genes da virulência (*vir*) presentes no plasmídio Ti da

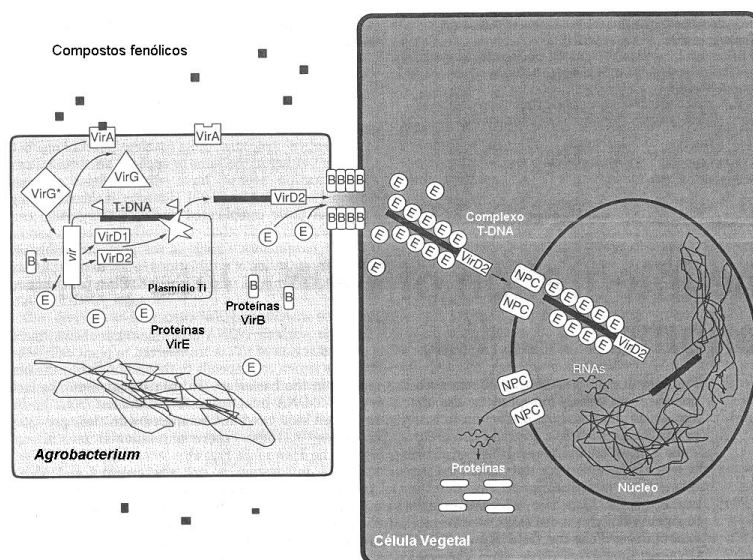
agrobactéria que, numa acção cooperativa com genes do cromossoma bacteriano, medeiam a transferência genética do T-DNA para o genoma da célula vegetal (Stachel *et al.*, 1985). O T-DNA presente no plasmídeo Ti está delimitado, nas extremidades, por sequências repetidas de 25 pb, as sequências flanqueadoras LB (“left border”) e RB (“right border”), que delimitam a sequência de DNA a ser transferida (Wang *et al.*, 1984; Bolton *et al.*, 1986). Após a indução dos genes *vir*, uma das cadeias do T-DNA é libertada através do corte nas sequências flanqueadoras e transferida para a célula vegetal (Stachel *et al.*, 1987), processo que pode demorar, em alguns casos, apenas 2 horas (Gelvin, 2000).

O T-DNA selvagem parasita a maquinaria genética da célula vegetal hospedeira e direcciona as actividades metabólicas da célula vegetal para a síntese de um conjunto de auxinas e citocininas, através dos genes *onc*, do que resulta o tumor “crown gall” (Chilton, 1983; Depicker *et al.*, 1983). Os outros genes do T-DNA codificam para a síntese de derivados de aminoácidos, designados opinas, os quais constituem uma fonte de carbono e azoto para a agrobactéria (Bevan, 1984). Diferentes estirpes induzem a produção de diferentes opinas como a nopalina, a octopina, a leucinopina, a agropina, a vitopina e a succinamopina (Chilton, 1983; Depicker *et al.*, 1983). Os outros genes do plasmídeo Ti, fora do fragmento do T-DNA, codificam para o metabolismo das opinas, para a transferência do T-DNA para a célula vegetal e para o processo de conjugação plasmídica bactéria-bactéria (Hooykaas e Beijersbergen, 1994). Os genes *vir*, envolvidos no processamento e transferência do T-DNA, estão organizados em 8 operões, desde o gene *virA* ao gene *virH* (Turk *et al.*, 1994). Os produtos dos genes *virA* e *virG* regulam a expressão dos restantes genes *vir*. A proteína VirA actua como receptor dos compostos fenólicos libertados pela célula vegetal ferida, enquanto a proteína VirB actua como regulador da transcrição dos genes *vir* (Winans *et al.*, 1994) (Fig. 1.8). Os genes *virD1* e *virD2* estão envolvidos na clivagem das sequências flanqueadoras LB e RB do T-DNA para a excisão de uma cadeia simples do T-DNA (Stachel *et al.*, 1987), a qual fica ligada covalentemente à proteína VirD2 na extremidade 5’ (Rossi *et al.*, 1993; Gelvin, 2000). Esta proteína tem um papel activo na integração do T-DNA no cromossoma da célula vegetal (de la Riva, *et al.*, 1998) (Fig. 1.8).

O T-DNA é posteriormente coberto com múltiplas proteínas VirE2 (Rossi *et al.*, 1993), formando o complexo T-DNA uma cadeia monocatenária que fica protegida da degradação nucleolítica (Koukolíková-Nicola *et al.*, 1993). O complexo T-DNA é dirigido para o poro nuclear da célula vegetal, mediado pela proteína VirD2, conjuntamente com a proteína VirE2 (Ziemienowicz *et al.*, 2001). Este processo foi comparado à conjugação bacteriana, sendo o poro composto por um conjunto de

proteínas VirB (Koukolíková-Nicola *et al.*, 1993), que Beijersbergen *et al.* (1994) associaram à estrutura de um “pilus” (Fig. 1.8). O processo de integração do DNA no genoma da planta ainda não está completamente explicado, embora Gheysen *et al.* (1991) tenham sugerido que a integração é feita por um sistema de recombinação ilegítima. Os genes da planta poderão ter um papel na integração do T-DNA, uma questão que não está ainda clarificada (Gelvin, 2000).

A capacidade natural do *Agrobacterium* transferir sequências de DNA para o genoma das células vegetais tem sido explorada no desenvolvimento de vectores de transformação com um T-DNA modificado. Para tal, foram eliminados os genes que promovem a formação do tumor “crown gall” (genes *onc*) e que inibem a regeneração de células, assim como os genes que codificam para a síntese das opinas. Os genes de interesse são inseridos entre as sequências flanqueadoras LB e RB, que funcionam como sinais de reconhecimento do sistema de transferência (Bevan, 1984). O fragmento em cadeia simples do T-DNA, é transferido para a célula vegetal de uma forma polar, iniciando-se a integração no genoma da célula vegetal pelo RB e terminando pelo LB (Stachel *et al.*, 1987).



**Fig. 1.8** - Transferência do T-DNA para as células vegetais. Compostos fenólicos são libertados para o meio ambiente quando uma célula vegetal é ferida. Estes compostos induzem as proteínas VirA, as quais por sua vez activam as proteínas VirG (na figura, a forma activa está indicada com um asterisco). As proteínas VirG activadas estimulam a expressão dos genes *vir*, os quais codificam diferentes proteínas Vir, envolvidas no processo de transferência. As proteínas VirD1 e VirD2 excisam o T-DNA em cadeia simples do plasmídeo Ti. Após a excisão, as proteínas VirD2 permanecem covalentemente ligadas à extremidade 5' do T-DNA. A molécula de DNA é exportada para a célula vegetal através de um canal, provavelmente formado pelas proteínas VirB, canal esse através do qual também passam as proteínas VirE2. Nas células vegetais, as proteínas VirE2 associam-se com a cadeia simples de T-DNA-VirD2, formando o complexo T. As proteínas VirD2 e VirE2 medeiam a entrada do T-DNA no núcleo da célula vegetal através dos poros nucleares. No núcleo, o T-DNA pode ser integrado no genoma da célula vegetal. Adaptado de Tinland (1996).

A identificação das células transformadas com um transgene é feita através de genes de selecção inseridos no T-DNA e que são indicadores da integração do DNA no genoma da planta, por conferirem resistência a um antibiótico ou herbicida. São empregues, entre outros, os genes que conferem resistência aos antibióticos canamicina (gene *nptII*) (Herrera-Estrella *et al.*, 1983), higromicina (gene *hpt*) (Blochlinger e Diggelmann, 1984) e bleomicina (gene *ble*) (Rogers e Klee, 1987). Também são empregues genes que conferem resistência aos herbicidas fosfinotricina (gene *bar*) e glifosato (Becker *et al.*, 1992), entre outros. Em plantas do género *Citrus* tem sido correntemente empregue o gene *nptII*, mas em estudos mais recentes foi inserido o gene *bar* em toranjeira (*C. paradisi* Macfad.), que induz resistência ao herbicida Basta (Piestun *et al.*, 2000).

Genes repórter são também incorporados no T-DNA por codificarem enzimas que são rapidamente detectadas nas células por fluorescência ou por reacção histoquímica, permitindo avaliar a expressão num processo de transformação. Alguns dos genes repórter mais usados codificam para as enzimas cloranfenicol acetiltransferase (Herrera-Estrella *et al.*, 1983), luciferase (Ow *et al.*, 1986) e  $\beta$ -glucuronidase (Jefferson, 1987; Jefferson *et al.*, 1987). A análise qualitativa da presença da enzima  $\beta$ -glucuronidase é feita através de uma reacção histoquímica por aplicação do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronido (X-gluc), que a enzima  $\beta$ -glucuronidase degrada em ácido glucurónico e forma um precipitado insolúvel de cor azul indigo, tornando visível os locais onde está presente a enzima (Jefferson *et al.*, 1987). O gene que codifica para a  $\beta$ -glucuronidase tem sido o gene repórter mais usado na transformação de citrinos. Mais recentemente, também o gene que codifica para a proteína fluorescente verde (GFP) (Kitts *et al.*, 1995) tem sido largamente aplicado, uma vez que não é prejudicial à célula vegetal e pode substituir os antibióticos e herbicidas na selecção de transformantes. Em citrinos, as referências à sua aplicação são escassas e apenas La Malfa *et al.* (2000) e Olivares-Fuster *et al.* (2000) os usaram na citrangeira Carrizo e em protoplastos de laranja doce, respectivamente.

A transformação via *Agrobacterium* tem a vantagem de poder ser usada, não só na transformação de protoplastos, mas também de estruturas pluricelulares, tais como discos foliares e segmentos de caule, a partir dos quais são regenerados rebentos adventícios com um risco reduzido de variação somaclonal. Podem ser transferidos grandes fragmentos de DNA, os quais são direccionados para o núcleo, onde são integrados no genoma da célula vegetal de uma forma estável, sendo passados para a descendência de acordo com as regras Mendelianas (Chilton, 1983; Furner *et al.*, 1986). O número de cópias de DNA introduzido na célula é inferior ao que se verifica

nos processos de biolística ou electroporação (de la Riva, 1998). Também a eficiência de transformação é maior do que os métodos de transferência directa (Chilton, 1983). Uma desvantagem na aplicação da transformação mediada por *Agrobacterium* prende-se com a ocorrência de configurações em “tandem” do T-DNA, em que o LB do T-DNA fica ligado covalentemente ao RB de outro T-DNA (Ooms *et al.*, 1982; Bevan, 1984).

A transformação via *Agrobacterium* começou por ser testada em tabaco (Herrera-Estrella, 1983; Horsch *et al.*, 1985; Powell Abel *et al.*, 1986). Algumas espécies vegetais são recalcitrantes à transformação ao *Agrobacterium*, além de não serem geralmente hospedeiros naturais deste género de bactérias, nomeadamente muitas plantas Monocotiledóneas e também plantas lenhosas (De Cleene e De Ley, 1976). O desenvolvimento de protocolos adequados de transformação e de regeneração também tem um papel fundamental e permitiu já a transformação via *A. tumefaciens* de milho (Gould *et al.*, 1991), arroz (Hiei *et al.*, 1994) e de trigo (Peters *et al.*, 1999).

### **1.9.3 - A transformação genética de plantas do género *Citrus***

A transformação de citrinos teve o seu início à aproximadamente uma década, com a transferência de genes para protoplastos de laranja doce (Kobayashi e Uchimiya, 1989) e de limão rugoso (*C. jambhiri*) Lush (Vardi *et al.*, 1990), mediada por polietilenoglicol (PEG). Também a biolística foi aplicada com sucesso na transformação de tangeleiro (*C. reticulata* Blanco x *C. paradisi* Macfad.). Em limoeiro foi usada na transferência do gene *uidA* para células de *calli* (Starrantino *et al.*, 1992; Kayim *et al.*, 1996), sem ter ocorrido a regeneração de plantas. A mesma técnica foi praticada na transformação de limeira mexicana, sem a regeneração de transformantes (Gutiérrez *et al.*, 1997). A electroporação, outra técnica de transferência directa, foi testada em tangerineira, com obtenção de protoplastos transformados (Hidaka e Omura, 1993).

A transformação de plantas do género *Citrus* mediada por *A. tumefaciens* tem sido e é referido por vários autores como o meio mais eficaz de transformação (Bond e Roose, 1998; Gutiérrez *et al.*, 1997; Peña *et al.*, 1995a e 1995b), e que apresenta os níveis mais elevados de expressão estável (Chilton *et al.*, 1980). Na primeira referência à transformação de citrinos mediada por *Agrobacterium* foram usadas células em suspensão (Hidaka *et al.*, 1990). No entanto, os estudos de indução de rebentos adventícios realizados na década de 80 (Barlass e Skene, 1982; Moore, 1986) abriram novas possibilidades de utilização do *Agrobacterium* na transformação de estruturas pluricelulares nos citrinos (Tabela 1.2, pág. 24). Moore *et al.* (1992) utilizaram

epicótilos de plântulas, explantes que foram posteriormente adotados com sucesso na transformação da maioria das espécies de citrinos (Tabela 1.2, pág. 24).

A bactéria *A. rhizogenes* foi também usada em processos de transformação com sucesso em limeira mexicana (Pérez-Molphe-Balch e Ochoa-Alejo, 1998). A inserção de genes *rol* mediada por *A. tumefaciens* foi efectuada por Gentile *et al.* (1999) e Kaneyoshi e Kobayashi (1999).

Mais recentemente foram também transformados citrinos com genes não virais, nomeadamente genes de tolerância à salinidade (Cervera *et al.*, 2000a) (Tabela 1.2, pág. 24), gene humano hEGF (“human epidermal growth factor”) (Kobayashi *et al.*, 1996) (Tabela 1.2, pág. 24); genes que promovem a iniciação floral, diminuindo assim o tempo de juvenilidade (Peña *et al.*, 2001) (Tabela 1.2, pág. 24) e genes que reduzem a formação de sementes (Koltunow *et al.*, 2000) (Tabela 1.2, pág. 24). Também foram transformados citrinos com o gene chalcona sintase (CHS) e o gene chalcona isomerase (CHI), isolados de toranjeira (*C. paradisi* Macfad. cv. Marsh), que entram na via biossintética da naringina. A transformação com estes genes teve como objectivo criar frutos menos amargos, embora com resultados ainda não satisfatórios (Moore *et al.*, 2000b). O isolamento de genes de citrinos relacionados com os processos bioquímicos de outros flavonóides, das giberelinas (Alapont *et al.*, 2000), da sacarose, dos ácidos orgânicos, dos carotenóides, da clorofila, do etileno, das pectinas e da celulose, entre outros, vem criar novas perspectivas na transformação genética futura dos citrinos (Di *et al.*, 2002).

Um dos objectivos da transformação de citrinos tem sido a introdução de resistência ao CTV, sendo o gene estrutural da cápside proteica o mais usado nos processos de transformação (Tabela 1.2, pág. 24). Mais recentemente o gene que codifica a proteína p23 foi usado, dando a conhecer a sua função no desenvolvimento dos sintomas do CTV no hospedeiro (Ghorbel *et al.*, 2001b) (Tabela 1.2, pág. 24). Também a região 3'UTR foi empregue na transformação de toranjeira (*C. paradisi* Macfad.) (Febres *et al.*, 2003) (Tabela 1.2, pág. 24). Os genes que codificam as proteínas p27 e p20 foram usados sem sucesso na transformação da mesma espécie. Apesar da obtenção de uma frequência de expressão transiente relativamente elevada (10% e 19%, respectivamente), os rebentos não cresceram. Febres *et al.* (2003) atribuíram a morte das plantas ao seu estágio muito precoce de desenvolvimento ou à existência de um factor tóxico ou prejudicial para a planta, que resultou na remoção do transgene do genoma, por rearranjos.

A resistência natural ao CTV foi encontrada em *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e o seu gene foi mapeado (Gmitter *et al.*, 1996). No futuro, após clonagem, este gene poderá ser usado e transferido para outras espécies e variedades por transformação genética, já que se torna difícil a sua utilização em processos convencionais de

melhoramento devido à complexa biologia floral e reprodutiva dos citrinos e aos longos períodos de juvenilidade. A resistência a determinados isolados de CTV foi encontrada também em toranjeira (*C. maxima* (Burm.) Merr., *Fortunella crassifolia* Swing e *Severinia buxifolia* (Poir.) Tenore (Domínguez *et al.*, 2002a).

A transformação de plantas do género *Citrus* apresenta algumas dificuldades associadas ao facto de ser uma lenhosa, sendo a mais notória a reduzida frequência de obtenção de transformantes. A análise das plantas transformadas adultas obriga a longos anos de espera, uma vez que o tempo de juvenilidade pode variar entre 4 a 6 anos (Spiegel-Roy e Goldshmidt, 1996), até à produção dos primeiros frutos. Por outro lado, o teste da resistência das plantas ao vírus requer a inoculação das plantas transgénicas com a estirpe da qual derivou o transgene e com outros isolados de CTV, procedimentos que requerem muito tempo até os resultados serem observáveis. De igual forma não se sabe se a resistência a uma dada variante genómica será durável nas diversas regiões em que os citrinos são cultivados, uma vez que estes estão sujeitos a repetidas infecções com diversas variantes genómicas do CTV.

**Tabela 1.2** – Genes introduzidos em plantas do género *Citrus*.

<b>Espécie</b>	<b>Explant</b>	<b>Método</b>	<b>Gene introduzido</b>	<b>Objectivo pretendido</b>
<i>C. aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i>	p25 (CP) do CTV	Resistência ao CTV
<i>C. aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle (Christm.) Swingle	Segmentos internodais	<i>A. tumefaciens</i>	p25 (CP) do CTV	Resistência ao CTV
<i>C. aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle	Segmentos internodais	<i>A. tumefaciens</i> EHA 105	p25 (CP) do CTV	Resistência ao CTV
<i>C. aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle	Segmentos internodais	<i>A. tumefaciens</i> EHA 105	p25 (CP) do CTV, estirpe “mild” e “stem pitting”	Resistência ao CTV
<i>C. aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle	Segmentos internodais	<i>A. tumefaciens</i>	p23 do CTV	Resistência ao CTV
<i>C. aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle	Segmentos internodais	<i>A. tumefaciens</i> EHA105	<i>uidA</i>	Análise da eficiência de transformação por detecção da enzima $\beta$ -glucuronidase
<i>C. aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle	Segmentos internodais	<i>A. rhizogenes</i> A4	<i>uidA</i>	Análise da eficiência de transformação por detecção da enzima $\beta$ -glucuronidase
<i>C. aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle	Segmentos internodais de plântula	<i>A. tumefaciens</i> LBA 4404	MS1 (“male sterility gene”) SDLS 1 (“seed-size reducing gene”)	Redução da formação de sementes e do seu tamanho (Detecção de transformantes efectuada só por PCR) -
<i>C. aurantium</i> (L.)	Segmentos internodais de caule	<i>A. tumefaciens</i> EHA 101	CTV-CP	Resistência ao CTV
<i>C. aurantium</i> (L.)	Segmentos internodais de caule de planta com 12 meses	<i>A. tumefaciens</i> EHA 105	CTV-CP	Resistência ao CTV
<i>C. jambhiri</i> Lush	Protoplastos de calli embriogénico	Poliétilenoglicol (PEG)	<i>cat</i>	Análise da eficiência de transformação por detecção da cloranfenicol acetil transferase
<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	Calli embriogénico	Bombardeamento	<i>uidA</i>	Análise da eficiência de transformação por detecção da enzima $\beta$ -glucuronidase
<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	Calli embriogénico	Bombardeamento	<i>uidA</i>	Análise da eficiência de transformação por detecção da enzima $\beta$ -glucuronidase (Não ocorreu a regeneração de células)

**Tabela 1.2 – Genes introduzidos em plantas do género *Citrus* (cont.).**

Espécie	Explant	Método	Gene introduzido	Objectivo pretendido	Referências
<i>C. paradisi</i> (Macfad.) cv. Duncan	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i> EHA 101	<i>uidA</i>	Análise da eficiência de transformação por detecção da enzima $\beta$ -glucuronidase	Luth e Moore, 1999
<i>C. paradisi</i> (Macfad.)	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i>	p27; p20; replicase	Resistência ao CTV	Moore <i>et al.</i> , 2000a
<i>C. paradisi</i> (Macfad.)	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i> EHA 105	Fitoeno sintase Fitoeno desaturase Licopeno- $\beta$ -ciclase	Genes da via biossintética dos carotenóides / precursores da vitamina A/antioxidante/alteração da cor do fruto e do sumo. (Detecção de transformantes efectuada só por PCR)	Costa <i>et al.</i> , 2002
<i>C. paradisi</i> (Macfad.) cv. Rio Red	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i> EHA 105 e C58C1	p25 (CP) do CTV não traduzível <i>gna</i>	Resistência ao CTV	Yang <i>et al.</i> , 2000
<i>C. paradisi</i> (Macfad.)	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i>	p25 (CP) do CTV; p25 não expressável; Replicase (RdRp); p27; p20; região 3' UTR	Resistência a insecticida Resistência ao CTV	Febres <i>et al.</i> , 2003
<i>C. reticulata</i> Blanco	Protoplastos de calli embriogénico	Electroporação	<i>uidA</i>	Análise da eficiência de transformação por detecção da enzima $\beta$ -glucuronidase	Hidaka e Omura, 1993
<i>C. reticulata</i> Blanco	Calli embriogénico	Bombardeamento	$\beta$ -conglycinin, gene de armazenamento de proteínas nas sementes, ligado ao gene Rnase Barnase	Redução do tamanho das sementes (Obtenção apenas de resultados de expressão transiente) -	Koltunow <i>et al.</i> , 1998
<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	Protoplastos de células em suspensão	Poliétilenoglicol	APH(3')II (aminoglicósido-fosfotransferase II)	Resistência ao antibiótico canamicina	Kobayashi e Uchimiya, 1989
<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	Células em suspensão	<i>A. tumefaciens</i>	<i>Hpt</i> e <i>npt II</i>	Resistência ao antibiótico higromicina fosfotransferase ( <i>Hpt</i> ) e canamicina ( <i>npt II</i> )	Hidaka <i>et al.</i> , 1990
<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck cv. Pineapple	Segmentos internodais do caule	<i>A. tumefaciens</i> EHA 105	<i>uidA</i>	Análise da eficiência de transformação por detecção da enzima $\beta$ -glucuronidase	Peña <i>et al.</i> , 1995a
<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i> C1C58/EHA101-5	<i>uidA</i>	Análise da eficiência de transformação por detecção da enzima $\beta$ -glucuronidase	Bond e Roose, 1998
<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	Segmentos de epicótilo e de ramos	<i>A. tumefaciens</i> EHA105	<i>uidA</i>	Análise da eficiência de transformação por detecção da enzima $\beta$ -glucuronidase	Cervera <i>et al.</i> , 1998c

(continua na pág. seguinte)

**Tabela 1.2** – Genes introduzidos em plantas do género *Citrus* (cont.).

<b>Espécie</b>	<b>Explante</b>	<b>Método</b>	<b>Gene introduzido</b>	<b>Objectivo pretendido</b>	<b>Referências</b>
Citrangeira Carrizo	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i> EHA 101	<i>uidA</i>	Análise da eficiência de transformação por detecção da enzima $\beta$ -glucuronidase	Moore <i>et al.</i> , 1992
Citrangeira Carrizo	Segmentos de epicótilo de plantas com 4 meses	<i>A. tumefaciens</i> EHA101	p25 (CP) do CTV	Resistência ao CTV	Gutiérrez <i>et al.</i> , 1997
Citrangeira Carrizo	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i> EHA105	<i>uidA</i>	Análise da eficiência de transformação por detecção da enzima $\beta$ -glucuronidase	Cervera <i>et al.</i> , 1998b
Citrangeira Carrizo	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404	<i>rolABC</i>	Plantas anãs de fácil enraizamento	Gentile <i>et al.</i> , 1999
Citrangeira Carrizo	Segmentos de entrenós de plantas com 1 ano	<i>A. tumefaciens</i> EHA105	GFP	Análise da eficiência de transformação por detecção de “green fluorescent protein”	La Malfa <i>et al.</i> , 2000
Citrangeira Carrizo	Plântulas com região apical e cotilédones cortados	<i>A. tumefaciens</i> EHA105	Replicase; Gene <i>bar</i>	Resistência ao CTV; resistência ao herbicida fosfotricina (gene <i>bar</i> )	Prestun <i>et al.</i> , 2000
Citrangeira Carrizo	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i>	LFY e API	Indução precoce da floração	Peña <i>et al.</i> , 2001
Citrangeira Carrizo	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i>	HAL2	Tolerância ao sal	Cervera <i>et al.</i> , 2000
Tangeleiro ( <i>C. reticulata</i> Blanco x <i>C. paradisi</i> Macfad.)	Calli embriogénico	Bombardeamento	<i>uidA</i>	Análise da eficiência de transformação por detecção da enzima $\beta$ -glucuronidase	Yao <i>et al.</i> , 1996
<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404	<i>uidA</i>	Análise da eficiência de transformação por detecção da enzima $\beta$ -glucuronidase	Kaneyoshi <i>et al.</i> , 1994
<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404	hEGF	Síntese de uma proteína humana envolvida no crescimento epidérmico	Kobayashi <i>et al.</i> , 1996
<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404	<i>rolC</i>	Plantas anãs de fácil enraizamento	Kaneyoshi e Kobayashi, 1999
<i>C. aurantium</i> (L.); <i>C. limon</i> (L.) Burm. f.; <i>C. macrophylla</i> Wester; <i>C. reshni</i> Hort. ex Tanaka; <i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i> EHA105 e C58	Plasmídeo com várias cópias do gene <i>virG</i>	Aumento da eficiência de transformação por indução dos genes <i>vir</i>	Ghorbel <i>et al.</i> , 2001a

## OBJECTIVOS DO PRESENTE TRABALHO

Torna-se premente para a região da Bacia Mediterrânica encontrar formas de controlar possíveis infecções por estirpes severas de CTV como as existentes na Ilha da Madeira. Dadas as características de vigor de *C. aurantium* L. e da sua adaptabilidade à região mediterrânica, é de importância crucial a obtenção de resistência neste porta-enxerto.

Os objectivos deste trabalho foram:

- Estudo da variabilidade genómica da região terminal 3'UTR do CTV, para a detecção das regiões mais conservadas a usar num processo de transformação genética, de forma a garantir uma resistência alargada, mediada por RNA, à maioria dos isolados do CTV.
- Estabelecimento de um sistema de transformação de plantas de laranjeira azeda (*C. aurantium* L. cv. Brazilian) mediado pelo vector natural *Agrobacterium tumefaciens*, com o gene da CP do CTV.



# MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1 - DESIGNAÇÃO CIENTÍFICA DAS ESPÉCIES DE *Citrus*

No presente trabalho foi adoptada a designação científica das espécies de *Citrus* segundo Cottin R., SRA INRA-CIRAD, versão 2.0 (2002).

## 2.2 - CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE CTV ANALISADOS

Foram analisados isolados de CTV com diversas origens geográficas e com características biológicas diferentes, incluindo isolados causadores de sintomas “mild” e de sintomas “stem pitting”. Os isolados foram mantidos em laranjeira doce cv. Madam Vinous, em estufa protegida contra insectos. O córtex das plantas indicadoras foi retirado seis meses após a inoculação do isolado e o caule foi observado para a detecção de sintomas todos os anos. Nas infecções mistas, a segunda inoculação só foi executada após confirmação por ELISA do estabelecimento da primeira infecção com o isolado “mild” 25. A caracterização biológica destes isolados, efectuada anteriormente (Grisoni, 1995; Bonacalza, 1998), encontra-se descrita na Tabela 2.1.

Foram igualmente analisados clones cuja sequenciação era previamente conhecida e que estão descritos na Tabela 2.2.

**Tabela 2.1** - Caracterização dos isolados de CTV analisados por SSCP, CFLP e sequenciação.

Isolado	Nº da planta	Local de colheita	Origem geográfica	Sintomas induzidos em plantas				Ref. caracterização biológica <sup>♦</sup>
				SP-LM <sup>a</sup>	SP-LD <sup>b</sup>	SP-T <sup>c</sup>	QD-LD/LA <sup>d</sup>	
36D	2	Ilha da Madeira	*	+	+	+	n/t	1
32D	8	Ilha da Madeira	*	+	+	+	+	1
46D	11	Ilha da Madeira	*	+	+	n/t	n/t	1
15D	13	Ilha da Madeira	*	+	+	+	n/t	1
15D	14	Ilha da Madeira	*	+	+	-	+	1
41G	15	Ilha da Madeira	*	+	+	-	n/t	1
50 <sup>^</sup>	19	Algarve	Espanha	+	-	-	+	1
78	25	Algarve	Espanha	+	-	-	+	1
Genoa 1	28	Setúbal	*	+	+/-	+/-	n/t	1
TR25/1	125	Ilha da Reunião	*	+	+	-	n/t	1
TR21/1	136	Ilha da Reunião	*	+	+	n/t	+	2
TR25/1	142	Ilha da Reunião	Ilha da Reunião	+	+	n/t	-	2
MA3	144	Ilha da Reunião	*	+	-	n/t	n/t	1
Golegã	152	Golegã	Golegã	+	-	-	-	1
-	●196=25+16	Mistura artificial	*	n/t	+	n/t	n/t	1
-	●200=25+7	Mistura artificial	*	n/t	+	n/t	n/t	1
-	●206=25+125	Mistura artificial	*	n/t	+	n/t	n/t	1

\* = Desconhecido

● = Plantas com uma mistura de isolados

<sup>a</sup> SP-LM="stem pitting" em limeira mexicana; <sup>b</sup> SP-LD="stem pitting" em laranja doce;

<sup>c</sup> SP-T="stem pitting" em toranja (*C. paradisi* Macfad.); <sup>d</sup> QD-LD/LA="quick decline" em laranja doce enxertada em laranja azeda.

n/t = não testado

+/- = presença de sintomas num número não representativo de plantas hospedeiras.

<sup>♦</sup> Referências bibliográficas: 1 - Boncalza (1998); 2 - Grisoni (1995).

## 2.3 - COMPOSIÇÃO DE ALGUMAS SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA.

A composição de tampões e de algumas das soluções usadas está descrita no Anexo I, Tabela 1. Na Tabela 2 do mesmo Anexo está descrito a composição dos meios de cultura.

**Tabela 2.2** - Caracterização dos isolados de CTV de onde foram obtidas as seqüências analisadas por SSCP e CFLP e cuja seqüência nucleotídica é conhecida.

Isolado	Origem	Sintomas induzidos em plantas indicadores					Referência da caracterização biológica	Seqüência do(s) gene(s) disponível no GenBank	Nº de acesso ao GenBank / Referência bibliográfica da seqüenciação
		SP-LM <sup>a</sup>	SP-LD <sup>b</sup>	SP-T <sup>c</sup>	QD-LDLA <sup>d</sup>	SY <sup>e</sup>			
2.93	Ilha da Madeira			Isolado 2, Tabela 2.1			Tabela 2.1	p25 (CP)	AF184116
2.98	Ilha da Madeira			Isolado 2, Tabela 2.1			Tabela 2.1	p25 (CP)	AF184117
13C	Ilha da Madeira			Isolado 13, Tabela 2.1			Tabela 2.1	p25 (CP)	AF184113
15.118	Ilha da Madeira			Isolado 15, Tabela 2.1			Tabela 2.1	p25 (CP)	**
19.121	Espanha			Isolado 19, Tabela 2.1			Tabela 2.1	p25 (CP)	AF184144
25.120	Espanha			Isolado 25, Tabela 2.1			Tabela 2.1	p25 (CP)	AF184115
28.121	Portugal			Isolado 28, Tabela 2.1			Tabela 2.1	p25 (CP)	**
65	Califórnia	+	+	?	?	?	Kong <i>et al.</i> , 2000	p20	AF203073
107	Califórnia	+	+	+	+	-	"	p20	AF203075
122	Califórnia	+	+	-	-	-	"	p20	AF203077
190	Califórnia	+	-	-	-	-	"	p20	AF203081
B5	Califórnia	+	-	-	-	-	Pappu <i>et al.</i> , 1997	p23	U42019
B32	Espanha	+	-	?	?	?	"	p23	U42021
B53	*Espanha/Japão	+	+	+	+	+	Pappu <i>et al.</i> , 1993 / Akbulut, 1996	p25 (CP)	Pappu <i>et al.</i> , 1993
B67	China	+	-	?	?	?	Pappu <i>et al.</i> , 1997	p23	U42020
B128	Colômbia	+	+	?	?	?	Pappu <i>et al.</i> , 1993	p25 (CP)	U42006
B147	Flórida, USA	+	+	?	?	?	Pappu <i>et al.</i> , 1997	p23	U42025
B165	Índia	+	+	?	?	?	"	p23	U42022
B185	Japão	+	+	+	-	+	Pappu <i>et al.</i> , 1993	p25 (CP)	Pappu <i>et al.</i> , 1993
B220	Índia	+	+	?	?	?	Pappu <i>et al.</i> , 1997	p23	U42023
B227	Índia	+	+	?	+	+	"	p23	U42017
B249	Venezuela	+	+	-	+	-	Penaranda, <i>et al.</i> , 1996	p25 (CP)	Penaranda, <i>et al.</i> , 1996
B274	Colômbia	+	-	-	-	-	Batista <i>et al.</i> , 1996	p25 (CP)	Acosta <i>et al.</i> , 1994
NUagA	Japão	+	+	+	?	?	AB046398	Genomia completo	AB046398
SY568	Califórnia	+	+	+	n/t	+	Yang <i>et al.</i> , 1999	Genomia completo	AF001623
T3	Flórida, USA	+	+	-	-	-	"	p25 (CP)	Pappu <i>et al.</i> , 1993
T30	Flórida, USA	+	+	-	n/t	+	"	Genomia completo	AF260651
T36	Flórida, USA	+	-	-	+	+	"	Genomia completo	M76485
T385	Espanha	+	-	-	+	+	Vives <i>et al.</i> , 1999	Genomia completo	Vives <i>et al.</i> , 1999
TR11a	Ilha da Reunião	+	-	-	n/t	n/t	Grisomi, 1995	p25 (CP)	**
VT	Israel	+	+/-	+/-	+	+	Pappu <i>et al.</i> , 1993	Genomia completo	U56902

<sup>a</sup>SP-LM= "stem pitting" em Limeira mexicana, <sup>b</sup>SP-LD="stem pitting" em laranja doce, <sup>c</sup>SP-T="stem pitting" em laranja doce, <sup>d</sup>QD-LDLA="quick decline" em laranja doce enfiada em laranja azeda, <sup>e</sup>SY="seedling yellows".  
n/t = não testado.  
\* = A origem deste clone vem referida por alguns autores como sendo Espanha, enquanto outros a referem como sendo o Japão.  
\*\* = Seqüências que não se encontram descritas no GenBank.  
? = caracterização biológica não referida.

## **2.4 - AMPLIFICAÇÃO DE GENES VIRAIS POR “IMUNOCAPTURE/ REVERSE TRANSCRIPTIONAL-POLYMERASE CHAIN REACTION” (IC/RT-PCR), A PARTIR DE PLANTAS INFECTADAS**

### **2.4.1 - Preparação do material vegetal**

A ramos novos de plantas infectadas com *Citrus tristeza virus* (CTV) foi retirado 0,2 g de casca, que foi macerada num almofariz com 2 ml de tampão de extracção de proteínas (Anexo I, Tabela 1), na presença de carborundum. O extracto foi clarificado por centrifugação a 5000 rpm durante 5 min a 4 °C.

### **2.4.2 – IC/RT-PCR**

#### **Imunocaptura (IC)**

O método da imunocaptura seguiu o protocolo descrito por Nolasco *et al.* (1993), com algumas modificações. Os tubos de PCR de 200 µl foram revestidos com 50 µl de uma solução de anticorpo de revestimento (IgG anti-CTV obtido em coelho, Bioreba, Ref. 151512) diluído 1:1000 em tampão carbonato (Anexo I, Tabela 1). A incubação decorreu durante a noite a 4 °C. Os tubos de PCR foram lavados 3 vezes com tampão PBS-Tween (Anexo I, Tabela 1) e mantidos a 4 °C para uso imediato ou foram guardados a –20 °C.

Em cada tubo de PCR previamente revestido com o anticorpo foram colocados 50 µl do extracto de planta clarificado (ver 2.4.1). Os tubos permaneceram durante 3-4h à temperatura ambiente para a captura do antigénio viral ou, em alternativa, foram incubados a 4 °C durante a noite. Após este período, lavaram-se os tubos duas vezes com a solução PBS-Tween e uma vez com água miliQ. As lavagens foram feitas por enchimento dos tubos por períodos de 3 minutos.

#### **“Reverse transcriptase- Polimerase Chain reaction” (RT/PCR)**

A transcrição reversa e a amplificação efectuaram-se no mesmo tubo. Foi preparada uma mistura de RT-PCR de 50 µl com a seguinte composição final: 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 200 nM de cada um dos “primers”, 3,5 U de inibidor de ribonucleases RNAGuard (Amersham Biosciences, ref. 27-0815-01), 7,5 U de transcriptase reversa MuLV RTase (Applied Biosystems, ref. N808-0018), 1 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas, ref. EPO402) e respectivo tampão e água miliQ q.b.. A mistura de RT-PCR foi colocada nos tubos onde previamente se fez a imunocaptura. Os tubos foram a incubar no termociclador Biometra® UNO II ou Biometra® Tgradient ou

no termociclador Perkin Elmer GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2400. Os ciclos de temperatura aplicados foram os seguintes: 38 °C durante 45 min, 94 °C a 2 min (transcrição reversa), seguido de 35 ciclos de 92 °C durante 30 seg (passo de desnaturação), 52 °C durante 30 seg (passo de hibridação) e 72 °C durante 45 seg (síntese de DNA), com um passo final de 72 °C durante 7 min.

## **2.5 - AMPLIFICAÇÃO POR “POLYMERASE CHAIN REACTION” (PCR)**

### **2.5.1 - Amplificação a partir de DNA plasmídico ou genómico**

Para a amplificação, foi preparada uma mistura de PCR de 50 µl com a composição final seguinte: 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 200 nM de cada um dos “primers”, 1 U de *Taq* DNA polimerase e respectivo tampão e água miliQ q.b.. Foi usado entre 15-30 ng.µl<sup>-1</sup> de DNA. Os ciclos de temperatura aplicados foram os seguintes: 94 °C a 2 min, seguido de 35 ciclos de 92 °C durante 30 seg (passo de desnaturação), 52 °C durante 30 seg (passo de hibridação) e 72 °C durante 45 seg (síntese de DNA), com um passo final de 72 °C durante 7 min. Foram utilizados os mesmos termocicladores descritos no RT-PCR.

Nas reacções de PCR feitas a partir de “minipreps” (ver 2.9.2) e a partir de DNA genómico, foram usados 15-20 ng.µl<sup>-1</sup> de DNA. Alternativamente, as reacções de PCR foram feitas directamente a partir de uma porção de uma colónia de *E. coli* transformada, retirada da caixa de Petri com o auxílio de um palito esterilizado e transferida directamente para o tubo de PCR.

Na amplificação do gene *nptII* com os “primers” NPT1 e NPT2, a partir do DNA genómico da planta T1B, o ciclo de temperaturas foi alterado para uma temperatura de hibridação de 50 °C.

### **2.5.2 - Amplificação por PCR simultânea com 5'-exonuclease assay (TaqMan)**

A mistura de PCR foi preparada num volume final de 50 µl com a seguinte composição: 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 200 nM de cada um dos “primers” CTV1 e CTV14 (Tabela 2.3), 200 nM de sonda TaqMan E, 1 U de *Taq* DNA polimerase e o respectivo tampão (Anexo I, Tabela 1). Utilizou-se cerca de 10-15 ng de DNA genómico de cada uma das plantas analisadas. Antes de ser iniciado o PCR, foi medida a fluorescência de cada tubo, designada a leitura pré-PCR, através da utilização do programa de computador Sequence Detector 7200 V1.6 da Perkin Elmer. De seguida os tubos de PCR foram colocados no termociclador e sujeitos aos seguintes ciclos de

temperatura: 94 °C durante 2 min, seguido de 49 ciclos de 92 °C durante 30 seg (passo de desnaturação) e 56 °C durante 90 seg (passo de hibridação e síntese de DNA), com um passo final de 56 °C durante 5 min. Após terminado o PCR, mediu-se a fluorescência pós-PCR, a qual é emitida pela molécula FAM a 520 nm, quando excitada a 488 nm.

Sequência da sonda TaqMan E: FAM-5' - ACGGGTATAACGTACACTCGG - 3' - TAMRA.

Os valores de fluorescência da análise pré-PCR foram subtraídos aos valores de fluorescência obtidos na análise pós-PCR para o comprimento de onda 520 nm, correspondente ao pico de emissão de fluorescência.

## **2.6 - CONCEPÇÃO DE “PRIMERS”**

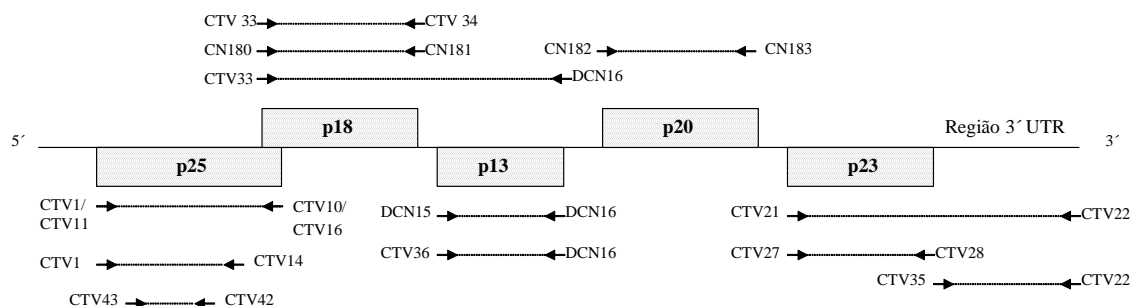
Os “primers” usados foram desenhados com auxílio do programa Oligo (Wojciech, 1994) a partir das sequências genómicas dos isolados de CTV T36 (Karasev *et al.*, 1995), VT (Mawassi *et al.*, 1996) e SY568 (Yang *et al.*, 1999), cujas referências do GenBank vêm descritas na Tabela 2.2. Os “primers” utilizados estão apresentados na Tabela 2.3. A posição relativa dos “primers” em relação às regiões genómicas a amplificar está representada na Fig. 2.1.

**Tabela 2.3** – “Primers” usados na amplificação das diferentes regiões genômicas. Na amplificação de alguns genes foram utilizados pares de “primers” distintos e combinações alternativas de “primers”. Caso estejam presentes locais de restrição nos “primers”, estes vêm assinalados a sublinhado.

Designação do “primer”	Sequência na orientação 5’ ... 3’	Gene Amplificado	Posição do “primer”	Locais de restrição	Dimensão do	Referência
CTV1	ATGGACGACGAAACAAAGAA	p25 (CP)	montante	*	673	Nolasco <i>et al.</i> , 1993
CTV10	ATCAACGTGTGTTGAATTCC		jusante			
CTV11	TTACTAGGTTGGATCCATGGACGACGAAACAAA	p25 (CP)	montante	<i>Bam</i> HI	689	G. Nolasco (ver acima)
CTV10	ATCAACGTGTGTTGAATTCC		jusante	*		
CTV11	TTACTAGGTTGGATCCATGGACGACGAAACAAA	p25 (CP)	montante	<i>Bam</i> HI	700	G. Nolasco
CTV16	GAACGCGAGCTCTCAACGTGTGTTGAATTCC		jusante	<i>Sac</i> I		
CTV1	ATGGACGACGAAACAAAGAA	Parte do gene	montante	*	543	(ver acima)
CTV14	GGTCAAGAAATCYGCACACA	p25 (CP)	jusante			
CTV42	CTCAAATTCGRTTCTGTCT	Parte do gene	jusante	*	415	G. Nolasco
CTV43	ATGTTGTTGCNGCNGAGTC	p25 (CP)	montante			
CTV33	GGCTGATGATGTCGTAGT	p18	montante	*	556	Este trabalho
CTV34	GCATTGAATCCGAACAG		jusante			
CTV33	GGCTGATGATGTCGTAGT	p18+p13	montante	*	926	(ver acima)
DCN16	AGATCTCTAGTTATTCGCAAGGTAAG		jusante			
DCN15	GCTAGCACCATGAGCATTTCGGCGCTC	p13	jusante	<i>Xor</i> II	372	C.L. Niblett ♦ (ver acima)
DCN16	AGATCTCTAGTTATTCGCAAGGTAAG		jusante	<i>Xba</i> I		
CTV36	TTCAATTGCTGCAAT	p13	montante	*	379	Este trabalho (ver acima)
DCN16	AGATCTCTAGTTATTCGCAAGGTAAG		jusante			
CN182	AAGCTICTAGAACCATGCGAGCTTACTTTAGTG	p20	montante	<i>Hind</i> III	563	C.L. Niblett ♦
CN183	CTACACGCAAGATGGAGAG		jusante			
CTV27	TGTGAAAGTCTGCGAGTTA	p23	montante	*	670	Este trabalho
CTV28	CTTATCCGTCCTCAAA		jusante			
CTV21	TATTGTKAAAGTCTGCGAGTTAC	p23+região 3’UTR	montante	*	927	Este trabalho
CTV22	TGGACCTATGTTGGCCCC		jusante			
CTV35	CGCGAACACCACTTCATCTG	região 3’UTR	montante	*	294	Este trabalho (ver acima)
CTV22	TGGACCTATGTTGGCCCC		jusante			
GUS1	GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG	<i>uidA</i>	montante	*	415	Peña <i>et al.</i> , 1997
GUS2	TGGATCCCGGCATAGTTAAA		jusante			
Ubi1	TAGACAATGTAAAGCCAAGATTCAAGACAAGG	Ubiquitina	montante	*	234	J. Leitão
Ubi2	TGTCAATGGTATCAGAGCTCTCCACCTCAAGGG		jusante			
NPT1	GACGAGGCAGCGCGCTAT	<i>nptII</i>	montante	*	597	Ghorbel <i>et al.</i> (2000)
NPT2	AAGAAGGCGATAGAAGGCGA		jusante			

♦ = “Primers” gentilmente cedidos pelo Dr. Chuck L. Niblett.

\* = “Primers” que foram desenhados sem locais de restrição enzimática.



**Fig. 2.1** - Posição relativa dos pares de “primers” que foram usados na amplificação de regiões genômicas do CTV em relação às regiões genômicas a amplificar. As zonas a sombreado são regiões codificantes. Não está desenhado à escala.

## 2.7 - VISUALIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Os produtos resultantes da amplificação por PCR foram analisados em gel de agarose ou, alternativamente, em gel de poliacrilamida não desnaturante a 6,5%. Na análise da variabilidade genómica do CTV por SSCP (ver 2.12.1) e CFLP (2.12.2), os produtos de amplificação de DNA foram sujeitos a electroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante a 8% e gel de poliacrilamida desnaturante a 8%, respectivamente. Os géis de agarose foram corados pelo brometo de etídio, enquanto os géis de poliacrilamida foram corados pelo nitrato de prata.

### **Electroforese em gel de agarose**

Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados em gel de agarose a 1% em tampão TAE (Anexo I, Tabela 1), após electroforese a uma diferença de potencial de 70 V, como descrito por Sambrook *et al.* (1989).

Os fragmentos de DNA resultantes de digestão enzimática foram analisados em gel de agarose a 0,7% no mesmo tampão.

### **Electroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante a 6,5%**

Os produtos de PCR foram analisados em minigel (85 mm por 65 mm por 0,75 mm) de poliacrilamida não desnaturante (PAGE) a 6,5 % (29:1 “cross-linking”) contendo também 10 µl de TEMED e 100 µl de persulfato de amónio em tampão TAE, num volume final de 10 ml. O tampão TAE também foi usado como electrólito. As amostras foram separadas com uma diferença de potencial de 100 V durante 1,5 h, à temperatura ambiente.

### **Marcadores moleculares**

A determinação da dimensão dos produtos amplificados por PCR ou resultantes de digestão enzimática fez-se em gel de agarose a 1%, por comparação com o perfil de bandas de peso molecular conhecidas do marcador 100 pares de bases (pb) DNA Ladder Plus (Fermentas, ref. SM0322) ou do marcador  $\lambda$ HindIII. Este obteve-se a partir do DNA do bacteriófago  $\lambda$  (Amersham Biosciences, ref. 27-4111-01), digerido com a enzima de restrição Hind III (Amersham Biosciences, ref. 27-0860-02).

### **Quantificação de DNA**

A quantificação de DNA genómico fez-se em gel de agarose a 1%, por comparação da intensidade das bandas que se pretendeu analisar com as bandas do

marcador  $\lambda$ Hind III, uma vez que é conhecida a concentração em DNA correspondente a cada banda.

### **Electroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante a 8% (SSCP)**

A análise de SSCP foi efectuada em minigel com a dimensão 85 mm por 65 mm por 0,75 mm, com 8% de poliacrilamida, contendo também 10  $\mu$ l de TEMED e 100  $\mu$ l de persulfato de amónio em tampão TBE 1x (Anexo I, Tabela 1), num volume final de 50 ml. O tampão TBE 1x também foi usado como electrólito.

A separação electroforética decorreu a 4 °C a tempos variados consoante o tamanho do fragmento de DNA a analisar. Foi aplicado uma diferença de potencial de 200 V durante 3h para a maioria das amostras cujos fragmentos têm entre 500-680 pb. Na análise do gene da p13, o tempo de corrida foi ajustado para 90 min por este gene ter 372 ou 379 pb (dependente dos pares de “primers” usados). Na análise da região 3’UTR, que tem 294 pb, a separação electroforética também decorreu durante 90 min.

### **Electroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 8% (CFLP)**

Foram preparados géis com as mesmas dimensões referidas para os géis de SSCP. Os géis foram preparados para um volume final de 10 ml, em tampão TBE 0,5x a que se adicionou acrilamida a 8% (19:1 “cross-linking”), 7 M de ureia, 10  $\mu$ l de TEMED e 100  $\mu$ l de APS. O tampão TBE 0,5x também foi usado como electrólito. Os géis foram submetidos a pré-corrída de 30 min à diferença de potencial de 300 V e as amostras foram previamente desnaturadas a 85° C durante 1-2 min antes de serem carregadas no gel. A electroforese decorreu durante 45 min a uma diferença de potencial de 300 V.

### **Coloração do DNA em géis de agarose e de poliacrilamida**

#### **Coloração pelo brometo de etídio**

Os géis da agarose foram corados com brometo de etídio (1  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) durante 30 min, tal como indicado por Sambrook *et al.* (1989) e visualizados sob luz UV, sendo a imagem processada mediante o sistema de captação e digitalização de imagens do programa de computador BIO-1D versão 6.02 (Kodak, Vilber Luormat).

#### **Coloração pelo nitrato de prata**

Os géis de poliacrilamida foram corados pelo nitrato de prata, segundo um protocolo fornecido pela Boheringer Mannheim. A fixação do DNA no gel de poliacrilamida foi efectuada por incubação numa solução aquosa de ácido acético

glacial a 10%, durante 20 min. Após três lavagens com água destilada durante 4 min os géis foram incubados numa solução aquosa de ácido nítrico a 1% durante 3 min. Seguiram-se 3 lavagens com água destilada durante 4 min e a incubação numa solução de nitrato de prata (Anexo I, Tabela 1) durante 30 min. Após lavagem em água miliQ durante 5-10 segundos, o gel foi colocado na solução de revelação (Anexo I, Tabela 1) e aguardou-se o desenvolvimento da cor. A terminação da reacção e a fixação da revelação fez-se por transferência para uma solução aquosa de ácido acético a 10%, durante 5 min. Após nova lavagem em água miliQ durante 2 min, os géis secaram sobre papel de filtro num secador de géis DryGel durante 30 min a 65 °C.

## **2.8 - CLONAGEM DOS PRODUTOS DE PCR**

### **2.8.1 - Ligação**

Os genes e fragmentos de DNA, amplificados por PCR ou por IC/RT-PCR, foram ligados no plasmídeo pCR<sup>®</sup> II (Invitrogen<sup>®</sup>, ref. K2050-01) ou plasmídeo pGEM<sup>®</sup> T-Easy (Promega, ref. A1360), pelo sistema “TA Cloning<sup>®</sup>”. Os vectores linearizados apresentam as extremidades 3’ salientes com uma base timina. A presença na extremidade 5’ do produto de PCR de uma base adenina adicionada pela *Taq* DNA polimerase, independentemente da sequência amplificada, possibilita a ligação entre o fragmento amplificado e o vector, desde que seja uma amplificação recente.

O plasmídeo pUC18 que transporta a cassette pE7113 foi utilizado para a clonagem do gene da CP do CTV. O plasmídeo pBI121 foi usado para a clonagem da cassette pE7113-CP.

#### **Ligação no plasmídeo pCR<sup>®</sup> II**

A mistura de ligação foi preparada num volume final de 10 µl, com a seguinte composição: 1 µl de tampão de ligação (Anexo I, Tabela 1), 50 ng de vector pCR<sup>®</sup> II, produto de PCR recente com cerca de 15-30 ng, 4 U de T4 DNA ligase e água miliQ esterilizada q.b.. As reacções foram incubadas a 14 °C durante a noite.

#### **Ligação no plasmídeo pGEM<sup>®</sup> T-Easy**

A mistura de ligação foi preparada num volume final de 10 µl, com a seguinte composição: 5 µl de tampão de ligação (Anexo I, Tabela 1), 50 ng de vector pGEM<sup>®</sup> T-

Easy, 0,3 U de T4 DNA ligase, 15-30 ng de produto de PCR recente e água miliQ esterilizada q.b.. As reacções foram incubadas a 4 °C durante a noite.

### **Ligação noutros plasmídios**

*Ligação do gene da CP no plasmídio pUC18-pE7113 / Ligação da cassette pE7113-CP no plasmídio pBII21*

A mistura de ligação foi preparada num volume final de 10 µl, com a seguinte composição: 1 µl de tampão One-Phor-All (OPA) (Anexo I, Tabela 1), 10 mM de ATP (Amersham Biosciences, ref. 2705601) e 1 U de T4 DNA ligase (Takara, ref. 2011A), cerca de 10 ng do plasmídio e cerca de 10 ng de DNA contendo o gene da CP. A mistura de reacção ficou a incubar durante 4 h a 10 °C.

### **2.8.2 – Digestão enzimática**

Quando necessário, a linearização dos plasmídios pGEM<sup>®</sup> T-Easy e pCR<sup>®</sup> II foi feita por digestão enzimática pela enzima *Eco* RI. Usou-se 10-15 ng de DNA plasmídico, numa mistura contendo tampão OPA (Anexo I, Tabela 1), 15 U de enzima de restrição *Eco* RI (Amersham Biosciences, ref. 27-0854) e água miliQ até perfazer 10 µl. A mistura foi homogeneizada e incubada a 37° C durante 1h. O resultado da digestão enzimática foi verificado em gel de agarose a 1%.

Quando necessário efectuou-se a digestão enzimática com duas enzimas de restrição numa mistura de reacção com a seguinte composição: tampão OPA 1,5x, 12 U de cada uma das enzimas, cerca de 20 ng de produto de PCR e água miliQ até perfazer um volume final de 75 µl. A mistura foi homogeneizada e incubada a 37° C durante 2 h.

### **2.8.3 - Preparação de células competentes de *Escherichia coli***

A preparação de células competentes de *Escherichia coli* InvαF' efectuou-se pelo método do cloreto de cálcio descrito por Ausubel *et al.* (1994), com algumas modificações. Uma cultura de *Escherichia coli* InvαF' cresceu em meio LB líquido (ver Anexo I, Tabela 2) a 37° C à densidade óptica (D.O.  $\lambda=600$  nm) de 0,4-0,5, correspondente à fase exponencial de crescimento, sendo de seguida colocada em gelo durante 10 min. As células bacterianas, recuperadas por centrifugação a 6000 rpm durante 10 min a 4 °C, foram ressuspensas em 5 ml de solução aquosa de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 0,1 M previamente arrefecido. Manteve-se a solução no gelo durante 10 min, seguido de uma centrifugação a 6000 rpm durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi decantado e o sedimento bacteriano foi ressuspensado em 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1M. Distribuíram-se alíquotas de 100 µl de células competentes por cada tubo eppendorf, às quais se

adicionou 100  $\mu\text{l}$  de meio LB líquido com 30% (v/v) de glicerol. As células competentes foram guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Foi usada a estirpe de *E. coli* Inv $\alpha$ F' por possibilitar a selecção de colónias transformadas por  $\alpha$ -complementação, sem necessitar de isopropil-tiogalactósido (IPTG).

#### **2.8.4 - Transformação de células competentes de *E. coli***

Para transformar células competentes de *E. coli* utilizou-se um protocolo baseado em Sambrook *et al.* (1989). A uma alíquota de 200  $\mu\text{l}$  de células competentes adicionou-se cerca de 50 ng do plasmídeo recombinante. Após incubação em gelo durante 30 min, as células foram transferidas para um banho maria a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 45 seg e imediatamente após este período de tempo colocadas em gelo durante 2 min. Em seguida adicionou-se 400  $\mu\text{l}$  de meio SOC (Anexo I, Tabela 1) e as células bacterianas foram colocadas a crescer a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 h com agitação a 150 rpm num agitador Edmund Bühler Th15. Plaqueou-se 100  $\mu\text{l}$  a 200  $\mu\text{l}$  da cultura bacteriana em caixas de Petri com meio LB sólido (Anexo I, Tabela 2) que ficou a incubar numa estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante a noite. O meio LB foi suplementado com o antibiótico canamicina à concentração final de  $50\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  quando o plasmídeo pCR<sup>®</sup>II foi usado na transformação. A suplementação do meio LB com ampicilina à concentração de  $50\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  foi usada na transformação com o plasmídeo pGEM<sup>®</sup> T-easy. Os antibióticos foram adicionados ao meio LB após a autoclavagem. Depois da solidificação do meio LB, foi espalhado sobre a sua superfície 40  $\mu\text{l}$  de solução X-gal (Sigma, ref. 7240-90-6) (Anexo I, Tabela 1). A preparação e a concentração usada de cada antibiótico são descritas na Tabela 3 do Anexo I.

#### **2.8.5 - Selecção de transformantes**

A selecção inicial de transformantes foi feita por  $\alpha$ -complementação a que se seguiu uma confirmação por PCR. Com a ponta de um palito esterilizado foi retirada uma pequena porção de cada colónia transformada para um tubo de PCR ao qual se adicionou 50  $\mu\text{l}$  da mistura de PCR, como descrito em 2.5.1.

## **2.9 - PURIFICAÇÃO E EXTRACÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA E DE RNA**

### **2.9.1 - Extracção de DNA de géis de agarose**

A purificação dos fragmentos de DNA após a digestão enzimática foi feita por um de dois processos, os quais são referidos de seguida.

#### **Extracção de DNA com o kit “Sephaglas™ BandPrep”**

A agarose que contém a banda de interesse foi cortada, sob luz UV, com a lâmina de um bisturi. O DNA foi extraído da agarose por aplicação do kit de purificação “Sephaglas™ BandPrep” (Amersham Biosciences, ref. XY-031-00-08). O DNA ficou ligado a uma resina por afinidade para facilitar a percolação de soluções de lavagem através da mistura resina/solução de DNA. A eluição do DNA fez-se por aplicação de Tris-HCl 10 mM pH8, seguido de uma centrifugação. O DNA foi guardado a  $-20^{\circ}$  C.

#### **Extracção pelo sistema Biometra® Transiluminator**

O fragmento de DNA foi carregado num gel de agarose a 1,2% com  $0,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de brometo de etídio em tampão TAE e foi sujeito a uma diferença de potencial de 70V. A presença de uma lâmpada de emissão de luz na banda dos UV permitiu avaliar a separação electroforética ao longo do tempo. Imediatamente antes da banda de interesse entrar no poço existente a meio do gel de agarose, foi aí colocada uma solução densa “focusing solution” (Anexo I, Tabela 1). Após a banda estar inserida no poço, a solução densa foi aspirada com uma micropipeta. O DNA separado por este processo foi purificado por precipitação por acetato de sódio/etanol e ressuspendido em Tris-HCl 10 mM pH 8.

### **2.9.2 - Extracção de DNA plasmídico em pequena escala (“miniprep”) pelo Kit “Wizard® Plus Minipreps”**

O DNA plasmídico foi extraído segundo o método da lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989), com a utilização do kit Wizard® Plus Minipreps. A cultura bacteriana cresceu durante a noite a  $37^{\circ}$  C num agitador Edmund Bühler Th15 a 180 rpm. Após a lise das células bacterianas na presença de RNase A e a precipitação de proteínas e polissacáridos, o DNA plasmídico ficou ligado a uma resina por afinidade, para facilitar

a percolação de soluções de lavagem através da mistura resina/solução de DNA. O DNA foi sujeito a lavagens e foi eluído da resina por aplicação de Tris-HCl 10 mM pH8 seguido de uma centrifugação. O DNA foi guardado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **2.9.3 - Extracção de DNA genómico de tabaco e de citrinos**

Para a extracção do DNA genómico de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) e de laranja azeda [*Citrus aurantium* L.] cv. Brazilian, utilizaram-se dois processos: o método de extracção de Edwards *et al.* (1991) modificado, quando se pretendeu fazer a detecção de plantas transformadas e o kit “DNeasy Plant Mini kit”, quando se pretendeu fazer a análise TaqMan e a análise por Southern Blot.

#### **Extracção de DNA genómico pelo método Edwards**

Cortaram-se dois pedaços de folhas jovens de *N. tabacum* ou de laranja azeda, consoante o material vegetal a analisar, com a dimensão da tampa do tubo eppendorf. O tecido foi macerado num almofariz com 400  $\mu\text{l}$  de tampão de extracção de DNA genómico (Anexo I, Tabela 1). Após sedimentação dos detritos celulares a 12500 rpm durante 1 min, 300  $\mu\text{l}$  do sobrenadante foram transferidos para outro tubo eppendorf. Na extracção de DNA dos citrinos, um passo adicional foi introduzido, após o que se mantém a igualdade no processo de extracção de DNA: foi adicionado ao sobrenadante 300  $\mu\text{l}$  de acetato de sódio 3M pH 5,2 e as amostras mantidas à temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 min, seguido de uma centrifugação a 13000 rpm durante 10 min. Foi adicionado ao sobrenadante um volume igual de isopropanol para a precipitação do DNA e ficou a incubar à temperatura ambiente durante 5 min. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm durante 5 min. O sedimento secou a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e posteriormente foi ressuscitado em 50  $\mu\text{l}$  de tampão Tris-HCl 10 mM pH 8. O DNA foi guardado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **Extracção de DNA genómico pelo kit “DNeasy Plant Mini Kit”**

O DNA genómico foi também extraído através da utilização do kit “DNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen, ref. 69104). Cerca de 100 mg de tecido foliar foi macerado em azoto líquido, seguido da lise das células na presença de RNase A. Após a precipitação de proteínas e polissacáridos que foram removidos por filtração, o DNA genómico foi precipitado pelo etanol. De seguida o DNA ficou ligado a uma resina por afinidade, para facilitar a percolação de soluções de lavagem através da mistura resina/solução de DNA. A eluição do DNA fez-se por passagem através da resina de tampão Tris-HCl 10 mM pH 8 ou água miliQ esterilizada e posterior centrifugação. O DNA foi guardado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.9.4 - Extracção de RNA**

Na extracção do RNA total da célula foi utilizado o kit “RNeasy Plant Extraction” (Qiagen, ref. 74904). Cerca de 100 mg de tecido foliar foi macerado em azoto líquido e os restos celulares foram removidos por filtração. Após a precipitação do RNA pelo etanol, este ficou ligado a uma resina por afinidade, para facilitar a percolação de soluções de lavagem através da resina/solução de DNA. O RNA foi eluído da resina por aplicação de 30 µl de água sem RNase, seguido de uma centrifugação. O RNA foi guardado a -20 °C.

#### **2.9.5 – Purificação de fragmentos de DNA com o kit “MicroSpin™ Columns”**

Os fragmentos de DNA foram purificados utilizando o kit “MicroSpin™ Columns” da Amersham Biosciences (ref. XY-047-00-09). O DNA foi aplicado a colunas S-400 HR [colunas com resina Sephacryl® S-400 equilibradas com tampão Tris-EDTA (pH 7,6)]. A purificação foi efectuada por filtração do DNA através de uma resina.

#### **2.9.6 - Precipitação de DNA plasmídico**

O DNA em cadeia dupla foi precipitado pelo acetato de sódio/etanol, tal como descrito por Sambrook *et al.* (1989), com algumas modificações. À solução de DNA plasmídico ou genómico foi adicionado 1/10 do volume em acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 3 volumes em etanol absoluto a -20 °C. Após precipitação a -20 °C durante a noite, o sedimento foi recolhido por centrifugação a 13000 rpm durante 15 min, seguido de uma lavagem com etanol a 70% a -20° C. Seguiu-se uma nova centrifugação nas mesmas condições referidas acima e uma última lavagem com etanol absoluto a -20 °C. O DNA, sedimentado por centrifugação como na etapa anterior e colocado a secar a 37° C durante cerca de 15 min, foi ressuscitado em água miliQ.

#### **2.10 - IMMUNODOT BLOT**

Na detecção da proteína do capsídeo do CTV em membrana de nitrocelulose, foi usada a técnica Imunodot Blot segundo Garnsey *et al.* (1993), com a introdução de

algumas modificações. A extracção de proteínas foi feita a partir de 0,1 g de tecido foliar, macerado num almofariz com 400 µl de tampão de extracção de proteínas, cuja composição vem referida no Anexo I, Tabela 1. Foi usada uma membrana de nitrocelulose de 45 µm (Amersham Biosciences, ref. 2005-106), previamente humidificada com tampão PBS (ver Anexo I, Tabela 1). Colocou-se algumas gotas de cada um dos extractos proteicos sobre a membrana, que foram fixados a 120 °C durante 15 min. Procedeu-se à reacção de bloqueamento da membrana com solução de leite em pó desnatado a 5% em tampão PBS durante 1h, à temperatura ambiente. Seguiram-se 3 lavagens de 5 min com tampão PBS-Tween. As membranas foram incubadas durante 2h com o anticorpo policlonal SP7 contra a CP do CTV, previamente testado por Sequeira (1997), diluído 1:500 em solução PBS-Tween com 1% de leite em pó desnatado. Seguiram-se 3 lavagens de 5 min com tampão PBS-Tween e procedeu-se à incubação durante 1h com o anticorpo anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina numa diluição 1:5000 em PBS-Tween com 1% de leite em pó desnatado. Seguiram-se lavagens como acima descrito. Como substrato da fosfatase alcalina utilizou-se a solução de BCIP-NBT (Anexo I, Tabela 1), com tempo de incubação de 15-20 min. O produto da reacção enzimática é insolúvel e precipita no local de reacção.

## **2.11 - SOUTHERN BLOT**

Na análise de produtos de PCR para a detecção do gene da CP do CTV, utilizou-se o método Southern Blot não radioactivo que faz uso do kit “DIG Nucleic Acid Detection Kit” (Boheringer Mannheim, ref. 1175041).

Também foram feitas análises Southern Blot com fósforo radioactivo, segundo Sambrook *et al.* (1989) modificado, na detecção do gene *uidA* no DNA genómico de plantas transformadas.

### **Análise Southern Blot pelo kit “DIG Nucleic Acid Detection Kit”**

São descritos os passos do processo que são sujeitos a alteração em relação ao descrito no protocolo do kit. O gene da CP foi previamente amplificado a partir de 10-15 ng.µl<sup>-1</sup> de DNA genómico com os “primers” CTV1 e CTV14 (Tabela 2.3). Após electroforese em gel de agarose a 1%, o DNA foi transferido para uma membrana de nylon (Boheringer, ref. 1417240) em condições alcalinas (NaOH 0,4 M), empregando um aparelho de transferência por vácuo, à pressão de 40 mbar, durante 1,5 h. Após a neutralização, feita de acordo com o descrito no kit, o DNA foi fixado por exposição durante 15 min a uma temperatura de 120 °C. Seguiu-se a pré-hibridação a 65 °C durante 1h. Na hibridação, foi adicionada a sonda com 543 pb e marcada com digoxigenina, que detecta o gene da CP. A sonda foi previamente desnaturada a 95 °C, à

concentração de 4  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de DNA marcado. A concentração da sonda foi determinada por dot-blot por comparação com uma solução de DNA marcado com digoxigenina, de concentração conhecida. A hibridação decorreu durante 6 h a 65 °C, de acordo com o que está descrito no kit. A digoxigenina presente na sonda foi detectada pelo conjugado anti-digoxigenina-AP (anti-digoxigenina-fosfatase alcalina). Uma reacção colorimétrica permitiu a detecção da fosfatase alcalina, por incubação da membrana em solução NBT-BCIP (Anexo I, Tabela 1).

#### *Marcação de uma sonda de DNA com digoxigenina*

A sonda do gene da CP foi marcada com DIG-11-dUTP através de uma reacção de PCR. O gene da CP do CTV foi amplificado por PCR com os “primers” CTV42 e CTV43 (Tabela 2.3) a partir de um clone no plasmídeo pCR® II. A mistura de PCR foi feita num volume final de 25  $\mu\text{l}$ , com a composição final seguinte:  $\text{MgCl}_2$  a 1,5 mM, “primers” a 0,4  $\mu\text{M}$ , DIG-dUTP a 70  $\mu\text{M}$ , dTTP a 130  $\mu\text{M}$  e restantes dNTPs a 200  $\mu\text{M}$ , 1,5 U de *Taq* DNA polimerase e o respectivo tampão (Anexo I, Tabela 1) e água miliQ q.b.. Os tempos de incubação foram os mesmos referidos em 2.5.1.

A confirmação da marcação da sonda foi feita por electroforese em gel de agarose a 1%, uma vez que a sonda apresenta uma mobilidade menor que o produto de PCR não marcado. A sonda foi purificada em gel de agarose a 1% por um processo adaptado de Koenen (1989) e modificado por Nolasco (1994).

### **Análise Southern Blot pelo método radioactivo**

Na análise Southern Blot pelo método radioactivo foi seguido o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989), com algumas modificações. São descritos os passos do processo que são sujeitos a alteração e que foram modificados no presente trabalho.

Na digestão enzimática de 10  $\mu\text{g}$  de DNA genómico para análise Southern Blot foi usada a enzima *EcoRI* (Amersham Biosciences, ref. E1040Y) a 3  $\text{U}\cdot\mu\text{g}^{-1}$  de DNA, o tampão da enzima (Anexo I, Tabela 1) e água miliQ para perfazer um volume final de 50  $\mu\text{l}$ . A digestão enzimática decorreu durante a noite a 37 °C. Os fragmentos de DNA foram separados por electroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TAE, com uma diferença de potencial de 30 V, durante cerca de 18 h. A transferência capilar para uma membrana Hybond™-NX (Amersham Biosciences, ref. RPN303T) foi feita na presença de uma solução SSC 3x (Anexo I, Tabela 1-diluição 6,7x do tampão SSC 20x), durante 16 h. A fixação do DNA na membrana de nylon foi feita a 80 °C durante 2 h. Na pré-hibridação, a membrana ficou a incubar durante 5 min a 68 °C com 10  $\mu\text{l}$  de solução PerfectHyb™ Plus (Sigma, ref. H7033). A hibridação foi iniciada pela adição da sonda do gene *uidA* e decorreu durante 3 h a 68 °C. De seguida, a membrana foi lavada à

temperatura ambiente (2 x 5 minutos cada) com SSC 2x (Anexo I, Tabela 1-diluição 10x do tampão SSC 20x). Seguiram-se lavagens a 68 °C (2x 20 minutos cada) com uma solução SSC 0,5x (Anexo I, Tabela 1-diluição 40x do tampão SSC 20x), contendo SDS 0,1%. A membrana foi colocada numa cassette “intensifying screen” a –80 °C durante 72 h e depois revelada para visualização das bandas.

#### *Marcação de uma sonda de DNA com <sup>32</sup>P*

A sonda foi preparada a partir do produto de PCR resultante da amplificação do gene *uidA* do plasmídeo pBI121, com a aplicação dos “primers” GUS1 e GUS2 (Tabela 2.3), originando um fragmento com 415 pb. O produto de PCR foi purificado através do kit GFX™PCR (Amersham BioSciences, ref. 27-9602-01). O DNA foi ligado a uma resina de forma a facilitar a percolação de soluções de lavagem através da mistura resina/solução de DNA.

Cerca de 100 ng de DNA foram diluídos em Tris-EDTA 10 mM pH 8 para perfazer o volume final de 50 µl. O DNA foi marcado com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP por “random priming”, através do kit Rediprime II DNA Labelling System (Amersham Biosciences, ref. RPN1634). A solução de DNA, desnaturada a 100 °C durante 10 min, foi imediatamente arrefecida em gelo para evitar o emparelhamento das cadeias simples. A solução foi vertida para um tubo contendo já uma mistura de dNTP’s e a enzima *Taq* DNA polimerase e de seguida adicionou-se 2 µl de fósforo radioactivo [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP. A reacção de incorporação do fósforo decorreu durante 15 min a 37 °C. As cadeias de DNA foram novamente desnaturadas como descrito acima.

## **2.12 - ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÓMICA DO CTV**

### **2.12.1 - Single Stranded Conformation Polymorphisms (SSCP)**

A solução desnaturante de formamida (Anexo I, Tabela 1) foi adicionada a cerca de 10-20 ng do produto de PCR para perfazer 10 µl (Rubio *et al.*, 1996). O DNA foi desnaturado a 95 °C durante 7 min e as amostras arrefecidas em gelo rapidamente para não ocorrer o emparelhamento entre cadeias complementares. As amostras foram analisadas por electroforese num minigel (85 mm por 65 mm por 0,75 mm) de poliacrilamida a 8% não desnaturante em tampão TBE, a 4 °C. A composição do gel está descrita em 2.7. As bandas de DNA foram visualizadas por coloração pelo nitrato de prata.

### **2.12.2 - Cleavase Fragment Length Polymorphism (CFLP)**

Os ensaios foram inicialmente efectuados com o kit CFLP<sup>®</sup> da Boehringer Mannheim (ref. 1814079) que posteriormente foi descontinuado. As análises passaram então a ser efectuadas com o kit CFLP Scanning Sistem da Takara Shuzo Co. (ref. 6627). A análise foi efectuada directamente sobre os produtos de amplificação do PCR precipitados por etanol. Dependendo da quantificação feita por electroforese em gel de agarose, foi diluído 1 ou 2 µl do produto de PCR num volume final de 15 µl em 5 mM MOPS (Anexo I, Tabela 1). O DNA foi desnaturado a 95 °C e em seguida arrefecido até à temperatura de reacção (45 °C). A enzima Cleavase (5 µl), diluída no respectivo tampão (Anexo I, Tabela 1) e pré-aquecida à temperatura de 45 °C, foi adicionada à reacção. A composição final da mistura de reacção foi de 13,75 mM MOPS (pH 7.5) (Anexo I, Tabela 1), 0,2 mM de MnCl<sub>2</sub>, 0,05% (w/v) de Tween 20, 0,05% (w/v) de Nonidet P-40 e 1,25 U de Cleavase. A digestão efectuada pela enzima Cleavase decorreu durante 12 minutos e cessou por adição de 16 µl da solução de terminação (Anexo I, Tabela 1). Os fragmentos de DNA, separados por electroforese num minigel de poliacrilamida desnaturante a 8%, foram visualizados após coloração pelo nitrato de prata. A composição do gel está descrita em 2.7.

A comparação dos padrões de CFLP foi feita através do software Bionumerics (Matemáticas Aplicadas, Kortrijk, Bélgica), usando o coeficiente de semelhança de Pearson e o método “Unweight Pair Group Average Method” (UPGMA). Foram determinados os valores de correlação cofenética para avaliar a consistência dos agrupamentos formados. De forma a evitar problemas de reconhecimento das bandas mais fracas e de menor peso molecular, a análise pelo Bionumerics limitou-se às bandas com mais de 200 bases.

### **2.12.3 – Sequenciação**

A sequenciação, realizada na maioria dos clones em ambas as direcções, foi realizada na empresa MWG-Biotech (Ebersberg, Alemanha) e 4 Base Lab GmbH (Reutlingen, Alemanha).

#### **Análise das sequências**

O alinhamento das sequências nucleotídicas foi efectuado com o software BioEdit (Hall, 1999) e ClustalX (Thompson *et al.*, 1994). As matrizes de identidade nucleotídica de cada região genómica foram calculadas pelo programa BioEdit (Hall, 1999), usando

as sequências nucleotídicas dos clones e também dos isolados publicados no GenBank. A sequência deduzida de aminoácidos foi calculada pelo programa BioEdit.

A construção de dendrogramas foi realizada com o software MEGA versão 2.1 (Kumar *et al.* 2001), pelo método UPGMA. O mesmo software foi utilizado no cálculo das substituições sinónimas e não sinónimas.

### **2.13 - TRANSFORMAÇÃO DE *Agrobacterium tumefaciens* POR CONJUGAÇÃO TRIPARENTAL**

Os plasmídios clonados em *E. coli* Inv $\alpha$ F' foram transferidos para a bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe EHA105, por conjugação triparental. Neste processo foi utilizada a estirpe de *E. coli* mobilizadora HB101 que contém o plasmídio pRK2013 e a estirpe receptora do plasmídio *A. tumefaciens* EHA105. Todas as estirpes foram induzidas a crescer. A estirpe de *E. coli* HB101 foi repicada em meio fresco LB sólido (Anexo I, Tabela 2) e cresceu a 37 °C durante a noite. A estirpe *E. coli* Inv $\alpha$ F'(estirpe doadora) cresceu na presença de canamicina (50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) e nas mesmas condições de cultura. A estirpe EHA 105 foi repicada em meio LB sólido com rifampicina (50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) e cresceu a 28 °C durante 48h. Foi retirado um inóculo de cada uma das bactérias que foram depois misturados numa caixa de Petri com meio LB sólido sem antibióticos de forma a permitir a conjugação triparental. Após incubação da cultura a 28 °C durante 24h, um inóculo da mistura de bactérias foi repicado em meio LB sólido suplementado com os antibióticos canamicina e rifampicina, nas mesmas concentrações referidas acima. Ao fim de três dias de cultura, uma das colónias foi repicada em meio fresco LB sólido com os mesmos antibióticos. A confirmação da transformação de *A. tumefaciens* EHA105 foi feita por PCR. As estirpes de bactérias foram sujeitas a uma reacção de coloração Gram e foram posteriormente mantidas a -80 °C.

Todas as estirpes bacterianas (EHA105; EHA105 p35SGUSINT; C58 p35SGUSINT e HB101 pRK2013) foram gentilmente cedidas pela Prof. Doutora Margarida Oliveira (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e Instituto de Tecnologia Química e Biológica).

### **2.14 - CURVA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES DE *Agrobacterium tumefaciens* USADAS NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA**

Foi determinada a curva de crescimento das estirpes de agrobactérias usadas nos processos de transformação: EHA 105 pE7113-CP, EHA 105 p35SGUSINT e C58

p35SGUSINT. A partir de uma cultura a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , foram preparados três pré-inóculos de cada estirpe em meio LB líquido (Anexo I, Tabela 2) suplementado com canamicina ( $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) e com rifampicina ( $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), que cresceram a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante a noite. Uma cultura de 100 ml foi iniciada com cerca de 1% do pré-inóculo e com uma  $\text{D.O.}_{\lambda=600\text{ nm}}$  de 0,02 a 0,04. A curva de crescimento foi avaliada por espectrofotometria até atingir o estado estacionário. O número de unidades formadoras de colónias presentes foi determinado segundo o método da gota (Barbosa *et al.*, 1995), para a D.O. de 0,2, 0,4 e 0,6. Para tal, foram feitas diluições  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  da cultura bacteriana que foram semeadas em meio LB sólido (Anexo I, Tabela 2) suplementado com os dois antibióticos referidos acima e usados nas mesmas concentrações.

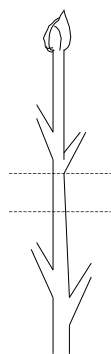
## **2.15 - INDUÇÃO DA FORMAÇÃO DE REBENTOS ADVENTÍCIOS A PARTIR DE SEGMENTOS DE ENTRENÓS**

### **2.15.1 - Preparação do material vegetal**

Sementes de laranjeira azeda cv. Brazilian semearam-se em vermiculite. Após germinação, as plântulas foram transferidas para sacos com substrato constituído por 25% de turfa, 45% de casca de pinho, 30% de areia,  $2,5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de superfosfato de cálcio e  $3\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de osmocote (adubo de libertação lenta) e mantidas em estufa à prova de insectos, com controlo de temperatura. Após dez meses de cultivo, as plantas foram podadas e os novos rebentos laterais que entretanto se desenvolveram foram colhidos para obtenção de explantes de entrenós.

Foram utilizadas as instalações da Direcção Regional de Agricultura para a germinação e posterior crescimento das plântulas.

Após as folhas e os espinhos serem retirados dos ramos juvenis (Fig. 2.2), estes foram lavados com água e detergente sonasol. Seguiu-se uma lavagem de 30 min em água esterilizada com 7,5-10% (v:v) de lixívia comercial e uma segunda lavagem com a mesma duração, numa solução similar com adição de SDS a 0,1%. Após duas novas lavagens com água esterilizada, cortaram-se segmentos internodais com 1 cm de comprimento que foram colocados no meio de cultura na posição vertical, respeitando a orientação do entrenó na planta. Os segmentos de entrenó foram cortados imediatamente abaixo do nó, de acordo com a Fig. 2.2.



**Fig. 2.2** - Esquema do corte de um segmento do entrenó de ramos jovens de laranjeira azeda a usar como explantes no processo de transformação genética.

---

### 2.15.2 - Meio de cultura testado e condições de incubação

Utilizou-se o meio de cultura D (Anexo I, Tabela 2) que, consoante a suplementação com diferentes combinações da hormona benziladenina (BA) e ácido naftalenoacético (NAA), foi designado de D2 a D13, de acordo com a Tabela 5.1. O meio controlo sem suplementação hormonal foi designado de D1. Os explantes foram colocados em frascos de vidro de 8,5 cm de diâmetro e tapados com tampa de plástico. As culturas foram colocadas num fitotrão e permaneceram às escuras durante 20 dias a 27 °C. Posteriormente foram expostas a fotoperíodo de 16 horas luz, mantendo-se a temperatura. As culturas foram repicadas mensalmente.

Para o enraizamento dos rebentos adventícios utilizou-se o meio D que, consoante a suplementação com a auxina NAA ou por alteração da concentração de alguns dos componentes, foram designados de R1 a R6, segundo descrito na Tabela 5.2. As culturas foram repicadas mensalmente e foram mantidas com fotoperíodo de 16 h luz e nas mesmas condições referidas acima. Na quantificação dos resultados foi contado o número de raízes formadas.

### 2.15.3 - Quantificação dos resultados

Os resultados da indução da formação de rebentos adventícios foram quantificados após cerca de dois meses de cultura. Foi quantificado o número de segmentos de entrenós que apresentaram rebentos adventícios, o número de gemas e de rebentos adventícios formados por segmento de entrenó, assim como o comprimento dos rebentos adventícios. Na contagem da formação de gemas foi utilizada uma lupa.

## **2.16 - TOLERÂNCIA DOS SEGMENTOS DE ENTRENÓS AOS ANTIBIÓTICOS CEFOTAXIMA E CANAMICINA**

Utilizaram-se segmentos de entrenós de ramos jovens de plantas com cerca de 12 meses, que foram preparados e cortados de acordo com o descrito em 2.15.1. Os segmentos internodais foram colocados no meio de cultura D5 (meio D com suplementação hormonal de BA  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  e NAA  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$ ) (Tabela 5.1), suplementado com concentrações diferentes do antibiótico canamicina (50, 100, 150 and  $200 \text{ mg.l}^{-1}$ ) ou do antibiótico cefotaxima (250, 500, 750 and  $900 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Foi também testada a presença conjunta de cefotaxima e canamicina nas concentrações de  $500 \text{ mg.l}^{-1}$  e  $100 \text{ mg.l}^{-1}$ , respectivamente. O meio controlo não foi suplementado com antibióticos.

Os explantes foram colocados em frascos de vidro, com as dimensões especificadas em 2.15.1. As culturas foram mantidas num fitotrão às escuras, durante 20 dias a  $27 \text{ }^\circ\text{C}$  e posteriormente expostas a fotoperíodo de 16 h luz e à mesma temperatura. A quantificação de resultados foi realizada segundo descrito em 2.15.3.

## **2.17 – TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens***

### **2.17.1 - Material vegetal, meios de cultura e condições de incubação**

#### **2.17.1.1 – Condições de cultura de *Nicotiana tabacum***

Plantas de *N. tabacum* foram mantidas *in vitro* em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) modificado, designado RMIN (Anexo I, Tabela 2), para promover o desenvolvimento radicular e caulinar. As culturas, repicadas mensalmente, foram usadas para fornecer material vegetal necessário ao processo de transformação genética.

O meio de cultura de regeneração (Anexo I, Tabela 2) foi usado na indução da formação de rebentos adventícios a partir de tecido foliar. Os antibióticos canamicina, na concentração de  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  e cefotaxima, na concentração de  $500 \text{ mg.l}^{-1}$ , foram adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem.

As culturas foram mantidas num fitotrão à temperatura de  $27 \text{ }^\circ\text{C}$  e com fotoperíodo de 16 h luz.

### 2.17.1.2 – Condições de cultura de *Citrus aurantium*

#### Preparação de segmentos de entrenós provenientes de plantas com cerca de 12 e 24 meses

Os segmentos de entrenós foram retirados de ramos jovens de plantas com cerca de 12 e 24 meses. Os ramos foram desinfetados para posteriormente serem cortados segmentos de entrenós com 1 cm, de acordo com o descrito em 2.15.1.

#### Preparação de sementes a usar na transformação genética

Sementes de laranjeira azeda foram extraídas de frutos frescos previamente lavados em água corrente com detergente sonasol e desinfetados com lixívia (NaOCl) a 10% (v/v). As sementes foram por sua vez desinfetadas numa solução com lixívia a 10% (v/v) durante 30 min e posteriormente lavadas em água esterilizada. O tegumento foi extraído e as sementes foram colocadas em caixas de Petri com meio MS semi-sólido sem compostos orgânicos (Anexo I, Tabela 2), com pH ajustado a 5,7 e solidificado com 8 g.l<sup>-1</sup> de bacto-agar que foi autoclavado a 120 °C à pressão de 1 atmosfera. As sementes germinaram durante 1, 5 ou 7 dias, a 25 °C, na escuridão.

### 2.17.2 – Transformação genética

#### 2.17.2.1 – Transformação de *Nicotiana tabacum*

A transformação de plantas de *N. tabacum* foi feita pelo método dos discos foliares, desenvolvido por Horsch *et al.* (1985). Uma colónia de uma cultura da estirpe *A. tumefaciens* EHA105 foi repicada em meio LB líquido (Anexo I, Tabela 2) e cresceu à temperatura de 28 °C com os antibióticos canamicina (50 µg.ml<sup>-1</sup>) e rifampicina (50 µg.ml<sup>-1</sup>) até atingir a D.O.  $\lambda=600$  nm de 0,6 a 0,8. Após recolha do sedimento bacteriano por centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos, este foi ressuscitado em igual volume de meio MS líquido sem compostos orgânicos (Anexo I, Tabela 2). A lavagem das células bacterianas foi repetida novamente. Procedeu-se ao corte de folhas de *N. tabacum* provenientes de culturas *in vitro*, com uma secção de 0,5 cm<sup>2</sup>, que de seguida foram imersas na solução de *A. tumefaciens* durante 3 h. Após ser retirado o excesso de suspensão bacteriana em papel de filtro esterilizado, as secções foliares foram colocadas em caixas de Petri com meio MS semi-sólido sem compostos orgânicos (Anexo I, Tabela 2). Seguiu-se um período de co-cultura de três dias, na escuridão, a 27 °C e posteriormente os explantes foram transferidos para meio de regeneração (Anexo I, Tabela 2).

Os rebentos adventícios, que começaram a surgir ao fim de 3 semanas de cultura, foram excisados e transferidos para meio RMIN (Anexo I, Tabela 2) para induzir o desenvolvimento caulinar e radicular. Foram realizados os seguintes controlos: a) controlo à composição do meio de regeneração, onde foram colocadas secções foliares não sujeitas ao processo de transformação; b) controlo à concentração dos antibióticos usada, através da presença de secções foliares no meio de regeneração com antibióticos.

As plântulas de tabaco foram mantidas e repicadas mensalmente no meio RMIN durante três a quatro meses. Posteriormente as plântulas foram envasadas numa mistura com turfa e vermiculite (2:1) e aclimatadas durante 15 dias num fitotróo à temperatura de 25 °C com fotoperíodo de 16 h luz, sendo de seguida transferidas para uma estufa.

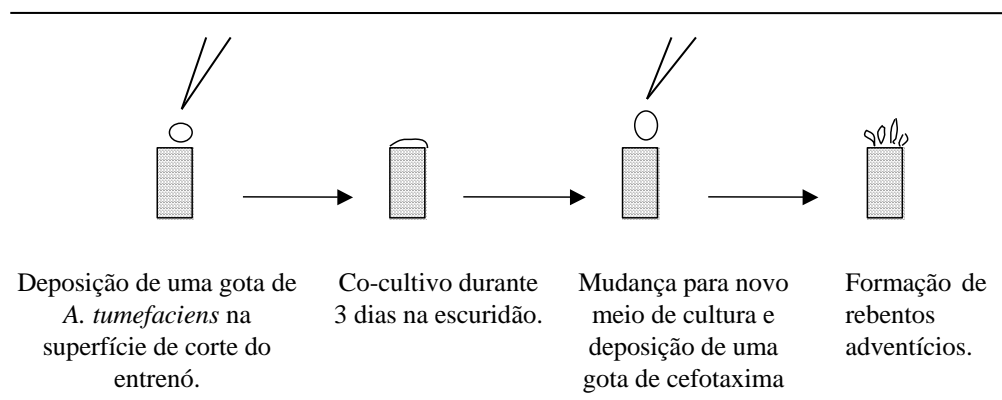
### **2.17.2.2 - Transformação genética de laranjeira azeda cv. Brazilian**

Foram desenvolvidos dois processos de transformação de laranjeira azeda: a) transformação dos rebentos adventícios formados na superfície de corte de segmentos de entrenós, com utilização do meio de cultura D (Anexo I, Tabela 2), previamente testado na indução de rebentos adventícios; b) transformação de sementes com 1, 5 e 7 dias de germinação.

#### **2.17.2.2.1 - Transformação de rebentos adventícios**

O meio de cultura usado para a formação de rebentos adventícios provenientes de segmentos de entrenós foi testada no meio de cultura D5 que é baseado no meio de cultura D (Anexo I, Tabela 2) suplementado com 1 mg.ml<sup>-1</sup> de benziladenina (BA) e 0,1 ml<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (NAA), segundo a Tabela 5.1. A transformação foi mediada pelas estirpes de *A. tumefaciens* EHA105 p35SGUSINT e C58 p35SGUSINT. As culturas bacterianas cresceram durante a noite a 28 °C em meio LB líquido (Anexo I, Tabela 2) suplementado com os antibióticos canamicina (50 µg.ml<sup>-1</sup>) e rifampicina (50 µg.ml<sup>-1</sup>) e foram usadas à D.O.<sub>λ=600nm</sub> de 0,2, 0,4 e 0,6. Uma gota da cultura bacteriana foi depositada, através do uso de uma seringa, na porção apical do segmento de entrenó, sobre a superfície de corte, de acordo com o protocolo de Peña *et al.* (1995b) e com o esquema da Fig. 2.3. Os explantes permaneceram às escuras durante 3 dias (período de co-cultivo), após os quais foram colocados em meio de cultura D5 suplementado com os antibióticos canamicina a 25 mg.ml<sup>-1</sup> e cefotaxima a 500 mg.l<sup>-1</sup>. Foram depositadas algumas gotas de cefotaxima sobre a superfície de corte de cada explante. Nas repicagens seguintes foi aumentada a concentração de canamicina de 25 mg.l<sup>-1</sup> para 100 mg.l<sup>-1</sup> e foi mantida a concentração de cefotaxima. As culturas foram mantidas às escuras durante 20 dias e posteriormente foram sujeitas a fotoperíodo de 16h luz, nas

condições referidas em 2.15.2. Foram realizados os seguintes controlos: a) controlo à composição do meio D5, onde foram colocados segmentos de entrenós não sujeitos ao processo de transformação; b) controlo à concentração dos antibióticos usada, através da presença de segmentos de entrenós não transformados colocados no meio D5 com antibióticos.



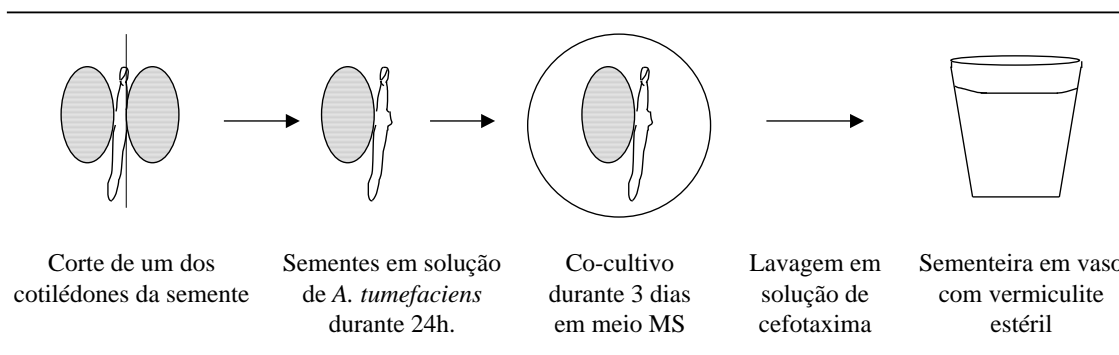
**Fig. 2.3** - Esquema da transformação de segmentos de entrenós de laranjeira azeda cv. Brazilian mediada por *A. tumefaciens*.

#### 2.17.2.2.2 - Transformação de sementes germinadas

Os testes de transformação de sementes germinadas de laranjeira azeda foram realizados com a bactéria *A. tumefaciens*, estirpe EHA105 pE7113-CP. Decorridos os tempos de germinação de 1, 5 e 7 dias, um dos cotilédones da semente foi cortado com um bisturi junto ao hipocótilo, de acordo com a Fig. 2.4. Desta forma, ficou um cotilédone ligado à plântula, necessário ao desenvolvimento da mesma. As sementes foram imediatamente colocadas em frascos com a cultura bacteriana, que cresceu e foi ressuspensa em meio MS sem compostos orgânicos segundo descrito em 2.17.2.1. Após a exposição à solução bacteriana à D.O. <sub>$\lambda=600\text{ nm}$</sub>  de 0,6 durante 2h, na escuridão, a 28 °C, lavaram-se as sementes em água esterilizada e de seguida foram colocadas em caixas de Petri com meio MS semi-sólido sem compostos orgânicos, para um período de co-cultura de 3 dias a 28 °C, na escuridão. Seguiu-se uma lavagem em solução aquosa de cefotaxima a 500 mg.l<sup>-1</sup> durante 2h. No tratamento controlo seguiu-se o mesmo protocolo, mas as sementes não foram expostas à solução bacteriana. As sementes germinadas foram colocadas em vermiculite esterilizada num fitotráo, à temperatura de 27 °C e com fotoperíodo de 16h luz.

Após 4 meses de crescimento, as plantas foram transferidas para vasos com uma mistura de turfa:vermiculite (2:1) e aclimatadas a uma estufa.

Após um ano de crescimento, as plantas foram transplantadas para novo substrato que vem referido em 2.15.1.



**Fig. 2.4** - Esquema do corte e da transformação de sementes germinadas de laranja azeda cv. Brazilian mediada por *A. tumefaciens*.

## 2.18 - PROCESSOS DE ENXERTIA DOS REBENTOS ADVENTÍCIOS

### 2.18.1 - Microenxertia

As sementes de citrangeira Carrizo foram desinfectadas numa solução de NaOH a 5% durante 30 min, seguido de 2-3 lavagens em água esterilizada. Depositou-se uma semente em cada tubo de 150 x 25 mm com meio MS semi-sólido sem compostos orgânicos, tapado com tampa de polipropileno. A germinação decorreu a 27 °C, na escuridão.

No processo da microenxertia foi seguido o protocolo de Navarro (1981). As plântulas de citranjeira Carrizo com duas a três semanas de crescimento foram cortadas, de forma a ficar um epicótilo de cerca de 1,5 cm e uma raiz de 4-6 cm. Os cotilédones também foram cortados.

Os rebentos adventícios com comprimento superior a 1 mm foram excisados do explante e uma secção caulinar transversal foi retirada da base do rebento e imediatamente colocada em solução X-gluc (Anexo I, Tabela 1), para ser analisada a presença de  $\beta$ -glucuronidase, segundo descrito em 2.19. A extremidade basal do rebento foi então cortada em bisel para este ser inserido na região cambial do porta-enxerto citranjeira Carrizo.

As plântulas microenxertadas foram colocadas em tubos de cultura com meio MS líquido (Anexo I, Tabela 2). As plantas que cresceram foram transplantadas para vasos com uma mistura turfa:vermiculite (2:1) e foram gradualmente acondicionadas num fitotróo com uma temperatura de 27 °C.

## **2.18.2 - Enxertia**

As sementes de *C. macrophylla* Wester foram desinfectadas de acordo com o descrito em 2.18.1 e germinaram em vasos com vermiculite esterilizada. As plântulas com 1 mês de crescimento foram transplantadas para vasos com uma mistura de turfa e vermiculite (2:1). Após 3 a 4 meses de crescimento, o ápice da planta foi cortado para se proceder a uma enxertia de garfo, segundo Hartmann *et al* (1990). A região basal do rebento adventício foi preparado como referido em 2.18.1. A ligação entre o porta-enxerto e o rebento adventício foi feita com parafilme e a plântula foi tapada com um saco de plástico furado para manter a humidade. Alternativamente foi também efectuada a enxertia em T, segundo Hartmann *et al.* (1990).

## **2.19 – DETECÇÃO DA ENZIMA $\beta$ -GLUCURONIDASE**

A reacção histoquímica para a detecção da  $\beta$ -glucuronidase, realizada segundo o protocolo descrito por Jefferson (1987), com algumas modificações, foi usada nos rebentos adventícios obtidos no processo de transformação de segmentos de entrenós e em tecido foliar. Procedeu-se à dissolução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido (X-gluc, Duchefa, ref. X1405) em dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente adicionou-se os compostos referidos no Anexo I, Tabela 1, em solução X-gluc. Os rebentos adventícios foram excisados do explante e fez-se um corte transversal na porção basal caular do rebento. Quando foram usadas secções de tecido foliar de plantas de tabaco e de citrinos, estas foram lavadas em água corrente e depois passadas por água esterilizada. O material vegetal foi submergido na solução X-gluc e após a aplicação de vácuo durante 10 min, para infiltração da solução, as amostras foram colocadas a 37 °C durante a noite. O antibiótico cloranfenicol foi adicionado à solução X-gluc com o objectivo de eliminar agrobactérias que pudessem estar presentes. A reacção terminou por lavagem com água esterilizada. O tecido foliar foi fixado em solução AFA (etanol absoluto 63%; ácido acético glacial 5%; formaldeído 5%).

## **2.20 - TRATAMENTO ESTATÍSTICO**

No presente trabalho, foram sujeitos a tratamento estatístico e são apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão (d.p.) os seguintes resultados:

No capítulo 3: - a) os resultados de heterozigocidade, de diversidade nucleotídica e do valor das substituições sinónimas e não sinónimas.

No capítulo 5: - a) a curva de crescimento das estirpes de agrobactérias EHA105 p35SGUSINT, EHA105 pE7113-CP e C58 p35SGUSINT e a determinação do número de unidades formadoras de colónias (ufc) viáveis; b) o efeito dos antibióticos cefotaxima (cef) e canamicina (can) no meio D5 na indução e expansão dos rebentos adventícios.

Na análise TaqMan, no capítulo 5, o limiar do intervalo de confiança das amostras a 99,5 % foi calculado com a média de controlos negativos, segundo a distribuição t-“Student” para um intervalo de confiança de 99,5 % (4,032). Ao valor 4,032, multiplicado pelo desvio padrão dos controlos negativos, foi somado a média dos controlos negativos. O valor resultante foi considerado o limiar positivo/negativo, acima do qual as amostras foram consideradas positivas.



## DIVERSIDADE GENÓMICA DA POPULAÇÃO DE CTV

### 3.1 - INTRODUÇÃO

O CTV e os vírus cujo genoma é constituído por RNA apresentam uma elevada variabilidade genómica que é atribuída, geralmente, à elevada taxa de erro da RNA Polimerase RNA dependente (RdRp). A frequência de ocorrência de mutações pode ser muito elevada. Holland *et al.* (1982) referem que é gerada uma população de variantes genómicas em cada infecção por um vírus em RNA. Essa população é composta por uma sequência mais frequente ou sequência principal e por um conjunto de variantes de menor frequência. O balanço entre estas frequências depende da produção de mutações e do seu valor de selecção. Esta população de variantes tem uma estrutura do tipo “quasispecies” (Holland *et al.*, 1982), que é representada não só pelo número de variantes que a compõem, mas também pela frequência com que cada uma ocorre e pelas distâncias genéticas entre as diferentes variantes (Gibbs *et al.*, 1999).

No presente trabalho, numerosos isolados de diversas origens geográficas e de diferentes características biológicas foram analisados quanto à região terminal 3', uma vez que Mawassi *et al.* (1996) a referiram como a mais conservada quando estudaram os isolados VT e T36 (ver Tabela 2.2). Dada a diversidade nucleotídica existente no CTV, torna-se necessário o conhecimento das regiões genómicas mais conservadas, afim de poder induzir resistência por transformação genética a um conjunto alargado de isolados. Neste trabalho a avaliação da diversidade nucleotídica foi feita por Single Stranded Conformation Polymorphisms (SSCP), Cleavase Fragment Length Polymorphism (CFLP) e sequenciação genómica.

#### 3.1.1 - Single stranded conformation polymorphisms (SSCP)

A análise de SSCP, introduzida por Orita *et al.* (1989b), fundamenta-se na distinção de cadeias simples de DNA com base na sua estrutura secundária, após auto-emparelhamento. A análise de SSCP é geralmente realizada sobre um produto de PCR. Este é desnaturado por calor na presença de formamida, sendo rapidamente arrefecido por forma a dificultar o emparelhamento das cadeias complementares. As cadeias simples de DNA adquirem uma conformação dependente da estrutura primária. A sua separação é feita por migração num gel de poliacrilamida. O DNA que voltou a adquirir a conformação bicatenária migra com maior rapidez e as duas cadeias monocatenárias, pela estrutura secundária mais volumosa que apresentam, migram com maior lentidão.

Estas exibem diferenças na mobilidade, de acordo com a estrutura secundária, o que vai gerar padrões electroforéticos característicos. A avaliação da variabilidade genómica é feita por comparação dos padrões electroforéticos. A variabilidade detectada na análise de SSCP não pode ser quantificável, mas permite perceber se duas sequências são idênticas (ou quase) ou não.

A análise de SSCP tem sido referenciada na identificação de isolados virais, assim como no estudo da variabilidade genómica do CTV (Nolasco e Sequeira, 1997; Kong *et al.*, 2000). No período em que foi executado este trabalho, foram publicados vários estudos de SSCP aplicados a diversos genes do CTV, nomeadamente o gene da CP (Rubio *et al.*, 1996), os genes da protease (Pro) e da metiltransferase (MT) (Rubio *et al.*, 2001), assim como o gene da p20 (Ayllón *et al.*, 1999b; d'Urso *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2001) o gene da p18 (Ayllón *et al.*, 1999b; d'Urso *et al.*, 2000) e o gene da p27 (Gago-Zachert *et al.*, 1999).

Neste trabalho, a análise de SSCP foi aplicada ao estudo dos genes a jusante do gene da proteína do capsídeo (genes que codificam as proteínas p18, p13, p20 e p23) e à região 3'UTR.

### **3.1.2 - Cleavase Fragment Length Polymorphism (CFLP)**

A análise por Cleavase Fragment Length Polymorphism (CFLP) baseia-se na actividade da endonuclease Cleavase que corta a cadeia de DNA na extremidade 5' da base dos "hairpins" porventura existentes em cadeias monocatenárias (Brow *et al.*, 1996). As cadeias de DNA a analisar, geralmente obtidas por PCR, são desnaturadas por via térmica e arrefecidas até temperaturas de 60 °C a 40 °C, permitindo o auto-emparelhamento de algumas regiões, gerando-se estruturas secundárias com a forma de "hairpins". A actividade da Cleavase origina uma colecção de fragmentos que são separados por electroforese em gel de acrilamida desnaturante (Brow *et al.*, 1996).

A análise por CFLP tem sido usada para estudar a variabilidade em diversos sistemas genéticos, tais como genes somáticos humanos (O'Connell *et al.*, 1999; Oldenburg e Siebert, 2000), bactérias (Brow *et al.*, 1996; Tondella *et al.*, 1999), plantas (Fofana *et al.*, 1998) e vírus de animais (Marshall *et al.*, 1997; Sreevatsan *et al.*, 1998), mas não em vírus de plantas.

Neste estudo, a análise CFLP foi aplicada ao gene da CP por este ser o mais estudado e serem conhecidas as sequências nucleotídicas de dezenas de isolados. Foi avaliada a capacidade desta técnica na análise dos isolados por comparação com a análise da sequência dos mesmos.

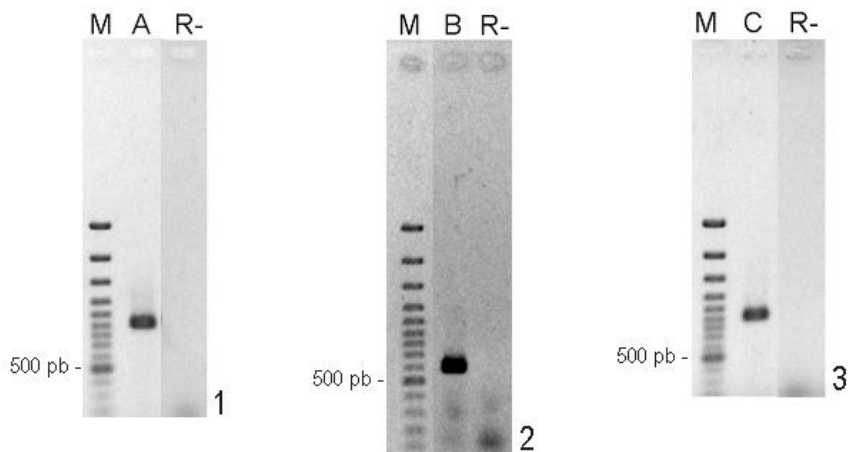
## **3.2 – ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÓMICA DA REGIÃO TERMINAL 3’ DO CTV POR SSCP E SEQUENCIAÇÃO GENÓMICA**

No estudo da variabilidade genômica foram analisados os genes que codificam as proteínas p18, p13, p20 e p23 e a região 3’ UTR de 10 isolados. De cada isolado e por amplificação por IC/RT-PCR, constituíram-se clones com as seguintes regiões genômicas: clones com o conjunto dos genes codificantes da p18 e da p13 (clones p18+p13); clones do gene codificante da p20; clones com o conjunto do gene codificante da p23 e da região 3’UTR (clones p23+região 3’UTR). Na Fig. 3.1 encontra-se exemplificado a dimensão do produto de PCR de cada um dos clones obtidos. De cada um destes clones ou da “miniprep” dos mesmos, amplificou-se por PCR cada uma das regiões genômicas separadamente para serem analisadas por SSCP. Na Fig. 3.2 é mostrado o resultado esperado da amplificação por PCR de cada região genômica. Os resultados da análise SSCP de cada região genômica e a frequência relativa das variantes genômicas observadas estão apresentados na Tabela 3.1.

De cada isolado foi sequenciado um ou vários clones representativos das variantes genômicas principais e de algumas variantes menos comuns, que foram escolhidos em função do padrão de SSCP. Foram usados os clones descritos acima para sequenciar as regiões genômicas codificantes da p18+p13, incluindo a respectiva região intergênica, a região codificante da p20 e a região genômica codificante da p23+a região 3’UTR. A descrição dos clones sequenciados está sumarizada na Tabela 3.3.

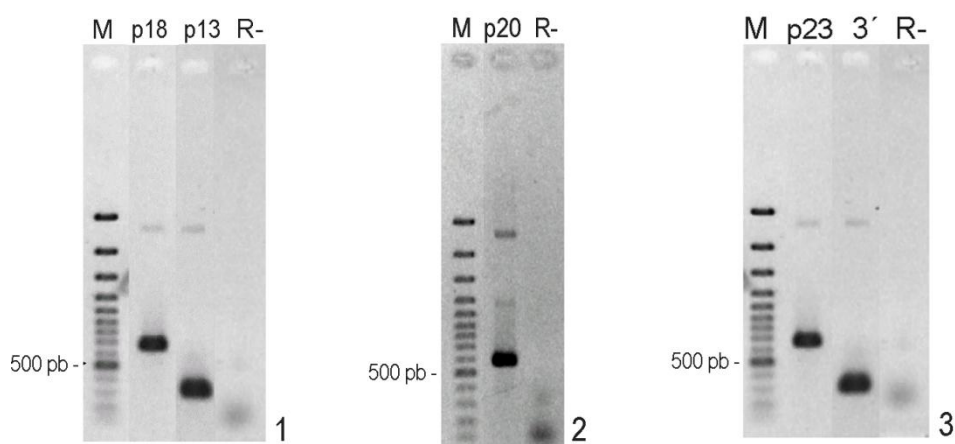
### **3.2.1 - Amplificação das regiões genômicas**

As regiões genômicas codificantes da p18+p13, da p20 e da p23+região 3’UTR, amplificadas por IC/RT-PCR, foram ligadas no vector pGEM<sup>®</sup> T-Easy. A região genômica codificante da p18+p13 foi amplificada com os “primers” CTV33 e DCN16 e originou um produto de amplificação de 926 pb (Fig. 3.1-1). A região genômica codificante da p20, que foi amplificada com os “primers” CN182 e CN183, deu origem a um produto de amplificação com 563 pb (Fig. 3.1-2). A região genômica codificante da p23+a região 3’UTR foi amplificada com os “primers” CTV21 e CTV22 e originou um produto de amplificação de 927 pb (Fig. 3.1-3).



**Fig. 3.1** - Análise electroforética em gel de agarose a 1% dos produtos de IC/RT-PCR. Colunas M: marcador 100 pb; colunas R-: ausência de amplificação na reacção de PCR sem DNA (controlo negativo); (1) A: banda resultante da amplificação por RT-PCR dos genes codificantes da p18+p13 (926 pb); (2) B: banda resultante da amplificação por RT-PCR do gene codificante da p20 (563 pb); (3) C: banda resultante da amplificação por RT-PCR do gene codificante da p23+a região 3'UTR (927 pb).

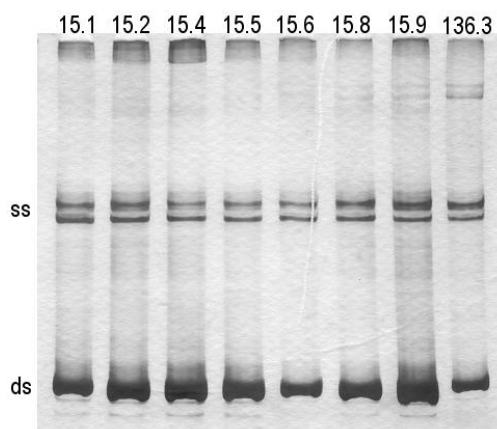
A amplificação de cada uma das regiões genómicas codificantes da p18, p13, p20 e p23 e a região 3'UTR, foi feita a partir dos clones ou da “miniprep” dos mesmos. Na Fig. 3.2 está exemplificado a dimensão dos produtos de amplificação esperados: o gene codificante da p18, amplificado com os “primers” CTV33 e CTV34, apresenta um produto de amplificação de 556 pb (Fig. 3.2-1); o gene codificante da p13, amplificado com os “primers” DCN15 e DCN16, tem 372 pb (Fig. 3.2-1); o gene codificante da p20, amplificado com os “primers” CN182 e CN183, tem 563 pb (Fig. 3.2-2); o gene codificante da p23, amplificado com os “primers” CTV27 e CTV28, tem 670 pb (Fig. 3.2-3) e a região 3'UTR, amplificada com os “primers” CTV35 e CTV22, tem 294 pb (Fig. 3.2-3).



**Fig. 3.2** – Análise electroforética em gel de agarose a 1% do produto de amplificação dos genes sobre os quais recaiu a análise de SSCP: Colunas M: marcador 100 pb; colunas R-: ausência de amplificação na reacção de PCR sem DNA (controlo negativo); (1) amplificação da região genómica codificante da p18 (556 pb) e da p13 (372 pb); (2) amplificação da região genómica codificante da p20 (563 pb); (3) amplificação da região genómica codificante da p23 (670 pb) e a região 3'UTR (3') (294 pb).

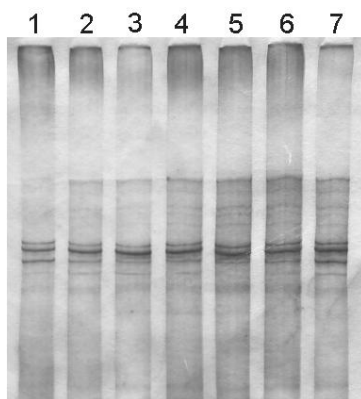
A análise de SSCP foi realizada directamente sobre o produto de PCR de colónias InvαF' que resultaram da clonagem do produto de IC/RT-PCR ou sobre a “miniprep” desses mesmos clones. Na Fig. 3.2 exemplifica-se o tipo de produtos de PCR sobre os quais recaiu a análise de SSCP. Analisou-se em média 15 clones de cada uma das regiões genómicas e de cada isolado. Os padrões obtidos estão apresentados na Tabela 3.1

Na análise por SSCP, as diferenças conformacionais das duas cadeias monocatenárias originam um padrão que pode ser constituído por 2 a 4 bandas que apresentam uma mobilidade inferior ao dsDNA (Fig. 3.3).



**Fig. 3.3.** Padrões de alguns clones do produto de amplificação da região 3'UTR dos isolados 15 e 136, em que estão presentes cadeias monocatenárias (ss) e bicatenárias (ds), obtidos em gel de poliacrilamida não desnaturante a 8%.

Foi analisado por SSCP o resultado de 45 amplificações por PCR, realizadas com os “primers” CTV33/CTV34 de um mesmo clone com o gene codificante da p18 [isolado TR21/1 (planta 136) - clone 136.1]. Este estudo teve o objectivo de analisar a introdução de mutações pontuais pela enzima *Taq* DNA polimerase. O clone 136.1 foi submetido às mesmas metodologias que os outros clones analisados por SSCP. O padrão obtido foi igual para os 45 clones analisados e está apresentado na Fig. 3.4.



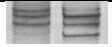
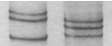



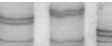






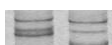


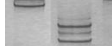


**Fig. 3.4** – Padrão obtido na análise do produto de PCR de 45 amplificações do gene codificante da p18 do clone 136.1 em gel de poliacrilamida não desnaturante a 8%. As colunas 1 a 7 mostram o padrão de sete amostras diferentes analisadas.

### **3.2.2 - Caracterização dos padrões de SSCP**

Na análise de diferentes clones de uma mesma região genômica de um mesmo isolado, os padrões apresentaram duas, três e quatro bandas, como pode ser observado na Tabela 3.1.

Os padrões de SSCP das regiões genômicas que codificam as proteínas p18, p13, p20 e p23 foram geralmente distintos entre os diferentes isolados. O mesmo não aconteceu com a região 3'UTR que apresentou padrões comuns a todos os clones do mesmo isolado e a todos os isolados, salvo duas exceções [isolados 50A (planta 19) e 46D (planta 11)].

**Tabela 3.1** – Variantes genômicas nos padrões de SSCP dos diferentes isolados e para as cinco regiões genômicas. Indica-se a frequência relativa de cada variante genômica. Apresentam-se os padrões de SSCP pela mesma ordem com que são referidas as suas frequências.

Gene	Isolado	Planta	Nº de clones analisados	Proporção relativa das variantes genômicas detectadas	Frequência das variantes genômicas (%)	Padrões de SSCP
p18	32D	8	13	10; 3	77; 23	
	46D	11	15	9; 5; 1	60; 33; 7	
	15D	14	7	5; 1; 1	71; 14; 14	
	41G	15	21	9; 8; 2; 1; 1	43; 38; 10; 5; 5	
	50A	19	22	16; 2; 1; 1; 1	73; 9; 5; 5; 5	
	78	25	12	11; 1	92; 8	
	Genoal	28	21	20; 1	95; 5	
	TR21/1	136	12	6; 5; 1	50; 42; 8	
	TR25/1	142	20	8; 8; 4	40; 40; 20	
	Golegã	152	19	13; 5; 1	68; 26; 5	
p13	32D	8	15	13; 1; 1	87; 6; 6	
	46D	11	15	12; 3	80; 20	
	15D	14	7	5; 2	71; 29	
p20	32D	8	15	13; 1; 1	87; 6; 6	
	46D	11	14	14	100	
	15D	14	18	15; 2; 1	83; 11; 6	
	41G	15	20	8; 8; 2; 1; 1	40; 40; 10; 5; 5	
	50A	19	20	18; 1; 1	90; 5; 5	

(continua na pág. seguinte)

**Tabela 3.1** – Variantes genômicas nos padrões de SSCP dos diferentes isolados e para as cinco regiões genômicas. Indica-se a frequência relativa de cada variante genômica. Apresentam-se os padrões de SSCP pela mesma ordem com que são referidas as suas frequências (cont.).

Gene	Isolado	Planta	Nº de clones analisados	Proporção relativa de variantes genômicas detectadas	Frequência das variantes genômicas (%)	Padrões de SSCP
p20	78	25	10	9; 1	90; 10	
	Genoal	28	24	19; 3; 1; 1	79; 13; 4; 4	
	TR21/1	136	15	10; 2; 2; 1	67; 13; 13; 7	
	TR25/1	142	15	12; 2; 1	80; 13; 7;	
	Golegã	152	20	20	100	
p23	32D	8	14	11; 1; 1; 1	79; 7; 7; 7	
	46D	11	11	9; 2	82; 18	
	41G	15	11	9; 1; 1	82; 9; 9	
	50A	19	15	12; 2; 1	80; 13; 7	
	78	25	15	14; 1	93; 7	
	Genoal	28	12	7; 4; 1	58; 33; 8	
	TR21/1	136	15	14; 1	93; 7	
	TR25/1	142	12	11; 1	92; 8	
	Golegã	152	18	18	100	
Região 3'UTR	32D	8	14	14	100	
	46D	11	15	12; 3	80; 20	
	41G	15	10	10	100	
	50A	19	10	9; 1	90; 10	
	78	25	17	17	100	
	Genoal	28	18	18	100	
	TR21/1	136	13	13	100	
	TR25/1	142	8	8	100	
	Golegã	152	25	25	100	

### 3.2.3 - Variabilidade da região terminal 3' (genes codificantes das proteínas p18, p13, p20 e p23 e região 3'UTR)

#### 3.2.3.1 - Frequência relativa das variantes genómicas

Admitindo que cada padrão de SSCP corresponde a uma variante genómica ou a um conjunto de variantes muito próximas, os resultados revelaram uma estrutura populacional constituída por uma variante genómica mais frequente que as restantes. A frequência relativa do padrão mais comum oscilou entre 50% e 100%. A presença de duas variantes genómicas com a mesma frequência foi observada no gene codificante da p18 e da p20 do isolado 41G (planta 15), e no gene codificante da p18 do isolado TR25/1 (planta 142).

A estrutura de “quasispecies” foi avaliada pelo cálculo da heterozigocidade utilizando a fórmula de Nei (Li e Graur, 1991), com as alterações sugeridas por Kong *et al.* (2000) para a análise de um grupo reduzido de amostras:  $H=n/(n-1)(1-\sum X_i^2)$ , onde  $n$  é o número de clones analisados e  $X_i$  a frequência da população com o padrão  $i$ . O valor de heterozigocidade ( $H$ ) indica-nos a probabilidade de ao escolhermos duas amostras ao acaso de entre as variantes genómicas analisadas, obtermos padrões diferentes. Os valores de heterozigocidade podem variar de 0 no caso de haver uma só variante, até 1 no caso de todos os clones apresentarem padrões diferentes. Na Tabela 3.2 são apresentados os valores obtidos. A análise do valor médio de heterozigocidade revela que na região genómica codificante da p18 há uma maior dispersão de variantes genómicas, ficando desta forma a variante genómica principal menos demarcada. Por contraposição, na região 3'UTR não há praticamente dispersão das variantes genómicas, ficando a variante principal bem demarcada.

**Tabela 3.2** – Heterozigocidade definida por SSCP, para os diferentes isolados e para as cinco regiões genómicas codificantes da p18, p13, p20 e p23 e a região 3'UTR.

Isolado	Planta	Regiões genómicas					Média dos valores
		p18	p13	p20	p23	Região 3'UTR	
32D	8	0,384	0,257	0,257	0,396	0,000	0,259 ± 0,16
46D	11	0,562	0,343	0,000	0,328	0,343	0,315 ± 0,20
15D	14	0,524	0,476	0,308	*	*	0,436 ± 0,11
41G	15	0,626	*	0,699	0,346	0,000	0,418 ± 0,32
50 <sup>A</sup>	19	0,424	*	0,195	0,362	0,198	0,295 ± 0,12
78	25	0,167	*	0,198	0,133	0,000	0,125 ± 0,08
Genoa1	28	0,095	*	0,369	0,591	0,000	0,264 ± 0,27
TR21/1	136	0,621	*	0,553	0,133	0,000	0,327 ± 0,31
TR25/1	142	0,674	*	0,362	0,629	0,000	0,416 ± 0,31
Golegã	152	0,485	*	0,000	0,000	0,000	0,121 ± 0,24
Média dos valores		0,456 ± 0,19	0,359 ± 0,11	0,294 ± 0,22	0,324 ± 0,21	0,060 ± 0,12	

\* = não foi realizada a análise de SSCP.

### 3.2.3.2 - Análise das sequências

Foram sequenciados um ou vários clones das regiões genômicas codificantes da p18+p13, integrando a respectiva região intergênica, da p20 e da p23+a região 3'UTR. Os clones sequenciados são maioritariamente representativos da variante genômica principal e como foi previamente descrito, foram escolhidos em função do padrão de SSCP dos genes codificantes da p18, da p20 e da p23. Foram também sequenciados clones de variantes genômicas menos frequentes dos isolados 32D (planta 8), 46D (planta 11), 15D (planta 14) e TR25/1 (planta 142). A sua descrição quanto às características do padrão de SSCP encontra-se na Tabela 3.3. As sequências nucleotídicas das diferentes regiões genômicas que foram analisadas no presente trabalho foram alinhadas e estão apresentadas no Anexo II, Figs. 1 a 6. As matrizes de identidade nucleotídica das sequências nucleotídicas estão apresentadas no Anexo III, Figs. 1 a 6.

O clone 25.8 do gene codificante da p13 do isolado 78 (planta 25) foi sequenciado para se conhecer a região de hibridação dos “primers” que amplificam o gene. Escolheu-se este isolado como representante do conjunto de isolados que apresentam características biológicas diferentes dos isolados amplificados.

**Tabela 3.3** – Descrição dos clones sequenciados de cada isolado e de cada uma das regiões genômicas, quanto às características do padrão de SSCP.

Região genômica	Isolado	Número da planta	Clone sequenciado	Frequência do padrão de SSCP do clone*
p18	32D	8	8.2 (p18/p13)	77 (+)
	46D	11	11.4 (p18/p13)	60 (+)
			11.5 (p18/p13)	(-)
			11.7 (p18/p13)	(-)
	15D	14	14.3 (p18/p13)	71 (+)
	41G	15	15.16 (p18/p13)	43 (+)
	50A	19	19.7 (p18/p13)	73 (+)
	78	25	25.8 (p18/p13)	92 (+)
	Genoa1	28	28.16 (p18/p13)	95 (+)
	TR21/1	136	136.2 (p18/p13)	50 (+)
	TR25/1	142	142.13 (p18/p13)	40 (+)
			142.12 (p18/p13)	20 (-)*
			142.14 (p18/p13)	20 (-)*
Golegã	152	152.7 (p18/p13)	68 (+)	
p13	32D	8	8.2 (p18/p13)	•
	46D	11	11.4 (p18/p13)	•
			11.5 (p18/p13)	•
			11.7 (p18/p13)	•
	15D	14	14.3 (p18/p13)	•
	41G	15	15.16 (p18/p13)	•
	50A	19	19.7 (p18/p13)	•
	78	25	25.8 (p18/p13)	•
	Genoa1	28	28.16 (p18/p13)	•
	TR21/1	136	136.2 (p18/p13)	•
	TR25/1	142	142.13 (p18/p13)	•
			142.12 (p18/p13)	•
			142.14 (p18/p13)	•
Golegã	152	152.7 (p18/p13)	•	
p20	32D	8	8.5 p20	87 (+)
	46D	11	11.4 p20	100 (+)
	15D	14	14.6 p20	83 (+)
			14.9 p20	(-)
	41G	15	15.22 p20	40 (+)
	50A	19	19.1 p20	90 (+)
	78	25	25.11 p20	90 (+)
	Genoa1	28	28.2 p20	79 (+)
	TR21/1	136	136.12 p20	67 (+)
	TR25/1	142	142.9 p20	80 (+)
Golegã	152	152.12 p20	100 (+)	
p23	32D	8	8.1 (p23/reg. 3')	79 (+)
			8.15 (p23/reg. 3')	7 (-)
	46D	11	11.5 (p23/reg. 3')	82 (+)
	41G	15	15.15 (p23/reg. 3')	9 (-)
	50A	19	19.3 (p23/reg. 3')	80 (+)
	78	25	25.4 (p23/reg. 3')	93 (+)
	Genoa1	28	28.49 (p23/reg. 3')	58 (+)
	TR21/1	136	136.9 (p23/reg. 3')	93 (+)
	TR25/1	142	142.6 (p23/reg. 3')	92 (+)
Golegã	152	152.13 (p23/reg. 3')	100 (+)	
região 3'	32D	8	8.1 (p23/reg. 3')	100 (+)
			8.15 (p23/reg. 3')	100 (+)
	46D	11	11.5 (p23/reg. 3')	♣
	41G	15	15.15 (p23/reg. 3')	100 (+)
	50A	19	19.3 (p23/reg. 3')	♣
	78	25	25.4 (p23/reg. 3')	100 (+)
	Genoa1	28	28.49 (p23/reg. 3')	100 (+)
	TR21/1	136	136.9 (p23/reg. 3')	100 (+)
	TR25/1	142	142.6 (p23/reg. 3')	100 (+)
Golegã	152	152.13 (p23/reg. 3')	100 (+)	

\* = (+) clone cujo padrão é o da variante principal; (-) clone com padrão pouco frequente.

♦ = clones que representam a segunda variante mais frequente existente no isolado TR25/1, no gene codificante da p18.

• = A região genômica que codifica para a p13 foi sequenciada em conjunto com a região genômica que codifica para a p18, de forma que não é conhecido o padrão de SSCP destes clones.

♣ = A região genômica 3'UTR foi sequenciada em conjunto com a região genômica que codifica a proteína p23, de forma que não é conhecido o padrão de SSCP destes clones.

### Limitações na amplificação do gene codificante da p13

A amplificação do gene codificante da p13 só foi conseguida para os isolados 32D (planta 8), 46D (planta 11) e 15D (planta 14). Estes resultados parecem basear-se na falta de homologia na região de hibridação dos dois “primers” que foram usados a montante, DCN15 e CTV36, com alguns isolados do CTV, como é revelado no alinhamento múltiplo com algumas das sequências dos isolados divulgados no GenBank (Fig. 3.5). A caracterização biológica dos isolados do GenBank (T36, VT e SY568) está apresentada na Tabela 2.2. A sequência do “primer” DCN15 foi desenhada com base no isolado T36, o único para o qual apresenta homologia na extremidade 3’. Os primeiros 9 nucleótidos do “primer” são locais de restrição de enzimas. Na região a jusante do codão de iniciação, que está marcado a negrito, a comparação da sequência do “primer” com as dos isolados divulgados no GenBank e com o clone 25.8, revelou que o “primer” DCN15 tem 6 bases diferentes, três das quais na região 3’ do “primer”. O “primer” CTV36 (montante) foi desenhado com base nos isolados T36, VT e SY568, os únicos que estavam sequenciados na altura em que foi feita esta análise e com os quais apresenta homologia. O “primer” DCN16 (jusante) hibrida numa região conservada.

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.
T30	-TTCGGATT <u>T</u>	AATTGCTGCG	<b>ATGAGT</b> ATTC	GACGCGTGTG	G
SY568	-TTCGGGTT <u>T</u>	AATTGCTGCA	<b>ATGGGT</b> ATTC	GACGCGTGTG	G
T385	-TTCGGATT <u>T</u>	AATTGCTGCG	<b>ATGAGT</b> ATTC	GACGCGTGTG	G
T36	-TTCGGATT <u>C</u>	AATTGCTGCA	<b>ATGAGC</b> ATTC	GGCGCTCGTG	G
NUagA	-TTCGGGTT <u>T</u>	AATTGCTGCA	<b>ATGGGT</b> ATTC	GACGCGTGTG	G
25.8	-TTCGGATT <u>T</u>	AATTGCTGCG	<b>ATGAGT</b> ATTC	GACGCGTGTG	G
VT	TTCGCGCTT <u>T</u>	AATTGCTGCA	<b>ATGAGC</b> ATTC	<b>GACGTG</b> TGTG	G
DCN15	-----	-GCTAGCACC	<b>ATGAGC</b> ATTC	GGCGCTC---	-
CTV36	-----TTC	AATTGCTGCA	AT-----	-----	-
Consensus		* * **			

**Fig. 3.5** – Homologia dos “primers” a montante DCN15 e CTV36 com sequências do gene codificante da p13 obtidas no GenBank e com o clone 25.8 de um isolado “mild”. Encontra-se a negrito o codão de iniciação do gene codificante da p13 e as bases das sequências que não são comuns ao “primer” DCN15. As bases das sequências que não são comuns ao “primer” CTV36 estão a sublinhado. \*=Bases comuns a todas as sequências.

### 3.2.3.3 - Estudo quantitativo da variabilidade genómica do CTV

#### *Análise da diversidade nucleotídica*

No cálculo da diversidade nucleotídica avaliaram-se as distâncias entre variantes pelo método de kimura com dois parâmetros (Nei e Kumar, 2000), que distingue entre

substituições tipo transição e transversão e assegura uma frequência de substituição igual para cada *locus*. Para este cálculo só foram consideradas as variantes principais de cada região genómica de cada isolado. Nesta análise também foram incluídas as sequências divulgadas no GenBank e referidas na Tabela 2.2. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.4.

**Tabela 3.4** - Diversidade nucleotídica segundo o algoritmo Kimura 2, calculada para o conjunto de clones sequenciados de cada região genómica representantes das variantes principais.

Região genómica	Diversidade nucleotídica
p13	0,083 ± 0,009
Região intergénica p18/p13	0,092 ± 0,029
p18	0,058 ± 0,006
p20	0,069 ± 0,007
p23	0,079 ± 0,007
Região 3'UTR	0,017 ± 0,005

O valor da diversidade nucleotídica indica serem as regiões genómicas codificantes da p18 e p13 e respectiva região intergénica, assim como o gene codificante da p23, as regiões mais heterogéneas. A região 3'UTR é a região mais conservada.

#### *Análise das substituições sinónimas e não sinónimas*

Foi estimada a extensão das alterações nucleotídicas existentes para as regiões genómicas que codificam proteínas. Essa estimativa foi feita pela análise do valor médio das substituições sinónimas ( $d_S$ ) e não sinónimas ( $d_N$ ) e está apresentada na Tabela 3.5. Foi usado o índice Li-Wu-Luo, o qual se baseia no índice de distância Kimura 2. Foram incluídas nesta análise as sequências divulgadas no GenBank e referidas na Tabela 2.2.

O valor das substituições sinónimas ( $d_S$ ) e das substituições não sinónimas ( $d_N$ ) é da mesma ordem de grandeza para as quatro regiões genómicas avaliadas, sendo o valor  $d_S$  muito superior ao valor  $d_N$ . A região genómica codificante da p20, cuja função ainda é desconhecida, mostrou a menor razão  $d_N/d_S$ . Os valores  $d_N/d_S$  revelam uma pressão de selecção negativa para a maioria das alterações de aminoácidos.

**Tabela 3.5** - Valor médio das substituições sinónimas ( $d_S$ ) e não sinónimas ( $d_N$ ) para as regiões genómicas da região terminal 3' do CTV que codificam proteínas, calculado pelo índice Li-Wu-Luo. O valor  $d_N/d_S$  é a razão entre o valor médio das substituições não sinónimas e das substituições sinónimas.

Regiões genómicas	$d_S$	$d_N$	$d_N/d_S$
p18	0,211 ± 0,032	0,040 ± 0,006	0,1895
p13	0,329 ± 0,052	0,036 ± 0,008	0,1094
p20	0,276 ± 0,034	0,019 ± 0,004	0,0688
p23	0,261 ± 0,031	0,039 ± 0,006	0,1494

### 3.2.4 – Estudo da relação entre isolados

Com o objectivo de avaliar as possíveis relações de agrupamento entre os isolados, foram construídos dendrogramas baseados nas distâncias nucleotídicas. Nesta análise incluíram-se as sequências genómicas divulgadas no GenBank, que vêm referidas na Tabela 2.2. Consideraram-se os grupos formados com uma distância nucleotídica inferior a 0,018.

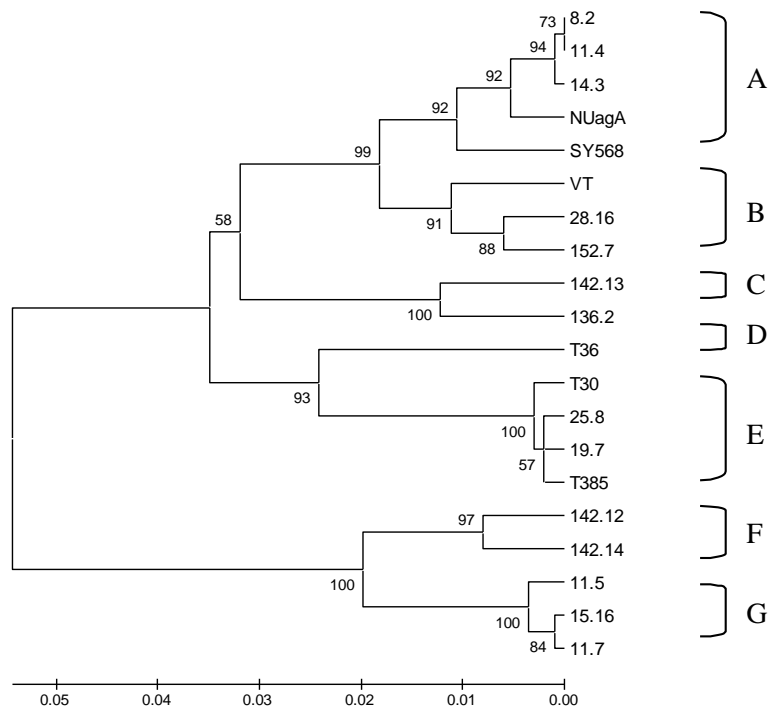
Os dendrogramas referentes às 6 regiões genómicas apresentam semelhanças na ordem da ramificação e na constituição dos agrupamentos e são mostrados nas Figs. 3.6 a 3.11. Desta forma, os agrupamentos que se descrevem de seguida, observados na região genómica codificante da p18, são observados nas restantes regiões genómicas. Os clones 8, 11 e 14, representados nas suas sequências mais comuns, constituem o grupo A e foram agrupados com os isolados SY568 e NuagA. Os clones 152 e 28 constituem o grupo B, que integra o isolado VT nas regiões genómicas codificantes da p18 e da p13. O grupo C é constituído pelos clones 136 e 142, representados nas suas sequências mais comuns, embora no dendrograma da região intergénica estejam separados. O grupo D é formado pelo isolado T36, o qual permanece sempre isolado. O grupo E agrupa os clones 19 e 25 com os isolados T30 e T385. No grupo G agrupam-se os clones menos frequentes 142.12 e 142.14, existentes na análise das regiões genómicas codificantes da p18 e da p13. O clone 15 em conjunto com os clones menos frequentes 11.5 e 11.7 constituem o grupo F. Os clones menos frequentes ficaram assim agrupados separadamente dos clones mais comuns do mesmo isolado (Figs. 3.6 e 3.7).

Nos dendrogramas das regiões genómicas que codificam a p18, a p13, a p20 e a p23, os grupos previamente definidos A a F, em regra, mantiveram-se os mesmos. Na região genómica que codifica a p13 e na região intergénica p18/p13, os grupos F e G também ficaram agrupados (Figs. 3.7 e 3.8). Contudo, na região genómica que codifica a p20 e na região intergénica p18/p13, os grupos A e B ficaram agrupados (Figs. 3.8 e 3.9). Foram analisados um maior número de isolados das regiões genómicas codificantes da p20 e da p23 por estarem disponíveis no GenBank. Estes integraram-se

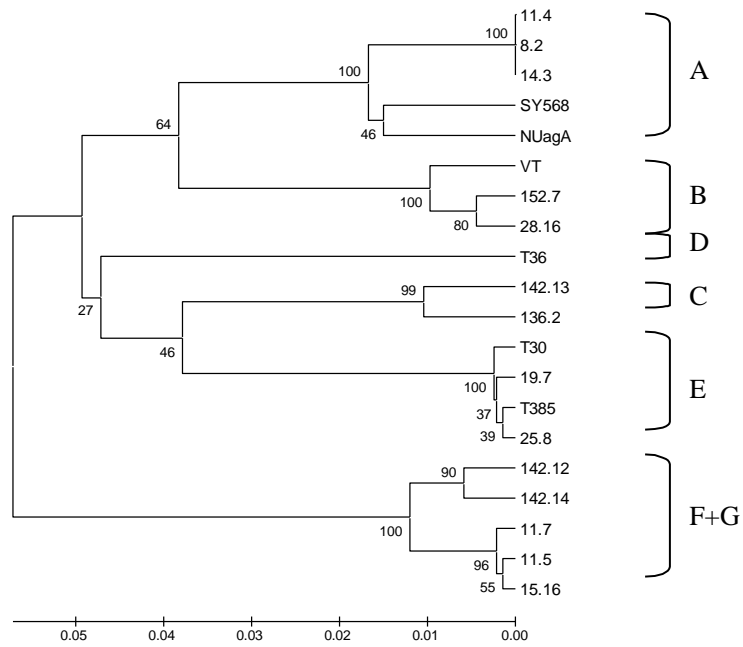
nos grupos previamente descritos ou deram origem ao novo grupo H (isolado 65) na região genômica codificante da p20, e grupo I (isolados B220 e B227) na região genômica codificante da p23 (Figs. 3.9 e 3.10). Os clones representativos das variantes menos frequentes das regiões genômicas codificantes da p20 e da p23 ficaram integrados nos diferentes grupos A a F (Fig. 3.9 e 3.10).

Na região genômica 3'UTR todos os isolados ficaram agrupados para valores de distância nucleotídica inferiores a 0,018 (Fig. 3.11), por haver uma semelhança elevada entre as sequências, com homologia completa nos últimos 124 nucleótidos (Anexo II, Fig. 6).

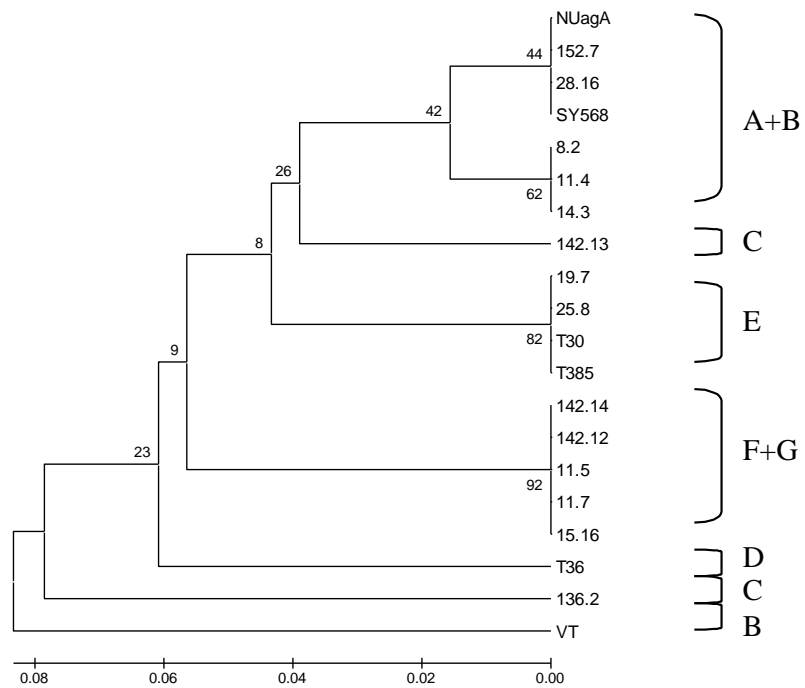
O valor de Bootstrap é superior a 50% na maioria dos grupos formados, o que é estatisticamente aceitável (Nei e Kumar, 2000). O grupo A+B da região intergênica constitui a exceção, com um valor de 42% de Bootstrap. Na região 3'UTR, os valores de Bootstrap inferiores a 50% (Fig. 3.11) traduzem a dificuldade em agrupar os clones e isolados, como consequência da reduzida distância nucleotídica existente.



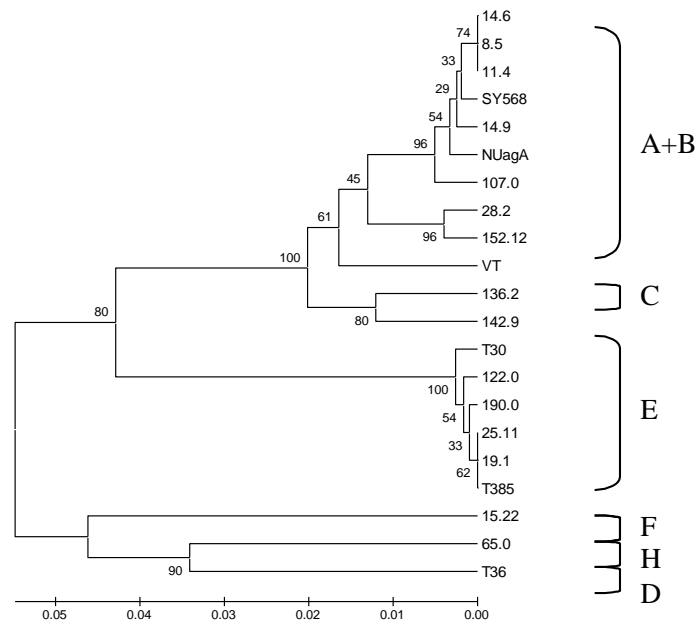
**Fig. 3.6** – Dendrograma da região genômica codificante da p18, obtido da matriz das distâncias nucleotídicas das sequências. A escala horizontal é uma medida da distância nucleotídica entre as sequências.



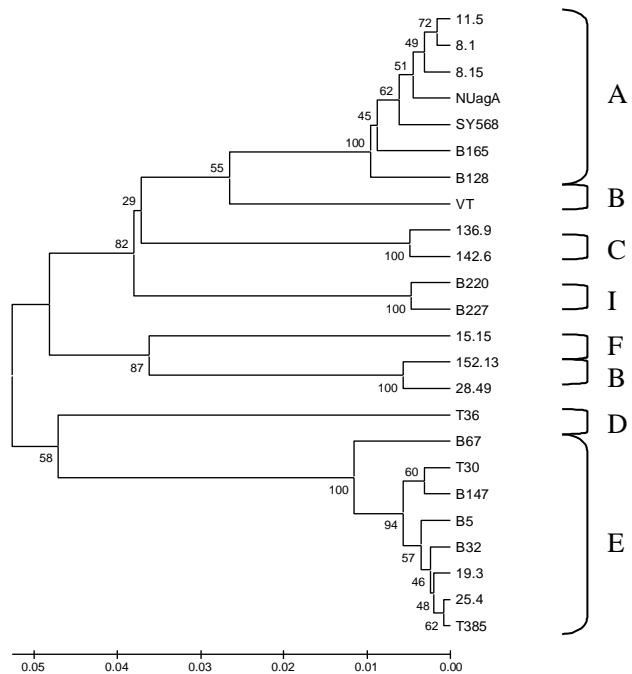
**Fig. 3.7** – Dendrograma da região genómica codificante da p13, obtido da matriz das distâncias nucleotídicas das sequências. A escala horizontal é uma medida da distância nucleotídica entre as sequências.



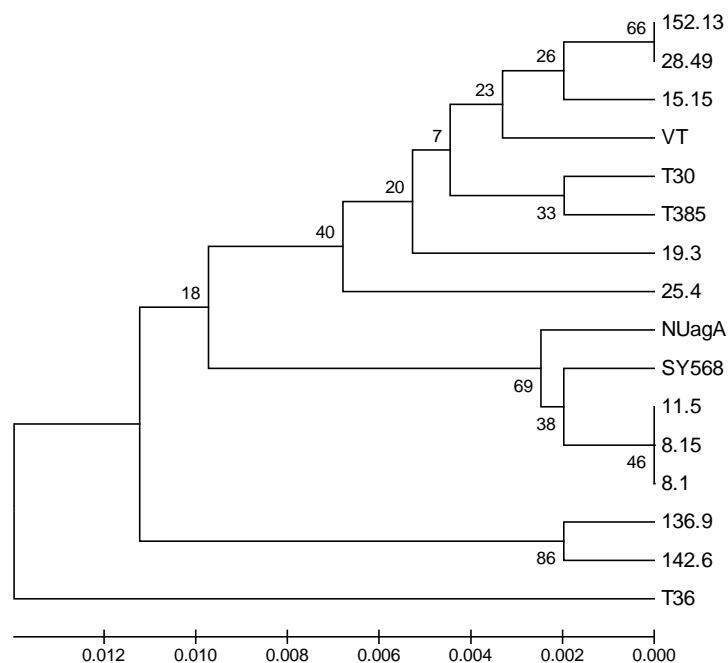
**Fig. 3.8** – Dendrograma da região intergénica p18/p13, obtido da matriz das distâncias nucleotídicas das sequências. A escala horizontal é uma medida da distância nucleotídica entre as sequências.



**Fig. 3.9** – Dendrograma da região genómica codificante da p20, obtido da matriz das distâncias nucleotídicas das sequências. A escala horizontal é uma medida da distância nucleotídica entre as sequências.



**Fig. 3.10** – Dendrograma da região genómica codificante da p23, obtido da matriz das distâncias nucleotídicas das sequências. A escala horizontal é uma medida da distância nucleotídica entre as sequências.



**Fig. 3.11** – Dendrograma da região 3'UTR, obtido da matriz das distâncias nucleotídicas das sequências. A escala horizontal é uma medida da distância nucleotídica entre as sequências.

### 3.2.5 – Discussão

#### 3.2.5.1 - Caracterização dos padrões de SSCP

A maioria dos padrões de SSCP mostraram 3 e 4 bandas, em vez de duas bandas, facto que se pode dever à presença de duas conformações estáveis para uma das cadeias monocatenárias ou até, eventualmente, para as duas cadeias monocatenárias de uma só variante genómica (Orita *et al.*, 1989a). De acordo com Cai e Touitou (1993) (citado por Rubio *et al.*, 1996), uma causa poderia ser a presença de uma concentração excessiva de “primers” na mistura de PCR, que eventualmente originaria amplificações inespecíficas. Não foi este o caso, pois as análises de SSCP foram feitas sobre produtos de PCR com uma só banda (ver Fig. 3.2). A presença de mais de duas bandas na maioria dos padrões de SSCP leva a crer tratar-se de conformações metaestáveis. No contexto da análise dos padrões de SSCP interessa o padrão em si, independentemente do número de bandas presentes, de forma a poder comparar e discriminar os padrões obtidos.

### 3.2.5.2 - Factores que afectam a detecção da variabilidade genómica na análise de SSCP

#### 3.2.5.2.1 - Condições de electroforese

A optimização da análise de SSCP é necessária pelo facto da conformação do DNA poder variar com alguns passos da técnica, implicando também variações no padrão obtido. Estas conformações estão dependentes das condições de electroforese, em particular da temperatura do gel, assim como das condições de desnaturação, do tampão usado, da concentração da acrilamida e da electroforese a baixa diferença de potencial (Orita *et al.*, 1989a; Orita *et al.*, 1989b; Cormier-Daire *et al.*, 1993), factores que devem ser mantidos constantes em todas as análises efectuadas. A alteração de apenas um destes factores pode resultar na alteração da conformação, originando uma alteração na mobilidade dos fragmentos de DNA (Orita *et al.*, 1989b). Para otimizar a capacidade discriminativa do SSCP, as análises foram realizadas nas mesmas condições de temperatura (4 °C), com a mesma concentração de bis-acrilamida e o tempo de corrida ajustado à dimensão do fragmento analisado.

Na repetição de análises de SSCP, verificou-se que os padrões de um mesmo clone podiam variar quando provinham de amplificações distintas. Para validar a comparação e discriminação entre os padrões, a análise de SSCP dos clones de um gene de um mesmo isolado foram feitas em simultâneo. Desta forma ficou também assegurada a análise nas mesmas condições de electroforese. A reprodutibilidade observada nos padrões de SSCP do gene codificante da p18 do clone 136.1 de 45 amplificações, mostra que as análises feitas em simultâneo proporcionam confiança nos padrões de SSCP que se obtêm.

#### 3.2.5.2.2 - Dimensão do fragmento de DNA a analisar

Um outro factor a considerar na aplicação da análise de SSCP é a diminuição da sensibilidade na detecção de mutações com o aumento da dimensão do fragmento de DNA a analisar. Quando o fragmento tem 200 bases, podem ser detectadas entre 70% a 90% das mutações pontuais, valores que diminuem para 60% a 80% quando o fragmento aumenta para 400 bases (Orita *et al.*, 1989a; Cormier-Daire *et al.*, 1993; Ayllón *et al.*, 1999b). A detecção de uma única mutação pontual foi descrita para fragmentos de DNA com 238 a 400 bp (Orita *et al.*, 1989a; Rubio *et al.*, 1996; Goszczynski e Jooste, 2002).

Alguns autores têm vindo a melhorar o desempenho da análise de SSCP na análise de grandes fragmentos através da subdivisão em fragmentos mais pequenos, quer por amplificações parciais (Gago-Zachert *et al.*, 1999), quer pelo uso de enzimas de restrição (Rubio *et al.*, 1996; Goszczynski e Jooste, 2002). Apesar de não estar definida a dimensão do fragmento a partir do qual deva ser feita uma análise parcial, esta foi utilizada em fragmentos de DNA superiores a 740 bp. Na análise dos genes das regiões codificantes da p18, da p20 e da p23, que têm entre 503 a 629 bp, não foi aplicada digestão enzimática, pois verificou-se que se conseguia obter discriminação entre os clones. A detecção de variantes genómicas por SSCP ocorreu apenas nas regiões genómicas acima de 503 pb, que se sabe de antemão serem mais variáveis. Por outro lado, na análise da região 3'UTR que tem apenas 294 pb, não foram detectadas variantes genómicas, a não ser em dois isolados, proporcionando desta forma confiança nos resultados obtidos.

#### 3.2.5.2.3 – Erros introduzidos pelas enzimas de polimerização de ácidos nucleicos RTase e Taq DNA polimerase

A utilização de RT-PCR na obtenção de clones pode interferir na detecção da variabilidade genómica. Embora seja um método viável na caracterização da população de CTV, como foi referido por Rubio *et al.* (2001), os erros que podem ocorrer durante o processo de amplificação têm um impacto importante na detecção ou na estimativa da variabilidade genómica dos vírus em RNA (Bracho *et al.*, 1998). A primeira fonte de erro pode ser introduzida pela actuação da enzima transcriptase reversa (MuLV) na síntese *in vitro* do cDNA com uma frequência inferior a 1 erro por 28000 nt (Bracho *et al.*, 1998). Segue-se uma segunda fonte de erro que é introduzida durante a polimerização cíclica do DNA durante o PCR pela Taq DNA polimerase e que se encontra num intervalo entre 1 erro por 5000 a 50000 pb (Bracho *et al.*, 1998). Na análise da população viral por clonagem do produto de PCR, que é o método seguido neste trabalho, acresce a possibilidade de incorporar erros devido à necessidade de fazer nova amplificação pela Taq DNA polimerase. Se a frequência de substituição de nucleótidos do vírus for menor ou igual à frequência de incorporação de erros pela Taq DNA polimerase, a análise da variabilidade genómica da população pode ficar afectada por esses erros. Para contornar esta situação, a reacção de PCR foi feita com uma concentração de dNTPs e uma quantidade de amostra não limitante, o que permite diminuir o número de ciclos de PCR. Os resultados da análise de SSCP do produto das 45 amplificações do clone 136.1 do gene da p18, com a total ausência de variabilidade nos padrões, assegura confiança nos resultados obtidos. A interpretação destes resultados pode, no entanto, dever-se a duas situações distintas: ausência de mutações por haver uma frequência baixa de mutações introduzidas pela Taq DNA polimerase ou

a presença de mutações que ocorrem durante a polimerização, mas que não são detectadas pela análise de SSCP.

#### **3.2.5.2.4 - Amplificação selectiva através dos “primers”**

Tal como foi sugerido por Gago-Zachert *et al.* (1999) e Goszczynski e Jooste (2002), a sequência dos “primers” utilizados na reacção de PCR pode também afectar a detecção da variabilidade genómica, por favorecer a amplificação de algumas variantes genómicas do vírus em detrimento de outras. Esta selecção é feita se os “primers” não hibridarem com todas as variantes genómicas existentes para um mesmo isolado, favorecendo a amplificação de apenas algumas variantes. Os “primers” usados na amplificação dos genes codificantes das proteínas p18, p13, p20 e p23 e da região 3'UTR foram desenhados de acordo com as sequências dos isolados T36, VT e SY568, que tinham sido sequenciados até à data da análise, o que poderia, de alguma forma, excluir a amplificação de variantes genómicas presentes na planta, em detrimento de outras. O alinhamento dos “primers” que amplificam as diferentes regiões genómicas do CTV com as sequências VT, NuagA, T30, T385, T36 e SY568, revelou que apenas o CTV10, CN182, DCN16, CTV28 e CTV43 têm homologia completa com todas as sequências, enquanto os outros “primers” apresentam de 1 a 3 nucleótidos diferentes. Somente o “primer” CTV14 apresenta falta de homologia com algumas sequências no último nucleótido da extremidade 3'. A ausência de homologia completa da parte de alguns “primers” para com algumas sequências não coloca assim em causa a amplificação das diferentes regiões genómicas (resultados não mostrados). Os resultados obtidos, nas diferentes regiões genómicas, de detecção de diversas variantes genómicas com a dimensão correcta, em isolados que diferem na origem geográfica e nas características biológicas, proporciona confiança nos “primers” usados neste trabalho.

A dificuldade observada na amplificação do gene codificante da p13 deve-se à fraca homologia dos “primers” usados a montante, uma vez que a região no início do gene é pouco conservada. O “primer” DCN15 só apresenta homologia com o isolado T36, enquanto o “primer” CTV36 foi desenhado com base nas sequências dos isolados sequenciados até à data da análise, nomeadamente o T36, o VT e o SY568. O “primer” CTV36 tem uma frequência elevada de bases adenina e timina e na extremidade 3' termina com as mesmas bases, o que lhe dá uma estabilidade reduzida e uma fraca capacidade de hibridação (ver Fig. 3.5).

### **3.2.5.3 - Capacidade de discriminação de variantes genómicas por SSCP**

O valor mínimo de frequência de uma variante genómica detectada por SSCP foi de 4% no gene codificante da p20 do isolado Genoa 1 (planta 28) (ver Tabela 3.1). Este valor indica a capacidade do SSCP para distinguir as variantes genómicas num isolado e está muito próximo do valor de 3% referido por Gago-Zachert *et al.* (1999). D'Urso *et al.* (2000) só detectaram variantes genómicas numa proporção mínima de 10%.

A capacidade de discriminação de variantes genómicas através de SSCP variou entre as diferentes regiões genómicas. Apesar de na região 3'UTR todos os padrões de SSCP serem iguais, há distâncias nucleotídicas elevadas de 3,6% que correspondem a cerca de 11 nucleótidos diferentes, entre os clones 8.15 e 19.3/25.4 e entre os clones 142.6 e 19.3/25.4 (ver Anexo III, Fig. 6) e que o SSCP não consegue detectar. Por outro lado, a análise de SSCP discriminou entre duas variantes genómicas do isolado TR25/1 (planta 142) do gene codificante da p18 que constituem o agrupamento F e que apresentam 10 nucleótidos diferentes, constituindo 1,8% de diferenças nucleotídicas. A análise de SSCP também foi capaz de discriminar variantes genómicas que apresentam cerca de 6 nucleótidos diferentes ou 1% de diferenças, como é o caso das variantes 11.5 e 11.7 do gene codificante da p18 e das variantes 8.1 e 8.15 do gene codificante da p23, com cerca de 7 nucleótidos diferentes.

### **3.2.5.4 - Análise da variabilidade genómica**

#### **Parâmetros usados na análise da diversidade nucleotídica**

A diversidade nucleotídica foi calculada através de diversos índices de distância. Constatou-se que os valores de diversidade eram idênticos quando calculados com os índices Kimura 2, Tamura e Tamura-Nei. De entre estes, foi escolhido o índice de distância Kimura 2 por ser o mais simples e permitir uma boa discriminação das sequências (Nei e Kumar, 2000). Os dendrogramas foram construídos de acordo com o mesmo índice, pelas mesmas razões referidas acima. Utilizou-se o método UPGMA, por este fornecer a melhor topologia na análise das sequências (Swofford *et al.*, 1996).

#### **Distribuição das variantes genómicas**

A análise dos padrões de SSCP dos genes codificantes das proteínas p18, p13, p20 e p23 e da região 3'UTR revelou que a maioria dos isolados é composto por um conjunto de variantes genómicas, havendo na maioria dos casos uma que é predominante (variante principal). Esta distribuição específica é a de uma estrutura "quasispecies" que já foi referida no CTV, na análise de SSCP dos genes codificantes da p18 e da p20 (Ayllón *et al.*, 1999b) e dos genes codificantes da CP, da p20, da Pro (protease) e da MT (metiltransferase) (Rubio *et al.*, 2001).

Neste estudo foi analisado em média 15 clones de cada região genómica de cada isolado, embora o número de clones tenha variado entre 7 e 25. A análise de apenas 7 clones pode ser insuficiente na detecção de algumas das variantes genómicas, mas para alguns dos isolados em que foram analisados cerca de 20 clones, verificou-se uma distribuição com apenas 2 a 3 variantes genómicas (ver Tabela 3.1). Nesta situação pensa-se que a análise de um maior número de clones não vá alterar significativamente o resultado encontrado.

Na análise de SSCP do gene codificante da p20 do isolado 41G (planta 15) e do gene codificante da p18 dos isolados TR25/1 (planta 142) e 41G (planta 15), foi detectada a existência de populações bi-modais, com a presença de duas variantes genómicas em igualdade de representatividade, com uma frequência de cerca de 40% (Tabela 3.1). Foram sequenciados 3 clones do gene codificante da p18 do isolado TR25/1 (planta 142), representativos das duas variantes genómicas mais frequentes. Nos dendrogramas, estes clones ficaram em dois grupos distintos, o grupo C (142.13) e o grupo F (142.12 e 142.14) (ver Figs. 3.6 e 3.7), o que revela uma elevada distância nucleotídica entre estes dois grupos, de cerca de 10% dos nucleótidos (ver Anexo III, Figs. 1 e 2). Este panorama revela a presença de variantes genómicas de mais de um grupo na intra-população de um isolado. Uma possível interpretação deste resultado consiste na população de variantes deste isolado ser originária de uma infecção múltipla de diferentes isolados de CTV que mantiveram a sua integridade ao longo do tempo. Estudos efectuados por Rubio *et al.* (2001) em isolados de Espanha e da Califórnia conduziram igualmente à conclusão de que a diversidade genómica, é por vezes maior dentro de uma mesma população do que em populações de CTV com origens diferentes.

### **Possível ocorrência de fenómenos de recombinação?**

A recombinação seria o acontecimento com maior probabilidade de ocorrência entre duas variantes genómicas com localização próxima uma da outra numa mesma célula, devido aos mecanismos associados aos genomas em RNA, como o “template switching” ou o “copy choice” ou ainda, devido a uma reacção de quebra e ligação (“cleavage/ligation reaction”) (Biebricher, 1999). A sua pressuposta ausência leva a supor que a replicação de variantes genómicas possa ocorrer em células diferentes. Alternativamente, pode colocar-se a hipótese dos isolados poderem coexistir em compartimentos de replicação separados numa mesma célula. Esta última situação foi recentemente observada por Dietrich e Maiss (2003), no estudo de co-infecções de diferentes vírus ou de Potyvirus marcados com diferentes proteínas fluorescentes em *Nicotiana benthamiana*. A separação espacial das variantes genómicas poderá também explicar a segregação das variantes de um isolado quando este é transmitido por afídios (Grant e Higgins, 1956), se estes forem capazes de extrair apenas o conteúdo de uma parte da célula.

Na análise dos dendrogramas, observou-se que a topologia dos clones e isolados era semelhante para as diferentes regiões genómicas (ver Figs. 3.6 a 3.11). Este resultado é indicativo da ausência de recombinação na região terminal 3'. Note-se, porém, que este resultado não é extensível à totalidade do genoma do CTV. Uma vez que o genoma tem cerca de 20 Kb, o fenómeno de recombinação poderá ser mais frequente em outras regiões genómicas.

### **Variabilidade nucleotídica nas diferentes regiões genómicas**

A análise comparativa das sequências de aminoácidos dos isolados VT e T36, efectuada por Mawassi *et al.* (1995a), mostrou que o gene codificante da p18, com apenas 91% de homologia e o gene codificante da p23, com 87% de homologia, são os mais heterogêneos. No estudo efectuado neste trabalho os valores de diversidade nucleotídica, calculados apenas para as variantes principais, indicam que a região genómica codificante da p13 e a região intergénica p18/p13, que foram neste trabalho analisadas pela primeira vez por SSCP, são as regiões menos conservadas (Tabela 3.4). Uma vez que o fragmento da região intergénica p18/p13 tem apenas 35 pb, a distância nucleotídica torna-se elevada quando é alterado apenas um nucleótido. Na região intergénica verifica-se que os grupos A e B e os grupos E, F e G estão bem definidos, uma vez que a distância nucleotídica dos constituintes de cada grupo é nula, como pode ser observado na matriz de identidade nucleotídica (ver Anexo III, Fig. 3). Este resultado sugere que a análise da região intergénica p18/p13 é fundamental quando se pretende agrupar os isolados de acordo com a sequência nucleotídica. Na análise de SSCP, a região codificante da p18 revelou ser também muito heterogênea, uma vez que a maioria dos isolados apresentou um número elevado de variantes genómicas (5) e uma frequência reduzida da variante principal. Esta dispersão das variantes genómicas traduz-se no valor médio mais elevado de heterozigocidade. A dispersão de variantes é mais elevada nos isolados com populações bi-modais [41G (planta 15) e TR25/1 (planta 142)] em que existem duas variantes mais frequentes. Este resultado traduz uma elevada variabilidade genómica associada ao gene que codifica a p18. Apesar de na região genómica codificante da p20 do isolado 41G (planta 15) também existir uma população bi-modal, o valor médio de heterozigocidade da p20 é baixo, o que significa que na maioria dos isolados existe uma variante bem definida e uma reduzida dispersão de variantes genómicas.

Outros estudos de detecção de variabilidade genómica por SSCP, efectuados por Ayllón *et al.* (1999b) aos genes que codificam a p18 e a p20, mostraram que o gene codificante da p18 é o mais heterogêneo. O valor médio de heterozigocidade para avaliar a dispersão de variantes genómicas não foi, no entanto, estimado.

Segundo os estudos de Mawassi *et al.* (1996), Vives *et al.* (1999) e Yang *et al.* (1999), a região 3'UTR é a região genómica mais conservada de todo o genoma do

CTV. Vives *et al.* (1999) referem valores de 97% de homologia na região 3'UTR quando analisaram 3 isolados, que está próximo do valor de 96% obtido neste estudo (ver Anexo III, Fig. 6). A região genômica 3'UTR também apresenta o valor médio mais reduzido de heterozigocidade. Este resultado advém da existência, na maioria dos isolados, de apenas uma variante genômica. Nos dois isolados que constituíram a exceção, o 50A (planta 19) e o 46D (planta 11), apenas foram observadas duas variantes, o que continua a ser indicador de uma baixa variabilidade genômica. Dado a conservação da região 3'UTR e a quase inexistência de dispersão de variantes genômicas, esta é, das regiões genômicas estudadas, a mais indicada a usar num processo de transformação mediado por RNA.

A conservação da região 3'UTR está associada a um conjunto de funções essenciais, tais como a ligação da RNA Polimerase RNA dependente a essa região (Hull, 2002), a formação da cadeia negativa, a regulação da tradução, a estabilidade do RNA e a inibição da formação de cadeias negativas nos estádios finais da infecção (Satyanarayana *et al.*, 2002a).

A extensão das alterações nucleotídicas que produzem modificações na proteína foi feita pelo cálculo das substituições sinónimas e não sinónimas. A estimativa do valor  $d_N/d_S$  revelou que as alterações nucleotídicas nos genes codificantes da p18, da p13, da p20 e da p23 ocorrem no sentido de manter a cadeia de codões que expressa uma proteína (ver Tabela 3.5). Uma vez que são regiões genômicas traduzidas, era esperado haver uma pressão de selecção negativa que limita a acumulação de mutações.

### **Tipificação da região terminal 3'**

Os agrupamentos constituídos reuniram os isolados que partilhavam muitas das características biológicas, que vêm referidas nas Tabelas 2.1 e 2.2. Os grupos A, C, F, G, H e I são formados por clones caracterizados maioritariamente como sendo “stem pitting”. No grupo A está também presente o isolado NUagA do Japão, causador de “seedling yellows”. O grupo B e o grupo E são formados pelos isolados caracterizados como sendo “mild”. No grupo B está incluído o isolado 28 que pode causar “stem pitting” em toranjeira (*C. paradisi* Macfad.). A este grupo também está associado o isolado VT, causador de “seedling yellows”, embora mais distante ao nível nucleotídico. No grupo E o isolado T30 é caracterizado como “stem pitting” suave. O grupo D é representado pelo isolado T36 causador de “quick decline”. Estes resultados mostram uma relação estreita entre a sequência nucleotídica de um isolado e a sintomatologia apresentada.

Ayllón *et al.* (1999b), associaram uma maior heterozigocidade aos isolados mais severos causadores de “stem pitting”, o que também se verificou no presente estudo.

Na análise dos dendrogramas, os clones e isolados das regiões genómicas codificantes da p18, da p13, da p20 e da p23 agruparam-se maioritariamente para valores de distância nucleotídica inferiores a 0,018. Dentro de cada grupo verificou-se que os valores de distância nucleotídica eram mais reduzidos nos isolados com a mesma origem geográfica. No grupo A constituíu-se um sub-grupo dos isolados da Ilha da Madeira (ver Figs. 3.6 a 3.11). No grupo B, os isolados portugueses constituíram um sub-grupo, ficando o isolado VT de Israel mais afastado. O grupo C e o grupo F agruparam os clones da Ilha da Reunião. O grupo E foi formado maioritariamente por isolados com origem em Espanha, estando o isolado T30, com origem na Florida, mais afastado. O grupo G reuniu os clones da Ilha da Madeira (clones 11 e 15). O grupo I agrupou dois isolados da Índia que ficaram distanciados de todos os outros (ver Fig. 3.10). Estes resultados revelam a existência de uma relação entre a origem geográfica e a similaridade nucleotídica dentro de cada “grupo biológico”.

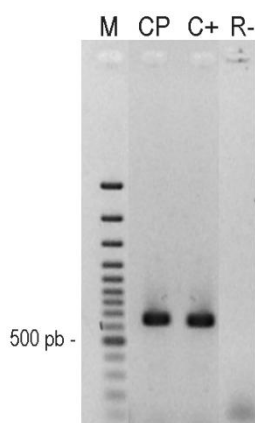
### **3.3 – ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÓMICA DO GENE DA CP DO CTV POR CFLP**

Nos ensaios de CFLP foram usados 16 clones do gene da proteína do capsídeo. A origem e a caracterização biológica dos isolados que deram origem aos clones estão descritos na Tabela 2.2. Adicionalmente 12 isolados de CTV provenientes de plantas infectadas foram também seleccionados a partir de uma colecção existente em laranja doce cv. Madam Vinous, limeira mexicana ou toranjeira (*C. paradisi* Macfad.). As características biológicas dos isolados estão descritas na Tabela 2.1.

#### **3.3.1 - Amplificação do gene da CP**

O gene da CP dos isolados de CTV foi amplificado por aplicação da técnica IC/RT-PCR. A polimerização à temperatura de 72 °C decorreu durante 60 s. Os “primers” usados foram o CTV 1 e o CTV 10, gerando um fragmento de 673 pb que corresponde ao gene da CP, o codão de terminação e um nucleótido extra na extremidade 3’.

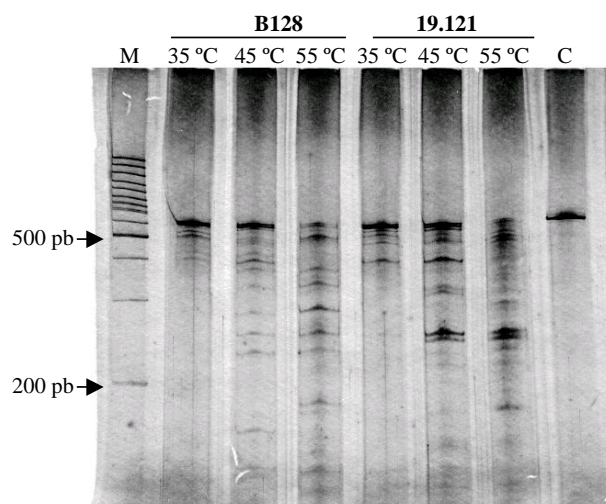
A análise de CFLP foi efectuada directamente sobre os produtos de amplificação do PCR originados, quer a partir de colónias Inv $\alpha$ F’, quer de “minipreps”. Na Fig. 3.12 exemplifica-se o tipo de produto de PCR sobre o qual foi efectuada a análise de CFLP.



**Fig. 3.12** – Electroforese em gel de agarose do produto de amplificação do gene da CP com os “primers” CTV1/CTV10. Coluna M: marcador 100 pb; coluna CP: banda resultante da amplificação do gene da CP (673 pb); coluna C+: amplificação de um clone da CP (controlo positivo); coluna R-: ausência de amplificação na reacção de PCR sem DNA (controlo negativo).

### 3.3.2 - Optimização da temperatura de digestão da Cleavase e reprodutibilidade dos resultados

A separação electroforética dos fragmentos originados pela digestão da Cleavase originou padrões compostos por várias bandas, havendo uma banda no topo do padrão electroforético comum a todas as amostras. Esta banda foi identificada como DNA não digerido numa corrida paralela com uma amostra não tratada com Cleavase, como é mostrado na Fig. 3.13. Uma vez que a temperatura a que ocorre a digestão enzimática afecta o desempenho da endonuclease Cleavase, foi analisada a formação de fragmentos de DNA a 3 temperaturas diferentes (35 °C, 45 °C e 55 °C), mantendo o tempo de digestão de 12 min. Os clones do gene da CP analisados foram o B128 e o 19.121 e os resultados são apresentados na Fig. 3.13. À temperatura mais baixa (35 °C) foram obtidas só alguns bandas, as quais correspondem a fragmentos de grande peso molecular. À temperatura de 45°C, o número de bandas do padrão electroforético aumentou para 15-20, as quais se distribuíram uniformemente no gel. À temperatura de 55 °C, diminuiu a intensidade da banda que corresponde ao DNA não digerido. A temperatura de 45 °C foi considerada a mais satisfatória nas condições testadas.



**Fig 3.13** - Padrões de CFLP de dois clones, B128 e 19.121 obtidos a diferentes temperaturas de reacção, analisados em gel de poliacrilamida desnaturante a 8%. M: marcador 100 pb Ladder Plus, previamente desnaturado; C: controlo negativo que consiste no clone B128 não digerido com a enzima Cleavase.

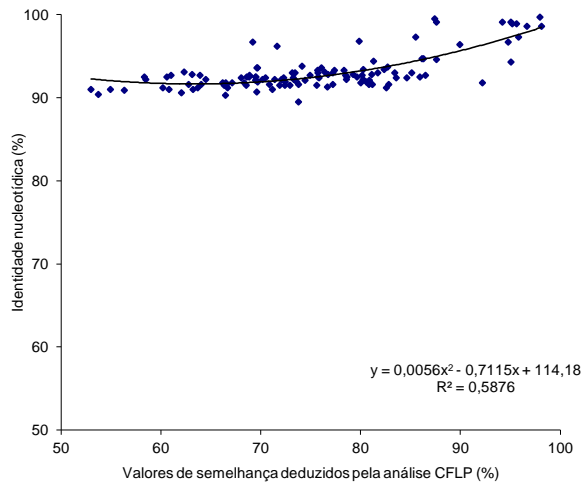
Uma vez que os clones a analisar ficaram separados por diversos géis, o clone 15.118 foi escolhido aleatoriamente para ser incluído em todas as análises e servir de referência de comparação entre os padrões a analisar. O clone 15.118 foi sujeito ao mesmo tratamento de digestão pela Cleavase, tal como as outras amostras.

Durante os ensaios houve a necessidade de mudar de fabricante do kit de CFLP devido à descontinuação da produção do reagente por parte da Boehringer Mannheim. O conjunto dos 16 clones do gene da CP que já tinha sido analisado com este kit foi posteriormente analisado com os reagentes de Takara Shuzo, mantendo as mesmas condições de temperatura e tempo de reacção. Os padrões obtidos para cada conjunto de kits compartilharam a maioria das bandas e foram comparadas as matrizes de similaridade resultantes da análise dos padrões. Uma relação linear com um declive perto de 1 ( $Y = 1,0021 X - 0,0959$ ) e um valor de correlação elevada ( $R^2 = 0,9939$ ) foi obtido nesta comparação, demonstrando a reprodutibilidade desta técnica.

### 3.3.3 - Análise de clones do gene da CP por CFLP

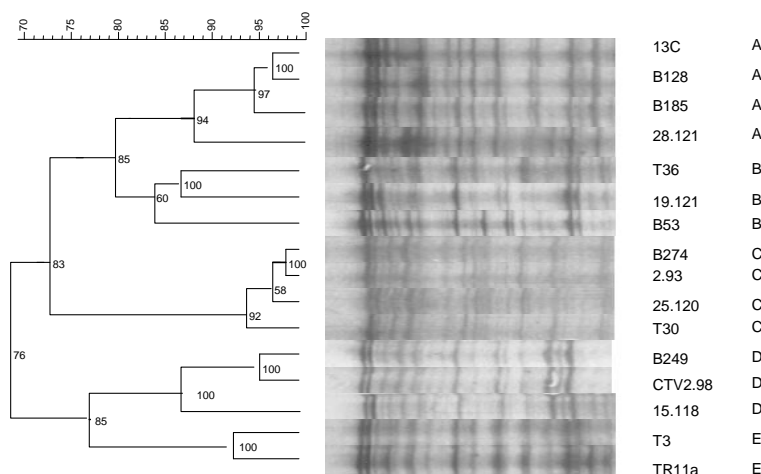
Os 16 padrões cuja sequência nucleotídica é conhecida (compartilham 89,5% a 99,7% de identidade nucleotídica, como vem apresentado na Tabela 3.6) foram analisados por CFLP e as semelhanças entre os padrões foram avaliadas com o coeficiente de Pearson. A capacidade de análise do CFLP em estimar a semelhança das sequências nucleotídicas foi avaliada por comparação dos valores de semelhança obtidos dos 16 clones (ver Tabela 3.7) com as identidades nucleotídicas dos mesmos





**Fig. 3.14** – Apresentação das identidades nucleotídicas em função dos valores de semelhanças obtidos pela análise CFLP.

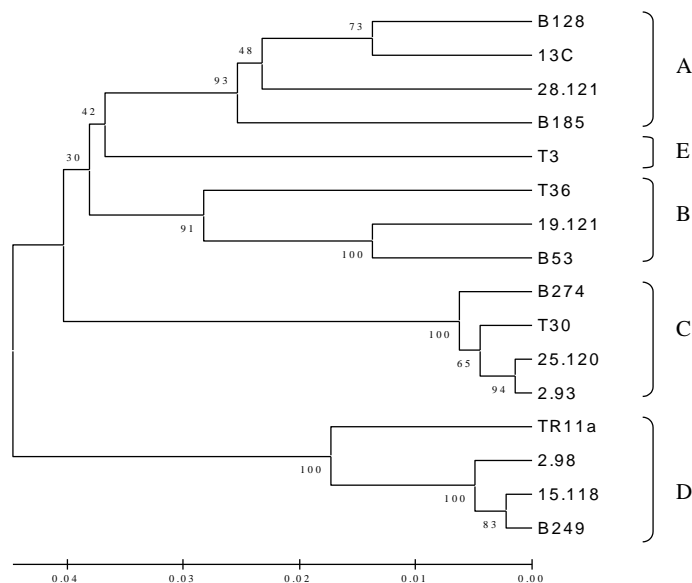
Os dados de semelhança nucleotídica obtidos pela análise CFLP (Tabela 3.7) foram usados para construir um dendrograma, apresentado na Fig. 3.15. A ordem de ramificação do dendrograma mostra 5 agrupamentos, de A a E, se considerarmos o valor acima de 80% de similaridade entre os 16 padrões do gene da CP analisados.



**Fig. 3.15** - Padrões de CFLP e respectivo dendrograma, correspondente à análise dos 16 clones do gene da CP. Os 5 agrupamentos presentes são referidos por A, B, C, D e E. A régua na extremidade esquerda, em cima, representa os valores de semelhança (%) entre os padrões. Os números no dendrograma são valores de correlação cofenética.

Um dendrograma obtido a partir das distâncias nucleotídicas (Kimura 2) entre os clones e construído pelo método UPGMA, apresenta maioritariamente os mesmos

agrupamentos referidos acima quando consideramos uma distância nucleotídica inferior a 0,03 (ver Fig. 3.16). A diferença consiste no clone TR11 ter ficado agrupado no grupo D e separado do clone T3.



**Fig. 3.16** – Dendrograma do gene da CP, obtido pelo método UPGMA da matriz das distâncias nucleotídicas das sequências, calculada com o índice de distância Kimura 2. A escala horizontal é uma medida da distância nucleotídica entre as sequências.

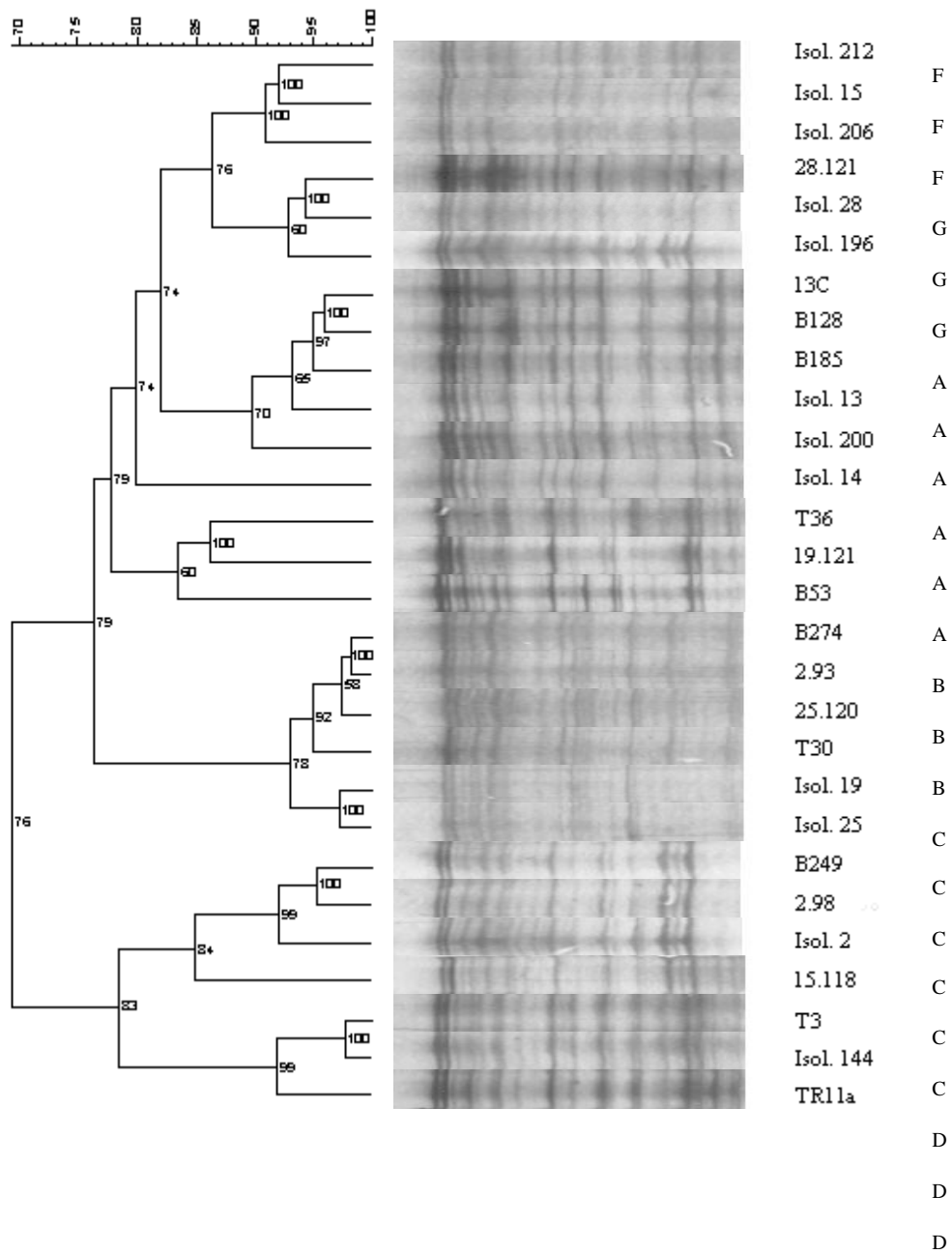
O aspecto mais notável é o facto dos padrões se agruparem de acordo com as propriedades biológicas dos isolados dos quais foram obtidos. Os padrões obtidos de isolados severos causadores de “stem pitting” em laranjeira doce (SP-LD) (B128, 13C, B185), foram agrupados no grupo A ou grupo D (15.118, 2.98, B249), enquanto os clones de isolados “mild” (T30, 2.93, 25.120 e B274) foram agrupados no grupo C. Os clones de isolados severos causadores de “quick decline” foram agrupados de um modo menos claro nos grupos B e E.

### 3.3.4 - Tipificação de material vegetal infectado com base na análise de CFLP

Um conjunto de 12 isolados de CTV com caracterização biológica descrita na Tabela 2.1 foram analisados por CFLP para avaliar a capacidade desta técnica na tipificação dos isolados.

Os 12 isolados de CTV ficaram agrupados em diferentes grupos com os isolados ou clones, com os quais compartilham características geográficas ou biológicas, estando os resultados apresentados na Fig. 3.17. Por exemplo, os isolados “mild” 19 e 25 (da Espanha) ficaram agrupados com os clones do agrupamento E que são originados de plantas descritas como tendo sintomas “mild”. Os isolados 13, 14 e 15 (da Ilha de Madeira) causadores de “stem pitting” ficaram agrupados no agrupamento A e F com os clones de isolados descritos como causadores de “stem pitting” em laranja doce (SP-LD), assim como o isolado 212 (da Ilha da Reunião). O isolado da planta 144, um isolado “mild” da Ilha da Reunião, ficou agrupado no agrupamento E, com um clone da Flórida (T3) e outro clone da Ilha da Reunião. O isolado 28 e um clone originado deste isolado, o clone 28.121, ficaram agrupados no mesmo agrupamento. O isolado 2 é um isolado SP-LD da Ilha da Madeira e originou dois clones diferentes, o clone 2.98 e o clone 2.93. O clone 2.98 ficou agrupado com o isolado 2 e outros clones que foram originados de isolados causadores de SP-LD. O clone 2.93 ficou agrupado no agrupamento C com isolados “mild” e clones provenientes de isolados com características “mild”.

A técnica CFLP foi também usada na análise de uma mistura de variantes genómicas resultantes da inoculação artificial de dois isolados com origem conhecida numa mesma planta. As plantas 196, 200 e 206 foram inoculadas com uma mistura de isolados “mild” e “stem pitting” e mostraram sintomas SP-LD. A análise CFLP agrupou os isolado 200 e 206 juntamente com os clones obtidos de isolados SP-LD. Porém o isolado 196 agrupou-se com os clones do agrupamento B que não estão relacionados com o inóculo.

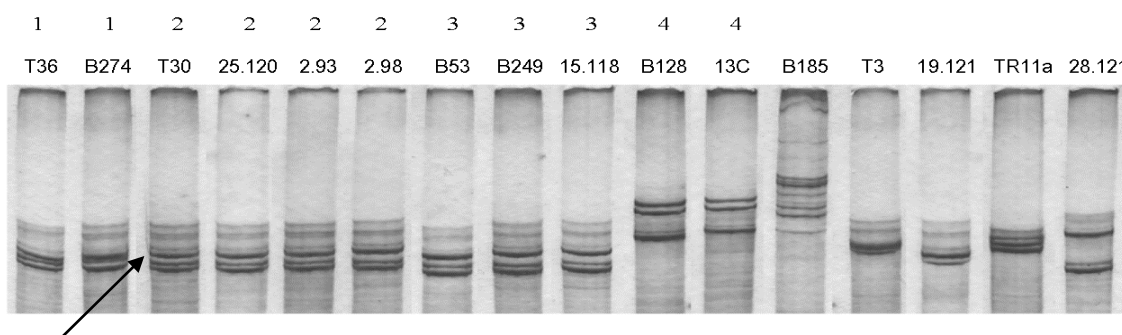


**Fig 3.17** - Padrões de CFLP e respectivo dendrograma, correspondente à análise de 12 isolados e dos 16 clones do gene da CP. Os agrupamentos formados estão apresentados na coluna do lado direito (A, B, C, D, E, F e G). A régua na extremidade esquerda, em cima, representa os valores de semelhança (%) entre os padrões. Os números no dendrograma são valores de correlação cofenética.

### 3.3.5 - Análise dos 16 clones do gene da CP por SSCP

A análise SSCP dos 16 clones que foram previamente analisados por CFLP foi efectuada para poder ser comparada a capacidade discriminativa das duas técnicas.

O resultado da análise de SSCP dos padrões dos 16 clones está apresentada na Fig. 3.18. Cinco clones apresentaram padrões diferentes que não puderam ser agrupados. Os restantes onze clones apresentaram quatro padrões diferentes. Porém, as diferenças entre os padrões dos grupos 1, 2 e 3 não foram muito distintas. Não houve uma correspondência entre os grupos definidos por SSCP e por CFLP. Por exemplo, o agrupamento 2 é composto pelos clones 25.120, 2.93, 2.98 e T30 que na análise por CFLP pertenciam aos agrupamentos E e F. Apenas no caso do grupo 4, formados pelos clones B128 e 13C, houve concordância com a análise CFLP.



**Fig. 3.18** - Padrões de SSCP dos 16 clones do gene da CP. Os grupos de padrões de SSCP comuns entre si estão marcados de 1 a 4. Uma pequena diferença na distância entre as bandas (seta) marca a diferença entre os padrões 1 e 2.

### 3.3.6 – Discussão

#### 3.3.6.1 - Optimização da técnica CFLP e digestão pela Cleavase

Normalmente a análise CFLP é feita sobre uma cadeia simples de DNA que é marcada radioactivamente. Porém O'Connell *et al.* (1999) conseguiu analisar padrões de CFLP através da marcação de DNA em cadeia dupla. Usando os padrões gerados por DNA em cadeia dupla e com marcação dos mesmos pelo nitrato de prata evita-se a marcação radioactiva, tal como foi efectuada neste trabalho. Isto resulta num protocolo menos laborioso e menos perigoso para o investigador. Numa tentativa prévia, Rossetti *et al.* (1997) usaram o nitrato de prata num protocolo de CFLP diferente, pelo que esses autores não conseguiram mais do que duas bandas, o que não foi adequado para a

discriminação de isolados. Neste estudo, os padrões de CFLP para fragmentos de DNA com 672 bp, consistiram em 15 a 20 bandas. Perante o estabelecimento das condições óptimas para a reacção de CFLP, é esperado obter padrões com um número máximo de bandas. As diferenças nos padrões são evidentes por perda ou ganho de uma ou mais bandas ou por mudanças na intensidade das mesmas. De acordo com o fabricante, um dos parâmetros que controlam o número de bandas é a temperatura da digestão por parte da Cleavase. Como pode ser visto na Fig. 3.13, a temperatura mais baixa não produz muitas bandas, enquanto à temperatura mais elevada de 55 °C ocorre um forte atenuamento da banda correspondente ao DNA não digerido e das bandas de migração mais lentas, indicativo de sobre-digestão. É de evitar a sobre-digestão para assegurar que o painel inteiro de fragmentos está presente. Neste trabalho, perante os resultados obtidos, foi considerado que a temperatura de digestão de 45° C era adequada.

### **3.3.6.2 - Capacidade de análise do CFLP na distinção e agrupamento das sequências nucleotídicas em comparação com o SSCP**

Os valores de semelhança calculada para os padrões dos clones, obtidos por análise CFLP, relacionam-se estreitamente com os valores de identidade nucleotídica. Além disso, como pode ser deduzido da Fig. 3.14, o CFLP mostra uma sensibilidade elevada para detectar alterações nucleotídicas entre sequências muito semelhantes, por exemplo, com identidade nucleotídica superior a 90%. Os 16 clones mostraram padrões diferentes e no conjunto das sequências testadas, foi detectada a menor distância existente que é de 2 nucleótidos. Esta capacidade de análise é especialmente adequada para comparar genes virais, como o gene da proteína do capsídeo, pelo facto de em algumas espécies de vírus haver uma ideia consensual de que as variantes de um isolado normalmente compartilham mais de 85% de identidade nucleotídica.

Com o SSCP a ênfase é posta normalmente na capacidade de análise para discriminar entre variantes de sequências nucleotídicas. Por exemplo, Rubio *et al.* (1996) pôde separar certas variantes de CTV que diferem em 1 nucleótido. Porém, o CTV apresenta um elevado potencial de variabilidade a nível nucleotídico, com uma população de variantes geneticamente relacionadas associada a cada isolado (Rubio *et al.*, 2001). Assim, o objectivo principal quando se comparam dois isolados de CTV seria adquirir uma medida do grau de semelhança, em vez de discriminá-los para ver quais são diferentes uns dos outros (o que normalmente são). Neste sentido, a técnica SSCP é muito limitada devido à impossibilidade de relacionar a conformação molecular com a sequência nucleotídica (Orita *et al.*, 1989b). Além disso, o SSCP produz um número muito limitado de bandas que limita a possibilidade de agrupar os padrões. Normalmente, os padrões de SSCP são quase iguais ou não se conseguem agrupar,

como pode ser visto na Fig. 3.18 onde são apresentados os resultados de um ensaio de SSCP com os mesmos 16 clones. Cinco clones entre os 16 originaram padrões únicos, enquanto onze padrões originaram 4 grupos de padrões idênticos. Assim a informação obtida por SSCP, em comparação com dados obtidos do CFLP, é mais limitada quando o objectivo é calcular as relações entre as sequências nucleotídicas. Estes dados demonstram claramente que o CFLP é uma técnica reproduzível, resultado também referido por O'Connell *et al.* (1999) e Brow *et al.* (1996), quando comparados com o SSCP, que pode sofrer de falta de reprodutibilidade (O'Connell *et al.*, 1999; Hauser *et al.*, 2000).

### 3.3.6.3 - Capacidade de análise do CFLP na tipificação de isolados de CTV

A necessidade de caracterização de variantes genómicas do CTV e o estabelecimento de relações com outras sequências previamente caracterizadas é de importância suprema no controlo prévio do CTV. Um aspecto notável da análise CFLP é a sua capacidade de agrupar os isolados de CTV com os clones da mesma origem ou com isolados com propriedades biológicas semelhantes. Esta característica parece ser o resultado directo da sua capacidade de agrupar de acordo com as sequências nucleotídicas, o que faz esta técnica ser muito prometedora para a tipificação do CTV.

Em condições naturais, as árvores são frequentemente infectadas por uma mistura de variantes de CTV que podem estar distribuídos irregularmente (Grant e Higgins, 1956). Na análise destas misturas de variantes, os resultados observados podem incluir: (i) a detecção de um único componente da mistura; (ii) a detecção de um padrão composto, resultado da adição dos padrões dos componentes da mistura ou (iii) o aparecimento de padrões novos que não apareciam quando eram analisados os componentes da mistura isoladamente. Neste caso, que foram analisadas misturas de isolados com uma componente “mild” e “stem pitting” e que originam sintomas “stem pitting”, os respectivos padrões de CFLP foram agrupados próximo dos isolados com sintomas “stem pitting”. Uma taxa mais elevada de multiplicação do componente “stem pitting” pode não ser a única explicação para este resultado, uma vez que uma análise de SSCP realizada ao mesmo tempo (resultado não mostrado) para alguns destes isolados mostrou um padrão que corresponde à adição dos isolados “mild” e “stem pitting”, provando que ambos estavam presentes em quantidade detectável por PCR. Ao contrário do SSCP, a análise CFLP de padrões não está baseada na comparação exacta de padrões, mas na similaridade entre padrões complexos que são distintos entre si. Assim o CFLP origina a situação referida acima em iii). De um ponto de vista prático, a capacidade de análise do CFLP na detecção dos componentes “stem pitting” é muito importante, pois permite a sua erradicação.

O CFLP parece ser uma técnica alternativa à sequenciação, uma vez que gera informação que permite o estabelecimento de relações entre os isolados de acordo com a sequência nucleotídica e indirectamente, de acordo com as características biológicas.

Os resultados obtidos da análise do gene da CP revelam que esta região genómica apresenta uma variabilidade da mesma ordem de grandeza da que foi verificada nas outras regiões genómicas codificantes analisadas. Numa perspectiva de transformação genética, e dada a variabilidade genómica do CTV, a utilização de uma região genómica mais conservada como a região 3'UTR poderá dar garantias de uma maior resistência ao CTV.



# PREPARAÇÃO DE UM VECTOR DE TRANSFORMAÇÃO COM O GENE DA PROTEÍNA DO CAPSÍDIO DO CTV E ENSAIO EM *Nicotiana tabacum*

## 4.1 - INTRODUÇÃO

A forma natural como as agrobactérias são capazes de transferir sequências definidas de DNA (T-DNA) para a genoma da célula vegetal, através de funções codificadas pelos genes *vir* dos plasmídios Ti do *Agrobacterium tumefaciens* e Ri do *A. rhizogenes*, tem sido largamente explorada no desenvolvimento de vectores de transformação. No plasmídio Ti, a região *vir* actua na configuração *cis* ou *trans* em relação ao T-DNA, o que permitiu que fossem desenvolvidos dois sistemas de vectores desarmados: a) vector co-integrado, baseado na actuação em *cis* dos genes *vir*, em que os genes de interesse são inseridos por recombinação homóloga no T-DNA presente no plasmídio Ti (Zambryski *et al.*, 1983); b) vector binário, baseado na actuação em *trans* dos genes *vir*, em que o T-DNA e a região *vir* se encontram em dois plasmídios diferentes (Hoekema *et al.*, 1983). No vector binário está presente uma origem de replicação funcional na bactéria *A. tumefaciens* e os genes de interesse são clonados entre as sequências flanqueadoras LB (“left border”) e RB (“right border”) do T-DNA. Por seu lado, a bactéria *A. tumefaciens* deve conter um plasmídio Ti com uma região *vir* intacta (plasmídio “helper”), ao qual falta a região T-DNA (Hoekema *et al.*, 1983). Os vectores binários têm ainda a particularidade de serem facilmente introduzidos e replicados, quer em *Escherichia coli*, quer nas agrobactérias (Bevan, 1994).

No T-DNA encontra-se geralmente um gene de selecção, por exemplo o *nptII*, que confere resistência a um antibiótico e um gene repórter, com a função de identificar as células transformadas. Utilizado pela primeira vez por Jefferson *et al.* (1986), o gene *uidA* da *E. coli* que codifica para a  $\beta$ -glucuronidase, tornou-se no gene repórter mais utilizado nos ensaios de transformação genética. A presença de promotores e terminadores fortes, tais como os do gene *nos* (“nopaline synthase”) e os do vírus “cauliflower mosaic virus” (CaMV), são elementos importantes para uma transformação eficiente em plantas dicotiledóneas e asseguram que os genes de interesse clonados no T-DNA sejam expressos na célula hospedeira (Huttner, 1992).

No presente trabalho foi usado o vector binário pBI121 (Clontech, ref. 6018-1) de 13 Kb que contém o T-DNA delimitado pelas sequências flanqueadoras LB e RB, com

a região codificante para o gene *nptII* e a região codificante para o gene *uidA*. O T-DNA foi modificado com a inserção da cassette pE7113 que transporta o gene da proteína do capsídio (CP). A cassette pE7113, gentilmente cedida pelo Dr. Masashi Ugaki (Nat. Inst. Agrobiological Resources, Ibaraki, Japan) contém duas sequências reguladoras: o “enhancer” E7 e a sequência  $\Omega$  que aumentam a eficiência da tradução em células vegetais (Mitsuhara *et al.*, 1996). A sequência  $\Omega$  e o gene da CP ficaram delimitados pelo promotor 35S do CaMV e pelo terminador *nos* da nopalina sintase (Fig. 4.2-d).

## 4.2 – PREPARAÇÃO DO VECTOR DE TRANSFORMAÇÃO

A partir de um isolado do CTV foi amplificado o gene da CP para ser posteriormente inserido na cassette pE7113, em substituição do gene *uidA*. A cassette pE7113-CP foi posteriormente excisada do plasmídeo pUC18 e inserida no T-DNA do plasmídeo pBI121, em substituição da região codificante do gene *uidA*.

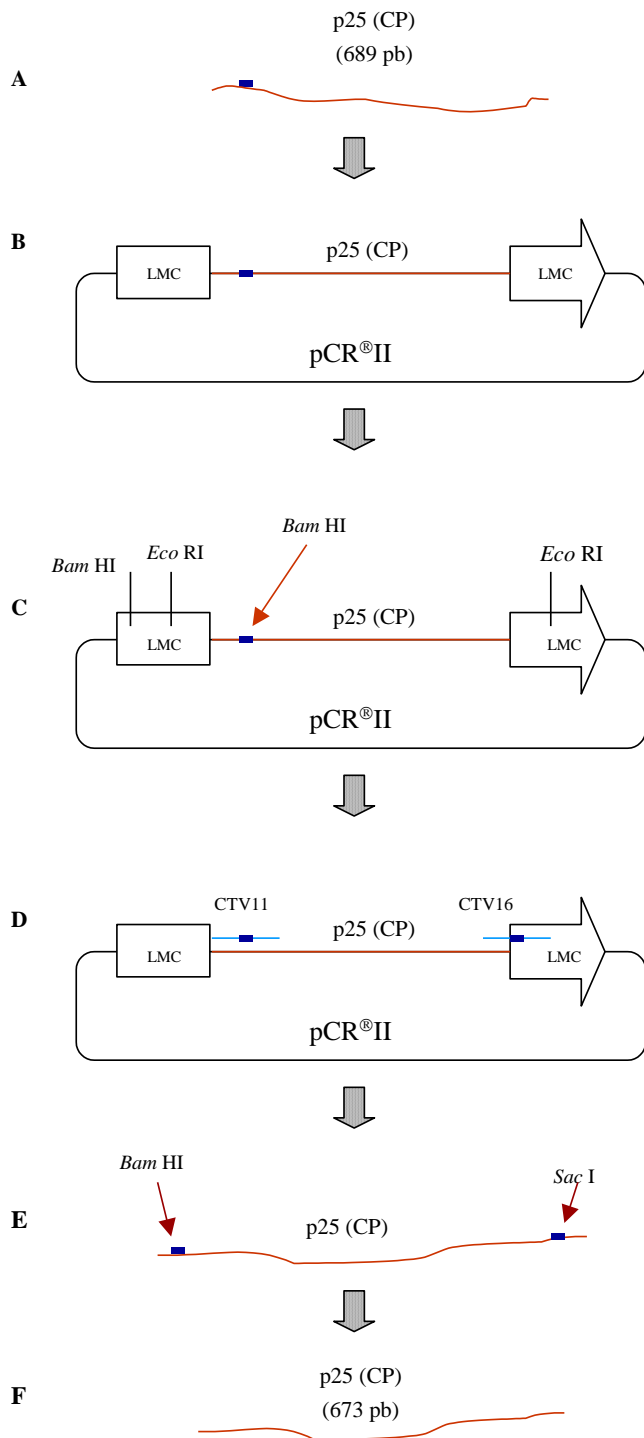
### Isolamento e clonagem do gene da CP no vector pCR<sup>®</sup>II

O gene da CP foi isolado e clonado no vector pCR<sup>®</sup>II segundo o esquema da Fig. 4.1. Para a amplificação do gene da CP foi usado o isolado 78 (planta 25) com características “mild” (ver Tabela 2.1). O gene foi amplificado por IC/RT-PCR com os “primers” CTV11 e CTV10, originando um fragmento de 689 pb que corresponde ao gene da CP com 16 nucleótidos adicionais na extremidade 5’ e um nucleótido adicional na extremidade 3’. O “primer” CTV11 apresenta um local de restrição da enzima *Bam* HI (Amersham Biosciences, Ref. 27-0868-03) (Fig. 4.1-A). O gene da CP foi ligado no vector pCR<sup>®</sup>II por TA Cloning (Fig. 4.1-B). Após a confirmação da ligação por PCR, procedeu-se à extracção e purificação do DNA plasmídico pelo Kit “Wizard<sup>®</sup> Plus Minipreps”. A dimensão do fragmento de DNA inserido foi em seguida confirmada por digestão com a enzima *Eco* RI (Fig. 4.1-C). A análise da orientação do gene da CP no plasmídeo pCR<sup>®</sup>II foi feita por digestão enzimática com a enzima *Bam* HI. A presença de um local de restrição da *Bam* HI no plasmídeo pCR<sup>®</sup>II no local múltiplo de clonagem (“multiple cloning site”) e de um outro local de restrição situado no gene da CP clonado, inserido pelo “primer” CTV11, permitiu saber a orientação do inserto (Fig. 4.1-C). A partir de um clone com o gene da CP na orientação correcta, foi feita uma amplificação por PCR com os “primers” CTV 11 e CTV16. Este novo “primer” CTV16 hibrida, na extremidade 3’, com o gene da CP e na extremidade 5’ com o plasmídeo pCR<sup>®</sup>II. Com este “primer” foi adicionado um local de restrição *Sac* I (Amersham Biosciences, ref. 27-0970-01) à sequência amplificada (Fig. 4.1-D). O produto da amplificação por PCR foi digerido simultaneamente com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Sac* I (Fig. 4.1-E), libertando o gene da CP com 673 pb, que corresponde ao gene da CP, o codão de terminação e um nucleótido extra na extremidade 3’ (Fig. 4.1-F). O

gene da CP com extremidades coesivas foi isolado do gel de agarose pelo kit “Sephaglas™ BandPrep” e purificado pelo kit “MicroSpin™ Columns”.

### **Clonagem do gene da CP na cassette pE7113**

A clonagem do gene da CP na cassette pE7113 e a clonagem desta cassette no plasmídeo pBI121 estão esquematizados na Fig. 4.2. A cassette pE7113, inserida no plasmídeo pUC18, foi digerida com as enzimas *Bam* HI e *Sac* I para libertar o gene *uidA* (Fig. 4.2-a). Os fragmentos resultantes (pUC18-pE7113 e o gene *uidA*) foram separados por electroforese em gel de agarose a 0,7% em tampão TAE. O fragmento pUC18-pE7113 foi recuperado da agarose utilizando o kit “Sephaglas™ BandPrep” e purificado pelo kit “MicroSpin™ Columns”. O gene da CP foi ligado na cassette pE7113, segundo o protocolo referido em 2.8.1. A presença do inserto na cassette foi verificada por digestão com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Sac* I e o resultado analisado em gel de agarose a 0,7%.



a) Amplificação do gene da CP por IC/RT-PCR com os "primers" CTV11/CTV10. O "primer" CTV11, a montante, insere um local de restrição da *Bam* HI, esquematizado na figura com o traço azul escuro.

b) Clonagem do gene da CP no plasmídeo pCR®II. O gene fica flanqueado pelo local de múltipla clonagem (LMC), onde se encontram seqüências de restrição de várias enzimas.

c) Na digestão com a enzima de restrição *Eco* RI libertou-se o gene da CP.

d) A digestão com a enzima *Bam* HI permitiu saber a orientação do inserto.

e) O gene da CP inserido na posição correcta é amplificado por PCR com os "primers" CTV11/CTV16. O "primer" CTV16 insere um local de restrição da enzima *Sac* I, esquematizado na figura com o traço azul escuro.

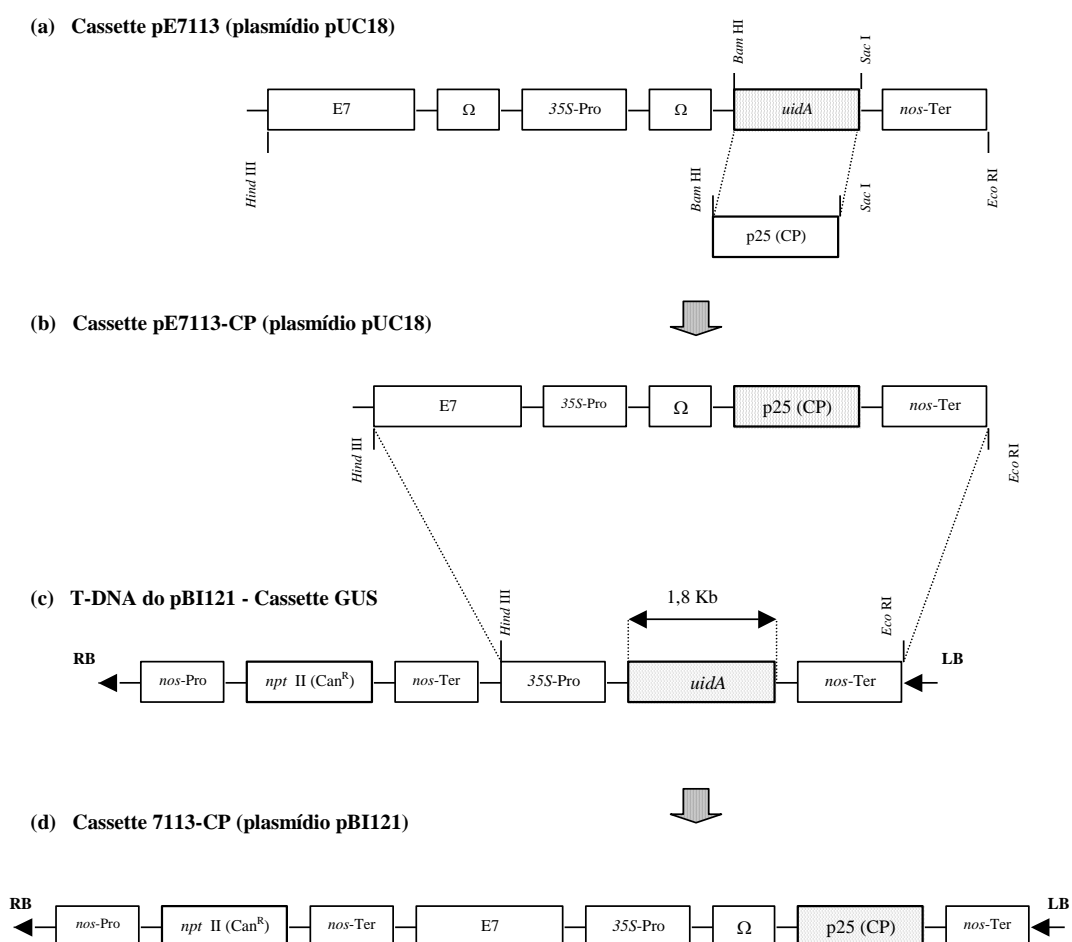
f) A digestão com a enzima *Bam* HI e *Sac* I liberta o gene da CP com 673 pb.

**Fig. 4.1** –Esquema da clonagem do gene da CP no vector pCR®II.  
 Abreviaturas: p25 (CP)= gene da proteína do capsídeo do CTV; LMC= local de múltipla clonagem.

## Clonagem da cassette modificada pE7113-CP no plasmídio pBI121

A cassette pE7113 modificada com a inserção do gene da CP do CTV, foi excisada do plasmídio pUC18 com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Hind* III (Fig. 4.2-b). A cassette pE7113-CP foi extraída da agarose usando o sistema Biometra® Transiluminator e foi purificada por precipitação com acetato de sódio/etanol.

O plasmídio pBI121 foi também sujeito a uma digestão com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Hind* III, para libertar o fragmento constituído pelo gene *uidA*, promotor *35S* e terminador *35S* (Fig. 4.2-c). O fragmento restante do pBI121 foi isolado e extraído do gel de agarose a 0,7% pelo método referido acima, seguido de uma purificação por precipitação com acetato de sódio/etanol. A cassette pE7113-CP foi então ligada no plasmídio pBI121 (Fig. 4.2-d), de acordo com o protocolo referido em 2.8.1.



**Fig. 4.2** – Esquema da modificação do T-DNA do plasmídio pBI121. Abreviaturas: *nos-Pro*; promotor do gene da nopalina sintase; *nos-Ter*: sequência de terminação do gene da nopalina sintase; *35S-Pro*: promotor do vírus do mosaico da couve-flor; *nptII* ( $\text{Can}^{\text{R}}$ ), gene que codifica para a neomicina fosfotransferase e que confere resistência à canamicina; *uidA*: gene que codifica para a enzima  $\beta$ -glucuronidase; E7: “enhancer”;  $\Omega$ : sequência formada por 25 repetições da sequência CAA; p25 (CP): gene da proteína do capsídio do CTV.

Procedeu-se à transformação de células bacterianas de *E. coli* InvαF' com o plasmídeo pBI121-pE7113-CP, que foi transferido para a bactéria *A. tumefaciens*, estirpe EHA105, após conjugação triparental.

### **4.3 - TRANSFORMAÇÃO DE UMA PLANTA MODELO, *Nicotiana tabacum***

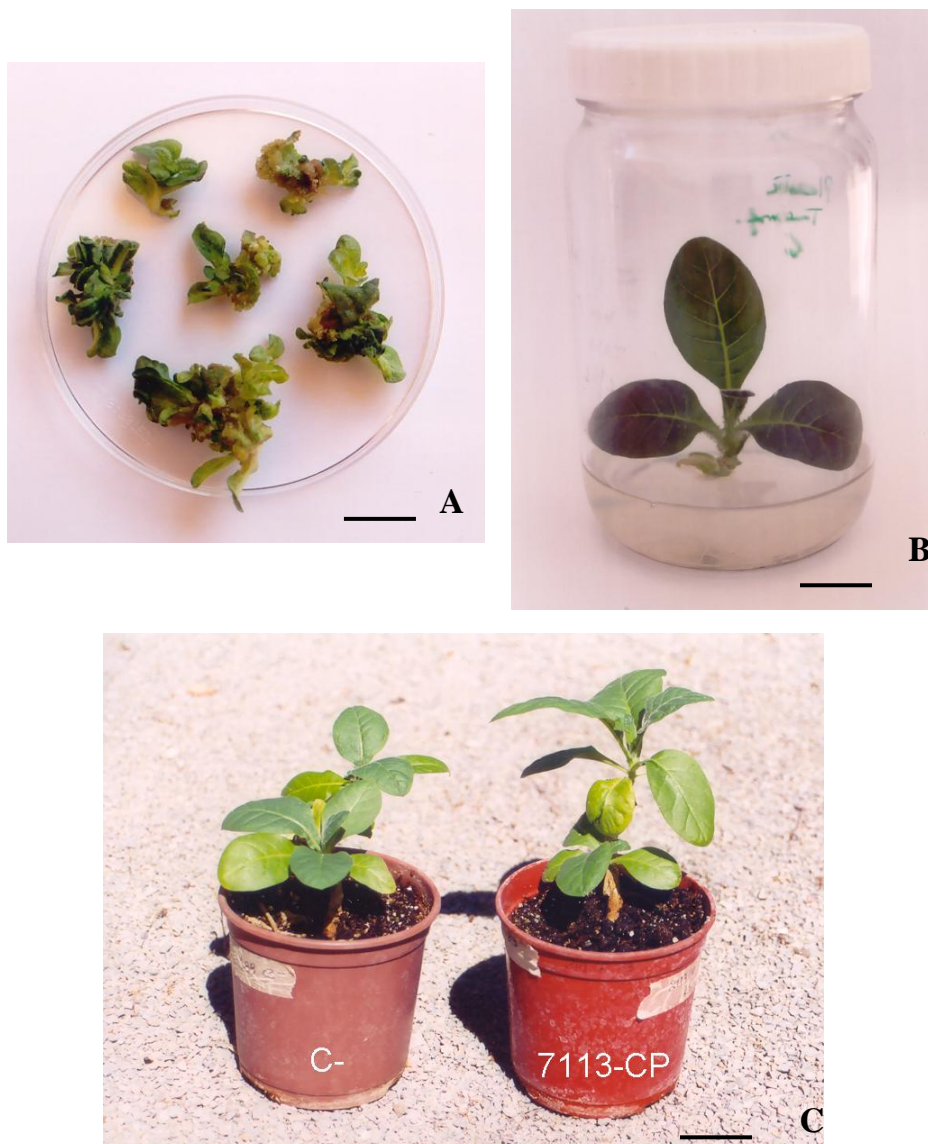
A expressão do gene da CP do T-DNA modificado com a construção pE7113-CP foi testada através da transformação de uma planta modelo, *Nicotiana tabacum*. A partir de plântulas de *N. tabacum* mantidas *in vitro* no meio de cultura RMIN, cortou-se tecido foliar que foi usado no processo de transformação. No método de transformação seguido, dos discos foliares, usou-se a bactéria *A. tumefaciens*, estirpe EHA105 com o plasmídeo pBI121-pE7113-CP.

Os numerosos rebentos adventícios obtidos em meio de regeneração a partir de cada secção foliar (Est. I-A), foram transferidos para meio RMIN para o desenvolvimento radicular e caulinar das plantas (Est. I-B). Após 3 a 4 meses de crescimento no meio RMIN, as plantas foram envasadas e adaptadas às condições *ex vitro* (Est. I-C).

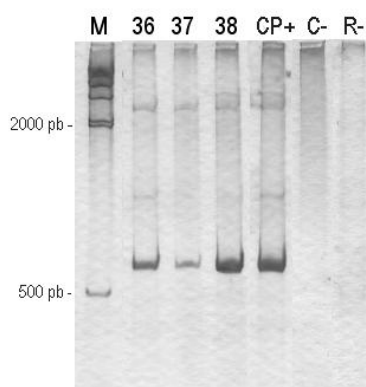
#### **4.3.1 - Detecção da presença e expressão do gene da CP**

##### **Amplificação por PCR do gene da CP**

O gene da CP foi analisado por amplificação por PCR em todas as plantas de tabaco sujeitas ao processo de transformação. A análise foi efectuada em plantas com cerca de 8 meses de crescimento, para a detecção de integração estável. O DNA genómico foi extraído de todas as plantas pelo método Edwards *et al.* (1991) modificado. A análise por PCR foi feita com os “primers” CTV1 e CTV10. Foi usado um clone do gene da CP inserido no plasmídeo pCR®II como controlo positivo, enquanto o DNA genómico de uma planta de tabaco não transformada foi usado como controlo negativo. Uma vez que a electroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante a 6,5% é mais sensível e permite uma detecção mais eficiente do produto de amplificação, foi escolhido este método para a análise do produto de PCR. Na Fig. 4.3 são apresentados alguns dos resultados obtidos na detecção do produto de amplificação do gene da CP.



**ESTAMPA I.** Regeneração de plantas de *Nicotiana tabacum* resistentes à canamicina, após a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. **(A):** Regeneração de rebentos adventícios a partir de folhas em meio de cultura (meio de regeneração) contendo 100 mg/l de canamicina; **(B):** Rebento adventício em meio de cultura RMIN com 100 mg.l<sup>-1</sup> de canamicina; **(C):** Plantas de *N. tabacum* mantidas em vaso: planta não transformada (C-) e planta transformada com a construção pE7113-CP. As plantas apresentam um fenótipo normal. Barras das figuras: em (A) = 1,7 cm; em (B) = 1,4 cm; em (C) = 4 cm.



**Fig. 4.3** - Análise electroforética em gel de poliacrilamida não desnaturante a 6,5% do resultado da amplificação do gene da CP: M: marcador  $\lambda$ Hind III; 36, 37 e 38: amplificação do gene da CP com os “primers” CTV1/CTV10; CP+: controlo positivo - amplificação do gene da CP de um clone; C-: controlo negativo - planta do tabaco não transformada; R-: controlo negativo - PCR sem DNA.

A eficiência média de transformação de *N. tabacum* com a cassette pE7113-CP foi de 54,2% (razão entre o número de plantas positivas à reacção de PCR e o número total de explantes analisados) e está apresentada na Tabela 4.1. As plantas transformadas apresentaram um fenótipo normal, como é observado na Est. I-C.

**Tabela 4.1** - Frequência de transformação de plantas de *N. tabacum* com o gene da CP do CTV.

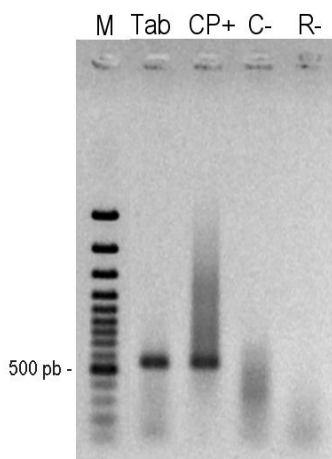
Construções plasmídicas	Número de plantas testadas	Número de plantas transformadas	Frequência de transformação (%)
pE7113-CP	24	13	54,2

### Análise do mRNA

Com o objectivo de analisar a transcrição do gene da CP, foi realizada uma análise RT-PCR do DNA genómico de uma das plantas transformadas com a cassette pE7113-CP, a planta 38.

A extracção do RNA total da planta 38 foi feita através do kit “RNeasy Plant Extraction” e o cDNA do gene da CP foi amplificado por PCR com os “primers” CTV1/CTV14. Um clone do gene da CP foi usado na reacção de RT-PCR para funcionar como controlo positivo. O RNA de uma planta do tabaco não transformada foi usado como controlo negativo. Na Fig. 4.4 apresentam-se os resultados obtidos.

A presença de uma banda com a dimensão correcta é indicativo da transcrição do gene da CP.



**Fig. 4.4** - Análise electroforética em gel de agarose a 1% dos produtos de RT-PCR, amplificados com os “primers” CTV1/CTV14. M: marcador molecular 100 pb Ladder Plus; Tab: amplificação do cDNA do gene da CP na planta do tabaco 38; CP+: controle positivo - amplificação do gene da CP de um clone; C-: controle negativo - reacção de RT-PCR com DNA genómico de planta do tabaco não transformada; R-: controle negativo - reacção de RT-PCR sem RNA.

#### 4.4 - DISCUSSÃO

A estirpe EHA105, após a conjugação triparental, fica com o plasmídeo pBI121 e o plasmídeo “helper” residente, que contém os genes da virulência que irão despoletar, num processo de transformação, a transferência do fragmento T-DNA do plasmídeo pBI121 que se encontra entre as sequências flanqueadoras LB e RB, para o genoma das células vegetais. No processo de conjugação triparental, apenas a bactéria *A. tumefaciens* cresce na caixa de Petri com o antibiótico de selecção rifampicina. Um gene do plasmídeo “helper” da agrobactéria confere-lhe a resistência ao antibiótico, enquanto a resistência ao antibiótico canamicina é conferida pelo gene *nptII* do plasmídeo pBI121. O plasmídeo pRK2013 não se replica na bactéria *A. tumefaciens*, ficando garantido que apenas as colónias transformadas crescem nas caixas de Petri que são suplementadas com os dois antibióticos.

O efeito da presença das sequências reguladoras da cassette pE7113-CP no aumento da eficiência de transformação não chegou a ser testado.

A expressão da cassette pE7113-CP foi testada em células de plantas superiores, nomeadamente em plantas de *N. tabacum*, para ser usada posteriormente na transformação de plantas de laranjeira azeda cv. Brazilian. Os resultados obtidos na transformação de *N. tabacum* mostraram que a cassette pE7113-CP pode ser utilizada num processo de transformação genética de *Citrus* spp..

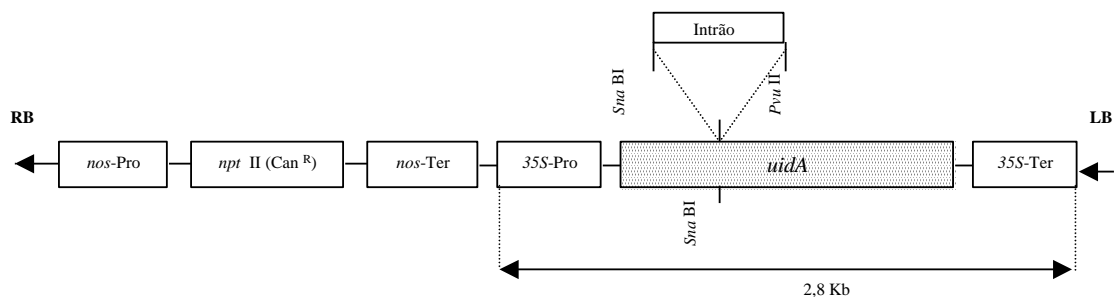
Nos trabalhos subsequentes de transformação genética de laranjeira azeda, além da cassette pE7113-CP, também foi utilizada a cassette p35SGUSINT, largamente testada em tabaco.

# TRANSFORMAÇÃO DE *Citrus aurantium* L. cv. Brazilian MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens*

## 5.1 - INTRODUÇÃO

A transformação genética tem sido implementada nos últimos anos em espécies de plantas lenhosas de interesse agrícola. Dois dos aspectos fulcrais na determinação dos explantes mais adequados à transformação, são a sua competência para a transformação e a sua capacidade de regeneração (Draper *et al.*, 1988). A transformação de plantas do género *Citrus* tem sido largamente explorada nos últimos 10 anos. Existem protocolos de transformação para numerosas espécies de *Citrus*, geralmente baseado no uso de segmentos de entrenós como explantes, nomeadamente laranja doce (Peña *et al.*, 1995a; Bond e Roose, 1998), toranja (*C. paradisi* Macfad.) (Luth e Moore, 1999; Yang *et al.*, 2000; Febres *et al.*, 2003), limeira mexicana (Domínguez *et al.*, 2000; Domínguez *et al.*, 2002b) e citrangeira Carrizo (Moore *et al.*, 1992; Cervera *et al.*, 1998b; La Malfa *et al.*, 2000).

O objectivo do presente estudo foi a transformação genética de laranja azeda cv. Brazilian, com vista à obtenção de formas resistentes ao CTV. Foram testados dois processos de transformação mediados por *Agrobacterium tumefaciens*. Num dos testes foi estudada a transformação de rebentos adventícios obtidos por regeneração *in vitro* a partir de segmentos de entrenós caulinares, com a utilização da cassette p35SGUSINT, que contém o gene *uidA* (Vancanneyt *et al.*, 1990) (Fig. 5.1). A presença de um intrão no gene *uidA* garante que a  $\beta$ -glucuronidase que este gene codifica é expressa somente nas células vegetais transformadas, uma vez que, com algumas excepções, as plantas não expressam esta enzima (Jefferson *et al.*, 1987). Um segundo teste de transformação foi efectuado com sementes com 1, 5 e 7 dias de germinação, usando a cassette pE7113-CP que contém o gene da CP do CTV (ver Fig. 4.2).



**Fig. 5.1** – Esquema do T-DNA do plasmídeo p35SGUSINT. Abreviaturas: *nos-Pro*; promotor do gene da nopalina sintase; *nos-Ter*: sequência de terminação do gene da nopalina sintase; *35S-Pro*: promotor do vírus do mosaico da couve-flor; *35S-Ter*: sequência de terminação do vírus do mosaico da couve-flor; *npt II* (Can<sup>R</sup>), gene que codifica para a neomicina fosfotransferase; *uidA*: gene que codifica para a enzima  $\beta$ -glucuronidase.

De modo a otimizar as condições para a transformação genética de laranjeira azeda, realizaram-se alguns ensaios prévios. Em particular estabeleceu-se um protocolo de regeneração *in vitro* por neoformação adventícia de rebentos utilizando como explantes segmentos de entrenós caulinares. Outros ensaios prévios incluíram a determinação da densidade bacteriana associada à frequência mais elevada de transformação, o estudo do efeito dos antibióticos cefotaxima e canamicina na regeneração dos rebentos adventícios e a avaliação da eficiência de transformação de duas estirpes de *A. tumefaciens*: C58 (nopalina) e EHA105 (L,L-succinamopina).

## 5.2 - ENSAIOS PRÉVIOS

### 5.2.1 - Indução da Formação de Rebentos Adventícios

A constituição do meio de cultura, nomeadamente a composição e a concentração de sais minerais, de vitaminas e de reguladores de crescimento, tem um papel decisivo na indução da formação de rebentos adventícios, assim como as necessidades hormonais, que variam com a espécie de *Citrus*. O papel do regulador de crescimento benziladenina (BA) na neoformação de rebentos adventícios em *Citrus* spp. é crucial, segundo os estudos de Durán-Vila *et al.* (1989).

Foram testados meios de cultura de indução da formação de rebentos adventícios a partir de segmentos de entrenós de laranjeira azeda, previamente estudados por Moore (1986) e Can *et al* (1992), mas não obtivemos sucesso com os mesmos. O meio de cultura foi então otimizado para os explantes com 12 meses. Escolheu-se utilizar segmentos de entrenós como explante, dado que em estudos prévios realizados em citrangeira Carrizo e em limeira mexicana (Moore *et al.*, 1992), se concluiu serem estes explantes mais produtivos de rebentos adventícios que os explantes foliares.

### 5.2.1.1 - Avaliação da concentração hormonal mais adequada à neoformação de rebentos adventícios

As gemas e os rebentos adventícios foram induzidos a partir de segmentos de entrenós, no meio de cultura D, suplementado com diferentes combinações dos reguladores de crescimento BA e ácido naftalenoacético (NAA).

Os dados correspondentes aos resultados obtidos estão contidos na Tabela 5.1 e apresentados nas Figuras 5.1 e 5.2. Os rebentos adventícios começaram a aparecer após 18 dias de cultura ( Est. II-A) e muitos atingiram um comprimento superior a 1 mm após 30 a 50 dias de cultura (Estampa II-D). No meio de cultura controlo D1, sem suplementos hormonais, foi também observado a formação e o desenvolvimento de rebentos adventícios (Est. II-C). O meio de cultura D2 que contém unicamente como suplemento hormonal  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  da citocinina BA, foi o melhor meio para a formação de gemas, de rebentos e seu alongamento (Fig. 5.2). Dos explantes inoculados neste meio, 93% apresentaram gemas/rebentos e obteve-se  $6,7 \pm 1,1$  rebentos por explante (Est. II-D). Concentrações mais elevadas de BA foram inibitórias para a formação e desenvolvimento dos rebentos. A presença da auxina NAA no meio de cultura parece também inibir a neoformação de rebentos. A alongação dos rebentos adventícios foi superior no meio de cultura D2, seguido do meio de cultura D5 (Fig. 5.3).

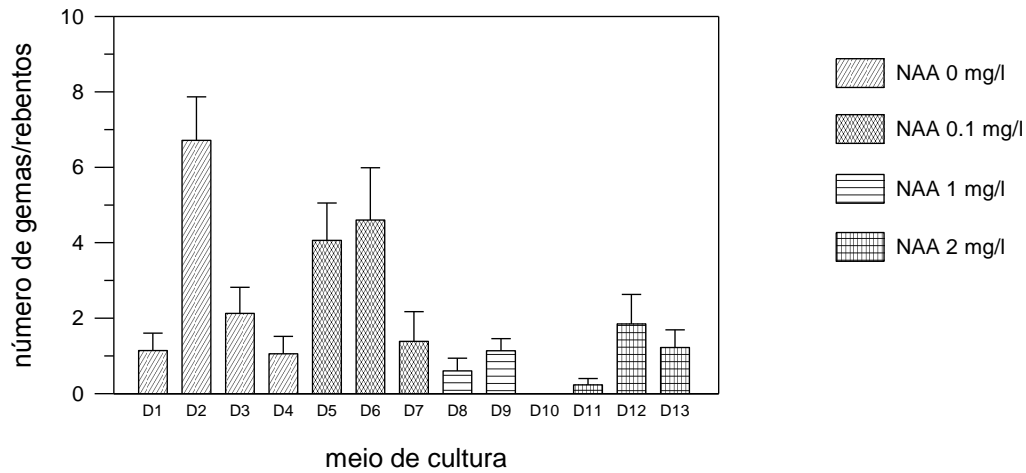
A formação de *callus* de aspecto compacto foi observada sobre a superfície de corte da maioria dos segmentos de entrenós, associado geralmente aos meios de cultura que contêm NAA (Est. II-A). No meio de cultura D1 (controlo) e D2, quando observada, a formação de *callus* foi sempre muito reduzida (Est. II-B).

A frequência de explantes que se perderam por necrose ou infecção foi de 16%. A necrose afectou maioritariamente os segmentos de entrenós de menor diâmetro provenientes da região junto ao ápice caulinar e deveu-se ao processo de desinfecção efectuado.

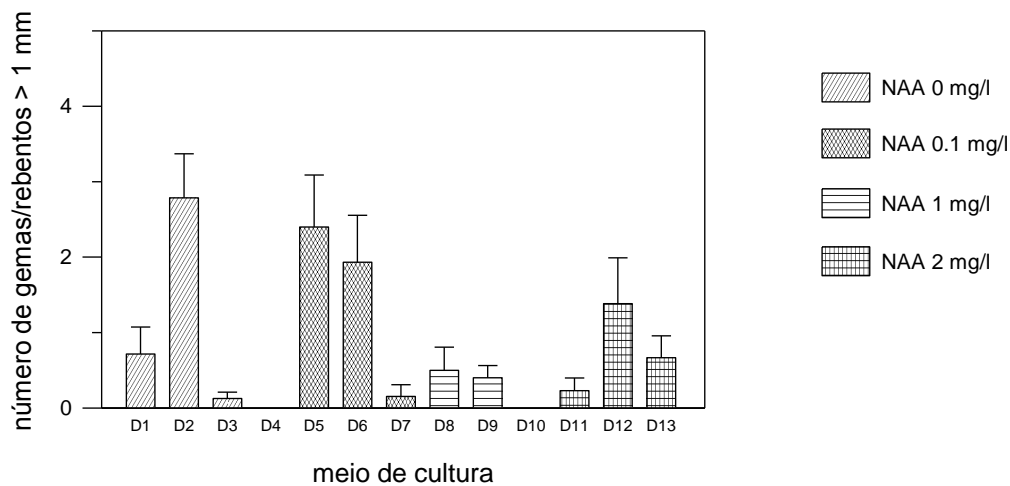
**Tabela 5.1** - Efeito de diferentes combinações de BA e de NAA na indução e alongação dos rebentos adventícios após 10 semanas em cultura.

Meio de cultura	Concentração BA $\text{mg.l}^{-1}$	Concentração NAA $\text{mg.l}^{-1}$	Nº de explantes	Nº de gemas/rebentos formados	Frequência de explantes com gemas/rebentos (%)	Nº de rebentos com comprimento igual ou superior a 1 mm	Frequência de explantes com rebentos com comprimento igual ou superior a 1 mm (%)
D1	-	-	7	8	57	5	43
D2	1,0	-	14	94	93	39	93
D3	2,0	-	16	34	56	2	13
D4	3,0	-	18	19	28	0	0
D5	1,0	0,1	16	65	75	36	69
D6	2,0	0,1	15	69	60	29	53
D7	3,0	0,1	13	18	23	2	8
D8	1,0	1,0	10	6	30	5	30
D9	2,0	1,0	15	17	53	6	33
D10	3,0	1,0	6	n.d.*	n.d.*	n.d.*	n.d.*
D11	1,0	2,0	13	3	15	3	15
D12	2,0	2,0	13	24	54	18	54
D13	3,0	2,0	9	11	56	6	44

\* n.d. = não determinado devido a múltiplas infecções.



**Fig. 5.2** - Efeito de várias combinações de BA e de NAA na indução de rebentos adventícios. As barras representam o número de rebentos totais formados por segmento de entrenó inoculado. As linhas verticais acima das barras representam o erro padrão.

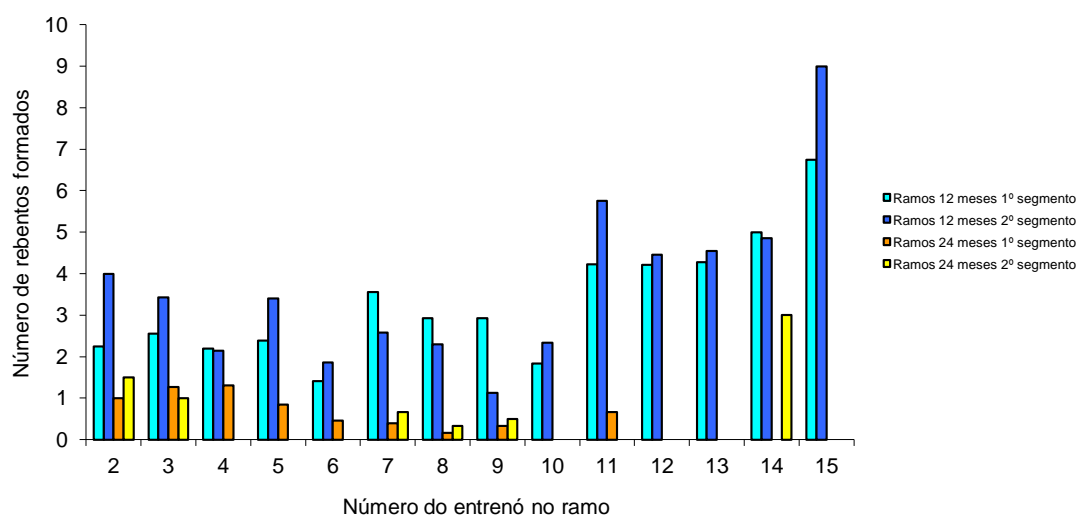


**Fig. 5.3** - Efeito da combinação de diferentes concentrações de BA e NAA no alongamento dos rebentos adventícios. As barras representam o número de rebentos com mais de 1 mm de comprimento, por segmento de entrenó inoculado. As linhas verticais acima das barras representam o erro padrão.

### 5.2.1.2 - Análise da capacidade organogénica dos segmentos de entrenós em função da posição no ramo e da idade da planta

A capacidade organogénica dos segmentos de entrenós de ramos jovens de plantas com cerca de 12 meses e de 24 meses, foi avaliada segundo a sua posição no ramo. Na preparação dos explantes, procedeu-se da seguinte forma: a) cada entrenó foi numerado por ordem crescente do ápice à base; b) de cada entrenó foram retirados dois segmentos de 1 cm imediatamente abaixo do nó. Os explantes, após cortados, foram imediatamente colocados no meio de cultura D5.

Os resultados obtidos da neoformação de rebentos adventícios em explantes do 2º ao 15º entrenó, foram quantificados de acordo com o descrito em 2.15.3 e estão apresentados na Figura 5.4. A formação de gemas e de rebentos foi maior nos explantes provenientes de plantas de 12 meses e muito reduzida nos explantes provenientes de plantas de 24 meses. Não foram notadas diferenças significativas entre o 1º e 2º segmento de cada nó na neoformação de rebentos adventícios. Por outro lado, a posição do entrenó no ramo revelou-se um factor importante, uma vez que nos segmentos de entrenós basais se formou maior número de gemas e de rebentos adventícios do que nos apicais.



**Fig. 5.4** - Formação de gemas/rebentos adventícios em explantes provenientes de plantas com cerca de 12 e de 24 meses. As barras indicam o número de gemas/rebentos formados por explante inoculado. Foram avaliados os entrenós número 2 até ao número 15. Em cada entrenó foi avaliado o 1º e o 2º segmento.

### 5.2.1.3 - Enraizamento dos rebentos adventícios

O enraizamento de rebentos adventícios foi testado no meio de cultura D (Anexo I, Tabela 2) suplementado com diferentes concentrações do regulador de crescimento NAA. Os meios de cultura testados foram designados de R1 a R6 e estão descritos na Tabela 5.2. Na mesma Tabela são apresentados os resultados obtidos.

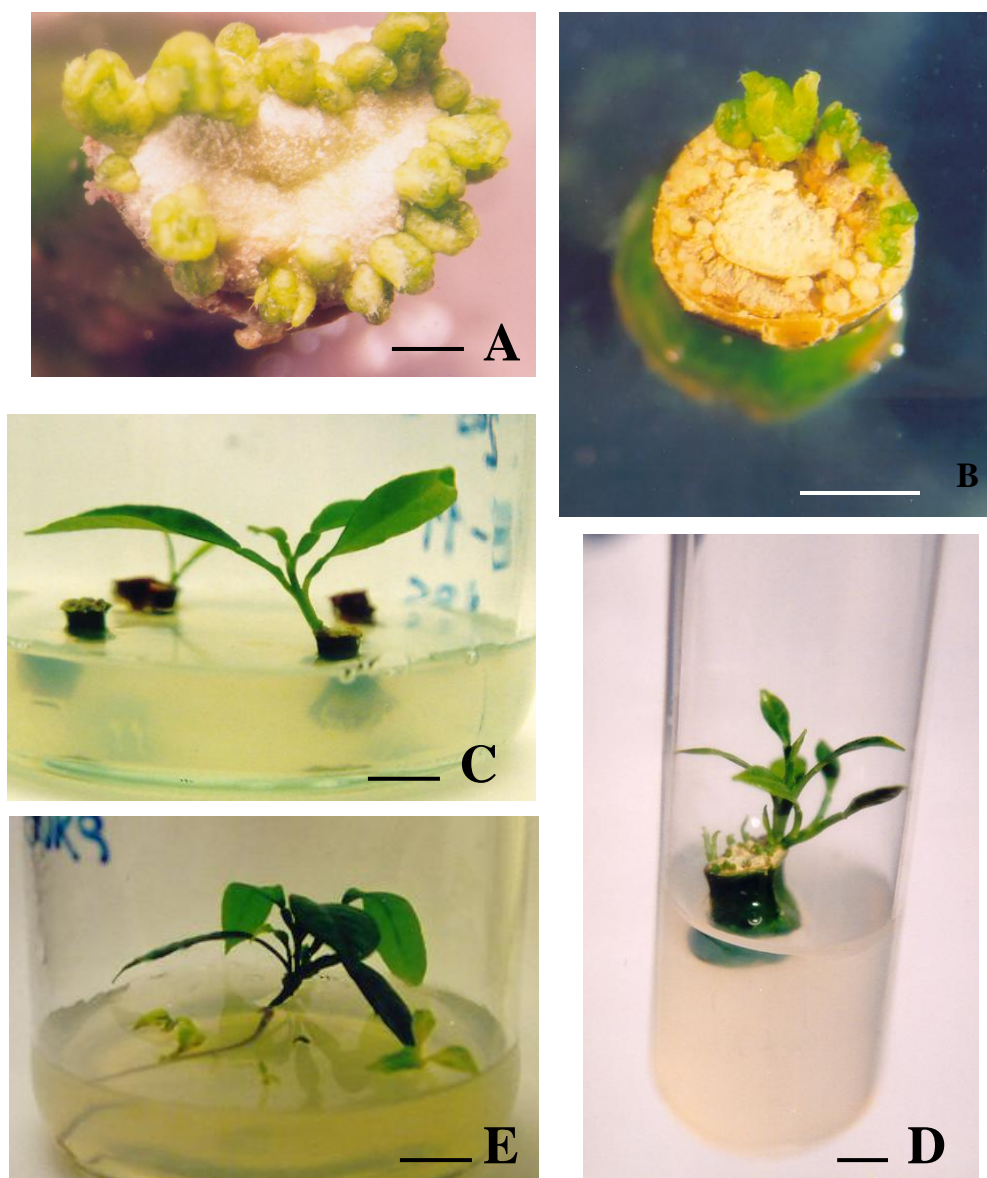
Apesar de ter sido conseguido o enraizamento dos rebentos adventícios em dois dos 6 meios de cultura testados (Est. II-E), a frequência de enraizamento, calculada pela razão entre o número de rebentos com raiz e o número de rebentos inoculados no meio de cultura, foi muito baixa atingindo um máximo de 2,9% no meio R2.

**Tabela 5.2.** Resultados obtidos nos estudos de enraizamento dos rebentos adventícios, em diferentes meios de cultura.

Designação dos meios de enraizamento	NAA (mg.l <sup>-1</sup> )	Meio D	Meio D com ½ Macro*	Meio D com ½ Macro* + 30 g.l <sup>-1</sup> sacarose	Nº rebentos inoculados no meio	Frequência de enraizamento (%)**
R1	-	+	-	-	41	0
R2	0,1	+	-	-	101	2,9
R3	-	-	+	-	50	2
R4	0,1	-	+	-	57	0
R5	1	-	+	-	36	0
R6	-	-	-	+	51	2

\* = macronutrientes do meio de cultura D

\*\* = razão entre o número de rebentos com raiz e o número total de rebentos inoculados nos meios de enraizamento.



**ESTAMPA II.** Formação de rebentos adventícios em *Citrus aurantium* L. cv. Brazilian e posterior enraizamento. **(A)** a **(D)**: Organogênese de rebentos adventícios na superfície de corte de segmentos de entrenós de plantas com cerca de 12 meses. **(A)**: Detalhe dos rebentos adventícios formados no meio de cultura D5, com a presença de *callus*. **(B)**: Detalhe dos rebentos adventícios formados no meio de cultura D2, onde não é visível a formação de *callus*. **(C)**: Regeneração de rebentos adventícios no meio de cultura D1, sem reguladores de crescimento. **(D)**: Regeneração de rebentos adventícios no meio de cultura D2. **(E)**: Rebento adventício enraizado no meio de cultura R2. Barras das figuras: em **(A)** = 0,1 cm; em **(B)** = 0,2 cm; em **(C)** = 0,8 cm; em **(D)** = 0,5 cm; em **(E)** = 1 cm.

#### 5.2.1.4 – Discussão

A neoformação de rebentos adventícios depende da escolha apropriada do explante e dos reguladores de crescimento presentes no meio de cultura. Existem diversos estudos de propagação por formação de rebentos adventícios a partir de segmentos de entrenós em *Citrus* spp. (Kitto e Young, 1981; Barlass e Skene, 1982, Moore, 1986; Goh *et al.*, 1995; Ghorbel *et al.*, 1998). Foi já referido também a indução da neoformação de rebentos adventícios em discos foliares (Moore *et al.*, 1992; Goh *et al.*, 1995), em fragmentos de cotilédone (Goh *et al.*, 1995), em raízes (Duran-Vila *et al.*, 1989; Goh *et al.*, 1995) e nos nós dos ramos (Barlass e Skene, 1982). Estes últimos estão descritos como os únicos que formaram maior número de rebentos adventícios que os segmentos de entrenós.

Estudos prévios de segmentos de entrenós colocados no meio de cultura em posição horizontal, mostraram que, tal como observado por Bordón *et al.* (2000), a formação de rebentos adventícios era menor, razão porque os explantes foram colocados em posição vertical.

A capacidade organogénica diminui geralmente com a idade do explante (Draper *et al.*, 1988). Na maioria dos estudos de neoformação de rebentos são usados explantes de epicótilos ou entrenós, consoante a idade do material vegetal, que pode ter entre duas semanas a 2 meses (García-Luís *et al.*, 1999) e que é muito novo quando comparado com o que foi usado no presente trabalho. Também a comparação da formação de rebentos adventícios a partir de segmentos de entrenós retirados de plantas com cerca de 12 e de 24 meses, mostrou que a resposta dos explantes mais velhos apresentava uma diminuição nítida da capacidade organogénica (Fig. 5.4). É notório, porém, que o número de rebentos formados por explante inoculado, obtidos para explantes de 12 meses ( $6,7 \pm 1,1$ ), é nitidamente superior ao valor obtido em plântulas de laranja azeda com 6 meses por Duran-Vila *et al.* (1989) ( $2,2 \pm 0,7$ ) ou ao valor obtido em plântulas com 2 a 4 meses por Moore (1986) ( $3 \pm 2$ ). A elevada resposta organogénica dos segmentos de entrenós pode ser atribuída ao protocolo usado e/ou ao genótipo da planta (Bordón *et al.*, 2000).

García-Luis *et al.* (1999) mostraram que a regeneração directa em citranjeira Carrizo diminui à medida que os segmentos de entrenó cortados se distanciam em relação ao nó. No estudo que efectuámos, não foi observado diferenças significativas entre a 1ª e a 2ª porção do entrenó. Na análise da capacidade organogénica dos segmentos de entrenós quanto à posição no ramo, seria de esperar um gradiente da capacidade regenerativa, devido à interferência das hormonas endógenas. Observou-se que os segmentos de entrenós basais do ramo apresentaram um maior número de rebentos formados por explante inoculado (Fig. 5.4).

O efeito da citocinina BA na neoformação de rebentos tem sido estudada na maioria das espécies de *Citrus* [citrangueira Carrizo; *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.; tangerineira, *C. reshni* Hort. ex Tanaka; *C. limonia* Osbeck; laranja doce, *C. sinensis* (L.) Osbeck (Barlass e Skene, 1982); toranjeira, *C. maxima* (Burm.) Merr. (Goh *et al.*, 1995); toranjeira, *C. paradisi* Macfad. e *C. macrophylla* Wester (Ghorbel *et al.*, 1998)]. Também em laranja azeda, a citocinina BA foi estudada na neoformação de rebentos (Kitto e Young, 1981; Moore, 1986; Gutiérrez *et al.*, 1997; Ghorbel *et al.*, 2000), assim como a citocinina 2iP, com uma percentagem de formação de rebentos semelhante (Kitto e Young, 1981). O efeito isolado ou em conjunto da citocinina BA e da auxina NAA, na formação de rebentos adventícios de laranja azeda e de outras espécies de *Citrus*, foi pela primeira vez estudada por Moore (1986), que refere o efeito inibitório do NAA quando está presente em concentrações elevadas. No entanto, Bordón *et al.* (2000) descrevem a acção indutora do NAA na formação de rebentos adventícios em laranja azeda. No presente estudo, a acção inibitória do NAA fez-se sentir quando foram usadas concentrações superiores a 0,1 mg.l<sup>-1</sup>. Também a hormona BA inibiu a neoformação de rebentos para concentrações superiores a 1 mg.l<sup>-1</sup>, mas quando conjugado com NAA, esse efeito foi menos acentuado, para a maioria das combinações hormonais testadas (Tabela 5.1). Verificou-se que o meio de cultura D2 com 1mg.l<sup>-1</sup> de BA foi o que apresentou melhores resultados na formação e desenvolvimento de gemas e de rebentos adventícios. O meio de cultura D5 apresentou também bons resultados no desenvolvimento dos rebentos (Fig. 5.3). Obteve-se uma taxa de 93% de segmentos de entrenós que formaram rebentos adventícios, bem acima da taxa de 60%, referida em laranja azeda por Ghorbel *et al.* (1998), ou de 39%, obtida por Moore (1986). O número de rebentos formados por explante foi de 6,7 ± 1,1 (Tabela 5.1), valor muito superior ao obtido por Duran-Vila *et al.* (1989) (2,2 ± 0,7), ou por Moore (1986) (3 ± 2).

García-Luis *et al.* (1999) estudaram o processo morfogénico dos rebentos adventícios a nível histológico, concluindo que o câmbio vascular está na origem da formação dos rebentos em citrangeira Troyer, que apresentam uma disposição anelar. Também no presente estudo foi observada uma disposição anelar das gemas e dos rebentos que surgiram em cada explante (Est. II-A e B). Uma vez que não foram efectuados estudos histológicos, não é possível inferir sobre a origem dos rebentos adventícios. No entanto, a sua disposição faz crer que se está perante um fenómeno de organogénese directa, mas o envolvimento de uma fase intermédia de formação de *callus* não pode ser colocada de lado, mesmo nos casos em que este não é observado na superfície de corte do segmento de entrenó.

A dominância apical ocorre quando um único rebento de um explante se desenvolve depressa inibindo o desenvolvimento dos outros rebentos, de acordo com Barlass e Skene (1982). Neste estudo, observou-se a formação de 10 ou mais rebentos adventícios com um comprimento superior a 1 mm em muitos segmentos de entrenós

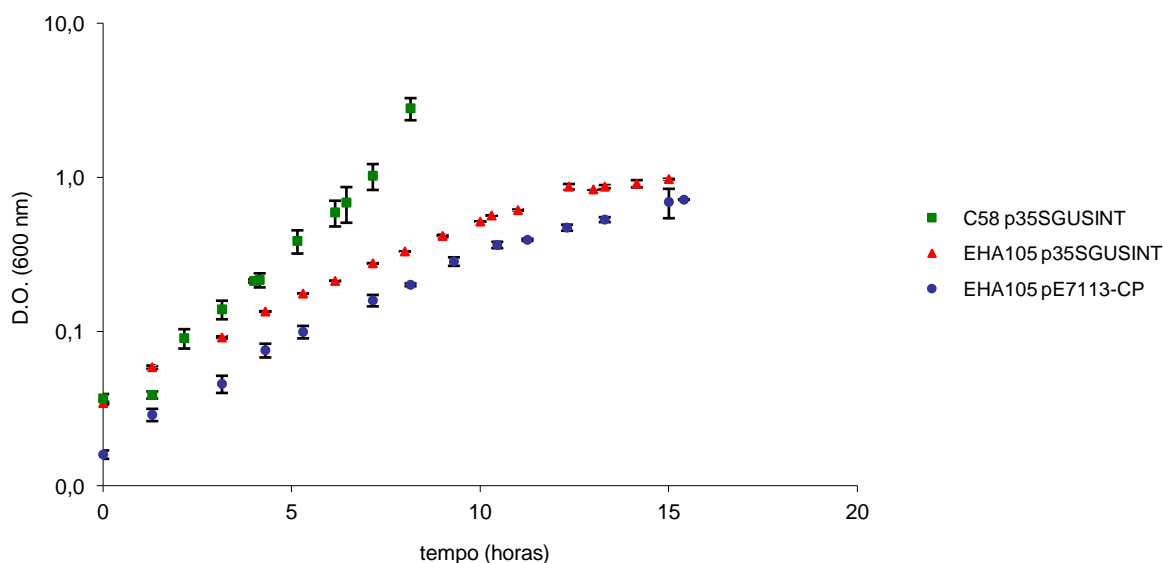
(Est. II-D), o que contradiz os estudos referidos acima. O reduzido comprimento do rebento adventício, caso seja inferior a 1 mm pode aumentar a taxa de insucesso, quer na microenxertia (La Malfa *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000), quer no enraizamento (Duran-Vila *et al.*, 1989). No meio de cultura D2, a formação de rebentos com um comprimento superior a 1 mm foi obtida numa frequência de 93%, um valor relativamente elevado necessário para garantir o posterior desenvolvimento dos rebentos adventícios. No entanto, embora em menor número, os rebentos provenientes do meio de cultura D5 apresentavam maior vigor.

O enraizamento mediado pela auxina NAA a concentrações reduzidas foi obtido em várias espécies de *Citrus* [(citrânjeira Carrizo, laranjeira doce, *C. medica* (L.), limeira mexicana (Kitto e Young, 1981); citrânjeira Carrizo (Barlass e Skene, 1982); laranjeira doce, limeira mexicana, *C. medica* (L.) (Duran-Vila *et al.*, 1989) e toranjeira (*C. maxima* (Burm.) Merr. (Goh *et al.*, 1995); *C. macrophylla* Wester, (Ghorbel *et al.*, 1998)]. Ghorbel *et al.* (1998) testaram um leque de concentrações de 0 a 30 mg.l<sup>-1</sup> da auxina NAA na formação de raízes em laranjeira azeda a partir de rebentos adventícios com 0,5 cm, sem obtenção de resultados, o que leva a crer que esta espécie é recalcitrante à formação de raízes *in vitro*. No presente estudo, os resultados de frequência de enraizamento dos rebentos adventícios de laranjeira azeda foram de 2,9% (Tabela 5.2). A microenxertia, processo desenvolvido por Navarro (1981), constitui assim o processo alternativo ao enraizamento para permitir o posterior crescimento dos rebentos adventícios.

### **5.2.2 - Curva de crescimento da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* estirpes EHA 105 e C58**

A determinação da influência do estágio de crescimento da cultura de *Agrobacterium* na virulência e, conseqüentemente, na capacidade de transformação, conduziu ao estudo da curva de crescimento de cada uma das agrobactérias utilizadas nos processos de transformação e à determinação da densidade bacteriana, para valores de densidade óptica (D.O.)<sub>(600 nm)</sub> de 0,2, 0,4 e 0,6.

Determinou-se a curva de crescimento das estirpes EHA 105 pE7113-CP, EHA 105 p35SGUSINT e C58 p35SGUSINT, que são apresentadas na Fig. 5.5. Para o cálculo do valor médio de densidade óptica, foram feitas 3 réplicas da cultura de cada estirpe bacteriana e realizaram-se 3 leituras de cada cultura.



**Fig. 5.5** – Curvas de crescimento das estirpes EHA105 p35SGUSINT, EHA105 pE7113-CP e C58 p35SGUSINT, construídas com os valores médios de leitura da densidade óptica, acompanhados do valor respectivo de desvio padrão.

O tempo de duplicação ( $T_d$ ) de cada uma das culturas bacterianas foi calculado pela fórmula  $\ln 2/\mu$ , onde  $\mu$  é a taxa específica de crescimento, obtida pelo declive da curva de crescimento de cada uma das estirpes, na fase exponencial (Kock, 1994). As curvas de crescimento das 3 agrobactérias revelam que o tempo de duplicação, que está descrito na Tabela 5.3, não é equivalente, sendo inferior o da estirpe C58 p35SGUSINT pelo facto de crescer mais rapidamente. A estirpe EHA105 p35SGUSINT apresenta tempos de duplicação diferentes consoante o plasmídeo que transporta, sendo maior o da estirpe EHA105 pE7113-CP.

**Tabela 5.3** - Tempo de duplicação (h) de cada uma das estirpes bacterianas.

Estirpe bacteriana	$T_d$ (h)
EHA105 p35SGUSINT	2,6
EHA105 pE7113-CP	2,8
C58 p35SGUSINT	1,3

A densidade bacteriana, calculada através do número de unidades formadoras de colónias (ufc) viáveis, foi determinada para as D.O. ( $_{600\text{ nm}}$ ) de 0,2; 0,4 e 0,6, pelo método da gota (Barbosa *et al.*, 1995). Foram feitas 3 réplicas de cada sementeira para o cálculo do valor médio de ufc. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 5.4.

O número de ufc diverge para as três agrobactérias. A bactéria C58 apresenta 45,5 vezes maior número de células viáveis à D.O. ( $_{600\text{ nm}}$ ) de 0,6 do que a bactéria EHA 105 pE7113-CP.

**Tabela 5.4** – Correspondência entre a viabilidade e os valores de D.O. ( $_{600\text{ nm}}$ ) determinados para as 3 estirpes. O resultado é apresentado na forma do logaritmo natural do número das unidades formadoras de colónias (ufc) por  $\text{ml}^{-1}$ . Entre parêntesis encontra-se o valor real da D.O. ( $_{600\text{ nm}}$ ).

Estirpe bacteriana	D.O.		
	0,2	0,4	0,6
EHA105 p35SGUSINT	$7,4 \pm 0,27$ (0,214)	$7,5 \pm 0,21$ (0,414)	$7,7 \pm 0,21$ (0,610)
EHA105 pE7113-CP	$7,1 \pm 0,21$ (0,209)	$7,4 \pm 0,24$ (0,409)	$7,3 \pm 0,16$ (0,602)
C58 p35SGUSINT	$8,6 \pm 0,16$ (0,210)	$8,7 \pm 0,11$ (0,424)	$8,9 \pm 0,11$ (0,654)

### 5.2.2.1 – Discussão

A concentração da agrobactéria no inóculo pode influenciar a eficiência de transformação. Uma densidade elevada de agrobactérias pode criar uma situação de “stress” à planta e afectar o seu potencial de regeneração, enquanto densidades mais baixas podem reduzir a frequência de transformação (Costa *et al.*, 2002). Habitualmente na descrição dos processos de transformação de citrinos não é precisado a densidade bacteriana usada. A densidade da cultura de *Agrobacterium* é geralmente ajustada para valores de D.O. ( $_{600\text{ nm}}$ ) a 0,6 ou é ressuspensa e ajustada a um valor aproximado de  $5 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$  de unidades formadoras de colónias (ufc) (Kaneyoshi *et al.*, 1994; Bond e Roose, 1998; Luth e Moore, 1999; Yang *et al.*, 2000). Outros autores referem o uso de uma diluição da agrobactéria à densidade de  $4 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$  de ufc, representando um inóculo 12,5 vezes menor que  $5 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ , no processo de transformação (Peña *et al.*, 1995a; Peña *et al.*, 1997; Cervera *et al.*, 1998b; Domínguez *et al.*, 2000; Ghorbel *et al.*, 2000; La Malfa *et al.*, 2000). Esta prática comum de diluir a cultura de *Agrobacterium*, sem o prévio conhecimento do seu estágio de crescimento, a um determinado valor de D.O. imediatamente antes de ser usada no processo infeccioso, não garante a presença de agrobactérias em divisão, que é uma condição essencial para a indução de transformação (Moore e Cooksey, 1981). Por outro lado, uma estirpe apresenta tempos de duplicação diferentes quando transporta plasmídios diferentes, de acordo com os resultados da Tabela 5.3 e com os resultados da curva de crescimento obtida para as duas estirpes EHA105 (Fig. 5.5).

Nos testes de transformação que se descrevem na secção 5.3, foram efectuados ensaios com as estirpes EHA 105 p35SGUSINT e C58 p35SGUSINT à D.O.<sub>(600 nm)</sub> de 0,2, 0,4 e 0,6, para testar o efeito da densidade óptica no processo de transformação.

### 5.2.3 - Tolerância aos antibióticos canamicina e cefotaxima

Estudou-se o efeito dos antibióticos canamicina (antibiótico de selecção de rebentos transformados) e cefotaxima (composto bacteriostático usado para limitar o crescimento de bactérias gram negativas) na regeneração de rebentos adventícios de laranjeira azeda cv. Brazilian e as concentrações mais adequadas à selecção de transformantes. Os segmentos de entrenós foram desinfectados e colocados no meio de cultura D5.

Os resultados obtidos neste estudo encontram-se sumarizados na Tabela 5.5. A presença de canamicina no meio de cultura actua como um inibidor da formação de rebentos adventícios, uma vez que há uma redução de  $3,6 \pm 0,74$  rebentos formados no meio controlo, para  $0,3 \pm 0,13$  rebentos formados no meio com  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  de canamicina. O aumento da concentração de canamicina de  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  para  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  reduz significativamente de 19% para 4% a formação de rebentos adventícios em laranjeira azeda. Quando os valores de canamicina são iguais ou superiores a  $150 \text{ mg.l}^{-1}$  no meio de cultura, o efeito letal é de 100%.

**Tabela 5.5** - Efeito dos antibióticos cefotaxima (Cef) e canamicina (Can) na formação e desenvolvimento dos rebentos adventícios, no meio D5, após 5 semanas em cultura.

Meios (valores em $\text{mg.l}^{-1}$ )	Nº de explantes	Frequência de explantes com rebentos (%)	Rebentos formados por explante inoculado (média $\pm$ d.p.)	Rebentos de comprimento igual ou acima a 1mm por explante inoculado (média $\pm$ d.p.)
Controlo	25	60	$3,6 \pm 0,74$	$0,8 \pm 0,26$
50 Can	27	19	$0,3 \pm 0,13$	$0,1 \pm 0,06$
100 Can	25	4	$0,04 \pm 0,04$	$0,04 \pm 0,04$
150 Can	23	0	0	0
200 Can	29	0	0	0
250 Cef	24	75	$7,3 \pm 1,10$	$4,5 \pm 0,81$
500 Cef	23	74	$2,7 \pm 0,68$	$1,7 \pm 0,60$
750 Cef	28	75	$5 \pm 0,87$	$3,1 \pm 0,62$
900 Cef	35	60	$3,6 \pm 0,77$	$2,9 \pm 0,68$
500 Cef + 100 Can	27	15	$0,3 \pm 0,17$	0

A presença de cefotaxima à concentração de  $250 \text{ mg.l}^{-1}$  apresenta um efeito indutor da formação de rebentos adventícios, uma vez que duplicou o número de rebentos formados, em comparação com o meio controlo. A cefotaxima também induz o

seu desenvolvimento, com a formação de 5 vezes mais rebentos com comprimento acima de 1 mm, em comparação com o meio controlo.

Ao efeito indutor da cefotaxima sobrepõe-se o efeito inibitório da canamicina quando os dois antibióticos estão presentes simultaneamente no meio de cultura, como foi verificado na combinação efectuada dos dois antibióticos (100 mg.l<sup>-1</sup> de canamicina e 500 mg.l<sup>-1</sup> de cefotaxima), com a diminuição da neoformação de rebentos.

### 2.2.3.1 – Discussão

O antibiótico usado como agente de selecção e a concentração usada têm um papel importante na identificação das plantas transformadas e na inibição eficiente do crescimento de rebentos não transformados (Dong e McHughen, 1993a). Alguns antibióticos de selecção também inactivados pela acção da neomicina fosfotransferase, embora com menor eficiência, tais como a geneticina (Peña *et al.*, 1997) e a higromicina (Costa *et al.*, 2002), têm constituído uma alternativa ao uso da canamicina na transformação de espécies de *Citrus*, embora sem resultados notórios. No estudo da aplicação de um antibiótico de selecção, deve ser encontrada uma concentração que seja letal, sem inibir a regeneração dos próprios rebentos transformados. O uso da canamicina à concentração de 100 mg.l<sup>-1</sup> tem sido usada na maioria dos protocolos de transformação de outros citrinos, entre os quais a limeira mexicana (Moore *et al.*, 1992) e a citrangeira Carrizo (Cervera *et al.*, 1998b). No entanto, a esta concentração, Cervera *et al.* (1998b) referem a ocorrência de rebentos que crescem no meio de cultura com antibiótico de selecção, mas que não se encontram transformados. Piestun *et al.* (2000) referem que a selecção de transformantes pode ser melhorada através da utilização de elevadas concentrações de canamicina (200-300 µg.l<sup>-1</sup>) desde as fases iniciais de transformação, e da colocação do explante, no meio de cultura, na posição horizontal. Outra forma de eliminar os rebentos não transformados que crescem no meio de cultura com antibiótico de selecção seria uma exposição prolongada à canamicina por cerca de 5 a 6 meses (Peña *et al.*, 1995b). Nos estudos que foram efectuados, a exposição prolongada à canamicina não foi viável, uma vez que os rebentos vitrificavam ou apresentavam uma necrose progressiva após cerca de 4 meses de cultura *in vitro*. Gutiérrez *et al.* (1997) e Ghorbel *et al.* (2000) referem que a concentração de 100 mg.l<sup>-1</sup> de canamicina é a mais correcta a aplicar em laranjeira azeda. No estudo que se efectuou com diferentes concentrações do antibiótico canamicina, foi verificado um efeito letal de 100% a partir de 150 mg.l<sup>-1</sup> (Tabela 5.5). Para evitar uma pressão de selecção muito forte, que pudesse afectar a regeneração dos próprios rebentos transformados, foi escolhido usar a concentração de 100 mg.l<sup>-1</sup> nos processos de transformação, à qual está associado um efeito letal de 96%.

O antibiótico cefotaxima teve um efeito indutor na formação de rebentos adventícios, tal como foi referido por Hassan *et al.* (1993). A acção conjunta dos antibióticos canamicina e cefotaxima à concentração de 100 mg.l<sup>-1</sup> e de 500 mg.l<sup>-1</sup>, respectivamente, favoreceu o crescimento de rebentos adventícios em cerca de 15%. Este resultado indica que pode haver desenvolvimento de rebentos não transformados no meio de cultura com antibiótico de selecção.

### **5.3 - ESTUDOS DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA**

#### **5.3.1 - Transformação genética de segmentos de entrenós**

Na transformação genética de segmentos de entrenós foi usado o meio de cultura D5, previamente testado nos ensaios de neoformação de rebentos adventícios. Os segmentos de entrenós, extraídos de ramos novos de plantas com cerca de 12 meses, foram desinfectados e colocados no meio de cultura na posição vertical. A transformação genética foi testada com as estirpes C58 p35SGUSINT e EHA105 p35SGUSINT à D.O.<sub>(600 nm)</sub> de 0,2, 0,4 e 0,6. Foram também testados diferentes tempos de co-cultura (1, 2 e 3 dias) na transformação com a estirpe EHA105 p35SGUSINT.

Os rebentos adventícios surgiram na superfície dos explantes ao fim de 3 semanas, com formação de tecido caloso em toda a superfície de corte, sendo este sempre em pequena quantidade, como é visível na Estampa III-B.

Verificou-se que 22,6% de explantes se perderam por necrose ou por infecção. A infecção verificou-se em 4% dos explantes e deveu-se, na maioria dos casos, ao crescimento excessivo da agrobactéria. A necrose, que foi observada em 18,6% dos explantes, deveu-se ao processo de desinfecção efectuado e afectou principalmente os segmentos de entrenós provenientes da região apical caulinar.

##### **5.3.1.1 - Análise da eficiência de transformação**

Os resultados da formação de rebentos adventícios e da transformação pelas estirpes EHA105 e C58, transportando o mesmo plasmídeo p35SGUSINT, estão descritos na Tabela 5.6 e são apresentados na Figura 5.6. No meio controlo D5 obtivemos o valor de 3,4 rebentos por explante inoculado, enquanto no meio controlo sem reguladores de crescimento, o número de rebentos formados foi nitidamente menor (0,39). O efeito inibitório da canamicina foi visível pela diminuição da frequência de formação de rebentos no meio de cultura D5 com canamicina (56%), por comparação

com o meio D5 controlo (73%). Alguns dos rebentos não transformados que cresceram na presença de canamicina apresentaram uma coloração esbranquiçada (Est. III-C).

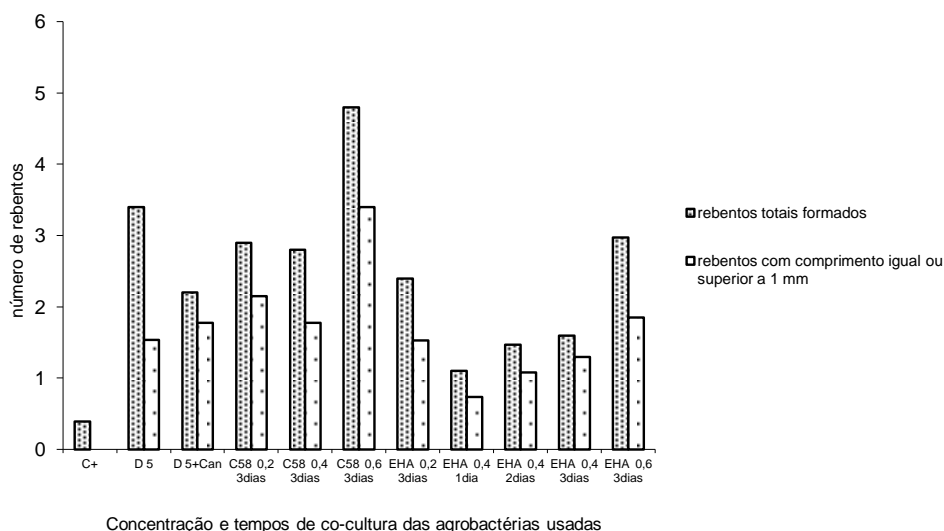
**Tabela 5.6** – Formação de rebentos adventícios e transformação pelas estirpes EHA105 e C58 transportando o mesmo plasmídeo p35SGUSINT.

Meios	Tempo de co-cultura (dias)	Nº explantes inoculados	Frequência de segmentos de entrenós com rebentos (%)	Nº de rebentos/nº total de explantes	Nº de rebentos avaliados na detecção da $\beta$ -glucuronidase	Nº de rebentos positivos à detecção da $\beta$ -glucuronidase
Meio D5 sem reguladores de crescimento	-	18	11	0,39	-	-
D5 (controlo)	-	26	73	3,4	-	-
D5+canamicina	-	18	56	2,2	-	-
C58 D.O. 0.2*	3	41	75	2,9	18	0
C58 D.O. 0.4*	3	41	73	2,8	27	0
C58 D.O. 0.6*	3	48	46	2,6	38	3
EHA105 D.O. 0.2*	3	38	58	2,4	19	0
EHA105 D.O. 0.4*	1	34	32	1,1	3	0
EHA105 D.O. 0.4*	2	60	53	1,47	28	0
EHA105 D.O. 0.4*	3	83	49	1,46	28	0
EHA105 D.O. 0.6*	3	39	80	2,97	30	2

\* = valores de D.O. determinados para  $\lambda = 600 \text{ nm}$

O número de rebentos formados quando os segmentos de entrenós foram infectados com uma cultura de bactéria à D.O.  $_{(600 \text{ nm})}$  de 0,4 é ligeiramente menor do que foi obtido com culturas à D.O.  $_{(600 \text{ nm})}$  de 0,2 ou 0,6. À D.O.  $_{(600 \text{ nm})}$  de 0,6 obteve-se o maior número de rebentos adventícios formados, para ambas as estirpes estudadas.

Foi obtido o valor médio de 65% de explantes a formar rebentos quando a transformação foi mediada pela estirpe C58 p35SGUSINT, e de 59% quando foi usada a estirpe EHA105 p35SGUSINT com tempo de co-cultura de 3 dias. Neste estudo foram obtidos 5 rebentos adventícios que reagiram positivamente à reacção histoquímica de detecção da  $\beta$ -glucuronidase. Dois dos rebentos resultaram da transformação mediada pela estirpe EHA105 p35SGUSINT (plantas 45 e 171) e os outros três resultaram da transformação mediada pela estirpe C58 p35SGUSINT (plantas T1B, 69 e 166). A razão entre o número de rebentos transformados e o número de segmentos de entrenós inoculados foi de 6,3 % na transformação mediada pela estirpe C58 p35SGUSINT e de 5,1 % na transformação mediada pela estirpe EHA105 p35SGUSINT. O número de rebentos não transformados que cresceram no meio de cultura com antibiótico de selecção foi de 96%. Estes resultados foram obtidos para a D.O.  $_{(600 \text{ nm})}$  de 0,6. A esta D.O. a cultura bacteriana encontra-se no início da fase estacionária para ambas as estirpes (Fig. 5.5).



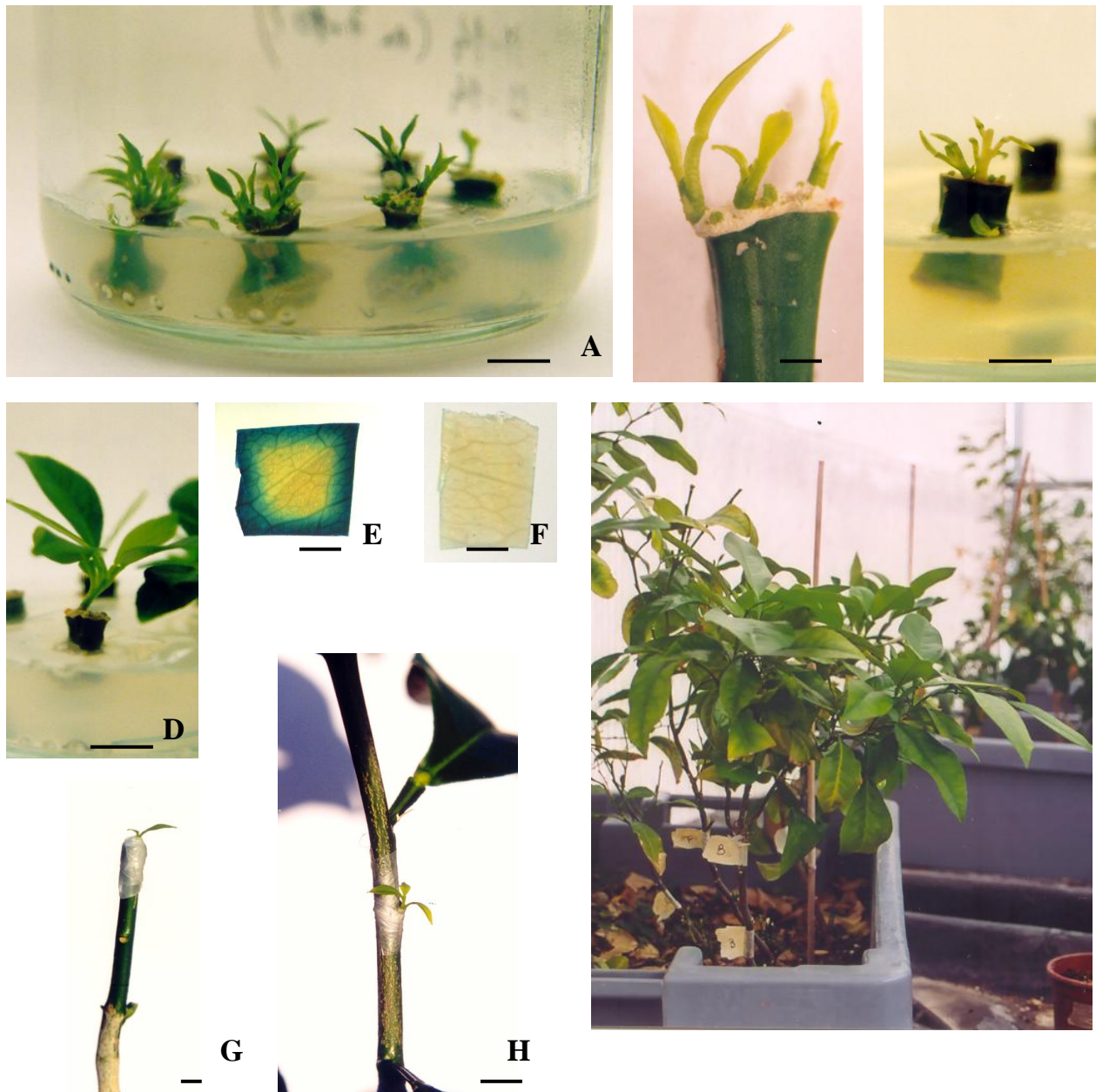
Concentração e tempos de co-cultura das agrobactérias usadas

**Fig 5.6** - Apresentação da razão entre o número de rebentos adventícios formados, totais ou com comprimento acima de 1 mm e do número de explantes inoculados no meio D5. Os resultados são apresentados em função da estirpe de *A. tumefaciens* usada (C58 e EHA105) e das diferentes D.O.<sub>(600 nm)</sub> e tempos de co-cultura testados.

A planta 45 e a planta T1B foram enxertadas em *C. macrophylla* Wester. As outras 3 plantas foram microenxertadas em citrangeira Carrizo. Deste grupo apenas a planta transformada T1B cresceu (Est. III-I), enquanto as outras quatro não sobreviveram ao processo da enxertia/microenxertia ou ao processo de transplante para o solo, caso da planta 166. A detecção da enzima  $\beta$ -glucuronidase foi repetida no tecido foliar da planta T1B após dois anos de crescimento e confirmou-se a sua expressão (Est. III - E e F).

Todos os rebentos adventícios com comprimento acima de 1mm em que não foi detectada a enzima  $\beta$ -glucuronidase, foram microenxertados e enxertados para posterior análise do DNA genómico por PCR. A maioria dos rebentos adventícios com comprimento superior a 1,5 mm foram enxertados em *C. macrophylla* Wester, enquanto os mais pequenos foram microenxertados na citrangeira Carrizo. Foi obtida uma taxa de sucesso na microenxertia de cerca de 60%. Na enxertia de garfo do tipo fenda simples (Est. III-G) e na enxertia em T (Est. III-H), realizada em *C. macrophylla* Wester, a taxa de sucesso obtida foi de 63%.

As plantas desenvolvidas mostraram um fenótipo normal e um crescimento normal (Est. III -I).



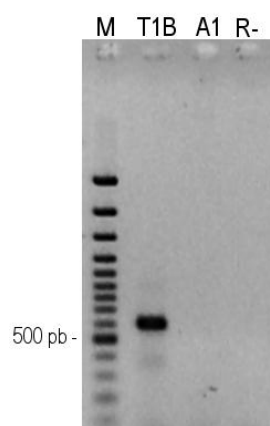
**ESTAMPA III.** Desenvolvimento de rebentos adventícios de *Citrus aurantium* L. cv. Brazilian após transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. **(A)** a **(D)**: Organogénese de rebentos adventícios na superfície de corte dos entrenós de plantas com cerca de 12 meses. **(A)**: Regeneração de rebentos adventícios em meio de cultura D5 com  $100 \text{ mg l}^{-1}$  de canamicina. **(B)**: Detalhe dos rebentos adventícios e do *callus* formados no meio de cultura D5 com  $100 \text{ mg l}^{-1}$  de canamicina. **(C)**: Rebentos adventícios com cor esbranquiçada devido à presença de canamicina no meio de cultura. **(D)**: No meio controlo sem reguladores de crescimento a formação de rebentos adventícios é menor. **(E)** e **(F)**: Detecção da actividade da  $\beta$ -glucuronidase em secções de folhas novas. **(E)**: Detecção positiva na planta T1B. **(F)**: Detecção negativa numa laranjeira azeda não transformada. **(G)** e **(H)**: Enxertia dos rebentos adventícios em *Citrus macrophylla* Wester. **(G)**: Enxertia de garfo do tipo fenda simples. A seta indica o rebento enxertado e ligado com parafilme. **(H)**: Enxertia em T. A seta indica o rebento enxertado e ligado com parafilme. **(I)**: Planta T1B transformada com o gene *uidA*. A planta apresenta um fenótipo normal. Barras das figuras: em **(A)** = 0,7 cm; em **(B)** = 0,12 cm; em **(C)** e **(G)** = 0,6 cm; em **(D)** e **(H)** = 1 cm ; em **(E)** = 0,15 cm; em **(F)** = 0,1 cm; em **(I)** = 6 cm.

### 5.3.1.2 - Análise da expressão do gene *uidA*

#### 5.3.1.2.1 - Amplificação por PCR do gene *uidA*

Para se efectuar o rastreio das plantas transformadas com o gene *uidA*, o DNA genómico das plantas foi extraído pelo método Edwards *et al.* (1991) e analisado por amplificação por PCR. O gene *uidA* foi amplificado com os “primers” GUS1 e GUS2. Como controlo positivo da amplificação de DNA genómico, foi também amplificado o gene da ubiquitina com os “primers” Ubi1 e Ubi2. Os resultados obtidos estão apresentados na Fig. 5.7.

A presença de uma banda com a dimensão correcta confirmou a amplificação do gene *uidA* da planta T1B. Não se verificou amplificação a partir do DNA genómico da planta não transformada (controlo negativo).

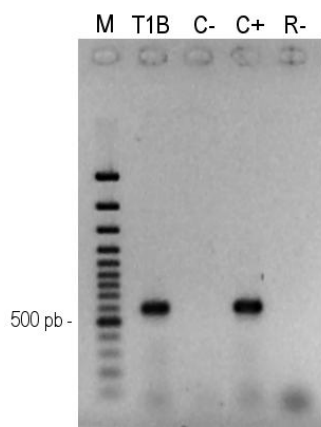


**Fig. 5.7** - Análise electroforética em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene *uidA* com os “primers” GUS1/GUS2. M: marcador 100 pb; T1B: amplificação do gene *uidA* da planta T1B; A1: controlo negativo – reacção de PCR com DNA genómico de laranja azeda não transformada; R-: controlo negativo – reacção de PCR sem DNA.

#### 5.3.1.2.2. - Amplificação por PCR do gene *npt II*

Com o objectivo de saber se toda a região do T-DNA tinha sido inserida no genoma da planta, foi amplificado por PCR o gene *nptII*. Este gene está presente junto ao RB da cassette p35SGUSINT e a sua amplificação a partir do DNA genómico da planta T1B foi feita com os “primers” NPT1 e NPT2. Como controlo positivo amplificou-se o gene *nptII* do plasmídeo pBI121. Na Fig. 5.8 apresentam-se os resultados obtidos.

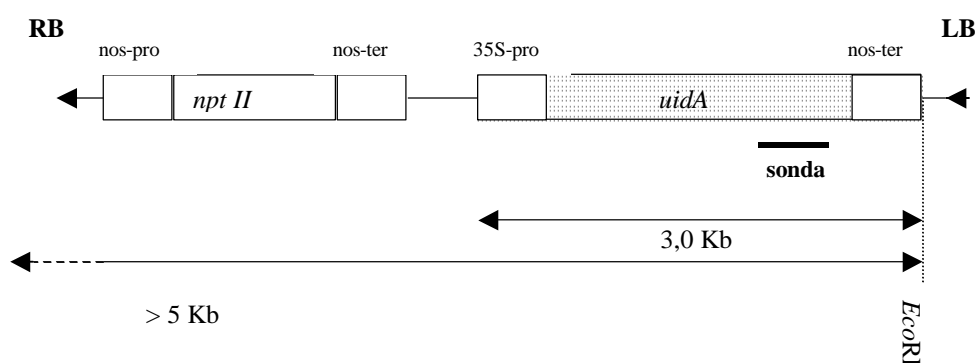
Confirmou-se a presença de uma banda com a dimensão correcta na amostra da planta T1B e no controlo positivo, enquanto no DNA genómico de uma planta não transformada não se verificou amplificação. O resultado da amplificação do gene *uidA* e do gene *nptII* a partir do DNA genómico da planta T1B indica que toda a cassette p35SGUSINT foi integrada no seu genoma.



**Fig. 5.8** - Análise electroforética em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene *nptII* com os “primers” NPT1/NPT2. M: marcador 100 pb; T1B: amplificação do gene *nptII* da planta T1B; C-: controlo negativo – resultado da reacção de PCR com DNA genómico de laranjeira azeda não transformada; C+: controlo positivo - amplificação do gene *nptII* do pBI121; R-: controlo negativo - reacção de PCR sem DNA.

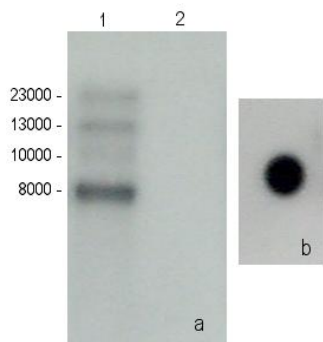
### 5.3.1.2.3. - Análise Southern Blot

O DNA genómico da planta T1B foi analisado por Southern Blot para confirmar a integração do gene *uidA* no seu genoma. O DNA foi extraído com o kit “DNeasy Plant Mini Kit”. Após a digestão do DNA com a enzima *Eco* RI que corta na extremidade 3’ do gene *uidA*, obtém-se um fragmento que engloba a cassette p35SGUSINT e cuja dimensão depende da região no DNA genómico da planta onde a enzima de restrição vai actuar, gerando um fragmento superior a 5 Kb, como vem esquematizado na Fig. 5.9.



**Fig. 5.9** - Esquema da cassette p35SGUSINT. Posição relativa da sonda marcada com  $^{32}\text{P}$ , usada na detecção do gene *uidA*. Adaptado de Peña *et al.* (1997).

A sonda marcada com  $^{32}\text{P}$  foi preparada a partir do plasmídeo pBI121 em que o gene *uidA* foi amplificado por PCR com os “primers” GUS1/GUS2 e apresenta 415 pb. Foram obtidas 4 bandas, como se pode observar na Fig. 5.10. Não ocorreu hibridação da sonda com o DNA genómico da planta não transformada (controlo negativo). O resultado da análise Southern Blot revela assim que houve integração estável do gene *uidA* no genoma da planta laranjeira azeda cv. Brazilian T1B.

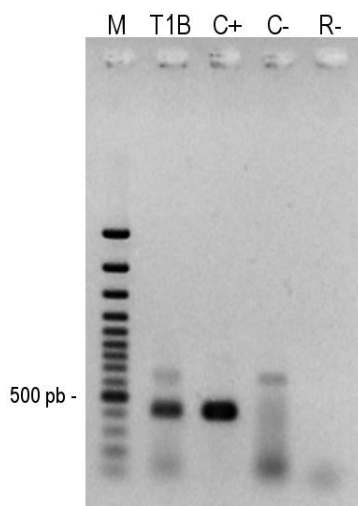


**Fig. 5.10** - Resultado da análise Southern Blot. O DNA genómico foi digerido com a enzima *Eco* RI e hibridado com uma sonda para a detecção do gene *uidA*: a) 1: presença de 4 bandas na análise do DNA genómico da planta T1B; 2: controlo negativo - DNA genómico de laranjeira azeda não transformada; b) controlo positivo - resultado da hibridação slot blot da sonda com o produto da amplificação por PCR do gene da CP de um clone. Os valores aproximados do marcador molecular são fornecidos em Kb.

#### 5.3.1.2.4 - Análise ao mRNA

Para confirmar a transcrição do gene *uidA*, foi analisado o mRNA da planta T1B. O RNA total da planta T1B, extraído com o kit “RNeasy Plant Extraction”, foi usado numa reacção RT-PCR com os “primers” GUS1 e GUS2. Na Fig. 5.11 apresentam-se os resultados obtidos.

A amplificação de uma banda com a dimensão correcta (415 pb) na amostra T1B e a ausência de amplificação na amostra de laranjeira azeda não transformada (controlo negativo), sugere que o gene *uidA* é transcrito.



**Fig. 5.11**- Análise electroforética em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação por RT-PCR do gene *uidA*. M: marcador 100 pb; T1B: amplificação do gene *uidA* da planta T1B; C+: controlo positivo - amplificação do gene *uidA* do pBI121; C-: controlo negativo - reacção de PCR com DNA genómico de laranjeira azeda não transformada; R-: controlo negativo - reacção de PCR sem DNA.

A tradução do gene *uidA* foi confirmada pela detecção da enzima  $\beta$ -glucuronidase em tecido foliar de plantas com dois anos, com a obtenção de uma coloração homogénea (Est. III - E e F).

### 5.3.2 - Transformação de sementes germinadas

Um protocolo de transformação de sementes foi desenvolvido e está referido no capítulo Material e Métodos. Sementes de laranjeira azeda cv. Brazilian com 1, 5 e 7 dias de germinação foram transformadas com a estirpe de agrobactéria EHA105 pE7113-CP. As sementes de laranjeira azeda são poliembriónicas e os embriões podem ter diferentes dimensões e alguns apenas um cotilédone (Est. IV-A). Para uniformizar o material vegetal a ser tratado, foram escolhidos os embriões de dimensão média com dois cotilédones. Um dos cotilédones foi cortado, de forma a induzir o processo de transformação por *A. tumefaciens* (Est. IV-B).

#### 5.3.2.1 – Análise da eficiência de transformação

Todas as sementes sujeitas ao processo de transformação foram colocadas em vermiculite esterilizada, mas apenas 72,7% se desenvolveram. Para a detecção da integração do gene da CP no genoma das plantas foi analisado por PCR o DNA genómico das 408 plantas sujeitas ao processo de transformação. A análise processou-se quando as plantas atingiram um ano de crescimento. Os resultados obtidos encontram-se sumarizados na Tabela 5.7.

A frequência média de plantas transformadas detectadas por PCR foi de 6,4% (razão entre o nº de plantas com detecção positiva do gene da CP e o nº de plantas que se desenvolveram em vermiculite). Destaque-se, porém, uma frequência de 13,6% de plantas transformadas com 5 dias de germinação (Tabela 5.7). As plantas apresentaram um fenótipo e um crescimento normal, como é possível observar na Estampa IV-C e D, por comparação com as plantas controlo negativo (Est. IV-E).

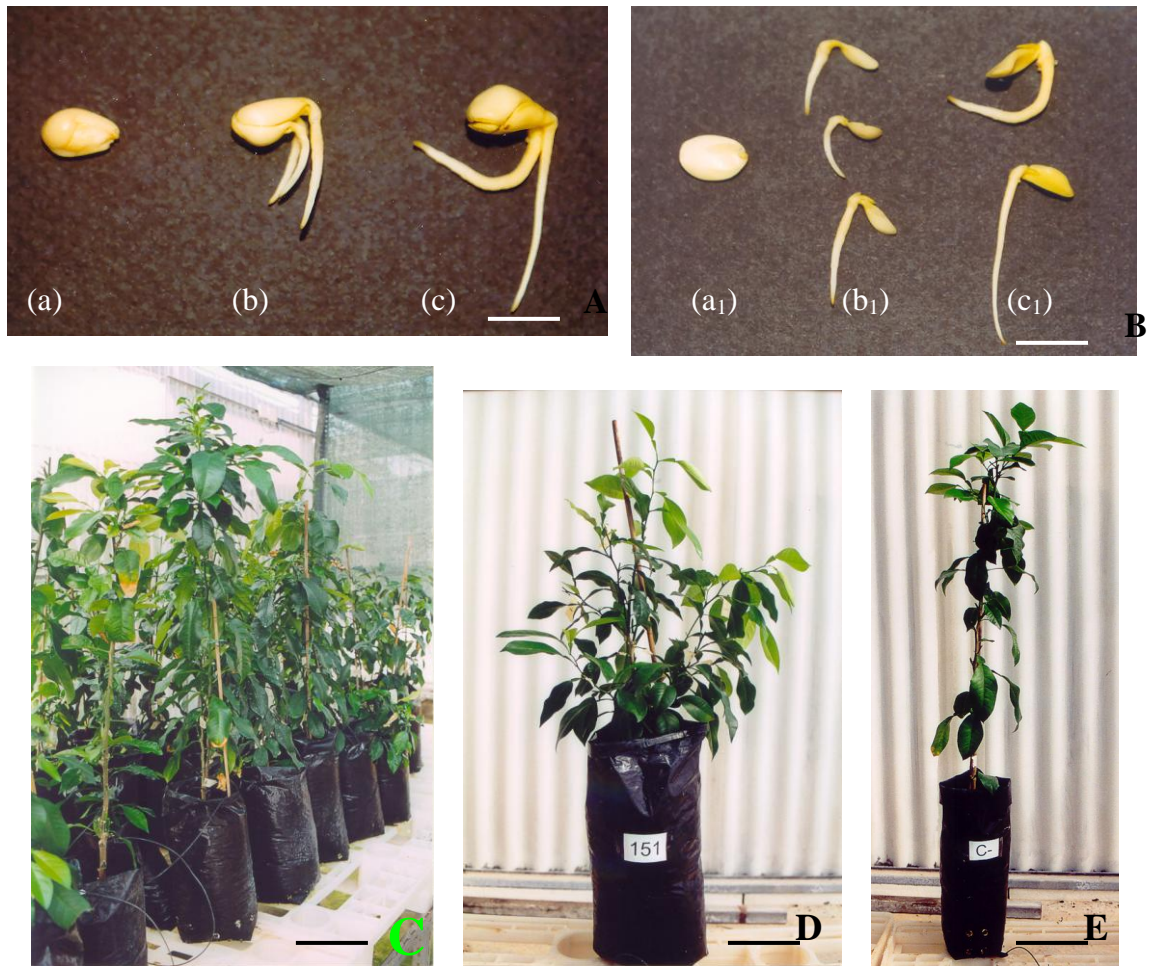
**Tabela 5.7** - Análise da transformação das sementes germinadas.

Tempo de germinação (dias)	Nº sementes tratadas	Frequência de germinação	Plantas com detecção da CP	Frequência de transformação (%)
1	187	80	5	3,4
5	212	69	20	13,6
7	162	69	1	0,9

#### 5.3.2.2 - Análise da expressão do gene da CP

##### 5.3.2.2.1 - Amplificação por PCR do gene da CP

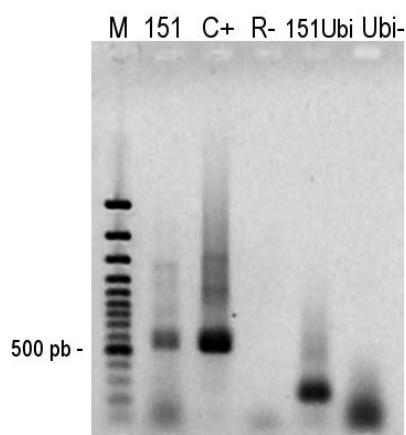
Para a detecção do gene da CP, o DNA genómico das plantas sujeitas a transformação foi extraído pelo método Edwards *et al.* (1991). O DNA genómico da



**ESTAMPA IV.** Desenvolvimento de plantas de *Citrus aurantium* L. cv. Brazilian após transformação de sementes germinadas. **(A)**: Sementes com 1 (a), 5 (b) e 7 (c) dias de germinação. A semente pode ser poliembriônica. **(B)**: Aspecto dos embriões após o corte de um dos cotilédones. Em (b<sub>1</sub>) e (c<sub>1</sub>) observa-se o número de embriões que formam a semente em (b) e (c), respectivamente. **(C)**: Conjunto de plantas transformadas com o gene da proteína do capsídio (CP) do CTV. As plantas apresentam um fenótipo normal. **(D)**: Planta 151 transformada com o gene da proteína do capsídio do CTV. **(E)**: Planta não transformada. Barras das figuras: em (A) e (B) = 1 cm; em (C) = 11,8 cm; em (D) e (E) = 8,5 cm.

planta do tabaco número 38, transformado com a cassette pE7113-CP, foi extraído pelo mesmo método e sujeito às mesmas análises para ser usado como controlo, quer da extracção, quer da amplificação por PCR do DNA genómico. O gene da ubiquitina também foi amplificado para cada amostra de DNA a analisar, através dos “primers” Ubi1/Ubi2, como controlo positivo da amplificação do DNA genómico. Estes “primers” amplificam um fragmento de DNA com 234 pb. Um exemplo dos resultados obtidos está apresentado na Fig. 5.12.

Na amplificação por PCR do gene da CP com os “primers” CTV1/CTV10 não foram detectadas bandas para a maioria das amostras. Mas com o uso dos “primers” CTV1/CTV14 que amplificam um fragmento do gene da CP com 543 pb, foi conseguida a amplificação de uma banda com o peso molecular correcto para a maioria das amostras e por essa razão estes “primers” foram usados no rastreio das plantas transformadas com o gene da CP (Fig. 5.12). O resultado da amplificação com os “primers” CTV1/CTV14 foi uma banda com a dimensão correcta, mas na maioria das amostras, de difícil detecção no gel de agarose. A confirmação da amplificação do gene da CP foi obtida após a reamplificação do produto de PCR com os “primers” CTV42/43, que amplificam um fragmento interno do gene da CP com 415 pb.



**Fig. 5.12** - Análise electroforética em gel de agarose a 1% da amplificação por PCR de um fragmento do gene da CP do CTV com os “primers” CTV1/CTV14. Amplificação do gene da ubiquitina com os “primers” Ubi1/Ubi2. M: marcador 100 pb; 151: amplificação de um fragmento do gene da CP da planta 151; C+: controlo positivo - amplificação de um fragmento do gene da CP da planta de tabaco nº 38 transformada com a cassette pE7113-CP; R-: controlo negativo - reacção de PCR sem DNA; 151Ubi: amplificação do gene da ubiquitina da planta 151; Ubi-: controlo negativo - reacção de PCR sem DNA.

A amplificação por PCR com os “primers” CTV1/14, de uma banda com a dimensão correcta, foi verificada em 27 plantas, como está descrito na Tabela 5.8. Neste conjunto de plantas foi novamente testado a amplificação do gene da CP com os “primers” CTV1/CTV10, tendo sido detectada uma banda com a dimensão correcta em 7 plantas.

**Tabela 5.8** - Resultado da amplificação do gene da CP do CTV com o conjunto de “primers” CTV1/CTV14 e CTV1/CTV10 em 27 plantas sujeitas ao processo de transformação de sementes germinadas.

Número da planta	“Primers” CTV 1/14	“Primers” CTV 1/10 (análise da CP completa)
22	+	-
23	+	-
27	+	-
29	+	-
30	+	-
31	+	-
32	+	-
33	+	-
34	+	-
36	+	-
38	+	-
82	+	-
108	+	-
110	+	-
136	+	+
137	+	+
146	+	+
151	+	+
152	+	+
171	+	+
287	+	-
332	+	+
376	+	-
380	+	-
381	+	-
385	+	-
390	+	-

Nota: + = amplificação do gene da CP.  
- = ausência de amplificação do gene da CP.

O DNA genómico da planta número 151, em que foi detectado o gene da CP integral com os “primers” CTV1/CTV10, foi usado para a confirmação da transformação.

#### 5.3.2.1.2 - Análise TaqMan ou “5’ exonuclease assay”

A técnica fluorogénica “5’ exonuclease assay” foi usada na detecção do gene da CP da planta 151 por constituir mais uma confirmação da amplificação do gene da CP. O DNA genómico foi extraído pelo kit “DNeasy Plant Mini kit”.

Uma vez que o gene da CP utilizado na construção da cassette pE7113-CP provém de um isolado com características “mild”, foi utilizada a sonda TaqMan E que apresenta uma homologia elevada com esses isolados. O valor de fluorescência obtido para cada amostra, resultante da subtracção do valor da leitura pré-PCR ao valor da leitura pós-PCR, está apresentado na Tabela 5.9. Um número adequado de amostras tipo controlo negativo é essencial para obter um elevado nível de confiança e um baixo limiar positivo/negativo. A determinação do limiar positivo/negativo das amostras foi feita com a média de 6 controlos negativos e foi calculado segundo a distribuição t-“Student”.

**Tabela 5.9** - Determinação do limiar positivo/negativo das amostras

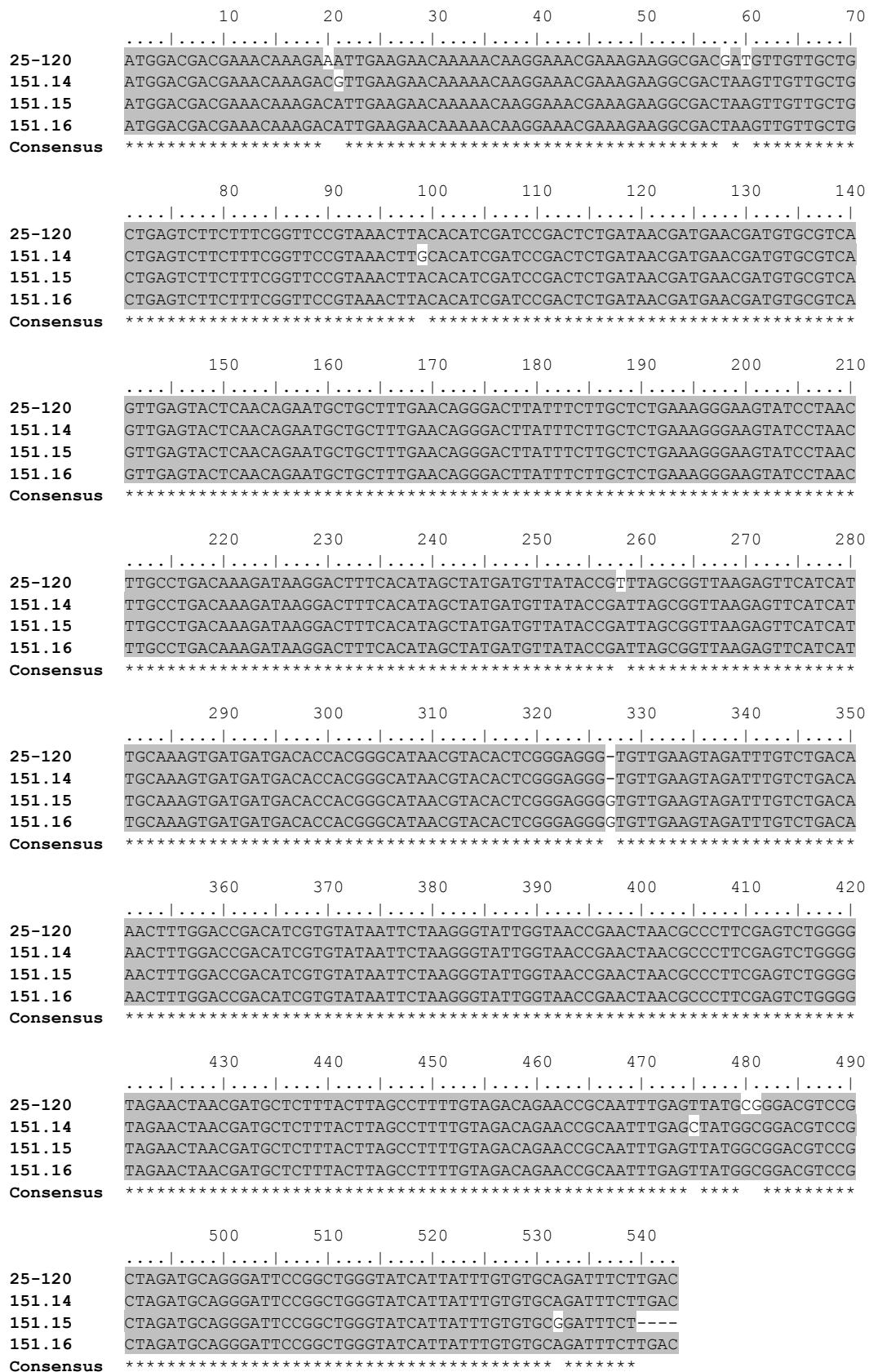
Amostras	Unidades arbitrárias
C-	914 ± 94
151	2307
C+ (CP)	2001

Num limiar de 99,5 % de confiança, a análise da distribuição t-“Student” forneceu-nos o valor 1294,16, acima do qual as amostras são consideradas positivas. O resultado foi positivo para a planta 151 e para um clone da CP do CTV que constitui o controlo positivo (C+).

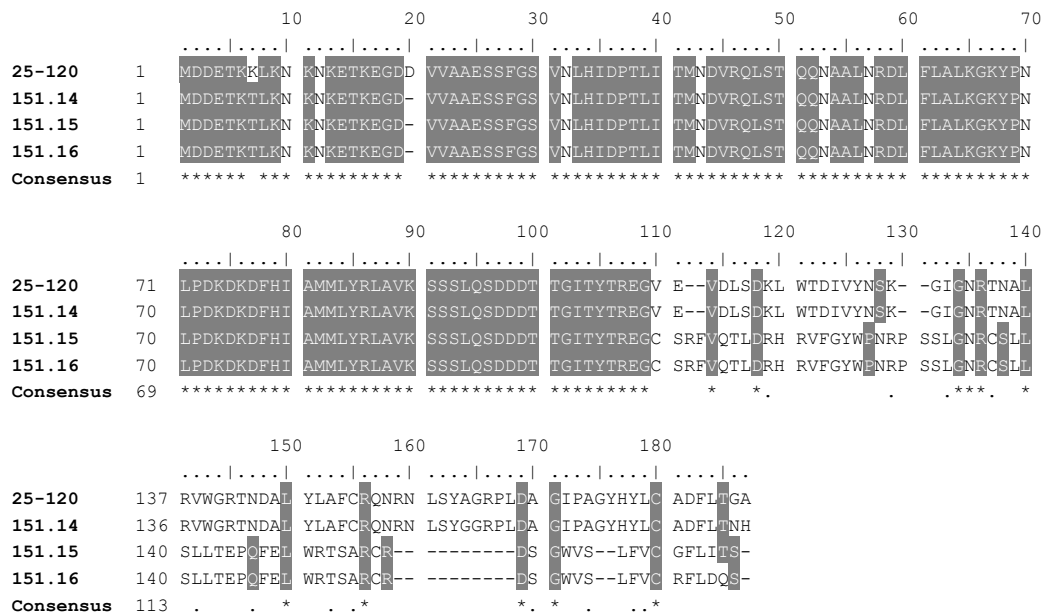
#### 5.3.2.1.3 - Análise por sequenciação

Com o objectivo de confirmar a integração do gene da CP no genoma da planta 151, o gene foi clonado e analisado por sequenciação nucleotídica. A partir do DNA genómico da planta 151, o gene da CP foi amplificado por PCR com os “primers” CTV1/CTV14. O produto do PCR foi clonado no vector pGEM<sup>®</sup> T-Easy. Os 3 clones do gene da CP obtidos foram posteriormente sequenciados. As sequências nucleotídicas do fragmento da CP foram alinhadas com a sequência nucleotídica da CP do clone 25.120, usado na construção da cassette pE7113-CP e estão apresentadas na Fig. 5.13. Apesar da sequência nucleotídica do gene da CP não estar completa por corresponder a um fragmento amplificado com os “primers” CTV1/CTV14, a sequência deduzida de aminoácidos de cada uma das 3 sequências nucleotídicas foi determinada para ser comparada com a do clone 25.120 e está apresentada na Fig. 5.14.

Nenhuma das sequências nucleotídicas do gene da CP tem uma homologia completa com a sequência 25.120, sendo os resultados diferentes entre os três clones. A sequência com maior homologia é a do clone 151.14, que partilha 97% de identidade nucleotídica com a sequência do clone 25.120, enquanto as outras duas sequências apresentam 70% de identidade nucleotídica. Como resultado das alterações nucleotídicas, a sequência deduzida de aminoácidos nos três clones analisados apresenta-se truncada. Apenas a sequência deduzida de aminoácidos do clone 151.14 partilha uma maior homologia (84,7%) com a sequência 25.120.



**Fig. 5.13** - Alinhamento múltiplo das seqüências nucleotídicas de um fragmento do gene da CP de 3 clones da planta 151, com a seqüência 25.120. Encontra-se a sombreado os nucleótidos que são comuns às 4 seqüências, enquanto a ausência de sombreado assinala a posição de um nucleótido diferente.

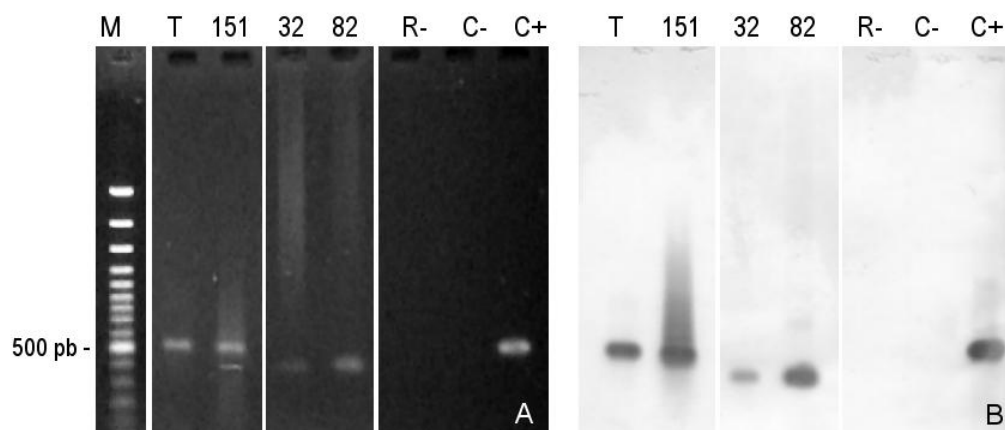


**Fig. 5.14** - Alinhamento múltiplo da sequência deduzida de aminoácidos de um fragmento do gene da CP de 3 clones da planta 151, com a sequência 25.120. Encontra-se a sombreado os aminoácidos que são comuns às 4 sequências, enquanto a ausência de sombreado assinala os aminoácidos diferentes.

### 5.3.2.1.4 - Análise Southern Blot

Para confirmar a amplificação do gene da CP por PCR, foi realizado um Southern Blot com o kit “DIG Nucleic Acid Detection Kit”. A análise Southern Blot incidiu sobre as plantas de laranjeira azeda 151, 32 e 82, sendo o seu DNA genómico extraído pelo kit “DNeasy Plant Mini kit”. O gene da CP das 3 plantas foi amplificado com os “primers” CTV1/CTV14, e no caso das plantas 32 e 82 foi ainda posteriormente reamplificado com os “primers” CTV42/43. Um clone do gene da CP e o DNA genómico da planta de tabaco número 38, transformada com a construção pE7113-CP, foram usados como controlos positivos no PCR e na análise Southern Blot. O DNA genómico de laranjeira azeda não transformada foi usado como controlo negativo. A sonda foi obtida por amplificação do gene da CP de um clone com os primers CTV42/CTV43, e foi marcada com digoxigenina. Os resultados estão apresentados na Fig. 5.15.

O resultado da análise Southern Blot confirmou que a banda obtida, quer na amplificação com os “primers CTV1/CTV14, quer na reamplificação com os “primers” CTV42/CTV43, corresponde ao fragmento da CP do CTV. Na planta 151, a banda obtida corresponde a pelo menos 80% do gene da CP, uma vez que na amplificação foram usados os “primers” CTV1/CTV14.



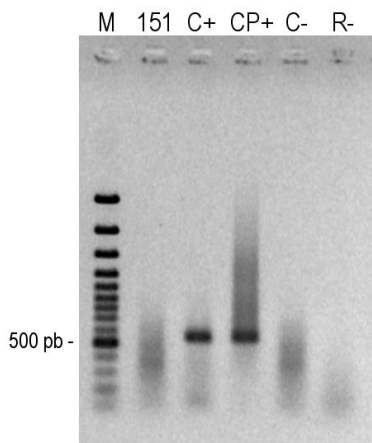
**Fig. 5.15** - Produto de amplificação e reamplificação por PCR do gene da CP, visualizado após electroforese em gel de agarose a 1% (A) e respectiva análise Southern Blot (B). (A) M: marcador 100 pb; T: amplificação do gene da CP da planta de tabaco nº 38, transformado com a cassette pE7113-CP, amplificado com os “primers” CTV1/14; 151: amplificação de um fragmento do gene da CP com os “primers” CTV1/14; 32 e 82: reamplificação de um fragmento do gene da CP com os “primers” CTV42/43; R-: controlo negativo - reacção de PCR sem DNA; C-: controlo negativo - reacção de PCR com DNA genómico de laranjeira azeda não transformada; C+: controlo positivo - amplificação do gene da CP de um clone; (B) T, 151, 32, 82 e C+: banda resultante da hibridação da sonda com o gene da CP; R- e C-: controlos negativos.

A necessidade de recorrer à reamplificação para a detecção do gene da CP poderá ser resultado do quimerismo das plantas transformadas, uma vez que é esperado que só parte dos tecidos estejam transformados.

#### 5.3.2.1.5 - Análise ao mRNA

Com o objectivo de detectar a transcrição do gene da CP, foi feita a análise da presença do mRNA do gene da CP da planta 151, uma vez que nesta planta o gene foi detectado por PCR na íntegra. O RNA da planta 151, extraído com o kit “RNeasy Plant Extraction”, foi analisado por RT-PCR com os “primers” CTV1/CTV14. O RNA da planta de tabaco número 38, transformada com a construção pE7113-CP, foi usado como controlo positivo da reacção de RT-PCR. Um clone do gene da CP foi usado na reacção de RT-PCR para funcionar como controlo positivo. O RNA de uma laranjeira azeda não transformada foi usado como controlo negativo. Na Fig. 5.16 apresentam-se os resultados obtidos.

A amplificação do cDNA do gene da CP foi obtido apenas para a planta de tabaco nº 38. O clone da CP também foi amplificado. A ausência de mRNA do gene da CP da planta 151 permite concluir que na planta 151 não ocorre a transcrição do gene da CP.

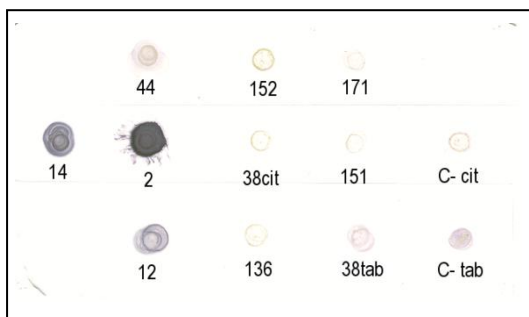


**Fig. 5.16** - Análise electroforética em gel de agarose a 1% dos produtos de RT-PCR do gene da CP do CTV, amplificados com os “primers” CTV1/CTV14. M: marcador 100 pb; 151: reacção de RT-PCR a partir do RNA total da planta 151; C+: controlo positivo - amplificação do cDNA do gene da CP da planta de tabaco nº 38; CP+: controlo positivo - amplificação directa do gene da CP de um clone; C-: controlo negativo – reacção de RT-PCR a partir de RNA total de laranjeira azeda não transformada; R-: controlo negativo - reacção de RT-PCR sem RNA.

### 5.3.2.1.6 - Análise Immunodot Blot

Uma vez que as plantas obtidas apresentam quimerismo, foi também analisado o extracto proteico das mesmas. Na análise Immunodot Blot foram analisados os extractos proteicos de algumas plântulas para os quais o resultado da amplificação ou reamplificação por PCR foi positivo. Foi igualmente analisado o extracto proteico da planta do tabaco número 38, transformada com a cassette 7113-CP. Um conjunto de 4 plantas infectadas com diferentes isolados do CTV foram usadas como controlo positivo. O resultado obtido está apresentado na Fig. 5.17.

A análise Immunodot Blot foi positiva na detecção da CP no extracto proteico das plantas controlo positivo (citrinos infectados com o CTV, nº 14, 2 e 12), com uma marcação de cor púrpura intenso. No extracto proteico da planta 44, também infectada com o CTV, foi obtido uma marcação negativa de cor rosa claro. Todos os citrinos 152, 38cit, 136, 171 e 151 apresentaram um resultado negativo, assim como a planta 38 do tabaco.



**Fig. 5.17** - Resultado da detecção Immunodot Blot da proteína do capsídio do CTV. A reacção positiva foi observada em 3 das plantas usadas como controlo positivo (14, 2 e 12). A planta do tabaco número 38 (38tab) e o seu controlo negativo (C- tab) apresentaram uma coloração negativa rosa claro. Os citrinos

sujeitos a transformação (152, 38cit, 136, 171 e 151) e o controlo negativo dos mesmos (C-cit) não reagiram ao anticorpo SP7.

Os extractos das plantas controlo negativo, quer a laranjeira azeda não transformada (C- cit), quer a planta do tabaco não transformada (C- tab), apresentaram uma reacção negativa. A coloração rosa claro do C- tab pode dever-se a uma exposição prolongada ao substracto BCIP/NBT.

Estes resultados confirmaram a ausência de expressão do gene da CP da planta 151 e das restantes plantas analisadas.

### **5.3.3 - Discussão**

#### **5.3.3.1 - Aspectos gerais**

Nos estudos de Moore *et al.* (1992) e Peña *et al.* (1997), o conceito de eficiência de transformação é referido como sendo a razão entre o número de rebentos transformados e o número total de explantes (segmentos de entrenós) inoculados. Por outro lado, Gutiérrez *et al.* (1997) definem o conceito de eficiência de transformação como sendo o número de rebentos transformados em função do número total de rebentos adventícios analisados. No presente trabalho calculou-se a eficiência de transformação a partir da definição de Moore *et al.* (1992) e Peña *et al.* (1997) por ser uma quantificação mais exacta.

#### **5.3.3.2 - Transformação de segmentos de entrenós**

Os ensaios de Moore *et al.* (1992) referem os segmentos de entrenós de 1 cm de comprimento da citrangeira Carrizo e de limeira mexicana como explantes com maior potencialidade organogénica na formação de rebentos adventícios, do que os discos foliares. Os segmentos de entrenós têm sido também um explante de eleição noutras espécies lenhosas, nomeadamente o pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch] (Scorza *et al.*, 1990), *Rubus spp.* (Hassan *et al.*, 1993), *Populus kitakamiensis* (Kajita *et al.*, 1994), diospireiro [*Diospyrus kaki* (L.)] (Tao *et al.*, 1994) e *Eucalyptus camaldulensis* (Ho *et al.*, 1998).

A idade do explante tem sido referida como um factor crítico na frequência de transformação de citrinos. Na maioria dos ensaios de transformação de *Citrus spp.*, são utilizados epicótilos ou hipocótilos, que por serem tecidos jovens e com um diâmetro pequeno, dão origem a um menor número de rebentos, mas que, segundo Bond e Roose (1998), são mais competentes para a transformação. A diminuição da frequência de transformação associada ao aumento da idade do explante pode resultar, segundo

Villemont *et al.* (1997) (citado em Bond e Roose, 1998) e Cervera *et al.* (1998b), da diminuição da taxa de células em divisão. As células tornam-se menos susceptíveis à integração de DNA exógeno e perdem alguma potencialidade organogénica. A alteração da composição dos componentes da parede celular e/ou exudados, ou uma redução da sua produção, nos segmentos de epicótilo de explantes mais velhos, pode dificultar a ligação da agrobactéria ou a activação dos genes da virulência, segundo Bond e Roose (1998). Em laranja doce foi referida uma frequência de regeneração e de transformação mais elevada em epicótilos com 3 semanas do que em explantes com 5 e 8 semanas (Bond e Roose, 1998). Em citrangeira Carrizo foi obtido 41,3% de transformação em explantes com 5 semanas (Cervera *et al.* 1998b), enquanto a transformação em explantes com 2 a 4 meses foi de 1,7% (Moore *et al.*, 1992). Porém, Ghorbel *et al.* (2000), ao testarem segmentos de entrenós de laranja azeda com 2 semanas, 4 meses e 12 meses, obtiveram melhores resultados na frequência de transformação dos explantes com 4 meses (42,6%) e nas plantas com 12 meses ocorreu uma frequência apenas 1,8 vezes menor de rebentos transformados. Estes dados indiciam que a utilização de explantes mais novos de laranja azeda cv. Brazilian poderia resultar numa maior eficiência de transformação.

Gutiérrez *et al.* (1997) referem que a posição vertical dos explantes no meio de cultura pode dificultar a acção do antibiótico de selecção e facilitar o desenvolvimento de rebentos adventícios não transformados, pelo facto de ficarem muito afastados do meio de cultura. Os segmentos de entrenós foram colocados no meio de cultura com a parte apical virada para cima, uma vez que referências anteriores (Moore *et al.*, 1992; García-Luis *et al.*, 1999) indicavam ser esta posição a que promovia a formação de maior número de rebentos adventícios, o que foi confirmado em testes preliminares realizados durante o presente trabalho. Verificou-se que muitos dos rebentos sujeitos ao processo de transformação, quando colocados no meio de cultura com canamicina, ficavam brancos, mostrando que o composto era absorvido pelo explante (ver Est. III-C). Na transformação de laranja azeda cv. Brazilian foram obtidos 96% de rebentos adventícios não transformados que cresceram no meio de cultura D5 com 100 mg.l<sup>-1</sup> de canamicina. Um valor semelhante de 95% foi obtido por Moore *et al.* (1992) em Carrizo, citrumeleiro e limeira mexicana e por Peña *et al.* (1995a) em laranja doce.

O efeito conjunto dos reguladores de crescimento BA e NAA foi referida por Ghorbel *et al.* (2000) como um factor crucial para o aumento da frequência de transformação de rebentos adventícios em laranja azeda. No entanto, a presença de NAA no meio de cultura pode também aumentar a predisposição das células a alterações genómicas (Hammerschlag, 1992). No estudo da formação de rebentos adventícios, o meio de cultura D2 (BA 1mg.l<sup>-1</sup>) revelou-se o mais adequado. Porém, foi utilizado o meio de cultura D5 nos ensaios de transformação, por os rebentos adventícios apresentarem um maior vigor, essencial para obter uma taxa de sucesso nos

processos de enxertia e microenxertia, usados para o posterior desenvolvimento dos rebentos.

Piestun *et al.* (2000) referem que longos períodos de incubação dos explantes na presença de citocininas e auxinas pode diminuir ou mesmo abortar a diferenciação de meristemas e a regeneração de rebentos. No presente estudo notou-se uma diminuição do crescimento dos rebentos adventícios após uma longa exposição ao meio de cultura D5.

Em muitos protocolos de transformação de citrinos, os explantes são expostos a um período de pré-cultura referido como indutor da transformação (Birch, 1997). No presente trabalho o passo de pré-cultura foi omitido do teste de transformação, baseado nos estudos que referem que a infecção pelo *Agrobacterium* deve ser feita em tecido ferido e fresco, quando ainda está presente a seiva da planta e são produzidos compostos fenólicos em maior quantidade (Moore e Cooksey, 1981; Bolton *et al.*, 1986; Binns, 1990; Mantis e Winans, 1992). O período imediatamente após a ferida do tecido é aquele em que as células se encontram em divisão activa e o DNA exógeno é mais facilmente integrado na célula vegetal (Moore e Cooksey, 1981). Segundo García-Luis *et al.* (1999), a divisão intensa das células na superfície de corte do segmento de entrenó da citrangeira Troyer ocorre nos primeiros 5 dias. Recentemente, Ghorbel *et al.* (2000) estudaram o efeito do período de pré-cultura na transformação de laranjeira azeda e concluíram que induz uma resposta de stress prejudicial.

O aumento do tempo de co-cultura pode fazer aumentar a frequência de transformação por facilitar o acesso da agrobactéria a um maior número de células competentes (Dong e McHughen, 1993b), como foi observado por Cervera *et al.* (1998b) na citrangeira Carrizo. No entanto, tempos prolongados de co-cultura permitem o crescimento excessivo de *A. tumefaciens* no meio de cultura, dificultando a sua erradicação e fazendo diminuir a frequência de regeneração dos rebentos transformados. O período de co-cultura de 3 dias, usado como rotina em variadas espécies de citrinos, incluindo a laranjeira azeda (Ghorbel *et al.*, 2000), também foi utilizado no presente trabalho de transformação de laranjeira azeda cv. Brazilian.

Os segmentos de entrenós de laranjeira azeda cv. Brazilian foram sujeitos a um período de escuridão, por estar descrito que favorece a formação de rebentos adventícios (Peña *et al.*, 1995a; 1997). A formação de *callus* também é induzida na escuridão e em muitos estudos de transformação genética este pode ser um pré-requisito fundamental quando a neoformação de rebentos se faz por organogénese indirecta. Segundo Bergmann e Stomp (1992), o estágio de desdiferenciação associado à formação de *callus* torna as células mais receptivas à entrada de DNA exógeno, aumentando assim a frequência de transformação. O protocolo usado no presente estudo, com um período de escuridão de 20 dias e na presença de NAA, também induziu a formação de *callus* por toda a superfície de corte do segmento de entrenó (ver

Est. III-B). Os rebentos adventícios apresentaram uma disposição anelar, tal como tinha sido previamente observado nos estudos de neoformação de rebentos adventícios (ver Est. II-A e B), mas somente a observação de cortes histológicos poderia indicar a presença ou ausência de organogénese directa.

A estirpe de *A. tumefaciens* usada no processo de transformação tem um papel activo na eficiência de transformação, uma vez que a sua virulência pode variar com o genótipo da planta infectada (Stomp *et al.*, 1990; Van Wordragen e Dons, 1992; Scorza *et al.*, 1994). Os estudos de Cervera *et al.* (1998a), em laranja doce e em limeira mexicana, sobre a indução de tumores pelas estirpes selvagens nopalina C58 e L,L-succinamopina A281, mostraram que são ambas eficientes. Por outro lado, os estudos de transformação de laranja doce e de toranja (*C. paradisi* Macfad.), realizados por Bond e Roose (1998) e por Yang *et al.* (2000), respectivamente, indicam que a estirpe C58 é mais eficaz que a estirpe EHA 105, que deriva da estirpe hipervirulenta A281 (Hood *et al.*, 1986). Estas duas agrobactérias, ambas transportando o plasmídeo binário p35SGUSINT (Vancanneyt *et al.*, 1990), também foram testadas na transformação de laranja azeda cv. Brazilian. Obtiveram-se rebentos adventícios positivos na detecção da  $\beta$ -glucuronidase somente à D.O.<sub>(600 nm)</sub> de 0,6, que corresponde ao início da fase estacionária. No entanto, o número de unidades formadoras de células (ufc) viáveis é distinto para as duas agrobactérias, sendo  $7,7 \pm 0,2$  para a estirpe EHA105 e  $8,9 \pm 0,1$  para a estirpe C58 p35SGUSINT. Concluiu-se que há necessidade de efectuar estudos de crescimento das agrobactérias sempre que se utiliza uma nova construção plasmídica num processo de transformação, uma vez que o tempo de duplicação da cultura depende do plasmídeo que a agrobactéria transporta (ver Tabela 5.3) e o estágio de crescimento da cultura é um factor importante a avaliar num processo de transformação.

A frequência de rebentos em que foi detectada a  $\beta$ -glucuronidase (razão entre o número de rebentos positivos na reacção histoquímica da  $\beta$ -glucuronidase e o número total de segmentos de entrenós inoculados), foi da mesma ordem de grandeza para a estirpe C58 (6,3%) e para a estirpe EHA105 (5,1%) (ver Tabela 5.7). Os resultados indicam que a estirpe C58 e EHA105 são igualmente recomendadas na transformação de laranja azeda cv. Brazilian. A frequência de transformação de segmentos de entrenós pode variar muito entre as diferentes espécies de *Citrus*, uma vez que estão envolvidos diversos factores como o protocolo de transformação, o genótipo da planta, a virulência da agrobactéria e factores fisiológicos (Márton *et al.*, 1979; Duran-Vila *et al.*, 1989; Kumar *et al.*, 1995; Peña *et al.*, 1995). No entanto, refira-se que os resultados de frequência de transformação de laranja azeda obtidos por Gutiérrez *et al.* (1997) foram inferiores a 1,2%, enquanto Ghorbel *et al.* (2000) conseguiram  $6,6 \pm 1,1\%$  em rebentos adventícios formados a partir de explantes de 4 meses, um valor da mesma ordem de grandeza dos obtidos no presente estudo.

No processo de transformação de segmentos de entrenós, obteve-se 5 rebentos adventícios positivos na detecção da  $\beta$ -glucuronidase. A planta T1B foi a única que sobreviveu das 5 plantas transformadas. A detecção da  $\beta$ -glucuronidase no tecido foliar, repetida após 2 anos de crescimento da planta, mostrou uma distribuição uniforme da enzima em todas as células do mesófilo (ver Est. III-E e F), o que sugere que a planta T1B tenha sido originada a partir de uma ou várias células, todas elas transformadas. A amplificação do gene *uidA* por PCR e do gene *nptII*, que está presente na extremidade esquerda do T-DNA, revelaram que todo o T-DNA foi integrado no genoma da planta. A integração do gene *uidA*, que foi confirmada por Southern Blot (ver Fig. 5.10), requer ainda a determinação do número de cópias presentes através de análises Southern Blot a realizar futuramente. As plantas que provieram dos testes de transformação de segmentos de entrenós não mostraram alterações fenotípicas (ver Est. III-I).

A fraca capacidade rizogénica dos rebentos adventícios da maioria das espécies de *Citrus* spp. foi inicialmente referida por Durán-Vila *et al.* (1989). Porém, taxas elevadas de rizogénese foram já descritas em rebentos adventícios transformados de toranjeira (90%) (Costa *et al.*, 2002), de limeira mexicana e de citrangeira Carrizo (72%) (Gutiérrez *et al.*, 1997). A reduzida taxa de rizogénese de laranjeira azeda cv. Brazilian justificou a aplicação do protocolo de microenxertia, previamente descrito por Navarro (1981) para o posterior desenvolvimento dos rebentos adventícios. A taxa de sucesso deste protocolo foi referida como sendo de 100% na microenxertia de rebentos adventícios provenientes do processo de transformação de laranjeira doce, de citranjeira Carrizo e de limeira mexicana, segundo Peña *et al.* (1995a; 1995b; 1997). Por sua vez, Ghorbel *et al.* (1998) conseguiram uma percentagem de 80% de sucesso em rebentos adventícios de laranjeira azeda. No presente trabalho a taxa de sucesso foi de 60%. Este valor é relativamente baixo e poderá ter pelo menos duas explicações. Uma delas será o facto dos rebentos adventícios provirem de um meio de cultura com um antibiótico, o que reduz o vigor dos mesmos (Yang *et al.*, 2000). Por outro lado, os rebentos enxertados apresentaram um comprimento entre 1 mm e 1,5 mm de comprimento, o que poderá também justificar o baixo rendimento. Apesar de Navarro (1981) referir que é possível a microenxertia de rebentos com 0,1-0,2 mm, La Malfa *et al.* (2000) conseguiu uma taxa de sucesso de 100% somente em rebentos com comprimento acima de 1 cm. O genótipo da planta poderá também interferir no resultado obtido.

Yang *et al.* (2000) referiram ter obtido uma taxa de 95% de sucesso na enxertia de rebentos com comprimento acima de 5 mm. No entanto, na enxertia de rebentos provenientes de um meio de selecção em canamicina, a taxa obtida foi de 24%. No presente trabalho, a maioria dos rebentos adventícios com comprimento acima de 1,5 mm foram enxertados em plântulas de *C. macrophylla* Wester com 4 a 12 meses, por enxertia de garfo do tipo fenda simples (ver Est. III-G) ou enxertia em T (ver Est. III-H). Este processo evitou a cultura *in vitro* e os rebentos cresceram com muito vigor. A

taxa de sucesso da enxertia foi média (63%), apesar de mais elevada que a taxa obtida por Yang *et al.* (2000) e as causas das quebras poderão estar associadas, quer à dificuldade em manusear os rebentos adventícios muito pequenos, quer à dessecação dos mesmos quando mantidos em estufa, apesar de envolvidos em plástico perfurado.

A integração de uma única cópia do transgene está descrito como resultando num nível elevado da sua expressão, enquanto a presença de múltiplas cópias está geralmente associada a fenómenos de silenciamento génico (Gallie, 1998; Hsieh e Fire, 2000) e à presença de estruturas complexas como rearranjos e DNA truncado. Em citrinos, Cervera *et al.* (2000) descreveram uma correlação negativa entre o número de cópias do gene e a actividade da  $\beta$ -glucuronidase, enquanto Febres *et al.* (2003) referem a ausência dessa correlação. Também Domínguez *et al.* (2000) não observaram qualquer efeito silenciador em plantas que tinham até 6 cópias de um gene. Estes resultados parecem confirmar os estudos de Scorza *et al.* (2001) (citado em Domínguez *et al.*, 2002) que referem que, em plantas lenhosas, a presença de múltiplas cópias de um transgene pode tornar a planta muito resistente. Frequentemente as múltiplas cópias de um gene dispõem-se em “tandem” num único *locus*, por o local de integração funcionar muitas vezes como “hot spot”, o que suporta a hipótese de que o DNA estranho não se integra no genoma da célula vegetal ao acaso (Fagard e Vaucheret, 2000). No presente trabalho, a integração de uma ou várias cópias do gene *uidA* no genoma da planta não foi analisada, desconhecendo-se assim a relação com a expressão do transgene na planta.

A expressão estável inicial de um transgene pode muitas vezes ser suprimida através da ocorrência de silenciamento génico pós-transcricional, após uma fase mais ou menos longa de expressão. Este fenómeno pode dever-se a mecanismos de regulação por degradação do mRNA, que leva à presença de baixos níveis de tradução (Fagard e Vaucheret, 2000). O silenciamento de transgenes, através do controlo da expressão de genes e da neutralização de sequências de DNA ou RNA invasivas, como transposões, vírus e T-DNAs, constitui provavelmente uma forma de defesa da planta (Fagard e Vaucheret, 2000). No caso da planta T1B, a integração do gene *uidA* no genoma da planta, confirmada por Southern Blot, e a expressão uniforme da  $\beta$ -glucuronidase nas células do tecido foliar, ao fim de 2 anos de crescimento, revela uma transformação estável.

### **5.3.3.3 - Transformação de sementes germinadas**

Moore e Cooksey (1981) referem que os tecidos jovens são geralmente mais susceptíveis ao processo infeccioso do *Agrobacterium*. A presença de células em divisão activa e de reguladores de crescimento endógenos que promovem um

crescimento rápido, constituem um conjunto de factores favoráveis à obtenção de frequências elevadas de transformação (Bergmann e Stomp, 1992). A transformação de sementes de laranjeira azeda cv. Brazilian, em início de germinação, com o gene da CP do CTV, baseou-se no corte de um dos cotilédones, originando uma zona de ferida na região intercotiledonar, segundo o esquema da Fig. 2.4. O número de plântulas desenvolvidas revelou a perda de 27,3% dos embriões. Este resultado pode ser uma consequência da manipulação das sementes germinadas quando foram colocadas no vaso com vermiculite, possivelmente pela quebra do cotilédone, que se separa do hipocótilo sob o efeito de uma pequena pressão. Embora a frequência média de ocorrência das plantas transformadas por este processo (6,4%) não seja elevado, foi obtido 13,6% de plantas transformadas com o gene da CP no grupo de plantas com 5 dias de germinação.

A cassette pE7113-CP, usada na transformação de sementes, não tem um gene repórter, o que impôs a análise de todas as plantas, por amplificação e reamplificação por PCR. Na construção da cassette pE7113-CP, usada no processo de transformação genética, a sequência do enhancer E7 e a sequência  $\Omega$  tiveram a finalidade de aumentar a eficiência da tradução. No entanto, no presente trabalho não chegou a ser avaliado o efeito das sequências reguladoras no processo de transformação.

A análise TaqMan tem sido usada na quantificação do número de cópias de um gene e na detecção de genes endógenos ou de transgenes (Schmidt e Parrott, 2001). A hibridação da sonda TaqMan com a cadeia de DNA que está a ser amplificada é uma reacção muito específica, de tal forma que a existência de um “mismatch”, por substituição ou deleção de apenas um nucleótido, é suficiente para não haver amplificação (Tyagi and Kramer, 1996). A sonda TaqMan E é específica para a detecção das estirpes com características biológicas “mild”, a que pertence o gene da CP inserido na planta 151. O valor obtido para a planta 151 e para o clone da CP (controlo positivo), dentro de um intervalo de confiança de 99,5 %, constituiu mais uma indicação da transformação desta planta.

A análise Southern Blot ao produto de PCR da planta 151, a sequenciação nucleotídica de 3 clones da CP e a análise TaqMan, foram realizadas após 2 anos de crescimento da mesma e confirmaram a integração estável do gene da CP. A transformação das plantas 32 e 82 foi também confirmada por Southern Blot.

A planta 151 apresenta o gene da CP integral, no seu genoma, de acordo com o resultado da amplificação por PCR com os “primers” CTV1/CTV10. No entanto, a ausência de mRNA da CP da planta 151 poderá estar associado a rearranjos do gene da CP na extremidade 3', a última região do T-DNA a ser integrada no genoma da planta. Esta pode ser também a explicação para a ausência de hibridação do “primer” CTV10 com a maioria das amostras de DNA genómico. A ausência da transcrição do gene da

CP pode dever-se à sua integração numa região do genoma vegetal onde a actividade de transcrição é reduzida ou inexistente (Fagard e Vaucheret, 2000). O promotor 35S do vírus *Cauliflower mosaic virus* é constitutivo e tem sido usado na maioria das construções génicas que visam a transformação de plantas, mas Dong *et al.* (1991) referem que é activo apenas nalguns tecidos, particularmente em tecidos jovens e tecidos vasculares, variando a sua expressão com o estágio de desenvolvimento da planta.

A necessidade de fazer uma reamplificação para detectar o gene da CP poderá dever-se à existência de quimerismo nas plantas transformadas. A quimera pode ser periclinal e/ou sectorial e estar presente só nas células mais externas dos tecidos ou estar presente apenas numa secção da planta (Cameron e Frost, 1968).

A ocorrência de silenciamento nalguns tecidos da mesma planta pode também ser uma explicação da dificuldade em obter um produto de PCR com uma banda bem visível. Este fenómeno não foi avaliado pelo facto de a cassette pE7113-CP não ter um gene repórter. Segundo Domínguez *et al.* (2002a), a ausência de selecção por acção de um antibiótico pode também estar associada ao aumento do silenciamento dos transgenes que pode chegar a ocorrer em mais de 30% das plantas transformadas.

A resistência ao CTV poderá ser induzida por vários mecanismos que envolvem a expressão do gene da CP ou a degradação do mRNA (Fagard e Vaucheret, 2000). Na planta 151 não há expressão do gene da CP e uma vez que o respectivo mRNA está ausente, é pressuposto que esta planta não apresenta resistência ao CTV.

Os estudos de Domínguez *et al.* (2002b) revelam que plantas de limeira mexicana transformadas com o gene da CP de um isolado “mild” (T-317) ou “stem pitting” (T-305), não apresentam diferenças significativas quando a resistência é testada com isolados de diversas características biológicas. No entanto, os autores atribuem uma maior resistência às plantas transformadas com uma estirpe severa, apesar dos seus resultados não serem significativos do ponto de vista estatístico. O uso de isolados “mild” e “stem pitting” num processo de transformação, foi também referido por Febres *et al.* (2003) e da mesma forma foi mencionada a semelhança nos sintomas das plantas, quando infectadas com o isolado “stem pitting” T36. As plantas de laranjeira azeda cv. Brazilian foram transformadas com a CP de uma estirpe “mild” do CTV. Os ensaios de resistência ao CTV não foram efectuados, mas de acordo com os estudos referidos acima, as plantas poderão ser também resistentes aos isolados “stem pitting”.

Foram referidos outros estudos de transformação de sementes germinadas pelo corte de um dos cotilédones, nas plantas herbáceas *Helianthus annuus* L. (Rao e Rohini, 1999) e *Arachis hypogaea* L. (Rohini e Rao, 2000). De acordo com a bibliografia disponível, este protocolo de transformação de sementes germinadas, mediado pela bactéria *Agrobacterium*, constitui uma primeira abordagem em plantas lenhosas. Através deste protocolo, que necessita ser melhorado, evita-se a cultura *in vitro* e a

variação somaclonal que muitas vezes lhe está associada, além de ser um processo simples de executar e económico. As plântulas obtidas por este processo de transformação apresentam também um sistema radicular desenvolvido que lhes permite crescer com vigor sobre a sua própria raíz, tal como foi feito, podendo também ser enxertadas numa planta já desenvolvida. As plantas que resultaram do desenvolvimento das sementes transformadas não apresentaram alterações fenotípicas (ver Est. IV-C, D e E).

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que plântulas de laranjeira azeda com apenas 1, 5 ou 7 dias de germinação são susceptíveis de serem transformadas e que o corte de um dos cotilédones constitui uma via de indução da transformação.

Neste trabalho estudou-se a variabilidade genómica da extremidade 3' do genoma do CTV de um conjunto de isolados e clones com diversas origens geográficas e com características biológicas conhecidas. Foram estudados os genes das proteínas p25, p18, p13, p20, p23 e a região 3'UTR. Foi também estudada a região intergénica entre os genes das proteínas p18 e p13. As regiões genómicas foram isoladas por IC/RT-PCR e extensivamente analisadas por SSCP. Foi verificada a existência de uma população de variantes genómicas com uma distribuição característica de uma estrutura “quasispecies”. Foram também detectadas populações bi-modais que, após análise por sequenciação, foi confirmado englobarem variantes genómicas pertencentes a mais de um grupo de isolados e cuja origem pode estar numa infecção múltipla. A ausência de recombinação de populações de variantes genómicas diferentes numa mesma planta sugere que a replicação ocorra em compartimentos separados a nível celular. Através da análise de SSCP traduzida em valores de heterozigocidade e dos resultados de sequenciação, foi possível concluir que as regiões genómicas menos conservadas englobam os genes da p18, da p13 e a respectiva região intergénica, enquanto a região mais conservada é a região 3'UTR. Os isolados e clones do GenBank de sequência conhecida foram analisados conjuntamente sob a forma de dendrogramas, donde se pôde inferir uma clara semelhança nos agrupamentos das 6 regiões genómicas, incluindo a região intergénica. Em regra, os isolados e os clones ficaram agrupados de acordo com as respectivas características biológicas e também foi notório a maior proximidade, em cada agrupamento, dos que apresentavam as mesmas origens geográficas.

A técnica CFLP foi aplicada ao estudo da variabilidade genómica do gene p25 ou gene da proteína do capsídeo (CP). Esta técnica revelou-se eficaz na discriminação de 16 clones com uma identidade nucleotídica superior a 90% e detectou diferenças entre dois isolados que diferiam em apenas 2 nucleótidos. Esta capacidade de análise é especialmente adequada para comparar genes virais, uma vez que as variantes de um isolado normalmente compartilham mais de 85% de identidade nucleotídica. A presença de um padrão com cerca de 15 a 20 bandas garante um poder discriminativo muito superior ao SSCP. Clones e isolados do gene da CP obtidos por IC/RT-PCR foram analisados e ficaram agrupados de acordo com a respectiva sequência nucleotídica e características biológicas. A análise CFLP também incidiu sobre uma mistura de isolados com uma componente “mild” e uma componente “stem pitting” que originam sintomas “stem pitting”. O agrupamento dos isolados próximo dos isolados com sintomas “stem pitting” revela a detecção deste componente, um factor importante para

a posterior erradicação da planta portadora. A análise da CP do CTV através desta técnica mostrou que, embora mais dispendiosa, é uma alternativa mais eficiente que a técnica SSCP na tipificação dos isolamentos virais. A técnica CFLP poderá também substituir a sequenciação na detecção de variantes genómicas, uma vez que é muito precisa e mais económica.

O gene da CP do isolado 25 tipificado como “mild” foi integrado no vector de transformação pBI121 para ser posteriormente usado no processo de transformação de *Citrus aurantium* L. (laranjeira azeda) cv. Brazilian mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. A cassette pE7113 em que foi integrado, além do promotor CaMV, contém também uma sequência  $\Omega$  e um “enhancer” que aumentam a tradução e a expressão do gene. A integração estável do gene da CP no genoma de *Nicotiana tabacum* mostrou que a construção podia ser usada na transformação de *Citrus* spp..

Na regeneração *de novo* a partir de segmentos de entrenós de plantas com cerca de 12 meses, formaram-se rebentos adventícios no meio de cultura D, suplementado com diferentes combinações das hormonas BA e NAA. A frequência de rebentos adventícios formados por segmento de entrenó (93%) foi superior aos resultados divulgados por estudos similares noutras espécies de *Citrus* spp.. Os resultados deste estudo foram usados no processo de transformação genética de laranjeira azeda cv. Brazilian.

A transformação genética de laranjeira azeda mediada pelo *A. tumefaciens* foi conseguida através de dois processos distintos. O processo de transformação de rebentos adventícios formados a partir de segmentos de entrenós foi mediado pela estirpe C58 e pela estirpe EHA105, transportando o plasmídeo p35SGUSINT. O resultado da eficiência de transformação, baseado na detecção da enzima  $\beta$ -glucuronidase nos rebentos adventícios, foi de 5,1% para a estirpe EHA105 p35SGUSINT e de 6,3% para a estirpe C58 p35SGUSINT. Este resultado está enquadrado nos resultados de transformação de *Citrus* spp. até agora publicados. O resultado da análise Southern Blot confirmou a integração estável do gene *uidA*, enquanto a detecção do mRNA do mesmo gene e da expressão da  $\beta$ -glucuronidase em tecido foliar confirmaram a sua transcrição e tradução, respectivamente. A transformação de sementes com 1, 5 e 7 dias de germinação, mediada pela estirpe EHA105 transportando a cassette pE7113-CP, foi conseguida e foram obtidas plantas transgénicas com o gene da CP. Os resultados da análise de PCR, Taqman, Southern Blot e sequenciação em plantas com 2 anos confirmaram a sua transformação. A ausência de um gene repórter na construção usada implicou a análise de todas as plantas sujeitas ao processo de transformação. A maior frequência de transformação foi de 13,6%, obtida nas sementes com 5 dias de germinação. A presença de um quimerismo elevado nas plantas desenvolvidas por este processo poderá ser minimizada pelo estudo de outros processos de transformação que envolvam outras zonas de corte que abranjam

maior número de células sem comprometer o crescimento e o desenvolvimento da planta.

O trabalho realizado cumpre os objectivos propostos, uma vez que as análises de variabilidade genómica efectuadas à região terminal 3' do CTV deram a conhecer a região 3'UTR como a mais conservada. Os dois protocolos de transformação de *C. aurantium* testados deram origem a plantas transformadas e abrem caminho para a transformação com genes de regiões conservadas do CTV e eventualmente com outros genes de interesse agronómico.

# ANEXO I

A composição de tampões e de algumas das soluções usadas vem descrita na Tabela 1. Na Tabela 2 descreve-se a composição dos meios de cultura usados.

**Tabela 1** – Composição dos tampões e de algumas das soluções usadas.

Soluções	COMPOSIÇÃO	pH	Referência da empresa que comercializa
<b>Tampões</b>			
Tampão carbonato	Carbonato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 15 mM; hidrogeno-carbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) 35 mM; azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ) 3 mM;	9,6	**
Tampão da Cleavase	Tris-HCl 20 mM a pH 8; Cloreto de potássio (KCl) 50 mM; Tween 20 a 0,5%; Nonidet P40 a 0,5%; “bovine serum albumine” 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; glicerol a 50%	*	**
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino propano sulfônico)	7,5	**
One-Phor-All (OPA)	Tris-acetato 100 mM pH 7,5; acetato de magnésio 100 mM; acetato de potássio 500 mM	*	Amersham Biosciences., ref. 27-0901
PBS 1x	Cloreto de sódio (NaCl) 137 mM; hidrogeno-fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1,5 mM; hidrogeno-fosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 8 mM; cloreto de potássio 2,7 mM; azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ) 3 mM	7,4	**
PBS-Tween	Tampão PBS; Tween 20 a 0,05%	*	**
TAE 1x	Tris-Base 40 mM; ácido acético glacial 19 mM; EDTA 1 mM, pH 7,4	8,3	**
TBE 1x	Tris-borato 89 mM; EDTA 2 mM, pH 8,3	8,3	**
Tampão da Eco RI	Tris-HCl 500 mM a pH 7,5; cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ) 100 mM; ditiotreitól 10 mM; cloreto de sódio 1000 mM	*	Amersham Biosc., ref. E1040Y
Tampão da Taq DNA polimerase	Tris-HCl 100 mM a pH 8,8; Cloreto de potássio 500 mM; Nonidet P40 a 0,8%.	*	Fermentas, ref. B16
Tampão de extracção de DNA genómico	Tris-HCl 200 mM pH 7,5; Cloreto de sódio 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5%	*	**
Tampão de extracção de proteínas	Tampão PBS; PVP a 2% (MW 25 kDa); Tween 20 a 0,05%	7,4	**
Tampão de ligação no vector pCR <sup>®</sup> II	Tris-HCl 60 mM pH 7,5; cloreto de magnésio 60 mM; cloreto de sódio 50 mM; BSA 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; $\beta$ -mercaptoetanol 70 mM; ATP 1 mM; ditiotreitól 20 mM; espermidina 10 mM	*	Invitrogen <sup>®</sup> , ref. K2050-01
Tampão de ligação no vector pGEM <sup>®</sup> T-Easy	Tris-HCl 60 mM pH 7,8; Cloreto de magnésio 20 mM; DTT 20 mM; ATP 2 mM; polietilenoglicol MM 8000 a 10%	*	Promega, ref. A1360
<b>Soluções</b>			
“focusing solution”	TAE pH 8; sacarose 10%; acetato de sódio 3 M pH 6, 10%	*	**
BCIP-NBT	45 $\mu\text{l}$ de cloreto de 4-nitroblue tetrazolium (NBT) a 75 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , em 70% de dimetilformamida; 35 $\mu\text{l}$ de 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) a 50 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em dimetilformamida	*	**
Solução desnaturante de formamida	Formamida 940 $\mu\text{l}$ ; EDTA 20 mM; azul de bromofenol 500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	*	**
Solução de nitrato de prata	Nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) 1 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; 1,5 $\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$ de formaldeído a 37%	*	**
Solução de terminação	Formamida a 95%; EDTA 10 mM, pH 8; xileno-cianol a 0,05%; azul de bromofenol a 0,05%	*	**
Solução de revelação	Carbonato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 30 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; 1,5 $\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$ de formaldeído a 37%; tiossulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	*	**
SSC 20x	Cloreto de sódio (NaCl) 3 M; citrato de sódio ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ ) 0,3 M	7,0	**
X-gal	X-gal 40 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , em dimetilformamida	*	**
X-gluc	Tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7; solução de ferricianeto ( $\text{K}_3\text{FeCN}_6$ ) e ferrocianeto de potássio ( $\text{K}_4\text{FeCN}_6$ ) a 50 mM, em partes iguais, Triton X-100 0,1%, X-gluc 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; cloranfenicol 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	*	**

\* = não determinado

\*\* = não se aplica

**Tabela 2** – Composição dos meios de cultura.

Meios de cultura	COMPOSIÇÃO	pH
LB líquido	Bacto-triptona 10 g.l <sup>-1</sup> ; extracto de levedura 5 g.l <sup>-1</sup> ; cloreto de sódio 10 g.l <sup>-1</sup>	7,2
LB sólido	A mesma composição do meio LB líquido, com bacto-agar 15 g.l <sup>-1</sup>	7,2
D	Este meio consiste no meio MS (Murashige e Skoog, 1962) modificado, suplementado com 0,2 mg.l <sup>-1</sup> de tiamina, 1 mg.l <sup>-1</sup> de piridoxina e 1 mg.l <sup>-1</sup> de ácido nicotínico, segundo Duran-Vila <i>et al.</i> (1989) e com 50 g.l <sup>-1</sup> de sacarose. O meio foi solidificado com 8 g.l <sup>-1</sup> de bacto-agar e foi autoclavado a 120 °C à pressão de 1 atmosfera.	5,7
MS semi-sólido	Meio de Murashige e Skoog (1962). O meio foi solidificado com 8 g.l <sup>-1</sup> de agar e foi autoclavado a 120 °C à pressão de 1 atmosfera.	5,7
MS líquido	A mesma composição do meio MS semi-sólido, sem adição de agar	5,7
MS sem compostos orgânicos	Tem a mesma composição em macronutrientes e micronutrientes do meio MS semi-sólido (Murashige e Skoog, 1962), sem adição de vitaminas e sacarose. Quando foi preparado na forma líquida, não foi adicionado agar.	5,7
Regeneração de tabaco	Este meio consiste no meio MS modificado, com as seguintes alterações: não tem glicina e foi suplementado com 20 mg.l <sup>-1</sup> de adenina, 10 mg.l <sup>-1</sup> de timina, 250 mg.l <sup>-1</sup> de L-glutamina, 2 mg.l <sup>-1</sup> de benziladenina (BA) e 0,2 mg.l <sup>-1</sup> de ácido indolacético (IAA). O meio foi solidificado com 5 g.l <sup>-1</sup> de agargel e foi autoclavado a 120 °C à pressão de 1 atmosfera.	5,8
RMIN	Este meio baseia-se no meio MS, com algumas modificações: não tem glicina e é suplementado com 1 mg.l <sup>-1</sup> de cada uma das vitaminas ácido nicotínico, piridoxina-HCl e tiamina-HCl e com 20 g.l <sup>-1</sup> de sacarose. O meio foi solidificado com agargel (5 g.l <sup>-1</sup> ) e foi autoclavado a 120 °C à pressão de 1 atmosfera.	5,8
SOC	Extracto de levedura a 0,5%; triptona a 2%; Cloreto de sódio 10 mM; cloreto de potássio 2,5 mM; cloreto de magnésio 10 mM; sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> ) 10 mM; glucose 20 mM	

**Tabela 3** – Antibióticos utilizados, concentração usada e modo de esterilização.

Designação	Forma de apresentação do antibiótico	Preparação por dissolução em:	Esterilização da solução de antibiótico	Concentração final a que foi usado (µg.ml <sup>-1</sup> )	Referência do antibiótico
Ampicilina	Pastilhas esterilizadas	Meio de cultura LB	*	50	Stratagene, 300020
Canamicina	Solução esterilizada	*	*	50-150	Sigma, K-0254
Cefotaxima	Pó	Água esterilizada	Filtração em poro de 0,2 µm	500	Duchefa, C 0111
Cloranfenicol	Pó	Etanol a 95%	*	ver Tabela 1 (solução X-gluc)	Sigma, C1919
Rifampicina	Pó	Metanol	*	50	Duchefa, R 0146

\* = não se aplica



```

      250      260      270      280      290      300      310      320
....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T30   TCCTTTGGCTTATTTGTTAAAAATTAGCGAAAACGACTACTACTATTTGTTTACCATGTCCAA-TAAGGTTCTTTTGGT
19.7  TCCTTTGGCTTATTTGTTAAAAATTAGCGAAAACGACTACTACTATTTGTTTACCATGTCCAA-AAAGGTTCTTTTGGT
25.8  TCCTTTGGCTTATTTGTTAAAAATTAGCGAAAACGACTACTACTATTTGTTTACCATGTCCAA-TAAGGTTCTTTTGGT
T385  TCCTTTGGCTTATTTGTTAAAAATTAGCGAAAACGACTACTACTATTTGTTTACCATGTCCAA-TAAGGTTCTTTTGGT
T36   TCCTTTGGCTTATTTGTTAAAAATTAGCGAAAACGACTACTACTATTTGTTTACTATGTCTAA-TAAGGTTCTTTTGGT
14.3  TCCTTTGGCTTATTTGTTAAAAATTAGCGAAAACGACTACTACTATTTGTTTACTATGTCTAA-TAAGGTTCTTTTGGT
8.2   TCCTTTGGCTTATTTGTTAAAAATTAGCGAAAACGACTACTACTATTTGTTTACTATGTCTAA-TAAGGTTCTTTTGGT
11.4  TCCTTTGGCTTATTTGTTAAAAATTAGCGAAAACGACTACTACTATTTGTTTACTATGTCTAA-TAAGGTTCTTTTGGT
NUagA TCCTTTGGCTTATTTGTTAAAAATTAGCGAAAACGACTACTACTATTTGTTTACTATGTCTAA-TAAGGTTCTTTTGGT
SY568 TCCTTTGGCTTATTTGTTAAAAATTAGCGAAAACGACTACTACTATTTGTTTACTATGTCTAA-TAAGGTTCTTTTGGT
152.7 CCCTTTGGCTTATTTGTTAAAGATTAGCGAAAACGACTACTACTATTTGTTTACTATGTCTAA-TAAGGTTCTTTTGGT
VT     CCCTTTGGCTTATTTGTTAAAAATTAGCGAAAACGACTACTACTATTTGTTTACTATGTCTAA-TAAGGTTCTTTTGGT
142.13 TCCTTTGGCTTACTTGTAAAAATTAGCGAAAACGACTACTACTATTTGTTTCACTATGTCTAA-TAAGGTTCTTTTGGT
136.2  CCCTTTGGCTTATTTGTTAAAAATTAGCGAAAACGACTACTACTATTTGTTTACTATGTCTAA-TAAGGTTCTTTTGGT
11.5   CCCTTTGGCTCCTTTGTTAAAAATTAGCGAAAACGACTACTACTATTTGTTTACTATGTCTAA-TAAGGTTCTTTTGGT
15.16  CCCTTTGGCTCATTGTTAAAAATTAGCGAAAACGACTACTACTATTTGTTTACTATGTCTAA-TAAGGTTCTTTTGGT
11.7   CCCTTTGGCTTATTTGTTAAAAATTAGCGAAAACGACTACTACTATTTGTTTACTATGTCTAA-TAAGGTTCTTTTGGT
142.12 CCCTTTGGCTTATTTGTTAAAAATTAGCGAAAACGACTACTACTATTTGTTTACTATGTCTAA-TAAGGTTCTTTTGGT
142.14 CCCTTTGGCTTATTTGTTAAAAATTAGCGAAAACGACTACTACTATTTGTTTCACTATGTCTAA-TAAGGTTCTTTTGGT
Consensus  ** ** ** * ** ** ** **

```

```

      330      340      350      360      370      380      390      400
....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T30   ACTACCAAATCCGAACCACTTAGTTGTTTACGTCGCGATCGAGTTTATTCAAAGTTATTATGGGCGCTAACGT
19.7  ACTACCAAATCCGAACCACTTAGTTGTTTACGTCGCGATCGAGTTTATTCAAAGTTATTATGGGCGCTAACGT
25.8  ACTACCAAATCCGAACCACTTAGTTGTTTACGTCGCGATCGAGTTTATTCAAAGTTATTATGGGCGCTAACGT
T385  ACTACCAAATCCGAACCACTTAGTTGTTTACGTCGCGATCGAGTTTATTCAAAGTTATTATGGGCGCTAACGT
T36   ACTACTAAATCCGAACCACTTAGTTGTTTACGTCGCGATCGAGTTTATTCAAAGTTATTATGGGCGCTAACGT
14.3  ACTACTAAATCCGAACCACTTAGTTGTTTACGTCGCGATCGAGTTTATTCAAAGTTATTATGGGCGCTAACGT
8.2   ACTACTAAATCCGAACCACTTAGTTGTTTACGTCGCGATCGAGTTTATTCAAAGTTATTATGGGCGCTAACGT
11.4  ACTACTAAATCCGAACCACTTAGTTGTTTACGTCGCGATCGAGTTTATTCAAAGTTATTATGGGCGCTAACGT
NUagA ACTACTAAATCCGAACCACTTAGTTGTTTACGTCGCGATCGAGTTTATTCAAAGTTATTATGGGCGCTAACGT
SY568 ACTACTAAATCCGAACCACTTAGTTGTTTACGTCGCGATCGAGTTTATTCAAAGTTATTATGGGCGCTAACGT
152.7 ACTACTAAATCCGAACCACTTAGTTGTTTACGTCGCGATCGAGTTTATTCAAAGTTATTATGGGCGCTAACGT
VT     ACTACTAAATCCGAACCACTTAGTTGTTTACGTCGCGATCGAGTTTATTCAAAGTTATTATGGGCGCTAACGT
142.13 ACTACTAAATCCGAACCACTTAGTTGTTTACGTCGCGATCGAGTTTATTCAAAGTTATTATGGGCGCTAACGT
136.2  ACTACTAAATCCGAACCACTTAGTTGTTTACGTCGCGATCGAGTTTATTCAAAGTTATTATGGGCGCTAACGT
11.5   ACTACTAAATCCGAACCACTTAGTTGTTTACGTCGCGATCGAGTTTATTCAAAGTTATTATGGGCGCTAACGT
15.16  ACTACTAAATCCGAACCACTTAGTTGTTTACGTCGCGATCGAGTTTATTCAAAGTTATTATGGGCGCTAACGT
11.7   ACTACTAAATCCGAACCACTTAGTTGTTTACGTCGCGATCGAGTTTATTCAAAGTTATTATGGGCGCTAACGT
142.12 ACTACTAAATCCGAACCACTTAGTTGTTTACGTCGCGATCGAGTTTATTCAAAGTTATTATGGGCGCTAACGT
142.14 ACTACTAAATCCGAACCACTTAGTTGTTTACGTCGCGATCGAGTTTATTCAAAGTTATTATGGGCGCTAACGT
Consensus  ***** ** ** ** * ** ** *

```

```

      410      420      430      440      450      460      470      480
....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T30   TGATGATTCGCGTGCGGCTGCAGTATTTGGTTTACAACAATGGTACGTTTCAAACCGGATTGACCCGTTGTAATAATC
19.7  TGATGATTCGCGTGCGGCTGCAGTATTTGGTTTACAACAATGGTACGTTTCAAACCGGATTGACCCGTTGTAATAATC
25.8  TGATGATTCGCGTGCGGCTGCAGTATTTGGTTTACAACAATGGTACGTTTCAAACCGGATTGACCCGTTGTAATAATC
T385  TGATGATTCGCGTGCGGCTGCAGTATTTGGTTTACAACAATGGTACGTTTCAAACCGGATTGACCCGTTGTAATAATC
T36   TGACGATTCGCGATGCGGCTGCAGTATTTGGTTTACAACAACGGTACGTTTCAAATGGATTGATCCGTTGTAATAATC
14.3  TGATGATTCGCGATGCGGCTGCAGTATTTGGTTTACAACAATGGGACGTTTCAAACCGGTTGACCCGTTGTAATAATC
8.2   TGATGATTCGCGATGCGGCTGCAGTATTTGGTTTACGACAATGGGACGTTTCAAACCGGTTGACCCGTTGTAATAATC
11.4  TGATGATTCGCGATGCGGCTGCAGTATTTGGTTTACAACAATGGGACGTTTCAAACCGGTTGACCCGTTGTAATAATC
NUagA TGATGATTCGCGATGCGGCTGCAGTATTTGGTTTACAACAATGGGACGTTTCAAACCGGTTGACCCGTTGTAATAATC
SY568 TGATGATTCGCGATGCGGCTGCAGTATTTGGTTTACAACAATGGGACGTTTCAAACCGGTTGACCCGTTGTAATAATC
152.7 TGATGATTCGCGATGCGGCTGCAGTATTTGGTTTACAACAATGGGATTTTCAAATGGGTTGACCCGTTGTAATAATC
VT     TGATGATTCGCGATGCGGCTGCAGTATTTGGTTTACAACAATGGGATGTTTCAAATGGGTTGACCCGTTGTAATAATC
142.13 TGATGATTCGCGATGCGGCTGCAGTATTTGGTTTACAACAATGGGACGTTTCAAACCGGTTGACCCGTTGTAATAATC
136.2  TGATGATTCGCGATGCGGCTGCAGTATTTGGTTTACAACAATGGGACGTTTCAAACCGGTTGACCCGTTGTAATAATC
11.5   TGATGATACTCGATGCGGTTGCAGTATCTGGTTTACAACAATGGAATGTTTCGAAACCGGATTGACCCGTTGTAATAATC
15.16  TGATGATACTCGATGCGGTTGCAGTATCTGGTTTACAACAATGGAATGTTTCGAAACCGGATTGACCCGTTGTAATAATC
11.7   TGATGATACTCGATGCGGTTGCAGTATCTGGTTTACAACAATGGAATGTTTCGAAACCGGATTGACCCGTTGTAATAATC
142.12 TGATGATACTCGATGCGGTTGCAGTATCTGGTTTACAACAATGGAATGTTTCGAAACCGGATTGACCCGTTGTAATAATC
142.14 TGATGATACTCGATGCGGTTGCAGTATCTGGTTTACAACAATGGAATGTTTCGAAACCGGATTGACCCGTTGTAATAATC
Consensus  *** ** * ** * ** ** *

```

```

      490      500
....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T30   TCGTCACTTTGTTTAGCGCGACTTAG
19.7  TCGTCACTTTGTTTAGCGCGACTTAG
25.8  TCGTCACTTTGTTTAGCGCGACTTAG
T385  TCGTCACTTTGTTTAGCGCGACTTAG
T36   TCGTCACTTTGTTTAGCGCGACTTAG
14.3  TCGTCACTTTGTTTAGCGCGACTTAG
8.2   TCGTCACTTTGTTTAGCGCGACTTAG
11.4  TCGTCACTTTGTTTAGCGCGACTTAG
NUagA TCGTCACTTTGTTTAGCGCGACTTAG
SY568 TCGTCACTTTGTTTAGCGCGACTTAG
152.7 TCGTCACTTTGTTTAGCGCGACTTAG
VT     TCGTCACTTTGTTTAGCGCGACTTAG
142.13 TCGTCACTTTGTTTAGCGCGACTTAG
136.2  TCGTCACTTTGTTTAGCGCGACTTAG
11.5   TCGTCACTTTGTTTAGTGCAGACTTAG
15.16  TCGTCACTTTGTTTAGTGCAGACTTAG
11.7   TCGTCACTTTGTTTAGTGCAGACTTAG
142.12 TCGTCACTTTATTTAGTGCAGACTTAG
142.14 TCGTCACTTTATTTAGTGCAGACTTAG
Consensus  *****

```



```

                250      260      270      280      290      300      310      320
                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
T30             TCTGATCGCACTAACGTTTCAGAGATTGTCGAATCGCATGTAAGCGACCGAGACAGAATGCACATCTTGTTCGTAATAA
T385           TCTGATCGCACTAACGTTTCAGAGATTGTCGAATCGCATGTAAGCGACCGAGACAGAATGCACATCTTGTTCGTAATAA
19.7          TCTGATCGCACTAACGTTTCAGAGATTGTCGAATCGCATGTAAGCGACCGAGACAGAATGCACATCTTGTTCGTAATAA
25.8          TCTGATCGCACTAACGTTTCAGAGATTGTCGAATCGCATGTAAGCGACCGAGACAGAATGCACATCTTGTTCGTAATAA
142.13       GCTGATCGCACTAACATTTTCAGAGATTGTCGAATCGCATATAAGCGACCGAGACAGAATGAAATATCTTGTTCGTAATAA
136.2       GCTGATCGCACTAACATTTTCAGAGATTGTCGAATCGCATGTGAGCGACCGAGACAGAATGAAATATCTTGTTCGTAATAA
SY568       GCTGATCGCACTAACGTTTCAGAGATTGTCGAATCGCATATGAGCGACCGAGACAGAATGAAATATCTTGTTCGTAATAA
NUagA       GCTGATCGCGCTAACGTTTCGAGATTGTCGAATCGCATGTGAGCGACCGAGACAGAATGAAATATCTTGTTCGTAATAA
11.4       GCTGATCGCGCTAACGTTTCAGAGATTGTCGAATCGCATGTGAGCGACCGAGACAGAATGAAATATCTTGTTCGTAATAA
14.3       GCTGATCGCGCTAACGTTTCAGAGATTGTCGAATCGCATGTGAGCGACCGAGACAGAATGAAATATCTTGTTCGTAATAA
8.2       GCTGATCGCGCTAACGTTTCAGAGATTGTCGAATCGCATGTGAGCGACCGAGACAGAATGAAATATCTTGTTCGTAATAA
28.16      GCTGATCGCGCTAACGTTTCGAGATTGTCGAATCGCATATGAGCGATCGAGACAGAATGAGTATCTTGTTCGTAATAA
152.7      GCTGATCGCGCTAACGTTTCGAGATTGTCGACTCGCATATGAGCGATCGAGACAGAATGAGTATCTTGTTCGTAATAA
VT         GCTGATCGCGCTAACGTTTCGAGATTGTCGAATCGCATGTGAGCGATCGAGACAGAATGAAATATCTTGTTCGTAATAA
T36       GCTGATCGCACTAACGTTTCAGAAATGTCGAATCGCATGTGAGCGACCGAGACAGATGAGCATCTTGTTCGTAATAA
11.5      GCTGATCGCGCTAATATTTTCAGAAATGTCGAATCGCATGTAAGCGACCGAGACAGAATGAAATTTTGTTCGTAACAA
11.7      GCTGATCGCGCTAATATTTTCAGAAATGTCGAATCGCATGTAAGCGACCGAGACAGAATGAAATTTTGTTCGTAACAA
15.16     GCTGATCGCGCTAATATTTTCAGAAATGTCGAATCGCATGTAAGCGACCGAGACAGAATGAAATTTTGTTCGTAACAA
142.12    GCTGATCGCGCTAATATTTTCAGAAATGTCGAATCGCATGTAAGCGACCGAGACAGAATGAAATTTTGTTCGTAACAA
142.14    GCTGATCGCGCTAATATTTTCAGAAATGTCGAATCGCATGTAAGCGACCGAGACAGAATGAAATTTTGTTCGTAACAA
Consensus ***** * ** **** * ***** ***** * ***** ***** ** * * ***** **

```

```

                330      340
                ....|....|....|....|..
T30             GCGGATCCAGATTCCCTTCGCT-
T385           GCGGATCCAGATTCCCTTCGCT-
19.7          GCGGATCCAGATTCCCTTCGCT-
25.8          GCGGATCCAGATTCCCTTCGCT-
142.13       GCGGATCCAGATTCCCTTCGCT-
136.2       GCGGATCCAGATTCCCTTCGCT-
SY568       GCGGATCCAGATTCCCTTCGCT-
NUagA       GCGGATCCAGATTCCCTTCGCT-
11.4       GCGGATCCAGATTCCCTTCGCT-
14.3       GCGGATCCAGATTCCCTTCGCT-
8.2       GCGGATCCAGATTCCCTTCGCT-
28.16      GCGGATCCAGATTCCCTTCGCT-
152.7      GCGGATCCAGATTCCCTTCGCT-
VT         GCGGATCCAGATTCCCTTCGCT-
T36       GCGGATCCAAATTCCTTCGCT-
11.5      GCGTATCCAAATCCCATCGCT-
11.7      GCGTATCCAAATCCCATCGCT-
15.16     GCGGATCCAAATCCCATCGCT-
142.12    GCGGATCCAAATCCCATCGCT-
142.14    GCGGANCCAAATCCCATCGCT-
Consensus *** * *** ** ***

```

**Fig. 3** - Alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas da região intergênica entre os genes p18 e p13, dos clones e de sequências do GenBank. Encontra-se a sombreado os nucleótidos que são comuns às sequências, enquanto a ausência de sombreado assinala a posição de um nucleótido diferente.

```

          10      20      30
    ....|....|....|....|....|....|....|
T30      ACACGAAGTGACCGTTCGGA--TTTAATTGCTGCG
T385     ACACGAAGTGACCGTTCGGA--TTTAATTGCTGCG
19.7     ACACGAAGTGACCGTTCGGA--TTTAATTGCTGCG
25.8     ACACGAAGTGACCGTTCGGA--TTTAATTGCTGCG
T36      ACACGAAGTGACTGTTTCGGA--TTC AATTGCTGCA
11.5     ACACGAAGTGCCCGTTAGGA--TTTAATTGCTGCA
11.7     ACACGAAGTGCCCGTTAGGA--TTTAATTGCTGCA
142.12   ACACGAAGTGCCCGTTAGGA--TTTAATTGCTGCA
142.14   ACACGAAGTGCCCGTTAGGA--TTTAATTGCTGCA
15.16    ACACGAAGTGCCCGTTAGGA--TTTAATTGCTGCA
SY568    ACACGAAGTGACCGTTCGGG--TTTAATTGCTGCA
NUagA    ACACGAAGTGACCGTTCGGG--TTTAATTGCTGCA
28.16    ACACGAAGTGACCGTTCGGG--TTTAATTGCTGCA
152.7    ACACGAAGTGACCGTTCGGG--TTTAATTGCTGCA
11.4     ACACGAAGTGACCATTCGGG--TTTAATTGCTGCA
14.3     ACACGAAGTGACCATTCGGG--TTTAATTGCTGCA
8.2      ACACGAAGTGACCATTCGGG--TTTAATTGCTGCA
142.13   ACACGAAGTGACCGTTCGGG--TTTAAATGTTGCA
136.2    ACACGAAGTGACCGTTCGGG--TTTAAATGCTGCA
VT       ACACGAAGTGACCGCTTCGCGCTTTAATTGCTGCA
Consensus ***** * * * * *

```



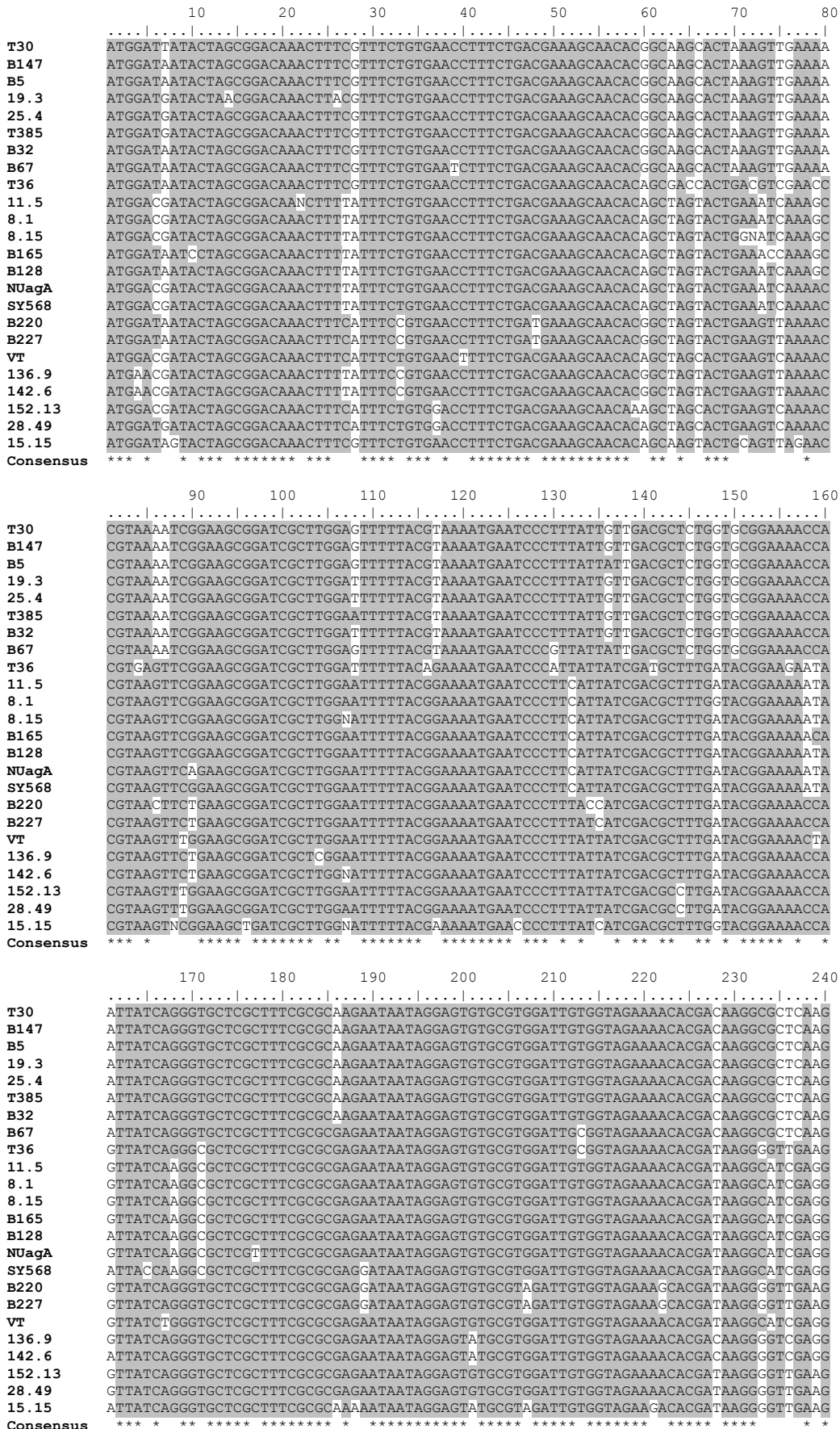


```

          490          500          510
    ....|....|....|....|....|....|.
T30      CCGTTTGCGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
11.4    CCGTTTGCGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
14.6    CCGTTTGCGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
8.5     CCGTTTGCGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
107     CCGTTTGCGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
14.9    CCGTTTGCGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
SY568   CCGTTTGCGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
NUagA   CCGTTTGCGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
152.12 CCGTTTGCGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
28.2   CCGTTTGCGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
VT      CTGTTTGCGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
136.2  CCGTTTGTGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
142.9  CCGTTTGTGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
T36    CCGTTTGCGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
65     CCGTTTGCGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
15.22  CCGTTTGCGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
T385   CCGTTTGCGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
25.11 CCGTTTGCGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
19.1  CCGTTTGCGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
190   CCGTTTGCGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
122   CCGTTTGCGGTCAGTTTGACATTAATTTAGT
Consensus * ***** *****

```

**Fig. 5** - Alinhamento múltiplo das seqüências nucleotídicas da região genômica p23 dos clones e de seqüências do GenBank. Encontra-se a sombreado os nucleotídios que são comuns às seqüências, enquanto a ausência de sombreado assinala a posição de um nucleotídeo diferente.









## ANEXO III

### Matrizes de identidade nucleotídica dos clones sequenciados e dos isolamentos de sequência nucleotídica conhecida

14.3																				
8.2	99.8																			
11.4	99.8	100.0																		
NUagA	98.8	99.0	99.0																	
SY568	97.8	98.0	98.0	97.8																
28.16	96.8	97.0	97.0	97.2	96.2															
152.7	96.2	96.4	96.4	96.6	95.6	98.6														
VT	96.2	96.4	96.4	96.2	95.2	97.8	97.6													
19.7	93.8	94.0	94.0	94.2	93.2	94.2	93.6	93.2												
T30	93.6	93.8	93.8	94.0	93.0	94.0	93.4	93.0	99.4											
25.8	93.8	94.0	94.0	94.2	93.2	94.2	93.6	93.2	99.6	99.4										
T385	93.8	94.0	94.0	94.2	93.2	94.2	93.6	93.2	99.6	99.4	99.6									
T36	92.8	93.0	93.0	93.2	93.0	94.0	93.4	93.4	95.4	95.2	95.4	95.4								
142.13	94.0	94.2	94.2	94.4	93.8	94.0	93.4	93.0	93.0	92.8	93.0	93.0	92.8							
136.2	94.0	94.2	94.2	94.4	93.4	94.0	93.8	93.4	92.2	92.0	92.2	92.2	92.0	97.6						
11.5	90.2	90.4	90.4	91.0	89.6	91.0	90.4	90.0	89.4	89.2	89.4	89.6	90.0	90.8	90.8					
15.16	90.8	91.0	91.0	91.6	90.2	91.6	91.0	90.6	90.0	89.8	90.0	90.2	90.6	91.4	91.4	99.4				
11.7	90.4	90.6	90.6	91.2	89.9	91.2	90.6	90.2	89.7	89.5	89.7	89.9	90.2	91.0	91.0	99.0	99.6			
142.12	88.9	89.1	89.1	89.7	88.3	89.7	89.1	88.7	88.1	87.9	88.1	88.3	88.7	89.9	89.5	95.0	95.6	95.6		
142.14	89.8	90.0	90.0	90.6	89.2	90.6	90.0	89.6	89.0	88.8	89.0	89.2	89.6	91.2	90.8	96.4	97.0	96.6	98.2	
	14.3	8.2	11.4	NUagA	SY568	28.16	152.7	VT	19.7	T30	25.8	T385	T36	142.13	136.2	11.5	15.16	11.7	142.12	142.14

**Fig. 1** - Matriz de identidade nucleotídica (%) da região genómica p18.

14.3	100																				
8.2	100	100																			
SY568	96,4	96,4	96,4																		
NUagA	97,0	97,0	97,0	97,0																	
152.7	91,8	91,8	91,8	92,1	92,1																
28.16	92,9	92,9	92,9	93,2	93,2	98,8															
VT	93,2	93,2	93,2	92,9	93,5	97,3	98,5														
T36	91,2	91,2	91,2	90,3	90,0	90,0	91,2	91,4													
142.13	91,4	91,4	91,4	91,7	91,4	90,9	92,0	91,7	90,9												
136.2	92,9	92,9	92,9	92,6	92,9	92,3	93,5	93,8	92,9	97,9											
19.7	90,3	90,3	90,3	90,0	90,3	89,1	90,3	90,6	90,9	92,0	93,5										
T30	90,3	90,3	90,3	90,0	90,3	89,1	90,3	90,6	90,9	92,0	93,5	99,4									
T385	90,3	90,3	90,3	90,0	90,3	89,1	90,3	90,6	90,9	92,0	93,5	99,4	99,4								
25.8	90,6	90,6	90,6	90,3	90,6	89,4	90,6	90,9	91,2	92,3	93,8	99,7	99,7	99,7							
11.5	89,4	89,4	89,4	87,3	87,6	87,7	88,8	89,1	88,8	89,4	90,3	89,7	89,7	89,7	90,0						
11.7	88,8	88,8	88,8	86,8	87,0	87,1	88,2	88,5	88,2	88,8	89,7	89,1	89,1	89,1	89,4	98,8					
15.16	90,0	90,0	90,0	87,9	88,2	88,3	89,4	89,7	89,4	90,0	90,9	90,3	90,3	90,3	90,6	99,4	98,8				
142.12	90,3	90,3	90,3	88,2	88,5	89,7	90,9	91,2	90,3	90,9	91,7	90,0	90,0	90,0	90,3	97,3	96,7	97,9			
142.14	89,1	89,1	89,1	87,1	87,4	90,3	89,7	90,0	89,7	90,3	91,2	89,4	89,4	89,4	89,7	96,7	96,1	97,3	98,2		
	11.4	14.3	8.2	SY568	NUagA	152.7	28.16	VT	T36	142.13	136.2	19.7	T30	T385	25.8	11.5	11.7	15.16	142.12	142.14	

**Fig. 2** - Matriz de identidade nucleotídica (%) da região genómica p13.





## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ACOSTA, O., Alegria, A., Guzman, M., Lee, R., Niblett, C., Peñaranda, J., 1994. El virus de la tristeza de los cítricos: una grave amenaza para la citricultura colombiana. *In*: "Evidencias Epidemiológicas y Moleculares. Lecturas seleccionadas sobre biología molecular de virus, Editorial Científica. 1<sup>st</sup> Edition, Santafé de Bogotá.
- AGUIAR, A.M.F., Fernandes, A., Ilharco, F.A., 1994. On the sudden appearance and spread of black citrus aphid *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy), (Homoptera: Aphidoidea) on the Island of Madeira. *Bocagiana*, 168:1-7.
- AGUSTÍ, M., 2000. Evolución histórica (Introducción). *In*: Citricultura. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- AKBULUT, M., Baloglu, S., Momol, E.A., Pappu, H.R., Pappu, S.S., Febres, V.J., Yilmaz, M.A., Lee, R.F., Niblett, C.L., 1996. Comparison of the capsid protein gene sequences of five Turkish isolates of *Citrus tristeza virus*. *In*: Proc. 13<sup>th</sup> Conf. IOCV, Riverside, CA, p:318-322.
- ALAPONT, C.P., Vidal, A.M., Talón, M., García-Martínez, J.L., 2000. Cloning of a gene encoding an *ent*-copalyl diphosphate synthase of Carrizo citrange and analysis of its parents. *In*: Proc. International Society of Citriculture (9<sup>th</sup> Congress), Orlando, Florida, Dec. 3-7, p:114-115.
- ALBIACH-MARTÍ, 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-MARTÍ, M.R., Guerri, J., Hermoso de Mendoza, A., Laigret, F., Ballester-Olmos, J.F., Moreno, P., 2000b. Aphid transmission alters the genomic and defective RNA populations of *Citrus tristeza virus* isolates. *Phytopathology*, 90:134-138.
- ALZHANOVA, D.V., Hagiwara, Y., Peremyslov, V.V., Dolja, V.V., 2000. Genetic analysis of the cell-to-cell movement of beet yellows closterovirus. *Virology*, 268:192-200.
- ARES, X., Calamante, G., Cabral, S., Lodge, J., Hemenway, P., Beachy, R.N., Mentaberry, A., 1998. Transgenic plants expressing *Potato virus X* ORF2 protein (p24) are resistant to *Tobacco mosaic virus* and to tobamoviruses. *J. Virol.*, 72(1):731-738.
- AUSUBEL, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.M., Coen, D.M., Varki, A., Janssen, K., 1994. Current Protocols in Molecular Biology, Vol I, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- AYLLÓN, M.A., López, C., Navas-Castillo, J., Mawassi, M., Dawson, W.O., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P., 1999a. New defective RNAs from *Citrus tristeza virus*: evidence for a replicase-driven template switching mechanism in their generation. *J. Gen. Virol.*, 80:817-821.
- AYLLÓN, M.A., Rubio, L., Moya, A., Guerri, J., Moreno, P., 1999b. The haplotype distribution of two genes if *Citrus tristeza virus* is altered after host change or aphid transmission. *Virology*, 255:32-39.

- BARBOSA, H.R., Rodrigues, M.F.A., Campos, C.C., 1995. Counting of viable cluster-forming and non cluster-forming bacteria: a comparison between the drop and spread plate methods. *J. Microbiol. Meth.*, 22:39-50.
- BAR-JOSEPH, M., Garnsey, S.M., Gonsalves, D., 1979a. The closteroviruses: a distinct group of elongated plant viruses. *Adv. Virus Res.*, 25:93-168.
- BAR-JOSEPH, M., Garnsey, S.M., Gonsalves, D., Moscovitz, M., Purcifull, D.E., Clark, M.F., Loebenstein, G., 1979b. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, 69(2):190-194.
- BAR-JOSEPH, M., Loebenstein, G., Cohen, J., 1970. Partial purification of viruslike particles associated with the Citrus tristeza disease. *Phytopathology*, 60:75-78.
- BAR-JOSEPH, M., Marcus, R., Lee, R.F., 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 27:291-316.
- BARLASS, M., Skene, K.G.M., 1982. *In vitro* plantlet formation from *Citrus* species and hybrids. *Scientia Horticulturae*, 17:333-341.
- BATISTA, L., Porras, D.N., Gutiérrez, A., Peña, I., Rodriguez, J., del Amo, O.F., Pérez, R., Morera, J.L., Lee, R.F., Niblett, C.L., 1996. Tristeza and *Toxoptera citricida* in Cuba: Incidence and control strategies. *In: Proc. 13<sup>th</sup> Conf. IOCV, Riverside, CA*, p:104-111.
- BAULCOMBE, D.C., 1996. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *The Plant Cell*, 8:1833-1844.
- BECKER, D., Kemper, E., Schell, J., Masterson, R., 1992. New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.*, 20: 1195-1197.
- BEIJERSBERGEN, A., Smith, S.J., Hooykaas, P.J.J., 1994. Localization and topology of VirB proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid*, 32: 212-218.
- BEJARANO, E.R., Lichtenstein, C.P., 1992. Prospects for engineering virus resistance in plants with antisense RNA. *Tibtech*, 10:383-388.
- BERGMANN, B.A., Stomp, A.-M., 1992. Effect of host plant genotype and growth rate on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gall formation in *Pinus radiata*. *Phytopathology*, 82 (12): 1457-1462.
- BEVAN, M., 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.*, 12 (22): 8711-8721.
- BIEBRICHER, C.K., 1999. Mutation, Competition and Selection as Measured with Small RNA Molecules. *In: Origin and Evolution of Viruses*, Domingo, E., Webster, R., Holland, J. (Eds.), Academic Press, London, UK.
- BINNS, A.N., 1990. *Agrobacterium*-mediated gene delivery and the biology of host range limitations. *Physiol. Plant.*, 79: 135-139.
- BIRCH, R.G., 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48:297-326.
- BLOCHLINGER, K., Diggelmann, H., 1984. Hygromycin B Phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells. *Mol. Cell. Biol.*, 4 (12): 2929-2931.
- BOLTON, G.W., Nester, E.W., Gordon, M.P., 1986. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. *Science*, 232: 983-985.
- BONACALZA, B.A., 1998. Tipificação Biomolecular de Isolamentos do Vírus da Tristeza dos Citrinos (CTV) em Portugal. Tese de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia.

- BOND, J.E., Roose, M.L., 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. *Plant Cell Rep.*, 18:229-234.
- BORDÓN, Y., Guardiola, J.L., García-Luis, A., 2000. Genotype affects the morphogenic response in vitro of epicotyl segments of *Citrus* rootstocks, *Ann. Bot.*, 86:159-166.
- BOVE, C., Vogel, R., Albertini, D., Bove, J.M., 1988. Discovery of a strain of tristeza virus (K) inducing no symptoms in mexican lime. In: Proc. 10<sup>th</sup> Conf. IOCV. University of California, Riverside, p:14-16.
- BRACHO, M.A., Moya, A., Barrio, E., 1998. Contribution of Taq polymerase-induced errors to the estimation of RNA virus diversity. *J. Gen. Virol.*, 79:2921-2928.
- BRAUN, C.J., Hemenway, C.L., 1992. Expression of amino-terminal portions or full-length viral replicase genes in transgenic plants confers resistance to potato virus X infection. *The Plant Cell*, 4:735-744.
- BROW, M.A.D., Oldenburg, M.C., Lyamichev, V., Heisler, L.M., Lyamicheva, N., Hall, J.G., Eagan, N.J., Olive, D.M., Smith, L.M., Fors, L., Dahlberg, J.E., 1996. Differentiation of bacterial 16S rRNA genes and intergenic regions and *Mycobacterium tuberculosis katG* genes by structure-specific endonuclease cleavage. *J. Clin. Microbiol.*, 34(12):3129-3137.
- CAMERON, J.W., Frost, H.B., 1968. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: Reuther, W., Batchelor, L.D., Webber, H.S. (Eds.), *The Citrus Industry*, Vol. II, University of California, U.S.A.
- CAN, C., Koç, N.K., Çinar, A., 1992. In vitro clonal propagation of sour orange (*Citrus aurantium* var. *Brezilia*) by using epicotyl segments. *Doğa - Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 16:132-139.
- CANN, A. J., 1997. *Principles of Molecular Virology*, 2<sup>nd</sup> Edition, Academic Press, U.K., North Yorkshire.
- CARRERO, J.M., 1981. *Virosis y Enfermedades Afines de los Citricos*. Manuales Técnicos, Serie G, nº 45. Extension Agraria, Bravo Murillo, Madrid.
- CERVERA, M., Juárez, J., Navarro, A., Pina, J.A., Durán-Vila, N., Navarro, L., Peña, L., 1998c. Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. *Transgenic Res.*, 7:51-59.
- CERVERA, M., López, M.M., Navarro, L., Peña, L., 1998a. Virulence and supervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* in woody fruit plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 52:67-78.
- CERVERA, M., Ortega, C., Navarro, A., Navarro, L., Peña, L., 2000a. Generation of transgenic citrus plants with the tolerance-to-salinity gene *HAL2* from yeast. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 75(1):26-30.
- CERVERA, M., Pina, J.A., Juárez, J., Navarro, L., Peña, L., 1998b. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Rep.*, 18:271-278.
- CERVERA, M., Pina, J.A., Juárez, J., Navarro, L., Peña, L., 2000b. A broad exploration of a transgenic population of citrus: stability of gene expression and phenotype. *Theor. Appl. Genet.*, 100:670-677.
- CHILTON, M.-D., 1983. A vector for introducing new genes into plants. *Sci. Amer.*, 246 (6): 51-59.
- CHILTON, M.-D., Saiki, R.K., Yadav, N., Gordon, M.P., Quetier, F., 1980. T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 (7): 4060-4064.

- CORMIER-DAIRE, V., Clavel, C., Polette, M., Doco, M., Bouterin, M.-C., Binnering, I., Birembaut, Ph., 1993. Non radioactive single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of exon 11 of the CFTR gene using the Pharmacia phastsystem. *Pathologie Biologie*, 41(8):713-715.
- COSTA, M.G.C., Otoni, W.C., Moore, G.A., 2002. An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. *Plant Cell Rep.*, 21:365-373.
- COTTIN, R., 2002. Citrus of the World, a citrus directory. Version 2.0© SRA INRA-CIRAD. EGID-Citrus Network, France.
- D'URSO, F., Ayllón, M.A., Rubio, L., Sambade, A., Hermoso de Mendoza, A., Guerri, J., 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 Pathology*, 49:288-294.
- DAWSON, W.O., Bubrick, P., Grantham, G.L., 1988. Modifications of the tobacco mosaic virus coat protein gene affecting replication, movement, and symptomatology. *Phytopathology*, 78(6):783-789.
- DE CLEENE, M., De Ley, J., 1976. The host range of crown gall. *The Botanical Review*, 42 (4): 389-466.
- DEPICKER, A., Van Montagu, M., Schell, J., 1983. Plant cell transformation by *Agrobacterium* plasmids, In "Genetic Engineering of Plants, An Agriculture Perspective", Kosuge, T., Meredith, C.P., Hollaender, A. (Eds.). Plenum Press, New York.
- DE LA RIVA, G.A., González-Cabrera, J., Vázquez-Padrón, R., Ayra-Pardo, C., 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *EJB, Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3): 1-18. (<http://www.ejb.org/content/vol1/issue3/full/1/>) (8/8/2003).
- DI, J., Changjie, X., Daming, C., Shanglong, Z., 2002. Status and prospect of research in *Citrus* transgene. *Journal of Fruit Science*, 19(1):48-52.
- DIETRICH, C., Maiss, E., 2003. Fluorescent labelling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected *Nicotiana benthamiana* plants. *J. Gen. Virol.*, 84:2871-2876.
- DOLJA, V.V., 2003. *Beet yellows virus*: the importance of being different. *Molecular Plant Pathology*, 4(2):91-98.
- DOLJA, V.V., Karasev, A.V., Koonin, E.V., 1994. Molecular biology and evolution of closteroviruses: sophisticated build-up of large RNA genomes. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 32:261-285.
- DOMINGO, E., Escarmís, C., Menéndez-Arias, L., Holland, J.J., 1999. Viral quasispecies and fitness variation. In: Origin and Evolution of Viruses, Chapter 7. Domingo, E., Webster, R., Holland, J. (Eds.), Academic Press, London, UK.
- DOMÍNGUEZ, A., Fagoaga, C., Navarro, L., Moreno, P., Peña, L., 2002a. Regeneration of transgenic citrus plants under non selective conditions results in high-frequency recovery of plants with silenced transgenes. *Molecular and Genetic Genomics*, 267:544-556.
- DOMÍNGUEZ, A., Guerri, J., Cambra, M., Navarro, L., Moreno, P., Peña, L., 2000. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of *Citrus tristeza virus*. *Plant Cell Rep.*, 19:427-433.
- DOMÍNGUEZ, A., Hermoso de Mendoza, A., Guerri, J., Cambra, M., Navarro, L., Moreno, P., Peña, L., 2002b. 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.

- DONG, J.-Z., McHughen, A., 1993a. An improved procedure for production of transgenic plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.*, 88: 61-71.
- DONG, J.-Z., McHughen, A., 1993b. Transgenic flax plants from *Agrobacterium* mediated transformation: incidence of chimeric regenerants and inheritance of transgenic plants. *Plant Sci.*, 91: 139-148.
- DONG, J.-Z., Yang, M.-Z., Jia, S.-R., Chua, N.-H., 1991. Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression from the *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter in transgenic melon plants. *Bio/Technology*, 9: 858-863.
- DRAPER, J., Scott, R., Hamn, J., 1988. Transformation of dicotyledonous plant cells using the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the Ri plasmid of *A. rhizogenes*. In: *Plant Genetic Transformation and Gene Expression, A Laboratory Manual*, Draper, J., Scott, R., Armitage, P., Walden, R. (Eds.), Blackwell Scientific Publications, Alden Press, Oxford.
- DURAN-VILA, N., Ortega, V., Navarro, L., 1989. Morphogenesis and tissue cultures of three citrus species. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 16:123-133.
- EDWARDS, K., Johnstone, C., Thompson, C., 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.*, 19(6):1349.
- ELBASHIR, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Develop.*, 15(2):188-200.
- FAGARD, M., Vaucheret, H., 2000. (Trans)gene silencing in plants: how many mechanisms? *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51:167-194.
- FEBRES, V.J., Ashoulin, L., Mawassi, M., Frank, A., Bar-Joseph, 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(12):1331-1335.
- 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., Pappu, H.R., Anderson, E.J., Pappu, S.S., Lee, R.F., Niblett, C.L., 1994. The diverged copy of the *Citrus tristeza virus* coat protein is expressed in vivo. *Virology*, 201:178-181.
- FOFANA, B., Martiat, J.C., Baudoin, J.P., du Jardin, P., 1998. Cleavase fragment length polymorphism (CFLP): a methodology to further exploit polymorphisms from PCR products of plastid DNA (ptDNA) in *Phaseolus*. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 16:271-282.
- FRASER, R.S.S., 1998. Introduction to classical crossprotection. In: *Plant Virology Protocols, From Virus Isolation to Transgenic Resistance*. Foster, G.D., Taylor, S.C. (Eds.), Humana Press, Totowa, New Jersey.
- FURNER, I.J., Huffman, G.A., Amasino, R.M., Garfinkel, D.J., Gordon, M.P., Nester, E.W., 1986. An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. *Nature*, 319: 422-427.
- GAGO-ZACHERT, S.P. Costa, N.B., Semorile, L., Grau, O., 1999. Sequence variability in p27 gene of *Citrus tristeza virus* (CTV) revealed by SSCP analysis. *EJB, Electronic Journal of Biotechnology*, 2(1):16-25. (<http://www.ejb.org/content/vol2/issue1/full/3/>) (10/04/2002).
- GALLIE, D.R., 1998. Controlling gene expression in transgenics. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1(2):166-172.
- GARCÍA-LUIS, A., Bordón, Y., Moreira-Dias, J.M., Molina, R.V., Guardiola, J.L., 1999. Explant orientation and polarity determine the morphogenic response of epicotyl segments of Troyer citrange. *Ann. Bot.*, 84:715-723.

- GARNSEY, S.M., Gonsalves, D., Purcifull, D.E., 1977. Mechanical transmission of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, 67:965-968.
- GARNSEY, S.M., Gumpf, D.J., Roistacher, C.N., Civerolo, E.L., Lee, R.F., Yokomi, R.K., Bar-Joseph, M., 1987. Toward a standardized evaluation of the biological properties of *Citrus tristeza virus*. *Phytophylactica*, 19:151-157.
- GARNSEY, S.M., Permar, T.A., Cambra, M., Henderson, C.T., 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV). *In: Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Organization of Citrus Virology, IOCV, Riverside, CA, USA*, p. 39-50.
- GELVIN, S.B., 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51:223-256.
- GENTILE, A., La Malfa, S., Deng, Z.N., Domina, F., Nicolosi, E., Tribulato, E., 1999. Agrumi transgenici: prime esperienze coi geni *Rol*. *Frutticoltura*, 1:59-61.
- GERLACH, W.L., Llewellyn, D., Haseloff, J., 1987. Construction of a plant disease resistance gene from the satellite RNA of *Tobacco ringspot virus*. *Nature*, 328:802-805.
- GHEYSEN, G., Villarroel, R., Van Montagu, M., 1991. Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes Development*, 5:287-297.
- GHORBEL, R., Domínguez, A., Navarro, L., Peña, L., 2000. High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of *Citrus tristeza virus*. *Tree Physiology*, 20:1183-1189.
- GHORBEL, R., La Malfa, S., López, M.M., Petit, A., Navarro, L., Peña, L., 2001a. Additional copies of *virG* from pTiBo542 provide a super-transformation ability to *Agrobacterium tumefaciens* in citrus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 58:103-110.
- GHORBEL, R., López, C., Fagoaga, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., Peña, L., 2001b. Transgenic citrus plants expressing the *Citrus tristeza virus* p23 protein exhibit viral-like symptoms. *Molecular Plant Pathology*, 2(1):27-36.
- GHORBEL, R., Navarro, L., Duran-Vila, N., 1998. Morphogenesis and regeneration of whole plants of grapefruit (*Citrus paradisi*), sour orange (*C. aurantium*) and alemow (*C. macrophylla*). *J. of Horticultural Science & Biotechnology*, 73(3):323-327.
- GIBBS, A.J., Keese, P.L., Gibbs, M.J., García-Arenal, F., 1999. Plant Virus Evolution: Past, Present and Future. *In: Origin and Evolution of Viruses*, Chapter 11. Domingo, E., Webster, R., Holland, J. (Eds.), Academic Press, London, UK.
- GILLINGS, M., Broadbent, P., Indsto, J., Lee, R., 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.
- GMITTER JR, F.G., Xiao, S.Y., Huang, S., Hu, X.L., Garnsey, S.M., Deng, Z., 1996. A localized linkage map of the *Citrus tristeza virus* resistance gene region. *Theor. Appl. Genet.*, 92:688-695.
- GOH, C.J., Sim, G.E., Morales, C.L., Loh, C.S., 1995. Plantlet regeneration through different morphogenic pathways in pommelo tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 43:301-303.
- GOLEMBOSKI, D.B., Lomonossoff, G.P., Zaitlin, M., 1990. Plants transformed with a *Tobacco mosaic virus* nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6311-6315.
- GOSZCZYNSKI, D.E., Jooste, A.E.C., 2002. The application of single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for the analysis of molecular heterogeneity of *Grapevine virus A*. *Vitis*, 41(2):77-82.

- GOTTWALD, T.R., Garnsey, S.M., Cambra, M., Moreno, P., Irey, M., Borbón, J., 1997. Comparative effects of aphid vector species on increase and spread of *Citrus tristeza virus*. *Fruits*, 52(6):397-404.
- GOULD, J., Devey, M., Hasegawa, O., Ulian, E.C., Peterson, G., Smith, R.H., 1991. Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiol.*, 95: 426-434.
- GOWDA, S., Satyanarayana, T., Davis, C.L., Navas-Castillo, J., Albiac-Martí, M.R., Mawassi, M., Valkov, N., Bar-Joseph, M., Moreno, P., Dawson, W.O., 2000. The p20 gene product of *Citrus tristeza virus* accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology*, 274:246-254.
- GRANT, T.J., Higgins, R.P., 1956. Occurrence of mixtures of tristeza virus strains in Citrus. *Phytopathology*, 47:272-276.
- GRISONI, M., 1995. Le Virus de la Tristeza des Agrumes – Variabilité de l'Agent Pathogène et Épidémiologie de la Maladie dans les Conditions de l'Île de la Réunion. Ph.D. Thesis, École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.
- GUERRI, J., Moreno, P., Lee, R.F., 1990. Identification of *Citrus tristeza virus* strains by peptide maps of virion coat protein. *Phytopathology*, 80(8):692-698.
- GUERRI, J., Moreno, P., Muñoz, N., Martínez, M.E., 1991. Variability among Spanish *Citrus tristeza virus* isolates revealed by double-stranded RNA analysis. *Plant Pathology*, 40:38-44.
- GUTIÉRREZ-E., M.A.; Luth, D.; Moore, G.A., 1997. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrus* and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of *Citrus tristeza virus*. *Plant Cell Rep.*, 16:745-753.
- 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.
- HAMILTON, A.J., Baulcombe, D.C., 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286(5441):950-952.
- HAMMOND-KOSACK, K.E., Jones, J.D.G., 1997. Plant disease resistance genes. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48:575-607.
- HASSAN, M.A., Swartz, H.J., Inamine, G., Mullineaux, P., 1993. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of several *Rubus* genotypes and recovery of transformed plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 33: 9-17.
- HAUSER, S., Weber, C., Vetter, G., Stevens, M., Beuve, M., Lemaire, O., 2000. Improved detection and differentiation of poleroviruses infecting beet or rape by multiplex RT-PCR. *J. Virol. Methods*, 89:11-21.
- HARTMANN, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T., 1990. Plant Propagation, Principles and Practices. 5<sup>th</sup> Edition, Prentice-Hall International, Inc.
- HERMOZO DE MENDOZA, A., Ballester Olmos, J.F., Pina Lorca, J.A., 1984. Transmission of *Citrus tristeza virus* by aphids (Homoptera, Aphididae) in Spain. In: Proc. 9<sup>th</sup> Conf. IOCV. Riverside, California, p:23-27.
- HERRERA-ESTRELLA, L., Depicker, A., Van Montagu, M., Schell, J., 1983. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature*, 303: 209-213.
- HIDAKA, T., Omura, M., 1993. Transformation of *Citrus* protoplasts by electroporation. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 62(2):371-376.
- HIDAKA, T., Omura, M., Ugaki, M., Tomiyama, M., Kato, A., Ohshima, M., Motoyoshi, F., 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Citrus* spp. from suspension cells. *Japan. J. Breed.*, Vol. 40(2):199-207.

- HIEI, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T., 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant J.*, 6 (2): 271-282.
- HILF, M.E., Karasev, A.V., Albiach-Marti, M.R., Dawson, W.O., Garnsey, S.M., 1999. Two paths of sequence divergence in the *Citrus tristeza virus* complex. *Phytopathology*, 89:336-342.
- 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.
- HO, C.K., Chang, S.-H., Tsay, J.-Y., Tsai, C.-J., Chiang, V.L., Chen, Z.-Z., 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. *Plant Cell Rep.*, 17:675-680.
- HOEKEMA, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A., 1983. A binary plant vector strategy based on separation of *vir* and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303: 179-180.
- HOLLAND, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S., VandePol, S., 1982. Rapid evolution of RNA genomes. *Science*, 215(26 March):1577-1585.
- HOOD, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T., Chilton, M.-D., 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *Journal of Bacteriology*, 168(3):1291-1301.
- HOYKAAS, P.J.J., Beijersbergen, G.M., 1994. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 32: 157-179.
- HORSCH, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T., 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227: 1229-1231.
- HSIEH, J., Fire, A., 2000. Recognition and silencing of repeated DNA. *Ann. Rev. Genet.*, 34:187-204.
- HULL, R., 2002. Matthews' Plant Virology. 4<sup>th</sup> Edition, Academic Press, London, UK.
- HUTTNER, S.L., Arntzen, C., Beachy, R., Breuning, G., Nester, E., Qualset, C., Vidaver, A., 1992. Revising oversight of genetically modified plants. *Bio/Technology*, 10: 967-971.
- ILHARCO, F.A., 1978. Prospecção de afídeos em citrinos no sul de Portugal (*Homoptera, Aphidoidea*). *Agronomia lusit.*, 38:271-278.
- JEFFERSON, R.A., 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, vol.5(4):387-405.
- JEFFERSON, R.A., Burgess, S.M., Hirsh, D., 1986.  $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:8447-8451.
- JEFFERSON, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W., 1987. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, vol.6(13):3901-3907.
- KAJITA, S., Osakabe, K., Katayama, Y., Kawai, S., Matsumoto, Y., Hata, K., Morohoshi, N., 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of poplar using disarmed binary vector and the overexpression of a specific member of a family of poplar peroxidase genes in transgenic poplar cell. *Plant Sci.*, 103:231-239.
- KANEYOSHI, J., Kobayashi, S., Nakamura, Y., Shigemoto, N., Doi, Y. 1994. A simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange. *Plant Cell Rep.*, 13: 541-545.
- KANEYOSHI, J., Kobayashi, S., 1999. Characteristics of transgenic trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.) possessing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 68(4):734-738.

- 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., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Lewandowski, D.J., Dawson, W.O., 1995. Complete sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA genome. *Virology*, 208:511-520.
- KARASEV, A.V., Hilf, M.E., 1997. Molecular biology of the *Citrus tristeza virus*. In: *Filamentous viruses of woody plants*, Monette, P.L. (Ed.). Research Signpost, Trivandrum, India.
- 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(8):6233-6236.
- KAYIM, M., Koç, N.K., Tör, M., 1996. Gene transfer into *Citrus* (*Citrus limon* L.) nucellar cells by particle bombardment and expression of Gus activity. *Tr. J. of Agriculture and Forestry.*, 20:349-352.
- KITAJIMA, E.W., Silva, D.M., Oliveira, A.R., Muller, G.W., Costa, A.S., 1963. Threadlike particles associated with tristeza disease of citrus. *Nature*, 201:1011-1012.
- KITTO, S.L., Young, M.J., 1981. In vitro propagation of Carrizo citrange. *HortScience*, 16(3):305-306.
- KITTS, P., Adams, M., Kondepudi, A., Gallagher, D., Kain, S., 1995. Green fluorescent protein (GFP): a novel reporter for monitoring gene expression in living cells and organisms. *Clontechiques*, 10:1-3.
- KOBAYASHI, S., Nakamura, Y., Kaneyoshi, J., Higo, H., Higo, K., 1996. Transformation of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) and Trifoliate Orange (*Poncirus trifoliata*) with a synthetic gene encoding the human epidermal growth factor (hEGF). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 64(4):763-769.
- KOBAYASHI, S., Uchimiya, H., 1989. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts by direct DNA transfer. *Japanese Journal of Genetics*, 64: 91-97.
- KOCH, A. L., 1994. Growth measurement. In: *Methods for General and Molecular Bacteriology*, Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N. R. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- KOLLÀR, A., Dalmay, T., Burgyàn, J., 1993. Defective interfering RNA-mediated resistance against *Cymbidium ringspot tobusvirus* in transgenic plants. *Virology*, 193:313-318.
- KOLTUNOW, A.M., Brennan, P., Bond, J.E., Barker, S.J., 1998. Evaluation of genes to reduce seed size in *Arabidopsis* and tobacco and their application to *Citrus*. *Molecular Breeding*, 4:235-251.
- KOLTUNOW, A.M., Brennan, P., Protosaltis, S., 2000. Regeneration of west Indian limes (*Citrus aurantifolia*) containing genes for decreased seed set. In: Proc. 1<sup>st</sup> International Symposium on Citrus Biotechnology. Goren, R., Goldschmidt, E.E. (Eds.), ISHS. *Acta Horticulturae*, 535:81-91.
- 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(3):139-145.
- KOUKOLÍKOVÁ-NICOLA, Z., Raineri, D., Stephens, K., Ramos, C., Tinland, B., Nester, E., Hohn, B., 1993. Genetic analysis of the *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens*: a search for functions involved in transport of T-DNA into the plant cell nucleus and in T-DNA integration. *J. Bacteriol.*, 175(3):723-731.
- KUMAR, A., Miller, M., Whitty, P., Lyon, J., Davie, P., 1995. *Agrobacterium*-mediated transformation of five wild *Solanum* species using *in vitro* microtubers. *Plant Cell Rep.*, 14: 324-328.

- KUMAR, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M., 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- LA MALFA, S., Gentile, A., Deng, Z., Domina, F., 2000. Trasformazione genetica degli agrumi con un gene reporter vitale. Espressione della proteina fluorescente verde in citrange troyer. *Italus Hortus*, 7(5):17-21.
- LEE, R.F., Baker, P.S., Rocha-Peña, M.A., 1994. The Citrus Tristeza Virus (CTV), An Introduction to Current Priorities, With Special Reference to the Worsening Situation in Central America and the Caribbean. International Institute of Biological Control, UK.
- LEE, R.F., Derrick, K.S., Niblett, C.L., Pappu, H.R., 1995. When to use mild strain cross protection (MSCP) and problems encountered. *In: Proc. 3<sup>th</sup> International Workshop Citrus tristeza virus and the brown Citrus aphid in the Caribbean basin: management strategies*, Lake Alfred, Florida (May 15-18), p:158-162.
- LEE, R.F., Garnsey, S.M., 1996. Citrus virus and virus-like pathogens: a continuing evolution of progress and problems. *In: Proc. 13<sup>th</sup> Conf. IOCV*, Riverside, CA, p:1-7.
- LI, W.-H., Graur, D., 1991. Fundamentals of Molecular Evolution. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- LÓPEZ, C., Ayllón, 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(7):685-691.
- LÓPEZ, 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.
- LUTH, D., Moore, G., 1999. Transgenic grapefruit plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 57:219-222.
- MACFARLANE, S.A., Davies, J.W., 1992. Plants transformed with a region of the 201-kilodalton replicase gene from pea early browning virus RNA1 are resistant to virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5829-5833.
- MANTIS, N.J., Winans, S.C., 1992. The *Agrobacterium tumefaciens vir* gene transcriptional activator *virG* is transcriptionally induced by acid pH and other stress stimuli. *J. Bacteriol.*, 174 (4): 1189-1196.
- MARSHALL, D.J., Heisler, L.M., Lyamichev, V., Murvine, C., Olive, D.M., Ehrlich, G.D., Neri, B.P., de Arruda, M., 1997. Determination of Hepatitis C virus genotypes in the United States by Cleavase Fragment Length Polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 35(12):3156-3162.
- MÁRTON, L., Wullems, G.J., Molendijk, L., Schilperoort, R.A., 1979. *In vitro* transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 277: 129-131.
- MAWASSI, M., Gafny, R., Gagliardi, D., Bar-Joseph, M., 1995a. Populations of *Citrus tristeza virus* contain smaller-than-full-length particles which encapsidate sub-genomic RNA molecules. *J. Gen. Virol.*, 76:651-659.
- MAWASSI, M., Karasev, A.V., Mietkiewska, E., Gafny, R., Lee, R.F., Dawson, W.O., Bar-Joseph, M., 1995b. Defective RNA molecules associated with *Citrus tristeza virus*. *Virology*, 208:383-387.
- MAWASSI, M., Mietkiewska, E., Gofman, R., Yang, G., Bar-Joseph, M., 1996. Unusual sequence relationships between two isolates of *Citrus tristeza virus*. *J. Gen. Virol.*, 77:2359-2364.
- MAWASSI, M., Mietkiewska, E., Hilf, M.E., Ashoulin, L., Karasev, A.V., Gafny, R., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., Bar-Joseph, M., 1995c. Multiple species of defective RNAs in plants infected with *Citrus tristeza virus*. *Virology*, 214:264-268.

- MAWASSI, M., Satyanarayana, T., Gowda, S. Albiach-Martí, M.R., Robertson, C., Dawson, W.O., 2000. Replication of heterologous combinations of helper and defective RNA of *Citrus tristeza virus*. *Virology*, 267:360-369.
- MILLER, W.A., Koev, G., 2000. Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology*, 273:1-8.
- MITSUHARA, I., Ugaki, M., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., 1996. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant and Cell physiology*, 1996, 37:49-59.
- MOORE, G.A., 1986. In vitro propagation of *Citrus* rootstocks. *HortScience*, 21(2):300-301.
- MOORE, G.A., Febres, V.J., Niblett, C.L., Luth, D., McCaffery, M., Garnsey, S.M., 2000a. *Agrobacterium*-mediated transformation of grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) with genes from *Citrus tristeza virus*. In: Proc. 1<sup>st</sup> International Symposium on Citrus Biotechnology. Goren, R., Goldschmidt, E.E. (Eds.), *ISHS. Acta Horticulturae*, 535: 237-244.
- MOORE, G.A., Jacono, C.C., Neidigh, J.L., Lawrence, S.D., Cline, K., 1992. *Agrobacterium*-mediated transformation of Citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.*, 11:238-242.
- MOORE, G.A., Kaplan, F., Koca, U., 2000b. Genetic transformation to alter naringin content in grapefruit. In: Proc. 9<sup>th</sup> International Society of Citriculture, Orlando, Florida, Dec. 3-7, p:78-81.
- MOORE, L.W., Cooksey, D.A., 1981. Biology of *Agrobacterium tumefaciens*: plant interactions. *Int. Rev. Cytology*, 13: 15-46.
- MOREIRA, S., 1942. Observações sobre a “Tristeza” dos Citrus ou “Podridão” das Radicelas. *Biológico*, 8:269-272.
- MORENO, P., Guerri, J., Albiach, M.R., Ballester-Olmos, J.F., Martínez, M.E., 1996. Interference between *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates detected by analysis of double stranded RNA (dsRNA). In: Proc. 13<sup>th</sup> Conf. IOCV, Riverside, CA, p:54-63.
- MORENO, P., Guerri, J., Ballester-Olmos, J.F., Albiach, R., Martínez, M.E., 1993. Separation and interference of strains from a *Citrus tristeza virus* isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. *Plant Pathology*, 42:35-41.
- MORENO, P., Guerri, J., Ballester-Olmos, J.F., Martinez, M.E., 1991. Segregation of *Citrus tristeza virus* strains evidenced by double stranded RNA (dsRNA) analysis. In: Proc. 11<sup>th</sup> Conf. IOCV. University of California, Riverside, p:20-24.
- MORENO, P. Guerri, J., Muñoz, N., 1990. Identification of spanish strains of *Citrus tristeza virus* by analysis of double-stranded RNA. *Phytopathology*, 80(5):477-482.
- MORERA, M.N., 1997. Reseña bibliografica sobre la enfermedad tristeza de los citricos. I- Antecedentes históricos, distribución mundial, agente causal y propiedades, rango de hospederos, sintomatología y clasificación de especies y variedades por su susceptibilidad. *Levante Agrícola*, 3<sup>o</sup> trimestre:227-240.
- MÜLLER, G.W., Costa, A.S., Castro, J.L., Guirado, N., 1986. Results from preimmunization tests to control the Capão Bonito strain of tristeza. In: Proc. 10<sup>th</sup> Conf. IOCV. Valencia, Spain, p:36. (Abstract).
- MÜLLER, G.W., Garnsey, S.M., 1984. Susceptibility of citrus varieties, species, citrus relatives, and non-rutaceous plants to slash-cut mechanical inoculation with *Citrus Tristeza Virus* (CTV). In: Proc. 9<sup>th</sup> Conf. IOCV. Riverside, CA, p:33-40.
- MURASHIGE, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.

- NARVÁEZ, G., Skander, B.S., Ayllón, 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.
- NAVARRO, L., 1981. Citrus shoot-tip grafting in vitro (STG) and its applications: a review. *In: Proc. International Society of Citriculture*, Vol. I: 452-456.
- NAVAS-CASTILLO, J., Albiach-martí, M.R., Siddarame, G., Hilf, M.E., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., 1997. Kinetics of accumulation of *Citrus tristeza virus* RNAs. *Virology*, 228:92-97.
- NEI, M., Kumar, S., 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press, Inc., New York.
- NIBLETT, C.L., Genc, H., Cevik, B., Halbert, S., Brown, L., Nolasco, G., Bonacalza, B., Manjunath, K.L., Febres, V.J., Pappu, H.R., Lee, R.F., 2000. Progress on strain differentiation of *Citrus tristeza virus* and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease. *Virus Res.*, 71:97-106.
- NOLASCO, G., 1994. Técnicas Biomoleculares no Diagnóstico e Tipificação em Virologia Vegetal. Tese de doutoramento. Universidade do Algarve.
- NOLASCO, G., de Blas, C., Torres, V., Ponz, F. 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *J. Virol. Methods*, 45:201-218.
- NOLASCO, G., de Sequeira, O.A., 1997a. New approaches in analysing genomic variability of *Citrus tristeza virus*, p:109-120. *In: Filamentous viruses of woody plants*, Monette, P.L. (Ed.). Research Signpost, Trivandrum, India.
- NOLASCO, G., Mendes, C., Fernandes, A., 1995. Aspects of the molecular epidemiology of *Citrus tristeza virus* as elucidated by restriction site polymorphism analysis. *In: Proc. 3<sup>th</sup> International Workshop of Citrus tristeza virus and the brown Citrus aphid in the Caribbean basin: management strategies*, Lake Alfred, Florida (May 15-18), p:229-231.
- NOLASCO, G., Sequeira, Z., Bonacalza, B., Mendes, C., Torres, V., Sanchez, F., Urgoiti, B., Ponz, F., Febres, V.J., Cevik, B., Lee, R.F., Niblett, C.L., 1997b. Sensitive CTV diagnosis using immunocapture, reverse transcriptional polymerase chain reaction and an exonuclease fluorescent probe assay. *Fruits*, 52(6):391-396.
- NAVARRO, L., 1981. Citrus shoot-tip grafting in vitro (STG) and its applications: a review. *In: Proc. International Society of Citriculture*, Vol I: 452-456.
- O'CONNELL, C.D, Atha, D.H., Oldenburg, M.C., Tian, J, Siebert, M., Handrow, R., Grooms, K., Heisler, L., de Arruda, M., 1999. Detection of p53 gene mutation: Analysis by single-strand conformation polymorphism and Cleavase fragment length polymorphism. *Electrophoresis*, 20:1211-1223.
- OLDENBURG, M.C., Siebert, M., 2000. New Cleavase Fragment Length Polymorphism method improves the mutation detection assay. *BioTechniques*, 28:351-357.
- OLIVARES-FUSTER, O., Fleming, G.H., Albiach-Marti, M.R., Gowda, S., Grosser, J.W., 2000. Alternative Citrus transformation with emphasis on disease resistance. *In: Proc. International Society of Citriculture (9<sup>th</sup> Congress)*, Orlando, Florida, Dec. 3-7, p:88-90.
- OOMS, G., Bakker, A., Molendijk, L., Wullems, G.J., Gordon, M.P., Nester, E.W., Schilperoort, R.A., 1982. T-DNA organization in homogeneous and heterogeneous octopine-type crown gall tissues of *Nicotiana tabacum*. *Cell*, 30: 589-597.
- ORITA, M., Iwahana, H., Kanazawa, K., Sekiya, T. 1989a. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single stranded conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:2766-2770.

- ORITA, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. 1989b. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5: 874-879.
- OW, D.W., Wood, K.V., DeLuca, M., DeWet, J.R., Helinski, D.R., Howell, S.H., 1986. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234:856-859.
- PAPPU, S.S., Febres, V.J., Pappu, H.R., Lee, R.F., Niblett, C.L., 1997. Characterization of the 3' proximal gene of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virus Res.*, 47: 51-57.
- PAPPU, H.R., Karasev, A.V., Anderson, E.J., Pappu, S.S., Hilf, M.E., Febres, V.J., Eckloff, R.M.G., McCaffery, M., Boyko, V., Gowda, S., Dolja, V.V., Koonin, E.V., Gumpf, D.J., Cline, K.C., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., Lee, R.F., Niblett, C.L., 1994. Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virology*, 199:35-46.
- PAPPU, H.R., Niblett, C.L., Lee, R.F., 1995. Application of recombinant DNA technology to plant protection: molecular approaches to engineering virus resistance in crop plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11:426-437.
- PAPPU, H., Pappu, S., Niblett, C., Lee, R., Civerolo, E., 1993. Comparative sequence analysis of the coat protein of biologically distinct citrus tristeza closterovirus isolates. *Virus Genes*, 7(3):255-264.
- PEÑA, L., Cervera, M., Juárez, J., Navarro, A., Pina, J.A., Durán-Vila, N., Navarro, L., 1995a. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.*, 14:616-619.
- PEÑA, L., Cervera, M., Juárez, J., Navarro, A., Pina, J.A., Navarro, L., 1997. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing.): factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Rep.*, 16:731-737.
- PEÑA, L., Cervera, M., Juárez, J., Ortega, C., Pina, J.A., Durán-Vila, N., Pina, J.A.,..., 1995b. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. *Plant Sci.*, 104:183-191.
- PEÑA, L., Martín-Trillo, M., Juárez, J., Pina, J.A., Navarro, L., Martínez-Zapater, J.M., 2001. Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. *Nat. Biotechnol.*, 19:263-267.
- PEÑARANDA, J., Acosta, O., Guzmán-Barney, M., Alegria, A., Pappu, H.R., Pappu, S.S., Manjunath, K.L., Febres, V.J., Lee, R.F., Niblett, C.L., 1996. Incidence and characterisation of mild and severe isolates of *Citrus tristeza virus* from Colombia. In: Proc. 13th Conf. IOCV, Riverside, CA, p:71-77.
- PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E., Ochoa-Alejo, N., 1998. Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed tissues. *Plant Cell Rep.*, 17:591-596.
- 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.
- PETERS, N.R., Ackerman, S., Davis, E.A., 1999. A modular vector for *Agrobacterium* mediated transformation of wheat. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 17:323-331.
- PIESTUN, D., Batuman, O., Che, X., Gofman, R., Filatov, V., Zypman, S., Gafny, R., Bar-Joseph, M., 2000. Truncated versions of the *Citrus tristeza virus* (CTV) replicase and basta resistance genes incorporated in transgenic Troyer citrange. In: Proc. 1<sup>st</sup> International Symposium on Citrus Biotechnology. Goren, R., Goldschmidt, E.E. (Eds.), ISHS. *Acta Horticulturae*, 535: 223-230.

- POWELL ABEL, P., Nelson, R.S., Barun, D., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T., Beachy, R.N., 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the *Tobacco mosaic virus* coat protein gene. *Science*, 232: 738-743.
- POWELL, P.A., Sanders, P.R., Tumer, N., Fraley, R.T., Beachy, R.N., 1990. Protection against *Tobacco mosaic virus* infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences. *Virology*, 175:124-130.
- PRINS, M., Goldbach, R., 1996. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants. *Arch. Virol.*, 141:2259-2276.
- RAO, K.S., Rohini, V.K., 1999. *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): a simple protocol. *Annals of Botany*, 83:347-354.
- RAMOS, N., Fernandes, J.E., Reis, J., Nolasco, G., 2000. Afídeos vectores do vírus-da-tristeza-dos-citros (CTV) no Algarve. Livro de Actas do Congresso Nacional de Citricultura, Faro, 16-18 de Novembro, p:167-183.
- REIS, J., Ramos, N., Fernandes, J.E., Mendes, C., Santos, C., Nolasco, G., 2000. Estudo da transmissibilidade do vírus da tristeza dos citros por afídeos vectores. Livro de Actas do Congresso Nacional de Citricultura, Faro, 16-18 Novembro, p:629-639.
- ROCHA-PEÑA, M.A., Lee, R.F., Lastra, R., Niblett, C.L., Ochoa-Corona, F.M., Garnsey, S.M., Yokomi, R.K., 1995. *Citrus tristeza virus* and its aphid vector *Toxoptera citricida*, threats to citrus production in the caribbean and central and north america. *Plant Disease*, 437-445.
- ROGERS, S.G., Klee, H., 1987. Pathways to plant genetic manipulation employing *Agrobacterium*. In: "Plant DNA Infectious Agents". Hohn, T.H., Schell, J. (Eds.), Springer-Verlag, Wien.
- ROHINI, V.K., Rao, S., 2000. Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.): a non-tissue culture based approach for generating transgenic plants. *Plant Sci.*, 150:41-49.
- ROSNER, A., Lee, R.F., Bar-Joseph, M., 1986. Differential hybridisation with cloned cDNA sequences for detecting a specific isolate of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, 76:820-824.
- ROSSETTI, S., Englisch, S., Bresin, E., Pignatti, P.F., Turco, A.E., 1997. Detection of mutations in human genes by a new rapid method: cleavage fragment length polymorphism analysis (CFLPA). *Molecular and Cellular Probes*, 11:155-160.
- ROSSI, L., Hohn, B., Tinland, B., 1993. The VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* carries nuclear localization signals important for transfer of T-DNA to plants. *Mol. Gen. Genet.*, 239: 345-353.
- RUBIO, L., Ayllón, 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., Ayllón, M.A., Kong, P., Fernández, 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(17):8054-8062.
- SAMBROOK, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SATYANARAYANA, T., Gowda, S., Boyko, V.P., Albiach-Martí, M.R., Mawassi, M., Navas-Castillo, J., Karasev, A.V., Dolja, V., Hilf, M.E., Lewandowski, D.J., Moreno, P., Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., 1999. An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:7433-7438.

- SATYANARAYANA, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., Albiach-Martí, M.R., Dawson, W.O., 2002a. Mutational analysis of the replication signals in the 3'-nontranslated region of *Citrus Tristeza Virus*. *Virology*, 300:140-152.
- SATYANARAYANA, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., Albiach-Martí, M.R., Rabindran, S., Dawson, W.O., 2002b. The p23 protein in *Citrus Tristeza Virus* controls asymmetrical RNA accumulation. *J. Virol.*, 76(2):473-483.
- SATYANARAYANA, T., Gowda, S., Mawassi, M., Albiach-Martí, M.R., Ayllón, 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.
- SCHMIDT, M.A., Parrott, W.A., 2001. Quantitative detection of transgenes in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] and peanut (*Arachis hypogaea* L.) by real-time polymerase chain reaction. *Plant Cell Rep.*, 20:422-428.
- SCHNEIDER, H., 1954. Anatomy of bark of bud union, trunk, and roots of quick-decline affected sweet orange trees on sour orange rootstock. *Hilgardia*, 22:567-581.
- SCORZA, R., Morgens, P.H., Cordts, J.M., Mante, S., Callahan, A.M., 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation of peach (*Prunus persica* L. Batsch) leaf segments, immature embryos, and long-term embryogenic callus. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 26: 829-834.
- SCORZA, R., Ravelonandro, M., Callahan, A.M., Cordts, J.M., Fuchs, M., Dunez, J., Gonsalves, D., 1994. Transgenic plums (*Prunus domestica* L.) express the *Plum pox virus* coat protein gene. *Plant Cell Rep.*, 14: 18-22.
- SHALITIN, D., Mawassi, M., Gafny, R., Leitner, O., Cabilly, S., Eshhar, Z., Bar-Joseph, M., 1994. Serological characterisation of *Citrus tristeza virus* isolates from Israel. *Ann. Appl. Biol.*, 125:105-113.
- SPIEGEL-ROY, P., Goldschmidt, E.E., 1996. Biology of Citrus. Cambridge University Press, Cambridge CB2 IRP.
- SREEVATSAN, S., Bookout, J.B., Ringpis, F.M., Pottathil, M.R., Marshall, D.J., de Arruda, M., Murvine, C., Fors, L., Pottathil, R.M., Barathur, R.R., 1998. Algorithmic approach to high-throughput molecular screening for alpha interferon-resistant genotypes in hepatitis C patients. *J. Clin. Microbiol.*, 36(7):1895-1901.
- STACHEL, S.E., Messens, E., Van Montagu, M., Zambryski, P., 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 318: 624-629.
- STACHEL, S.E., Timmerman, B., Zambryski, P., 1987. Activation of *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression generates multiple single-stranded T-strand molecules from the pTiA6 T-region: requirement for 5' *virD* gene products. *EMBO J.*, 6 (4): 857-863.
- STARRANTINO, A., Raciti, M., Antonelli, N.M., Tramontano, E., 1992. Genetic manipulation of *Citrus* by using the biolistic process. *In: Proc. International Society of Citriculture*, Vol I:199-201.
- STOMP, A.-M., Loopstra, C., Chilton, W.S., Sederoff, R.R., Moore, L.W., 1990. Extended host range of *Agrobacterium tumefaciens* in the genus *Pinus*. *Plant Physiol.*, 92: 1226-1232.
- SWOFFORD, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J., Hillis, D.M., 1996. Phylogenetic Inference. *In: Molecular Systematics*, 2<sup>nd</sup> Edition, Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.), Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- TAO, R., Handa, T., Tamura, M., Sugiura, A., 1994. Genetic transformation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.) by *Agrobacterium rhizogenes* wild type strain A4. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 63(2):283-289.

- TAVLADORAKI, P., Benvenuto, E., Trinca, S., De Martinis, D., Cattaneo, A., Galeffi, P., 1993. Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature*, 366:469-472.
- TENLLADO, F., Díaz-Ruíz, J.R., 2001. Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *J. Virol.*, 75(24):12288-12297.
- TENLLADO, F., García-Luque, I., Serra, M.T., Díaz-Ruíz, J.R., 1995. *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the 54-kDa region of the *Pepper mild mottle tobamovirus* replicase gene exhibit two types of resistance responses against viral infection. *Virology*, 211:170-183.
- THOMPSON, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22:4673-4680.
- TINLAND, B., 1996. The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci.*, 1(6):178-184.
- TONDELLA, M.L.C., Reeves, M.W., Popovic, T., Rosenstein, N., Holloway, B.P., Mayer, L.W., 1999. Cleavase fragment length polymorphism analysis of *Neisseria meningitidis* basic metabolic genes. *J. Clin. Microbiol.*, 37(8):2402-2407.
- TURK, S.C.H.J., Lange, R.P., Regensburg-Tuink, T.J.G., Hooykaas, P.J.J., 1994. Localization of the VirA domain involved in acetosyringone-mediated *vir* gene induction in *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.*, 25: 899-907.
- TYAGI, S., Kramer, F.R., 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.*, 14:303-308.
- VAN WORDRAGEN, M.F., Dons, H.J.M., 1992. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of recalcitrant crops. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 10(1):12-36.
- VANCANNEYT, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L., Rocha-Sosa, M., 1990. Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.*, 220:245-250.
- VARDI, A., Bleichman, S., Aviv, D., 1990. Genetic transformation of Citrus protoplasts and regeneration of transgenic plants. *Plant Sci.*, 69:199-206.
- VELA, C., Cambra, M., Cortes, E., Moreno, P., Miguet, J.G., Perez de San Roman, C., Sanz, A., 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Citrus tristeza virus* and their use in diagnosis. *J. Gen. Virol.*, 67:91-96.
- VIVES, M.C., Rubio, L., López, C., Navas-Castillo, J., Albiach-Martí, 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.
- WALLACE, J.M., 1978. Virus and viruslike diseases. In: Reuther, W., Calavan, E.C., Carman, G.E. (Ed.), *The Citrus Industry*, Vol. IV, University of California, U.S.A.
- WALSH, J.A., 2000. Transgenic approaches to disease resistant plants as exemplified by viruses. In: *Molecular Plant Pathology, Annual Plant Reviews*, Vol. 4, Dickinson, M., Beynon, J. (Eds.), 1<sup>st</sup> Edition, Academic Press, Sheffield, England.
- WANG, K., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., Zambryski, P., 1984. Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell*, 38: 455-462.
- WINANS, S.C., Mantis, N.J., Chen, C.-Y., Chang, C.-H., Han, D.C., 1994. Host recognition by the VirA, VirG two-component regulatory proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *Research in Microbiology*, 145: 461-473.

- WOJCIECH Rychlik, 1994. Oligo® Primer Analysis Software, Version 5.0 for Windows. National Biosciences, Inc., (NBI), 3650 Annapolis Lane-Plymouth, USA.
- YANG, Z.N., Ingelbrecht, I.L., Louzada, E., Skaria, M., Mirkov, T.E., 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). *Plant Cell Rep.*, 19:1203-1211.
- 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(2):131-142.
- YANG, G., Mawassi, M., Ashoulin, L., Gafny, R., Gaba, V., Gal-On, A., Bar-Joseph, M., 1997. A cDNA clone from a defective RNA of *Citrus tristeza virus* is infective in the presence of the helper virus. *J. Gen. Virol.*, 78:1765-1769.
- YAO, J.-L., Wu, J.-H., Gleave, A.P., Morris, B.A.M., 1996. Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos. *Plant Sci.*, 113:175-183.
- ZACCOMER, B., Cellier, F., Boyer, J.-C., Haenni, A.-L., Tepfer, M., 1993. Transgenic plants that express genes including the 3' untranslated region of the *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) genome are partially protected against TYMV infection. *Gene*, 136:87-94.
- ZAITLIN, M., Anderson, J.M., Perry, K.L., Zhang, L., Palukaitis, P., 1994. Specificity of replicase-mediated resistance to *Cucumber mosaic virus*. *Virology*, 201:200-205.
- ZAMBRYSKI, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Van Montagu, M., Schell, J., 1983. A Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.*, 2:2143-2150.
- ZHOU, C.L.E., Ammar, E.-D., Sheta, H., Kelley, S., Polek, M., Ullman, D.E., 2002. *Citrus tristeza virus* ultrastructure and associated cytopathology in *Citrus sinensis* and *Citrus aurantifolia*. *Can J. Bot.*, 80:512-525.
- ZIEMIENOWICZ, A., Merkle, T., Schoumacher, F., Hohn, B., Rossi, L., 2001. Import of *Agrobacterium* T-DNA into plant nuclei: two distinct functions of VirD2 and VirE2 proteins. *Plant Cell*, 13:369-384.