

MARIA LUÍSA PENTEADO NATIVIDADE TARGON

BC/32245

IB/80484

EXPRESSÃO E ANÁLISE DO GENE DO
CAPSÍDEO DE ISOLADOS DO VÍRUS
DA TRISTEZA DE DIFERENTES ESPÉCIES
E VARIEDADES DE CITROS

CAMPINAS - SP

1997

T/UNICAMP

T174
e.

MARIA LUÍSA PENTEADO NATIVIDADE TARGON

EXPRESSÃO E ANÁLISE DO GENE DO CAPSÍDEO DE ISOLADOS DO VÍRUS
DA TRISTEZA DE DIFERENTES ESPÉCIES E VARIEDADES DE CITROS

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Maria Luísa Penteado
Natividade Targon
e aprovada pela Comissão Julgadora.

12/09/97

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Doutor em
Ciências na área de Genética Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Marcos A. Machado

Campinas - SP

1997

UNIDADE	115
N.º CHAMADA:	1111111111111111
V.	Ex.
T.º MSB	BC/135-2-135-2
PNDC	135-2-135-2
C	D
PRECO	135-2-135-2
DATA	135-2-135-2
N.º CPDC	135-2-135-2

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Targon, Maria Luísa Penteado Natividade

T174e Expressão e análise do gene do capsídeo de isolados do vírus da tristeza de diferentes espécies e variedades de citros/ Maria Luísa Penteado Natividade Targon. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.
143f.: ilus.

Orientador: Marcos A. Machado
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Vírus de plantas. 2. Sequenciamento. 3. Biologia molecular.
I. Machado, Marcos A. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA - Campinas, 12 de setembro de 1997.

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Prof. Dr. Marcos A. Machado (orientador)

Prof. Dra. Yoko Bomura Rosato *Yokomura*

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira *Gonçalo Amarante Guimarães Pereira*

Prof. Dr. Jorge Vega *Jorge Vega*

Dr. Gerd Walter Müller *Gerd Walter Müller*

SUPLENTES

Dr. José Alfredo Usberti

Prof. Dra. Anete Pereira de Souza

*Aos meus pais,
Fábio e Lúcia,
ofereço*

*Ao meu marido,
Julio,
dedico*

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Marcos A. Machado**, meu agradecimento especial pela oportunidade, orientação e apoio durante a realização deste trabalho.

Aos **Drs. Joaquim Teófilo Sobrinho e Jorgino Pompeu Júnior**, da diretoria do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” - Instituto Agrônômico, por todas as facilidades oferecidas.

Ao **Dr. Gerd W. Müller**, pelos ensinamentos e por toda a ajuda durante a realização do trabalho.

Aos **Drs. Richard F. Lee e Keremane L. Manjunath**, do Citrus Research and Education Center, Universidade da Flórida - Lake Alfred - USA, pela valiosa colaboração durante a realização do trabalho.

À **Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato** e aos **Profs. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira e Dr. Jorge Vega**, pela análise prévia do trabalho e pelas valiosas sugestões.

Ao **Dr. Sérgio Alves de Carvalho**, pelas facilidades oferecidas nos trabalhos realizados em casa de vegetação.

Ao **Benedito Wanderley da Cunha, Geraldo A. Ventura e Neurival Paiola**, pela ajuda durante a realização dos trabalhos em casa de vegetação.

Ao **Kleber Martins Borges**, pela valiosa ajuda na execução dos gráficos e montagem das fotos apresentadas no trabalho.

Aos colegas **Helvécio Della Coletta Filho, Mariângela Cristófani e Célia Regina Baptista**, pela convivência e amizade.

À **Terezinha V.A.P. Chiodetto**, por toda a ajuda e atenção dispensada.

À **Fundação Instituto Agrônomo de Campinas**, pelo apoio financeiro e por todas as facilidades oferecidas.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na execução deste.

Índice

1. Introdução e Revisão	01
1.1. A tristeza dos citros	01
1.2. O vírus da Tristeza dos citros (CTV)	04
1.2.1. Caracterização e propriedades biológicas	04
1.2.2. Capsídeo e estrutura genética	10
1.2.3. Detecção e diferenciação de isolados	18
1.2.4. Manejo da tristeza e perspectivas	23
2. Objetivos	25
3. Material e Métodos	26
3.1. Material vegetal e isolados do CTV	26
3.2. Multiplicação de isolados fraco e severo do vírus da tristeza em diferentes espécies e variedades	27
3.2.1. Infecção das plântulas com os isolados do vírus	27
3.2.2. Extração de proteínas totais de tecido vegetal para “Western blot”	28
3.2.3. “Western blot”	28
3.3. Clonagem, expressão e análise do gene do capsídeo	29
3.3.1. Isolamento de dsRNA	29
3.3.2. Síntese da primeira fita de cDNA	30
3.3.3. Amplificação do gene da capa protéica através de PCR	31
3.3.4. RFLP	34
3.3.5. Clonagem do gene da capa protéica	34
3.3.5.1. Purificação de fragmentos	36
3.3.5.2. Preparo de células competentes, transformação e seleção dos recombinantes	37
3.3.6. Indução da expressão e purificação da proteína do capsídeo	39
3.3.6.1. pMALc2	39
3.3.6.2. pET22	40
3.3.7. Produção de anticorpos policlonais	41
3.3.8. “Dot blot” do dsRNA	42

3.3.9. Sequenciamento	44
3.3.9.1. Minipreparação de DNA de plasmídeo	46
4. Resultados	48
4.1. Multiplicação do vírus em diferentes espécies e variedades	48
4.2. Isolamento de dsRNA e amplificação do gene da capa protéica	55
4.3. Purificação da proteína de fusão e produção de anticorpos policlonais	60
4.4. RFLP do gene da capa proteica de isolados do CTV	70
4.5. Determinação da ocorrência de misturas de isolados por hibridização	75
4.6. Sequenciamento do gene da capa protéica de isolados do CTV	78
4.7. RT-PCR na detecção de isolados	87
5. Discussão	100
6. Conclusões	113
7. Resumo	115
8. Summary	118
9. Referências Bibliográficas	120
10. Apêndice	138

Abreviaturas

BD/RT/PCR	Bi-directional reverse transcription polymerase chain reaction
BYV	Beet yellow virus
CP	Coat protein
CTV	Citrus tristeza virus
DI-RNA	Defective interfering RNA
DsRNA	Double stranded RNA
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
<i>x g</i>	Aceleração da gravidade
h	Hora
HEL	Helicase
LIYV	Lettuce infectious yellow virus
mim	Minuto
MT	Methyl transferase
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
RdRp	RNA polimerase RNA dependente
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
rpm	Rotações por minuto
RT/PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SSCP	Single stranded conformational polymorphism
ssRNA	Single stranded RNA
TCV	Turnip crinkle virus

1. Introdução e Revisão

1.1. A tristeza dos citros

A tristeza dos citros é considerada uma das mais importantes doenças que atingiram esta cultura nos últimos 90 anos. Foi registrada pela primeira vez no início do século quando ocorreu o desenvolvimento da indústria de citros na África do Sul (Bennett e Costa, 1949). Na época, foi observado que variedades de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) quando enxertadas em laranja Azeda (*Citrus aurantium* L.) não cresciam. Inúmeras tentativas de se usar a laranja Azeda como porta-enxerto foram feitas sem sucesso em nenhuma delas. Deste modo, apesar das vantagens da laranja Azeda como porta-enxerto, tais como adaptação a muitos solos, tolerância à *Phytophthora* e a outros patógenos transmissíveis por enxertia, e também ser compatível com muitas variedades copa (Rocha-Peña *et al.*, 1995), seu uso foi reduzido nas áreas de ocorrência da tristeza (Webber, 1943).

Problemas semelhantes aos da África do Sul foram observados em Java (Toxopeus, 1937); na Argentina (Carrera, 1933; Carrera, 1935); no Brasil (Bitancourt, 1940); no Uruguai (Bertelli e Bertelli, 1944); nos Estados Unidos, na Califórnia (Fawcett, 1946) e na Austrália (McAlpin *et al.*, 1948). Nas décadas de 60 e 80 a doença atingiu a Espanha e Venezuela, respectivamente (Cambra *et al.*, 1988). Na Argentina e Uruguai foi considerada uma doença de raízes e recebeu o nome de "podredumbre de las raicillas de los citros". No Brasil foi chamada de tristeza, nos Estados Unidos de "quick decline" e na Austrália de "bud-union decline".

O fracasso das tentativas de se enxertar laranja doce em laranja Azeda foi atribuído à incompatibilidade entre copa e porta-enxerto (Bennett e Costa, 1949), devido a uma substância produzida pela copa que seria tóxica ao porta-enxerto

(Toxopeus, 1937). Somente quando foi detectada na América do Sul, onde causou perdas inestimáveis, é que surgiram outras teorias para tentar explicar as causas da doença. Entre elas, foram citadas: incompatibilidade fisiológica entre copa e porta enxerto; acidez e alto teor de umidade do solo; períodos prolongados de seca; organismos patogênicos e infecção por vírus (Bennett e Costa, 1949). O fim da década de 30 e a década de 40 foram marcados por extensos esforços visando determinar as causas da doença.

Bitancourt (1944) suspeitou que a doença era causada por um vírus, mas foi só em 1946, através do trabalho desenvolvido por Meneghine (1946), que foi obtida a confirmação da natureza infecciosa da tristeza. Meneghine transmitiu a doença através do pulgão preto dos citros *Aphis citricidus* Kirk, também conhecido na época por *Aphis tavaresi* Del Guercio. Na mesma época, Fawcett e Wallace (1946), Wallace e Fawcett (1947) e Oberholzer *et al.* (1947) transmitiram a doença através de enxertia de borbulhas de plantas doentes, o que também veio indicar que a tristeza era causada por vírus. No Brasil, os resultados de Meneghine foram confirmados por Bennett e Costa (1949), que conseguiram transmitir a tristeza através do pulgão preto dos citros (*Toxoptera citricidus* Kirk) e também por enxertia de borbulhas infectadas.

O *Toxoptera citricidus* é considerado um vetor altamente eficiente, sendo responsável por boa parte da disseminação do vírus da tristeza na América do Sul, África do Sul, Austrália e Ásia (Costa e Grant, 1951; Costa *et al.*, 1968; Retuerma e Price, 1972; McClean, 1975). Em outros países, espécies vetoras diferentes foram encontradas, como: *Aphis gossypii* (Glov.), *A. spiraecola* Patch., *T. aurantii* (B. de F.), *Mysus persicae* Sulz., *Aphis craccivora* (Koch), e *Dactynotus jaceae* L.; porém, nas condições brasileiras, o único vetor eficiente é o *Toxoptera citricidus* (Müller e Costa, 1993).

A partir do descobrimento que o agente causal da tristeza era um vírus transmitido pelo pulgão preto dos citros e por enxertia de material infectado, um

dos pontos fundamentais a ser determinado em relação à doença foi saber se o vírus era de parênquima ou de floema. Existiam evidências que o vírus era de floema, pois em plantas apresentando sintomas da tristeza o floema apresentava-se colapsado, o que sugeria que o vírus poderia ser limitado a ele (Schneider *et al.*, 1947). Através de experiências de anelagem, Costa *et al.* (1949) provaram que o vírus era realmente limitado aos tecidos do floema.

Grant *et al.* (1951) concluíram, baseado em análises comparativas, que os problemas observados nas principais regiões de ocorrência da tristeza eram todos manifestações de uma mesma doença, ocasionados, provavelmente, pela movimentação de material vegetativo contaminado sem sintomas da tristeza e também do vetor transmissor do vírus. O CTV provavelmente já estava presente em plantas de citros no Oriente, local de origem da cultura, sem causar sintomas e foi detectado a primeira vez na África do Sul quando da tentativa de se usar a laranja Azeda como porta enxerto (Bar-Joseph *et al.*, 1989).

Como medida de controle da doença no Brasil, foi adotado o uso de porta-enxertos tolerantes, que não se mostrou completamente viável para algumas variedades de laranja doce (Müller e Costa, 1977). Deste modo, outras medidas de controle precisaram ser desenvolvidas. Trabalhos de proteção cruzada foram, então, pela primeira vez executados no Brasil por Müller e Costa (1977). Os autores verificaram que a infecção das plantas com isolados fracos do vírus da tristeza no Brasil protegiam contra a super-infecção por isolados severos (Müller, 1980). Atualmente, cerca de 50 milhões das plantas de laranja Pera plantadas no Brasil originaram-se de um programa que teve como objetivo a distribuição de material pré-imunizado com isolados protetivos do vírus sem perder a capacidade de proteção após sucessivas gerações clonais (Müller e Costa, 1993).

Apesar da tristeza estar amplamente disseminada nos citros, devido à eficiência do vetor *Toxoptera citricidus*, pode-se dizer que no Brasil a doença está

satisfatoriamente controlada (Müller e Costa, 1993). A ausência de sintomas em uma planta não implica que o vírus não está presente. A maioria das variedades é considerada tolerante pela sua capacidade de conviver com o vírus sem expressiva redução de produção ou desenvolvimento de sintomas (Bar-Joseph *et al.*, 1989). No entanto, não é descartado o perigo da ocorrência de isolados muito severos do vírus que poderiam quebrar a proteção conferida às plantas pelos isolados fracos, acarretando prejuízos inestimáveis. Deste modo, a seleção de diferentes isolados fracos do vírus para serem usados nos trabalhos de proteção cruzada de variedades susceptíveis de laranjas é de extrema importância.

1.2. O vírus da tristeza dos citros (CTV)

1.2.1. Caracterização e propriedades biológicas

As partículas do CTV foram observadas pela primeira vez no Brasil através dos trabalhos desenvolvidos por Kitajima (1963), Kitajima *et al.* (1965) e Kitajima e Costa (1968), usando técnicas de microscopia eletrônica. Nestes trabalhos, foram detectadas partículas alongadas e flexuosas em preparações de folhas de plantas infectadas, que correspondiam ao CTV. Estas partículas não foram detectadas em tecidos de plantas controle sadias, bem como em espécies e variedades de citros conhecidas por sua resistência ou imunidade ao CTV, como *Poncirus trifoliata* Raf., *Severinia buxifolia* Ten. ou Citrange Troyer (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) (Kitajima *et al.*, 1965).

O CTV possui partículas longas, filamentosas de aproximadamente 10-12 nm de diâmetro e 2000 nm de comprimento (Kitajima, 1963; Bar-Joseph *et al.*, 1979). Foi incluído no grupo dos Closterovirus, que compreende os vírus com partículas filamentosas e flexuosas, com comprimento variando de 1250 a 2000 nm (Bar-Joseph *et al.*, 1979), juntamente com o Beet Yellow Virus (BYV) e o Lettuce Infectious Yellow Virus (LIYV).

O vírus é transmitido de maneira semi-persistente pelos afídeos vetores, com um período de aquisição de 30 min a 24 h (Raccah *et al.*, 1976 a, b). Após a aquisição, os afídeos podem permanecer inoculativos de 24 a 36 h (Costa e Grant, 1951; Raccah *et al.*, 1976 a). Em trabalhos realizados por Retuerma e Price (1972) a transmissão do vírus foi obtida com períodos de alimentação e aquisição de apenas alguns segundos. No entanto, de acordo com Raccah *et al.* (1976 a) são necessários períodos maiores, de 30 min a 24 h, pois os afídeos precisam atingir os tecidos do floema tanto para adquirir como para transmitir o vírus. De um modo geral, a eficiência da transmissão aumenta com o tempo de aquisição do vírus através da alimentação (Bar-Joseph *et al.*, 1979).

O CTV é capaz de infectar muitas espécies, variedades e híbridos de *Citrus*, como também outros membros da família das Rutaceas como: *Aglopsis chevaliere*, *Afraegle paniculata*, *Pamburus missiones*, *Aegle marmelos* (Müller e Garnsey, 1984). Müller *et al.* (1974) inocularam o CTV em aproximadamente 200 espécies de plantas fora da família das Rutaceas e somente em *Passiflora gracilis* ocorreu sua multiplicação. A multiplicação do CTV em um sistema de protoplastos de *C. sinensis* Osb. cv. Hamlin foi desenvolvido recentemente por Price *et al.* (1996), podendo ser detectado o RNA genômico e também as partículas virais.

Em células de plantas infectadas com o CTV são produzidas inclusões que se localizam principalmente no floema. Essas inclusões são estruturas intracelulares de agregados de partículas virais e proteínas relacionadas, detectadas pela primeira vez por Schneider (1959). As inclusões podem ser observadas nos tecidos do floema de plantas infectadas com o CTV através de coloração com Azure A e / ou imunofluorescência “*in situ*”. De acordo com Bransky (1987) e Bransky *et al.* (1988), esses métodos podem ser usados na detecção do CTV, e o número de inclusões observadas nos tecidos de plantas infectadas pode ser relacionado à severidade do isolado do vírus. Deste modo,

sob condições de crescimento uniformes, as inclusões podem ser úteis para a diferenciação de isolados fracos e severos do CTV (Brlansky & Lee, 1990).

Os inúmeros isolados do CTV são encontrados nas diversas áreas de cultivo de citros do mundo, causando variados sintomas em função principalmente das combinações de copa e porta-enxerto (Wallace, 1978). As propriedades biológicas do CTV como a severidade em plantas no campo ou em indicadoras (McClellan, 1974; Roistacher e Moreno, 1991), transmissibilidade por afídeos (Bar-Joseph e Loebenstein, 1973), ou habilidade de proteção cruzada (Müller e Costa, 1972) foram usadas inicialmente para caracterizar os diferentes isolados. De acordo com McClellan (1974), os vários sintomas induzidos pelo CTV devem ser, provavelmente, produzidos por variantes de um único vírus.

Garnsey *et al.* (1991) estabeleceram uma coleção internacional de isolados do CTV e, através de ensaios biológicos, compararam e descreveram vários isolados do vírus presentes em diferentes países. Os isolados do CTV foram classificados em 5 grupos, de acordo com sua atividade biológica em diferentes hospedeiros: *fracos*, induzindo apenas clareamento de nervuras em limão Galego (*Citrus aurantifolia* Christm.), e os causadores de *declínio rápido*, “*seedling yellows*” (amarelecimento de plântulas), caneluras em pomelo (*Citrus paradise* Macf.) e caneluras em laranja doce.

O limão Galego é considerado um indicador sensível ao CTV, expressando sintomas de clareamento de nervuras, acanoamento de folhas, nanismo e caneluras. No entanto, estes sintomas não refletem necessariamente a severidade do isolado em outras espécies e variedades de citros (Rocha-Peña *et al.*, 1995).

Laranja doce (*C. sinensis* L. Osb) enxertada em laranja Azeda (*C. aurantium* L.) é a indicadora de isolados do CTV indutores de declínio rápido. Em árvores no campo o declínio pode ser rápido ou gradual (McClellan, 1974), conforme ocorre

a necrose do floema na região da enxertia. Quando borbulhas infectadas com isolados indutores de declínio rápido são enxertadas em plântulas de laranja Azeda, as plantas resultantes crescem pouco e raras vezes produzem frutos de qualidade (Rocha-Peña *et al.*, 1995).

A detecção de isolados do CTV causadores de "seedling yellows" é feita normalmente em plântulas de laranja Azeda. Este isolado induz clorose e redução de crescimento em plantas de laranja Azeda, pomelo e limão (*C. limon* L. Burm.). É uma reação observada geralmente em casa de vegetação (Wallace, 1978). Porém, existem indicações que limões e pomelos enxertados em porta-enxertos infectados com isolados "seedling yellows" podem apresentar os mesmos sintomas no campo.

A indicação da presença de isolados do CTV causadores de caneluras é feita em plântulas de pomelo Duncan e laranja doce Madame Vinous. Os sintomas causados em plantas comerciais são perda do vigor, redução na produção e frutos de tamanho pequeno (Rocha-Peña *et al.*, 1995). Pomelos e limas ácidas são os mais afetados, no entanto, podem ocorrer caneluras severas em algumas variedades de laranja doce (Shneider, 1959; Wallace, 1978). Os isolados causadores de caneluras também podem causar clareamento de nervuras e "vein corking" em folhas de limão ou laranja doce (Rocha-Peña *et al.*, 1995).

Cabe lembrar que os sintomas induzidos pelo CTV podem variar, além do isolado do vírus e do hospedeiro, com as condições ambientais, e também com as interações do CTV com outros vírus ou patógenos semelhantes a vírus presentes no hospedeiro (Wallace, 1968, 1978; Navarro *et al.*, 1988).

A ocorrência de declínio em variedades de laranja doce enxertadas em porta-enxertos tolerantes na Estação Experimental de Capão Bonito - IAC - Capão Bonito - SP, foi constatada no final de 1965 por Müller *et al.* (1968 a). Os autores concluíram, através de observações em campo e experimentos em casa de

vegetação, que o tipo de declínio observado na região de Capão Bonito era causado por um complexo do CTV diferente dos que ocorriam em outras áreas citrícolas do Estado de São Paulo. Foram afetadas praticamente todas as variedades de laranja doce plantadas na região (Müller *et al.*, 1968 a).

As plantas de laranja doce infectadas com o complexo Capão Bonito do CTV (CTV-CB) apresentavam baixa taxa de crescimento, brotos axilares curtos, galhos que se quebravam com facilidade, folhas menores que o normal e com sintomas de deficiência de nutrientes, frutos menores, secos e com sementes mal formadas. Foi observado, também, caneluras severas, diferente das observadas em plantas de laranja doce presentes em outras regiões; as caneluras presentes eram mais numerosas, curtas e superficiais, podendo ser observadas pontuações escuras no lenho produzidas por impregnações de goma, quando os ramos com caneluras eram cortados no sentido longitudinal. (Müller *et al.*, 1968 a).

No entanto, as principais características que diferenciaram o complexo do CTV de Capão Bonito dos de outras regiões, foi o forte declínio das variedades de laranja doce e a indução de caneluras em porta enxerto de limão cravo, ainda não observados em outras áreas citrícolas do Estado de São Paulo (Müller, 1976). Foi sugerido que o complexo do CTV presente em Capão Bonito pertence ao complexo de isolados do vírus chamado de “strain” asiático, responsável pelo aniquilamento de pomares de laranja doce na região costeira do Peru (Müller e Costa, 1993).

Na ocasião, os prejuízos causados pelo CTV não foram significantes, pois Capão Bonito não era uma região produtora de citros. Mesmo assim, algumas medidas foram adotadas, com o objetivo de se obter variedades de laranja doce que pudessem crescer e produzir naquela região (Müller *et al.*, 1968 a, b). Trabalhos de pré-imunização de clones sadios de laranja doce com isolados do vírus que pudessem proteger contra o complexo do CTV presente em Capão

Bonito foram executados. Os resultados destes trabalhos mostraram que os isolados fracos do CTV protegiam contra o severo de Capão Bonito em alguns casos; porém, foi observado que algumas árvores, supostamente protegidas, apresentavam sintomas do CTV de Capão Bonito que poderiam ser devidos a uma quebra na proteção ou a uma falha na inoculação do isolado protetivo do vírus (Müller *et al.*, 1988). No caso específico da laranja “Pera”, a principal variedade de laranja doce cultivada no Estado de São Paulo, apesar dos trabalhos de pré-imunização com isolados fracos do CTV, as plantas desta variedade na região de Capão Bonito apresentavam sempre algumas caneluras no tronco (Müller *et al.*, 1988). Atualmente, com a expansão da citricultura no sul do Estado de São Paulo, onde se localiza a região de Capão Bonito, aumentou o interesse em se encontrar isolados do CTV com capacidade de proteger a laranja Pera contra o complexo do vírus lá presente.

A seleção de isolados do CTV vem sendo realizada há muitos anos no Estado de São Paulo, tendo sido alguns deles bem caracterizados biologicamente. O isolado presente em Pera IAC foi coletado 34 anos atrás por Müller e Costa (1977) de pomares de laranja Pera e selecionado como o melhor de 45 isolados testados em experimento de proteção cruzada. Indexado em limão Galego, dá uma reação fraca de CTV. Sua estabilidade e alto grau de proteção foram responsáveis pelo sucesso da pré-imunização em laranja Pera no Estado de São Paulo. No momento, existem aproximadamente 50 milhões de árvores crescendo satisfatoriamente, obtidas do programa de pré-imunização com isolados protetivos do vírus.

Grant e Costa (1948) selecionaram o isolado do CTV presente na laranja doce Barão, que foi chamado pelos autores de Barão B. Este isolado foi coletado no campo, de plantas sem sintomas, mas portadoras do vírus, e é mantido até hoje em condições de casa de vegetação. Borbulhas de plantas de Barão B, quando enxertadas em laranja doce, não induzem reação de tristeza. Porém, quando

enxertadas em laranja Azeda e pomelo, apresentam reação severa de tristeza (Grant e Costa, 1948; G. W. Müller, comunicação pessoal).

O isolado presente em Pera Ipiгуá, planta cultivada em pequena escala no Estado de São Paulo e utilizada neste trabalho como fonte de vírus, dá uma reação severa de CTV em Galego (S. A. Carvalho, comunicação pessoal). O isolado presente em Galego, também utilizado neste trabalho, vem de uma árvore mostrando caneluras no tronco.

O isolado presente em Pera 135 sobre Cravo 507, da Estação Experimental de Capão Bonito (Pera 135-CB), utilizado neste trabalho, produz uma reação muito severa de tristeza. A planta, inoculada por união de tecidos na fase de muda com o complexo Capão Bonito do CTV, apresenta porte muito reduzido, caneluras generalizadas na copa e no porta-enxerto e as brotações possuem entrenós curtos.

1.2.2. Capsídeo e estrutura genética

Considerado o maior vírus conhecido de planta, as partículas do CTV contêm RNA fita simples (ssRNA), não segmentado, "positive sense", com peso molecular aproximado de $6,5 \times 10^3$ KDa, que corresponde a 20 Kb. O vírus não possui cauda poli-A na extremidade 3' (Bar-Joseph *et al.*, 1979). O tamanho do genoma do CTV é considerado aproximadamente 3 vezes maior que o tamanho médio do genoma dos outros vírus de planta conhecidos, o que pode, em parte, justificar a diversidade genética existente nesse grupo (Niblett *et al.*, 1993). Outro fator que pode justificar a existência de um grande número de isolados do CTV é a baixa fidelidade da RNA polimerase RNA dependente, que produz cerca de 10^{-3} - 10^{-4} erros em cada ciclo de replicação (Drake, 1993; Holland *et al.*, 1982).

Vários procedimentos de purificação das partículas virais foram desenvolvidos (Silva *et al.*, 1965; Bar-Joseph *et al.*, 1970; Lee *et al.*, 1987). Em gradiente de sacarose o vírus consiste de um componente com um coeficiente de sedimentação de 140 ± 10 S. (Bar-Joseph *et al.*, 1970). Em sulfato de céσιο, a densidade da partícula é de 1,257 g/cm e a razão da $A_{260/280}$ dos vírus purificados é de $1,21 \pm 0,1$ (Bar-Joseph *et al.*, 1972).

Em trabalhos iniciais de purificação e análise de proteínas do capsídeo do CTV através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), realizados por Bar-Joseph *et al.* (1972), foi observado um único peptídeo de aproximadamente 25 ± 1 KDa. Trabalhos de caracterização das proteínas do capsídeo de cinco isolados do CTV da Flórida foram realizados por Lee e Calvert (1987) e Lee *et al.* (1988). Nestes trabalhos foram detectados peptídeos de 23 e 21 KDa, chamados CP1 e CP2 (coat protein), respectivamente, presentes em uma proporção de 5:1 (CP1:CP2). Já em preparações de proteínas do capsídeo de isolados do CTV encontradas na Espanha e Israel foram observados peptídeos de 27-28 e 26 KDa para CP1 e CP2, respectivamente (Guerri *et al.*, 1990).

Rosner *et al.* (1983) prepararam o primeiro banco de cDNA a partir de dsRNA do isolado VT do CTV de Israel. Obtiveram clones contendo insertos de 200-2000 pb, sendo vários deles específicos do CTV, capazes de detectar e diferenciar isolados em plantas infectadas. Calvert (1987) preparou bancos de cDNA a partir de RNA de isolados fracos e severos do CTV presentes na Flórida. Dois clones foram selecionados do banco de cDNA preparado a partir de RNA de isolado severo. Juntos, estes clones representaram 70% do genoma total do CTV e foram utilizados em trabalhos posteriores de caracterização molecular do vírus.

Sekiya *et al.* (1991) prepararam um banco de cDNA a partir do RNA do isolado T- 36 do CTV em vetor lambda Zap II, e selecionaram clones contendo o gene

da capa protéica com anticorpos policlonais produzidos contra a proteína do capsídeo do vírus. Os autores obtiveram cinco clones positivos, produzindo proteínas em *E. coli*, que reagiram com anticorpos mono e policlonais específicos da proteína do capsídeo do CTV. O sequenciamento dos clones e a comparação das regiões comuns entre eles revelou a presença de uma “open reading frame” (ORF) de 669 nucleotídeos, cercada por vários códons de terminação. A proteína codificada possuía 24909 Da. A comparação da sequência de aminoácidos, deduzida da sequência de ácidos nucleicos, com a sequência amino terminal de CP1 e CP2 mostrou que estas duas proteínas originaram-se do mesmo produto de tradução primário, devido à proteólise pós traducional em sítios aproximados de 12 a 15 e 26 aminoácidos do amino terminal, respectivamente (Sekiya *et al.*, 1991).

Após a primeira publicação da sequência de nucleotídeos do gene da capa protéica do CTV, trabalhos de clonagem e sequenciamento do mesmo gene foram realizados utilizando outros isolados do vírus. Niblett *et al.* (1992), Pappu *et al.* (1993 b) e Manjunath *et al.* (1994) desenvolveram trabalhos de comparação da sequência do gene da capa protéica do CTV de isolados biológica e geograficamente distintos. De acordo com os autores, existe entre 90-100% de homologia na sequência de ácidos nucleicos e aminoácidos deduzida entre os diversos isolados estudados.

O genoma do isolado T-36 do CTV presente na Flórida foi clonado e os 7259 nucleotídeos do final 3' foram sequenciados por Pappu *et al.* (1994 a). Karasev *et al.* (1994; 1995) completaram a sequência de nucleotídeos de todo o genoma do vírus. O genoma completo do CTV possui 19296 nucleotídeos, com 12 ORFs codificando potencialmente 17 proteínas. Nos finais 5' e 3' foram observadas regiões não codificantes de 108 e 277 nucleotídeos, respectivamente. Na Figura 1 é apresentada a representação esquemática do genoma do CTV.

As 12 ORFs codificam, da região 5' para a 3', produtos proteicos de 349, 57, 33, 6, 65, 61, 27, 25, 18, 13, 20 e 23 KDa (Pappu *et al.*, 1994 a; Karasev *et al.*, 1994; 1995). O produto da ORF 1a (p349), contém domínios característicos de duas proteases semelhantes a papaína (“papain like-proteases” - P-PRO), uma metiltransferase (MT) e uma helicase (HEL). A ORF 1b codifica a proteína de 57 KDa (p57), uma provável RNA polimerase RNA dependente (RdRp). A ORF 2, subsequente ao gene da polimerase, codifica uma proteína de 33 KDa (p33). A ORF 3 codifica uma proteína de 6 KDa (p6) muito similar à 6,4 K do BYV (Beet Yellow Virus). A ORF 4 codifica uma proteína de 65 KDa (p65), homóloga à 70 “heat shock protein” (hsp), e também à p65 do Beet Yellow Virus (BYV).

A ORF 5 codifica uma proteína de 61 KDa (p61), que apresenta similaridades com a p64 do BYV. Uma proteína de 27 KDa (p27) é codificada pela ORF 6. A p27 foi apontada como uma uma cópia divergente da p25 (proteína do capsídeo), que é codificada pela ORF 7. A p25 possui 223 aminoácidos e seu PM é 25 KDa. A p25 e a p27 estão relacionadas com a p24 do BYV. As ORF 8, 9 e 10 codificam proteínas de 18 (p18), 13 (p13) e 20 (p20) KDa, não tendo sido observadas relações de similaridade destas proteínas com outras através da pesquisa em banco de dados de sequência de genes. A ORF 11 codifica uma proteína de 23 KDa (p23), que possui propriedades de “RNA binding” (Dolja *et al.*, 1994; Pappu *et al.*, 1994 a; Karasev *et al.*, 1994; 1995).

Pappu *et al.* (1997) caracterizaram a ORF 11 do genoma do CTV, que codifica uma proteína de 209 aminoácidos, com peso molecular de 23 KDa (p23). A ORF da p23 foi expressa em *E. coli* e a proteína expressa foi usada para produção de anticorpos policlonais em coelhos. Através de “Western blot”, ficou demonstrado que a maior parte da p23 foi detectada na fração solúvel do citoplasma. A comparação da sequência do gene da p23 de isolados do CTV biológica e geograficamente distintos, mostrou que existe um alto grau de conservação deste gene e também do domínio da “RNA binding”. O dendrograma gerado a partir do alinhamento das sequências de aminoácido da p23, agrupou os

isolados de acordo com suas propriedades biológicas, formando grupos distintos de isolados causadores de sintomas fracos, declínio rápido e caneluras. Baseado nos resultados obtidos, os autores sugeriram que a p23 também pode ser usada como indicadora de severidade da tristeza.

Uma grande semelhança na sequência de nucleotídeos do genoma do CTV e BYV foi observada, a nível de sequência de produtos gênicos, e também de organização de genoma (Pappu *et al.*, 1994 a). Através da análise da sequência de nucleotídeos do genoma do CTV, dois blocos gênicos foram identificados (Karasev *et al.*, 1995). O primeiro deles inclui os genes responsáveis pela replicação do vírus, MT, HEL e RdRp, sendo este bloco conservado em outras famílias relacionadas. O segundo bloco consiste de 5 ORFs, 3 a 7, que são conservadas entre todos os membros do grupo dos closterovirus.

Dados obtidos através de "Northern blot", usando sondas específicas de sequências do genoma do CTV, forneceram evidências da síntese dos nove RNAs 3' terminais durante a infecção viral em plantas hospedeiras (Hilf *et al.*, 1995). Este resultado indica que esses genes são expressos através de RNAs subgenômicos, sendo os da p20 e p23 os mais abundantes, superados apenas pelo da p25 ("coat protein"). No trabalho realizado pelos autores, não foram detectados RNAs subgenômicos maiores que o da ORF p33, o que está de acordo com o mecanismo proposto para o BYV, onde a replicase viral é traduzida diretamente do RNA genômico (Agranowski *et al.*, 1994). As proteínas codificadas pela metade 5' do genoma do vírus parecem ser expressas diretamente do RNA genômico do CTV (Hilf *et al.*, 1995).

Apesar de ter sido demonstrado anteriormente que a partícula do CTV possui apenas um tipo de proteína no capsídeo, de 24-25 KDa, trabalhos realizados recentemente por Febres *et al.* (1996) indicaram que a p27 e a p25 (proteína do capsídeo) estão associadas. Técnicas de microscopia eletrônica associadas a

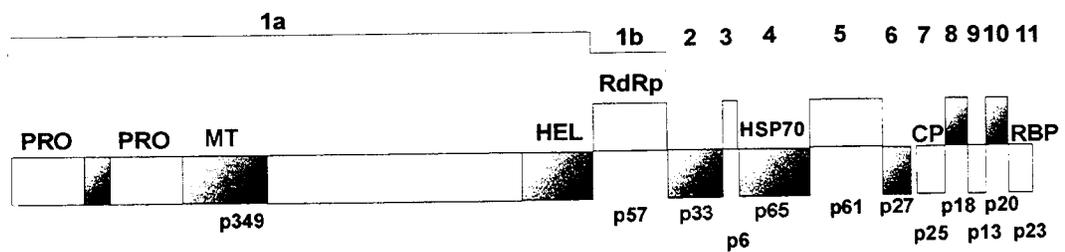


Figura 1. Representação esquemática do genoma do CTV. Os retângulos representam as ORFs. Os números indicados acima do esquema correspondem às ORFs, e os indicados abaixo, às proteínas codificadas por elas. Retirado de Karasev *et al.* (1995).

imunocitoquímica com anticorpos produzidos contra a p25 e p27 foram usadas para a realização destes trabalhos. Ficou demonstrado que ocorria reação de marcação somente em um segmento de 75-85 nm de comprimento em um dos extremos da partícula do CTV do isolado da Flórida e Israel, quando o anticorpo contra a p27 foi usado. Anticorpos contra a p25 marcaram a maior parte da partícula viral, menos um segmento de 75-85 nm de comprimento, localizado em uma das extremidades. Trabalhos realizados por Agranowsky *et al.* (1995) demonstraram que a p24 do BYV localiza-se em um segmento de 75 nm de comprimento, em um dos extremos da partícula do vírus. Baseado nesses resultados, os autores sugeriram que os vírions dos closterovirus possuem uma estrutura polar e são compostos de duas proteínas do capsídeo, além da p24 poder estar envolvida na montagem da partícula viral ou na transmissão por afídeos. Devido ao acúmulo da p27 na parede celular de tecidos infectados com o CTV, foi sugerido por Febres *et al.* (1994) que a p27 estaria associada à movimentação do vírus entre as células, após uma associação com o RNA viral.

Mais recentemente, Mawassi *et al.* (1996) sequenciaram todo o genoma de um outro isolado do CTV chamado VT (CTV-VT), de Israel, causador de “seedling yellows”, e compararam os dados da sequência com os do isolado CTV-T36. A organização do genoma é a mesma nos dois isolados; no entanto, o genoma do CTV-VT possui 70 nucleotídeos a menos que o do isolado CTV-T36. Através do alinhamento da sequência de nucleotídeos dos dois isolados do vírus, ficou demonstrado que a metade 3' do genoma do CTV-VT apresentava maior semelhança com a do isolado CTV-T36 que a metade 5', apresentando 87,4 e 70,7% de homologia, respectivamente. De acordo com os autores, ocorreu um aumento gradual na porcentagem de homologia na sequência de nucleotídeos do genoma dos dois isolados do CTV a partir do centro do genoma, em direção ao final 3'. As regiões não codificantes 5' e 3' apresentaram 60 e 97% de homologia, respectivamente. Esta característica de transição gradual de dissimilaridade e similaridade entre a sequência do genoma do CTV-VT e CTV-T36 poderia ser atribuída a eventos de recombinação ocorridos entre dois

isolados do vírus, sendo um deles muito semelhante ao CTV-T36, e o outro não (Mawassi *et al.*, 1996).

Mawassi *et al.* (1995 a) descreveram o primeiro “defective-interfering RNA” (DI-RNA) no grupo dos closterovirus. DI-RNAs são moléculas de RNA não autônomas, derivadas inteira ou principalmente de sequências de nucleotídeos do genoma do vírus. São encontrados associados a uma grande variedade de vírus animais (Huang e Baltimore, 1970) e a diferentes grupos de vírus de RNA de plantas, “+ sense”, como os tombovirus (Hillman *et al.*, 1987) e carmovirus (Li *et al.*, 1989). Usando ssRNA isolado da partícula do CTV, isolado VT, e ssRNA e dsRNA isolados de tecido infectado, Mawassi *et al.* (1995 a, b) verificaram que existia uma população de moléculas com características dos DI-RNAs. O primeiro DI-RNA clonado e sequenciado pelos autores foi o de 2424 nucleotídeos. Através dos dados do sequenciamento, foi demonstrado que esse DI-RNA era composto de dois fragmentos, um deles derivado de 1151 nucleotídeos do final 5' e o outro, de 1259 nucleotídeos do final 3' do RNA genômico do CTV (isolado VT), além de duas repetições de oito nucleotídeos de origem desconhecida no sítio de junção dos dois fragmentos. Este DI-RNA foi usado em trabalhos de tradução “*in vitro*” e foi constatado que ele não é um molde eficiente (Mawassi *et al.*, 1995 a). Foi demonstrado também que este RNA é encapsidado pela capa proteica do CTV, o que indica que a origem do empacotamento do vírus está localizada perto dos terminais 3' ou 5'. Outros dois DI-RNAs do VT, de 2,7 e 4,5 Kb também foram sequenciados por Mawassi *et al.* (1995 b). Esses DI-RNAs eram formados de fragmentos de 1818 e 4036 nucleotídeos do terminal 5' e 938 e 442 nucleotídeos do terminal 3' do RNA genômico do vírus, respectivamente.

Simon e Bujarski (1994) sugeriram que os DI-RNAs competem com o genoma do vírus pelos componentes da replicase, o que poderia resultar em um acúmulo reduzido do vírus, e também em uma atenuação dos sintomas virais nas plantas infectadas. No entanto, no caso do Turnip Crinkle Virus, foi verificado que DI-

RNAs intensificam os sintomas virais. Estudos com o CTV estão em andamento para determinar o possível papel dos DI-RNAs na sintomatologia das plantas infectadas com este vírus (Mawassi *et al.*, 1995 a, b).

Baseado nas principais diferenças no formato e organização do genoma do BYV, CTV e LIYV (Lettuce infectious yellow virus) e também nos resultados das análises filogenéticas realizadas por Dolja *et al.* (1994), foi proposto que cada um destes vírus passasse a ser considerado representante de três grupos distintos dentro da família *Closteroviridae*. *Closterovirus* seria usado para o BYV e gêneros relacionados; *Biclovirus* seria usado para o LIYV e gêneros relacionados; e *Citrivirus*, para o CTV e gêneros relacionados. Uma das características que diferenciaram o CTV é a duplicação do domínio da “papain-like protease” no final 5’ do genoma do CTV e a presença de 4 ORFs no final 3’ do genoma do vírus (Pappu *et al.*, 1994 a; Karasev *et al.*, 1995).

1.2.3. Detecção e diferenciação de isolados do CTV

O procedimento que tem sido usado para diferenciação de isolados do CTV é o ensaio biológico com plantas indicadoras. No entanto, este procedimento é muito lento, sendo necessários 12-15 meses para os testes de detecção de isolados que causam declínio rápido e “seedling yellows” (R. F. Lee, comunicação pessoal). Levando-se em conta o espaço necessário em casa de vegetação, despesas com a manutenção do material e de pessoal especializado para realizar os trabalhos, o processo é caro.

A rápida diferenciação de isolados do vírus é necessária, principalmente em situações onde decisões a respeito de medidas de controle precisam ser tomadas, como no caso de quarentena e seleção de plântulas em viveiros. Além do processo de indexação biológica ser caro e demorado, nem sempre permite uma identificação correta dos isolados do CTV.

Um dos primeiros procedimentos desenvolvidos para a caracterização de isolados foi o mapeamento de peptídeos da proteína do capsídeo do CTV com endopeptidases (Lee e Calvert, 1987). A técnica pode detectar somente diferenças localizadas no gene da capa proteica, que representa uma pequena parte do genoma do vírus (3%), e podem não ser relacionadas à patogenicidade. Não se mostrou um método prático para a identificação rotineira de isolados do vírus (Moreno e Guerri, 1992).

O vírus da tristeza dos citros não é um único vírus, e sim um complexo de vírus relacionados imunologicamente, o que torna problemática a sua detecção (Powell, 1992). O uso de anticorpos policlonais na diferenciação de isolados não é eficiente. Já os anticorpos monoclonais reconhecem um único sítio antigênico na proteína do capsídeo do CTV, sendo seu uso adequado quando se deseja diferenciar isolados do vírus (Garnsey e Cambra, 1992).

Com a disponibilidade dos anticorpos mono e policlonais contra a proteína do capsídeo do CTV, vários testes começaram a ser usados a partir de 1978 para a detecção do vírus, entre eles: “sodium dodecyl sulphate (SDS) immunodiffusion” (Gonçalves *et al.*, 1978; Garnsey *et al.*, 1979), “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) (Bar-Joseph *et al.*, 1979); “radio immunosorbent assay” (Lee *et al.*, 1981), “immunofluorescent assay” (Tsuchizaki *et al.*, 1978; Brlansky *et al.*, 1984), “immunospecific electron microscopy” (Garnsey *et al.*, 1980), “Western blot” (Lee *et al.*, 1987), “tissue immunoprint method” (Garnsey *et al.*, 1993). Atualmente, os testes imunológicos que vêm sendo mais utilizados para detecção do CTV são ELISA e “Western blot”.

Um dos anticorpos monoclonais mais usados é o MAC-13, que reage com isolados causadores de declínio e / ou caneluras, e não reage com isolados fracos (Permar *et al.*, 1988, 1990). Através de mutagênese sítio dirigida, foi determinado que a reatividade do MCA-13 é controlada pela troca de um único

nucleotídeo, adenina para timina, na posição 371 do gene do capsídeo (Pappu *et al.*, 1993 a).

O monoclonal 3DF1 é outro anticorpo que vem sendo usado na detecção do CTV em vários laboratórios, reagindo com um grande número de isolados, independentemente dos sintomas em hospedeiros (Vela *et al.*, 1986). O 3DF1 reage apenas com a proteína do capsídeo intacta, não com os produtos proteolíticos. Através da comparação da sequência de nucleotídeos do gene da capa proteica de isolados do CTV que reagem com o 3DF1 com as poucas que não reagem, e também da comparação da sequência da proteína, foi possível localizar o epítipo do anticorpo 3DF1, na posição 2 do terminal amino da proteína do capsídeo. Também neste caso, é controlada por uma única troca de nucleotídeos (Pappu *et al.*, 1994 b; Pappu *et al.*, 1995).

A análise de dsRNA em plantas infectadas também tem sido usada para diferenciação de isolados do vírus (Moreno *et al.*, 1990, 1992). Existem, atualmente, várias técnicas para extração e purificação de dsRNA de tecidos infectados (Bar-Joseph *et al.*, 1983; Dodds e Bar-Joseph, 1983; Lee, 1984). As mais utilizadas empregam CF-11 (cellulose fibrous) e etanol para purificar seletivamente os dsRNAs. A visualização destes é feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose (Dodds *et al.*, 1987 b; Lee, 1984).

Em todos os isolados do CTV analisados até o momento foi observado um dsRNA grande, chamado forma replicativa "full length" do RNA (RF), de aproximadamente $13,3 \times 10^3$ KDa, e vários dsRNAs menores, chamados subgenômicos (Dodds e Bar-Joseph, 1983). O tamanho e a quantidade relativa dos dsRNAs subgenômicos dependem do isolado do vírus e do hospedeiro (Dodds *et al.*, 1983; Dodds *et al.*, 1987 a). Deste modo, o padrão eletroforético dos dsRNAs subgenômicos e forma replicativa podem ser usados como "fingerprint" para identificar isolados específicos em determinados hospedeiros (Bar-Joseph *et al.*, 1989).

Dodds *et al.* (1987 b) observaram que dois dos dsRNAs subgenômicos, com peso molecular de $1,9 \times 10^3$ e $0,8 \times 10^3$ KDa estavam presentes em todos os isolados analisados. Os autores também encontraram outros dois dsRNAs subgenômicos de $1,7 \times 10^3$ e $0,5 \times 10^3$ KDa associados com isolados do CTV que causam "seedling yellows" e caneluras, respectivamente.

As técnicas atuais de biologia molecular como PCR, clonagem e sequenciamento de DNA, permitiram um grande avanço no estudo do genoma do CTV (Niblett *et al.*, 1992). A associação entre a sequência de nucleotídeos do gene da capa proteica e a atividade biológica de isolados do vírus foi feita (Pappu *et al.*, 1993 b; Manjunath *et al.*, 1994). De acordo com os dados obtidos pelos autores, existe aproximadamente 90% de homologia entre as sequências nos diferentes isolados estudados. Isolados mais fracos encontram-se em um mesmo grupo, mais distante dos que causam declínio rápido e/ou caneluras. A comparação da sequência de aminoácidos, deduzida da sequência dos ácidos nucleicos, mostrou uma diferença consistente no aminoácido 124. Nos isolados fracos essa posição é ocupada por tirosina e nos fortes por fenilalanina (Pappu *et al.*, 1993 a)

Em trabalhos realizados por Niblett *et al.* (1992), o gene da proteína do capsídeo (GPC) de 42 isolados do CTV, biológica e geograficamente diferentes, foram clonados. Foram sequenciados 19 dos GPC e os autores também observaram que é possível agrupar as sequências de acordo com a severidade dos isolados. No entanto, para que possam ser consideradas indicadoras confiáveis de severidade de isolados, mais GPC precisam ser sequenciados, pois este gene representa apenas 669 dos 20000 nucleotídeos, ou seja, 3,4% do genoma do CTV (Niblett, 1992).

A identificação de isolados do CTV através de RFLP (restriction fragment length polymorphism) do gene da capa proteica do vírus, amplificado por PCR, foi feita por Gillings *et al.* (1993). De acordo com os autores, a identificação dos isolados

pode ser feita com rapidez e segurança usando-se este tipo de análise. Os autores amplificaram o gene da capa proteica de 51 isolados do CTV e digeriram o fragmento obtido com as enzimas *RsaI* e *HinfI*. Foi possível, através desta análise, detectar variações na sequência de nucleotídeos do gene da capa proteica dos isolados utilizados, e também constatar a existência de misturas de isolados do CTV em uma mesma planta. A enzima *HinfI* mostrou-se mais apropriada para este tipo de análise, e permitiu que fossem definidos sete grupos de RFLP, compostos por isolados do CTV apresentando atividade biológica semelhante (Gillings *et al.*, 1993).

Mais recentemente, Febres *et al.* (1995) utilizaram o procedimento chamado “single stranded conformational polymorphism” (SSCP), que permite a separação de moléculas de DNA similares em tamanho, mas que possuem diferenças na sequência de ácidos nucleicos. Devido às diferenças existentes, ocorrem mudanças na conformação da molécula, o que conduz a uma migração diferencial de moléculas de DNA simples fita em géis de poliacrilamida não desnaturantes. De acordo com os autores, através de RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) e SSCP, foi possível identificar diferenças na sequência de ácidos nucleicos entre vários isolados do CTV. Foram utilizados nas análises os genes da p27 e da p23 do vírus, tendo sido detectadas diferenças nos 2 genes entre os isolados utilizados. Isolados fracos produziram um mesmo padrão, diferente do padrão produzido por isolados do CTV causadores de caneluras.

Cevik (1995) e Cevik *et al.* (1995), baseado na diferença de um único nucleotídeo na sequência do gene da capa protéica do CTV, na posição 371, desenvolveram dois primers internos, sendo um específico de isolados fracos e um de isolados severos do vírus. Os autores utilizaram os primers internos em um teste chamado BD/RT/PCR (Bi-directional reverse transcription polymerase chain reaction), juntamente com os primers específicos dos finais 3' e 5' do gene da capa protéica do CTV e conseguiram diferenciar isolados fracos e severos.

Após BD/RT/PCR, isolados severos do CTV produzem um fragmento de aproximadamente 300 pb, ao passo que um fragmento de aproximadamente 400 pb é produzido por isolados fracos do vírus. Quando existe uma mistura de isolados do CTV na mesma planta, sendo um fraco e um severo, são produzidos fragmentos de aproximadamente 300 e 400 pb. Este teste provou ser de extrema rapidez e sensibilidade, e vem sendo usado com frequência na detecção e diferenciação de isolados do vírus (Cevik *et al.*, 1995).

1.2.4. Manejo da tristeza e perspectivas

Estratégias de manejo da tristeza, baseadas na ausência ou presença do CTV nas diferentes áreas de crescimento de citros, foram desenvolvidas (Lee e Rocha-Peña 1992). Com o objetivo de prevenir a introdução do CTV em países onde ele não está presente, foram adotados a quarentena, certificação de borbulhas e / ou programas de limpeza clonal. Em locais onde a incidência do CTV é baixa, a recomendação dos autores é a erradicação ou programas de supressão, juntamente com programas de limpeza clonal e certificação. Em regiões onde o CTV é endêmico, as medidas de controle indicadas são o uso de porta enxertos tolerantes, proteção cruzada com isolados protetivos do vírus, e resistência obtida através de hibridação genética somática e / ou engenharia genética.

A imunidade ao CTV é encontrada em gêneros como *Hesperethusa*, *Luvunga*, *Merope*, *Oxantherea*, *Poncirus*, *Severinea*, *Swinglea*, e parece ser devida a um único gene dominante, sendo que *Poncirus* é o único gênero sexualmente compatível com *Citrus* (Grosser e Gmitter, 1990; Grosser *et al.*, 1992). Devido a problemas de incompatibilidade, torna-se difícil incorporar a imunidade em variedades de citros de interesse comercial através de técnicas de melhoramento tradicional. Grosser e Gmitter (1990) e Grosser *et al.* (1992), com o objetivo de contornar o problema citado acima e de obter copas e porta-

enxertos imunes ao CTV, realizaram trabalhos de hibridação somática através de fusão de protoplastos.

As técnicas de engenharia genética podem possibilitar o desenvolvimento de plantas resistentes ao CTV. Plantas de citros transformadas com o gene da capa proteica do CTV já foram obtidas (Schell, 1991; Moore *et al.*, 1993) e estão sendo, atualmente, avaliadas quanto às suas características.

2. Objetivos

Este trabalho teve por objetivos:

- Avaliar a expressão de um isolado fraco e um severo do vírus da tristeza, acompanhando sua multiplicação em diferentes espécies e variedades de citros através de “Western blot”.
- Clonar a proteína do capsídeo em vetor de expressão para produção de anticorpos policlonais.
- Estudar e comparar o gene da capa protéica de diferentes isolados do CTV através de RFLP, sequenciamento e RT-PCR.

3. Material e Métodos

3.1. Material vegetal e isolados do CTV

As fontes de vírus usadas neste trabalho são de plantas matrizes de citros pertencentes ao Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” - Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Cordeirópolis, São Paulo, e da Estação Experimental de “Capão Bonito” - IAC, São Paulo.

Nos estudos de avaliação da multiplicação viral, foram enxertadas em limão *Cravo* (*Citrus limonia* Osb.) borbulhas obtidas de plantas livres de vírus através de microenxertia, das seguintes espécies / variedades: limão Galego (*Citrus aurantifolia* L.), laranjas doces Pera, Baía Tremembé e Hamlin (*Citrus sinensis* L. Osb.), e tangerina Poncan (*Citrus reticulata* Blanco) pertencentes ao Banco de Matrizes do Centro de Citricultura. As fontes de isolados do vírus usadas neste trabalho foram as laranjas Pera IAC, como isolado fraco, e Barão B, como isolado severo.

Nos estudos do genoma do CTV foram utilizados os isolados presentes nas laranjas doces cv. Pera Ipiguá e Pera IAC, e no limão Galego pertencentes ao Banco de Matrizes do Centro de Citricultura. O isolado de laranja Pera Ipiguá também foi utilizado nos trabalhos de clonagem do gene da capa proteica do vírus em vetor de expressão. Da região de Capão Bonito, foram selecionados os isolados presentes em 5 plantas de laranja doce para os trabalhos de RFLP: Pera Ipiguá sobre Cleópatra (Pera Ipiguá-CB); Calderon 479 sobre Cravo 80 (Calderon 479-CB); Pera 135 sobre Cravo 507 (Pera 135-CB); Pera 170 sobre Trifoliata 608 (Pera 170-CB); Valência 205 sobre Cravo 530 (Valência 205-CB). Destes, o isolado de laranja Pera 135 sobre Cravo 137 (Pera 135-CB) foi selecionado para

os trabalhos de clonagem, sequenciamento e expressão do gene da capa proteica do CTV. Neste trabalho, os isolados do CTV foram chamados como indicado entre parênteses.

3.2. Multiplicação de isolados do vírus da tristeza em diferentes espécies e variedades

3.2.1. Infecção das plântulas com os isolados do vírus

Nos experimentos sobre a multiplicação de dois isolados do CTV em diferentes espécies e variedades de citros, foram enxertadas em limão Cravo com cerca de 6 meses, mantidos em casa de vegetação, duas borbulhas retiradas de plantas sadias obtidas por microenxertia de: limão Galego, laranjas Pera IAC, Baía Tremembé e Hamlin, e de tangerina Poncan, também mantidas em casa de vegetação. Após aproximadamente 30 dias, foi feita a enxertia de borbulhas infectadas com um isolado fraco (Pera IAC) e um severo (Barão B). A multiplicação dos isolados foi avaliada através de “Western blot”, usando anticorpo policlonal produzido contra a proteína do capsídeo do vírus. O material para análise foi coletado em diferentes dias após a enxertia.

Para a realização da enxertia das borbulhas sadias, inicialmente foram cortadas as folhas do caule dos porta-enxertos, a uma distância aproximada de 12 cm acima da superfície. Em seguida, foram feitos cortes em forma de T no caule do porta-enxerto, as borbulhas sadias foram colocadas nesses cortes e amarradas com fitilhos. As plantas foram mantidas em casa de vegetação. Os fitilhos foram retirados após 22 dias e foi feita uma poda no porta-enxerto, a uma distância aproximada de 2 cm acima da enxertia. Quando as plantas atingiram 30 cm (aproximadamente 30 dias após a enxertia), foram enxertadas, abaixo das borbulhas sadias citadas acima, duas borbulhas retiradas de plantas infectadas

com o isolado fraco (Pera IAC) e severo do CTV (Barão B). Para cada tratamento, foram utilizadas cinco repetições. Como controle negativo foram usadas plantas enxertadas apenas com as borbulhas saudáveis.

A coleta das amostras foi feita aos 0, 5, 10, 20, 30, 60 e 90 dias após a enxertia. As amostras foram liofilizadas e mantidas em freezer a -20°C até serem usadas para extração de proteínas totais e “Western blot”.

3.2.2. Extração de proteínas totais de tecido vegetal para “Western blot”

Proteínas totais foram extraídas de 100 mg de nervuras ou cascas. O material foi triturado em um almofariz com auxílio de nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino e, em seguida, foi adicionado 1 ml de tampão de extração (63 mM Tris-HCl pH 7,0; 5% Mercaptoetanol; 2% SDS; 10% glicerol). Após homogeneização, a emulsão foi transferida para tubo Eppendorf, colocada em banho-maria fervente durante 3 min e, em seguida, no gelo. Após centrifugação durante 10 min a 12000 rpm em uma microcentrífuga, o sobrenadante foi transferido para novo Eppendorf e mantido a -20°C.

3.2.3. “Western blot”

As proteínas extraídas como descrito em 3.2.2., foram inicialmente separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), gradiente 5-20% (Apêndice). Foram aplicados aproximadamente 20 µg de proteínas totais em cada canaleta do gel. Imediatamente após a eletroforese os géis foram incubados 2 vezes em tampão de transferência (48 mM Tris base; 39 mM glicina; 0,04% SDS; 20% metanol) durante 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond C extra, Amersham), de acordo com as especificações da LKB (LKB -

Produkter, Bromma, Sweeden). A transferência foi feita no aparelho Multiphor II Novablot (LKB) durante 2 h a $0,8 \text{ mA/cm}^2$ durante 2 h.

Após a transferência, as membranas foram incubadas durante 3 h, com agitação, em tampão TBS (0,1M Trisma base; 0,9% NaCl, pH 7,6 com HCl) contendo 5% de leite em pó desnatado Molico. As membranas foram, em seguida, incubadas durante 16 h, à temperatura ambiente, em TBS contendo 0,1% Tween 20 (TBS-T); 5% Molico e os anticorpos na diluição adequada. As membranas foram lavadas 3 vezes durante 10 min com TBS-T e incubadas durante 1 h em TBS-T contendo 5% Molico e o conjugado goat anti-mouse IgG - fosfatase alcalina (Sigma), no caso de anticorpos monoclonais, ou goat anti-rabbit IgG - fosfatase alcalina (Sigma), no caso de anticorpos policlonais. As membranas foram lavadas como descrito acima e incubadas em uma solução de revelação contendo 25 ml de tampão de reação (0,1M Tris-HCl pH 9,5; 0,1M NaCl; 5 mM MgCl_2); 2 mg de BCIP (5-bromo 4-choro 3-indolyl phosphate); 4 mg de NBT (nitro blue tetrazolium). Quando a coloração desejada foi obtida, as membranas foram colocadas em H_2O destilada a fim de parar a reação e secas à temperatura ambiente.

3.3. Clonagem, expressão e análise do gene do capsídeo

3.3.1. Isolamento de dsRNA

Cascas de brotações novas e nervuras principais de folhas foram utilizadas para isolamento de dsRNA do CTV. Para tanto, as brotações foram coletadas e colocadas em isopor contendo gelo. Após serem lavadas em água de torneira, água destilada e secas com papel toalha, as cascas e nervuras principais das folhas foram retiradas com auxílio de um bisturi. O material foi liofilizado e mantido em freezer a -20°C .

DsRNA do CTV foi isolado de acordo com modificações do procedimento descrito por Valverde *et al.* (1990). Um grama de tecido infectado liofilizado foi triturado com auxílio de nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino e transferido para tubos de centrifuga de 50 ml contendo: 7,0 ml de 2x STE (1x STE é composto de 0,05 M Trisma base; 0,1 M NaCl; 0,001 M EDTA; pH 6,8 com HCl); 7 ml de fenol; 7 ml de clorofórmio; 1,6 ml de 20% SDS. O homogenato foi vigorosamente agitado durante 30 min à temperatura ambiente e, em seguida, foi feita uma centrifugação a 8000 x g, 4°C, durante 10 min. Após a centrifugação a fase aquosa foi transferida para outro tubo, a concentração de etanol foi ajustada para 16% e, em seguida, foi aplicada em uma coluna de CF-11 (Celulose Fibrosa - Wathman) preparada em 1x STE contendo 16% etanol (2g CF-11; 50 ml de 1x STE + 16% etanol). A coluna foi lavada com 80 ml de STE contendo 16% etanol e com 5 ml de STE. O dsRNA foi eluído em 20 ml de STE e, em seguida, foi adicionado etanol para uma concentração final de 16%. A amostra foi aplicada em uma segunda coluna contendo metade do volume da primeira, como descrito acima. O dsRNA foi eluído em 6 ml de STE e precipitado com 0,1 volumes de 3M acetato de sódio pH 5,2 e 3 volumes de etanol, durante 16 h a -20°C. O dsRNA foi coletado por centrifugação a 12096 x g durante 25 min a 4°C, lavado com 70% etanol, seco e suspenso em 50 µl de água destilada. Foi, em seguida, analisado através de eletroforese em gel 1% de agarose preparado em TAE (0,04 M Tris-acetato; 0,001 M EDTA) contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo e fotografado sob luz UV (ultra-violeta).

3.3.2. Síntese da primeira fita de cDNA

A síntese da 1ª fita de cDNA foi feita como indicado por Sambrook *et al.* (1989). Para o preparo das reações, o dsRNA foi inicialmente desnaturado a 65°C durante 10 min e, em seguida, colocado imediatamente no gelo. As reações foram preparadas em um volume de 20 µl, contendo:

- tampão 5x da MuMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Reverse Transcriptase)
- dsRNA desnaturado 30 ng
- dN6 random hexameros (Gibco) 1,0 µg
- dNTPs (cada) 500 µM
- DTT 1 mM
- RNAsin (Gibco-BRL) 10 U
- MuMLV-RT (Gibco-BRL) 300U

A síntese da 1ª fita de cDNA foi feita a 37°C durante 2 h. Em seguida, foi feita uma extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e o cDNA foi precipitado com 0,1 volumes de 3M acetato de sódio pH 5,2 e 3 volumes de etanol, durante 16 h a -20°C. O cDNA foi coletado através de centrifugação a 12096 x g, durante 30 min a 4°C, lavado com 70% etanol, seco e suspenso em 20 µl de H₂O esterilizada.

3.3.3. Amplificação do gene da capa proteica através de PCR

Cerca de 1/10 do cDNA sintetizado como descrito em 3.3.2. foi usado em PCR e o gene da capa proteica foi amplificado usando-se primers específicos derivados da sequência do isolado do CTV T-36 da Flórida, contendo sítios de enzimas de restrição para facilitar os trabalhos de clonagem (Tabela 1). Os sítios das enzimas de restrição estão indicados em negrito nas sequências dos primers descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados na amplificação do gene da capa protéica do CTV e seu emprego.

Primer	Sequência	Uso
A	<i>Bgl</i> II	
CN119	5' AGATCT ACCATGGACGACGAAACAAAG 3'	Clonagem em pUC, KS para sequenciamento
CN120	5' GAATTC GCGGCCGCTCAACGTGTGTTAAATTTCC 3'	
	<i>Eco</i> RI	
B	<i>Eco</i> RI	
	5' CGAATTC GACGACGAAACAAAGAAATTG 3'	Clonagem em pMAL-c2 para expressão CP de isolado de Pera Ipiгуá
	5' GTTGGATCC GGGAATCGGAACGCAACAGATCAA 3'	
	<i>Bam</i> HI	
C	<i>Nde</i> I	
M265	5' ATAGCTAGCC ATATG ATGGACGACGAAACAAAG 3'	Clonagem em pET22 para expressãode CPde Pera 135 / Cravo 507
C174	5' A CACTCG AGACGTGTGTTAAATTTCC 3'	
	<i>Xho</i> I	
D	<i>Pst</i> I <i>Nco</i> I	
M210	5' AAC CTGCAGccatgg ACGACGAAACAAAG 3'	Uso geral, "screening"
C74	5' GAAGATCTT CAACGTGTGTTGAATTTCC 3'	
	<i>Bgl</i> II	

As reações PCR foram preparadas em um volume de 50 μ l, contendo:

- tampão 10 x (100 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 mM KCl; 25 mM MgCl₂; 0.01% gelatina)
- dNTPs (cada) 200 μ M
- primer + 100 ng
- primer - 100 ng
- cDNA 1/10 da reação de síntese
- Taq DNA polimerase (Cenbiot - RS) 1,25U

A amplificação foi feita em um PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.), programado para:

Par de primers A

40 ciclos a: 94°C 2 min
 42°C 2 min
 72°C 2 min
Final: 72°C 10 min
 4°C até serem retiradas do termociclador

Par de primers B

 94°C 2 min
30 ciclos a: 94°C 30 seg
 50°C 30 seg
 72°C 30 seg
Final: 72°C 10 min
 4°C até serem retiradas do termociclador

Par de primers C e D

5 ciclos a: 94°C 2 min

50°C 2 min

72°C 2 min

35 ciclos a: 94°C 2 min

55°C 2 min

72°C 2 min

Final: 72°C 10 min

4°C até serem retiradas do termociclador

Os produtos das reações de amplificação foram analisados através de eletroforese em gel 1% de agarose contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo.

3.3.4. RFLP

O gene da capa proteica, obtido através de PCR, foi digerido com as enzimas *EcoRI*, *HinfI* e *KpnI* de acordo com as indicações do fornecedor (Boehringer Mannheim). Após a digestão, as reações foram aplicadas em gel 1,5% agarose contendo 0,5 µg/ml brometo de etídeo.

3.3.5. Clonagem do gene da capa proteica

Para os trabalhos de clonagem, após a amplificação foi feita uma extração com fenol:clorofórmio (1:1) e o cDNA foi precipitado com 0,1 volumes de 3M acetato de sódio pH 5,2 e 3 volumes de etanol. O cDNA foi coletado por centrifugação a 12096 x g durante 30 min a 4°C, lavado com 70% etanol, seco e suspenso em 20 µl de H₂O. Para os trabalhos de sequenciamento, a clonagem do gene do capsídeo foi feita nos vetores pUC118 e pBluescript KS+, e para os de expressão da proteína do capsídeo em *E. coli*, as clonagens foram feitas nos vetores pMAL-

c2, que produz uma proteína de fusão, e pET22, onde ocorre a fusão da proteína de interesse com um peptídeo de apenas 25 aminoácidos.

Os produtos PCR foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*, para clonagem em pMAL-c2, e *EcoRI* e *BglII* para clonagem em pUC 118, de acordo com as instruções do fabricante das enzimas, e purificados por eletroforese em gel 1% de agarose de baixo ponto de fusão (Sambroock *et al.*, 1989). Em seguida, foram ligados em pUC 118 ou pMAL-c2 digeridos com *EcoRI* e *BamHI* também purificados por agarose de baixo ponto de fusão e células competentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas.

A clonagem do gene da capa proteica do CTV presente em material proveniente da região de Capão Bonito em pBluescript KS+ foi do tipo “blunt end” (Sambrook *et al.*, 1989). Foi feita uma reação com a enzima Klenow usando-se o cDNA obtido através de PCR, preparada em um volume de 20 μ l e composta de:

- DNA 8 μ l
- tampão 10 x 2 μ l
- 10 mM dNTPs 2 μ l
- Klenow (2U/ μ l) 1 μ l
- H₂O 7 μ l

A reação foi incubada durante 10 min à temperatura ambiente, 20 min a 37° C e 10 min a 70°C. Após extração com fenol: clorofórmio (1:1) e precipitação com 0,1 volumes de 3M acetato de sódio pH 5,2 e 3 volumes de etanol, foi feita a ligação em pBluescript KS+ digerido com *EcoRV*. Em seguida, células competentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas.

O gene da capa proteica do CTV presente em Pera 135-CB proveniente da região de Capão Bonito e clonado em pBluescript KS+ foi reamplificado usando o par de primers C. Após digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* e purificação através de eletroforese em agarose de baixo ponto de fusão, foi ligado no vetor de expressão pET22 digerido com as mesmas enzimas. Em seguida, células competentes de *E. coli* BL21 DE 3 foram transformadas.

3.3.5.1. Purificação de fragmentos

Para os trabalhos de clonagem, logo após a digestão com as enzimas de restrição adequadas, o DNA de interesse foi purificado através de eletroforese em gel 1% agarose de baixo ponto de fusão, preparado em tampão TAE, de acordo com o procedimento descrito por Sambrook *et al.* (1989). A banda de interesse foi cortada com auxílio de um bisturi, transferida para tubo Eppendorf e foram adicionados 600 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) e 10 µg de tRNA. Após incubação a 65°C durante 10 min, foi feita uma extração com 1 volume de fenol; uma com 1 volume de fenol:clorofórmio (1:1); e uma com 1 volume de clorofórmio. A separação das fases foi feita através de centrifugação a 12000 rpm em microcentrífuga, durante 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, o DNA foi precipitado com 0,1 volumes de 3 M acetato de sódio e 3 volumes de etanol, durante 16 h a -20°C. O DNA foi coletado através de centrifugação a 12000 rpm durante 30 min a 4°C, lavado com 70% etanol, seco e suspenso em volume adequado de TE. A pureza do DNA foi verificada através de eletroforese em gel 1% de agarose.

3.3.5.2. Preparo de células competentes, transformação e seleção dos recombinantes

As células competentes de *E.coli* DH 5 α e BL21 DE3 foram preparadas pelo método do cloreto de cálcio, de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Inicialmente foi feito um pré-inóculo em 3 ml de meio SOB (por litro: 20 g de Bacto triptona; 5 g de extrato de levedura; 0,585 g NaCl; 0,186 g KCl; pH 7,0 com KOH. Esterilizar por autoclavagem e adicionar 10 ml de uma solução esterilizada por filtração em filtro 0,22 μ m contendo 1 M MgCl₂ e 1 M MgSO₄). A cultura foi incubada a 37°C, com agitação, durante aproximadamente 16 h. Em seguida, foram colocados 1,5 ml do pré-inóculo para cada 25 ml de meio SOB e a cultura foi incubada a 37°C, com agitação, até DO₅₅₀ atingir 0,55. A cultura foi transferida para tubos de centrifuga de 50 ml, incubada no gelo durante 60 min e as células foram sedimentadas através de centrifugação durante 5 min a 3024 x g, a 4°C.

As células foram suspensas em 1/5 do volume da cultura inicial de 100 mM CaCl₂ e incubadas no gelo durante 90 min. Após centrifugação a 5000 rpm, durante 5 min a 4°C, as células foram suspensas em 1/20 do volume inicial em uma solução contendo 1 ml de glicerol; 5 ml de 100 mM CaCl₂. As células foram aliqotadas em tubos Eppendorf previamente resfriados em volumes de 100 μ l, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C até serem usadas.

As células competentes de *E.coli* DH 5 α também foram preparadas pelo método de Hanahan (1983). Até a obtenção das células sedimentadas, o procedimento foi o mesmo descrito no primeiro parágrafo deste ítem. Em seguida, as células foram suspensas em 1/3 do volume inicial da cultura em TFB (10 mM K-MES pH 6,3; 100 mM KCl; 45 mM MnCl₂; 10 mM CaCl₂; 3 mM HAcCoCL₃) e incubadas no gelo durante 15 min. Após centrifugação a 5000 rpm durante 5 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 1/12,5 do volume inicial

da cultura em TFB. Foi adicionada uma solução de DnD (10 mM acetato de potássio, pH 7,5; 90% DMSO; 1 M DTT) para uma concentração final de 3,5% e as células foram incubadas no gelo durante 10 min. A solução de DnD foi novamente adicionada para uma concentração final de 7% e as células foram incubadas no gelo por 15 min. Em seguida, as células foram distribuídas em tubos Eppendorf previamente resfriados e usadas imediatamente para transformação.

Para a transformação, a reação de ligação, em um volume de 10 μ l, foi colocada em tubos Eppendorf contendo 100 μ l de células competentes e a mistura foi incubada em gelo durante 60 min. Em seguida, foi incubada a 42°C durante exatamente 90 seg e transferida imediatamente para gelo. Foram colocados 400 μ l de meio SOC (meio SOB contendo 20 mM glicose) e as células foram incubadas durante 60 min a 37°C, com agitação. As células foram plaqueadas em placas de LB (Por litro: 10 g de NaCl; 10 g de bacto triptona; 5 g de extrato de levedura; pH 7,0 com KOH) contendo 100 μ g/ml de ampicilina, IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) e X-Gal (5 - bromo - 4 - chloro - 3 -indolyl - β - D - galactoside). Para preparar estas placas, 100 μ l de 100mM IPTG e 20 μ l de 50 mg/ml X-Gal foram espalhados sobre a superfície do meio LB contendo ampicilina e as placas foram colocadas a 37°C durante pelo menos 30 min antes de serem usadas.

A seleção das prováveis colônias brancas transformantes foi feita através de PCR. Com auxílio de um palito de dentes estéril, uma parte das colônias foi suspensa em 50 μ l de uma solução contendo 20 mM Tris-HCl pH 8,5; 2mM EDTA; 1% Triton X-100. A solução foi incubada em banho fervente durante 15 min para romper as células e, em seguida, colocada em gelo. Após centrifugação momentânea em microcentrífuga, alíquotas de 1 μ l foram usadas em PCR com “primers” específicos do gene da capa proteica. As reações foram preparadas em volumes de 25 μ l, utilizando-se o ciclo já descrito para o conjunto de primers C.

3.3.6. Indução da expressão e purificação da proteína do capsídeo

3.3.6.1. pMALc2

A indução da expressão do gene da proteína do capsídeo do CTV e a purificação da proteína de fusão foram feitas de acordo com as especificações da New England BioLabs para o “Protein Fusion and Purification Systems”. Este sistema possibilita a expressão e purificação de proteínas expressas de um gene ou “open reading frame”. O gene clonado é inserido adjacente ao gene Mal E, que codifica a proteína de ligação da maltose (MBP) de bactérias, o que resulta na expressão de uma proteína de fusão. Para a realização do trabalho, 200 ml de “Rich medium” (por litro: 10 g bacto triptona; 5 g extrato de levedura; 5 g NaCl; 2 g glucose) contendo 100 µg/ml de ampicilina, foram inoculados com 2 ml de uma cultura de células contendo o plasmídeo recombinante crescida durante 16 horas a 37°C, com agitação. Após 3 h a 37°C ($A_{600} \sim 0.5$) com vigorosa agitação, uma alíquota de 1 ml foi retirada e as células foram coletadas por centrifugação a 12000 rpm, em microcentrífuga, durante 2 min. Estas células foram suspensas em 50 µl de H₂O e 50 µl de tampão de amostra (0,062 M Tris-HCl, pH 6,8; 10% glicerol; 2% SDS; 5% 2-Mercaptoetanol; 0,002% azul de bromofenol) de SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). A expressão foi induzida pela adição de IPTG ao restante da cultura a uma concentração final de 0,1 mM. A incubação continuou por mais 4 h, foi retirada uma alíquota de 1 ml como descrito acima e o restante das células foi, então, coletado por centrifugação a 4000 x g durante 20 min. Para cada grama de células foram adicionados 10 ml de tampão de lise [10 mM fosfato; 30 mM NaCl; 0,25% Tween 20; 10 mM 2-Mercaptoetanol; 10 mM EGTA (ethyleneglycol-bis-(β-aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid); pH 7.0] e as células foram colocadas a -20°C durante 16 h. As células foram descongeladas em um banho de água gelada, sonicadas durante 20 min e, em seguida, foi adicionado NaCl para uma

concentração final de 0,5 M. Após centrifugação a 9000 x g por 30 min, o sobrenadante foi aplicado em uma coluna de 5 ml de resina de amilose preparada de acordo com as instruções da New England BioLabs. A coluna foi lavada com 5 volumes de tampão da coluna (10 mM fosfato pH 7,2; 0,5 M NaCl; 10 mM 2-Mercaptoetanol; 1 mM EGTA) contendo 0,25% Tween 20 e com 5 volumes de tampão da coluna sem Tween 20. A proteína de fusão foi eluída em tampão da coluna contendo 10 mM maltose. Quinze alíquotas de 1 ml foram coletadas e a A_{280} de cada uma foi determinada. As frações contendo a proteína foram reunidas, a A_{280} foi novamente determinada e alíquotas de 0,5 ml foram mantidas a -20°C . A determinação da concentração de proteína foi feita usando-se a relação $A_{280} = 1$ mg de proteína / ml.

3.3.6.2. pET 22

Para a realização do trabalho de purificação da proteína do capsídeo dos isolados do CTV de material proveniente da região de Capão Bonito para ser usada na produção de anticorpos monoclonais, o gene foi clonado no vetor pET 22. A clonagem foi feita neste vetor porque não ocorre a fusão da proteína de interesse com outro peptídeo, o que é apropriado para produção de anticorpos monoclonais. Inicialmente foi feito um pré-inóculo da cultura em 5 ml de meio LB contendo 200 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. A cultura foi incubada a 37°C , com agitação, até DO_{600} de 0,6 a 1,0. As células foram sedimentadas através de centrifugação em microcentrífuga durante 1 min, suspensas em 1 ml de meio e usadas para inocular 200 ml de meio LB contendo ampicilina. Após 3 h a 37°C ($A_{600} \sim 0,6$) com vigorosa agitação, uma alíquota de 1 ml foi retirada e as células foram coletadas por centrifugação a 12000 rpm, em microcentrífuga, durante 2 min. Estas células foram suspensas em 50 μl de H_2O e 50 μl de tampão de amostra (0,062 M Tris-HCl, pH 6,8; 10% glicerol; 2% SDS; 5% 2-Mercaptoetanol; 0,002% azul de bromofenol) de SDS-PAGE. A indução foi feita pela adição de IPTG

(isopropylthio- β -D-galactoside) ao restante da cultura a uma concentração final de 1 mM. A incubação continuou por mais 4 h, foi retirada uma alíquota de 1 ml como descrito acima e o restante das células foi, então, coletado por centrifugação a 9798 x g, 4°C, durante 20 min. As células foram suspensas em 10 ml de água destilada e 10 ml de tampão da amostra SDS-PAGE.

A purificação da proteína do capsídeo do CTV de laranja Pera 135-CB, de Capão Bonito, foi feita através de SDS-PAGE, gradiente 5-20%. Para tanto alíquotas das células preparadas como descrito acima foram incubadas durante 5 min em banho fervente e aplicadas nos géis. A corrida eletroforética foi feita a 100 volts. Após a eletroforese os géis foram colocados em água destilada gelada durante 1 min e, em seguida, as proteínas foram precipitadas incubando-se os géis em uma solução gelada contendo 0,25 M KCl; 1 mM DTT. A banda de interesse (de coloração branca e visualizada com maior facilidade colocando-se o gel sobre um fundo escuro), foi cortada com auxílio de um bisturi, colocada em membranas de diálise, e a proteína foi eletroleuída do gel em tampão de corrida, em cubas de eletroforese horizontais, durante 3 h a 30 volts. A determinação da concentração de proteína foi feita como descrito no item anterior (3.3.6.1.).

3.3.7. Produção de anticorpos policlonais

Anticorpos policlonais contra a proteína de fusão Pera Ipiguá foram produzidos em coelhos brancos New Zealand no Cocalico Biological Inc, Reamstown, PA - USA. Foram aplicadas 5 injeções contendo 1,0 mg de proteína, sendo a primeira delas com um volume de coadjuvante Freund completo. As seguintes foram aplicadas com um volume do coadjuvante incompleto. Cada injeção foi aplicada em 10 partes diferentes do corpo do coelho. Após a 5ª injeção teve início a sangria. O título do anticorpo foi testado através de "Western blot", usando extratos de tecidos de plantas como antígeno.

3.3.8. “Dot blot” do dsRNA

Este procedimento foi feito de acordo com as especificações da Bio-Rad para o “Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus”. Foi usado dsRNA isolado de tecido de Pera 135-CB e, como controle negativo, foi usado RNA isolado de tecido sadio. Imediatamente antes de ser aplicado na membrana de nylon Hybond N (Amersham), o dsRNA (em um volume de 7 μ l, a uma concentração total de 70 ng) foi desnaturado colocando-se 500 μ l de uma solução gelada de 10 mM NaOH; 1 mM EDTA. As amostras foram aplicadas nos pocinhos do aparelho e foi aplicado vácuo até drenar todo o líquido. Os pocinhos foram lavados com 500 μ l da solução acima e o vácuo foi novamente aplicado. Após drenar toda a solução, a membrana foi retirada do aparelho e lavada rapidamente em uma solução contendo 2 x SSC (3 M NaCl; 0,3 M citrato de sódio); 1% SDS. A fixação do dsRNA na membrana foi feita durante 2 h a 80°C. A membrana foi, em seguida, usada para hibridização com o gene da capa proteica marcado com digoxigenina.

A marcação do gene da capa proteica do CTV presente em Pera 135-CB e clonado em pBluescript KS+, foi feita através de PCR usando os nucleotídeos marcados com digoxigenina do “DIG DNA Labeling and Detection Kit Non Radioactive” (Boehringer Mannheim Biochemica, número de catálogo 1093657). Como controle negativo, foi feita uma reação usando o DNA de pBluescript KS+. As reações foram preparadas em um volume de 50 μ l, usando 50 ng de DNA como molde e o par de primers D.

A hibridização foi feita de acordo com as especificações da Boehringer Mannheim para o Kit especificado acima. A pré-hibridização foi feita durante 4 h a 42°C em um forno de hibridização Biometra OV.5, na seguinte solução: 5x SSC; 0,1% N-laurilsarcosina; 0,02% SDS; 50% formamida; 2% agente bloqueador; 100 μ g/ml DNA de esperma de salmon. O DNA de esperma de salmão foi desnaturado

durante 5 min em banho fervente e, em seguida, imediatamente colocado no gelo até ser adicionado à solução.

Após a pré-hibridização, a solução foi descartada e os filtros foram colocados na solução de hibridização, com a mesma composição da de pré-hibridização e mais a sonda desnaturada. Foi usado um volume de sonda correspondente a 1/10 do volume da reação de marcação. A sonda foi desnaturada como descrito para o DNA de esperma de salmão e a hibridização foi feita durante 16 h a 42°C. Após a hibridização, os filtros foram lavados duas vezes 10 min à temperatura ambiente com 2x SSC; 0,1% SDS; uma vez 15 min a 65°C com 1x SSC; 0,1% SDS e uma vez 15 min a 65°C com 0,5x SSC; 0,1% SDS.

A detecção foi feita de acordo com as instruções da Boehringer Mannheim para o Kit especificado acima. Neste processo, todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente com ligeira agitação. Inicialmente a membrana foi equilibrada em tampão maleato (0,1 M ácido maleico; 0,15 M NaCl; pH7,5 com NaOH) durante 2 min e, em seguida, incubada durante 30 min em tampão maleato contendo 1% do agente bloqueador do Kit. Em seguida, foi incubada durante 30 min em tampão maleato contendo o conjugado anti-digoxigenina - fosfatase-alcalina (750 unidades/ml) diluído 1:5000 e, após este tempo, foi lavada duas vezes durante 15 min com tampão maleato contendo 0,3% Tween 20. A membrana foi equilibrada durante 2 min em tampão contendo 0,01M Tris-HCl pH 9,5; 0,1M NaCl; 0,01M MgCl₂ e, em seguida, incubada durante 5 min no mesmo tampão contendo CSPD (Disodium 3-(methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2' -(5' -chloro) tricyclo [3.3.1^{3,7}] decan} -4yl) phenyl phosphate) 25 mM, diluído 1:100 no tampão acima. A membrana foi envolta em Magipack e colocada a 37°C durante 5 min. Em seguida, foi exposta ao Hyperfilm M-AP (Amersham) durante 10 min. O filme foi revelado de acordo com as instruções da Kodak para o Revelador e reforçador GBX.

3.3.9. Sequenciamento

DNA dupla fita, obtido através de minipreparação (descrita em 3.3.9.1.), foi usado nas reações de sequenciamento. As reações foram feitas de acordo com as instruções da USB para o kit Sequenase Versão 2.0 (número de catálogo US70770), usando primers universais de pUC e pBluescript KS+ e primers internos específicos do gene da capa proteica (5' AACGTACTACTCGGGAGGG 3', correspondendo às bases 308 a 321, e 5' CGGTTACCAATACCCTTAG 3', correspondendo às bases 376 a 394). Foi usado o sistema "Sequi-Gen® Nucleic Acid Sequencing Cell" (BioRad) para preparar os géis de sequenciamento. As sequências de ácidos nucleicos foram analisadas usando-se o programa Seqaid II, versão 3.60.

Inicialmente o DNA (~5 µg) a ser sequenciado foi colocado em tubos Eppendorf e desnaturado adicionando-se 0,1 volumes de uma solução 0,2N NaOH; 2mM EDTA recém preparada. A reação foi incubada a 70°C durante 5 min e, em seguida, foi colocada imediatamente no gelo durante aproximadamente 2 min. O DNA desnaturado foi precipitado com 0,15 volumes de 3M acetato de sódio pH 5,2 e 4 volumes de etanol, a -20°C, durante 16 h. Foi coletado por centrifugação a 12000 rpm em microcentrífuga, durante 10 min a 4°C. Em seguida, foi lavado com 70% etanol, seco e suspenso em 7 µl de H₂O.

O anelamento dos primers (direto, reverso e internos) com o DNA foi feito em reações contendo:

- primer 1 µl
- Tampão 5 x da Sequenase 2 µl
- DNA 7 µl

As reações foram incubadas a 65°C durante 3 min e, em seguida, à temperatura ambiente para esfriar lentamente, durante aproximadamente 30 min. Após a reação de anelamento, foi feita a reação de marcação. Inicialmente foi feita uma mistura, no gelo, contendo:

- 0,1 M DTT 1,0 µl
- 1:5 mistura de marcação 2,0 µl
- [³⁵S] dATP (1000 Ci/mmol) 1,0 µl
- Tampão de diluição da enzima 1,5 µl
- Sequenase Versão 2.0 0,5 µl

A mistura, em um volume de 6 µl, foi adicionada ao DNA-primer anelados e a reação de marcação foi incubada à temperatura ambiente durante exatamente 4 min.

Para as reações de terminação, foram colocados em 4 tubos Eppendorf marcados com as letras G, A, T, C, 2,5 µl do ddNTP correspondente, e foi feita uma incubação a 37°C durante 5 min. Em seguida, foram adicionados 3,4 µl da reação de marcação em cada um dos Eppendorfs contendo os ddNTPs, e a reação foi incubada a 37°C durante 5 min. Após este tempo, foram adicionados 4 µl da solução “stop” (95% formamida; 20 mM EDTA; 0,05% azul de bromofenol; 0,05% xileno cianol), as reações foram colocadas no gelo e mantidas a -20°C até serem aplicadas nos géis de sequenciamento (Apêndice).

Para a corrida eletroforética, os géis foram montados nas cubas, o tampão de corrida (1xTBE) foi adicionado nos reservatórios e foi feita uma pré-corrída a 1500 volts, até que a temperatura do gel (indicada por um selo apropriado) estabilizasse a 55°C, aproximadamente 1 h. As amostras para o sequenciamento

foram desnaturadas a 95°C durante 3 min e imediatamente transferidas para gelo. Alíquotas de 4 μ l foram aplicadas nos géis e a corrida eletroforética foi feita a 1500 volts. O gel das curtas correu até sair a primeira frente do corante, e o das longas, 2 h mais após a saída da segunda frente do corante.

Após a corrida, a placa de vidro tratada com o “stick silane”, onde o gel ficou aderido, foi removida e colocada em uma cuba contendo uma solução de fixação (10% ácido acético; 10% metanol) durante 15 min, para fixação das bandas e remoção da uréia. Em seguida, o gel foi lavado em água de torneira e colocado em uma cuba contendo água destilada durante 20 min. Após esse tempo, o gel foi seco com auxílio de um secador de cabelos (1500 watts) durante aproximadamente 20 min e exposto ao Hyperfilm™-MP (Amersham), durante 24 h à temperatura ambiente. A revelação do filme foi feita com revelador da Kodak.

3.3.9.1. Minipreparação de DNA de plasmídeo

A minipreparação do DNA dos clones foi feita de acordo com modificações da metodologia descrita por Sambrook *et al.* (1989). Os clones foram retirados de culturas permanentes, inoculados em placas de meio LB contendo ampicilina (100 μ g/ml para clones em pUC118, pBluescript KS+, pMAL-c2, e 200 μ g/ml para clones em pET22) e incubados durante 16 h a 37°C. Para as minipreparações, uma colônia isolada foi inoculada em meio LB contendo ampicilina e incubada durante 16 h a 37°C com vigorosa agitação. Em seguida, foram colocados 1,5 ml da cultura em tubos Eppendorf e foi feita uma centrifugação durante 2 min em microcentrifuga. O sobrenadante foi descartado, as células foram suspensas em 200 μ l de solução I (25 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM glicose; 10 mM EDTA) e incubadas no gelo durante 5 min. Em seguida, foram adicionados 400 μ l de solução II (0,2 M NaOH; 1% SDS) recém preparada e foi feita uma incubação no gelo durante exatamente 5 min. Após este tempo, foram adicionados 150 μ l de

solução III (3 M acetato de potássio pH 4,8) e foi feita uma nova incubação no gelo durante 10 min. Em seguida, foi feita uma centrifugação a 12000 rpm em microcentrífuga durante 5 min à temperatura ambiente. Após centrifugação, 400 μ l do sobrenadante foram transferidos para outro tubo Eppendorf e foram adicionados 720 μ l de 100% etanol. Após 2 min à temperatura ambiente, o DNA foi coletado por centrifugação durante 5 min, lavado 2 vezes com 70% etanol, seco e suspenso em 50 μ l de TE contendo 10 μ g RNase/ml. Alíquotas de 1 μ l foram submetidas a eletroforese em gel 1% de agarose, juntamente com padrões de concentração conhecida, para avaliar o estado e determinar a concentração do DNA.

4. Resultados

4.1. Multiplicação do vírus em diferentes espécies e variedades

A multiplicação de dois isolados do CTV (um fraco e um forte) em plantas de três espécies de citros, após inoculação através de enxertia de borbulhas contaminadas, foi avaliada por “Western blot”. Após diferentes tempos da inoculação, as amostras foram coletadas e foi feita uma extração de proteínas totais de plantas. As proteínas foram submetidas a SDS-PAGE, transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com o anticorpo policlonal produzido contra a proteína do capsídeo do CTV expressa em *E. coli*. A intensidade da reação foi associada à concentração do vírus na amostra.

Para comprovar a presença do vírus nas fontes dos inóculos, laranjas Pera IAC e Barão B, foi feito inicialmente um “Western blot”. A Figura 2 apresenta o resultado da análise. Proteína isolada de tecido sadio foi usada como controle negativo e não ocorreu reação (Fig. 2, linha 1). Uma reação forte, indicando a presença do vírus, foi observada quando se usou proteína isolada de tecido de laranja Pera IAC (Fig. 2, linha 2) e Barão B (Fig. 2, linha 3).

Imediatamente após a enxertia das borbulhas contaminadas com o CTV, foram coletadas para avaliação as primeiras amostras de folhas de 5 repetições. Foi feito um “Western blot” usando proteínas totais isoladas dessas amostras para comprovar a ausência do CTV (dados não apresentados).

A coleta das amostras foi feita aos 30, 60 e 90 dias após a enxertia das borbulhas infectadas. Em todos os casos foi observado que, com exceção de tangerina Poncan, após os 30 dias todas as variedades já estavam contaminadas com o vírus. Deste modo, outro experimento foi instalado, na

mesma época do ano em que foi instalado o primeiro (meses de dezembro e janeiro), e as amostras foram coletadas aos 10, 15 e 20 dias após a inoculação por enxertia.

A Figura 3 A apresenta o resultado do “Western blot” usando proteínas extraídas de limão Galego infectado com o isolado fraco do CTV (Pera IAC) aos 10, 15, 20, 30, 60 e 90 dias após a enxertia das borbulhas contaminadas (linhas 1 a 6). Após 10 dias da enxertia das borbulhas infectadas o CTV não foi detectado (Fig. 3 A, linha 1). Somente após o 15º e 20º dias foi possível detectar o vírus (Fig. 3 A, linhas 2 e 3). Aos 30, 60 e 90 dias após a enxertia, a reação observada foi proporcionalmente mais intensa, indicando maior concentração de partículas do vírus nesses tecidos (Fig. 3 A, linhas 4, 5 e 6, respectivamente).

A detecção do CTV nos tecidos de Galego só ocorreu 30 dias após a enxertia das borbulhas contaminadas com o isolado forte do vírus (Barão B) (Fig. 3 A, linha 10). O mesmo padrão e a mesma intensidade de reação foram observados aos 60 e 90 dias após a enxertia (Fig. 3 A, linhas 11 e 12, respectivamente). Já aos 10, 15 e 20 dias o vírus não foi detectado (Fig. 3 A, linhas 7, 8 e 9). De modo geral, a reação observada em limão Galego com o isolado Barão B foi mais fraca que com o isolado de Pera IAC.

A Figura 3 B (linhas 1 a 6) apresenta o resultado obtido nas análises de “Western blot” usando proteínas isoladas de laranja Pera após enxertia das borbulhas contaminadas com o isolado Pera IAC. Somente após 15 dias da enxertia foi observada uma reação fraca (Fig. 3 B, linha 2). Aos 20 dias ocorreu uma reação um pouco mais intensa (Fig. 3 B, linha 3), o que indica que o vírus já estava de fato se multiplicando nos tecidos de laranja Pera aos 15 dias da enxertia. Reações bem mais intensas foram observadas aos 30, 60 e 90 dias (Fig. 3 B, linhas 4, 5 e 6).

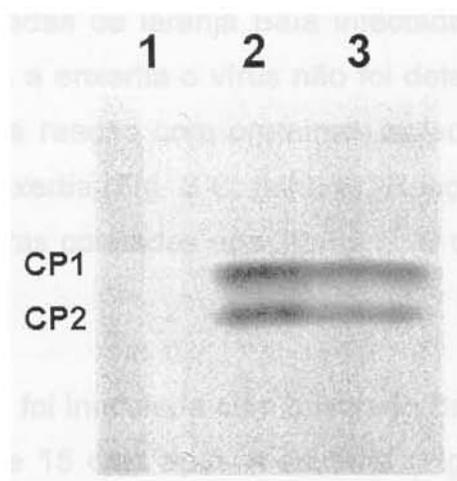


Figura 2. “Western blot” de proteínas extraídas de material usado como fonte de isolados do vírus. **1.** Laranja Pera sadia; **2.** laranja Pera IAC; **3.** laranja Barão B.

Quando a laranja Pera foi inoculada com o isolado Barão B, o CTV não foi detectado aos 10 e 15 dias da enxertia (Fig. 3 B, linhas 7 e 8, respectivamente). Somente aos 20 dias foi possível detectar o vírus (Fig. 3 B, linha 9). Reações proporcionalmente mais fortes foram observadas aos 30, 60 e 90 dias (Fig. 3 B, linhas 10, 11 e 12).

A Figura 3 C (linhas 1 a 6) apresenta o resultado das análises de “Western blot” usando proteínas isoladas de laranja Baía infectada com o isolado Pera IAC. Aos 10 e 15 dias após a enxertia o vírus não foi detectado (Fig. 3 C, linhas 1 e 2). Foi observada uma reação com proteínas isoladas de amostras coletadas aos 20 dias após a enxertia (Fig. 3 C, linha 3). Reações bem mais fortes foram observadas em amostras coletadas aos 30, 60 e 90 dias após a enxertia (Fig. 3 C, linhas 4, 5 e 6).

Quando a laranja Baía foi inoculada com o isolado Barão B, o vírus também não foi detectado aos 10 e 15 dias após a enxertia (Fig. 3 C, linhas 7 e 8). Uma reação muito fraca foi observada aos 20 dias (Fig. 3 C, linha 9), o que indica que o CTV estava, provavelmente, iniciando o processo de multiplicação nesses tecidos. Reações mais fortes foram observadas aos 30, 60 e 90 dias (Fig. 3 C, linhas 10, 11 e 12).

Resultados semelhantes aos descritos para laranja Baía foram obtidos quando laranja Hamlim foi inoculada os isolados Pera IAC (Fig. 3 D, linhas 1 a 6) e Barão B (Fig. 3 D, linhas 7 a 12).

A detecção do CTV nos tecidos de tangerina Poncan infectada com o isolado do CTV presente em Pera IAC ocorreu somente aos 30, 60 e 90 dias da enxertia das borbulhas contaminadas (Fig. 3 E, linhas 4, 5 e 6, respectivamente). A reação observada neste caso não foi tão intensa quanto a observada nas

variedades de laranja doce. Aos 10, 15 e 20 dias da enxertia o vírus não foi detectado, sugerindo uma menor taxa de multiplicação nesses tecidos (Fig. 3 E, linhas 1, 2 e 3).

A multiplicação do isolado do CTV mais severo (Barão B) parece ter sido menor, pois o vírus só foi detectado aos 60 dias após a enxertia, e com uma intensidade de reação muito mais fraca que a observada nas outras amostras. A Figura 3 E (linhas 7 a 12) apresenta o “Western blot” das proteínas extraídas das amostras coletadas nos diferentes tempos após a enxertia das borbulhas contaminadas. Aos 10, 15, 20 e 30 dias após a enxertia o vírus não foi detectado (Fig. 3 E, linhas 7 a 10, respectivamente). Aos 60 dias foi observada uma reação fraca (Fig. 3 E, linha 11), e aos 90 dias uma reação mais intensa (Fig. 3 E, linha 12). Os dados das análises de “Western blot” foram agrupados na Tabela 2.

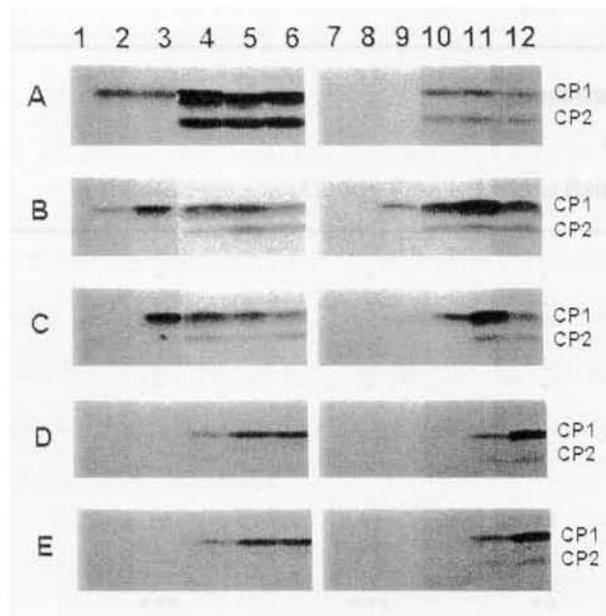


Figura 3. “Western blot” de proteínas do capsídeo do CTV isoladas de tecido de brotações novas de: **A.** Limão Galego aos 10, 15, 20, 30, 60 e 90 dias após a enxertia das borbulhas contaminadas com isolado fraco (Pera IAC) (linhas 1 a 6, respectivamente) e isolado forte (Barão B) (linhas 7 a 12, respectivamente). **B.** Como descrito em A, usando tecido de laranja Pera. **C.** Tecido de laranja Baía Tremembé. **D.** Tecido de laranja Hamlin. **E.** Tecido de tangerina Poncan.

Tabela 2: Análises por “Western blot” dos isolados Pera IAC e Barão B em diferentes espécies e variedades de citros.

Dias da enxertia	Isolado	Hospedeiras				
		Limão Galego	Laranja Pera	Laranja Baia	Laranja Hamlin	Laranja Poncan
0	IAC	-	-	-	-	-
	Barão B	-	-	-	-	-
10	IAC	-	-	-	-	-
	Barão B	-	-	-	-	-
15	IAC	++	++	-	-	-
	Barão B	-	-	-	-	-
20	IAC	++	++	++	++	-
	Barão B	-	++	+	+	-
30	IAC	+++	+++	++	++	+
	Barão B	++	+++	++	++	-
60	IAC	+++	+++	++	++	+
	Barão B	++	+++	++	++	+
90	IAC	+++	+++	++	++	+
	Barão B	++	+++	++	++	+

- reação negativa; + intensidade de reação fraca; ++ intensidade de reação média; +++ intensidade de reação forte.

4.2. Isolamento de dsRNA e amplificação do gene da capa proteica

O dsRNA foi isolado de 1 g de tecido liofilizado infectado com o CTV e alíquotas correspondendo a 100 mg de tecido foram analisadas através de eletroforese em gel não desnaturante de agarose. A Figura 4 (linhas 1 a 9) apresenta o padrão eletroforético do dsRNA do CTV de aproximadamente 20 Kb, correspondente à forma replicativa do ssRNA de vários isolados do vírus, incluindo isolados severos de Capão Bonito. A concentração do dsRNA em Galego (Fig. 4, linha 3) foi maior que a concentração nas outras variedades estudadas, provavelmente associada a uma maior capacidade de replicação do vírus nesta espécie de citros. Na Figura 4, linhas 5, 6 e 7, podem ser observadas duas bandas no dsRNA, uma de 20 Kb, que corresponde à forma completa, e outra de aproximadamente 17 Kb. DsRNAs subgenômicos não foram detectados nessas condições.

O dsRNA foi usado como molde para a síntese da 1ª fita de cDNA pela MuMLV transcriptase reversa com “primers” randômicos. A amplificação do gene da capa proteica foi feita por PCR usando “primers” específicos derivados da sequência do gene da capa protéica do isolado T-36 do CTV da Flórida.

A Figura 5 (linhas 1 a 9) mostra o padrão eletroforético dos produtos das reações de amplificação do gene da capa protéica. Não ocorreu amplificação no controle originado de tecido sadio (Fig. 5, linha 1). Um fragmento de aproximadamente 670 pb foi obtido em todos os isolados avaliados.

A síntese da 1ª fita de cDNA e a amplificação do gene da capa protéica do isolado presente na laranja Pera 135-CB também foram feitos usando-se tanto o dsRNA de 20 Kb quanto o de 17 Kb. Para essa avaliação, as duas bandas do dsRNA foram purificadas através de agarose de baixo ponto de fusão, o cDNA

foi sintetizado e o gene da capa protéica amplificado como descrito. Após amplificação e análise através de eletroforese, verificou-se que foi amplificado um único fragmento de 670 pb nas duas amostras (Fig. 6, linhas 1 e 2). A diferença observada na concentração dos produtos amplificados pode ser devida a uma menor concentração do molde nas reações de amplificação.

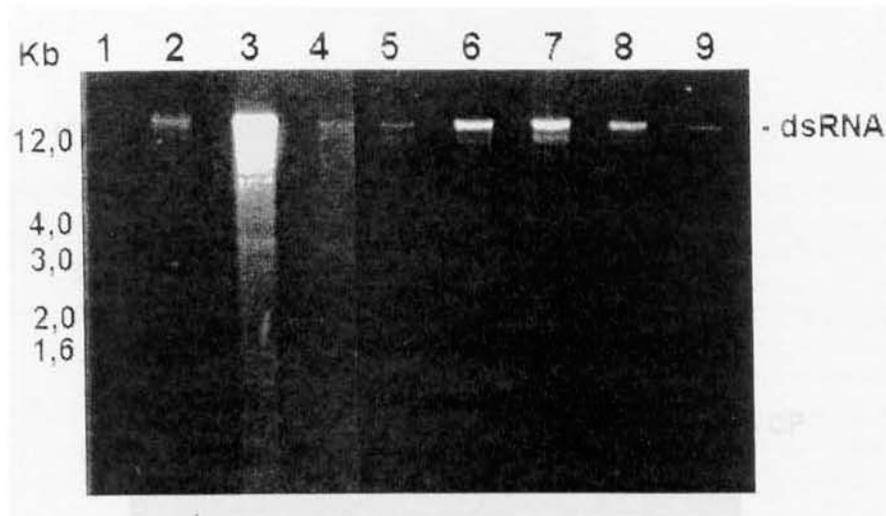


Figura 4. dsRNA em gel não desnaturante de agarose a 1% dos isolados do CTV presentes em: 1. Controle sadio; 2. Laranja Pera Ipiruá; 3. Limão Galego; 4. Laranja Pera IAC; 5. Laranja Pera Ipiruá-CB; 6. Laranja Calderon 479-CB; 7. Laranja Pera 135-CB; 8. Laranja Pera 170-CB; 9. Laranja Valência 205-CB. Números à esquerda correspondem a 1 Kb DNA Ladder.

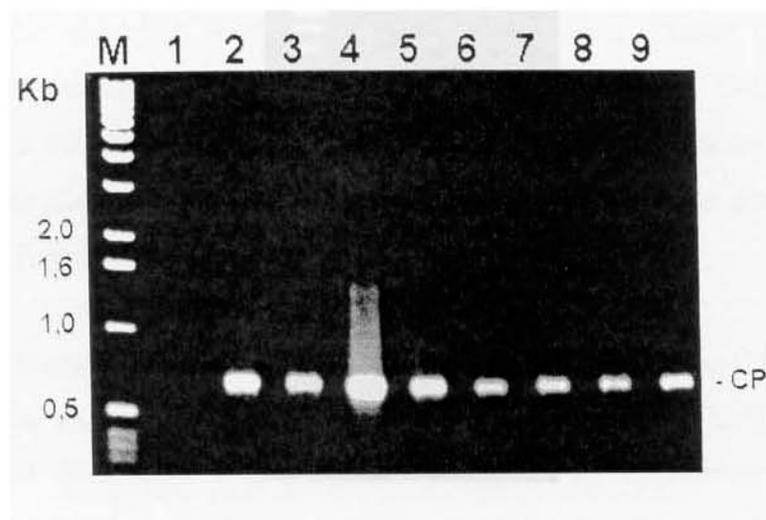


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% do gene da capa proteica de isolados do CTV amplificados por PCR. **1.** Controle sadio; **2.** Laranja Pera Ipiruá; **3.** Limão Galego; **4.** Laranja Pera IAC; **5.** Laranja Pera Ipiruá-CB; **6.** Laranja Calderon 479-CB; **7.** Laranja Pera 135-CB; **8.** Laranja Pera 170-CB; **9.** Laranja Valência 205-CB. Linha M, 1 Kb DNA Ladder.

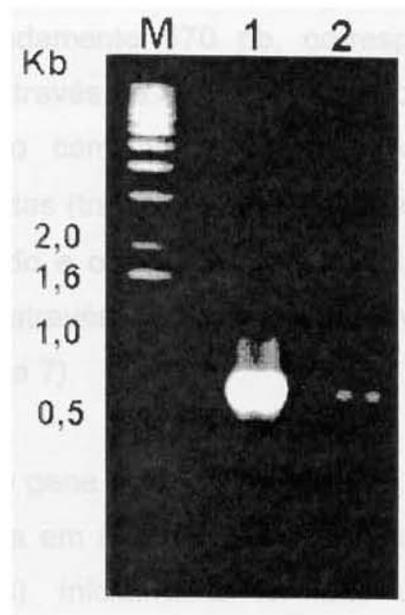


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1% do gene da capa protéica do isolado do CTV de laranja Pera 135-CB amplificado por PCR, usando como molde a 1^a fita de cDNA sintetizada a partir do dsRNA de 20 Kb (1) e do dsRNA de 17 Kb (2). Linha M, 1 Kb DNA Ladder. *(Linha do capsídeo do CTV) foi significativamente expressa.*

4.3. Purificação da proteína de fusão e produção de anticorpos policlonais

Para a realização dos trabalhos de purificação da proteína de fusão, o gene da capa proteica do isolado do CTV presente em Pera Ipiguá foi inicialmente amplificado com o par de primers B como descrito em 3.3.3. e, após a amplificação, foi feita a digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*. O fragmento de aproximadamente 670 pb, correspondente ao gene da capa proteica, foi purificado através de agarose de baixo ponto de fusão, ligado no vetor pMAL-c2 digerido com as mesmas enzimas e células competentes de DH5 α foram transformadas (transformação de alta eficiência). O DNA dos clones recombinantes foi isolado e os fragmentos correspondentes ao gene da capa proteica foram obtidos através da digestão do DNA com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*. (Fig. 7, linhas 1 a 7).

A região codificadora do gene da capa proteica do isolado do CTV presente em Pera Ipiguá foi expressa em *E.coli* usando o "Fusion and Purification System" (New England BioLabs). Inicialmente foi feito um experimento piloto para verificar se a proteína de fusão estava sendo expressa e, em seguida, uma preparação maior foi feita como descrito em 3.3.6.1. Aliquotas de 4 μ l das frações coletadas durante a preparação da proteína de fusão foram analisadas através de SDS-PAGE, gradiente 5-20%. A Figura 8 A (linha 1) apresenta o padrão eletroforético das células bacterianas transformadas com os plasmídeos recombinantes contendo o gene da capa proteica do CTV antes da indução com IPTG. Pode ser observado que a proteína de fusão não foi detectada nesta fração. A Figura 8 A (linha 2) apresenta o padrão eletroforético das proteínas totais das células bacterianas transformadas após a indução com IPTG. A proteína de fusão de 67 KDa (42 KDa da proteína de ligação da maltose mais 25 KDa da proteína do capsídeo do CTV) foi significativamente expressa.

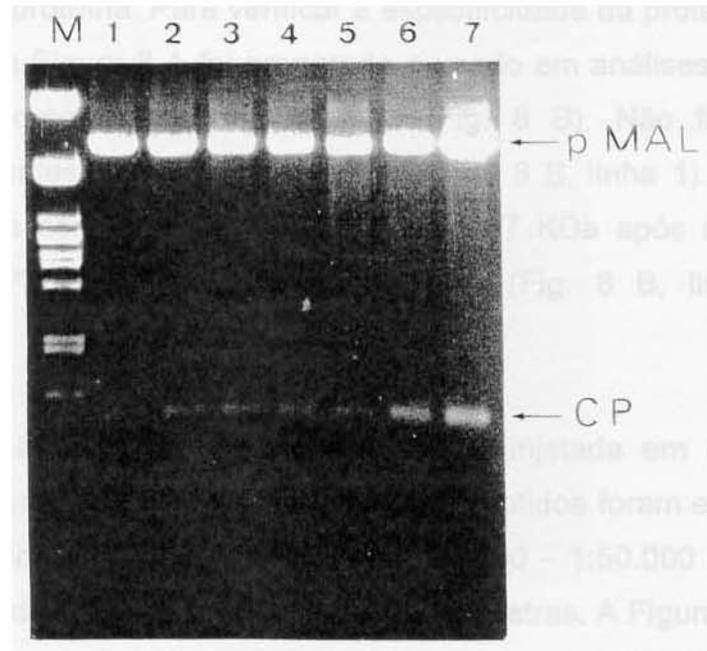


Figura 7. Análise eletroforética em gel de agarose 1% do DNA de sete plasmídeos recombinantes contendo o inserto do gene da capa proteica do CTV presente em laranja Pera Ipiгуá, digeridos com *EcoRI* e *BamHI* (linhas 1 a 7). Linha M, DNA de Lambda digerido com *Pst* I.

De acordo com a New England BioLabs, a proteína de fusão expressa usando este sistema representa aproximadamente 20-40% da proteína total da célula. A Figura 8 A (linha 3) mostra a proteína de fusão após a purificação através de cromatografia em coluna de afinidade de resina de amilose. Por ml de cultura de bactéria, foram obtidos aproximadamente 25 μ g de proteína, perfazendo um total de 5,0 mg de proteína. Para verificar a especificidade da proteína induzida, gel em replicata da Figura 8 A foi preparado e usado em análises de “Western blot” com o anticorpo monoclonal MCA-13 (Fig. 8 B). Não foi observada nenhuma reação antes da indução com IPTG (Fig. 8 B, linha 1). Uma reação forte foi observada com a proteína de fusão de 67 KDa após a indução da expressão com IPTG e purificação da proteína (Fig. 8 B, linhas 2 e 3, respectivamente).

A proteína de fusão foi usada como antígeno e injetada em coelhos para produção de anticorpos policlonais. Os anticorpos obtidos foram específicos ao CTV e foram usados em concentrações de 1:30.000 - 1:50.000 em “Western blot”, dependendo da concentração do vírus nas amostras. A Figura 9 apresenta o “Western blot” usando o anticorpo produzido contra a proteína do capsídeo do CTV expressa em *E. coli*. Não foi observada reação com laranja Pera sadia obtida por microenxertia (Fig. 9, linha 1). Com as amostras de laranja Pera Ipiguá (Fig. 9, linha 2), limão Galego (Fig. 9, linha 3) e laranja Pera IAC (Fig. 9, linha 4) infectadas com o vírus, uma reação forte foi observada. O anticorpo reagiu igualmente com isolados severos (Pera Ipiguá e Galego) e fracos (Pera IAC) do CTV, e não apresentou reação cruzada com proteínas de planta.

A outra etapa do trabalho de expressão de proteína do capsídeo do vírus incluiu dois clones de isolados de Pera 135-CB, da região de Capão Bonito, para produção de anticorpos monoclonais. Estes anticorpos monoclonais deverão ser usados no desenvolvimento de “kits” diagnóstico para a identificação rápida de

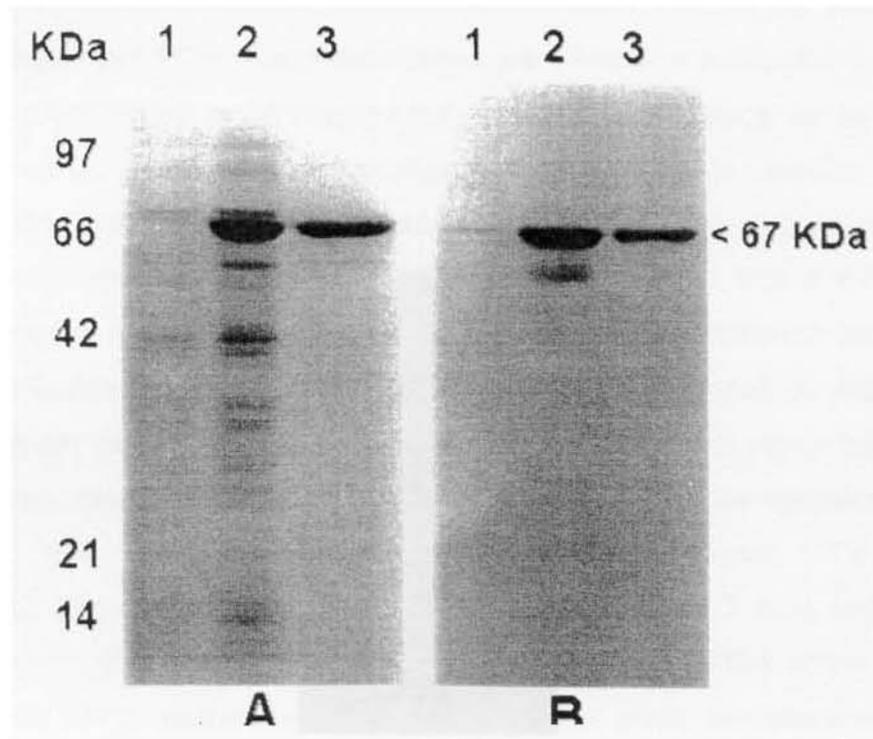


Figura 8. SDS-PAGE e “Western blot” de extratos de *E. coli* transformada com plasmídeos recombinantes contendo o inserto do gene da capa proteica do CTV presente em laranja Pera Ipiгуá. **A.** SDS-PAGE, gradiente 5-20%, de extratos da bactéria antes (1) e após a indução com IPTG (2); e proteína de fusão purificada através de cromatografia em coluna de afinidade de maltose (3). **B.** “Western blot” de géis em replicata de A usando o anticorpo monoclonal MCA-13, diluição 1:10.000.

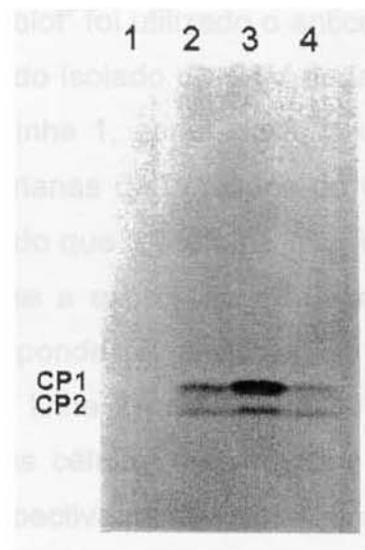


Figura 9. "Western blot" de proteínas extraídas de cascas de brotações novas e nervuras principais usando o anticorpo produzido contra a proteína de fusão-Ipiguá. **1.** Laranja Pera sadia; **2.** Laranja Pera Ipiguá; **3.** Limão Galego; **4.** Laranja Pera IAC.

isolados severos do vírus. A clonagem foi feita como descrito em 3.3.5. Após transformação de células competentes de *E.coli* BL 1 DE 3, foi feita a seleção dos recombinantes através de PCR.

Após a seleção por PCR foram escolhidos para testar a produção da proteína, através de SDS-PAGE e “Western blot”, dois clones obtidos de laranja Pera 135-CB contendo o gene da capa protéica, chamados neste trabalho CB 3-22 e CB 3-104. No “Western blot” foi utilizado o anticorpo policlonal produzido contra a proteína do capsídeo do isolado do CTV de laranja Pera Ipiguá expressa em *E. coli*. A Figura 10 A, linha 1, apresenta o padrão eletroforético de proteínas totais das células bacterianas de um clone de CB 3-22 antes da indução com IPTG. Pode ser observado que a proteína não foi detectada nesta fase. Após 3 h da indução, observa-se a expressão de uma proteína de aproximadamente 28,7 KDa, que corresponde à proteína do capsídeo do CTV mais 25 aminoácidos (Fig. 10 A, linha 2). Na Figura 10 A (linhas 3 e 4) observa-se o padrão eletroforético das células de um clone de CB 3-104 antes e após a indução com IPTG, respectivamente. Neste caso, pode ser observado que o tamanho da proteína do capsídeo do CTV no clone CB 3-104 que está sendo produzida na bactéria foi de aproximadamente 19,0 KDa, menor que o esperado (Fig. 10 A, linha 4). Foram selecionados outros clones e, em todas as tentativas, a proteína do capsídeo do CTV de CB 3-104 produzida em *E. coli* era menor, exatamente como indicado acima. Antes de se proceder à purificação da proteína partindo-se de um grande volume de cultura, foi feito inicialmente um experimento de cinética de expressão da proteína utilizando-se o clone de CB 3-22. Foram retiradas alíquotas de 1 ml antes e após 1, 2, 3 e 4 h da indução com IPTG. As células foram peletadas, suspensas em 50 μ l de H₂O e 50 μ l de tampão de amostra de SDS-PAGE e, em seguida, alíquotas de 4 μ l foram submetidas a SDS-PAGE, gradiente 5-20% (Figura 11, linhas 1 a 5). Após 1 hora da indução a proteína já estava sendo produzida em quantidades

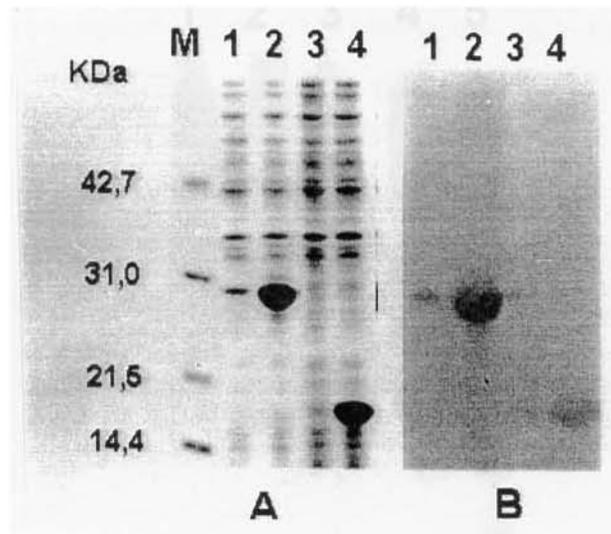


Figura 10. SDS-PAGE e "Western blot" de extratos de *E. coli* transformada com plasmídios recombinantes contendo o inserto do gene da capa proteica do CTV presente em laranja Pera 135-CB, clones CB 3-22 e CB 3-104. **A.** SDS-PAGE, gradiente 5-20%, de extratos da bactéria, clone CB 3-22, antes (1) e após a indução com IPTG (2); e do clone CB 3-104 antes (3) e após a indução com IPTG (4). **B.** "Western blot" de géis em replicata de A usando o anticorpo produzido contra a proteína de fusão Ipiгуá, diluição 1:30000. (Linhas 1 a 5, respectivamente).

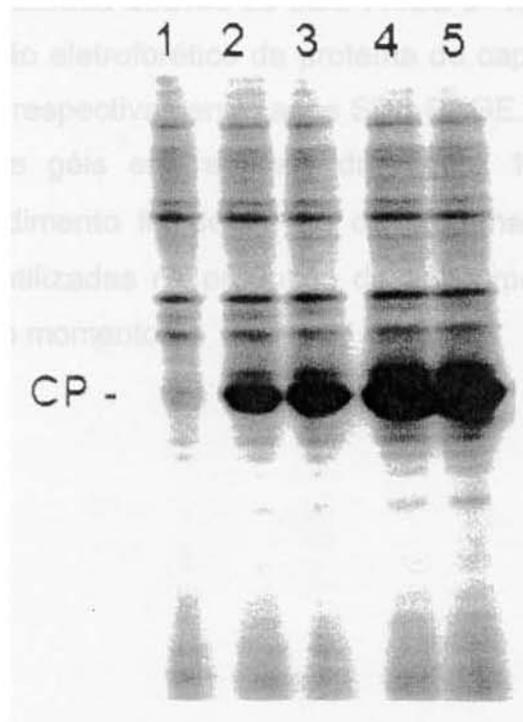


Figura 11. SDS-PAGE, gradiente 5-20%, de extratos de *E. coli* transformada com plasmídios recombinantes contendo o inserto do gene da capa protéica do CTV presente em laranja Pera 135-CB, clone CB 3-22, antes e após 1, 2, 3 e 4 horas da indução da expressão da proteína com IPTG (linhas 1 a 5, respectivamente).

significativas (linha 2), atingindo um pico máximo de produção após 3 horas (linha 4).

Em seguida, foi feita a purificação da proteína partindo-se de um volume de 200 ml de cultura. A proteína foi purificada como descrito em 3.3.6.2. e, após a purificação, foi analisada através de SDS-PAGE e “Western blot”. A Figura 12 A apresenta o padrão eletroforético da proteína do capsídeo de CB 3-22 e CB 3-104 (linhas 1 e 2, respectivamente) após SDS-PAGE. A Figura 12 B apresenta o “Western blot” de géis em replicata da Figura 12 A, usando o anticorpo policlonal. O rendimento foi de 70 μg de proteína por ml de cultura. Estas proteínas foram utilizadas na produção de anticorpos monoclonais que estão sendo testados no momento.

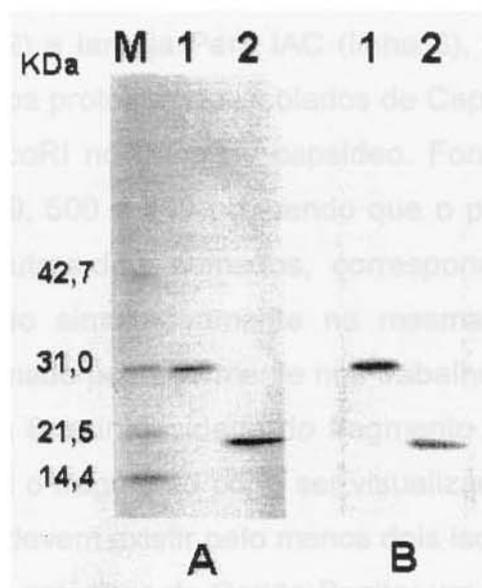


Figura 12. A. SDS-PAGE, gradiente 5-20%, da proteína do capsídeo do isolado do CTV de laranja Pera 135-CB, clones CB 3-22 (1) e CB 3-104 (2), após purificação. **B.** "Western blot" de géis em replicata de **A** usando o anticorpo produzido contra a proteína de fusão Ipiguá, diluição 1:30.000.

4.4. RFLP do gene da capa protéica de isolados do CTV

Trabalhos de RFLP do gene da capa protéica dos isolados do CTV foram realizados com o objetivo de se verificar a existência de polimorfismos entre eles. A Figura 13 (linhas 1 a 8) apresenta o padrão eletroforético dos RFLPs gerados pela enzima *EcoRI*. Em alguns isolados, laranja Pera Ipiruá (linha 1), limão Galego (linha 2) e laranja Pera IAC (linha 3), não foi detectado sítio de *EcoRI* no gene da capa protéica. Nos isolados de Capão Bonito (linhas 4 a 8) foi detectado sítio de *EcoRI* no gene do capsídeo. Foram obtidos fragmentos de aproximadamente 669, 500 e 169 pb, sendo que o primeiro deles corresponde ao gene inteiro. Os outros dois, somados, correspondem ao gene inteiro de um isolado ocorrendo simultaneamente na mesma planta. O tamanho dos fragmentos foi confirmado posteriormente nos trabalhos de sequenciamento. Na Figura 13, linhas 4 a 8, a intensidade do fragmento de 169 pb é fraca, sendo que na figura original o fragmento pode ser visualizado com maior nitidez. Este resultado indica que devem existir pelo menos dois isolados do vírus presentes na mesma planta nas amostras de Capão Bonito: um com sítio interno de *EcoRI* no gene da capa protéica, e outro sem o sítio da enzima.

A digestão do gene da capa protéica do CTV com a enzima *HinfI* produziu fragmentos de aproximadamente 73, 171 e 428 pb dos isolados originados de laranja Pera Ipiruá, limão Galego e laranja Pera IAC (Fig. 14, linhas 1 a 3, respectivamente). Já nas amostras provenientes de Capão Bonito foram obtidos fragmentos de aproximadamente 38, 73, 91, 111, 168, 264 e 299 pb (Fig. 14, linhas 4 a 8), o que indica que existe uma mistura de isolados naquelas plantas. A presença do sítio de restrição e o tamanho dos fragmentos só foram confirmados posteriormente através do sequenciamento.

Com a enzima *KpnI* foram obtidos fragmentos de aproximadamente 149 e 520 pb nos isolados presentes na laranja Pera Ipiguá, limão Galego e laranja Pera IAC (Fig. 15, linhas 1 a 3, respectivamente). Nas amostras provenientes de Capão Bonito, foram observados fragmentos de aproximadamente 669, 520 e 149 pb. Também neste caso ficou demonstrado que existem pelo menos dois isolados em uma mesma planta; em um dos isolados não existe o sítio da enzima *KpnI*. No outro isolado ocorre o sítio de *KpnI* no gene da capa protéica, originando dois fragmentos de restrição (Fig. 15, linhas 4 a 8).

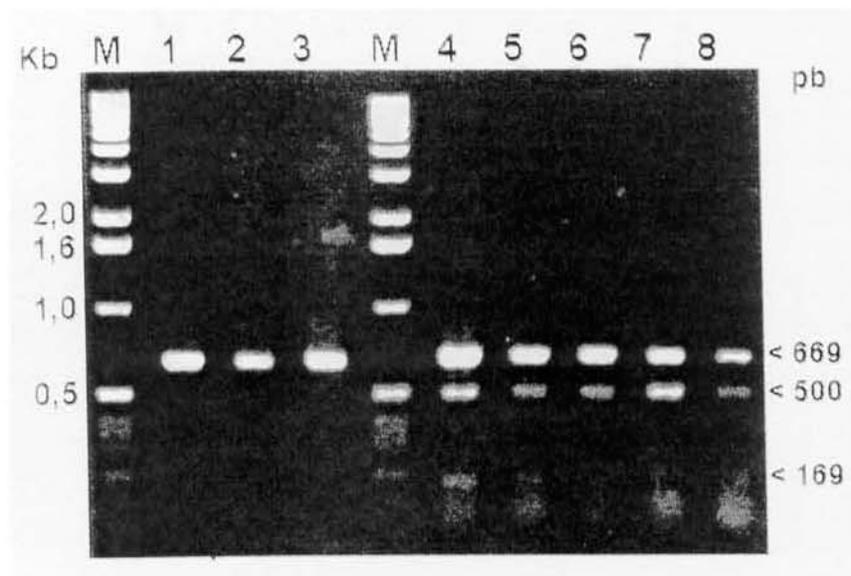


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1% do gene da capa protéica do CTV digerido com *Eco* RI. Laranja Pera Ipiguá (1); Limão Galego (2); Laranja Pera IAC (3); Laranja Pera Ipiguá-CB (4); Laranja Calderón 479-CB (5); Laranja Pera 135-CB (6); Laranja Pera 170-CB (7); Laranja Valência 205-CB (8). Linha M, 1Kb DNA Ladder.

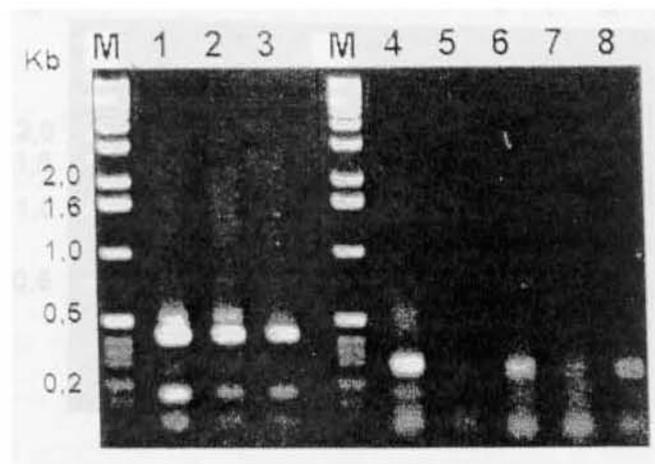


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1% do gene da capa protéica do CTV digerido com *Hinf* I. Laranja Pera Ipiгуá (1); Limão Galego (2); Laranja Pera IAC (3); Laranja Pera Ipiгуá-CB (4); Laranja Calderon 479-CB (5); Laranja Pera 135-CB (6); Laranja Pera 170-CB (7); Laranja Valência 205-CB (8). Linha M, 1Kb DNA Ladder.

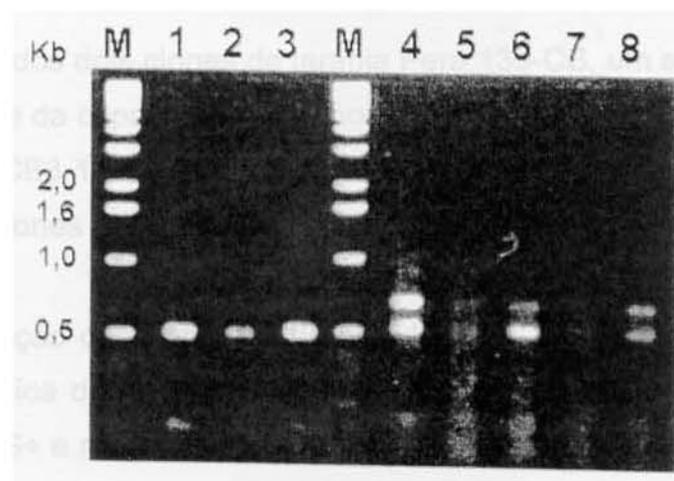


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 1% do gene da capa protéica do CTV digerido com *KpnI*. Laranja Pera Ipiruá (1); Limão Galego (2); Laranja Pera IAC (3); Laranja Pera Ipiruá-CB (4); Laranja Calderon 479-CB (5); Laranja Pera 135-CB (6); Laranja Pera 170-CB (7); Laranja Valência 205-CB (8). Linha M, 1Kb DNA Ladder.

4.5. Determinação da ocorrência de misturas de isolados por hibridização

Objetivando confirmar “in vivo” os resultados do RFLP, que indicaram a ocorrência de dois isolados do vírus na mesma planta de laranja Pera 135-CB, e também verificar a concentração de cada um deles, foram executados trabalhos de hibridização com o dsRNA isolado dessa planta.

Foram escolhidos dois clones de laranja Pera 135-CB, um sem o sítio interno de *EcoRI* no gene da capa protéica, denominado CB3-22, e um com sítio de *EcoRI*, denominado CB3-104. A Figura 16 apresenta o padrão eletroforético do DNA desses dois clones após digestão com *EcoRI*.

Para a realização dos trabalhos de hibridização, foi usado como sonda o gene da capa protéica dos dois isolados do CTV presentes na planta, clonados em pBluescript KS+ e marcados com digoxigenina (3.3.8). A Figura 17 A (linhas 2 e 3) apresenta os produtos da reação de amplificação e marcação usando como molde o cDNA de CB3-22 e CB3-104 clonados em pBluescript KS+, respectivamente. Foram obtidos fragmentos de aproximadamente 670 pb nas duas amostras. Como controle negativo, foi feita a reação usando DNA de pBluescript KS+ como molde (Fig. 17 A, linha 1).

A Figura 17 B apresenta o resultado da hibridização. Pode ser observado que ocorreu a hibridização do dsRNA isolado de laranja Pera 135-CB com as duas sondas, confirmando que os dois isolados estavam realmente presentes na mesma planta (linha 2). A intensidade do sinal de hibridação foi mais forte quando o DNA do clone CB 3-104 marcado com digoxigenina foi usado como sonda. RNA isolado de tecido sadio foi usado como controle negativo e não ocorreu hibridização (linha 1).

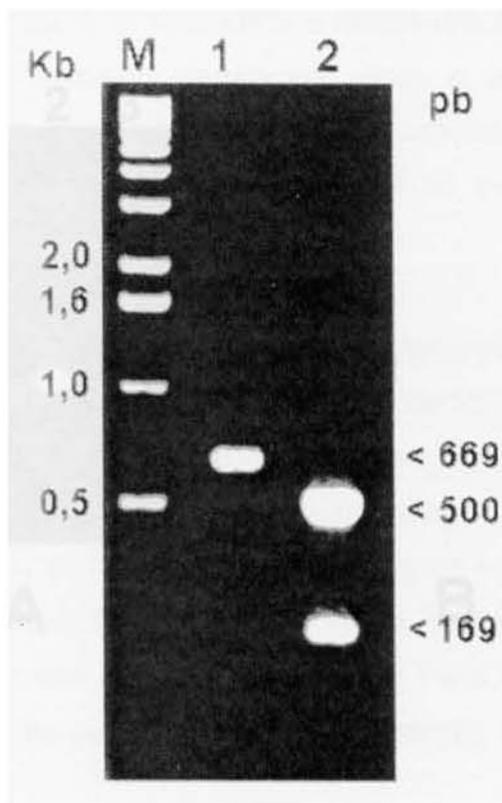


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 1% do gene da capa protéica de Pera 135-CB, clonado em pBluescript KS+ e digerido com *EcoRI*. 1. Clone CB 3-22; 2. Clone CB 3-104. Linha M, 1 Kb DNA Ladder.

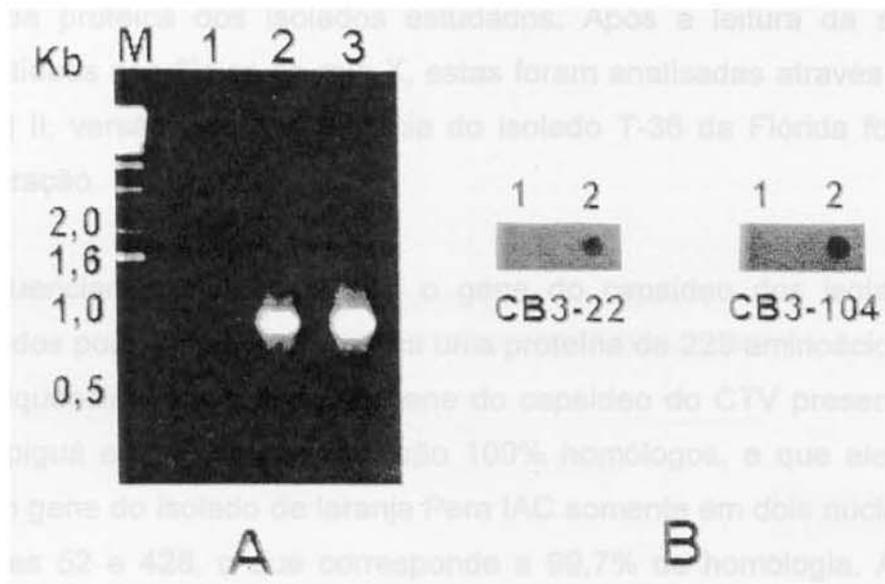


Figura 17. Marcação do gene da capa protéica de isolados do CTV e "Dot blot". **A.** Eletroforese em gel de agarose 1% do gene do capsídeo de dois isolados do CTV de laranja Pera 135-CB marcados com digoxigenina através de PCR. (1) DNA de pBluescript KS+; (2) DNA do clone CB 3-22; (3) DNA do clone CB 3-104. Linha M, 1 Kb DNA Ladder. **B.** "Dot blot" do dsRNA de tecido sadio (1) e do isolado de laranja Pera 135-CB (2), usando as sondas acima.

4.6. Sequenciamento do gene da capa protéica de isolados do CTV

O sequenciamento foi feito com o Kit Sequenase versão 2.0 (USB), usando “primers” universais de pUC e pBluescript KS+, e “primers” internos do gene da capa protéica do vírus. A Figura 18 mostra a estratégia usada para o sequenciamento e a Figura 19 apresenta a sequência de nucleotídeos do gene da capa protéica dos isolados estudados. Após a leitura da sequência de nucleotídeos nos filmes de raio X, estas foram analisadas através do programa Seqaid II, versão 3.0. A sequência do isolado T-36 da Flórida foi usada para comparação.

O sequenciamento mostrou que o gene do capsídeo dos isolados do CTV estudados possui 669 pb e codifica uma proteína de 223 aminoácidos. A análise das sequências mostrou que o gene do capsídeo do CTV presente na laranja Pera Ipiгуá e no limão Galego são 100% homólogos, e que eles diferem do mesmo gene do isolado de laranja Pera IAC somente em dois nucleotídeos, nas posições 52 e 428, o que corresponde a 99,7% de homologia. As diferenças mudaram dois aminoácidos no isolado de laranja Pera IAC: serina para glicina, na posição 18, e treonina para asparagina, na posição 143.

A análise da sequência do gene da capa protéica dos dois isolados presentes na laranja Pera 135 de Capão Bonito mostrou que existem 59 bases diferentes entre eles, o que corresponde a 91,22% de homologia. Essas diferenças de bases explicam a ocorrência de 11 aminoácidos diferentes na proteína do capsídeo dos dois isolados do CTV. A diferença é muito grande, considerando-se que esses dois isolados estão presentes em uma mesma planta.

O sequenciamento destes clones possibilitou a confirmação das análises de RFLP, principalmente no caso da digestão com *Hinf*I, que produziu fragmentos

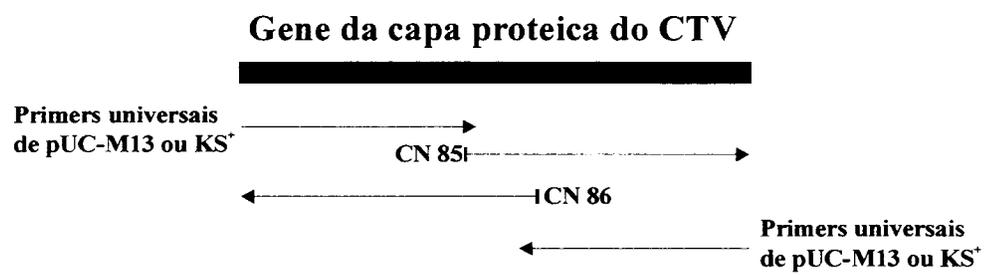


Figura 18. Estratégia utilizada no sequenciamento do gene da capa proteica de estirpes do CTV.

CTV-Ipiguá	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAACCAAGGAAACGAAAGA	
CTV-Galego	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAACCAAGGAAACGAAAGA	
CTV-IAC	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAACCAAGGAAACGAAAGA	
CTV-CB3-22	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAACCAAGGAAACGAAAGA	
CTV-CB3-104	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAACCAAGGAAACGAAAGA	
CTV-T-36	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAACCAAGGAAACAAAGA	50
	*	
CTV-Ipiguá	AAGCGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTGGTTCCCTTAACTTAC	
CTV-Galego	AAGCGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTGGTTCCCTTAACTTAC	
CTV-IAC	AGGCGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTGGTTCCCTTAACTTAC	
CTV-CB3-22	AGGCGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTGGTTCCCTTAACTTAC	
CTV-CB3-104	AGGCGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTGGTTCCCTTAACTTAC	
CTV-T-36	AGGCGACGATGTTGTTGCTGCCGAGTCTTCTTTGAGTTCCGTAACTTAC	100
	* * * * *	
CTV-Ipiguá	ACATCGATCCAACCTCTGATAGCGATGAATGACGTGCGTCAGTTGGGTACC	
CTV-Galego	ACATCGATCCAACCTCTGATAGCGATGAATGACGTGCGTCAGTTGGGTACC	
CTV-IAC	ACATCGATCCAACCTCTGATAGCGATGAATGACGTGCGTCAGTTGGGTACC	
CTV-CB3-22	ACATCGATCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTAAC	
CTV-CB3-104	ACATCGATCCGACTCTGATAGCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACC	
CTV-T-36	ACATCGATCCGACTTTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACC	150
	* * * * *	
CTV-Ipiguá	CAACAGAACGCTGCTTTAAACAGAGACTTATTTCTTACTTTGAAAGGGAA	
CTV-Galego	CAACAGAACGCTGCTTTAAACAGAGACTTATTTCTTACTTTGAAAGGGAA	
CTV-IAC	CAACAGAACGCTGCTTTAAACAGAGACTTATTTCTTACTTTGAAAGGGAA	
CTV-CB3-22	CCACAGAATGCTGCTTTGAACAGGGACTTATTTCTTGCTCTGAAAGGGAA	
CTV-CB3-104	CAACAGAATGCTGCTTTGAATAGAGATTTGTTTCTTACCTTGAAAGGGAA	
CTV-T-36	CAACAGAACGCTGCTTTGAACAGAGACTTATTCCTTACTTTGAAAGGGAA	200
	* * * * *	
CTV-Ipiguá	ECATCCTAACTTACCTGACAAAGATAAAGGACTTTCACTTAGCTATGATGT	
CTV-Galego	ECATCCTAACTTACCTGACAAAGATAAAGGACTTTCACTTAGCTATGATGT	
CTV-IAC	ECATCCTAACTTACCTGACAAAGATAAAGGACTTTCACTTAGCTATGATGT	
CTV-CB3-22	ETATCCTAACTTGCCTGACAAAGATAAAGGACTTTACATAGCTATGATGT	
CTV-CB3-104	ETATCCCAACTTACCTGACAAAGATAAAGGACTTTACATAGCTATGATGT	
CTV-T-36	ECATCCTAACTTACCTGATAAAGATAAAGGACTTTGCATAGCTATGATGT	250
	* * * * *	
CTV-Ipiguá	TGTATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGATGACGATACT	
CTV-Galego	TGTATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGATGACGATACT	
CTV-IAC	TGTATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGATGACGATACT	
CTV-CB3-22	TATACCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAAGTGATGATGACACC	
CTV-CB3-104	TATATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGACGGTGATACC	
CTV-T-36	TGTATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAAGCGATGACGACGCC	300
	* * * * *	
CTV-Ipiguá	ACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAAAGTGGACTTGCCTGACAA	
CTV-Galego	ACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAAAGTGGACTTGCCTGACAA	
CTV-IAC	ACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAAAGTGGACTTGCCTGACAA	
CTV-CB3-22	ACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAAAGTAGATTTGTCTGACAA	
CTV-CB3-104	ACGGGTGTGACGTACACTCGGGAGGGTGTGAAAGTGGAGTTGTCTGACAA	
CTV-T-36	ACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAAAGTGGATTTGTCTGACAA	350
	* * * * *	

Figura 19. Sequência de nucleotídeos do gene da capa protéica de isolados do CTV.

CTV-Ipiguá	ACTTTGGACTGACGTCGTGTTTAACTCCAAGGGTATTGGCAACCGTACTA	
CTV-Galego	ACTTTGGACTGACGTCGTGTTTAACTCCAAGGGTATTGGCAACCGTACTA	
CTV-IAC	ACTTTGGACTGACGTCGTGTTTAACTCCAAGGGTATTGGCAACCGTACTA	
CTV-CB3-22	ACTTTGGACCGACATCGTGTATAATTCTAAGGGTGTTGGTAACCGAACTA	
CTV-CB3-104	ACTTTGGACAAGACGTCGTGTTTAACTCTAAGGGTATTGGTAACCGTACTA	
CTV-T-36	ACTTTGGACTGACGTCGTGTTTAACTCTAAGGGTATTGGTAACCGTACTA	400
	* * * * *	
CTV-Ipiguá	ACGCCCTTCGAGTTTGGGGTAGAACTACCGATGCCCTTTACTTAGCTTTT	
CTV-Galego	ACGCCCTTCGAGTTTGGGGTAGAACTACCGATGCCCTTTACTTAGCTTTT	
CTV-IAC	ACGCCCTTCGAGTTTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTTACTTAGCTTTT	
CTV-CB3-22	ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAACTAACGATGCTCTTTACCTAGCCTTT	
CTV-CB3-104	ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTTATTTGGCTTTT	
CTV-T-36	ACGCCCTTCGAGTTTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTTACTTAGCTTTT	450
	* * * * *	
CTV-Ipiguá	TGTAGACAAAATCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG	
CTV-Galego	TGTAGACAAAATCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG	
CTV-IAC	TGTAGACAAAATCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG	
CTV-CB3-22	TGTAGACAGAACCCTAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG	
CTV-CB3-104	TGTAGACAGAACCCTAATTTGAGTTATGGTGGACGTCCGCTAGATGCAGG	
CTV-T-36	TGCAGACAGAATCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGACGCAGG	500
	* * * * *	
CTV-Ipiguá	GATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTG	
CTV-Galego	GATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTG	
CTV-IAC	GATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTG	
CTV-CB3-22	GATTCCGGCCGGGTATCATTATTTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTG	
CTV-CB3-104	AATTCCAGCCGGGTATCACTACCTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTG	
CTV-T-36	GATTCCGGCCGGGTATCATTACTTGTGTGCAGATTTCTTGACTGGGGCTG	550
	* * * * *	
CTV-Ipiguá	CCTTGACTGATTTAGAATGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG	
CTV-Galego	CCTTGACTGATTTAGAATGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG	
CTV-IAC	CCTTGACTGATTTAGAATGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG	
CTV-CB3-22	CCTTGACTGATTTAGAATGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTA	
CTV-CB3-104	CCTTGACTGATTTAGAATGTGCAGTGTACTTACAAGCTAAAGAGCAATTA	
CTV-T-36	CTTTGACTGATTTAGAATGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTA	600
	* * * * *	
CTV-Ipiguá	TTGAAGAAGCGAGGAGCTGATGAAGTTGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCT	
CTV-Galego	TTGAAGAAGCGAGGAGCTGATGAAGTTGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCT	
CTV-IAC	TTGAAGAAGCGAGGAGCTGATGAAGTTGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCT	
CTV-CB3-22	TTGAAAAGCGAGGGGCTGATGAGGTTGTAGTTACGAATGTCAGGCAGCT	
CTV-CB3-104	TTAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCTAGTTACCAATGTCAGGCAGCT	
CTV-T-36	TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGATGTCGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCT	650
	* * * * *	
CTV-Ipiguá	TGGGAAATTTAGCACACGTTGA	
CTV-Galego	TGGGAAATTTAGCACACGTTGA	
CTV-IAC	TGGGAAATTTAGCACACGTTGA	
CTV-CB3-22	TGGGAAATTTAACACACGTTGA	
CTV-CB3-104	TGGGAAATTTAACACACGTTGA	
CTV-T-36	TGGGAAATTTCAACACACGTTGA	672
	* *	

Continuação da Figura 19

muito pequenos. A tabela 3 apresenta a posição do sítio de restrição e o tamanho dos fragmentos obtidos após a digestão do gene da capa protéica do CTV com as enzimas de restrição, confirmados através dos trabalhos de sequenciamento.

A sequência completa de aminoácidos da proteína do capsídeo dos isolados do CTV estudados, deduzida da sequência de ácidos nucleicos, é apresentada na Figura 20. A tabela 4 apresenta as diferenças de bases e aminoácidos entre os isolados do CTV estudados.

O dendrograma gerado a partir do alinhamento de sequências de aminoácidos de proteínas do capsídeo de isolados biológica e geograficamente diferentes do CTV é apresentado na Figura 21. O dendrograma foi gerado através do programa PILEUP. T-30 e B-274 são isolados fracos da Flórida (USA) e Mompox (Colômbia); T-36, B-128, B-129, B-185 e B-227 são isolados severos da Flórida, Colômbia, Colômbia, Japão e Índia, respectivamente. Os isolados do CTV presentes em laranja Pera Ipiгуá, limão Galego e laranja Pera IAC formaram um grupo separado, o que os diferencia de outros isolados fracos e severos usados na construção do dendrograma. Os dois isolados do CTV presentes em laranja Pera 135-CB, CB3-22 e CB3-104, agruparam com os isolados fracos e severos, respectivamente. A sequência de CB 3-22, agrupado com os isolados fracos, é muito similar à do isolado fraco do CTV T-30, da Flórida, que é usado em proteção cruzada. A sequência do isolado CB 3-104 é muito semelhante à do isolado B-129 da Colômbia, que causa severo “stem pitting” em pomelos. Estes dois isolados mostraram-se completamente diferentes de outros isolados do CTV presentes no Brasil usados no trabalho.

Tabela 3. Posição dos sítios de restrição e o tamanho dos fragmentos obtidos após digestão do gene da capa protéica do CTV com *EcoRI*, *HinfI* e *KpnI*.

Isolado	<i>EcoRI</i>		<i>HinfI</i>		<i>KpnI</i>	
	sítio	tamanho (pb)	sítio	tamanho (pb)	sítio	tamanho (pb)
Laranja Pera IAC	-	-	73 501	73 171 428	149	149 523
Laranja Pera Ipiguá	-	-	73 501	73 171 428	149	149 523
Limão Galego	-	-	73 501	73 171	149	149 523
Laranja Pera CB 3-22	-	-	73 111 410 501	38 73 91 171 299	-	-
Laranja Pera CB 3-104	500	500 172	73 111 410	38 73 262 299	149	149 523

Tabela 4: Diferenças de bases e aminoácidos observadas entre os isolados do CTV.

Isolados do CTV	Diferenças		% Homologia	
	Bases	AA	Bases	AA
Laranja Pera Ipiguá e Limão Galego x Laranja Pera IAC	2	2	99,7	99,1
Laranja Pera CB 3-22 x Laranja Pera CB 3-104	59	11	91,2	95,1
Laranja Pera CB 3-22 x Laranja Pera Ipiguá e Limão Galego	53	14	92,1	93,7
Laranja Pera CB 3-22 x Laranja Pera IAC	51	12	91,4	94,6
Laranja Pera CB 3-104 x Laranja Pera Ipiguá e Limão Galego	49	11	92,7	95,1
Laranja Pera CB 3-104 x Laranja Pera IAC	48	09	92,9	95,1
Laranja Pera Ipiguá e Limão Galego x T-36	39	13	94,2	94,2
Laranja Pera IAC x T-36	37	11	94,5	95,1
Laranja Pera CB3-22 x T-36	48	09	92,3	95,7
Laranja Pera CB3-104 x T-36	55	12	91,8	94,6

CTV-Ipiguá	M D D E T K K L K N K T K E T K E S D D V V A A E S S F G S L N L H I D P T L I A M N D V R Q L G T	
CTV-Galego	M D D E T K K L K N K T K E T K E S D D V V A A E S S F G S L N L H I D P T L I A M N D V R Q L G T	
CTV-IAC	M D D E T K K L K N K T K E T K E G D D V V A A E S S F G S L N L H I D P T L I A M N D V R Q L G T	
CTV-CB3-22	M D D E T K K L K N K N K E T K E G D D V V A A E S S F G S V N L H I D P T L I T M N D V R Q L S T	
CTV-CB3-104	M D D E T K K L K N K N K E T K E G D D V V A A E S S F G S L N L H I D P T L I A M N D V R Q L G T	
CTV-T36	M D D E T K K L K N K N K E T K E G D D V V A A E S S F S S V N L H I D P T L I T M N D V R Q L S T	50
	* * * * *	
CTV-Ipiguá	Q Q N A A L N R D L F L T L K G K H P N L P D K D K D F H L A M M L Y R L A V K S S S L Q S D D D T	
CTV-Galego	Q Q N A A L N R D L F L T L K G K H P N L P D K D K D F H L A M M L Y R L A V K S S S L Q S D D D T	
CTV-IAC	Q Q N A A L N R D L F L T L K G K H P N L P D K D K D F H L A M M L Y R L A V K S S S L Q S D D D T	
CTV-CB3-22	Q Q N A A L N R D L F L A L K G K Y P N L P D K D K D F H I A M M L Y R L A V K S S S L Q S D D D T	
CTV-CB3-104	Q Q N A A L N R D L F L T L K G K Y P N L P D K D K D F H I A M M L Y R L A V K S S S L Q S D G D T	
CTV-T36	Q Q N A A L N R D L F L T L K G K H P N L P D K D K D F R I A M M L Y R L A V K S S S L Q S D D D A	100
	* * * * *	
CTV-Ipiguá	T G I T Y T R E G V E V D L P D K L W T D V V F N S K G I G N R T N A L R V W G R T T D A L Y L A F	
CTV-Galego	T G I T Y T R E G V E V D L P D K L W T D V V F N S K G I G N R T N A L R V W G R T T D A L Y L A F	
CTV-IAC	T G I T Y T R E G V E V D L P D K L W T D V V F N S K G I G N R T N A L R V W G R T N D A L Y L A F	
CTV-CB3-22	T G I T Y T R E G V E V D L S D K L W T D I V Y N S K G V G N R T N A L R V W G R T N D A L Y L A F	
CTV-CB3-104	T G V T Y T R E G V E V E L S D K L W T D V V F N S K G I G N R T N A L R V W G R T N D A L Y L A F	
CTV-T36	T G I T Y T R E G V E V D L S D K L W T D V V F N S K G I G N R T N A L R V W G R T N D A L Y L A F	150
	* * * * *	
CTV-Ipiguá	C R Q N R N L S Y G G R P L D A G I P A G Y H Y L C A D F L T G A G L T D L E C A V Y I Q A K E Q L	
CTV-Galego	C R Q N R N L S Y G G R P L D A G I P A G Y H Y L C A D F L T G A G L T D L E C A V Y I Q A K E Q L	
CTV-IAC	C R Q N R N L S Y G G R P L D A G I P A G Y H Y L C A D F L T G A G L T D L E C A V Y I Q A K E Q L	
CTV-CB3-22	C R Q N R N L S Y G G R P L D A G I P A G Y H Y L C A D F L T G A G L T D L E C A V Y I Q A K E Q L	
CTV-CB3-104	C R Q N R N L S Y G G R P L D A G I P A G Y H Y L C A D F L T G A G L T D L E C A V Y L Q A K E Q L	
CTV-T36	C R Q N R N L S Y G G R P L D A G I P A G Y H Y L C A D F L T G A G L T D L E C A V Y I Q A K E Q L	200
	*	
CTV-Ipiguá	L K K R G A D E V V V T N V R Q L G K F S T R	
CTV-Galego	L K K R G A D E V V V T N V R Q L G K F S T R	
CTV-IAC	L K K R G A D E V V V T N V R Q L G K F S T R	
CTV-CB3-22	L K K R G A D E V V V T N V R Q L G K F N T R	
CTV-CB3-104	L K K R G A D E V V V T N V R Q L G K F N T R	
CTV-T36	L K K R G A D D V V V T N V R Q L G K F N T R	223
	* *	

Figura 20. Sequência de aminoácidos, deduzida da sequência de ácidos nucleicos, da proteína do capsídeo de isolados de laranja Pera Ipiguá, limão Galego, laranja Pera IAC, laranja Pera 135-CB, clones CB 3-22 e CB 3-104 e T-36.

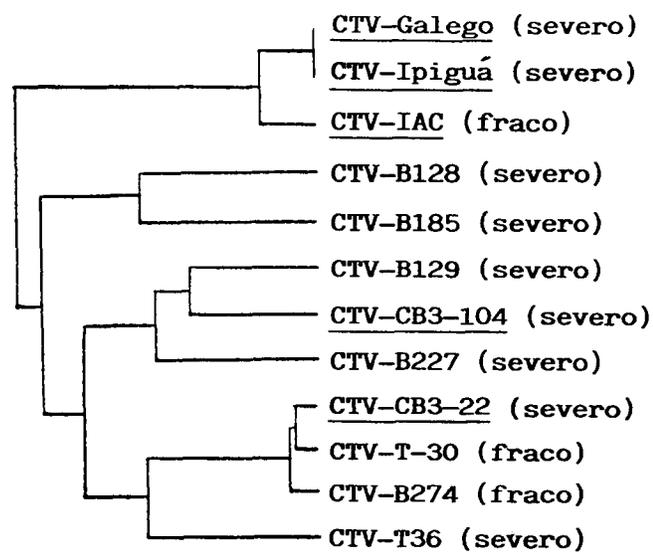


Figura 21. Dendrograma gerado a partir do alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína do capsídeo de isolados do CTV.

4.7. RT-PCR na detecção de isolados

Baseado nas diferenças existentes na sequência de ácidos nucleicos do gene da capa protéica dos isolados do CTV, foram construídos “primers” para amplificação de fragmentos de tamanhos diferentes, específicos para cada isolado. A tabela 5 apresenta a sequência desses “primers”, enquanto a Figura 22 apresenta a região amplificada e o tamanho dos fragmentos. As reações de amplificação foram feitas usando as condições descritas para o par de “primers” A, porém a temperatura de anelamento usada foi de 60°C.

O par de primers P1P2 corresponde ao par de primers D descrito em 3.3.3. e amplifica um fragmento de 669 pb, que corresponde ao gene da capa proteica inteiro. A tabela 6 apresenta: 1) o isolado de onde foi retirada a sequência e para o qual o par de primers é específico, 2) o tamanho dos fragmentos gerados após PCR, 3) posição dos primers na sequência do gene da capa proteica e 4) as bases diferentes em cada um e sua localização, entre parênteses.

A tabela 7 apresenta, de uma maneira bem simples, qual isolado do CTV permite a amplificação de fragmentos do gene da capa proteica por cada par de primers e o tamanho dos fragmentos gerados.

Os “primers” internos foram testados em uma série de experimentos onde:

1. o gene da capa proteica do isolado das laranjas Pera Ipiгуá, Pera CB 3-22 e Pera CB 3-104 clonados nos respectivos vetores foram usados como molde em reações de amplificação;

2. o gene da capa proteica dos isolados citados acima foi usado como molde em reações com dois pares de “primers”, sendo o par P1P2 usado em todas as reações;

Tabela 5: Sequência de “primers” para detecção diferencial do gene da capa proteica de diferentes isolados do CTV.

“Primers”	Sequência
P1	5' GAA GAT CTT CAA CGT GTG TTG AAT TTC C 3'
P2	5' AAC CTG CAG CCA TGG ACG ACG AAA CAA AG 3'
P3	5' AAC CAA GGA AAC GAA AGA AA 3'
P4	5' AGC TAA GTA AAG GGC ATC GG 3'
P5	5' TTG CAG CTG AGT CTT CTT TT 3'
P6	5' TGT CCA AAG TTT GTC AGA CAA C 3'
P7	5' TTT GTC TGA CAA ACT TTG GAC C 3'
P8	5' CTC ATC AGC CCC TCG CTT T 3'
P9	5' AAC TCT GAT AGC GAT GAA TGA C 3'
P10	5' CGC AAC AGA TCA ACG TGT GC 3'
P11	5' CCC AAC AGA ATG CTG CTT TG 3'
P12	5' TAA CTA CAA CCT CAT CAG CC 3'

Tabela 6: Especificações dos “primers” internos do CTV.

Primer	Sequência derivada do isolado de	Fragmento obtido (pb)	Posição dos primers na sequência (bases)	Bases diferentes e posição			
				Ipiguá	IAC	CB3-22	CB3-104
P3 (+)	P.Ipiguá	414	33-52	A(52)	G	G	G
P4 (-)			447-428	C(428)	A	A	A
P5 (+)	CB 3-104	295	65-84	C	C	C	T(84)
P6 (-)			360-339	C	C	T	G(339)
P7 (+)	CB 3-22	285	339-360	T	T	C(360)	A
P8 (-)			606-624	G	G	A(606)	G
P9 (+)	P.Ipiguá e	570	111-132	C(132)	C	T	T
P10 (-)	P.IAC		681-662	G(662)	G	A	A
P11 (+)	CB 3-22 e	485	149-168	A	A	G(168)	G
P12 (-)	CB 3-104		634-615	A	A	G(615)	G

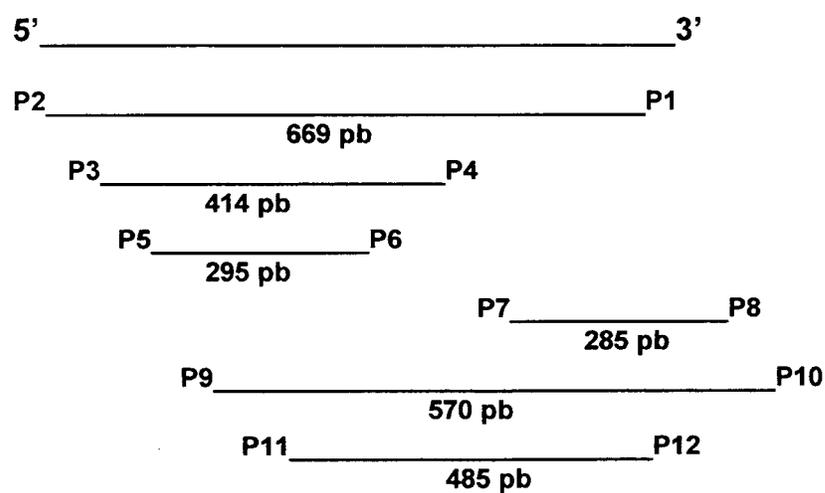


Figura 22. Região do gene da capa protéica amplificada por cada par de “primers” internos e tamanho dos fragmentos gerados.

3. o gene da capa proteica clonado de dois isolados diferentes do CTV foi usado como molde em uma mesma reação com os pares de “primers”;

4. o cDNA de um isolado do CTV foi usado como molde, e não o gene da capa proteica clonado, em reações com os pares de “primers”.

Os pares de “primers” foram testados inicialmente utilizando-se o cDNA do gene da capa protéica do isolado do CTV presente em laranja Pera Ipiguá, clonado em pUC 118. A Figura 23 A apresenta o padrão eletroforético dos produtos das reações de amplificação desse cDNA com todos os “primers”. Ocorreu a amplificação de um fragmento de aproximadamente 669 pb quando se usou o par de “primers” P1P2, que amplifica o gene da capa protéica completo (Fig. 23 A, linha 1). Um fragmento de 414 pb foi amplificado quando o par de “primers” P3P4, que é específico para o isolado do CTV presente em laranja Pera Ipiguá, foi usado (Fig. 23 A, linha 2). O par de “primers” P9P10, específico para amplificar fragmento do gene da capa protéica de isolados de laranja Pera Ipiguá e Pera IAC, e não dos isolados de Capão Bonito, amplificou um fragmento de 570 pb (Fig. 23 A, linha 5). Não ocorreu amplificação quando foram usados os pares de “primers” P5P6 (específico de CB 3-22), P7P8 (específico de CB 3-104) e P11P12 (específicos de CB 3-22 e CB 3-104) (Fig. 23 A, linhas 3, 4 e 6, respectivamente). O gene da capa proteica do isolado de laranja Pera CB3-22 clonado em pBluescript KS+ também foi usado como molde nas reações PCR com os pares de “primers”. A Figura 23 B, linhas 1 a 6, apresenta o padrão eletroforético dos produtos amplificados. Os pares de “primers” P1P2, P7P8 e P11P12 amplificaram fragmentos de 669, 285 e 495 pb, respectivamente (Fig. 23 B, linhas 1, 4 e 6). Não ocorreu amplificação quando foram usados os “primers” P3P4, P5P6 e P9P10 (Fig. 23 B, linhas 2, 3 e 5). Os resultados obtidos neste experimento estão de acordo com o que está indicado na tabela 7.

O resultado da amplificação do gene da capa proteica do isolado de laranja Pera CB 3-104 clonado em pBluescript KS+ com os mesmos pares de “primers” é apresentado na Figura 23 C. Ocorreu a amplificação de fragmentos de 669, 295 e 485 pb quando os primers P1P2, P5P6 e P11P12 foram usados (Fig. 23 C, linhas 1, 3 e 6, respectivamente). Por outro lado, não ocorreu amplificação quando os “primers” P3P4, P7P8 e P9P10 foram usados (Fig. 23 C, linhas 2, 4 e 5, respectivamente).

Na segunda série de experimentos, o gene da capa protéica do CTV dos isolados das laranjas Pera Ipiguá, Pera CB 3-22 e CB 3-104, clonados nos vetores já especificados, foram usados em reações de amplificação com dois pares de “primers”. O par de “primers” P1P2, que amplifica o gene completo, foi usado em todas as reações e, além dele, foi usado um dos pares de “primers” internos. A Figura 24 A apresenta o resultado desse experimento quando o gene da capa protéica do isolado de laranja Pera Ipiguá foi usado como molde. Um fragmento de 669 pb e um de 414 pb foram obtidos quando a reação foi feita com os “primers” P1P2 e P3P4 (Fig. 24 A, linha 1).

O fragmento de 669 pb corresponde ao gene inteiro, e o de 414 pb é específico do isolado presente em laranja Pera Ipiguá. Foram obtidos fragmentos de 669 e 570 pb quando o conjunto de “primers” usado foi P1P2 e P9P10 (Fig. 24 A, linha 4), sendo este último par de “primers” específico para amplificar um fragmento de laranjas Pera provenientes da região de Cordeirópolis. Nas outras combinações de “primers” foram obtidos apenas um fragmento de 669 pb, amplificado pelo par de “primers” P1P2, pois os “primers” P5P6, P7P8 e P10P11 usados em conjunto com os “primers” externos, são específicos de isolados de laranjas Pera CB 3-104, CB 3-22 e das Peras provenientes de Capão Bonito, respectivamente (Fig. 24 A, linhas 2, 3 e 5).

Tabela 7: Tamanho dos fragmentos do gene da capa proteica do CTV gerados por cada par de “primer” e indicação dos isolados específicos para cada par de primer

Par de primers	Tamanho do fragmento (pb)	Isolados em estudo			
		Ipiguá	IAC	CB3-22	CB3-104
P1P2	669	+	+	+	+
P3P4	414	+	-	-	-
P5P6	295	-	-	-	+
P7P8	285	-	-	+	-
P9P10	570	+	+	-	-
P11P12	485	-	-	+	+

(+) ocorre amplificação ; (-) não ocorre amplificação

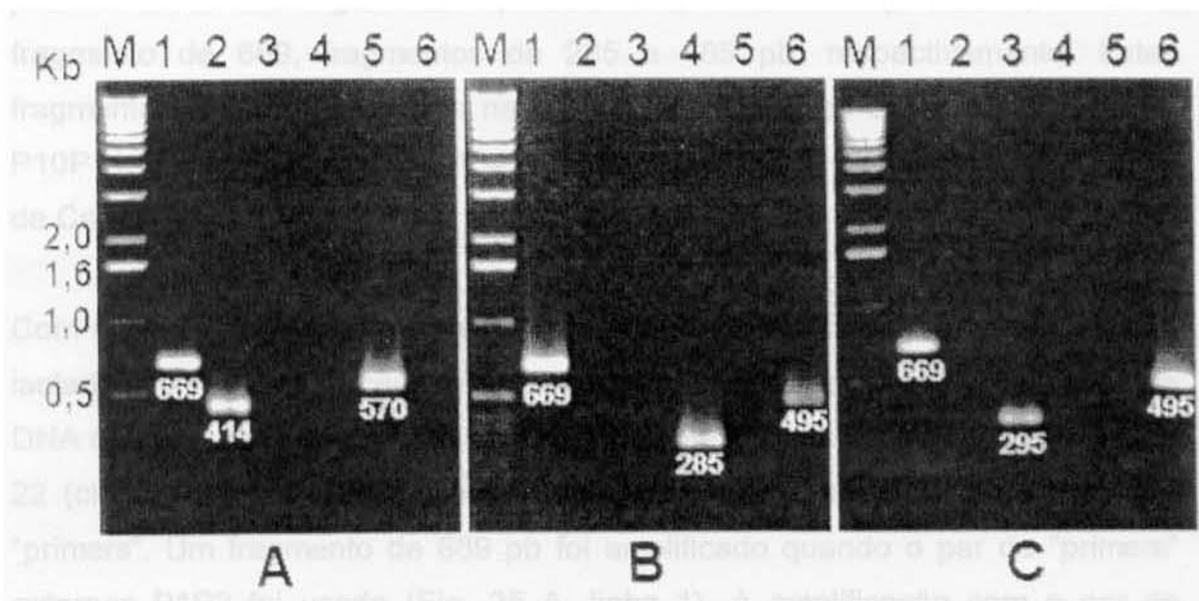


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose 1% do gene da capa protéica do CTV amplificado por PCR usando "primers" específicos para isolados do vírus. **A.** Reações usando como molde o cDNA do gene da capa protéica presente no isolado de laranja Pera Ipiruá (clonado em pUC 118) e os pares de "primers" P1P2 (1); P3P4 (2); P5P6 (3); P7P8 (4); P9P10 (5); P11P12 (6). **B.** Mesmo descrito em A, usando como molde DNA do isolado de laranja Pera 135 CB 3-22. **C.** Mesmo descrito em A, usando como molde DNA do isolado de laranja Pera CB 3-104. Linha M, 1 Kb DNA Ladder. Números em branco indicam o tamanho dos fragmentos amplificados, em pb.

O mesmo trabalho foi realizado usando-se como molde o gene da capa protéica do isolado de laranja Pera CB 3-104 clonado em pBluescript KS+ (Fig. 24 C, linhas 1 a 5). As combinações de “primers” foram as mesmas descritas acima. A Figura 24 C apresenta o resultado das reações de amplificação. Também foram obtidos fragmentos de 669 pb em todas as reações, amplificados pelo par de primers P1P2. Na Figura 24 C, linhas 2 e 5 foram amplificados, além do fragmento de 669, fragmentos de 285 e 485 pb, respectivamente. Estes fragmentos foram amplificados na reação com os pares de “primers” P5P6 e P10P11, específicos de CB 3-104 e de Peras em geral, provenientes da região de Capão Bonito.

Com o objetivo de verificar se os pares de “primers” detectavam misturas de isolados do vírus, na terceira série de experimentos foi feita uma combinação de DNA do gene da capa proteica do CTV presente em laranja Pera Ipiguá e CB 3-22 (clonados) para serem usados como molde em reações com os pares de “primers”. Um fragmento de 669 pb foi amplificado quando o par de “primers” externos P1P2 foi usado (Fig. 25 A, linha 1). A amplificação com o par de “primers” P3P4, específico para o isolado de laranja Pera Ipiguá, gerou um fragmento de 414 pb (Fig. 25 A, linha 2). Quando o par de “primers” P5P6, específico para CB 3-104, foi usado, não ocorreu amplificação (Fig. 25 A, linha 3). O par de “primers” P7P8, específico para CB 3-22, produziu um fragmento de 285 pb (Fig. 25 A, linha 4); o par P9P10, específico de isolado de laranja Pera Ipiguá e outras de região de Cordeirópolis, produziu um fragmento de 570 pb (Fig. 25 A, linha 5). Um fragmento de 485 pb foi gerado quando o par de “primers” P11P12, específico para as Peras da região de Capão Bonito, foi usado (Fig. 25 A, linha 6).

A combinação do DNA do isolado de laranja Pera Ipiguá e CB3-104 para serem usados nas reações de amplificação com os pares de “primers” também foi feita

(Fig. 25 B, linhas 1 a 6). Foram amplificados fragmentos de 669, 414, 295, 570 e 485 pb quando os pares de “primers” P1P2, P3P4, P5P6, P9P19 e P11P12 foram usados (Fig. 25 B, linhas 1, 2, 3, 5 e 6, respectivamente). O par de “primers” P7P8, específico de CB3-22, não amplificou nenhum fragmento (Fig. 25 B, linha 4).

Na quarta série de experimentos, foi usado como molde nas reações de amplificação a primeira fita de cDNA do isolado de presente em laranja Pera da região de Capão Bonito (Fig. 26, linhas 1 a 6). Foram amplificados fragmentos de 669, 295, 285, 570 e 485 pb quando os pares de “primers” P1P2, P5P6, P7P8, P9P10 e P11P12 foram usados (Fig. 26, linhas 1, 3, 4, 5 e 6, respectivamente). O par de “primers” P3P4, específico de Pera Ipiruá, não amplificou nenhum fragmento (Fig. 26, linha 2). O conjunto P9P10, específico de isolados de laranjas Pera da região de Cordeirópolis e não de Capão Bonito, amplificou um fragmento de 570 pb (Fig. 26, linha 5).

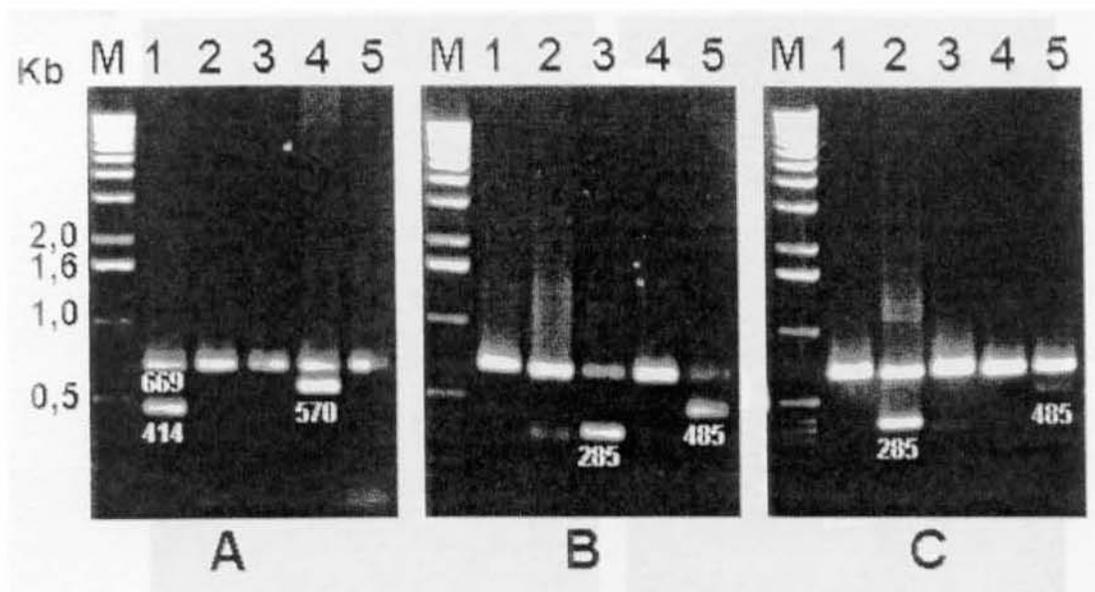


Figura 24. Eletroforese em gel de agarose 1% do gene da capa protéica do CTV amplificado por PCR usando dois pares de "primers". **A.** Reações usando como molde o cDNA do gene da capa protéica do isolado de laranja Pera Ipirigá (clonado em pUC 118). O par de "primers" P1P2 foi usado em todas as reações em conjunto com os pares de "primers" P3P4 (1); P5P6 (2); P7P8 (3); P9P10 (4); P11P12 (5). **B.** Mesmo descrito em A, usando como molde cDNA do gene da capa proteica do isolado presente em laranja Pera CB 3-22 (clonado em pBluescript KS+). **C.** Mesmo descrito em A, usando como molde cDNA do gene da capa protéica do isolado presente em laranja Pera CB 3-104 (clonado em pBluescript KS+). Linha M, 1Kb DNA Ladder. Números em branco indicam o tamanho dos fragmentos amplificados, em pb.

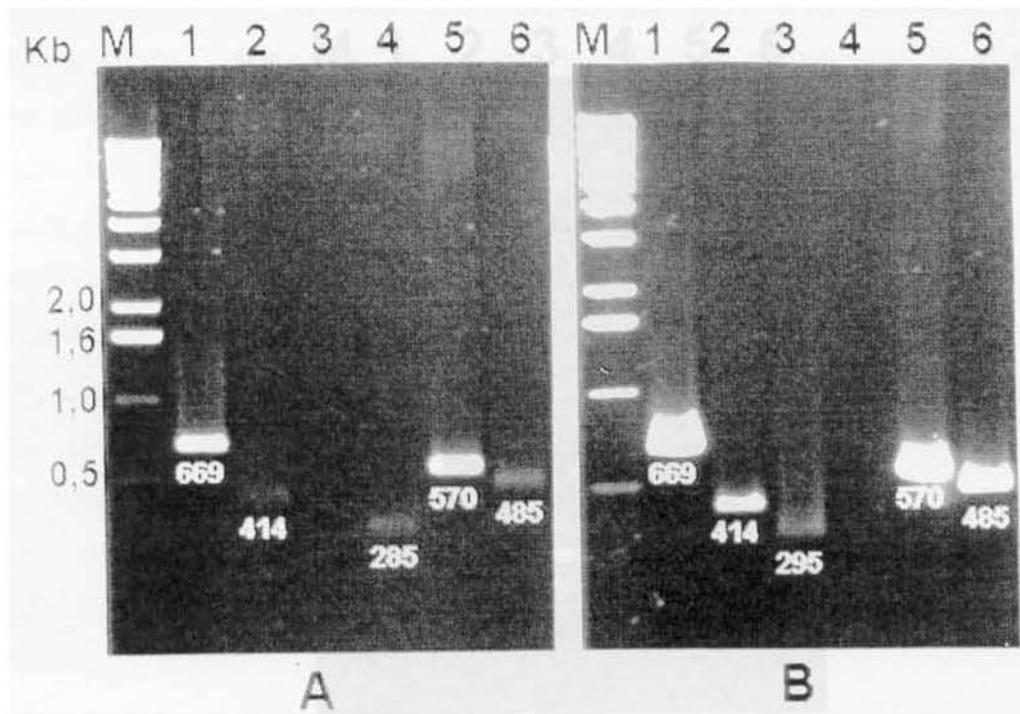


Figura 25. Eletroforese em gel de agarose 1% do gene da capa protéica do CTV amplificado por PCR usando como molde o cDNA de dois isolados do vírus em uma mesma reação e os conjuntos de "primers" internos. **A.** Reações usando como molde o cDNA do gene da capa protéica do CTV presente em laranjas Pera Ipiгуá e CB 3-22 (clonados) com P1P2 (1); P3P4 (2); P5P6 (3); P7P8 (4); P9P10 (5) e P11P12 (6). **B.** Mesmo descrito em A, usando como molde o cDNA de laranjas Pera Ipiгуá e CB 3-104 (clonados). Linha M, 1 Kb DNA Ladder. Números em branco indicam o tamanho dos fragmentos amplificados, em pb.

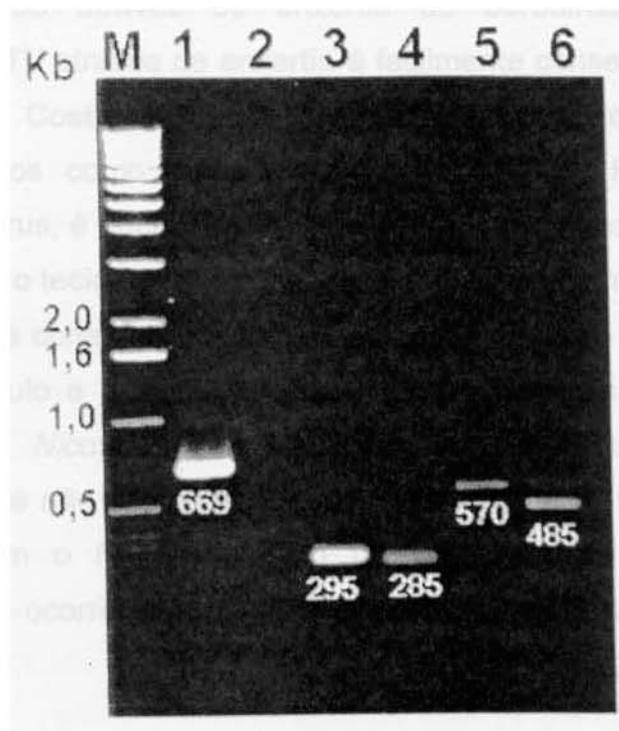


Figura 26. Eletroforese em gel de agarose 1% do gene da capa protéica do CTV amplificado por PCR usando como molde a primeira fita de cDNA do isolado presente em laranja Pera da região de Capão Bonito e os pares de primers internos P1P2 (1); P3P4 (2); P5P6 (3); P7P8 (4); P9P10 (5); P11P12 (6). Linha M, 1Kb DNA Ladder. Números em branco indicam o tamanho dos fragmentos amplificados, em pb.

5. Discussão

Para a realização dos experimentos sobre a multiplicação de um isolado fraco (Pera IAC) e um severo (Barão B) do CTV em diferentes espécies de citros, o vírus foi inoculado através de enxertia de borbulhas contaminadas. A transmissão do CTV através de enxertia é facilmente conseguida de citros para citros (Bennett e Costa, 1949), sendo que vários tecidos contendo floema podem ser usados como inóculo (Roistacher, 1976). Para que ocorra a transmissão do vírus, é necessário que se forme uma conexão vascular entre o tecido infectado e o tecido receptor, sendo necessários no mínimo oito dias para que se forme essa conexão vascular e o vírus atravesse a união entre o tecido usado como inóculo e o tecido receptor. Já em sistemas de protoplastos de *Citrus sinensis* e *Nicotiana benthamiana*, considerado um não hospedeiro experimental, onde não ocorre infecção da planta intacta, Navas-Castillo *et al.* (1997) detectaram o RNA genômico do CTV apenas dois dias após a inoculação, tendo ocorrido um acúmulo máximo desse RNA três a cinco dias após a inoculação.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho ficou demonstrado, através das análises de “Western blot”, que o tempo mínimo para detecção do CTV em tecidos que foram infectados com o vírus variou de acordo com dois fatores: **1.** a espécie / variedade de citros que foi infectada e **2.** o tipo de isolado do CTV usado para infecção.

Ficou evidente que quando o limão Galego foi infectado com o isolado fraco do CTV presente em laranja Pera IAC, a concentração do vírus nos seus tecidos foi maior que nos tecidos das outras amostras analisadas. Esta característica de limão Galego de favorecer uma alta concentração do vírus nos seus tecidos já havia sido verificada anteriormente por Costa *et al.*, 1949. Quando borbulhas de

laranja Pera IAC foram usadas para infectar as plantas, o vírus foi detectado nos tecidos de limão Galego e laranja Pera a partir de 15 dias após a enxertia das borbulhas contaminadas, seguido das laranjas Baía e Hamlin, onde o CTV foi detectado aos 20 dias após a enxertia, e tangerina Poncan, somente 30 dias após a enxertia (Fig. 3 A a 3 E, linhas 1 a 6; Tabela 2).

O isolado do CTV presente em laranja Barão B, considerado severo, replicou em todas as variedades avaliadas, tendo sido detectado aos 20 dias após a enxertia das borbulhas contaminadas nas laranjas Pera, Baía e Hamlin; em limão Galego foi detectado aos 30 dias e na tangerina Poncan somente aos 60 dias da enxertia (Fig. 3 A a 3 E, linhas 7 a 12; Tabela 2). Neste caso, foi observado que as plântulas de Pera apresentaram maior concentração deste isolado do CTV. Nos tecidos de tangerina Poncan, além do CTV ser detectado somente 60 dias da enxertia das borbulhas contaminadas, a reação observada foi muito fraca, indicando uma baixa concentração do vírus. A tolerância de tangerinas à presença do CTV, tanto em copas quanto em porta-enxertos, já é conhecida (Costa *et al.*, 1949; Moreira *et al.*, 1949). De acordo com Moreira *et al.* (1949) algumas variedades de tangerinas são de grande valor como porta-enxertos para variedades comerciais de citros devido à sua tolerância à tristeza.

De acordo com Lee *et al.* (1995), existem algumas características comuns entre os isolados fracos do CTV selecionados para proteção cruzada, entre elas: 1. a alta concentração de vírus nos tecidos, expressando sintomas fracos em todos os hospedeiros, e 2. a capacidade de se mover rapidamente em novos ramos. O isolado do CTV presente em laranja Pera IAC é considerado fraco, e vem sendo usado no programa de pré-imunização de laranja Pera no Estado de São Paulo. Como foi visto nas análises de “Western blot”, este isolado do CTV foi o que apresentou maior capacidade de multiplicação e concentração nos tecidos das amostras usadas no trabalho, o que vem confirmar a constatação de Lee *et al.*

(1995).

Durante a realização deste trabalho, RNAs dupla fita (dsRNAs) foram isolados de tecidos infectados com o CTV. A presença desses dsRNAs em tecidos infectados baseia-se no fato que durante a replicação, os closterovirus, e também outros vírus de ssRNA, produzem dsRNAs nos seus hospedeiros (Dodds *et al.*, 1984). Esses dsRNAs correspondem à forma replicativa “full length” do ssRNA. Além dos dsRNAs “full length”, também são encontrados em tecidos infectados com o vírus, dsRNAs menores, chamados subgenômicos (Dodds e Bar-Joseph, 1983). Quando analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida, os dsRNAs subgenômicos produzem padrões específicos, de acordo com o isolado do CTV, a planta hospedeira e também com a concentração do vírus no hospedeiro (Dodds *et al.*, 1987a; Valverde *et al.*, 1986). De acordo com Lee (1984), Dodds *et al.* (1987 b) e Moreno *et al.* (1990), o padrão eletroforético dos dsRNAs subgenômicos pode ser usado para distinguir isolados fracos e severos do CTV. Plantas saudáveis não possuem uma quantidade detectável de dsRNA de alto peso molecular ($> 0,1 \times 10^6$) (Dodds e Bar-Joseph, 1983; Dodds *et al.*, 1984).

Nas condições em que foi realizado este trabalho, a única diferença observada no padrão eletroforético (em gel de agarose 1%) do dsRNA dos isolados em estudo foi a presença da banda de 17 Kb, detectada em amostras provenientes da região de Capão Bonito (Fig. 4, linhas 5, 6, 7). A purificação das duas bandas correspondentes ao dsRNA, e a posterior síntese da 1ª fita de cDNA para ser usada como molde em reações de amplificação do gene da capa proteica do CTV através de PCR, mostrou que após a amplificação foram obtidos fragmentos de aproximadamente 670 pb nas duas amostras (Fig. 6, linhas 1 e 2). Provavelmente, pode ter ocorrido uma deleção no dsRNA do vírus, originando o de 17 Kb. A amplificação do gene da capa proteica usando como molde a 1ª fita de cDNA obtida a partir destes dsRNAs também indicou que a

região que possivelmente tenha sido deletada não estava relacionada com esse gene, uma vez que essa sequência foi amplificada sem revelar polimorfismo no tamanho.

A detecção da tristeza através de técnicas serológicas, como ELISA e “Western blot”, usando anticorpos mono e policlonais produzidos contra a proteína do capsídeo do CTV purificada, ou contra partículas virais intactas, vem sendo realizada rotineiramente. No entanto, devido ao fato do CTV estar estreitamente associado ao floema, a purificação de suas partículas para serem usadas na produção de anticorpos apresenta algumas limitações como: 1. grande quantidade de tecido infectado necessária para a purificação do vírus; 2. baixo rendimento de vírus; 3. contaminação com proteínas da planta hospedeira, o que pode comprometer a qualidade do anticorpo produzido (Niblett *et al.*, 1993; Manjunath *et al.*, 1994; Nikolaeva *et al.*, 1995).

A aplicação de técnicas de Biologia Molecular, como uma alternativa para a obtenção da proteína do capsídeo do CTV para ser usada na produção de anticorpos, foi adotada por Manjunath *et al.* (1994) e Nikolaeva *et al.* (1995). Os autores clonaram o gene da capa proteica de isolados do CTV da Índia e Estados Unidos em vetores de expressão e usaram a proteína expressa em *E. coli* para a produção de anticorpos.

Nikolaeva *et al.* (1995) utilizaram o vetor pMALc2, que cria a fusão do gene clonado com um fragmento da proteína de ligação da maltose de *E. coli*, e obtiveram um rendimento de 100 µg de proteína de fusão por ml de cultura de bactéria. No presente trabalho foram obtidos 25 µg de proteína de fusão - Pera Ipiгуá por ml de cultura de bactéria. Mesmo representando ¼ do rendimento obtido por Nikolaeva *et al.* (1995), a quantidade de proteína do capsídeo do CTV obtida é maior que a que se obtém normalmente partindo-se de 100 g de

tecido. Bar-Joseph *et al.* (1976), partindo de 100 g de tecido infectado de *C. aurantifolia*, obteve um rendimento de 0,04-0,32 e 0,1-0,75 mg de vírus, respectivamente. Baptista *et al.* (1997) obtiveram um rendimento de 0,55-0,60 mg de vírus também por 100 g de tecido infectado de *C. aurantifolia*. Já em preparações do CTV, realizadas por Tsuchizaki *et al.* (1978), usando tecido infectado de *C. sinensis*, o rendimento foi de 0,33-0,8 mg de vírus por 100 g de tecido.

Nikolaeva *et al.* (1996) usaram o mesmo sistema de clonagem em pMALc2 para selecionar 30 anticorpos monoclonais produzidos contra a proteína do capsídeo do CTV. Para a realização do trabalho, os autores clonaram fragmentos do gene da capa protéica do vírus e expressaram a proteína em *E. coli*. De acordo com os autores, este sistema também é muito adequado para ser usado em trabalhos de mapeamento de epítopos de anticorpos monoclonais do vírus, pois podem ser feitas, com facilidade, construções que representem diferentes regiões do gene da capa proteica do vírus.

Manjunath *et al.* (1994) usaram o sistema de vetores pET (Novagem) para clonar o gene da capa protéica do isolado B-227, da Índia. A proteína do capsídeo do CTV obtida através deste sistema possui 25 aminoácidos a mais, a partir do terminal amino do vetor. Devido aos aminoácidos a mais, ficou demonstrado no presente trabalho, através de SDS-PAGE, que a proteína do capsídeo do CTV do clone CB 3-22 possui aproximadamente 28,7 KDa (Fig. 10 A, linha 2; Fig. 12 A, linha 1). Devido a problemas na clonagem ou mesmo na expressão, a proteína do capsídeo do CTV presente em laranja Pera 135-CB, clone CB 3-104, mesmo com os 25 aminoácidos a mais, possui aproximadamente 19 KDa (Fig. 10 A, linha 3; Fig. 12 A, linha 2). Anticorpos monoclonais contra proteína do capsídeo do CTV expressa em *E. coli* usando o sistema pET não foram ainda produzidos (Lee, R. F., comunicação pessoal). As

proteínas purificadas neste trabalho serão as primeiras a serem usadas para a produção deste tipo de anticorpo.

Cabe lembrar aqui que a quantidade de tecido infectado utilizada para a realização dos trabalhos de clonagem e expressão da proteína do capsídeo do CTV presente em laranjas Pera Ipiruá e Pera 135-CB foi de apenas 1 g. Além disso, uma vez clonado o gene da capa protéica do CTV, sempre que houver necessidade basta crescer a bactéria, induzir a expressão com IPTG e purificar a proteína. De acordo com Niblett *et al.* (1993) e Manjunath *et al.* (1994), a proteína expressa em *E. coli* também serve como controle positivo em reações serológicas para detectar o CTV, o que evita a entrada de padrões positivos, na forma de tecidos infectados ou extratos de tecidos infectados, em áreas consideradas sensíveis.

A sequência de ácidos nucleicos do gene da capa proteica do CTV e a sequência de aminoácidos da proteína do capsídeo (deduzida da sequência de ácidos nucleicos) de quatro isolados do vírus foram determinadas neste trabalho. Foi usado um clone do isolado do CTV presente em laranja Pera Ipiruá, um de limão Galego e um de laranja Pera IAC. Do isolado do CTV presente em laranja Pera 135-CB, proveniente da região de Capão Bonito, foram selecionados dois clones contendo o gene da capa protéica, que foram denominados neste trabalho CB 3-22 e CB 3-104.

O gene da capa proteica do CTV presente em laranja Pera Ipiruá e limão Galego apresentou 100% de homologia na sequência de ácidos nucleicos. A homologia observada entre o gene da capa proteica dos outros isolados foi da ordem de 91,2 a 99,7% na sequência de ácidos nucleicos, e de 93,7 a 99,1% na de aminoácidos. Diferenças de 59 nucleotídeos foram observadas na sequência do gene do capsídeo dos clones CB 3-22 e CB 3-104, presentes na mesma

planta. Estes clones apresentaram 91,2% de homologia na sequência de ácidos nucleicos e 95,1% na de aminoácidos (Tabela 4). Isolados do CTV biológica e geograficamente diferentes já sequenciados apresentam 90-100% de homologia (Pappu *et al.*, 1993 b). Portanto, considerando-se que os isolados CB3-22 e CB3-104 estão presentes na mesma planta (Pera 135-CB), as diferenças observadas entre eles podem ser consideradas significativas. Comparado com o isolado do CTV T-36, da Flórida, 9 a 13 aminoácidos foram diferentes nos isolados brasileiros. A homologia na sequência de ácidos nucleicos variou de 91,8 a 94,5%, sendo que a maior % de homologia foi observada entre esse isolado e o de laranja Pera IAC (Tabela 4).

Em trabalhos realizados por Pappu *et al.* (1993b) e Manjunath *et al.* (1994), sobre sequenciamento do gene da capa proteica de isolados de diferentes regiões e propriedades biológicas, foram observadas porcentagens de homologia semelhantes às obtidas neste trabalho. Cevik (1995) determinou a sequência de ácidos nucleicos de 14 clones de nove diferentes isolados do CTV, sendo sete de limão Meyer e dois de tangor Homely. A homologia na sequência de ácidos nucleicos e de aminoácidos deduzida foi da ordem de 90 a 99% e 91 a 100%, respectivamente.

De acordo com Niblett *et al.* (1993), a comparação da sequência de aminoácidos da proteína do capsídeo de diferentes isolados do CTV mostrou que na posição 124 o aminoácido presente nos isolados fracos é sempre a tirosina (Y), e nos severos, a fenilalanina (F). A troca da base A por T na posição 371 é que causa a mudança de aminoácidos. A base A na posição 371 e o aminoácido tirosina na 124 são responsáveis pela presença do epítipo do anticorpo monoclonal MCA-13, que reage especificamente com isolados severos do CTV existentes na Flórida. No presente trabalho, entretanto, foi demonstrado que o aminoácido presente na posição 124 da proteína do

capsídeo dos isolados de laranja Pera Ipiгуá, limão Galego, laranja Pera IAC e laranja Pera 135-CB clone CB3-104 é a fenilalanina, o mesmo observado no gene do capsídeo de isolados severos de várias partes do mundo. Já em CB3-22 o aminoácido presente na mesma posição é a tirosina. A presença do aminoácido fenilalanina na posição 124 do gene do capsídeo do isolado de laranja Pera IAC, considerado fraco e usado há muitos anos em proteção cruzada, poderia ser explicada pelo fato que este é um isolado que não causa caneluras e induz reação fraca quando indexado em limão Galego, mas induz “seedling yellows” e declínio em combinações de laranja doce em Azeda, o que não acontece com outros isolados fracos, principalmente os que ocorrem na Flórida (Lee *et al.*, 1995).

A presença do sítio da enzima de restrição *Hinf*I na sequência de nucleotídeos do gene da capa proteica dos isolados usados por Cevik (1995) foi verificada através de pesquisa em computador. Após a pesquisa, o autor fez uma comparação com os grupos de RFLP determinados por Gillings *et al.* (1993) através de digestão do gene da capa proteica de isolados do CTV com a mesma enzima. Dos clones utilizados por Cevik, sete apresentariam o mesmo padrão de restrição do grupo I de RFLP de Gillings se fossem digeridos com *Hinf*I. Neste grupo foram incluídos por Gillings *et al.* (1993) isolados do CTV que causam sintomas severos em limão Galego, reações variáveis em plântulas de limão Eureka e caneluras em laranja doce. Três clones apresentariam o mesmo padrão do grupo IV de RFLP, no qual foram incluídos os isolados fracos da Flórida, que não induzem caneluras ou “seedling yellows” em limão Galego, induzindo apenas reações fracas. Um clone apresentou padrão do grupo VI, agupando com isolados severos do vírus, indutores de “seedling yellows”.

A digestão do gene da capa proteica do isolado do CTV de laranja Pera Ipiгуá, limão Galego, laranja Pera IAC e laranja Pera 135-CB, clones CB 3-22 e CB 3-

104, com a enzima *HinfI* (Fig. 14) e a confirmação da presença do sítio da enzima através da análise da sequência de ácidos nucleicos assistida por computador, incluíram os isolados do vírus em estudo neste trabalho em três grupos diferentes. O gene do capsídeo dos isolados do CTV de laranja Pera Ipiгуá, limão Galego e laranja Pera IAC apresentaram tamanhos de fragmentos de restrição de 73, 171 e 428 pb (Tabela 3), que correspondem ao grupo V de Gillings. Neste grupo estão incluídos os isolados fracos da Austrália, usados para proteção cruzada de pomelo (Gillings *et al.* 1993). O gene da capa proteica do CTV presente no clone CB 3-22 apresentou o mesmo tamanho de fragmentos do grupo IV de RFLP de Gillings *et al.* (1993), onde foram agrupados os isolados que induzem sintomas fracos em plantas indicadoras, principalmente os da Flórida. Já o isolado do clone CB 3-104 apresentou fragmentos do mesmo tamanho dos do grupo VI de Gillings após digestão com *HinfI*. Neste grupo foram incluídas estirpes severas do CTV, causadoras de “seedling yellows” em limão Galego (Guillings *et al.*, 1993).

No dendrograma gerado (Fig. 21), os isolados de laranja Pera Ipiгуá, limão Galego e laranja Pera IAC formaram um grupo à parte. O isolado do clone CB3-22 formou um mesmo grupo com T-30 e B-274, isolados fracos da Flórida e Colômbia, respectivamente. O do clone CB3-104 agrupou com os isolados T-36, B-128, B-129, B-185 e B-227 de diferentes países, e considerados muito severos. O agrupamento obtido no dendrograma está perfeitamente de acordo com a classificação dos isolados nos grupos de RFLP de Guillings descrito no parágrafo anterior.

A digestão do gene da capa proteica do CTV com a enzima *KpnI* também mostrou diferenças no tamanho dos fragmentos obtidos (Fig. 15), podendo esta enzima ser usada para diferenciação de isolados do vírus. A presença do sítio de *EcoRI* no gene do capsídeo de laranja Pera 135-CB, clone CB 3-104, e

também em outros isolados do vírus da região de Capão Bonito, foi outro dado interessante. Até recentemente, o único isolado que possuía sítio desta enzima no gene da capa proteica era o B-129 da Colômbia, que causa caneluras em pomelo (Acosta *et al.*, 1994). Dentre alguns dos isolados usados nos trabalhos desenvolvidos por Cevik (1995), originários da Flórida, também foi detectado o sítio de *EcoRI* na sequência do gene da capa proteica de três clones, na posição 500, a mesma observada em CB 3-104 e em B-129.

Trabalhos de clonagem e sequenciamento do gene da capa protéica de 12 isolados do CTV realizados recentemente por Targon *et al.* (dados não publicados) mostraram que 9 de 12 isolados do vírus utilizados apresentavam o sítio de *EcoRI* na sequência de nucleotídeos do gene da capa proteica. Foi constatada, também, através de “PCR colony screening” e RFLP, uma mistura de isolados do vírus nas plantas utilizadas. Neste trabalho, o gene da capa protéica de isolados das laranjas Pera Ipiguá e Pera IAC foi novamente clonado e, ao contrário do que foi observado anteriormente, foi detectada uma mistura de isolados do CTV, sendo um deles possuidor do sítio de *EcoRI* na sequência de ácidos nucleicos. Como o material para realização deste trabalho foi coletado em outra época, aproximadamente dois anos após a coleta do material utilizado para a realização dos primeiros trabalhos, e também de outra planta, provavelmente os isolados do CTV presentes nas duas plantas eram diferentes.

De acordo com Cevik (1995), análises de RT/PCR a partir de dsRNAs isolados diretamente de plantas do campo originaram mais de um grupo de RFLP em uma mesma amostra, o que significa que, provavelmente, as plantas estavam infectadas com isolados únicos do CTV, cada um pertencendo a um grupo de RFLP. Para comprovar isto, isolados do vírus foram transmitidos de uma planta que produzia vários padrões de RFLP usando afídeos e, através deste procedimento, foi confirmada a hipótese da presença de mais de um isolado em

uma mesma planta. Três das plantas produziram RFLP do grupo VI após RT/PCR, uma produziu RFLP do grupo II e as restantes produziram misturas dos originais.

O uso dos primers internos para detecção e diferenciação de isolados do vírus através de RT-PCR demonstrou ser útil. A técnica de PCR é muito sensível, rápida e, no caso do CTV, pode auxiliar na seleção de isolados, principalmente os fracos, e com potencial para serem usados em trabalhos de proteção cruzada. Vale lembrar que o método empregado há algum tempo para seleção de isolados do CTV através de indexação biológica em plantas indicadoras é lento, caro, e algumas vezes está sujeito a variações ambientais. Visando acelerar o processo de detecção e também de seleção de diferentes isolados foram construídos cinco pares de “primers” internos (Tabela 5), baseado em diferenças de 1 a 2 bases existentes na sequência de ácidos nucleicos (sendo uma delas sempre na posição 3’), e que são específicos para diferenciar isolados fracos e severos.

As reações PCR foram feitas usando-se temperatura de anelamento alta, de 60°C, o que permite que somente regiões com alto nível de homologia sejam amplificadas. Na série de experimentos realizada, ficou demonstrado que a técnica é capaz de detectar a presença do vírus e também de determinar se o (os) isolado (s) presente (s) em uma planta infectada é fraco, severo, ou se ocorre uma mistura de ambos. Esta detecção e determinação do tipo de isolados do vírus presentes em uma mesma planta podem ser feitos em um única reação PCR usando os pares de primers adequados, que asseguram diferenças nos tamanhos dos produtos amplificados.

Em reações de amplificação com os “primers” internos com o cDNA do isolado de laranja Pera proveniente da região de Capão Bonito, ficou demonstrado que

o par de “primers” P9P10 amplificou um fragmento de 570 pb (Fig. 25, linha 5). O fato deste par de “primers”, desenhado para reconhecer isolados do CTV presentes em laranjas Pera da região de Cordeirópolis, ter amplificado um fragmento do tamanho esperado usando como molde cDNA de material de outra região, vem confirmar mais uma vez a existência de uma mistura de isolados do CTV em uma mesma planta. Um desses isolados deve apresentar uma maior homologia na sequência de ácidos nucleicos do gene da capa proteica com isolados do CTV presentes em laranjas Pera da região de Cordeirópolis.

Os “primers” P5P6 e P7P8, específicos de CB 3-104 e CB 3-22, respectivamente, quando usados em reações tendo como molde a 1ª fita de cDNA do isolado de laranja Pera-CB amplificaram fragmentos de tamanho esperado (Fig. 25, linhas 3 e 4). Ocorreu uma maior amplificação quando o par de primers P5P6 (específico de CB 3-104) foi usado (Fig. 25, linha 3). Comparando com o resultado obtido nos trabalhos de hibridização, onde ficou demonstrado que a concentração de CB 3-104 em laranja Pera 135-CB é maior que a de CB 3-22 (Fig. 17 B), pode-se inferir que a maior concentração dos produtos obtidos nessa reação tenha sido devida à maior concentração do molde na amostra, no caso, um isolado do CTV semelhante ao de CB 3-104. Deste modo, o uso de “primers” internos específicos poderia possibilitar a quantificação de isolados do CTV em plantas onde ocorre infecção mista.

Dois “primers” internos, construídos baseado na diferença de um único nucleotídeo, o que determina o epitopo do anticorpo monoclonal MCA-13, foram usados por Cevik (1995) e Cevik *et al.* (1995) para diferenciação de isolados do CTV através de RT-PCR. Um desses “primers” era específico de isolados fracos, e o outro, de isolados severos. Cevik (1995) apontou algumas vantagens de BD/RT/PCR sobre técnicas imunológicas empregadas usando-se o anticorpo MCA-13 na diferenciação de isolados do CTV. Dentre elas, podem

ser citadas: 1. em uma única reação é possível determinar se o vírus está presente em uma planta e se o isolado é fraco, severo, ou se os dois estão presentes; 2. a sensibilidade da técnica é muito maior que a dos outros métodos utilizados para diferenciação de isolados. O autor constatou que algumas plantas que não reagiram com o MCA-13 em ELISA devido ao baixo título do vírus, não detectável pela técnica, quando usadas em RT/PCR amplificaram fragmentos do gene da capa proteica do CTV que variaram em tamanho de acordo com o “primer” e isolado usados. Mathews *et al.* (1997) também compararam as técnicas de RT/PCR e ELISA na detecção do CTV e chegaram à mesma conclusão de Cevik (1995).

Como aplicação prática, RT/PCR usando “primers” específicos pode ser usada na detecção de misturas de isolados do CTV em uma mesma planta, fornecendo dados sobre o mecanismo e a cinética de isolados do vírus no processo de proteção cruzada e também na rápida identificação de isolados fracos para serem usados no processo (Cevik, 1995). Uma outra aplicação é na seleção de plântulas em que foram inoculados isolados fracos do vírus para proteção cruzada, em programas de certificação, para assegurar a presença desse isolado e a ausência dos severos, antes da distribuição do material (Cevik, 1995).

6. Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir:

- através de “Western blot” foi constatado que a multiplicação de isolados do CTV variou de acordo com o isolado e com a espécie / variedade de citros utilizados. A concentração do isolado de laranja Pera IAC foi maior que o de laranja Barão B em todas as espécies / variedades utilizadas.
- a clonagem do gene da capa proteica do CTV em vetores de expressão permitiu que grandes quantidades de proteína do capsídeo do CTV fossem obtidas em *E. coli*, sendo essa proteína pura e livre de contaminantes da planta.
- anticorpos policlonais produzidos contra a proteína expressa em *E. coli* reagiram especificamente com a proteína do capsídeo do CTV e não apresentaram reação cruzada com proteínas da planta.
- a concentração e o padrão do dsRNA do CTV em tecidos de plantas infectadas variaram de acordo com a espécie / variedade de citros utilizada.
- o emprego de RT-PCR com “primers” específicos para amplificar o gene da capa proteica mostrou-se adequado, tendo ocorrido a amplificação em todos os isolados utilizados.
- as análises de RFLP com as enzimas *EcoRI*, *HinfI* e *KpnI* demonstraram a ocorrência simultânea de pelo menos dois isolados do CTV em plantas provenientes da região de Capão Bonito.

- através dos dados do sequenciamento, foi demonstrado que a homologia na sequência de ácidos nucleicos do gene da capa protéica dos isolados utilizados variou de 91,2 a 100%, e a de aminoácidos da proteína do capsídeo, de 93,7 a 99,1%.
- devido a diferenças de 59 nucleotídeos no gene do capsídeo, os isolados que ocorrem simultaneamente em laranja Pera 135-CB, CB3-22 e CB3-104, possuem 11 aminoácidos diferentes na proteína do capsídeo.
- no dendrograma gerado os isolados de laranja Pera Ipiguá, limão Galego e laranja Pera IAC formaram um grupo à parte dos outros usados para comparação. Os isolados de laranja Pera 135-CB, clones CB3-22 e CB3-104, agruparam com isolados fracos e severos de diversas partes do mundo, respectivamente.
- a utilização de “primers” internos específicos em reações PCR mostrou-se extremamente adequada para detecção e também diferenciação de isolados do CTV.

7. Resumo

A multiplicação de um isolado fraco do CTV, presente na laranja Pera IAC, e um severo, presente na laranja Barão B, foi avaliada através de “Western blot” usando anticorpos policlonais produzidos contra a proteína do capsídeo do vírus. A avaliação foi feita após 10, 15, 20, 30, 60 e 90 dias da inoculação por enxertia em diferentes espécies/ variedades de citros. O isolado fraco multiplicou-se mais intensamente que o isolado severo em todas as amostras avaliadas. As primeiras detecções do isolado fraco do CTV nos tecidos das amostras em estudo ocorreram aos 15 dias após a inoculação, principalmente em limão Galego e laranja Pera, mais susceptíveis ao vírus. Para a detecção do isolado severo o tempo mínimo necessário foi de 20 dias, sendo que na tangerina Poncan, normalmente mais tolerante à tristeza, o vírus se multiplicou em taxas menores e só foi detectado a partir dos 30 dias da inoculação.

O RNA dupla fita (dsRNA), correspondendo à forma replicativa do RNA simples fita (ssRNA) do CTV foi isolado de tecido infectado de diferentes espécies/variedades de citros. O dsRNA foi usado como molde para a síntese da 1ª fita de cDNA e o gene da capa protéica foi amplificado por PCR. Ocorreu a amplificação de um fragmento de aproximadamente 670 pb em todas as amostras utilizadas. O gene da capa protéica do isolado de laranja Pera Ipiguá foi clonado em vetor de expressão e a proteína do capsídeo foi expressa em *E. coli*, sendo obtido um rendimento de 25 µg de proteína por ml de cultura. Essa proteína foi usada como antígeno na produção de anticorpos policlonais. Os anticorpos obtidos reagiram especificamente com a proteína do capsídeo do CTV de isolados fracos e severos. Dois clones do gene da capa protéica do isolado severo do CTV presente na laranja Pera 135-CB também foram clonados em vetor de expressão e a proteína expressa em *E. coli* foi utilizada na produção de anticorpos monoclonais.

Análises de RFLP do gene da capa proteica de isolados do CTV com as enzimas de restrição *EcoRI*, *HinfI* e *KpnI* demonstraram a existência de diferenças na sequência de nucleotídeos. O sítio de *EcoRI* não foi detectado no gene da capa proteica dos isolados de laranja Pera Ipiruá, limão Galego e laranja Pera IAC. Nas amostras provenientes de Capão Bonito, a digestão com a mesma enzima indicou a presença simultânea de pelo menos dois isolados do CTV nas mesmas plantas. A digestão com *HinfI* também mostrou diferenças e permitiu o agrupamento dos isolados de acordo com os grupos de RFLP estabelecidos por Gillings *et al.* (1993). A digestão com a enzima *KpnI* também gerou polimorfismos. A hibridação do dsRNA isolado de laranja Pera 135-CB com o cDNA de CB 3-22 e CB 3-104 confirmou a presença simultânea dos dois isolados do CTV na mesma planta, e indicou que a concentração de CB 3-104 é maior que a de CB 3-22.

O sequenciamento mostrou que o gene da capa proteica do isolado de laranja Pera Ipiruá e limão Galego são 100% homólogos, diferindo em dois nucleotídeos do de laranja Pera IAC. Essas diferenças ocasionaram a troca de dois aminoácidos na proteína do capsídeo do isolado de laranja Pera IAC: serina para glicina, e treonina para asparagina, nas posições 18 e 143, respectivamente. A análise da sequência de nucleotídeos do gene da capa proteica dos isolados de laranja Pera 135-CB, clones CB 3-22 e CB 3-104, mostrou que existem 59 bases diferentes entre eles, o que corresponde a 91,2% de homologia. Como consequência, as proteínas do capsídeo desses dois isolados diferem em 11 aminoácidos. A comparação dos dados de sequenciamento desses isolados com os outros utilizados mostrou que existe uma homologia na sequência da ordem de 91,2 a 92,9%. O dendrograma gerado mostrou que os isolados de laranja Pera Ipiruá, limão Galego e laranja Pera IAC formaram um grupo separado, quando comparados com outros isolados de várias partes do mundo. Já os isolados de laranja Pera 135-CB, CB 3-22 e CB 3-104, agruparam com isolados fracos e severos, respectivamente. Baseado nas diferenças existentes na sequência de

nucleotídeos, foram construídos primers internos isolado-específicos para serem usados em PCR. Estes primers mostraram-se adequados para o diagnóstico rápido e seguro da doença, tanto na detecção do vírus, quanto na identificação dos isolados.

8. Summary

The multiplication of a mild (Pera IAC) and a severe (Barão B) CTV isolates was evaluated by Western blot using polyclonal antiserum raised against the CTV coat protein. The evaluation was done 10, 15, 20, 30, 60 and 90 days after graft inoculation in different species/varieties of citrus. The mild isolate multiplied more than the severe one in the tissues of all samples evaluated. The first detection of the CTV mild isolate in the tissues of the samples studied occurred 15 days after the inoculation, mainly in Galego lime and Pera orange, more susceptible to the virus. The detection of the severe isolate occurred 20 days after inoculation. In Poncan mandarin, usually more tolerant to tristeza, the virus multiplied in lower rates and was detected only 30 days after inoculation.

Double stranded RNA (dsRNA), corresponding to the CTV single stranded RNA (ssRNA) replicative form was isolated from infected tissue of different isolates. The ds RNA was used as a template for the first strand cDNA synthesis and the coat protein gene was amplified by PCR. It was amplified a 670 bp fragment in all samples used in the work. CTV coat protein gene from Pera Ipiqua orange was cloned into expression vector and the coat protein was expressed in *E. coli*. The yield of protein obtained was 25 µg per ml of culture. This protein was used as an antigen to produce polyclonal antiserum. The antiserum obtained reacted specifically with the CTV coat protein from mild and severe CTV isolates. Two clones of the coat protein gene from Pera 135-CB severe isolate were also cloned into expression vector and the expressed protein was used to produce monoclonal antiserum.

RFLP analysis of coat protein gene from CTV isolates using *EcoRI*, *HinfI* and *KpnI* restriction enzymes indicated that there are differences in the nucleotide sequence. The *EcoRI* site was not detected in the coat protein gene of Pera Ipiqua

orange, Galego lime and Pera IAC orange isolates. The digestion of the CTV coat protein gene from Capão Bonito isolates with the same enzyme indicated the simultaneous presence of at least two isolates in the same plants. The digestion with *HinfI* also showed differences and allowed to group the CTV isolates according to the RFLP groups established by Gillings *et al.* (1993). The digestion with *KpnI* enzyme also generated polymorphisms. The hybridization of CTV dsRNA isolated from Pera 135-CB with cDNA from CB 3-22 and CB 3-104 confirmed the simultaneous presence of the two isolates in the same plant, and indicated that the concentration of CB3-104 is higher than the one of CB3-22.

The sequencing showed that the coat protein gene from Pera Ipiqua orange and Galego lime isolates are 100% homologous and they differed from Pera IAC isolate in two nucleotides. The differences changed two aminoacids in the coat protein of Pera IAC isolate: serine to glycine and treonine to asparagine, at the positions 18 and 143, respectively. The analysis of the coat protein gene nucleotide sequence of Pera 135-CB isolate, clones CB 3-22 and CB 3-104, showed that there are 59 bases different between them, which corresponds to 91.2% of homology. Due to the differences the coat protein of the two isolates differed in 11 aminoacids. The comparison of the sequencing data of these isolates with the others studied showed that the homology at the nucleotide sequence is from 91.2 to 92.9%. The dendrogram generated showed that the isolates presents in Pera Ipiqua orange, Galego lime and Pera IAC orange formed a separated group when compared to the others isolates from different countries. The Pera 135-CB isolates, CB 3-22 and CB 3-104, grouped with mild and severe isolates, respectively. Based on the differences observed at the nucleotide sequence, it was constructed internal primers isolate-specific to use in PCR. These primers showed extremely adequate for the quick and safe diagnosis of the disease, in the detection of the virus and also in the identification of isolates.

9. Referências Bibliográficas

- Acosta, O., Alegria, A., Guzman, M., Lee, R.F., Niblett, C.L., Peñaranda, J. (1994).** El virus de la Tristeza de los citricos: una amenaza para la citricultura Colombiana. Evidencias epidemiológicas y moleculares. In Lecturas seleccionadas sobre Biología Molecular de virus. Editorial científica.
- Agranovsky, A. A., Koonin, E. V., Boyko, V. P., Maiss, E., Frotschi, R., Lunina, N. A., Atabekov, J. G. (1994).** Beet yellows closterovirus: Complete genome structure and identification of a leader papain-like thiol protease. *Virology* 198: 311-324.
- Agranovsky, A., Lesemann, D. E., Maiss, E., Hull, R. and Atabekov, J. G. (1995).** "Rattlesnake" structure of a filamentous plant RNA virus built of two capsid proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 2470-2493.
- Baptista, C. R., Vega J., Stach-Machado D. R., Targon, M. L. P. N., Machado, M. A., Müller G. W. (1996).** Método simplificado de purificação do vírus da tristeza dos citros e obtenção de anti-soro de alta especificidade. *Summa Phytopathologica*, 22, n° 3/4: 234-238.
- Bar-Joseph, M., Loebstein, G., Cohen, J. (1970).** Partial purification of virus-like particles associated with the citrus tristeza disease. *Phytopathology* 60: 75-78.
- Bar-Joseph, M., Loebenstein, G., Cohen, J. (1972).** Further purification and characterization of particles associated with citrus tristeza disease. *Virology* 50: 821-828.

- Bar-Joseph, M., Loebenstein, G. (1973).** Effects on strain, source plant and temperature on the transmissibility of citrus tristeza virus by the melon aphid. *Phytopathology* 63: 716-720.
- Bar-Joseph, M., Loebenstein, G., Cohen, J. (1976).** Comparison of particle characteristics and cytopathology of citrus tristeza virus and other morphologically similar viruses. *Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*, 7th, 39-46.
- Bar-Joseph, M., Garnsey, S. M., Gonçalves, D. (1979).** The closteroviruses: a distinct group of elongated plant virus. *Adv. Virus Res.* 25:93-168.
- Bar-Joseph, M., Rosner, A., Moskovitz, M., Hull, R. (1983).** A simple procedure for the extraction of double-stranded RNA from viral infected plants. *J. Virol. Methods* 6: 1-8.
- Bar-Joseph, M., Marcus, R., Lee, R. F. (1989).** The continuous challenge of citrus Tristeza virus control. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27: 291-316.
- Bennett, C. W., Costa, A. S. (1949).** Tristeza disease of citrus. *Journal of Agricultural Research* vol. 78, n. 8: 207-237.
- Bertelli, J. C. & Bertelli, L. K. de. (1944).** Podredumbre de las raicillas de los citros. *Uruguay Min. de Ganad y Agr., Lab de Fisiol. y Patol. Veg.* 71: 23.
- Bitancourt, A. A. (1940).** A doença dos citros no Vale do Paraíba. *O Biológico* 6: 268-269.

- Bitancourt, A. A. (1944).** Um teste para identificação precoce da tristeza dos citros. *O Biológico* 10: 169-175.
- Brlansky, R. H., Garnsey, S. M., Lee, R. F., Purcifull, D. E. (1984).** Application of the citrus tristeza virus antisera in labeled antibody, immuno-electron microscopical, and sodium dodecyl sulfate-immunodiffusion tests. *Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virol.* 9th, 337-342.
- Brlansky, R. H. (1987).** Inclusion bodies produced in *Citrus* spp. by citrus tristeza virus. *Phytophylactica* 19: 211-213.
- Brlansky, R. H., Lee, R. F., Garnsey, S. M. (1988).** In situ immunofluorescence for detection of citrus tristeza virus inclusion bodies. *Plant Disease* 72: 1039-1041.
- Brlansky, R. H., and Lee, R. F. (1990).** Numbers of inclusion bodies produced by mild and severe strains of citrus Tristeza virus. *Plant Disease* 74: 297-299.
- Calvert, L. A. (1987).** Complementary DNA cloning and partial molecular characterization of citrus tristeza and citrus variegation viruses. PhD thesis. Univ. Fla., Gainesville. 60 pp.
- Cambra, M., Serra, J., Villalba, D., Moreno P. (1988).** Present situation of the citrus tristeza virus in the Valencian community. *Proc. Conf. Intl. Org. Citrus Virol.*, 10th, 1-7.

- Carrera, C. (1933).** Informe preliminar sobre una enfermedad aparecida en los citrus de Bella Vista (Corrientes). Argentina Min. de Agr. Bol. Mens. 34: 275-280.
- Carrera, C. (1935).** Informe de las observaciones y experimentaciones efectuadas sobre una nueva enfermedad aparecida en los citrus de Bella Vista (Corrientes). Argentina Min. de Agr. Bol. 37: 15-37.
- Cevik, B. (1995).** Molecular differentiation of strains of citrus tristeza virus using the coat protein gene sequences. Master Thesis - Graduate school of the University of Florida - University of Florida, 111 pp.
- Cevik, B., Pappu, S. S., Bensher, D., Lee, R. F., Garnsey, S. M., Irey, M., Niblett, C. L. (1995).** Application of bi-directional PCR to citrus tristeza virus: detection and strain differentiation. Proc. Conf. Intl. Org. Citrus Virol., 13th. In Press.
- Costa, A. S., Grant, T. J., Moreira, S. (1949).** Investigações sobre a tristeza dos citros. Bragantia 9: 59-80.
- Costa, A. S., Grant, T. J. (1951).** Studies on transmission of the tristeza virus by the vector *Aphis citricidus*. Phytopathology 41: 105-113.
- Costa A.S., Müller G.W., Costa C.L. (1968).** Rearing of Tristeza vector *Toxoptera citricidus* on squash. Proc. Conf. Int. Org. Citrus Virol., 10th, 32-35.
- Dodds, J. A., Bar-Joseph, M. (1983).** Double-stranded RNA from plants infected with closteroviruses. Phytopathology 73:419-423.

- Dodds, J. A., Jordan, R. L., Heick, J. A., Tamaki, S. J. (1983).** Double-stranded RNA of the diagnosis of citrus and avocado viruses. Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virol., 9th, 330-336.
- Dodds, J. A., Morris, T. J., Jordan, R. J. (1984).** Plant viral double-stranded RNA. Annu. Rev. of Phytopathology 22: 151-168.
- Dodds, J. A., Jarupat, T., Lee, J. G., Roistacher C. N. (1987 a).** Effects of strain, host, time of harvest and virus concentration on double- stranded RNA analysis of citrus tristeza virus. Phytopathology 77: 442-447.
- Dodds, J. A., Jarupat, T., Roistacher, C. N., Lee, J. G. (1987 b).** Detection of strain specific double-stranded RNAs in citrus species infected with citrus tristeza virus : a review. Phytophylactica 19: 131-137.
- Dolja, V. V., Karasev, A. V., Koonin, E. V. (1994).** Molecular biology and evolution of closteroviruses: sophisticated build-up of large RNA genomes. Annu. Rev. Phytopathol. 32:261-285.
- Drake, J. W. (1993).** Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4171-4175.
- Fawcett, H. S. & Wallace, J. M. (1946).** Evidence of the virus nature of citrus quick decline. Calif. Citrog. 32: 50, 88-89.
- Febres, V. J., Pappu, H. R., Anderson, E. J., Pappu, S. S., Lee, R. F., and Niblett, C. L. (1994).** The diverged copy of the citrus tristeza virus coat protein is expressed *in vivo*. Virology 201: 178-181.

- Febres, V. J., Pappu, S. S., Rubio, L., Aylon, M. A., Moreno, P., Guerri, J., Lee, R. F., Niblett, C. L. (1995).** Single stranded conformational polymorphism enables the differentiation of citrus Tristeza closterovirus strains. *Phytopathology* 85: 1210.
- 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* vol. 86, n. 12, 1331-1335.
- Garnsey, S. M., Gonsalves, D., Purcilull, D. E. (1979).** Rapid diagnosis of citrus tristeza virus infection by SDS immunodiffusion procedures. *Phytopathology* 69: 88-95.
- Garnsey, S. M., Christie, R. G., Derrick, K. S., Bar-Joseph, M. (1980).** Detection of citrus tristeza virus. II. Light and electron microscopy of inclusions and viral particles. *Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*, 8th, 9-16.
- Garnsey, S. M., Civerolo, E. L., Gumpf, D. J., Yokomi, R. K., Lee, R. F. (1991).** Development of a worldwide collection of citrus tristeza virus isolates. *Proc. Conf. Intl. Org. Citrus Virol.*, 11th, 113-120
- Garnsey, S. M., Cambra, M. (1992).** Serological diversity among CTV isolates and its effects on diagnosis. In *Citrus tristeza virus and *Toxoptera citricidus* in Central America: Development of management strategies and use of biotechnology for control.* Maracay, Venezuela, pp. 114-116.

- Garnsey, S. M., Permar, T. A., Cambra, M., Henderdon, C. T. (1993).** Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virol. 12th, 39-50.
- Gillings, M., Broadbent, P., Indsto, J., Lee, F. (1993).** Characterization of isolates and strains of citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods 44: 305-317.
- Grant, T.J., Costa, A.S. (1948).** A progress report on studies of tristeza disease of citrus in Brazil. Proc. Fla. State Hort. Soc., 1-14.
- Grant, T. J., Costa, A. S., Moreira, S. (1951).** Tristeza disease of citros in Brazil - other citrus diseases may be variation of spectacular tristeza or quick decline. Citrus leaves 31: 8-10, 36-37.
- Guerri, J., Moreno, M., Lee, R.F. (1990).** Identification of citrus tristeza virus strains by peptide maps of virion coat protein. Phytopathology 80: 692-698.
- Grosser, J. W., Gmitter, F. G. (1990).** Protoplast fusion and citrus improvement. Plant Breed. Rev. 8: 339-374.
- Grosser, J. W., Gmitter, F. G., Sesto, F., Chandler, J. L. (1992).** Six new somatic citrus hybrids and their potential for cultivar improvement. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117: 169-173.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166:557-580.

- 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.
- Hillman, B. I., Carrington, J. C. and Morris, T. J. (1987).** A defective interfering RNA that contains a mosaic of a plant virus genome. *Cell* 51: 427-433.
- Holland, J. J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S., van de Pol, S. (1982).** Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215: 1577-1585.
- Huang, A. S., Baltimore, D. (1970).** Defective viral particles and viral disease processes. *Nature* 226: 325-327.
- Karasev, A. V., Nikolaeva, O. V., Koonin, E. V., Gumpf, D. J., Garnsey, S. M. (1994).** Screening of the closterovirus genome by degenerate primer-mediated polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* 75: 1415-1422.
- 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.
- Kitajima, E. W. (1963).** Thread-like particles associated with tristeza disease of citrus. *Nature* 201:1011-1012.
- Kitajima, E. W., Silva, D. M., Oliveira, A. R., Müller, G. W., Costa, A. S. (1965).** Electron microscopical investigations of tristeza. *Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*, 3rd, 1-9.

- Kitajima, E. W., Costa, A. S. (1968).** Electron microscopy of the Tristeza virus in citrus leaf tissues. Proc. Conf. Int. Org. Citrus Virol., 4th, 59-64.
- Lee, R. F., Timmer, L. W., Purcifull, D. E., Garnsey, S. M. (1981).** Comparison of radioimmunosorbent assay and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of rickettsia-like bacteria and citrus tristeza virus. *Phytopathology* 71: 889.
- Lee, R. F. (1984).** Use of double-stranded RNAs to diagnose citrus tristeza virus strains. Proc. Fla. State Hortic. Soc. 97: 53-56.
- Lee, R. F., Calvert, L. A., (1987).** Polypeptide mapping of citrus tristeza virus strains. *Phytophylactica* 19: 205-210.
- Lee, R. F., Garnsey, S. M., Brlansky, R. H., Goheen, A. C. (1987).** A purification procedure for enhancement of citrus tristeza virus yields and its application to other phloem-limited viruses. *Phytopathology* 77: 543-549.
- Lee, R. F., Calvert, L. A., Nagel, J., Hubbard, J. D. (1988).** Citrus Tristeza Virus: characterization of coat proteins. *Phytopathology* 78: 1221-1226.
- Lee, R. F., Rocha-Peña, M. A. (1992).** Citrus Tristeza virus. Pages 226-249 in: *Plant diseases of international importance III*. A. N. Mukhapadhyay, H. S. Chaube, J. Kumar and U. S. Singh, eds. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.

- Lee, R. F., Derrick, K. S., Niblett, C. L., Pappu, H. R. (1995).** When to use mild strain cross protection (MSCP) and problems encountered. Pages 158-161 in Proceedings of the third International workshop citrus tristeza virus and the brown citrus aphid in the Caribbean Basin: Management Strategies. Lake Alfred - Florida. May 15-18-1995. R.F.Lee, M.Rocha-Pena, C.L.Niblett, S.M.Garnsey, R.K.Yokomi, R.Lastra eds. University of Florida.
- Li, X. H., Heaton, L. A., Morris, T. J., Simon, A. E. (1989).** Turnip crinkle virus defective interfering RNAs intensify viral symptoms and are generated *de novo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9173-9177.
- Manjunath, K. L., Pappu, H. R., Lee, R. F., Niblett, C. L., Civerolo, E. (1994).** Studies on the protein genes of four Indian isolates of citrus tristeza closterovirus: cloning, sequencing and expression. Proc. Intl. Organ. Citrus Virol. 12th, 20-27.
- Mathews, D.M., Riley, K., Dodds, J.A. (1997).** Comparison of detection methods for citrus tristeza virus in field trees during months of nonoptimal titer. Plant Disease, 81, 5: 525-529.
- Mawassi, M., Karasev, A. V., Mietkiewska, E., Gafny, R., Lee, R. F., Dawson, W. O., Bar-Joseph, M. (1995 a).** Defective RNA molecules associated with citrus tristeza virus. Virology 208: 383-387.
- 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. (1995 b).** Multiple species of defective RNAs in plants infected with citrus tristeza virus. Virology 214: 264-268.

- 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.
- McAlpin, D. M., Parsay, P. S., Roberts, R., Hope, H. R. (1948).** Bud-union decline disease in citrus trees. *Victoria Depto. Agr. Jour.* 46:25-31.
- McClellan, A. P. D. (1974).** The tristeza virus complex. *Proc. Conf. Int. Org. Citrus Virol.*, 6th, 59-66.
- McClellan, A. P. D. (1975).** Tristeza virus complex: its transmission by aphid *Toxoptera citricidus*. *Phytophylactica* 7: 109-114.
- Meneguine, M. (1946).** Sobre la naturaleza y transmissibilidad da doencia "Tristeza" de los citros. *O Biológico* 12: 285-287.
- Moore, G. A. (1995).** Genetic transformation of Citrus. In *Proc. Third International Workshop on citrus tristeza virus and the brown citrus aphid in the Caribbean Basin: Management Strategies*. R. Lee et al, Eds. Univ. Florida, Lake Alfred, pp.92-95.
- Moreira, S., Costa, A. S., Grant, T. J. (1949).** Conhecimentos atuais sobre a Tristeza dos citrus. *Revista da Agricultura*, XXIV, n. 11-12: 335-345.
- Moreno P., Guerri J., Munhoz N. (1990).** Identification of Spanish strains of citrus tristeza virus (CTV) by analysis of double-stranded RNAs (dsRNA). *Phytopathology* 80:477-482.

- Moreno, P., Guerri, J. (1992).** Progress on CTV strain differentiation: peptide map and double-stranded (dsRNA) analysis. In *Citrus tristeza virus and Toxoptera citricidus* in Central America: Development of management strategies and use of biotechnology for control. Maracay, Venezuela, pp. 117-119.
- Müller, G. W., Rodriguez, O., Costa, A. S. (1968 a).** A tristeza virus complex severe to sweet orange varieties. *Proc. Int. Org. Citrus Virol.*, 4th, 64-71.
- Müller, G. W., Costa, A. S., Alcover, M. (1968 b).** Obtenção de variedades de laranja doce tolerantes à tristeza de Capão Bonito. *Rev. Soc. Bras. Fitopat.* 2: 33-45.
- Müller, G. W., Costa, A. S. (1972).** Reduction in the yield of Galego lime avoided by preimmunization with mild strains of the tristeza virus. *Proc. Conf. Int. Org. Citrus Virol.*, 5th, 171-175.
- Müller, G. W., Costa, A. S., Kitajima, E. W., Camargo, I. J. B. (1974).** Additional evidence that tristeza virus multiplies in *Passiflora* spp. *Proc. Int. Org. Citrus Virol.*, 6th, 75-78.
- Müller, G. W. (1976).** A Tristeza dos citros. *Summa Phytopathologica* 2: 245-263.
- Müller, G.W., Costa, A.S. (1977).** Tristeza control in Brazil by preimmunization with mild strains. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 3:868-872.
- Müller, G.W. (1980).** Use o mild strains of citrus tristeza virus (CTV) to reestablish commercial production of “Pera” sweet orange in Sao Paulo, Brazil. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.* 93: 62-64.

- 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). Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virol., 9th, 33-40.
- Müller, G. W., Costa, A. S., Castro, J. L., Guirado, N. (1988).** Results from preimmunization tests to control the Capão Bonito strain of Tristeza. Proc. Conf. Int. Org. Citrus Virol., 10th, 82-85.
- Müller, G.W., Costa A.S. (1993).** Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. pp 55-84. Ed. Rosseti V., Müller G. W., Costa A. S. Fundação Cargill - Campinas - SP
- Navarro, L., Juarez, J., Pina, J. A., Ballester-Olmos, J. F., Arregui, J. M. (1988).** The citrus variety improvement program in Spain (CVIPS) after eleven years. Proc. Conf. Int. Org. Citrus Virol., 10th, 400-406.
- Navas-Castillo, J., Albiach-Martí, M. R., Gowda, S., Hilf, M. E., Garnsey, S. M., Dawson, W. O. (1997).** Kinetics of accumulation of citrus tristeza virus RNAs. Virology 228: 92-97.
- Niblett, C. L., Pappu, H. R., Lee, R. F. (1992).** Progress on CTV strains differentiation: nucleic acid probes and polymerase chain reaction. In Citrus tristeza virus and *Toxoptera citricidus* in Central America: Development of managements strategies and use of biotechnology for control, pp. 120-123. Maracay, Venezuela.
- Niblett, C. L., Pappu, H. R., Pappu, S. S., Febres, V. J., Manjunath, K. L., Lee, R. F., Grosser, J. W., Schell, J. (1993).** Progress on the characterization and control of citrus tristeza virus. Proc. Fla. State Soc. 106:99-102.

- Nikolaeva, O. V., Karasev, A. V., Gumpf, D. J., Lee, R. F., Garnsey, S. M. (1995).** Production of polyclonal antisera to the coat protein of citrus tristeza virus expressed in *Escherichia coli*: application for immunodiagnosis. *Phytopathology* 85: 691-694.
- Nikolaeva, O., Karasev, A. V., Powell, C. A., Gumpf, D. J., Garnsey, S. M., Lee, R. F. (1996).** Mapping epitopes for citrus tristeza virus-specific monoclonal antibodies using bacterially expressed coat protein fragments. *Phytopathology* 86, 9: 974-979.
- Oberholzer, P. C. J. (1947).** The Bitter-Seville rootstock problem. *Farming in South Africa* 22: 489-495.
- Pappu, H. R., Manjunath, K. L., Lee, R. F., Niblett, C. L. (1993 a).** Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 90:3641-3644.
- Pappu H. R., Pappu S., Niblett C., Lee R. F., Civerolo E. (1993 b).** Comparative sequence analysis of the coat proteins of biologically distinct citrus Tristeza closterovirus isolates. *Virus Genes* 7:255-264.
- 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 a).** Nucleotide Sequence and Organization of Eight 3' Open Reading Frames of the citrus tristeza closteroviruses genome. *Virology* 199:35-46.

Pappu, H. R., Pappu, S. S., Lee, R. F., Garnsey, S. M., Cambra, M., Moreno P., Niblett, C. L. (1994 b). The molecular basis for the antigenic diversity of citrus tristeza virus: implications for virus detection. Proc. Fla. State Hort. Soc. 107: 8-12.

Pappu, H. R., Pappu, S. S., Kano, T., Koizumi, M., Cambra, M., Moreno., P., Su, H. J., Garnsey, S. M., Lee, R. F., Niblett, C. L. (1995). Mutagenic analysis and localization of a highly conserved epitope near the amino terminal end of the citrus tristeza closterovirus capsid protein. Phytopathology 85: 1311-1315.

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 Research, in press.

Permar, T. A., Garnsey, S. M., Gumpf, D. J., Lee, R. F. (1988). A monoclonal antibody which discriminates strains of citrus tristeza virus. Phytopathology 78: 1558.

Permar, T. A., Garnsey, S. M., Gumpf, D. J., Lee, R. F. (1990). A monoclonal antibody which discriminates strains of citrus tristeza virus. Phytopathology 80: 224-228.

Powell, C. A. (1992). Progress on CTV strain differentiation: Serological methods. In Citrus tristeza virus and *Toxoptera citricidus* in Central America: Development of managements strategies and use of biotechnology for control, pp. 111-113. Maracay, Venezuela.

- Price, M., Schell, J., Grosser, J., Pappu, S. S., Pappu, H. R., Febres, V. Manjunath, K. L., Niblett, C. L., Derrick, K. S., Lee, R. F. (1996).** Replication of citrus tristeza closterovirus in citrus protoplasts. *Phytopathology* 86, 8: 830-833.
- Raccah, B., Loebenstein, G., Bar-Joseph, M. (1976 a).** Transmission of Tristeza virus by the melon aphid. *Phytopathology* 66: 1102-1104.
- Raccah, B., Loebenstein, G., Bar-Joseph, M., Oren, Y. (1976 b).** Transmission of Tristeza by the aphids prevalent on citrus and operation of the Tristeza supression program in Israel. *Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*, 7th, 47-49.
- Retuerma, M. L., Price, W. C. (1972).** Evidence that tristeza is stylet borne. *FAO Plant Prot. Bull.* 20: 111-114.
- Rocha-Peña, M. A., Lee, R. F., Lastra, R., Niblett, C. L., Ochoa-Corona, F., Garnsey, S. M., Yokomi, R. K. (1995).** Citrus Tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricidus* - Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease* 79-5: 437-445.
- Roistacher C. N. (1976).** Detection of citrus viruses by graft transmission: a review. *Proc. Conf. Int. Org. Citrus Virol.*, 7th, 175-184.
- Roistacher C.N., Moreno P. (1991).** The woldwide threat from destructive isolates of citrus Tristeza virus. A review. *Proc. Conf. Int. Org. Citrus Virol.*, 11th, 7-19.

- Rosner, A., Ginzburg, I., Bar-Joseph, M. (1983).** Molecular cloning of complementary DNA sequences of citrus tristeza virus. *J. Gen. Virol.* 64: 1757-1763.
- Sambrock, J., Fritsh, J., Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Schell, J. (1991).** Genetic transformation of citrus protoplast by PEG-mediated direct DNA uptake and the regeneration of putative transgenic plants. MSc. thesis. University of Florida, Gainesville.
- Schneider, H., Bitancourt, A. A., Rosseti, V. (1947).** Similarities in the pathological anatomy of quick-decline and tristeza-diseased orange trees. *Phytopathology* 37: 845-846.
- Schneider, H. (1959).** The anatomy of tristeza-virus-infected citrus. In *Citrus virus disease*, ed. J. M. Wallace. Berkeley, CA: Univ. Calif. Press. pp 73-84.
- Sekiya, M. E., Lawrence, S. D., McCaffery, M., Cline, K. (1991).** Molecular cloning and nucleotide sequencing of the coat protein gene of citrus tristeza virus. *J. Gen. Virol.* 72:1013-1020.
- Silva, D. M., Oliveira, A. R., Kitajima, E. W. (1965).** Partial purification of Tristeza virus. *Proc. Conf. Int. Org. Citrus Virol.*, 3rd, 10-13.
- Simon, A. E. and Bujarski, J. J. (1994).** RNA-RNA recombination and evolution in virus infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32-337-362.

- Toxopeus H. J. (1937).** Stock-scion incompatibility in citrus and its cause. Jour. Pomol. and Hort. Sci. 14: 360-364.
- Tsuchizaki, T., Sasaki, A., Saito, Y. (1978).** Purification of citrus tristeza virus from diseased fruits and the detection of the virus in citrus by fluorescent antibody techniques. Phytopathology 68: 139-142.
- Valverde, R. A., Dodds, J. A., Heick, J. A. (1986).** Double-stranded ribonucleic acid from plants infected with virusis having elongated particles and undivided genomes. Phytopathology 76:459- 465.
- Valverde, R. A., Nameth, S. T., Jordan, R. L. (1990).** Analysis of double strand RNA for plant virus diagnosis. Plant Disease 71:255-258.
- Vela, C., Cambra, M., Cortes, E., Moreno, P., Miguet, G. J., Perz de San Roman, C., Sanz, A. (1986).** Production and characterization of monoclonal antibodies for citrus tristeza virus and their use for diagnosis. J. Gen. Virol. 67: 91-96.
- Wallace, J. M. & Fawcett, H. S. (1947).** Quick decline of orange trees - a virus disease. Science 105: 315-316.
- Wallace, J. M. (1978).** Virus and virus-like disease. The Citrus Industry. W. Reuther, C. Calavan, G. E. Carman, eds. Division of Agricultural Science University of California Berkeley. Vol. II: 67-184.
- Webber, H. J. (1943).** The "Tristeza" disease of sour orange rootstock. Am. Soc. Hort. Sci. Proc. 43: 160-168.

10. Apêndice

10.1. Preparo de gel de acrilamida, gradiente 5-20%

10.1.1. Soluções estoque usadas no preparo dos géis

As soluções estoque usadas no preparo dos géis de poliacrilamida foram:

- Acrilamida:bisacrilamida 30:0,8 - 30 g de acrilamida e 0,8 g de bisacrilamida em 100 ml de água destilada. Esta solução foi filtrada em papel Whatman nº1 e mantida em frasco escuro a 4°C.
- Tampão de resolução do gel: 3M Tris-HCl pH 8,8.
- Tampão de empacotamento do gel: 0,5M Tris-HCl pH 6,8.
- 10% SDS
- 3% persulfato de amônia
- TEMED
- Tampão de corrida: 25 mM Trisma base; 0,192 M glicina, pH 8,3; 0,1% SDS

10.1.2. Preparo dos géis (gradiente 5 a 20%)

Os géis foram preparados no sistema Protean® II xi Slab Cell da BioRad. Para o preparo dos géis, foram colocados em 2 provetas de 25 ml os seguintes volumes das soluções estoque:

Soluções	gel 5% ml	gel 20% ml
• acrilamida:bisacrilamida 30:0,8	2,04	8,04
• tampão de resolução	1,50	1,50
• 10% SDS	0,109	0,109
• Glicerol	--	1,20
• 3% persulfato de amônia	0,136	0,136
• TEMED	4,02 μ l	4,02 μ l
• H ₂ O qsp (quantidade suficiente para)	12,00	12,00

Os géis foram preparados com o auxílio de um formador de gradiente da Bio Rad. Após a polimerização, foi colocado o gel de empacotamento com a seguinte composição:

Soluções	volume ml
• H ₂ O	5,85
• acrilamida:bisacrilamida 30:0,8	1,25
• tampão de empacotamento	2,50
• 10% SDS	0,10
• 3% persulfato de amônia	0,25
• TEMED	7,5 μ l

10.1.3. Preparo das amostras e eletroforese

Alíquotas das amostras preparadas como descrito em 3.16. e 3.18. foram colocadas em tubos Eppendorf, foi adicionado 2 μ l de 0,1% azul de bromofenol e as amostras foram colocadas em banho-maria fervente durante 10 min. Após

atingirem temperatura ambiente, foram aplicadas nos géis. A corrida eletroforética foi feita a 100 volts, à temperatura ambiente, até a frente de azul de bromofenol atingir o fim do gel.

Os géis foram corados durante 30 min em uma solução contendo 0,25% Coomassie Brilliant Blue R 250 em metanol: água: ácido acético (5:5:1), descorados em metanol: água: ácido acético (3:6:1) e mantidos em uma solução 2,5% ácido acético. De um modo geral, foram aplicados cerca de 20 µg de proteínas totais em cada canaleta.

10.2. Preparo do gel de sequenciamento

10.2.1. Tratamento das placas

As placas de vidro usadas para preparar o gel de sequenciamento foram lavadas com detergente e muito bem enxaguadas com água de torneira e água destilada. Em seguida, foram secas com papel absorvente e limpas com etanol. A placa de vidro do sistema da BioRad, onde o gel foi fixado, foi tratada com “sticky silane” (Methacryloxypropyltrimethoxysilane - Sigma M-6514). Para tanto, foram preparadas 2 soluções:

- A.** 300 µl de H₂O e 30 µl de ácido acético em tubo eppendorf;
- B.** 10 ml de 95% etanol e 30 µl de “sticky silane” em um tubo Falcon de 15 ml.

A solução A foi, em seguida, adicionada à solução B e aplicada na placa de vidro com um papel absorvente.

A outra parte do sistema usada para preparar o gel foi tratada com repel silano [1,1-bis (p-chorophenil) - 2,2,2- Trichloroethane - Sigma]. Em uma capela foram

colocados 5 ml de repel silano na superfície desengordurada da placa e este foi espalhado com um papel absorvente em movimentos circulares. Depois de seca, o excesso foi retirado com papel umedecido em água.

10.2.2. Soluções usadas no preparo do gel de sequenciamento

Inicialmente, foram preparadas as seguintes soluções:

- Acrilamida: bisacrilamida - 30,4 g de acrilamida; 1,6 g de bisacrilamida. Volume final de 80 ml com água destilada.
- 5 x TBE - 108 g de Trizma base; 55 g de ácido bórico; 7,5 g EDTA. Volume final de 2 litros.
- 10% Persulfato de amônia
- TEMED

Em seguida, foi preparada a solução estoque do gel de sequenciamento a 5%. Foram adicionados em um becker:

- | | |
|----------------------|--------|
| • 5 x TBE | 128 ml |
| • ddH ₂ O | 192 ml |
| • Uréia | 320 g |

A solução foi colocada em uma placa de aquecimento para dissolver a uréia e, em seguida, foram adicionados 80 ml da solução estoque de acrilamida: bisacrilamida. O volume final desta solução foi 600 ml. A solução foi esterilizada por filtração em filtro Millipore de 0,45 μ m, e estocada a 4°C por um período máximo de 2 meses.

No momento de preparar o gel, a solução foi pré-aquecida em banho-maria a 37°C durante alguns minutos para completa dissolução da uréia. Em seguida, foram colocados em um becker:

- solução do gel 40 ml
- 10% persulfato de amônio 0,2 ml
- TEMED 35 µl

O gel foi imediatamente aplicado na placa com auxílio de uma seringa de 50 ml. A polimerização foi feita à temperatura ambiente.