

04574
MEN 26991

LUCIANO VILELA PAIVA

MARCADORES BIOQUÍMICOS PARA O DECLÍNIO DOS CITROS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Maurício Antônio Lopes



LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1997

Ficha Catalográfica preparada pela Secção de Classificação e Catalogação da
Biblioteca Central da UFLA

Paiva, Luciano Vilela

Marcadores bioquímicos para o declínio dos citros
/ Luciano Vilela Paiva. -- Lavras : UFLA, 1997.
69 p. : il.

Orientador: Maurício Antônio Lopes.
Dissertação (Doutorado) - UFLA.
Bibliografia.

1. Declínio dos citros - Eletroforese. 2. Marcador bioquímico. 3.
Marcador molecular. 4. Imunologia - Teste. I. Universidade Federal
de Lavras. II. Título.

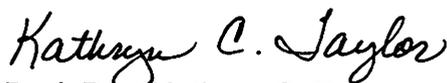
CDD-634.393

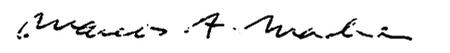
LUCIANO VILELA PAIVA

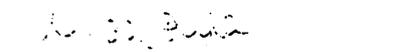
MARCADORES BIOQUÍMICOS PARA O DECLÍNIO DOS CITROS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de "Doutor".

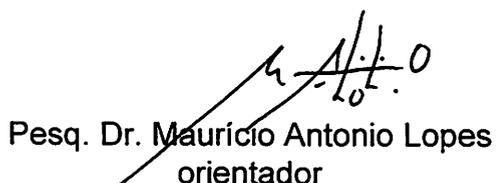
APROVADA em 26 de fevereiro de 1997


Prof. Dra. Kathryn C. Taylor


Pesq. Dr. Marcos A. Machado


Prof. Dr. Maurício de Souza


Prof. Dr. João Bosco dos Santos


Pesq. Dr. Maurício Antonio Lopes
orientador

Ao meu pai, Jainir Santos Paiva (*in memorian*),
meu exemplo de perfeição que um
ser humano pode atingir,

DEDICO

It is clear these biotechnology techniques will
not be the last word or the entire answer, but
rather they represent another weapon in
the arsenal of fruit breeders that is needed
to overcome the reluctance of Mother Nature
to share her bounty and her secrets,

Julis Janick (1995)

A minha mãe Clymar Vilela Paiva
e aos meus irmãos Edilson, Marcos e Renato
que estão sempre me cobrando mais,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

à Universidade Federal de Lavras - UFLA, pela oportunidade concedida para a realização do curso de doutorado;

to the department of Plant Sciences of the University of Arizona for supporting part of my thesis work;

ao Núcleo de Biologia Aplicada do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - Embrapa, pelo ambiente, condições de trabalho e visão de futuro;

à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior - CAPES, pela concessão de bolsa de estudos durante minha estadia na UFLA;

ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão de bolsa de estudos durante minha estadia na Universidade do Arizona - USA;

ao meu orientador Dr. Maurício A. Lopes, pela confiança e pelos valiosos conhecimentos transmitidos;

to my co-advisor Dr. Kathryn C. Taylor who was a constant source of support, help and advice;

ao meu irmão Edilson Paiva, pelo inestimável apoio e sugestões;

aos professores do Curso de Pós-Graduação, em especial Prof. Maurício de Souza, pelas constantes motivações, apoio e sobretudo pela amizade;

aos colegas do Curso de Pós-Graduação, em especial ao Dr. João Luiz Palma Menegucci pela amizade e companheirismo nas lutas que enfrentamos durante o curso;

aos colegas do Núcleo de Biologia Aplicada do CNPMS - EMBRAPA, pelo convívio e amizade. Agradecimento especial vai para o quebrador de galho, o macaco gordo Miguel Reis;

also I would like to thx friends I made in Kathy's Lab for their helpfulness and kindness. Thanks are also due to all Brazilians and "gringo" friends (specially Matthew Teller and Oso), who help me to make my stay in Tucson very pleasant;

à minha namorada Vera, pela paciência e sobretudo pelo companheirismo;

à todos que, de algum modo, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Caracterização do declínio dos citros.....	4
2.2 Testes para diagnose do declínio dos citros.....	7
2.3 Caracterização de proteínas.....	13
2.3.1 Focalização isoeétrica de proteínas.....	13
2.3.2 Resistência sistêmica adquirida.....	14
2.4 "mRNA differential display".....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Testes imunológicos.....	26
3.1.1 Purificação de proteínas associadas com declínio dos citros.....	26
3.1.2 Produção e purificação de anticorpos.....	27
3.1.3 "Western blot".....	29
3.2 Focalização isoeétrica - IEF e "Dot blot".....	30
3.3 Efeito de diferentes tipos de estresse no acúmulo da proteína 23 kD...	31
3.4 "Garden blot".....	32
3.5 Determinação da composição e da sequência de aminoácidos da proteína 23 kD.....	32
3.6 Expressão diferencial de genes nas plantas com declínio dos citros observada pela técnica "mRNA differential display".....	33
3.6.1 Obtenção e análise do RNA total.....	33
3.6.2 Produção dos cDNAs.....	33
3.6.3 Eletroforese em gel de sequenciamento.....	34
3.6.4 Isolamento, reamplificação dos produtos de PCR e clonagem.....	35
4 RESULTADOS.....	36
4.1 Expressão da proteína 23 kD encontrada nas plantas afetadas pelo declínio dos citros.....	36
4.2 Efeito de diferentes tipos de estresses na acumulação da proteína 23 kD....	41
4.3 Análise da composição e da sequência de aminoácido da proteína 23 kD....	47
4.4 Identificação de cDNAs específicos de plantas com declínio dos citros através da técnica "mRNA differential display".....	47

5 DISCUSSÃO.....	53
6 CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro		Página
1	Composição aminoacídica da proteína 23 kD.....	48
2	Sequência nucleotídica do clone cDNA1 obtido à partir da técnica “mRNA differential display”.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Padrão eletroforético de proteínas extraídas dos vasos lenhosos de plantas de citros sadias (colunas 1 e 2) e com declínio dos citros (colunas 3 e 4) obtido em gel de poliacrilamida 12,5%. Pesos moleculares encontram-se à direita.....	10
2. Padrão imunológico obtido pela técnica “western blot” mostrando a especificidade do anticorpo policlonal anti-23 kD para a proteína 23 kD. (D) extrato de proteína total dos vasos lenhosos de raízes de plantas com declínio dos citros, (S) extrato de proteína total dos vasos lenhosos de raízes de plantas sadias e (P) extrato da proteína 23 kD isolada	37
3. Análise “dot blot” de proteínas totais, nativas, obtidas do extrato do xilema de raízes de plantas com “blight” e fracionadas por focalização isoelétrica. As 20 frações coletadas apresentaram gradiente de pH entre 1,8 a 11,7. Como controle positivo foram utilizadas duas concentrações (1µg e 5µg) da proteína total extraída dos vasos lenhosos de plantas doentes.....	39

4. Análise “western blot” da distribuição da proteína 23 kD em folhas de plantas com “blight” (colunas 1-3) e em folhas de plantas saudias (colunas 4-6). Colunas 1 e 4, folha intacta; colunas 2 e 5, folha cuja nervura principal foi removida e colunas 3 e 6, nervura principal..... 40

5. Análise “western blot” mostrando reações imunológicas positivas da presença da proteína 23 kD em extratos protéicos de raízes de plantas com sintomas iniciais da doença “blight” (B) de plantas com “macrophylla decline” (MD) e de plantas com declínio dos citros (D)..... 42

6. Análise “western blot” da expressão da proteína 23 kD em folhas de plantas cítricas saudias submetidas a diferentes tipos de estresses. 1 e 4 - controle negativo; 2 - estresse hídrico; 3 - folhas com deficiência de Zn; 5 - folha perfurada; 6 - folhas adjacentes àquela perfurada; 7 - folhas com as bordas maceradas; 8 - folhas adjacentes àquela macerada; 9 - controle positivo..... 43

7. Análise “western blot” da expressão da proteína 23 kD na folha de pessegueiro submetida ao estresse mecânico através da perfuração da folha com espinho (B) na folha adjacente localizada acima (A) e abaixo (C) daquela submetida a ferimentos e na folha de planta não submetida a ferimento (S)..... 45

8. Análise “western blot” do extrato de proteína total de raízes de plantas com “blight (B), de plantas saudias (S) e de folhas submetidas a ferimentos (F) (30 perfurações com espinho) (F) com anticorpo produzido contra quitinase ácida extraída de pinus. (C) controle positivo, enzima quitinase ácida purificada..... 46

9. Autorradiograma exibindo cDNAs detectados pela técnica "mRNA differential display". Os RNAs totais extraídos de folhas e cascas de plantas sadias (S) e com declínio dos citros (D) foram submetidos a transcrição reversa com o primer 3' (5'CGTGAATTCGGTT₁₁A) e os cDNAs resultantes foram amplificados por PCR na presença de ³³P-dATP usando o mesmo primer 3' e o primer 5' (5'CGTGGATTCAGCCAGCGAA). Os produtos de PCR foram separados em gel de sequenciamento contendo 6% acrilamida e 7M de uréia. O gel foi em seguida desidratado e exposto a filme raio-X. Traços indicam bandas de cDNAs correspondentes a mRNAs expressos somente em plantas com declínio dos citros..... 50
10. Gel de agarose 1,5%, exibindo cDNAs reamplificados exclusivos de plantas com declínio dos citros e a presença de contaminantes. Os cDNAs correspondentes às bandas de PCR de interesse visualizadas no filme raio-X foram eluídos e reamplificados por PCR na presença do primer 3' (5'CGTGAATTCGGTT₁₁A) e do primer 5' (5'CGTGGATTCAGCCAGCGAA) e na ausência de radioisótopo. M representa marcador molecular e 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 os fragmentos reamplificados enumerados de acordo com a ordem decrescente de tamanho..... 51

RESUMO

PAIVA, L.V. **Marcadores bioquímicos para o declínio dos citros**. Lavras: UFLA, 1997. 69p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia)

Este estudo teve por objetivos o desenvolvimento de um teste imunológico para o diagnóstico precoce de plantas com declínio dos citros, a caracterização estrutural e funcional da proteína 23 kD, associada a esta anomalia, e a obtenção de marcadores de cDNA que se relacionem à anomalia. Para a produção de anticorpos policlonais, a proteína 23 kD foi isolada a partir de SDS-PAGE e injetada em galinhas em fase de postura. A caracterização estrutural e funcional da proteína 23 kD se deu através da determinação da sua composição aminoacídica e da sequência de aminoácidos na região do terminal amino. Estudos da sua presença em outras espécies e da sua acumulação em resposta à diferentes tipos de estresses também foram realizados. Os resultados indicam que os anticorpos policlonais produzidos contra a proteína de 23 kD utilizados no teste "western blot" foram eficientes na distinção entre plantas saudáveis e doentes e no diagnóstico de plantas pré-sintomáticas. Verificou-se também que a proteína 23 kD ou outra proteína com antigenicidade semelhante a esta proteína, é sintetizada em plantas afetadas pela anomalia "macrophylla decline". A alta concentração de aminoácidos acídicos na composição da proteína 23 kD e sua

*Orientador: Maurício A. Lopes. Membros da Banca: Kathryn C. Taylor, Marcos A. Machado, Maurício de Souza e João Bosco dos Santos.

presença na fração de pH em torno de 1,8, verificada por focalização isoeletrica, indicam que ela é uma proteína ácida. Os resultados indicam ainda que a proteína 23 kD é acumulada em plantas de citros e pêsego em resposta a estresse mecânico, mas não pode ser detectada em plantas de tomate, feijão, abóbora, milho e mamona, sugerindo que a sua expressão possa estar relacionada com resposta de plantas lenhosas à ferimentos. Os marcadores cDNAs foram obtidos pela técnica "mRNA differential display". A técnica "mRNA differential display" também se mostrou eficiente na constatação da expressão diferencial de genes entre plantas sadias e com declínio dos citros. Esta técnica possibilitou a identificação de oito cDNAs com presença aparentemente exclusiva em plantas com declínio dos citros. Os mRNAs precursores destes cDNAs podem ter envolvimento com eventos metabólicos que ocorrem no tronco de plantas afetadas pela anomalia.

ABSTRACT

BIOCHEMICAL MARKERS FOR BLIGHT

The objectives of this study were the development of a serological test for early detection of blight disease in citrus plants, the structural and functional characterization of the disease specific 23 kD protein and the obtainment of cDNA markers which correlate with the anomaly. To produce the specific polyclonal antibodies, the 23 kD protein exclusively found in blight plants was isolated from SDS-PAGE and injected in a laying hen. The structural characterization of the 23 kD protein was done through the determination of its amino acid composition and its N-terminal amino acid sequence. The 23 kD was also investigated by measuring its accumulation in response to different types of stress imposed in healthy plants and by assessing the cross-reactivity of 23 kD specific antibodies with protein extracted of other different plants specie. The polyclonal antibodies raised against the 23 kD protein, used in the immuno blot analysis, were able to efficiently distinguish healthy from blight affected plants. The use of this serological test allowed the identification of young plants affected by blight before visual symptoms developed. It was also observed that the 23 kD protein or another protein with epitopes which react to the anti-23 kD was produced in plants affected by the anomaly macrophylla decline. Due to high concentration of glutamic acid found in its composition and its presence in the lowest pH fraction obtained from preparative isoelectric focusing, the 23 kD polypeptide can be characterized as an acid protein. The 23 kD protein was also found to accumulate in citrus and peach plants in response to wounding but not in tomatoes, beans, cucumber, *Ricinus communis* and maize plants, suggesting that its expression may be related to response of woody plant to wounding. The mRNA differential display technique also demonstrated differential gene expression between healthy and blight affected plants. This technique allowed the identification of eight cDNAs with expressions apparently specific in blight affected plants. The eight corresponding mRNAs may have involvement with metabolic events which occur in the trunk of blight affected plants.

1 INTRODUÇÃO

O declínio dos citros ou "blight" como é conhecido nos Estados Unidos, anomalia diagnosticada a mais de cem anos e cuja etiologia ainda permanece desconhecida, continua sendo um dos maiores problemas nas principais regiões mundiais produtoras de citros. No Brasil, o declínio dos citros está sendo responsável pela morte de aproximadamente 10 milhões de árvores a cada ano, o que corresponde um prejuízo em torno dos 50 milhões de reais por ano (Sérgio T. Mendes, 1996*). A causa desta anomalia permanece obscura, e ainda não existem medidas disponíveis para a sua prevenção e controle.

Observações da expansão da anomalia sugerem que o declínio dos citros pode inicialmente vir das matrizes, provavelmente numa baixa incidência, criando pequenos focos que possibilitam a sua expansão no pomar (Derrick et al., 1992). Alguns pomares permanecem livres da anomalia por muitos anos, sugerindo que se a causa e o método de expansão forem conhecidos, estratégias poderão ser desenvolvidas para controlar a doença.

Devido à semelhança dos sintomas externos apresentados pelas plantas com declínio dos citros com sintomas causados por outros fatores, como déficit hídrico, "foot root", "rio grande gummosis", nematóides, e os vírus da tristeza (Lee et al., 1984), foram desenvolvidos alguns testes padrões para o diagnóstico do declínio. Os mais utilizados são o teste de acúmulo de Zn no lenho e o teste de absorção de água através do uso da seringa (Wutscher, 1989). A desvantagem destes testes é que eles dão

* Sérgio T. Mendes - Comunicação Pessoal

resultados positivos somente quando as plantas já estão no estágio avançado da doença, não diagnosticando, portanto, plantas afetadas no estágio inicial da anomalia.

Até recentemente o declínio dos citros era considerado uma anomalia de plantas adultas, porque as plantas afetadas somente mostram os sintomas externos após cinco anos de idade, ou seja, após a primeira produção econômica (Marais, 1990). No entanto, Derrick et al. (1990) comparando o perfil protéico de raízes do limoeiro 'Rugoso' de plantas sadias e com "blight", verificaram que plantas jovens também são susceptíveis, embora demorem algum tempo para apresentarem os sintomas externos. No limoeiro 'Rugoso', porta-enxerto analisado por Derrick et al., (1990), foram identificadas três proteínas com pesos moleculares de aproximadamente 35, 23 e 15 kD, presentes somente nas plantas afetadas com "blight". Estas proteínas foram designadas como "blight specific proteins" ou BSP. No Brasil, no porta-enxerto limoeiro 'Cravo' com declínio dos citros, encontrou-se duas proteínas com pesos moleculares de aproximadamente 26 e 23 kD, que também foram caracterizadas como específicas de plantas doentes (Paiva, 1993). Baseando-se no peso molecular, somente a proteína 23 kD parece ser a mesma e exclusiva dos dois porta-enxertos com a anomalia.

Com a descoberta das proteínas específicas do "blight", tornou-se possível o diagnóstico precoce e preciso da anomalia através da utilização de testes imunológicos. Nestes testes utilizam-se anticorpos como marcadores. Devido à sua alta especificidade, estas moléculas tem despertado grande interesse na diagnose prática e eficiente de doenças. Desde o início deste século os métodos imunológicos vem sendo desenvolvidos e aperfeiçoados em diversos ramos da biologia, para múltiplas finalidades e funções. Técnicas imunológicas como imunodifusão, imunoeletroforese, imunoprecipitação, imunositulocalização, "western blot", "dot blot" e "ELISA" (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) permitem detectar, quantificar e visualizar pequenas diferenças entre macromoléculas (Clark e Adams, 1977), possibilitando diagnósticos precoces de doenças. Uma vantagem da diagnose precoce do declínio dos citros é a possibilidade de se desenvolver um programa de monitoramento das plantas infectadas

(assintomáticas e/ou pré-sintomáticas) no pomar. Outra importante aplicação dos mesmos poderá ser na indexação de matrizes, visando reduzir uma possível propagação de plantas doentes via enxertia de borbulhas.

Para identificar e caracterizar pequenas mudanças na expressão gênica que são difíceis de serem detectadas pelas técnicas diretamente envolvidas com o estudo de proteínas, utilizou-se a técnica "mRNA differential display". A técnica "mRNA differential display" bem como as técnicas conhecidas como seleção diferencial de bibliotecas de cDNAs e hibridação subtrativa de bibliotecas de cDNAs, têm sido utilizadas com sucesso na identificação de genes expressos diferencialmente, pela simples comparação de diferenças ao nível de mRNA encontrado entre diferentes tipos de células, ou nas mesmas células sob diferentes condições biológicas (Maser e Calvet, 1995; Mészáros e Morton, 1996). Entre as vantagens da técnica "mRNA differential display", utilizada neste trabalho, sobre as outras duas técnicas, destacam-se a maior facilidade de identificar e clonar os mRNAs raros, não limitação pela redundância de mRNAs que possuem expressão elevada e necessidade de pequenas quantidades de RNA para análise.

Um dos objetivos do presente trabalho foi a obtenção de anticorpos policlonais contra a proteína 23 kD, específica de limoeiro 'Cravo' com declínio dos citros (Paiva, 1993), para serem utilizados no desenvolvimento de testes imunológicos visando o diagnóstico precoce da anomalia. Foi feita também a caracterização estrutural e funcional da mesma. O outro objetivo deste trabalho foi identificar novos marcadores moleculares, como cDNAs específicos de plantas com declínio dos citros, por meio da técnica "mRNA differential display".

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização do declínio dos citros

Como sintomas característicos, as plantas com declínio dos citros apresentam declínio setorial ou da planta inteira quando estão no estágio mais avançado da doença, desaparecimento dos surtos de crescimento e algumas alterações no balanço de nutrientes, (Tavares, 1987; Giroto, 1990; Paiva, 1993), sendo a mais proeminente, a redistribuição de Zn (Albrigo e Young, 1981; Taylor et al., 1988). Os surtos de florescimento são irregulares e nos estágio mais avançados as árvores infectadas lançam brotações na parte interna da copa e no porta-enxerto. As plantas afetadas demoram para morrer, mas apresentam uma expressiva redução na produção, no tamanho dos frutos e na longevidade. Internamente, as plantas apresentam acima da região da enxertia, nos vasos do xilema, obstruções amorfas que reduzem a translocação hídrica nestes tecidos (Brlanskly et al., 1984). Teoricamente o declínio/"blight" têm sido confinado a regiões produtoras úmidas. No entanto, anomalia com sintomas bastante semelhantes, conhecida como "Macrophylla decline" têm sido observada em limões localizados no deserto do Arizona (U.S.A.) (Schneider, 1960). Esta anomalia ocorre somente em porta-enxertos 'Citrus macrophylla'.

O agente causal do declínio dos citros ainda permanece desconhecido, apesar de muitas pesquisas terem sido realizadas desde 1874, época provável do surgimento da anomalia (Smith, 1974). A incapacidade de se transmitir o declínio via enxertia de borbulhas (Wutscher et al., 1983) levou alguns pesquisadores a defender que a causa da anomalia é um distúrbio fisiológico. Experimentos realizados por

Wutscher e Smith (1988), constataram que borbulhas de laranjeiras Valência severamente atacadas pelo declínio e borbulhas de plantas saudias usadas como controle, enxertadas nas brotações dos próprios porta-enxertos mostraram falhas na propagação do "blight". A proporção de plantas com "blight" foi idêntica no controle e nas plantas onde se enxertaram borbulhas de plantas infectadas, indicando que o "blight" não é propagado, mas sim induzido pelo local onde as plantas crescem.

Várias foram as tentativas de correlacionar o "blight" com fatores abióticos. O tipo de solo e seu preparo (Fisher et al., 1984), bem como aplicações de calcário, matéria orgânica, macro e micronutrientes (Trani et al., 1986), e de reguladores de crescimento (Castro et al., 1992) não afetaram o desenvolvimento da anomalia, e portanto não foram correlacionados com a mesma.

No entanto, demonstrações que os sintomas do declínio dos citros são reproduzidos através de enxertia de raízes podem indicar o envolvimento de um agente patogênico (Tucker et al., 1984). Para demonstrar a transmissibilidade, Tucker et al. (1984) desenvolveram estudos onde laranjeiras saudias 'Pineapple' sobre o porta-enxerto limoeiro 'Rugoso', tiveram suas raízes enxertadas com raízes provenientes de plantas da mesma espécie, afetadas pelo declínio dos citros. Foi constatado que após quatro anos, sete das oito plantas enxertadas tinham os sintomas visuais típicos do declínio, como concentração significativamente alta de zinco no lenho, baixa absorção de água e obstruções amorfas nos vasos lenhosos. Das oito plantas controles, as quais não tiveram suas raízes enxertadas, somente uma desenvolveu os sintomas típicos do declínio.

Estudos para correlacionar o declínio dos citros com o ataque de várias espécies de nematóides, fungos (Rossetti e Beretta, 1988), micoplasmas, bactéria e vírus (Marais, 1990) também não foram capazes de confirmar estas hipóteses.

Tentativas de recuperar as plantas doentes mostraram que os sintomas são irreversíveis. Aplicações nas raízes do antibiótico tetraciclina (Timmer et al., 1981), de escórias, produto rico em silício, cálcio e magnésio (Beretta e Rossetti, 1988), pesticidas Aldicarb e Carbofuran (Muller et al., 1982), reguladores de crescimento (Prates et al., 1983), injeções em troncos com solução diluída de ácido cítrico (Rossetti e Beretta, 1984), afrancamento com poda drástica da copa (Beretta e Rossetti, 1988) e sub-enxertia (Rossetti et al., 1984), não foram capazes de recuperar as plantas afetadas.

Aparentemente todas as combinações enxerto/porta-enxerto são susceptíveis ao declínio, mas o nível de incidência varia com o tipo de porta-enxerto. Os porta-enxertos laranja 'Doce', laranja 'Azeda', 'Sunki' e tangerina 'Cleopatra' possuem uma certa tolerância visto que a incidência da doença ocorre em menor quantidade e os sintomas visuais normalmente aparecem em plantas com mais de 15 anos de idade (Beretta e Lefevre, 1986). Já o limoeiro 'Cravo', provavelmente por ser o porta-enxerto mais utilizado na citricultura nacional, se revela como o mais susceptível ao declínio.

Estudos recentes da anatomia do xilema de alguns porta-enxertos mostraram que nas plantas com "blight" as densidades dos vasos aumentaram e os diâmetros decresceram quando comparado com as plantas sadias. Entre as plantas sadias, as densidades e os diâmetros dos vasos foram similares com as plantas enxertadas no 'Citrange Carrizo' [*C. sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf] e no limoeiro 'Rugoso' (*C. jambhiri* Lush) e maiores que nas plantas enxertadas na laranja 'Azeda' (*C. aurantium* L.) e na "Cleopatra" (*C. reshi* Hort. ex Tan.) (Vasconcelos e Castle, 1994). Segundo os mesmos autores existem associações entre a anatomia dos vasos com a tolerância do porta-enxerto ao "blight". Plantas enxertadas nos porta-enxertos com diâmetro pequeno dos vasos são tolerantes ao "blight" (laranja 'Azeda') ou são afetadas tardiamente ('Cleopatra'). Porta-enxertos com diâmetros largos ('Rugoso' e 'Citrange Carrizo') estão entre os mais susceptíveis. Embora as plantas com "blight" apresentem maior número e maior área de vasos em relação às plantas sadias, a

explicação dada pela reduzida translocação hídrica nas plantas doentes, é que as pequenas mudanças no diâmetro dos vasos apresentam grandes efeitos na condutividade hidráulica.

2.2 Testes para diagnose do declínio dos citros

Dentre as técnicas modernas utilizadas no estudo de proteínas, destacam-se os testes imunológicos, onde anticorpos são utilizados como ferramentas poderosas na caracterização, quantificação e localização celular de várias proteínas.

A falta de sintomas visuais em plantas novas, ou seja, em plantas com menos de cinco anos de idade, tem dificultado os esforços para determinar a causa da doença e o desenvolvimento de estratégias para o seu controle. Não há um sintoma visual característico do declínio dos citros que o distinga de outras anomalias que também ocorrem nos citros, o que representa um entrave no diagnóstico preciso da anomalia.

Plantas afetadas frequentemente apresentam deficiência de zinco nas folhas indicando que o declínio interfere na translocação deste nutriente dentro da planta (Marais, 1990). Sintomas de deficiência de zinco nas folhas podem ser resultado de vários fatores, e portanto não são utilizados como um método acurado para o diagnóstico do declínio.

Como resultado da redistribuição de Zn nas plantas doentes, Lee et al. (1984), verificaram um acúmulo deste nutriente no lenho. Baseando-se no fato que esta concentração de Zn no lenho ocorre somente em plantas com declínio dos citros, foi desenvolvido um dos testes mais utilizados para o diagnóstico da anomalia, conhecido como teste de acúmulo de Zn no lenho. Neste teste, plantas são consideradas doentes quando possuem mais de 3 μg de Zn/g de lenho, o que representa três vezes a concentração normal presente nas plantas sadias. A causa deste acúmulo é

desconhecida e a principal localização tem sido controversa. Segundo Taylor et al., (1988), o acúmulo de Zn no lenho, ocorre somente quando o teor de Zn no floema for alto. Em trabalhos nutricionais realizados com o porta-enxerto limoeiro 'Cravo' (Tavares, 1987; Paiva, 1993), não foram identificadas diferenças nas concentrações de Zn no lenho entre plantas sadias e doentes. Nestes trabalhos o acúmulo de Zn na casca do tronco das plantas doentes foi o parâmetro que melhor representou a evolução da doença.

Outro teste de diagnóstico bastante utilizado para o declínio dos citros é o teste de absorção de água. No teste de absorção de água, um orifício é feito acima da região da enxertia onde com o auxílio de uma seringa tenta-se injetar 10 ml de água durante 20 segundos (Lee et al., 1984). As plantas com declínio dos citros, por possuírem obstruções amorfas e filamentosas nos vasos do xilema, apresentam nula ou reduzida absorção de água, enquanto que nas plantas sadias a absorção é total. Segundo Wutscher e Bistline (1980), as plantas sadias podem absorver até 12 vezes mais água do que as plantas doentes. A grande desvantagem tanto do teste de absorção de água, bem como do teste de acúmulo de Zn no lenho é que eles dão resultado positivo somente quando as plantas já estão no estágio avançado da doença.

Grande avanço no que se refere a um teste mais rápido e preciso para o declínio foi possível a partir dos experimentos de Derrick et al. (1990), que verificaram alteração no perfil protéico das plantas doentes a partir de trabalhos com extratos de xilema de raízes do limoeiro 'Rugoso'. Foram identificadas sete proteínas relacionadas com a doença, sendo que as proteínas com pesos moleculares de aproximadamente 35, 23 e 15 KD, foram consideradas exclusivas de plantas doentes, ou seja, não aparecem em tecidos sadios. As demais proteínas apresentaram expressão alterada entre as plantas sadias e doentes. Estas proteínas passaram a ser chamadas proteínas específicas do "blight" ou "blight specific proteins" (BSP).

No Brasil, através da análise dos perfis protéicos do extrato do xilema de raízes de limoeiro 'Cravo' de plantas sadias e doentes, foram identificadas duas

proteínas (26 e 23 kD) presentes somente em plantas com declínio dos citros (Paiva, 1993) (Fig.1). Estas proteínas não foram observadas nos vasos lenhosos de ramos de plantas doentes, suportando a idéia, de que se o declínio for causado por um patógeno, ele se encontra em concentração extremamente baixa no caule e em maior concentração nas raízes. Foi verificado também que não há influência dos efeitos ambientais de diferentes locais amostrados na expressão destas duas proteínas. A proteína de 23 kD é a única entre as exclusivas da doença presente nos porta-enxertos limoeiros 'Cravo' e 'Rugoso' afetadas pelo declínio.

Investigações também no floema de plantas cítricas mostraram que um polipeptídeo com peso molecular de aproximadamente 4.5 kD e alta afinidade por Zn é acumulado em excesso nas plantas doentes (Taylor et al., 1989).

Com a identificação das proteínas específicas da doença tornou-se possível o desenvolvimento de testes imunológicos que são mais rápidos e precisos. A aplicação de técnicas imunológicas na pesquisa básica, como estudo da taxonomia de patógenos, fisiologia de doenças, interação patógeno-hospedeiro, ecologia do patógeno e epidemiologia possui imenso potencial. Populações de patógenos de solo, água ou culturas podem ser amostradas e correlacionadas com os danos na cultura, permitindo o desenvolvimento de medidas de controle. Assim que os padrões básicos sejam desenvolvidos pelos pesquisadores, estes poderão ser utilizados pelos produtores como um teste relativamente simples.

O princípio básico das técnicas imunológicas é a introdução de corpos estranhos (antígenos) em organismos vivos (cobaia), induzindo o último a produzir anticorpos que irão combater o corpo estranho. Os anticorpos são populações de proteínas (imunoglobulinas), cuja função é neutralizar ou eliminar o antígeno que induziu sua formação. Anticorpos produzidos contra proteínas específicas são capazes de reconhecê-las com alta especificidade e, portanto podem ser usados como marcadores moleculares altamente eficazes.

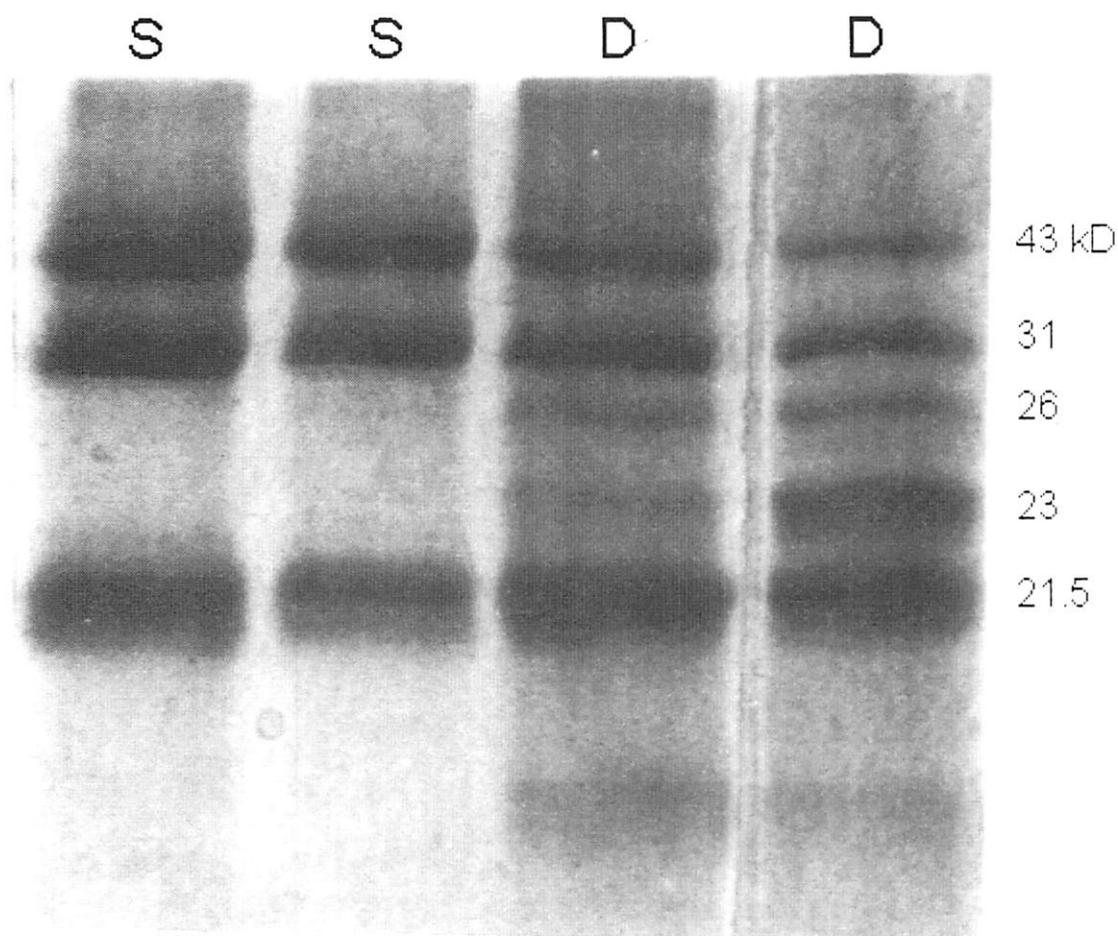


Figura 1 - Padrão eletroforético de proteínas extraídas dos vasos lenhosos de plantas de citros sadias (colunas 1 e 2) e com declínio dos citros (colunas 3 e 4) obtido em gel de poliácridamida 12,5%. Pesos moleculares encontram-se à direita.

Os animais possuem um repertório muito grande de células produtoras de anticorpos, conhecidas como linfócitos (células B), cada uma produzindo um anticorpo com uma só especificidade. Estes anticorpos produzidos são considerados policlonais, ou seja, são heterogêneos com respeito a especificidade e afinidade para o antígeno (Stryer, 1988).

Anticorpos policlonais geralmente possuem especificidade apropriada para uso prático em testes imunológicos para detecção de viroses, micoplasmas e bactérias. Entretanto, para alguns patógenos nestes grupos e para microrganismos mais complexos fisiologicamente, como fungos e nematóides, reações não específicas ocorrem e o uso deste tipo de anticorpo é limitado. Nestes casos, a purificação de componentes específicos e/ou desenvolvimento de anticorpos monoclonais podem promover a especificidade necessária. Os anticorpos monoclonais, em contraste com os policlonais, são homogêneos porque são sintetizados por uma população de células idênticas (um clone). Cada uma dessas populações é descendente de uma só célula de hibridoma que é formada pela fusão de uma célula produtora de anticorpo com uma célula tumoral que tem capacidade de proliferação ilimitada. Devido ao fato que os hibridomas serem imortais, um suprimento constante e uniforme de anticorpos pode estar disponível, o que é uma distinta vantagem sobre os anticorpos policlonais, os quais podem variar significativamente de uma amostra para outra (Dumbar, 1987).

Um dos testes imunológicos mais utilizados é conhecido como "western blot". O termo "blotting" refere-se a transferência de amostras biológicas para uma membrana e a sua detecção na superfície desta matriz. "Western blot" ou "immunoblotting", combina a resolução do gel de eletroforese com a especificidade da detecção imunológica e consiste de vários passos interrelacionados. Primeiramente as proteínas são fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Em seguida são transferidas do gel para uma membrana (nitrocelulose ou PVDF) onde ficam imobilizadas como uma réplica do padrão de banda obtido no gel. Normalmente na

transferência a membrana é colocada em contato com o gel e este sanduíche na presença de solução tamponante é submetido a um campo elétrico que direciona as proteínas do gel para a membrana. Após a transferência os sítios não ocupados pelas proteínas na membrana são saturados para prevenir ligações não específicas dos anticorpos. Em seguida as proteínas de interesse são hibridadas com o anticorpo primário. Para localizar os anticorpos primários usam-se anticorpos secundários específicos os quais são conjugados com um grupo repórter, tipo enzimas ou isótopos radioativos. Finalmente as proteínas são identificadas através dos grupos repórteres, que no caso de enzimas (fosfatase alcalina, "horseradish peroxidase"), convertem substratos em produtos insolúveis e coloridos ou geram uma reação de quimioluminescência. Muitas variações desta metodologia podem ser utilizadas (Gooderham, 1984).

A utilização de anticorpos produzidos contra as proteínas exclusivas do "blight" no sistema "western blot", conforme relato de Derrick et al. (1991), permitiu o diagnóstico de plantas pré-sintomáticas. Em outro estudo estas proteínas foram identificadas até um ano antes do desenvolvimento dos sintomas visuais (Derrick et al., 1992), demonstrando que os sintomas visuais característicos de plantas com "blight", demoram um tempo para serem desenvolvidos.

Anticorpos produzidos também contra proteínas isoladas do extrato de folhas de plantas com "blight", possibilitaram através da técnica "western blot" o diagnóstico de laranjeiras como sendo saudáveis ou doentes, em três regiões diferentes da Flórida (Bausher e Sweeney, 1991). Segundo os mesmos autores o uso de folhas como amostra para diagnose do "blight" na técnica "western blot" possui a vantagem da facilidade em se repetir a amostragem, o que não ocorre com o teste de Zn no lenho e com o teste de absorção de água.

2.3 Caracterização de proteínas

2.3.1 Focalização isoeletrica de proteínas

O isolamento de proteínas de misturas complexas para posterior caracterização sempre envolve muitos passos de purificação. No método tradicional inclui-se precipitação das proteínas seguida de várias etapas de cromatografia. Cada etapa requer diálise e concentração das proteínas, o que afeta a recuperação bem como aumenta o tempo requerido para sua purificação. Através da focalização isoeletrica (IEF), proteínas podem ser altamente purificadas em uma única etapa. A focalização isoeletrica baseia-se na propriedade que as proteínas tem, de serem moléculas anfotéricas, ou seja, carregam cargas positivas, negativas ou nulas dependendo do ambiente que se encontram. Para toda proteína, há um pH específico no qual a carga é zero. Este valor isoeletrico de pH, conhecido como ponto isoeletrico ou pI , é a característica de toda proteína que permite o fracionamento de misturas complexas num gradiente de pH. Se o número de grupos ácidos na proteína excede o número de grupos básicos, o pI desta proteína terá um valor baixo de pH, e se o número de grupos básicos exceder o número de grupos ácidos, o pI será alto. Proteínas apresentam considerável variação nos pontos isoeletricos, mas os valores de pI geralmente ficam entre pH 3-10. O gradiente linear e estável de pH é o ponto chave do IEF. O estabelecimento de tal gradiente é conseguido com o uso de carregadores sintéticos conhecidos como anfólitos que são moléculas de componentes poliamino-policarboxilo e apresentam tamanho em torno de 300-1000 Da. Quando a corrente elétrica é aplicada na solução de anfólitos, eles formam um gradiente crescente de pH entre o polo anodo e o polo cátodo. A proteína colocada neste meio contendo diferentes pHs, e submetida a carga elétrica, moverá para o eletrodo que contém cargas opostas, liberando íons de H^+ ou OH^- a medida que se move. Quando a carga da molécula é zero ela passa a ter mobilidade nula (Divall, 1984).

2.3.2 Resistência sistêmica adquirida (SAR - systemic acquired resistance)

Ainda não existem evidências se as proteínas relacionadas com o declínio dos citros são produzidas pelas plantas em resposta à um estresse biótico ou abiótico ou se são diretamente produto de um agente biológico, funcionando neste caso como toxinas para as plantas. Visto que diferentes proteínas tem sido relacionadas com o declínio dos citros, suspeita-se que estas proteínas tenham algum tipo de envolvimento com o sistema de defesa das plantas em resposta a estresses.

Inúmeros são os processos celulares que ocorrem nas plantas em resposta ao ataque de patógenos. Quando a planta reconhece o ataque de patógeno, ela reage através da indução de várias respostas locais nas células que envolvem a região da infecção. Esta resposta tem por finalidade limitar a expansão da invasão do microrganismo patogênico (Ward et al., 1991). Estes processos incluem a morte celular programada, conhecida como resposta de hipersensitividade, engrossamento da parede celular como resultado da lignificação, deposição de calose e produção de componentes antimicrobiais como as fitoalexinas (Vance et al., 1980; Dixon, 1981; Kauss, 1987; Slusarenko et al., 1991, citados por Ward et al., 1991).

Embora características estruturais possam proporcionar às plantas graus de defesa contra o ataque de patógeno, tem-se tornado claro que a resistência das plantas ao ataque de patógenos não depende somente das barreiras estruturais mas também de substâncias produzidas pelas células antes e depois da infecção. Além das barreiras estruturais as plantas desenvolvem um tipo de resistência não específica para infecções subsequentes, fenômeno conhecido como resistência sistêmica adquirida (SAR-systemic acquired resistance) (Ross, 1961).

O início do mecanismo SAR é marcado pela transcrição de uma série de mRNAs que são responsáveis pela síntese de proteínas conhecidas como "proteínas relacionadas com a patogenezidade" ou "proteínas PR". Um destes mRNAs é responsável pela síntese de quitinase, enzima que catalisa a hidrólise de quitina, um

polímero de N-acetil-D-glucosamina com ligações β -1-4, componente principal da parede celular de fungos e do exoesqueleto de insetos. Embora as quitinases sejam encontradas geralmente em níveis baixos nas plantas saudáveis, sua expressão é aumentada durante o ataque de patógenos e o seu acúmulo se dá intracelularmente no vacúolo ou extracelularmente nos espaços intercelulares (Van Loon, 1985).

Estudos com plantas de fumo transgênicas que expressam constitutivamente o gene da quitinase de feijão sob o controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor, mostraram que em solos infestados com o fungo patogênico *Rhizoctonia solani* houve uma maior taxa de sobrevivência destas plantas em relação às não transformadas e aquelas atacadas pelo fungo apresentaram um atraso no desenvolvimento dos sintomas da doença (Broglie et al., 1991).

O sucesso da planta em se proteger da invasão de patógenos não depende somente da coordenação entre as diferentes estratégias de defesa mas também da rapidez da resposta. O estímulo da transcrição dos genes de quitinase e o acúmulo destes transcritos representam um dos eventos mais precoces que pode ser relacionado com as respostas de defesa da planta. Hedrick et al., (1988) demonstraram que o elicitor do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* em culturas suspensas de células de feijoeiro promoveu uma rápida ativação dos transcritos de quitinase, chegando a estimular 10 vezes mais a quantidade da enzima após 5 minutos de inoculação e um aumento de 30 vezes após 20 minutos. Devido à rapidez na indução da resposta, supõe-se que o sinal de tradução está presente antes mesmo do tratamento com o elicitor, que há poucos passos entre a ligação do elicitor com receptores celulares e que existe um ativador específico da transcrição de genes de quitinase.

Muitas evidências sugerem que o ácido salicílico é a molécula sinal relacionada com a resistência das plantas aos agentes patogênicos. Os principais fatores que suportam esta idéia são: o ácido salicílico está sempre presente no exudato do floema de plantas infectadas e a aplicação deste ácido ativa os genes da SAR (Métraux et al., 1990). Para determinar se o ácido salicílico é o sinal móvel que ativa a

SAR, Vernooij et al., (1994) fizeram experimentos de enxertia, usando várias combinações entre porta-enxertos transgênicos que expressam uma enzima ("salicylate hydroxylase") que degrada o ácido salicílico com porta-enxertos que produzem normalmente o ácido salicílico. Embora porta-enxertos transgênicos de fumo não acumulem o ácido salicílico, eles foram capazes de enviar para a copa sinais de resistência contra vírus e fungos, indicando portanto que o sinal sistêmico que induz a SAR não é o ácido salicílico. Somente em copas (enxertos) que produzem normalmente o ácido salicílico, houve a tradução de mRNA envolvido com a resistência, demonstrando que para ativar a SAR, o ácido salicílico deve estar presente no sítio de indução.

Outra proteína que é traduzida em resposta ao ataque patogênico é a heveína, polipeptídeo de cadeia simples que contém 43 aminoácidos, geralmente ricos em aminoácidos cisteína e glicina (Broekaert et al., 1990). Recentemente, foi demonstrado que a heveína se liga à quitina e inibe o crescimento de vários fungos que contém quitina, apresentando portanto função semelhante às quitinases, ou seja, proteção de pontos de ferimento limitando a expansão do ataque de fungos (Van Parijs et., citado por Broekaert et al., 1990). De acordo com De Bolle et al. (1993), todas as proteínas que se ligam à quitina, neste caso incluem-se as quitinases, heveína e lectinas, caracterizadas ao nível de cDNA ou gene, possuem uma região rica em aminoácidos cisteína e glicina adjacente ao terminal carboxílico.

Proteínas produzidas em resposta ao ataque de patógenos também são acumuladas em plantas submetidas a ferimento mecânico e em plantas que recebem aplicações de reguladores vegetais relacionados com estresse, tais como etileno e ácido abscísico (Hedrick et al., 1988). Defesa sistêmica apresentada pelas plantas em resposta a ferimentos é característica de outra classe de genes de defesa, conhecida como inibidores de proteases. Parsons et al., (1989) demonstraram em "poplar" a existência de uma resposta sistêmica forte em folhas localizadas acima de folhas submetidas a ferimento mecânico. Foram caracterizados dois clones de cDNA (win 6 e

win 8) que acumulam em resposta ao ferimento. Estes clones são membros de famílias multigênicas e traduzem proteínas com alto grau de similaridade com as quitinases de feijão, fumo e cevada. O mecanismo responsável pelo acúmulo destes transcritos não é conhecido. Uma hipótese sugerida pelos autores é que o aumento dos níveis de win-mRNAs reflete o aumento da taxa de transcrição dos genes-win correspondentes.

No entanto, demonstrações de que inibidores da síntese de RNA não inibem a síntese das proteínas PR, contrariam esta hipótese, mostrando que para a expressão das proteínas PR nenhuma transcrição extra é requerida (Van Loon, 1985). Concordando com este resultados, Carr et al. citado por Van Loon, (1985), mostraram através de estudos de tradução *in vitro* que, mRNAs de folhas sadias induziram a mesma quantidade de proteínas PR que os mRNAs de folhas infectadas. Estas observações indicam que mRNAs relacionados com patogenicidade podem estar presentes constitutivamente mas não são traduzidos em folhas não estimuladas. Portanto para este sistema a expressão das proteínas relacionadas com a patogenicidade é controlada ao nível de tradução.

A síntese de proteínas em resposta a ferimentos também é um processo rápido. De acordo com Graham et al. (1986), 4 a 6 hr após ferimento, tanto as folhas de tomate submetidas ao ferimento bem como as folhas não submetidas ao ferimento, apresentaram acúmulo de inibidores de proteases. A taxa máxima de acúmulo se deu 4 hr após o ferimento, cessando a síntese por volta das 20 hrs.

Segundo Raz e Fluhr (1992), o cálcio está necessariamente envolvido com as respostas patogênicas mediadas por etileno. O bloqueio do fluxo de cálcio com quelantes inibiu o acúmulo de quitinase enquanto que o aumento artificial dos níveis de cálcio no citosol estimulou o acúmulo de quitinases, mostrando que a presença de cálcio é essencial para a indução dos processos defensivos apresentados pelas plantas que são dependentes do hormônio etileno.

Conforme Broekaert et al., (1990), aplicações exógenas de etileno e ácido abscísico em plantas látíferas da espécie *Hevea brasiliensis*, induziram aumento nos níveis de transcritos de heveína em folhas, caule e latex mas não em raízes. Ambos reguladores foram responsáveis pela síntese de transcritos de heveína semelhantes àqueles induzidos por ferimentos, suportando a idéia que vários sinais separados podem ativar os genes que são transcritos em resposta a ferimento e/ou de genes relacionados com defesa em plantas.

Existem variações com relação aos tipos de proteínas produzidas pelas plantas em resposta aos mais diferentes tipos de estresses. Folhas de milho tratadas com cloreto de mercúrio e infectadas com vírus do mosaico produziram oito proteínas que são solúveis em pH extremamente ácido, em torno de 2.8. Estas proteínas foram designadas como proteínas relacionadas com a patogenicidade do milho, visto que possuem propriedades comuns com as proteínas que são traduzidas em resposta ao ataque de patógenos, como solubilidade em baixo pH, apresentam baixo peso molecular, possuem resistência a proteases e localização extracelular (Nasser et al., 1988).

Quitinases ácidas também foram isoladas e caracterizadas a partir de calos de laranjeira Valência obtidos de embriões imaturos com quatro semanas de idade. Das onze isoformas isoladas, as quais apresentaram ponto isoelétrico entre pH 4.5 a 5.4, quatro foram capazes de hidrolisar quitosanos, sugerindo que estas enzimas além de possuírem atividade de quitinase possuem também atividade de quitosanases. As restantes apresentaram apenas atividade de quitinase (Osswald et al., 1994). Segundo os mesmos autores, enzimas que possuem mais de uma atividade são muito efetivas na interrupção das interações patógeno-hospedeiro e inseto-hospedeiro, visto que são ativas contra uma grande variedade de patógenos e insetos de plantas.

2.4 “mRNA differential display”

Métodos eficientes e sensíveis também são requeridos para identificar e isolar genes que são expressos diferencialmente em vários tipos de células ou em células sob condições alteradas. “mRNA differential display” tem se constituído ultimamente em poderosa técnica na identificação da expressão diferencial dos mRNAs nas células sob diferentes condições biológicas (Zhao et al., 1995).

A estratégia geral desta técnica é obter cDNAs a partir de subgrupos de mRNAs por meio de reações catalisadas pela enzima transcriptase reversa e amplificar parcialmente sequências destes cDNAs por PCR. Transcriptases reversa são polimerases de DNA dependentes de RNA, usadas predominantemente para catalisar a partir de RNA a síntese da primeira fita de DNA, conhecida como DNA complementar ou cDNA. As diferentes enzimas com atividade de transcrição reversa disponíveis hoje comercialmente são obtidas do “avian myoblastosis virus (AMV)”, “moloney murine leukemia virus (M-MuLV)” e do “*Thermus thermophilus* (Tth)”. Todas essas enzimas requerem para atividade ótima, diferentes pH, concentração salina e temperaturas de incubação. PCR (polymerase chain reaction) é um método para a síntese “in vitro” de sequências definidas de DNA. Na reação são usados dois primers (oligonucleotídeos) que hibridam em fitas opostas e que flanqueiam a sequência de DNA alvo que é para ser amplificada. A elongação dos primers é catalisada normalmente pela Taq DNA Polimerase, enzima isolada da bactéria *Thermus aquaticus* e que é estável à altas temperaturas. A série repetida de ciclos envolvendo a desnaturação do DNA molde, o anelamento dos primers e a extensão dos primers, pela Taq DNA Polimerase, resulta numa acumulação exponencial de fragmentos específicos de DNA. Uma vez que o produto sintetizado pela extensão dos primers pode servir de molde para o próximo ciclo, o número de cópias de DNA é aproximadamente duplicada a cada ciclo. Portanto, vinte ciclos de PCR produz em torno de (2^{20}) cópias do DNA alvo (Mullis e Falloana, 1987)

No método original “mRNA differential display”, o mRNA é primeiro transcrito reversamente em cDNA com primer de ancoragem 3’ apresentando duas bases de ancoragem (T₁₂MN), onde M possa ser representado tanto pelas bases nitrogenadas A, G ou C e N por A, T, C ou G. A seleção do primer 3’ ou primer de ancoragem tem a vantagem da presença da cauda poliadenilada (poli-A) na maioria dos mRNAs de eucariontes. O cDNA fita simples é convertido a fita dupla e amplificado via PCR numa mistura contendo o mesmo primer de ancoragem 3’, um primer arbitrário 5’ (10 bases) e deoxiribonucleosídeos trifosfatos radioativos (dNTP). No PCR são usados 40 ciclos com temperatura de anelamento de 40° C. Para o primer arbitrário de sequência aleatória 5’, posições de anelamento nos cDNAs deverão ter distribuição aleatória em relação à cauda poli-A. Como resultado, os produtos amplificados vão diferir em tamanho para os vários tipos de mRNAs existentes nas células. Numerosas combinações de diferentes primers são usados em reações independentes para garantir que cada mRNA presente nos extratos sejam convertidos num produto de PCR. Os produtos de PCR são então visualizados por autoradiografia em géis desnaturantes de sequenciamento de DNA. As bandas de cDNA exibindo diferenças são removidas do gel, reamplificadas por PCR e clonadas em vetores. Uma vez clonados os cDNAs de mRNAs expressos diferencialmente, estes poderão ser investigados pelo sequenciamento de DNA, pela análise das suas funções e expressões tecido específicas ou poderão ser usados para expressar proteínas em células hospedeiras, tudo isto dando novos sinais de suas funções no desenvolvimento, diferenciação, metabolismo de células bem como no entendimento de processos envolvidos com doenças (Liang e Pardee, 1992).

A técnica “mRNA differential display” em comparação com as técnicas conhecidas como seleção diferencial de bibliotecas de cDNA e hibridação subtrativa de bibliotecas de cDNA que também são utilizadas para identificar genes com expressão diferencial, apresenta vantagens como facilidade de identificar e clonar os mRNAs raros, não é limitada pela redundância de mRNAs que possuem expressão elevada e requer pequena quantidade de RNA para análise (Meser e Calvet, 1995; Mészáros e Morton, 1996). Conforme relato de Bauer et al. (1993), a técnica “mRNA differential display” não

permite somente a identificação de novos genes mas também a diagnose de mudanças quantitativas na expressão gênica em função de processos celulares particulares.

Segundo Shoham et al., (1995), a técnica "mRNA differential display" pode apresentar duas desvantagens. A primeira é que os produtos de cDNAs são geralmente de baixa qualidade e isto está associado com um "background" não específico detectado como uma mancha de DNA no gel. A segunda desvantagem é baseada no fato que normalmente mais de uma espécie de cDNA é encontrada junto com uma banda amplificada. Para superar estes problemas, os autores sugerem o uso de uma enzima que não tenha atividade RNase na reação de transcrição reversa e a utilização de enzimas de restrição que permitem um rápido agrupamento de várias espécies de cDNA.

Um outro método para detectar e eliminar os materiais contaminantes, permitindo o isolamento específico de clones correspondentes aos genes regulados diferencialmente e identificados pela técnica "mRNA differential display" foi desenvolvido por Callard et al., (1994). Neste método, os fragmentos de PCR purificados obtidos a partir da recuperação da banda com expressão diferencial do gel, são divididos em duas frações. A primeira metade do material é reamplificada e clonada, enquanto que a outra metade é estocada a -20°C . Após a clonagem os plasmídeos obtidos de diversos clones independentes são imobilizados em pedaços pequenos de membrana de nylon. Esta membrana então é hibridada contra os fragmentos de PCR radioativos que foram estocados. Após autoradiografia os clones de plasmídeos que contêm o inserto correspondente à banda de PCR com expressão diferencial, serão hibridados fortemente com a sonda, enquanto que os clones "negativos" contendo insertos originados de contaminantes de DNA, não darão nenhum sinal significativo acima do "background".

Em trabalho para examinar a especificidade, sensibilidade e reproducibilidade da técnica "mRNA differential display", verificou-se que a última base do terminal 3' do primer de ancoragem T₁₂MN é a base que fornece a maior



especificidade de se ligar aos diferentes tipos de mRNAs. A penúltima base apresentou considerável degenerescência, portanto ao invés de usar os 12 possíveis primers T₁₂MN para detectar os diferentes mRNAs, deve-se usar quatro primers degenerados que diferem somente na última base. Para aumentar a sensibilidade recomenda-se a utilização de RNA livre de contaminantes de DNA. A concentração ideal de RNA para análise é questionável visto que ainda não foi determinado o limite de sensibilidade da técnica para detectar os mRNA raros. Com relação a reproducibilidade, para minimizar a escolha das bandas falso positivas, as quais surgem a partir das reações de PCR, sugere-se a realização de amostras duplicadas a partir da reação de transcrição reversa (Liang et al., 1993).

Com o objetivo também de aumentar a reproducibilidade dos resultados e reduzir os falsos positivos na técnica "mRNA differential display", foi desenvolvida a técnica AP-PCR onde usa-se o mesmo primer arbitrário de 20 bases tanto na transcrição reversa (RT) bem como no PCR. Outro aspecto importante é o aumento na temperatura de anelamento (Zhao et al., 1995). Esta técnica apresenta como desvantagem a baixa probabilidade de que estes tipos de primers encontrem dois sítios complementares para anelamento dentro de uma distância que corresponda a 100-700 pares de bases.

Outro aspecto relacionado com a técnica "mRNA differential display" é a dificuldade de se obter fragmentos de cDNAs maiores que 500 pares de bases. A análise de "northern blot" é facilitada quando se usa fragmentos longos, porque nestes fragmentos haverá uma maior incorporação de nucleotídeos marcados em comparação com o fragmento de cDNA curtos. Além do mais, fragmentos compridos de cDNA podem hibridar com uma alta afinidade com mRNA. De acordo com Averboukh et al. (1996), fragmentos maiores que 1 kb podem ser obtidos pelo aumento da concentração de dNTPs para 20 μ M em combinação com as condições padrões para PCR (94°C, 30s; 40°C, 2min.; 72°C, 30s), ou pelo aumento do tempo de alongação para 90s ou mais, mantendo-se a concentração de dNTPs em 2 μ M. O aumento do tempo de alongação em detrimento ao aumento da concentração de dNTPs é o recomendado, pois

mantendo-se a concentração padrão de dNTPs, será preservada a fidelidade e especificidade da reação de PCR.

Um método alternativo de fase sólida para a técnica “mRNA differential display” foi desenvolvido para caracterizar a expressão gênica durante a diferenciação das células hematopoéticas imaturas. Utilizando-se primers de oligo(dT)MN biotinilados os mRNAs são acoplados a uma fase sólida contendo estreptoavidina, onde se procede a síntese da primeira fita de cDNA, e a reação subsequente de PCR (Rosok et al., 1996). Segundo os autores, a ligação do mRNA à fase sólida durante o procedimento da técnica, simplifica os passos de purificação, diminui a perda de amostras e permite o manuseio rápido do mRNA. A contaminação de DNA também é minimizada.

A técnica “mRNA differential display” foi utilizada para identificar e clonar genes que apresentam mudanças no padrão de expressão durante o desenvolvimento inicial dos frutos de tomate. Foram utilizados frutos com 10 e 20 dias de idade. Este é o período de ontogenia do fruto, quando há uma transição no seu crescimento, onde a expansão celular é predominante à divisão celular. Foram clonados e caracterizados o padrão de expressão de vários genes nas folhas, raízes e durante o desenvolvimento e amadurecimento nos frutos. Foi observado que o nível de mRNA correspondente a quatro clones foi aumentado entre frutos com 10 e 20 dias de desenvolvimento, enquanto dois clones tiveram um decréscimo na regulação durante este período (Tieman e Handa, 1996).

A mesma técnica também se mostrou eficiente no estudo do amadurecimento de frutos não climatéricos. Foram identificados cinco mRNAs com expressão elevada durante o amadurecimento de frutos de morango e três deles parecem ser específicos do fruto, com pouca ou nenhuma expressão detectada nos tecidos vegetais (Wilkinson et al., 1995). Visto que os produtos de PCR resolvidos no gel de poliacrilamida foram relativamente pequenos e devido a possibilidade de existirem vários produtos amplificados independentes próximos uns dos outros, não se tentou fazer a clonagem e o sequenciamento da banda original eluída. Ao contrário, as

bandas desejáveis que apresentaram ampliações diferenciais, foram usadas para isolar clones maiores presentes na biblioteca de cDNA de frutos maduros. Estes cDNAs foram utilizados para gerar sondas visando análise de RNAs e sequenciados para verificar homologia de seus nucleotídeos com as bases de dados disponíveis.

Outros métodos também tem sido utilizados para identificar genes que são expressos diferencialmente como seleção diferencial de bibliotecas de cDNA e hibridação subtrativa de bibliotecas de cDNA (Basset et al., 1990; Lee et al., 1990).

Na técnica seleção diferencial de bibliotecas de cDNA, há a necessidade de se construir bibliotecas de cDNA de populações de mRNA de plantas doentes, sadias ou de ambas populações. Para cada placa amostrada obtém-se membranas duplicadas que são hibridadas com sondas sintetizadas para as duas populações de mRNA e analisadas por autoradiografia. Placas que demonstrarem níveis de diferença na hibridação com as duas sondas representam mRNAs que são potencialmente expressos diferencialmente nas duas populações amostradas (Maser e Calvet, 1995).

Na hibridação subtrativa de bibliotecas de cDNAs, para isolar clones que representam genes com expressão específica em um tipo de célula, cDNAs fita simples são sintetizados usando populações de mRNA desta célula. Estes cDNAs são então hibridados em solução contendo mRNA de outro tipo de célula. As sequências de cDNA representando mRNAs expressos em comum serão hibridadas, enquanto aquelas que são únicas nas células de interesse permanecerão fita simples. Os híbridos são então removidos por uma variedade de técnicas, e os cDNAs fita simples (subtraídos) são recuperados e clonados (Maser e Calvet, 1995). Segundo os mesmos autores a grande desvantagem destas técnicas em comparação com "differential display" é a necessidade de se construir bibliotecas de cDNA. A construção de uma biblioteca de cDNA envolve muitos passos que incluem isolamento de mRNA poly(A)⁺, síntese da primeira fita de cDNA, conversão para fita dupla de cDNA, adição de ligantes ou adaptadores para clonagem dentro de um vetor (bacteriófago), ligação no vetor, empacotamento e infecção.

Seleção diferencial de bibliotecas de cDNA e hibridação subtrativa de bibliotecas de cDNAs são técnicas demoradas, de difícil manuseio e que requerem grandes quantidades de RNA (Rosok et al., 1996). Bauer et al. (1993) constataram que estas técnicas são principalmente qualitativas e não permitem detectar mudanças quantitativas na expressão gênica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido em duas etapas. A primeira etapa foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - CNPMS / EMBRAPA (Sete Lagoas - MG) e teve como objetivo a produção de anticorpos contra a proteína 23 kD e o desenvolvimento do teste imunológico "western blot" para a detecção precoce de plantas com declínio. A segunda etapa foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular de Citros do Departamento de "Plant Sciences" da Universidade do Arizona (U.S.A) e consistiu da caracterização funcional e estrutural da proteína de 23 kD e da obtenção de cDNAs específicos provenientes da expressão diferencial de genes nas plantas com declínio dos citros.

3.1 Testes imunológicos

3.1.1 Purificação de proteínas associadas com declínio dos citros

Os materiais biológicos foram obtidos de pomares comerciais, situados nos municípios de Lavras e de Alfenas, estado de Minas Gerais. As amostras de raízes foram coletadas de laranjeiras [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], cv. Valência, enxertadas nos porta-enxertos (*Citrus limonia* Osbeck), cv. Cravo, e tinham aproximadamente 15 a 16 anos de idade. Para distinguir plantas saudáveis de plantas afetadas pelo declínio dos citros, utilizou-se o método de injeção de água com seringa no tronco sob pressão (Lee et al., 1984). Coletou-se amostras de raízes com 1 a 2 cm de diâmetro de 15 plantas saudáveis e 15 plantas com declínio, que foram parafinadas nas extremidades, embaladas

em papel umedecido e colocadas em caixa de isopor para transporte. No laboratório manteve-se as amostras a 4°C, até a extração das proteínas.

Para a extração das proteínas presentes no xilema, as amostras de raízes com 1 a 2 cm de diâmetro foram cortadas com aproximadamente 10 cm de comprimento, e a casca de suas extremidades removidas. As extrações foram realizadas com o tampão de extração de proteínas PBS (pH 7.4), acrescido de 1% do agente redutor beta-mercaptoetanol e com o tampão Tris 1M (pH 7.5), de acordo com a metodologia descrita por Paiva (1993).

A eletroforese foi feita em géis desnaturantes contendo 12,5% de poliacrilamida e 0,1% de sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE). Os géis foram polimerizados com 1,5 mm de espessura em sistemas descontínuos (Laemmli, 1970), e a corrida se deu com o tampão contendo 0,192M Glicina + 0,025M Tris + 0,1% SDS. Os géis foram submetidos a carga elétrica de 12 mA durante a corrida no gel de concentração e em seguida a carga elétrica de 24 mA no gel de separação. O período total de corrida foi de aproximadamente 4 horas. A coloração dos géis foi feita em solução contendo 0,5% do corante Coomassie blue R-250 + 50% etanol + 10% ácido acético e a descoloração com uma solução contendo 10% ácido acético + 5% etanol.

Os pesos moleculares foram estimados pela comparação com padrões de proteínas de pesos moleculares conhecidos: albumina bovina (66kD), ovoalbumina (45kD), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36kD), anidrase carbônica (29kD), tripsinogênio (24kD), inibidor de tripsina da soja (20,1kD) e a lactoalbumina (14,2kD):

3.1.2 Produção e purificação de anticorpos

A escolha da proteína 23 kD para produção de anticorpos em detrimento da proteína 26 kD, ambas exclusivas de plantas com a anomalia (Paiva, 1993), foi feita

baseando-se no fato desta proteína ter sido encontrada em maior quantidade na maioria das plantas doentes

Os anticorpos policlonais monoespecíficos foram obtidos pela inoculação da proteína 23 kD em galinhas em fase de postura (Carrol e Stoller, 1983). Para isto, regiões do gel preparativo de poliácridamida contendo a proteína 23 kD foram cortadas, congeladas, liofilizadas e pulverizadas em nitrogênio líquido. Antes da imunização, ovos foram coletados para obtenção dos anticorpos pré-ímmunes e utilizados como controle. Aproximadamente 100µg da proteína 23 kD foi injetada subcutaneamente em diferentes posições abaixo da asa da galinha. A emulsão da primeira injeção aplicada foi obtida com 200µl do adjuvante de Freud completo e 800µl solução salina (NaCl) sob agitação vigorosa. Este processo foi repetido a cada duas semanas, exceto que a emulsificação do antígeno foi realizada na presença do Adjuvante de Freud incompleto. Uma semana após a última injeção, os ovos foram coletados diariamente e marcados para identificação.

Para a purificação dos anticorpos tomou-se cuidado especial para separar a gema da clara do ovo, lavando-a com água. O volume da gema medido através de proveta graduada foi despejado em um tubo de centrifuga. Neste mesmo tubo adicionou-se igual volume do tampão SP, pH 7,5 (10 mM fosfato, 0,1 M NaCl) com posterior agitação. Posteriormente adicionou-se outro volume igual do da gema de polietileno glicol (PEG) 10,5% agitando-se por 30 minutos. Em seguida o volume total foi centrifugado por 20 minutos a 10.750 rpm e o sobrenadante filtrado em gaze para outro tubo de centrifuga. O sobrenadante foi ajustado para PEG 12,5% pela adição de PEG 42% em tampão SP e agitado por 30 minutos. Posteriormente centrifugou-se por 20 minutos a 10.750 rpm. O pellet foi redissolvido em tampão SP e em sulfato de amônio 4M, ambos com volume igual ao da gema, sob agitação e incubado a 0°C por 30 minutos. Finalmente centrifugou-se a 10.750 rpm por 20 minutos e o pellet foi dissolvido no tampão fosfato 10 mM, pH 7,5, na quantidade de um quarto do volume da gema.

3.1.3 “Western blot”

A determinação do título do anticorpo e o diagnóstico de plantas infectadas pela anomalia foi feita através da técnica “western blot”. Esta técnica consiste basicamente na transferência de proteínas presentes num gel de eletroforese para uma membrana sólida (nitrocelulose ou PVDF).

Para a determinação do título dos anticorpos foram retiradas várias colunas de uma membrana contendo o antígeno imobilizado, as quais foram tratadas separadamente com várias diluições do anticorpo primário produzidos em galinha. Posteriormente foi adicionado o anticorpo secundário conjugado com a enzima fosfatase alcalina e finalmente os substratos, que indicaram através da precipitação de um produto colorido a ocorrência de reação entre os antígeno e o anticorpo. A diluição ideal do anticorpo primário (título 1:500) foi aquela em que se visualizou com maior nitidez a reação da proteína de interesse com anticorpo e aquela onde se visualizou o menor número de reações não específicas.

A técnica “western blot” também foi utilizada para diferenciar plantas saudáveis e doentes através de reação de cor visualizada em membranas. Os extratos do xilema das raízes de plantas saudáveis e de plantas afetadas pelo declínio dos citros foram coletados como descrito anteriormente. Para análise “western blot”, as proteínas presentes nos géis SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando-se o sistema de transferência semi-seco para mini-géis (BIO-RAD Laboratories), seguindo instruções dadas pelo fabricante. A transferência se deu a 100 volts por aproximadamente 1 hora. Após a transferência, a membrana foi lavada no tampão TTBS, pH 7,5 (20 mM Tris + 500 mM NaCl + 0.15% Tween), por 5 minutos. Posteriormente a membrana foi bloqueada por 30 minutos em solução de 3% leite desnatado em TTBS, sob agitação. Em seguida a membrana foi exposta durante a noite ao anticorpo primário na diluição de 1:500 em TTBS. Após, foram realizadas três lavagens com TTBS por 5 minutos cada. O anticorpo secundário (anti-galinha IgG conjugado com fosfatase alcalina), diluído 1:20.000 em TTBS foi adicionado e incubado

por 2 horas. Novamente, realizou-se três lavagens com TTBS por 5 minutos cada. Finalmente foi adicionado o reagente de coloração (50 μ l NBT + 125 μ l BCIP em 10 ml de solução contendo 100 mM Tris, pH 9,6, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) e agitado até o desenvolvimento da cor.

3.2 Focalização isoeétrica - IEF e "Dot blot"

O ponto isoeétrico da proteína 23 kD foi determinado utilizando-se o aparato Rotofor (Bio-Rad). O gradiente IEF foi estabelecido através da utilização de anfólitos na concentração de 2% (Servalyt 3-10, Serva, Biochemicals, Paramus, NJ) no tampão contendo 1mM Tris-HCl, 8 mM CHAPS (3-[(cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid), 5 mM β -mercaptoetanol em um volume total de 52 ml. A amostra contendo em torno de 500 μ g de proteína total foi desalinizada utilizando-se três volumes de acetona e o precipitado obtido após centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos foi ressuspenso em 2ml de tampão contendo 40 μ l de anfólitos + 8 μ l de β -mercaptoetanol e em seguida injetado no orifício central do aparato. A focalização no Rotofor deu-se à uma potência constante de 12 W, gerando corrente de 500 a 1500 V, a uma temperatura de 4°C. A coleta das amostras foi realizada 30 minutos após a estabilização da voltagem o que se deu aproximadamente 4 horas após a adição das proteínas. O pH das 20 amostras coletadas foi determinado. A identificação da proteína 23 kD entre as 20 frações coletadas se deu através da técnica "dot blot". Primeiramente a membrana de PVDF foi hidratada em metanol 100% e depois lavada em tampão TTBS antes de ser colocada dentro do aparato. Em seguida foi aplicado 100 μ l do tampão TTBS em cada canaleta removendo-o gentilmente pela aplicação de vácuo. Após, adicionou-se 100 μ l de cada amostra obtida por focalização isoeétrica em diferentes canaletas, submetendo-se novamente o sistema a vácuo. Os procedimentos para visualização das reações imunológicas na membrana foram semelhantes aos passos utilizados na técnica "western blot", exceto que a concentração do anticorpo primário foi de 1:100 no tampão TTBS.

3.3 Efeito de diferentes tipos de estresse no acúmulo da proteína 23 kD

Os efeitos do estresse osmótico, da deficiência de Zn e de ferimento mecânico na acumulação da proteína 23 kD, foram verificados no porta-enxerto "Macrophylla" com 3 meses de idade. Para cada tratamento utilizou-se três plantas que foram estabelecidas em recipientes contendo 7 litros de areia/vermiculita/perlite na proporção 1:1:1.

O estresse osmótico foi obtido pela irrigação com duas soluções, sendo uma, a solução meia força de Hoagland (pH 6,0) (Hoagland e Arnon, 1950) contendo 144g PEG/l e a outra, uma solução contendo 55g PEG/l (pH 6,0) [PEG =3D "Carbowax 3350" (Fisher Scientific)]. Aplicou-se alternadamente dois litros de cada solução nas quarta e sextas-feiras de cada semana por um período de seis meses. Após seis meses de tratamento com PEG, o potencial no xilema medido por bombas de pressão, indicou níveis variando entre -13 à -18 bars. As plantas controles apresentaram potencial no xilema variando entre -4 à -8 bars. O crescimento obtido pelas plantas submetidas ao tratamento com PEG foi de aproximadamente 70% em relação ao crescimento observado nas plantas utilizados como controle.

A deficiência de Zn foi obtida através da irrigação semanal das plantas com solução meia força de Hoagland sem Zn alternada com água deionizada. Após seis meses de tratamento as plantas com deficiência de Zn apresentaram concentração de Zn variando entre 3-7 μ g/g, enquanto que as plantas controles apresentaram concentração de Zn variando entre 17-21 μ g/g.

O estresse de ferimento foi obtido através da perfuração da quarta folha madura com o próprio espinho da laranjeira (em média 30 perfurações) ou através da maceração das bordas do mesmo tipo de folha com o uso de alicate. Após 24 horas as folhas submetidas a ferimento e as folhas adjacentes foram colhidas separadamente.

Todas as amostras foram mantidas a -80°C para subsequente extração protéica. Para extração protéica as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas na presença de 1ml do tampão contendo 50mM Tris, pH 7,5 + 5mM β -mercaptoetanol + 5% PVPP.

3.4 “Garden blot”

Para verificar se a proteína 23 kD é específica da espécie citros, procurou-se identificar a presença da mesma em extratos protéicos de folhas de plantas de tomate, feijão, milho, mamona e abóbora com três semanas de idade e em folhas de plantas adultas de pêssigo, todas cultivadas em condições controladas. Para a indução da proteína 23 kD, algumas folhas destas plantas foram submetidas a ferimentos mecânicos, semelhantes aos descritos anteriormente.

3.5 Determinação da composição e da sequência de aminoácidos da proteína 23 kD.

A proteína 23 kD foi separada em SDS-PAGE e transferida via “western blot” para membrana PVDF, segundo metodologia descrita anteriormente. Após a transferência a membrana foi lavada brevemente em água destilada e em seguida saturada em metanol 100% por poucos segundos. A identificação da proteína 23 kD na membrana deu-se através da coloração da mesma em solução contendo 0,1% do corante coomassie blue + 1% ácido acético + 40 % metanol e a descoloração em solução contendo 50% metanol. Posteriormente a membrana foi lavada em água destilada, seca a temperatura ambiente e as bandas de interesse foram recortadas. As regiões seccionadas da membrana contendo a proteína de interesse foram então envolvidas primeiramente em papel celofane e depois em papel de alumínio. Estas amostras foram mantidas a -20°C até a análise da sequência. A composição aminoacídica da proteína 23 kD foi obtida no Laboratório para Sequenciamento e

Análise de Proteína da Universidade do Arizona utilizando-se o analisador de aminoácido ABI 420 A/H. A proteína foi hidrolizada em 6N HCl a 155°C por 75 minutos, e depois derivatizada com fenilisotiocionato para formar derivados feniltiocabamil os quais foram extraídos e transferidos para análise em HPLC a 254 nm. A hidrólise DMSO foi requerida para determinação de cisteína como ácido cisteico (Spencer e Wold, 1969). Os resultados foram baseados na combinação de duas hidrólises.

A sequência N-terminal da proteína purificada 23 kD foi analisada no Laboratório para Sequenciamento e Análise de Proteínas da Universidade do Arizona usando o sequenciador proteína/peptídeo "Applied Biosystem 477A (Edman Chemistry) intercalado com analisador HPLC 120A [coluna C-18 feniltiohidanton (PTH) cromatografia de fase reversa] para determinar aminoácido PTH.

3.6 Expressão diferencial de genes nas plantas com declínio dos citros observada pela técnica "mRNA differential display".

3.6.1 Obtenção e análise do RNA total

Foram extraídos RNAs totais de folhas e cascas do tronco de plantas saudáveis e com declínio dos citros segundo metodologia similar à desenvolvida por Russel e Sachs (1989). A qualidade do RNA total extraído foi analisada por visualização em géis com 1.2% agarose.

3.6.2 Produção dos cDNAs

Para eliminar possível contaminação de DNA na amostra, dez microgramas de RNA total foram tratados com 10 µl de DNase I (Gibco BRL - Amp Grade, 1U/µl) durante 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida a enzima foi inativada com 1µl de EDTA 25mM e a reação foi incubada a 65°C por 10 minutos. Para

a reação de transcrição reversa, ou seja, para obtenção dos cDNAs, foram utilizados 5µg de RNA total, livre de DNA, 1µl do primer de ancoragem 3' (5'CGTGAATTCGGTT₁₁A) na concentração de 100µM e 20µM de cada deoxinucleotídeo dATP, dCTP, dGTP, dTTP. A reação foi incubada a 70°C por 10 minutos e em seguida a 42°C por 2 minutos antes da adição de 200 unidades da enzima transcriptase reversa SuperScript II (Gibco BRL). A mistura foi incubada a 42°C por mais 50 minutos antes da finalização que se deu através do aquecimento a 70°C por 15 minutos. Para a síntese das fitas duplas de cDNAs e consequente amplificação dos mesmos, utilizou-se na reação de PCR, 2µl da reação transcrição reversa, 1X do tampão de PCR (200mM Tris-HCl pH 8.4; 500mM KCl), 2µM de cada dNTP, 1.5mM MgCl₂, 0.2µM do primer arbitrário 5' (5'CGTGGATTCAGCCAGCGAA), 1µM do primer de ancoragem 3' (5'CGTGAATTCGGTT₁₁A), 2µCi α-³³P-dATP e 1U da enzima Taq DNA polimerase (Gibco BRL). A reação foi submetida uma vez a um ciclo de 94°C por 1 minuto, 40°C por 4 minutos, 72°C por 1 minuto; quarenta vezes a ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 2 minutos, 72°C por 1 minuto e finalizada por um ciclo a 72°C por 10 minutos no termociclador Ericomp (modelo EZ cycler).

3.6.3 Eletroforese em gel de sequenciamento

Para a separação dos fragmentos de PCR utilizou-se 5µl da reação de PCR e 3µl do tampão contendo 95% formamida, 20mM EDTA, 0.05% bromophenol blue e 0.05% xylene cianol. A amostra foi fervida por 5 minutos, esfriada no gelo e submetida a eletroforese em um gel de sequenciamento contendo 6% de acrilamida e 7M de uréia. A corrida se deu com o tampão TBE (90mM Tris, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA pH 8.0) a uma voltagem de 1400 Volts até que o corante xylene cianol atingisse o final do gel. O gel foi então coberto com Saran Wrap (Dow Chemical Company, Midland, MI, USA), seco a 80°C por 2 horas e em seguida exposto por 48 horas à autoradiografia em filme de raio-X (Fuji Film Rx).

3.6.4 Isolamento, reamplificação dos produtos de PCR e clonagem

Os fragmentos do gel de acrilamida correspondentes às bandas de PCR de interesse apresentadas no filme de raio-X foram recortados e colocados em 100 μ l de água bidestilada por 10 minutos e em seguida fervidos por 15 minutos. Centrifugou-se por 2 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Adicionou-se 10 μ l de 3M NaOAc, 5 μ l de glicogênio (10mg/ml) e 450 μ l de etanol 100%. O material foi mantido no gelo por 30 minutos e para obter o pelete de DNA foi centrifugado à 14.000 rpm, a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o pelete foi lavado com 200 μ l de etanol gelado na concentração de 85%. O pelete foi dissolvido em 10 μ l de água bidestilada e 5 μ l foram utilizados na reação de reamplificação. Na reamplificação repetiu-se o mesmo procedimento utilizado para obter e amplificar a fita dupla de cDNAs, com exceção que não se utilizou radioisotopo e a concentração de dNTP foi aumentada para 20 μ M. Para confirmar a amplificação dos fragmentos de DNA foi feita eletroforese do produto da reação em um gel contendo 1.5% de agarose. Os fragmentos reamplificados de cDNA foram clonados pelo método padrão (Sambrook et al., 1989) no vetor pBluescript (Stratagene, La Jolla, Ca).

4 RESULTADOS

Apesar dos termos declínio e “blight” corresponderem à mesma anomalia, considerou-se nos itens resultados e discussão o termo declínio para se referir as amostras coletadas de plantas localizadas no Brasil e o termo “blight” para as amostras coletadas de plantas localizadas nos Estados Unidos.

4.1 Expressão da proteína 23 kD encontrada nas plantas afetadas pelo declínio dos citros

O título dos anticorpos obtidos contra a proteína 23 kD, bem como o “screening” de materiais foram obtidos pela técnica “western blot”. Para evitar o problema de reações não específicas, várias diluições do anticorpo primário foram testadas. O título 1:500 foi aquele que proporcionou maior especificidade e nitidez nas reações. Dessa forma, para todos os testes “western blot” subsequentes, o anticorpo primário foi utilizado na diluição 1:500.

Com objetivo de verificar se a proteína 23 kD está realmente ausente em plantas saudáveis e se a mesma pode ser utilizada como marcador molecular relacionado à anomalia, extratos protéicos de plantas saudáveis, doentes, e da proteína 23 kD isolada, foram testados mediante a utilização dos anticorpos anti-23kD no teste “western blot”. Como pode ser observado na Figura 2, as reações imunológicas entre os anticorpos e a proteína 23 kD, foram específicas para a amostra que contém proteína total extraída de plantas com declínio (D) e para a amostra que contém somente a proteína 23 kD (P). Não houve reação visível nas amostras que contém proteína total extraída de planta saudável (S). A reação positiva somente nas amostras cujos extratos contêm a proteína 23

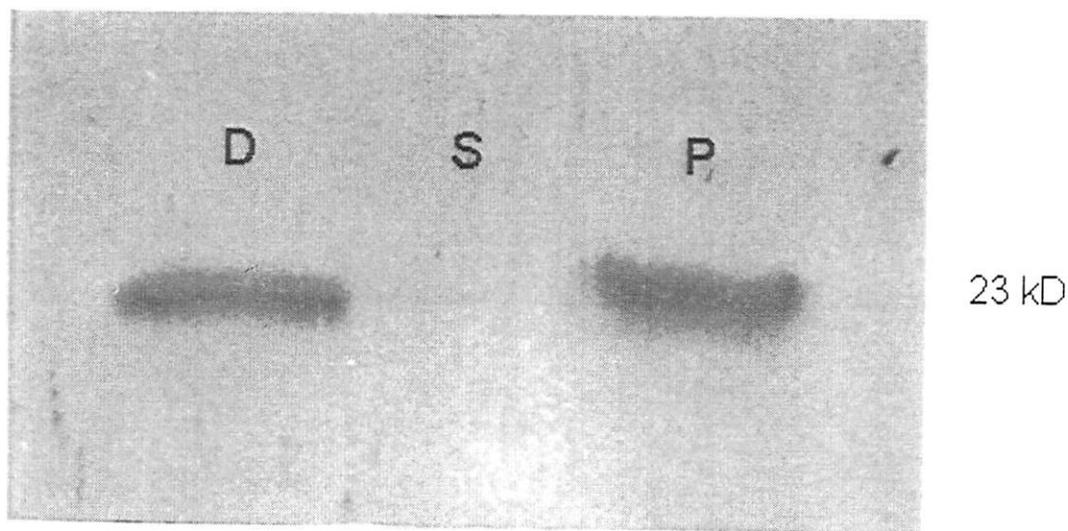


Figura 2 - Padrão imunológico obtido pela técnica "western blot" mostrando a especificidade do anticorpo policlonal anti-23 kD para a proteína 23 kD. (D) extrato de proteína total dos vasos lenhosos de raízes de plantas com declínio dos citros, (S) extrato de proteína total dos vasos lenhosos de raízes de plantas saudáveis e (P) extrato da proteína 23 kD isolada.

kD, indica que os anticorpos policlonais são monoespecíficos, mostrando-se eficientes como marcadores para diferenciação entre plantas saudáveis e doentes. Estes anticorpos também foram capazes de identificar a proteína 23 kD em mudas de citros com apenas 18 meses de idade. Estas mudas foram avaliadas antes mesmo de serem plantadas no campo. Este resultado além de demonstrar a eficiência dos anticorpos em detectar precocemente plantas com declínio dos citros, mostra também que a proteína 23 kD é sintetizada bem antes do desenvolvimento dos sintomas visuais, os quais normalmente ocorrem em plantas com mais de 5 anos de idade.

O ponto isoelétrico da proteína 23 kD foi obtido através da separação das proteínas totais extraídas de vasos lenhosos de raízes de plantas doentes pela técnica da focalização isoelétrica (IEF). As 20 frações coletadas apresentaram pH variando entre 1,8 a 11,7. A análise imunológica das 20 frações obtidas pelo teste "dot blot" (Figura 3), mostrou reação positiva forte entre os anticorpos e a proteína 23 kD na fração 1 (pH 1,8) e uma reação fraca na fração 2 (pH 3,7), quando comparado com os controles. Baseado neste resultado, verificou-se que a proteína 23 kD possui ponto isoelétrico muito ácido, próximo a 1,8.

A proteína 23 kD também foi analisada quanto à sua distribuição em folhas de plantas com "blight". O extrato de proteína total foi obtido a partir de três tipos de amostras, sendo elas, folha intacta, lâmina (folha cuja nervura principal foi removida) e nervura principal. Como pode ser observado na Figura 4, houve reação positiva nos três tipos de amostras de plantas com "blight", porém uma reação mais forte foi observada no extrato obtido a partir da amostra da lâmina da folha. Não foi verificada reação positiva visível nos mesmos tipos de amostras extraídas de plantas saudáveis, utilizadas como controle. Este resultado demonstra que a proteína 23 kD está dispersa no tecido foliar e não é específica dos vasos lenhosos.

Com o objetivo de verificar se a proteína 23 kD é acumulada em plantas afetadas por outras anomalias, avaliou-se através dos anticorpos anti-23 kD a presença da proteína 23 kD em extratos protéicos de raízes de plantas que se encontravam no

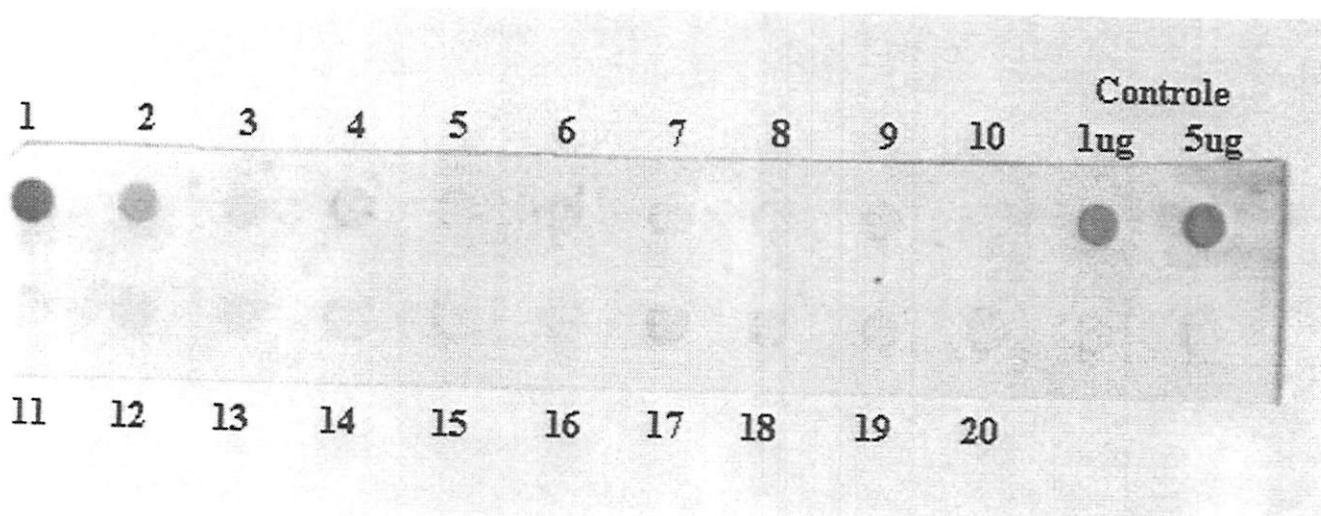


Figura 3 - Análise "dot blot" de proteínas totais, nativas, obtidas do extrato do xilema de raízes de plantas com "blight" e fracionadas por focalização isoeétrica. As 20 frações coletadas apresentaram gradiente de pH entre 1,8 a 11,7. Como controle positivo foram utilizadas duas concentrações (1µg e 5µg) da proteína total extraída dos vasos lenhosos de plantas doentes.

BLIGHT			SADIA		
Folha	Lam.	Nerv.	Folha	Lam.	Nerv.

Figura 4 - Análise "western blot" da distribuição da proteína 23 kD em folhas de plantas com "blight" (colunas 1-3) e em folhas de plantas sadias (colunas 4-6). Colunas 1 e 4, folha intacta; colunas 2 e 5, folha cuja nervura principal foi removida e colunas 3 e 6, nervura principal.

estádio inicial do “blight” (B), em plantas no estágio avançado da anomalia “macrophylla decline” (MD) e em plantas no estágio avançado do declínio dos citros (D) (Fig. 5). Embora a quantidade de proteína total analisada tenha sido a mesma para as três amostras, observa-se que a proteína 23 kD está presente em menores proporções no extrato de plantas no estágio inicial do “blight”, em proporções medianas no extrato de plantas com “macrophylla decline” e em maiores proporções em plantas com declínio. Este resultado demonstra que a proteína 23 kD está presente em plantas afetadas pelo declínio dos citros/blight e em plantas afetadas pelo “macrophylla decline”, ou seja, em plantas afetadas por diferentes anomalias.

4.2 Efeito de diferentes tipos de estresses no acúmulo da proteína 23 kD

Baseado no fato de que a proteína 23 kD ter sido encontrada em plantas afetadas por diferentes anomalias, foi feito um estudo para verificar o possível efeito de diferentes tipos de estresses no seu acúmulo. Para tal, plantas cítricas com três meses de idade foram submetidas ao estresse hídrico pelo tratamento com polietileno glicol (PEG), ao estresse nutricional pelo tratamento com soluções sem Zn e ao estresse mecânico pelo ferimento de folhas através de perfuração e maceração foliar. Na Figura 6, pode-se observar através de reação imunológica a presença da proteína 23 kD em grandes quantidades em amostras de plantas submetidas ao ferimento mecânico de perfuração (coluna 5), de maceração (coluna 7), nas amostras de folhas adjacentes àquelas submetidas aos ferimentos (coluna 6 e 8) e na amostra de proteínas de raízes de plantas com “blight”, utilizada como controle positivo (coluna 9). Verificou-se também uma pequena quantidade da proteína 23 kD na amostra obtida a partir de folhas submetidas ao estresse hídrico (coluna 2), e ausência da mesma nas amostras utilizadas como controles negativos (colunas 1 e 4) e na amostra de folha submetida ao estresse nutricional (coluna 3). Este resultado indica que a síntese da proteína 23 kD pode ser induzida quando as plantas sofrem ferimentos mecânicos. A presença da proteína 23 kD nas folhas adjacentes àquelas submetidas ao estresse demonstra também que a proteína 23 kD possui propriedade sistêmica.

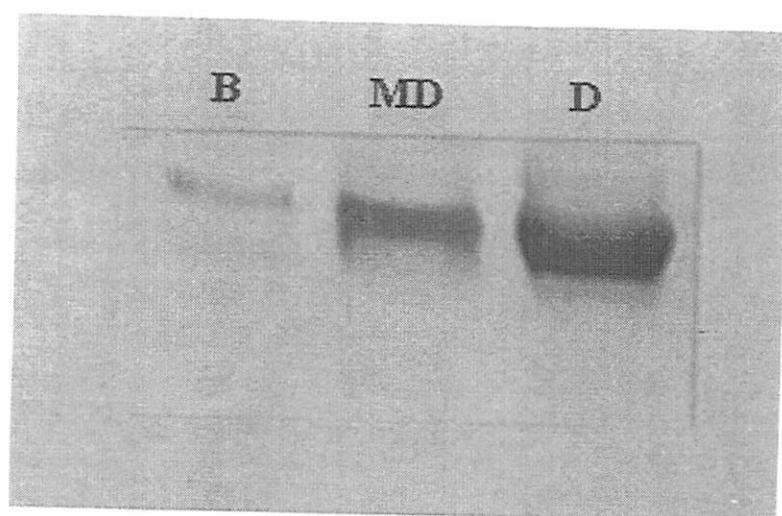


Figura 5 - Análise "western blot" mostrando reações imunológicas positivas da presença da proteína 23 kD em extratos protéicos de raízes de plantas com sintomas iniciais da doença "blight" (B) de plantas com "macrophylla decline" (MD) e de plantas com declínio dos citros (D).

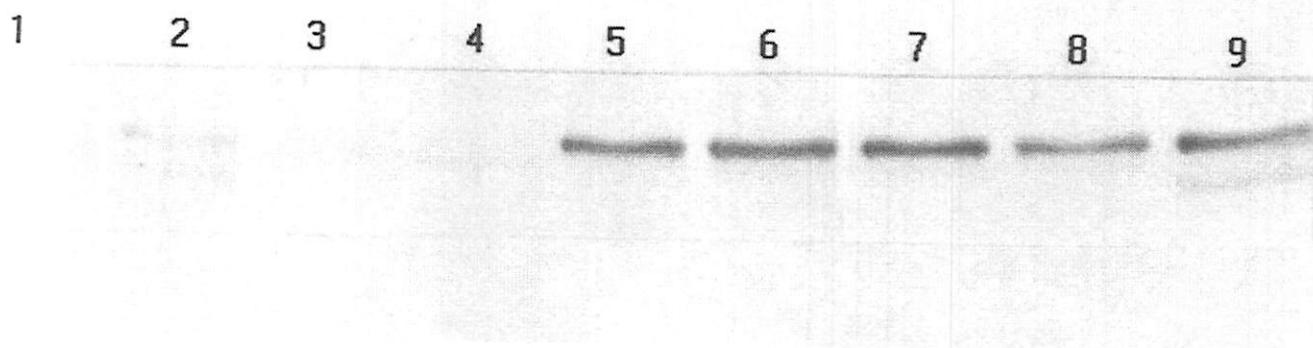


Figura 6 - Análise "western blot" da expressão da proteína 23 kD em folhas de plantas cítricas sadias submetidas a diferentes tipos de estresses. 1 e 4 - controle negativo; 2 - estresse hídrico; 3 - folhas com deficiência de Zn; 5 - folha perfurada; 6 - folhas adjacentes àquela perfurada; 7 - folhas com as bordas maceradas; 8 - folhas adjacentes àquela macerada; 9 - controle positivo.

Com base nas informações obtidas de que a proteína 23 kD está presente em folhas de plantas submetidas a ferimentos (Figura 6), levantou-se a suspeita com relação à sua especificidade para as espécies cítricas. Para averiguar se a proteína 23 kD é realmente específica de espécies cítricas, folhas de plantas de tomate, feijão, mamona, milho e abóbora submetidas a estresse mecânico foram analisadas com o anticorpo anti-23 kD. Não foi observada nenhuma reação positiva nas plantas avaliadas (dado não apresentado). No entanto, reações positivas foram observadas quando se analisou folhas de pessegueiro submetidas aos mesmos tipos de ferimento. Como pode ser observado na Figura 7, a proteína 23 kD está presente no extrato protéico obtido à partir da folha de pessegueiro perfurada (B) bem como das folhas adjacentes localizadas acima (A) e abaixo (C) daquela submetida ao ferimento, sendo que a maior concentração foi observada nas folhas submetidas ao ferimento. Não houve reação positiva visível no extrato protéico obtido de folhas da planta que não foi submetida ao ferimento mecânico (S). Este resultado confirma a síntese da proteína em resposta ao ferimento, sugerindo porém que a sua expressão em resposta a este estímulo poderá estar relacionada com as plantas lenhosas.

Baseado em algumas características da proteína 23 kD, como ponto isoelétrico extremamente ácido e baixo peso molecular, suspeitou-se de que a mesma fosse semelhante à enzima quitinase ácida, extraída de *Pinus*, a qual apresenta ambas características descritas para a proteína 23 kD. Para testar esta hipótese, extratos protéicos de raízes de plantas com "blight" (B) de plantas sadias (S) e de folhas de plantas sadias submetidas a ferimento (F), foram analisadas para verificar se os anticorpos produzidos para a enzima quitinase ácida reconheceria a proteína 23 kD (Figura 8). Como pode ser observado, estes anticorpos reconheceram a enzima quitinase ácida utilizada como controle positivo (C) e as proteínas 43 e 31 kD presentes no extrato total de plantas com "blight" e plantas sadias. Como não houve reação positiva na região da proteína 23 kD no extrato de folha submetida ao ferimento e em folhas de plantas com "blight", deduz-se que a proteína 23 kD não se assemelha à enzima quitinase ácida de *Pinus*.

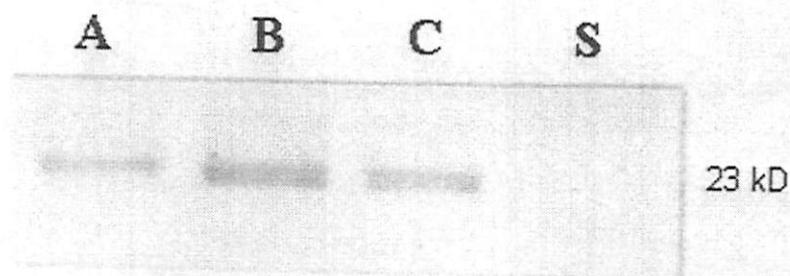


Figura 7 - Análise "western blot" da expressão da proteína 23 kD na folha de pessegueiro submetida ao estresse mecânico através da perfuração da folha com espinho(B) na folha adjacente localizada acima (A) e abaixo (C) daquela submetida a ferimento e na folha de planta não submetida a ferimento (S).

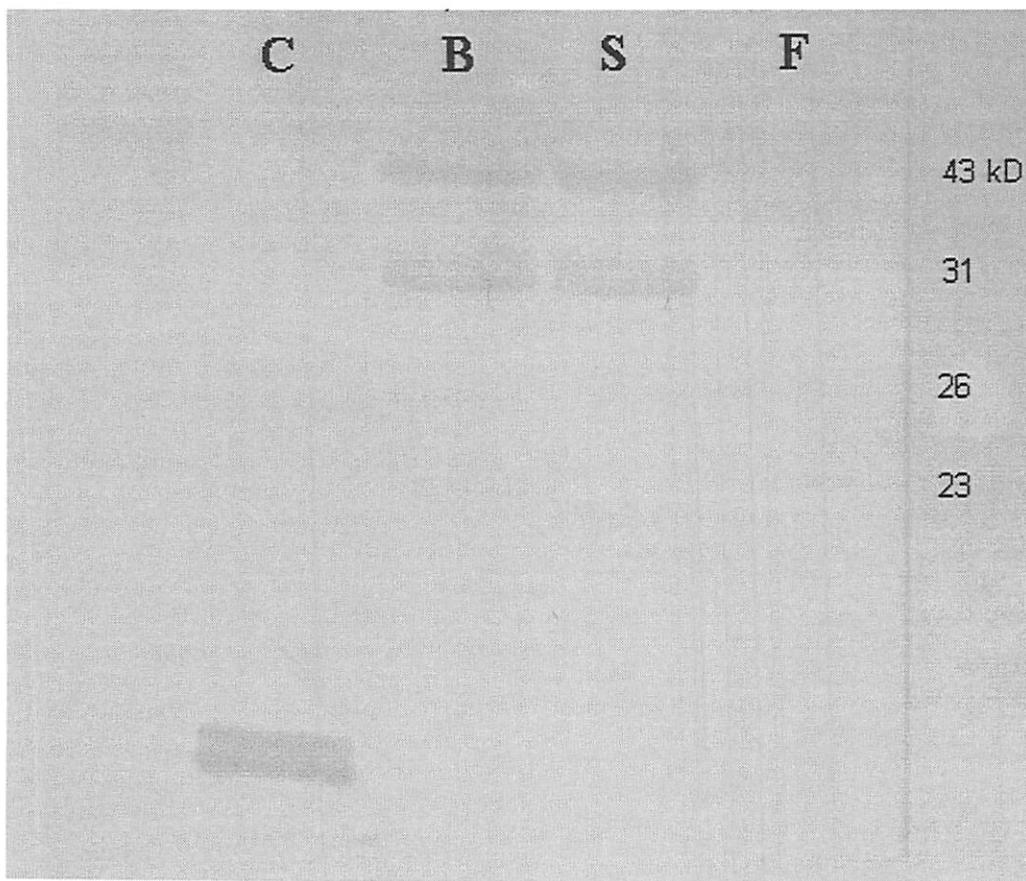


Figura 8 - Análise "western blot" do extrato de proteína total de raízes de plantas com "blight (B), de plantas saudáveis (S) e de folhas submetidas a fermentação (F) (30 perfurações com espinho) com anticorpo produzido contra quitinase ácida extraída de pinus. (C) controle positivo, enzima quitinase ácida purificada.

4.3 Análise da composição e da sequência de aminoácido da proteína 23 kD

A proteína 23 kD foi purificada e a sua sequência foi determinada a partir do terminal amino. Os 11 resíduos de aminoácidos obtidos a partir do terminal amino foram ALA, GLY, ASP, ILE, THR, ASN, ASN, SER, PRO, ASP, THR. A análise desta sequência pelo programa "Blast search" não encontrou similaridade significativa com proteínas catalogadas nos principais bancos de dados. A maior similaridade obtida foi de 35% com a enzima Acilhidrolase Triacilglicerol (E.C.3.1.1.3).

A composição aminoacídica da proteína 23 kD é apresentada no Quadro 1. Como pode ser observado a proteína 23 kD possui alta concentração dos aminoácidos ácidos tais como, ácido glutâmico (até 20,06%), ácido aspártico (até 6,39%) e dos aminoácidos não polares como glicina (12,70%), alanina (15,58%), valina (10,03%), além de apresentar relativamente baixa concentração dos aminoácidos básicos como histidina (0,86%), arginina (2,26%) e lisina (3,69%). Na sua composição não foram encontrados os aminoácidos triptofano, metionina e cisteína. A alta concentração de aminoácidos ácidos na composição da proteína 23 kD pode explicar a sua presença no extrato com pI em torno de 1,8 obtido à partir da focalização isoeletrica (Figura 3).

4.4 Identificação de cDNAs específicos de plantas com declínio dos citros através da técnica "mRNA differential display"

Para verificar a expressão gênica diferencial entre plantas sadias e plantas com declínio dos citros, foi inicialmente testada a possibilidade de não se utilizar materiais radioativos na visualização dos fragmentos de cDNAs obtidos pela técnica "mRNA differential display". A idéia era utilizar um método mais simples, rápido, seguro e menos oneroso. Para tal, os cDNAs amplificados obtidos na ausência de isótopos marcados foram separados em gel contendo 6% de poliacrilamida e submetidos a coloração com brometo de etídio e com nitrato de prata segundo metodologia

QUADRO 1. Composição aminoacídica da proteína 23 kD

Aminoácido	Mol (%)
Ácido glutâmico	20,06
Alanina	15,58
Glicina	12,70
Valina	10,03
Ácido aspártico	6,39
Prolina	5,51
Fenilalanina	5,43
Isoleucina	5,18
Leucina	4,46
Lisina	3,69
Serina	2,91
Treonina	2,47
Tirosina	2,42
Arginina	2,26
Histidina	0,86

desenvolvida por Bassam et al., (1991). O melhor resultado obtido, mostrou que a resolução e a sensibilidade deste procedimento não foram suficientes para diferenciar as plantas sadias das doentes (dados não apresentado). Portanto para obter melhor resolução e sensibilidade, foi decidido que o uso de radioisótopo era indispensável.

O perfil comparativo de mRNAs obtidos de folhas e cascas de plantas sadias e doentes usando ^{33}P -dATP na técnica "mRNA differential display" pode ser visto na Figura 9. Nesta análise cada reação foi repetida duas vezes para verificar reprodutibilidade. Este estudo não identificou no tecido foliar diferenças consistentes de cDNAs entre plantas sadias e com declínio dos citros quando se utilizou o primer arbitrário 5' (5'CGTGGATTTCAGCCAGCGAA), e o primer de ancoragem 3' (5'CGTGAATTCGGTT₁₁A). No entanto, no tecido casca do tronco, quando se utilizou o mesmo conjunto de primers, foi observada a presença de oito bandas nas plantas com declínio dos citros que estão aparentemente ausentes nas plantas sadias. Os mRNAs identificados parecem ser específicos do tecido casca, com pouca ou nenhuma expressão detectada nas folhas.

As oito bandas marcadas apresentadas na Figura 9, foram excisadas do gel seco, eluídas em tampão e reamplificadas. Após a reamplificação foi verificado que uma simples banda apresentada no gel de sequenciamento continha mais de uma espécie de DNA, o que reflete no aparecimento de múltiplas bandas, como pode ser facilmente verificado na Figura 10, para os clones 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Para a clonagem no plasmídeo pBluescript e transformação no hospedeiro XL1 Blue utilizou-se as bandas mais nítidas. Foi determinada a sequência de nucleotídeos do clone cDNA 1 com expressão aparentemente exclusiva em plantas com declínio dos citros (Quadro 2). Esta sequência, ou região codificadora identificada, foi comparada com dados da base "GenBank" para identificar possíveis similaridades. Buscas de dados com sequências parciais deste clone, não identificaram nenhuma similaridade significativa ao nível de nucleotídeo ou aminoácido.

Figura 9 - Autorradiograma exibindo cDNAs detectados pela técnica "mRNA differential display". Os RNAs totais extraídos de folhas e cascas de plantas saudias (S) e com declínio dos citros (D) foram submetidos a transcrição reversa com o primer 3' (5'CGTGAATTCGGT₁₁A) e os cDNAs resultantes foram amplificados por PCR na presença de ³³P-dATP usando o mesmo primer 3' e o primer 5' (5'CGTGGATTCAGCCAGCGAA). Os produtos de PCR foram separados em gel de sequenciamento contendo 6% acrilamida e 7M de uréia. O gel foi em seguida desidratado e exposto a filme raio-X. Traços indicam bandas de cDNAs correspondentes a mRNAs com expressão aparentemente exclusiva em plantas com declínio dos citros.

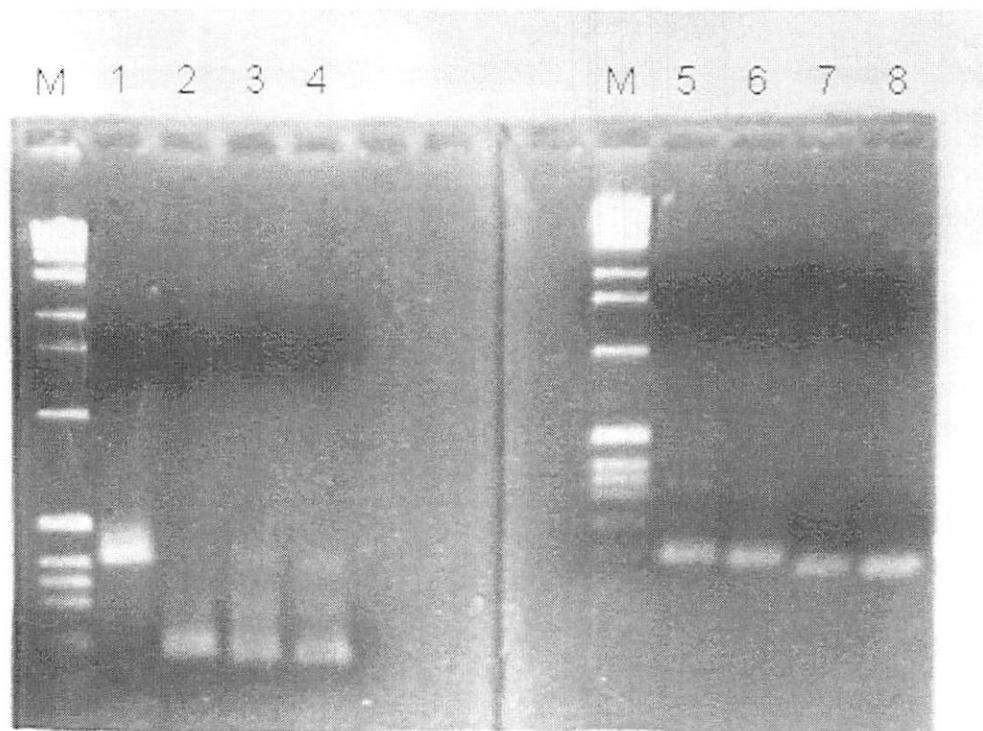


Figura 10 - Gel de agarose 1,5%, exibindo cDNAs reamplificados exclusivos de plantas com declínio dos citros e a presença de contaminantes. Os cDNAs correspondentes às bandas de PCR de interesse visualizadas no filme raio-X foram eluídos e reamplificados por PCR na presença do primer 3' (5'CGTGAATTCGGT₁₁A) e do primer 5' (5'CGTGGATTCAGCCAGCGAA) e na ausência de radioisótopo. M representa marcador molecular e 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 os fragmentos reamplificados enumerados de acordo com a ordem decrescente de tamanho.

Quadro 2 - Sequência nucleotídica do clone cDNA1 obtido à partir da técnica "mRNA differential display"

Clone cDNA1

CCTAGGTCGGTCGCCTTCTACCGTCGAAGACTATAAACAGTATTGTAAACCTTCCG
TTATTTAAACACTACCTATAACCCATAAGAAAGAAGTCTACTGTTTAGATTGAACAA
ACACTAACTACGAAGAACACTTAGGAAAGCAAACGGAACACATAAACTTAACGGT
ACAAACAAAGACATTTTCGACATTGGAAGTATACACTGTATAGTTCAATAAATAACAT
CAAGATTTAAAGGCCAGATTTTTTTTTTTT

Os clones de cDNAs individuais correspondentes às oito bandas selecionadas foram isolados e poderão ser utilizados para produção de sondas visando verificar via análise de RNA (Northern blot) a autenticidade da expressão diferencial.

5 DISCUSSÃO

Várias mudanças fisiológicas e bioquímicas tem sido reportadas associadas ao declínio dos citros (Giroto, 1990; Taylor et al., 1988; Brlanskly et al., 1984). As mudanças bioquímicas são representadas pelo surgimento de proteínas específicas da anomalia (Derrick et al., 1990; Paiva, 1993), as quais aparentam ser um dos primeiros sintomas apresentados pelas plantas afetadas pelo declínio.

Baseado no fato de que estas proteínas são exclusivas da anomalia, elas se tornam possíveis marcadores moleculares para a caracterização e diagnose precoce do declínio dos citros, devido à relação direta que possuem com a anomalia. No presente estudo foi produzido anticorpo policlonal para a proteína 23 kD visando o desenvolvimento e a utilização de um teste imunológico que permita o diagnóstico do declínio antes mesmo do aparecimento dos sintomas visuais, o que é de grande interesse científico e econômico.

Através da análise das proteínas de plantas sadias e doentes no teste “western blot” (Figura 2), verificou-se que os anticorpos policlonais produzidos para a proteína 23 kD se mostraram eficientes na discriminação de plantas afetadas. Este resultado está de acordo com as informações contidas na literatura, onde padrões protéicos específicos e anticorpos produzidos contra a proteína de 12 kD exclusiva do “blight” utilizada no teste “western blot” se mostraram eficientes no diagnóstico precoce (Derrick et al. 1991; Bausher e Sweeney, 1991; Paiva, 1993).

A detecção da proteína 23 kD em plantas com apenas 18 meses de idade utilizando-se os anticorpos policlonais anti-23kD no teste “western blot”, evidencia a sensibilidade que estes anticorpos possuem, visto que possibilitam o diagnóstico da

anomalia no seu estágio incipiente, ou seja, bem antes das plantas começarem a demonstrar os sintomas visuais que normalmente ocorrem em plantas com mais de cinco anos de idade. Várias são as vantagens de se fazer o diagnóstico de plantas pré-sintomáticas, destacando-se entre elas a possibilidade de se desenvolver um programa de monitoramento das plantas infectadas (assintomáticas e/ou pré-sintomáticas) no pomar e monitoramento de trabalhos de melhoramento visando obtenção de porta-enxertos tolerantes ao declínio dos citros.

A presença da proteína 23 kD em plantas jovens ou em mudas que não chegaram a ser plantadas a nível de campo, pode ser um indício da possibilidade de se propagar o declínio via enxertia de borbulhas. No entanto, os dados obtidos por Wutscher et al. (1983), apresentam constatações contrárias a esta hipótese. Estes autores tentaram propagar o "blight" via enxertia de borbulhas e verificaram após 12 anos a impossibilidade de se distinguir visualmente as plantas saudáveis das do declínio dos citros e não observaram diferenças no tamanho das plantas, nas concentrações de Zn no lenho, na casca e de fenólicos solúveis no lenho. Apesar de se verificar falhas na propagação do "blight" via enxertia de borbulhas, sucesso tem sido demonstrado na transmissibilidade da anomalia quando se realiza enxertia de raízes (Tucker et al., 1984).

É importante mencionar que os anticorpos policlonais obtidos no presente trabalho foram produzidos contra a proteína 23 kD isolada apenas por SDS-PAGE. Como em SDS-PAGE as proteínas são separadas somente de acordo com o peso molecular, havia dúvida com relação à pureza da proteína utilizada para a produção de anticorpos. Para esclarecer melhor esta dúvida as proteínas totais extraídas dos vasos lenhosos de raízes de plantas doentes foram fracionadas por focalização isoeletrica e analisadas pela técnica "dot blot" (Figura 3). A presença de reação imunológica em apenas duas frações em faixas adjacentes de pH, é um forte indício que os anticorpos foram produzidos contra a proteína pura ou com baixos níveis de contaminantes.

A análise imunológica da proteína 23 kD em folhas de plantas com “blight” (Figura 4), demonstrou que ela está dispersa no tecido foliar. A menor presença da proteína na amostra que continha apenas a nervura principal em relação à amostra constituída apenas da lâmina foliar pode ser devido ao fato de que esta proteína esteja sendo sintetizada nas células parenquimatosas. Embora as células que compõem a nervura principal sejam inativas em termos de síntese protéica, elas podem estar sendo utilizadas como meio de transporte, o que explica a presença da proteína 23 kD neste tecido.

A grande vantagem em se detectar a proteína 23 kD no extrato protéico obtido do tecido foliar é a facilidade de se amostrar este tecido comparado ao sistema radicular. Resultados semelhantes com relação à presença de proteína específica do “blight” em mais de um tecido foram obtidos por Derrick et al. (1992), os quais trabalhando com o antissoro anti-12 kD, verificaram a presença da proteína 12 kD tanto no extrato protéico obtido a partir de raízes de plantas doentes bem como no tecido foliar das respectivas plantas. No entanto o diagnóstico de plantas com “blight” utilizando-se o antissoro contra a proteína 35 kD só é possível quando se usa o extrato protéico obtido de raízes (Derrick et al., 1991).

A reação cruzada entre o anticorpo policlonal produzido contra a proteína 23 kD com proteínas isoladas de plantas afetadas pelo “macrophylla decline” constatada neste trabalho (Figura 5), sugere que a proteína 23 kD também pode estar presente em plantas afetadas por esta anomalia. A presença da proteína 23 kD em diferentes anomalias, pode indicar que esta proteína é produzida em resposta a algum estresse comum. Outra possibilidade seria que as plantas afetadas pelo “macrophylla decline” possuem proteínas com antigenicidade semelhante à proteína 23 kD extraída de plantas com declínio dos citros.

A presença da proteína 23 kD no extrato protéico de folhas submetidas à ferimento e a ausência da mesma em folha submetida ao estresse nutricional, indica que a síntese da proteína 23 kD pode estar relacionada com sistema de defesa das

plantas ao estresse mecânico (Figura 6). Conforme relato por Hedrick et al. (1988), proteínas produzidas em resposta a ferimento mecânico também são produzidas em plantas atacadas por patógenos e em plantas que recebem aplicações de reguladores vegetais envolvidos com estresse, tais como, etileno e ácido abscísico. Estas proteínas fazem parte do tipo de resistência não específica produzido pelas plantas com objetivo de evitar infecções subseqüentes, fenômeno este conhecido como resistência sistêmica adquirida (Ross, 1961).

Nota-se pelo surgimento de reação imunológica positiva nas amostras obtidas de folhas adjacentes as folhas submetidas à ferimento que a proteína 23 kD possui propriedade sistêmica. Conforme dados obtidos por Parsons et al. (1989), defesa sistêmica apresentada pelas plantas em resposta a ferimentos é característica da classe de genes de defesa, conhecida como inibidores de proteases. Em suas pesquisas, estes autores também verificaram respostas sistêmicas fortes nas folhas de “poplar” localizadas acima de folhas submetidas a ferimentos mecânicos.

Conforme mencionado anteriormente, a coleta das amostras do experimento realizado para se verificar o efeito do estresse mecânico na acumulação da proteína 23 kD, se deu 24 horas após a realização do ferimento no tecido foliar. Percebe-se que a síntese das proteínas em resposta a ferimento é um processo rápido. Esta mesma constatação foi obtida por Graham et al. (1986) após verificarem que folhas submetidas ou não a ferimentos, acumulam inibidores de proteases, 4 a 6 horas após a realização do ferimento. De acordo com Hedrick et al. (1988), o sucesso da planta em se proteger de estresses não depende somente da coordenação entre as diferentes estratégias de defesa, mas também da rapidez da resposta.

Com relação à reação imunológica com o anticorpo anti-23 kD em outras espécies, verificou-se que as plantas de tomate, feijão, mamona, milho e abóbora não possuem proteína que reaja com o anticorpo, mesmo quando suas folhas são submetidas a ferimentos. No entanto, através da presença de proteína imunoreativa no extrato protéico de folhas de pessegueiro (Figura 7), constatou-se que a proteína 23 kD

pode não ser específica da espécie citros. Talvez esta proteína tenha sua síntese relacionada com estresse mecânico somente em espécies lenhosas. Estudos com um maior número de plantas se tornam necessários para confirmar esta hipótese.

A composição aminoacídica da proteína 23 kD mostrou alta proporção de aminoácidos com resíduos acídicos (até 20,06% de ácido glutâmico e até 6,39% de ácido aspártico). Esta composição explica a presença da proteína 23 kD no extrato com pH em torno de 1,8, obtido após a focalização isoeletrica. Proteínas solúveis em pH extremamente ácido também foram identificadas por Nasser et al. (1988) quando trataram folhas de milho com cloreto de mercúrio e quando infectaram os mesmos tipos de folhas com vírus do mosaico. A análise aminoacídica de seis das oito proteínas identificadas por estes autores, mostraram alta proporção de aminoácidos com resíduos ácidos (21-29%). A princípio estas proteínas foram relacionadas como resposta de defesa da planta ao ataque de patógenos. As características em comum entre estas proteínas são solubilidade em baixo pH, baixo peso molecular, resistência a proteases e localização extracelular. Estudos enzimáticos realizados posteriormente, mostraram que quatro das oito proteínas identificadas por Nasser et al. (1988) apresentaram atividade de quitinase. À exceção da localização extracelular, não determinada no presente estudo, as demais propriedades das proteínas relacionadas com a patogenicidade são semelhantes as propriedades encontradas na proteína 23 kD isolada de plantas com declínio.

Análises do extrato de plantas sadias, plantas com declínio dos citros e de plantas sadias cujas folhas foram submetidas à fermento, com anticorpos produzidos contra a enzima quitinase ácida de *Pinus* (Figura 8), mostraram que a proteína 23 kD não possui antigenicidade em comum com esta enzima, o que indica que estas proteínas são diferentes.

Novas informações sobre a expressão gênica diferencial em plantas com declínio dos citros poderão ser obtidas a partir de observações da regulação gênica a nível de transcrição. A técnica "mRNA differential display", que foi originalmente

desenvolvida para identificar genes que apresentam mudanças de expressão em doenças cancerígenas (Liang e Pardee, 1992), foi utilizada no presente estudo objetivando-se a identificação de marcadores cDNA com expressão exclusiva ou elevada em plantas com declínio. A escolha da técnica “mRNA differential display” para a determinação destas mudanças, baseou-se nas vantagens que a mesma apresenta, como maior facilidade de identificar e clonar os mRNAs raros, além de não limitação pela redundância de mRNAs que possuem expressão elevada. Ademais, a técnica requer pequena quantidade de RNA para análise (Maser e Calvet, 1995; Mészáros e Morton, 1996).

Para aumentar a eficiência do método original realizou-se algumas mudanças. Uma das modificações foi a utilização de primers longos (primer de ancoragem 3' com 24 bases e primer arbitrário 5' com 19 bases) para a síntese da primeira e segunda fita de cDNA. Modificou-se também a temperatura de anelamento utilizada na reação de PCR. Tanto a utilização de primers longos bem como elevada temperatura de anelamento na reação de PCR visou aumentar a estrigência na reação e conseqüentemente reduzir o aparecimento de bandas falso positivas no gel, pois estas modificações permitem somente a amplificação dos cDNAs que apresentem alta complementaridade com os primers. A especificidade dos primers e a estrigência das condições de PCR são os fatores chave que afetam a reproducibilidade e a taxa de falso positivos na técnica “mRNA differential display”. Zhao et al., (1995), obtiveram sucesso no aumento da reproducibilidade e na redução dos falsos positivos da técnica quando utilizaram primers longos e alta temperatura de anelamento.

Outra modificação no primer de ancoragem 3' em relação ao método original foi a redução de duas para somente uma base degenerada no terminal 3'. Teoricamente este primer permite a síntese de cDNAs que representem um quarto do total de mRNA presente nas amostras visto que possui apenas uma base degenerada no terminal 3' após os resíduos de deoxitimina. A escolha do primer de ancoragem 3' com apenas uma base degenerada no terminal 3' foi baseada no experimento realizado por Liang et al., (1993), os quais verificaram que este tipo de primer mostrou-se mais

específico na amplificação dos diferentes tipos de mRNAs em comparação com primer que possuem duas bases precedendo o resíduo de deoxitimina.

A baixa qualidade da resolução dos fragmentos de cDNA quando se coloriu com brometo de etídeo e nitrato de prata, provavelmente se deveu ao fato da falta de sensibilidade destes corantes necessária para a visualização do grande número de fragmentos que são produzidos pela técnica "mRNA differential display". Para a visualização deste grande número de fragmentos tornou-se necessária a utilização de géis de sequenciamento que são géis com maior espaço de separação, menor espessura e, portanto, maior sensibilidade.

A vantagem da utilização de isótopos marcados está na alta sensibilidade que possuem. Outro aspecto que reforça a importância do uso de radioisótopo é a dificuldade de se obter pela técnica "mRNA differential display" fragmentos de cDNAs maiores que 500 pares de bases (Averbouth et al., 1996). A grande quantidade de fragmentos menores produzidos só podem ser visualizados quando se utiliza detecção sensível. Devido às desvantagens apresentadas pelos isótopos mais comumente utilizados na marcação de DNA, como ^{32}P (baixa resolução de bandas) e ^{35}S (contaminação de termocicladores), optou-se neste estudo pelo isótopo ^{33}P , o qual apresenta energia radioativa e meia-vida entre ^{32}P e ^{35}S e combina as vantagens dos dois isótopos (Liang e Pardee, 1995).

Quando se utilizou material radioativo, a técnica "mRNA differential display" permitiu a identificação de oito bandas em amostras do tecido tronco com expressão elevada e aparentemente exclusiva de plantas com declínio dos citros. Os mRNAs que deram origem a estes cDNAs podem codificar proteínas que possuem suas funções específicas associadas com o processo da doença e com os eventos metabólicos que ocorrem no tronco. Análises futuras através da técnica "northern blot" serão necessárias para confirmar esta expressão diferencial. Não foi encontrada homologia significativa entre a sequência de nucleotídeos do clone sequenciado com as

sequências disponíveis nos bancos de dados, indicando portanto que este clone corresponde a gene ainda não caracterizado.

Um dos problemas verificados após a reamplificação dos fragmentos de cDNAs eluídos do gel foi a presença de contaminantes. Segundo Shoham et al., (1995), a presença de mais de uma espécie de cDNA junto à banda amplificada é considerada uma das desvantagens da técnica "mRNA differential display". Neste estudo, para eliminar os contaminantes tentou-se clonar apenas a banda mais nítida e a confirmação do sucesso foi feita através da comparação do tamanho dos fragmentos obtidos após a digestão de vários clones com o tamanho da banda original mais nítida.

A técnica "mRNA differential display" mostrou-se eficiente como uma nova ferramenta para a identificação de genes com expressão diferencial. Os resultados apresentados neste trabalho, usando somente uma combinação de primers, representam uma pequena fração do número total de bandas que pode ser visualizada usando esta técnica. No entanto, combinações de diferentes tipos de primers 5' e 3' podem ser usados para representar melhor a população de mRNAs presente nas amostras.

6 CONCLUSÕES

1. Os anticorpos policlonais produzidos contra a proteína 23 kD utilizados no teste “western blot” foram marcadores moleculares eficientes na discriminação de plantas saudáveis e com declínio dos citros e também no diagnóstico precoce da anomalia. Estes anticorpos poderão ser utilizados para desenvolvimento de kits para diagnose precoce.

2. A proteína 23 kD é considerada uma proteína ácida, visto que, após focalização isoeletrica de proteínas totais ela foi encontrada na fração com pI em torno de 1.8 e na análise da sua composição foi encontrado alta concentração de resíduos de aminoácidos acídicos (até 20,06% de ácido glutâmico e até 6,39% ácido aspártico).

3. No tecido foliar a proteína de 23 kD está presente em maior quantidade no limbo foliar

4. A proteína 23 kD ou outra proteína com antigenicidade semelhante é produzida em plantas com a anomalia “macrophylla decline”.

5. A imposição de estresse mecânico foi capaz de induzir a síntese da proteína 23 kD em plantas lenhosas, tais como de citros e de pêssego, mas não em plantas de milho, abóbora, feijão, mamona e tomate.

6. A técnica “mRNA differential display” foi eficiente na constatação da expressão gênica diferencial entre as plantas sadias e as com declínio dos citros a nível de transcrição. Permitiu o isolamento de oito clones obtidos à partir de mRNAs com expressão aparentemente exclusiva em plantas com declínio dos citros e que supostamente estão envolvidos com eventos metabólicos que ocorrem no tronco.

7. A sequência do clone cDNA 1 não apresentou similaridade com sequências de genes caracterizados disponíveis no banco de dados “GenBank”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRIGO, L.G.; YOUNG, R.H. Phloem zinc accumulation in citrus trees affected with blight. **HortScience**, Alexandria, v.16, n.2, p.158-160, Apr. 1981.
- AVERBOUKH, L.; DOUGLAS, S.A.; ZHAO, S.; LOWE, K.; MAHER, J.; PARDEE, A.B. Better gel resolution and longer cDNAs increase the precision of differential display. **BioTechniques**, Notick, v.20, n.5, p.918-921, May 1996.
- BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.196, p.80-83, 1991.
- BASSET, P; BELLOCQ, J.P.; WOLF, C.; STOLL, I; HUTIN, P.; LIMACHER, J.M.; PODHAJECER, L.; CHENARD, M.P. A novel mettalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. **Nature**, London, v. 348, p.699-704, 1990.
- BAUER, D.; MULLER, H.; REICH, J.; RIEDEL, H.; AHRENKIEL, V.; WARTHOE, P.; STRAUSS, M. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). **Nucleic Acid Research**, London, v.21, n.18, p.4272-4280, Aug. 1993.
- BAUSHER, M. G.; SWEENEY, M.G. Field detection of citrus blight using immunological techniques. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, n.5, p.447-450, May 1991.
- BERETTA, M.L.G.; LEFEVRE, A.F.V. Declínio: resistência de variedades e pesquisas recentes. **Laranja**, Cordeirópolis, v.7, n.1, p.71-86, 1986.
- BERETTA, M.J.G.; ROSSETTI, V. Declínio de plantas cítricas. In: SIMPÓSIO DE CITRICULTURA, 3, Jaboticabal, 1988. **Anais...** Jaboticabal, [s.n.], 1988. p.137-148.
- BRLANSKY, R.H.; TIMER, L.W.; LEE, R.F.; GRAHAM, J.H. Relationship of xylem plugging to reduce water uptake and symptom development in citrus trees with blight and blight-like declines. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, n. 11, p.1325-1328, Nov. 1984.

- BROEKAERT, W.; LEE, H.; KUSH, A.; CHUA, N.; RAIKHEL, N. Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Proceeding of the National Academic of Science**, Washington, v.87, p.7633-7637, Oct. 1990.
- BROGLIE, K.; CHET, I.; HOLLIDAY, M.; CRESSMAN, R.; BIDDLE, P.; KNOWLTON, S.; MAUVAIS, C.J.; BROGLIE, R. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. **Science**, Washington, v.254, p.1194-1197, Nov. 1991.
- CALLARD, D.; LESCURE, B.; MAZZOLINI, L. A method for the elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique. **BioTechniques**, Notick, v.16, n.6, p.1096-1103, 1994.
- CARROL, M.; STOLLER, I. Immunization of chickens and purification of antibody (IgY) from egg York. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.258, p.24-26, 1983.
- CASTRO, P.R.C.; BERNADES, A.S.; PRATES, H.S. Remissão do declínio dos citros, uma desordem fisiológica, com reguladores vegetais. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS, 2, Bebedouro, 1992. **Resumos ... Bebedouro**, [s.n.], 1992, p.49-50
- CLARK, M.F.; AN ADAMS. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, Essex, v.34, p.475-483, 1977.
- DE BOLLE, M.F.C.; DAVID, K.M.M.; REES, S.B.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUNE, B.P.A.; BROEKAERT, W.F. Cloning and characterization of a cDNA encoding an antimicrobial chitin-binding protein from amaranth, *Amaranthus caudatus*. **Plant Molecular Biology**, Rockville, v.22, p.1187-1190, June 1993.
- DERRICK, K.S.; BARTHE, G.A.; HEWITT, B.G.; LEE, R.F.; ALBRIGO, L.G.; IREY, M.S. Detection of citrus blight by serological assays. **Proceeding of the Florida State for Horticulture Society**, Flórida, v.105, p.26-28, 1992.
- DERRICK, K.S.; LEE, R.F.; BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W.; HEWITT, G.G.; BARTHE, G.A. Proteins associated with citrus blight. **Plant Disease**, St. Paul, v.74, n.2, p.168-170, Feb. 1990.

- DERRICK, K.S.; LEE, R.F.; BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W.; HEWITT, G.G.; BARTHE, G.A. Protein and filamentous associated with citrus blight. In: INTERNATIONAL ORGANIZATION CITRUS VIROLOGISTS, 11, Riverside, 1991. **Proceedings...** Riverside: IOCV, 1991. p.256-258.
- DIVALL, G.B. Isoelectric focusing in ultrathin polyacrylamide gels. In: WALKER, J.M. **Methods in molecular biology**. New Jersey: [s.n.], 1984. v.1, p.105-110.
- DUMBAR, B.S. **Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques**, New York: Plenum Press, 1987. 372p.
- FISHER, H.V.; TIMMER, L.W.; MULEER, G.W. Comparison of "declinamiento", "blight", "declinio", and "marchitamiento repentino" by use of uniform examination methods. In: CONFERENCE ORGANIZATION CITRUS VIROLOGISTS, 9, Argentina, 1983. **Proceeding ...** Riverside: University of California, 1984, p.279-280.
- GIROTO, E. J. **Correlações de nutrientes em tecidos de laranjeiras (Citrus sinensis (L.) Osbeck cv. Valência) e o declínio dos citros**. Lavras: ESAL, 1990. 77p. (Tese - Mestrado em Fitotecnia).
- GOODERHAM, K. Transfer techniques in protein blotting. In: WALKER, J.M. **Method in molecular biology**. New Jersey: [s.n.], 1984. v.1, p.165-178.
- GRAHAM, J.S.; HALL, G.; RYAN, C.A. Regulation of synthesis of proteinase inhibitors I and II mRNAs in leaves of wounded tomato plants. **Planta**, New York, v.169, p.399-405, June 1986.
- HEDRICK, S.A.; BELL, J.N.; BOLLER, T.; LAMB, C.J. Chitinase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding, and infection. **Plant Physiology**, Rockville, v.86, n.1, p.182-186, Sept.1988.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water-culture method for growing plants without soil**. California Agriculture Experimental Station, 1950. (Circular, 347).
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.277, p.680-5, 1970.
- LEE, T.H.; LEE, G.W.; ZIFF, E.B. et al. Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.10, p.1982-1988, 1990.
- LEE, R.F.; MARAIS, L.J.; TIMMER, L.W.; GRAHAN, J.H. Syringe injection of water into the trunk; A rapid diagnostic test for citrus blight. **Plant Disease**, St Paul, v.68, n.6, p.511-513, June 1984.

- LIANG, P.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A.B. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. **Nucleic Acids Research**, London, v.21, n.14, p.3269-3275, June 1993.
- LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v.257, n.24, p.967-971, Feb. 1992.
- LIANG, P.; PARDEE, A.B. Alternative to ^{35}S as a label for differential display of eukaryotic messenger RNA. **Science**, Washington, v.267, p.1186-1187, 1995.
- MARAIS, L.J. Citrus blight: world research review. **Citrograph**, Los Angeles, v.75, n.5, p.119-124, Mar. 1990.
- MASER, R.L.; CALVET, J.P. Analysis of differential gene expression in the kidney by differential cDNA screening, subtractive cloning, and mRNA differential display. **Seminars in Nephrology**, Philadelphia, v.15, n.1, p.29-42, 1995.
- MÉSZAROS, M.; MORTON, D.B. Subtractive hybridization strategy using paramagnetic oligo(dT) beads and PCR. **BioTechniques**, Notick, v.20, n.3, p.413-419, Mar. 1996.
- MÉTRAUX, J.P.; SIGNER, H.; RYALS, J.; et al., Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. **Science**, Washington, v.250, p.1004-1006, 1990.
- MULLER, G.W. PRATES, H.S. ; COSTA, A.S. Declínio dos citros em São Paulo: Ensaio exploratório visando a recuperação de plantas afetadas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.7, n.3, p. 571, out. 1982.
- MULLIS, K ; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, San Diego, v.55, p.335-350, 1987.
- NASSER, W.; TAPIA, M.; KAUFFMAN, S.; MONTASSER-KOUHSARI, S.; BURKARD, G. Identification and characterization of maize pathogenesis-related proteins. Four maize PR proteins are chitinases. **Plant Molecular Biology**, Belgium, v.11, p.529-538, 1988.
- OSSWALD, W.F.; SHAPIRO, J.P.; DOOSTAR, H.; McDONALD, R.E.; NIEDZ, R.P.; NAIRN, C.J.; HEARN, C.J.; MAYER, R.T. Identification and characterization of acidic hydrolases with chitinase and chitosanase activities from sweet orange callus tissue. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v.35, n.5, p.811-820, May 1994.

- PAIVA, L.V. **Alterações protéicas e nutricionais em tecidos de plantas afetadas pelo declínio dos citros**. Lavras: ESAL, 1993. 76p. (Tese - Mestrado em Fitotecnia).
- PARSONS, T.J.; BRADSHAW Jr., H.D.; GORDON, M.P. Systemic accumulation of specific mRNAs in response to wounding in poplar trees. **Proceeding of the National Academic of Science**, Washington, v.86, p.7895-7899, 1989.
- PRATES, H.S.; CASTRO, P.R.; SOUZA, W. DIONISIO, A. ; APEZZATO, B. Ação de reguladores vegetais no declínio dos citros. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.9, n.3/4, p.220-229, jul./dez. 1983.
- RAZ, V., FLUHR, R. Calcium requirement for ethylene-dependent responses. **The Plant Cell**, Rockville, v.4, p.1123-1130, July 1992.
- ROSOK, O.; ODEBERG, J.; RODE, M.; STOKKE, S.; FUNDERUD, S.; SMELAND, E.; LUNDEBERG, J. Solid-phase method for differential display of genes expressed in hematopoietic stem cells. **BioTechniques**, Notick, v.21, n.1, p.114-121, July 1996.
- ROSS, A.F. Systemic resistance induced by localized virus infections in plants. **Virology**, Vilnius, v.14, p.340-358, 1961.
- ROSSETTI, V.; BERETTA, M.J.G. Declínio of citrus trees in Brazil. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CITRUS CANCKER, DECLÍNIO/BLIGHT AND SIMILAR DISEASE**, 1, São Paulo, 1987. **Proceeding ...** Campinas: Fundação Cargill, 1988. p. 262-273.
- ROSSETTI, V.; BERETTA, M.J.G. Estudo do pH de tecidos de plantas cítricas afetadas pelo declínio. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, n.253, p.434, jun. 1984.
- ROSSETTI, V.; KRAUSEMANN, J.; FEITENBERGER, E. Attempts to induce recovery of citrus trees affected by declínio. In **CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS**, 9, Argentina, 1983. **Proceeding ...** Riverside: University of California, 1984. p.322-326.
- RUSSEL, D.A.; SACHS, M.M. Differential expression and sequence analysis of the maize glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family. **The Plant Cell**, Rockville, v.1, n.8, p.793-803, Aug. 1989.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2. ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. 545 p.
- SCHNEIDER, H. Bud-union trouble in macrophylla roostocks of frost nucellar eureka. **California Citrograph**, Los Angeles, v.46, n.2, p.12, 1960.

- SHOHAM, N.G.; ARAD, T.; ROSIN-ABERSFELD, R.; MASHIAH, P.; GAZIT, A.; YANIV, A. Differential display assay and analysis. **BioTechniques**, Notick, v.20, n.2, p.182-184, Feb. 1995.
- SMITH, P.F. Citrus blight. **The Citrus Industry**, Riverside, p.9-14, Oct. 1974.
- STRYER, L. **Biochemistry**, 3. ed. New York: W.H. Freeman and Company, 1988. 1089p.
- SPENCER, R. K.; WOLD, F. A new convenient method for estimation of total cystine-cysteine in proteins. **Analytical Biochemistry**, New York, v.32, p.185, 1969.
- TAVARES, E.D. **Avaliação do estado nutricional da laranjeira (Citrus sinensis (L.) Osbeck) cv. Valência com o Declínio dos citros**. Lavras: ESAL, 1987. 64p. (Tese - Mestrado em Fitotecnia).
- TAYLOR, K.C.; ALBRIGO, L.G.; CHASE, C.D. Zinc complexation in the phloem of blight-affected citrus. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.113, n.3, p.407-411, 1988.
- TAYLOR, K.C.; ALBRIGO, L.G.; CHASE, C.D. Characterization of a Zn-binding peptide associated with a decline disorder of citrus. In: DWINGE, D HAMER (eds.) **Symposium on metal ion homeostasis: molecular biology and chemistry**. New York: Alan R Liss, 1989. p.385-394.
- TIEMAN, D.M.; HANDA, A.K. Molecular cloning and characterization of genes expressed during early tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit development by mRNA differential display. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.121, n.1, p.52-56, Aug. 1996.
- TIMMER, L.W.; LEE, R.F.; YOUNG, R.H.; ALBRIGO, L.G.; SYVERTSEN, J.P.; TUCKER, D.P.H. Distribution and resistance of tetracycline applied by high-pressure trunk-injection and soil drench to blight affected citrus trees. **Phytopathology**, St Paul, v.71, p.261, 1981.
- TRANI, P.E.; PRATES, H.S.; HIROCE, R.; GUIRADO, N. Relação declínio, calagem e adubação em citros no Estado de São Paulo. **Summa Phytopatologica**, Piracicaba, v.12, n.1, p.12, jan. 1986.
- TUCKER, D.P.H.; LEE, R.F.; TIMMER, L.W.; ALBRIGO, L.G.; BRLANSKY, R.H. Experimental transmission of citrus blight. **Plant Disease**, St Paul, v.68, n.11, p.979-980, Nov. 1984.
- VAN LOON, C. Pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, Belgium, v.4, p.111-116, 1985.

- VASCONCELLOS, L.A.B.C.; CASTLE, W.S. Trunk xylem anatomy of mature healthy and blighted grapefruit trees on several rootstocks. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.119, n.2, p.185-194, Mar. 1994.
- VERNOOIJ, B.; FRIEDRICH, L.; MORSE, A. et al., Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. **The Plant Cell**, Rockville, v.6, p.959-965, July 1994.
- WARD, E. R.; UKNES, S.J.; WILLIAMS, S.C. et al. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v.3, n.10, p.1085-1094, Oct. 1991.
- WILKINSON, J.Q.; LANAHAAN, M.B.; CONNER, T.W.; KLEE, H.J. Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display. **Plant Molecular Biology**, Belgium, v.27, p.1097-1108, Feb. 1995.
- WUTSCHER, H.K. Long-term patterns of water uptake in syringe injection and wood zinc levels of blight-affected orange trees. **Proceedings of the Florida State for Horticulture Society**, Florida, v.102, p.24-27, 1989.
- WUTSCHER, H.K.; BISTLINE, F.W. The blight susceptibility of 'Pineapple' orange trees on citrus macrophylla rootstock. **Proceedings of the Florida State for Horticulture Society**, Florida, v.93, p.17-18, 1980.
- WUTSCHER, H.K.; SMITH, P.F. Failure to propagate citrus blight in reconstituted trees. **Proceeding of the Florida State for Horticulture Society**, Florida, v.101, p.62-63, 1988.
- WUTSCHER, H.K.; YOUTSEY, C.O.; SMITH, P.F.; COHEN, M. Negative results in citrus blight transmission tests. **Proceeding of the Florida State for Horticulture Society**, Florida, v.96, p.48-50, 1983.
- ZHAO, S.; OOI, S.L.; PARDEE, A.B. New primer strategy improves precision of differential display. **BioTechniques**, Notick, v.18, n.5, p.841-850, Feb. 1995.