

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Obtenção de plantas de *Humulus lupulus* L.
resistentes a vírus

Maria João de Almeida Coelho de Sousa
Doutoramento em Biotecnologia Vegetal
2005

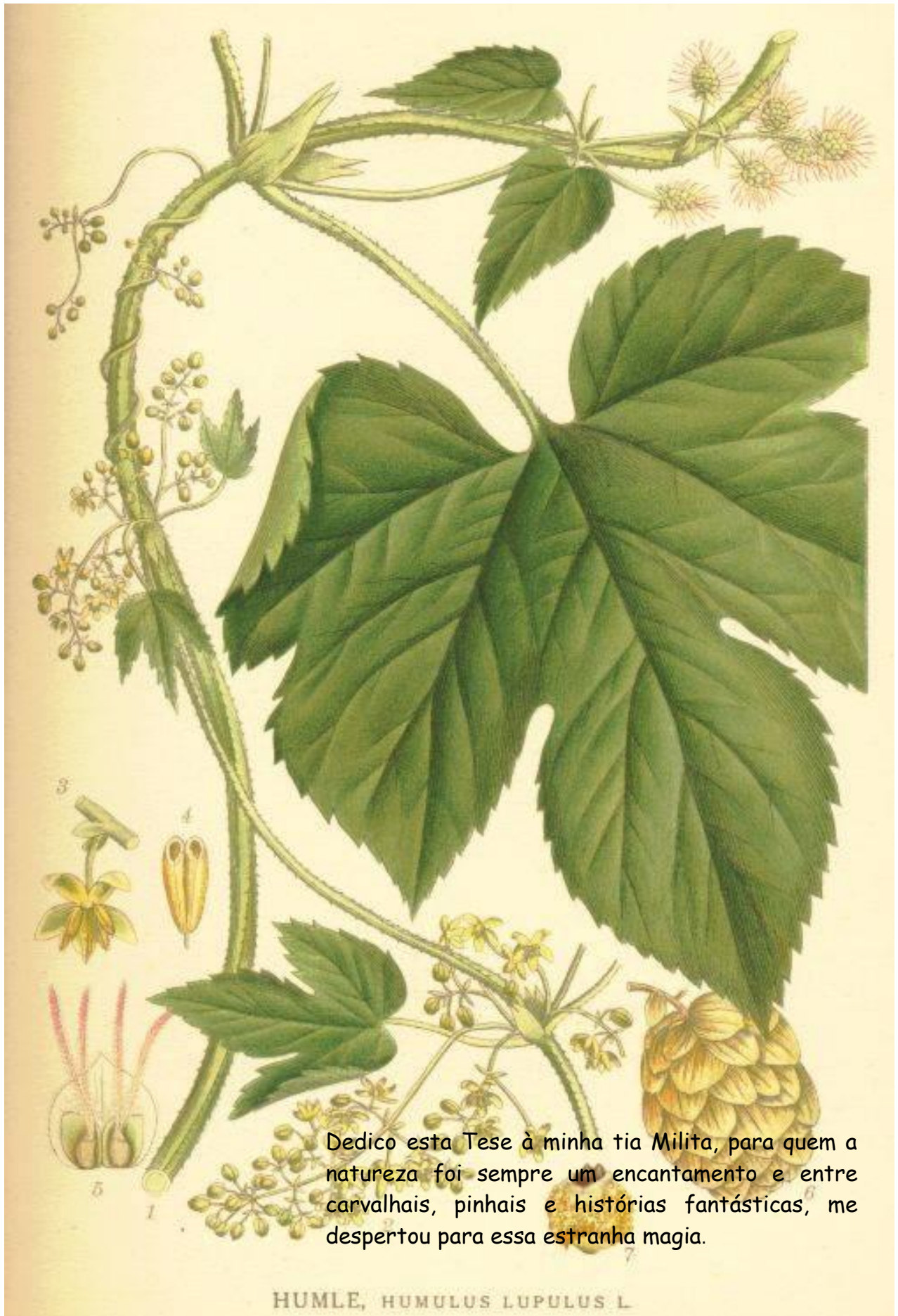
UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Obtenção de plantas de *Humulus lupulus* L.
resistentes a vírus

Maria João de Almeida Coelho de Sousa
Doutoramento em Biotecnologia Vegetal
2005

Tese orientada pela Professora Doutora Maria Salomé Pais Telles Antunes



Dedico esta Tese à minha tia Milita, para quem a natureza foi sempre um encantamento e entre carvalhais, pinhais e histórias fantásticas, me despertou para essa estranha magia.

HUMLE, HUMULUS LUPULUS L.

ERRATA

Onde se lê	Deve ler-se
<p>Capítulo 1</p> <ul style="list-style-type: none"> - pg 26, 2ª linha, 2º parágrafo: <i>Vírus da Necrose em Anel de Tabaco</i> - pg 36, 4ª linha, 2º parágrafo: “pilus” 	<p>Vírus da Necrose em Anel de Tabaco</p> <p>“pilus”</p>
<p>Capítulo 2</p> <ul style="list-style-type: none"> - Introdução, pg. 48, 8ª linha, 2º parágrafo: ácido acetilsalicílico - Introdução, pg 49, 7ª linha sem parágrafo - Resultados, pg 56, 3ª linha, 5º parágrafo: Fig.2.3. c, d, e, f 	<p>Ácido salicílico</p> <p>Paragrafo na 7ª linha</p> <p>Fig. 2.3. c, d, e</p>
<p>Capítulo 3</p> <ul style="list-style-type: none"> -Resumo, pg.79, 7ª linha, 3º parágrafo: 6mM -Material e Métodos, pg 90, 5ª linha: 6mM - Material e Métodos, pg 91, 4ª linha: em tampão fosfato 100mM - Material e Métodos, pg 91, 5ª linha: 1 Minuto - Material e Métodos, pg 91, 7ª linha, 2º parágrafo: em tampão TAE - Material e Métodos, pg 92, 1º parágrafo: 1 Minuto - Discussão, pg 117, 8ª linha, 2º parágrafo: stress 	<p>6mm</p> <p>6mm</p> <p>Em solução tampão fosfato 100mM</p> <p>1 minuto</p> <p>em solução tampão TAE</p> <p>1 minuto</p> <p>stresse</p>
<p>Capítulo 4</p> <ul style="list-style-type: none"> - Introdução, pg. 121, 11ª linha, 1º parágrafo: as plantas dos de lúpulo com semente 	<p>As plantas de lúpulo com semente</p>
<p>Capítulo 5</p> <ul style="list-style-type: none"> -Material e Métodos, pg 142, 5ª linha: 1/10 volumes de 3M AcNa -Material e Métodos, pg. 143, 6ª linha, 3º parágrafo: e/ou <i>Sma I</i> - Resultados, pg 152, legenda figura 5.4: Linha 5: 0,8 ng de plasmídeo cortado com enzima <i>Sma I</i> - Resultado, pg 152, legenda figura 5.4: Linha 6: planta da linha 1 cortada com a enzima <i>Sma I</i> -Resultados, pg.153, 1º parágrafo, 1ª linha: na digestão com a enzima <i>Sma I</i> -Resultados, pg.153, 1º parágrafo, 2ª linha: implicará um local de inserção -Resultados, pg. 155 legenda da fig. 5.7: λ corresponde ao marcador molecular lambda cortado com enzima <i>Hind III</i> -Resultados, pg. 156 legenda da fig. 5.8: B Plasmídeo -Resultados, pg. 156 legenda da fig. 5.8: C Plasmídeo 	<p>1/10 volume de 3M Acetato de Sódio (AcNa)</p> <p>e <i>Sma I</i></p> <p>Linha 5: planta da linha 1 cortada com as enzimas <i>Sma I</i> e <i>Eco RI</i>.</p> <p>Linha 6: 0,8 ng de plasmídeo cortado com as enzimas <i>Sma I</i> e <i>Eco RI</i></p> <p>Na digestão dupla com as enzimas <i>Sma I</i> e <i>Eco RI</i></p> <p>Mais de um local de inserção</p> <p>λ corresponde, no gel B, ao marcador molecular lambda cortado com enzima <i>Hind III</i> e no gel A ao marcador XIV</p> <p>B Plasmídeo</p> <p>C Plasmídeo</p>

ERRATA FIGURAS

Capítulo 2, Resultados, pg 63, Fig. 2.2, 1ª fotografia da esquerda para a direita, linha imediatamente acima da legenda deverá estar assinalada com a letra **n**. 2ª fotografia na mesma linha deverá estar assinalada com a letra **o**, 3ª fotografia na mesma linha deverá estar assinalada com a letra **p**, 4ª fotografia da mesma linha deverá estar assinalada com a letra **q**. Da esquerda para a direita, a 1ª fotografia da 2ª linha acima da legenda, deverá estar assinalada com a letra **i**. Resultados, pg 65, Fig. 2.3, a fotografia assinalada com a letra **f** deverá ler-se letra **c**.

Capítulo 3, Resultados, pg 96, Fig. 3.5, gráfico **A**, na barra de erro da coluna Filtrado deverá estar a letra **a**, na barra de erro da coluna Autoclavado deverá estar a letra **b**. Resultados, pg 97, na barra de erro do ponto 1 deverá estar a letra **a**, na do ponto 2 a letra **b**, na do ponto 3 a letra **c**, na do ponto 4 a letra **d** e na do ponto 5 a letra **d**. Gráfico **B**, na barra de erro do ponto 1 deverá estar a letra **b**, na do ponto 2 a letra **b**, na do ponto 3 a letra **c** na do ponto 4 a letra **b** e na do ponto 5 a letra **a**. Resultados, pg.98, Fig. 3.7, na barra de erro da coluna controlo, coluna 6 mg/L e na de 12,5 mg/L deverá estar a letra **a**, na barra de erro da coluna de 25 mg/L deverá estar a letra **b** e na barra de erro da coluna de 50 mg/L deverá estar a letra **c**. Resultados, pg 98, Fig. 3.8, na barra de erro da coluna controlo deverá estar a letra **a**, na da coluna 6 mg/L a letra **b**, na da coluna 12,5 mg/L a letra **c**, na da coluna 25 mg/L a letra **d** e na da coluna 50 mg/L a letra **e**. Resultados, pg 99, Fig. 3.9, na barra de erro da coluna 1 deverá estar a letra **a**, na barra de erro das colunas 2,5,7,8 deverá estar a letra **b**, na barra de erro das colunas 3 e 6 deverá estar a letra **c**, na barra de erro na coluna 4 deverá estar a letra **d**. Resultados, pg.100, Fig.3.10 gráfico **A**, na barra de erro da coluna 1, 3 e 4 deverá estar a letra **b**, na barra de erro da coluna 2 deverá estar a letra **a**. Gráfico **B**, na barra de erro da coluna 5 deverá estar a letra **a**, na da coluna 6 deverá estar a letra **b**, na da coluna 7 deverá estar a letra **c** e na barra de erros da coluna 8 deverá estar a letra **d**. Resultados, pg. 105, Fig. 3.14, da esquerda para a direita em cima, 1ª fotografia deverá estar assinalada com a letra **a**, 2ª fotografia com a letra **c** e na fotografia por baixo das anteriores deverá estar a letra **b**. Resultados, pg. 107, Fig.3.16 da esquerda para a direita, gráfico **A**, a barra de erro da coluna dos 2 meses deverá ter a letra **a** e na barra de erro da coluna dos 4 meses deverá estar a letra **b**. Gráfico **B**, na barra de erro da coluna dos 2 meses deverá estar a letra **a** e na barra de erro da coluna dos 4 meses a letra **b**.

Capítulo 4, Resultados, pg 126, Fig. 4.2, da esquerda para a direita linha imediatamente acima da legenda, 1ª fotografia deverá ter a letra **f**, 2ª fotografia deverá ter a letra **d**, a 3ª fotografia deverá ter a letra **c**, a 4ª fotografia deverá ter a letra **b**, Fotografia acima da fotografia **f** deverá ter a letra **e**, e a fotografia acima desta a letra **a**. Resultados, pg 128, Fig. 4.6, da esquerda para a direita a 1ª fotografia deverá ter a letra **a** 2ª fotografia deverá ter a letra **f**, por cima desta fotografia **f** da esquerda para a direita 1ª fotografia deverá ter a letra **d** e a 2ª fotografia deverá ter a letra **e**, por cima destas da esquerda para a direita 1ª fotografia deverá ter a letra **b** e 2ª fotografia deverá ter a letra **c**.



Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à Professora Salomé Pais, pela oportunidade, apoio e confiança, durante todo o tempo antes e durante este trabalho. Agradeço também a sua disponibilidade para fazer a revisão do texto, as sugestões e os conselhos sempre úteis e pertinentes.

O meu agradecimento à Professora Margit Laimer por me ter permitido trabalhar no seu laboratório em Viena, onde cresci em termos científicos e pessoais.

Agradeço ao Doutor Willmitzer pela permissão de utilização do plasmídeo p35SGUSINT, ao Doutor Artur Machado pela permissão de utilização do Agrobacterium LBA4404/plasmídeo p35SGUSINT, e do plasmídeo: pROKArMV e à Doutora Elisabeth Hood pela estirpe EHA 105.

Um muito especial agradecimento ao Doutor Luís Pedro, que sempre me apoiou cientificamente e por vezes, mais importante ainda, com a amizade e o carinho que o caracterizam.

Agradeço às Doutoradas Cristina Figueiredo e Margarida Oliveira, o apoio no laboratório e fora dele. Aos Doutores José Barroso, Pedro Fevereiro e José Feijó as discussões, a disponibilidade e a alegria... nos momentos certos.

Às amigas Célia, Madalena, Catarina, Filomena, por todo o apoio, amizade e discussões fantásticas de onde sempre sai uma luz, importante nos momentos de maior crise.

Aos meus companheiros de laboratório: Rita, Helena Cotrim, Rossana, Aladje, Tomé, Américo, Dora, Hélia, Mónica, Susana, Pedro Sampaio, Cristina, Helena Garcês e Helena Serrano, um imenso obrigado por todos os momentos de laboratório, pela partilha das dúvidas, do conhecimento e principalmente pelo carinho muito para além do trabalho.

Às Lurdes, “grande” e “pequena”, pela imensa ajuda e disponibilidade em tudo e sempre.

Aos meus fantásticos colegas de licenciatura, amigos intemporais e com quem sempre conto, por terem sido e continuarem a ser, “não didáticos”: Teresa Lino Neto, Sofia Goes, Natália Marques e Paula Bacelar.

Um muitíssimo e especial obrigado à Manuela Gouveia pela amizade incondicional e pelo trabalho de me aturar, especialmente nos momentos de crise, e pelas críticas...que até nem foram assim tão duras!

Ao José Pedro Gil por tudo e para sempre, aqui, longe, em qualquer lugar, por existires e seres meu amigo!

Ao Alberto Dias, Paulo Lemos, Susana Geraldes, Margarida Vigário, Teresa Taborda e Alexandra Nobre, por todo o apoio científico, profissional e de uma amizade imensa e resistente, ao tempo e à distancia.

À Joana Robalo pela amizade, e pelo cantinho fantástico e cheio de sol que me disponibilizou para a inspiração!

Ao Professor Victor Almada pela ajuda na análise estatística de alguns resultados.



Agradeço à Escola Superior Agrária de Bragança, na pessoa do Presidente do Conselho Directivo, Doutor Orlando Rodrigues, por permitir e apoiar a continuação deste trabalho em Bragança.

Aos meus colegas de Departamento pelo apoio e incentivo, em todos os momentos. Ao Vice-Presidente do Conselho Científico Doutora Ana Carvalho e à Coordenadora do Departamento de Biologia, Doutora Anabela Martins, pelo apoio, que permitiu ultrapassar os momentos mais difíceis dos últimos anos. E ainda um obrigado especial à Doutora Anabela Martins por amavelmente ter recolhido o clone Bragança.

Ao Atilano Suarez por toda ajuda na impressão e preparação da tese, pela disponibilidade, mesmo nos momentos mais impróprios.

Ao Nuno do CiESA pela paciência e disponibilidade imbatíveis na “causa” informática.

Ao Doutor José Alberto pela disponibilidade e dicas na análise de alguns resultados.

Aos meus colegas e amigos de Bragança por existirem.

À Amélia Santos e Isabel Afonso por todo o apoio na manutenção das plantas e da boa disposição.

Um obrigado a todos os funcionários das estufas da Escola Agrária de Bragança, sem os quais não teria sido possível manter as plantas de lúpulo.

Aos meus queridos Lourdes, Mica, Ana e Miguel, por ter sido sempre e continuarem a ser da minha família de coração.

À minha família, Ália, Zeca, Luís, Ana e Ágata, por me aturarem o mau feitio, e estarem disponíveis com a paciência, a crítica e o amor de sempre.

E a todos aqueles que são, ou foram importantes, no desenvolvimento deste projecto e que de algum modo contribuíram para a execução deste trabalho, o meu especial obrigado.



ÍNDICE GERAL:

Agradecimentos	ii
Lista de Abreviaturas	viii
Resumo	xi
Abstract	xii

CAPÍTULO I

Introdução Geral

RESUMO	2
1.1. <i>HUMULUS LUPULUS</i> L.	4
1.1.A. CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS E DISTRIBUIÇÃO	4
1.1.B. BREVE HISTÓRIA DAS APLICAÇÕES DO LÚPULO	8
1.1.B.A. PAPEL DO LÚPULO NA INDÚSTRIA CERVEJEIRA	9
1.1.C. PRAGAS E DOENÇAS DO LÚPULO E SUAS CONSEQUÊNCIAS ECONÓMICAS	17
1.1.D. O NASCIMENTO DA VIROLOGIA	19
1.1.E. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS VÍRUS	20
1.1.F. POSSÍVEIS LOCAIS DE PENETRAÇÃO DOS VÍRUS	23
1.1.G. ESTRATÉGIAS DE RESISTÊNCIA E COMBATE A VÍRUS	25
1.2. CULTURA DE PLANTAS <i>IN VITRO</i>	28
1.3. REGENERAÇÃO DE MERISTEMAS <i>IN VITRO</i>	29
1.4. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA	32
1.4.A. TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	33
1.4.B. TRANSFORMAÇÃO POR BOMBARDEAMENTO DE PARTÍCULAS	39
1.4.C. EXPRESSÃO DE TRANSGENES	41
1.5. OBJECTIVOS	44

CAPÍTULO II

Organogénese

RESUMO	46
2.1. INTRODUÇÃO	47



2.2. MATERIAL E MÉTODOS	50
2.2.1. MICROPROPAGAÇÃO E ORGANOGÉNESE	50
2.2.1.1. MATERIAL VEGETAL	50
2.2.1.2. MÉTODO DE DESINFECÇÃO DO MATERIAL FRESCO	50
2.2.1.3. CONDIÇÕES DE PROPAGAÇÃO	50
2.2.1.5. EFEITO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE STRESSE	52
2.3. RESULTADOS	54
2.3.1. ORGANOGÉNESE EM FOLHAS	54
2.3.2. ORGANOGÉNESE EM PECÍOLOS E ENTRENÓS	54
2.3.3. DIFERENTES CONDIÇÕES DE STRESSE	57
2.4. DISCUSSÃO	66
2.4.1. ORGANOGÉNESE EM FOLHAS	66
2.4.2. ORGANOGÉNESE EM PECÍOLOS E ENTRENÓS	67
2.5.3. DIFERENTES CONDIÇÕES DE STRESSE	69

CAPÍTULO III

Transformação Genética

RESUMO	79
3.1. INTRODUÇÃO	81
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	83
3.2.1. AVALIAÇÃO DA EXISTÊNCIA DE INFECÇÕES VIRAIS NAS PLANTAS POR DAS-ELISA	83
3.2.2. MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE PLANTAS LIVRES DE VÍRUS	84
3.2.2.1. TERMOTERAPIA E ISOLAMENTO DE MERISTEMAS	84
3.2.2.2. ANTIVÍRUS QUÍMICO	84
3.2.3. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	85
3.2.3.2. ESTIRPES UTILIZADAS E PLASMÍDIOS	86
3.2.3.3. SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS	86
3.2.3.4. TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM</i>	87
3.2.3.5. SELECÇÃO DO MATERIAL APÓS TRANSFORMAÇÃO	88
3.2.4. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA POR BOMBARDEAMENTO DE PARTÍCULAS	88
3.2.4.1. MATERIAL VEGETAL	89
3.2.4.2. PREPARAÇÃO DA LIGAÇÃO DO DNA ÀS PARTÍCULAS DE OURO	89
3.2.4.3. BOMBARDEAMENTO	89
3.2.4.4. SELECÇÃO DO MATERIAL APÓS TRANSFORMAÇÃO	90
3.2.5. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO TRANSIENTE	90
3.2.6. ANÁLISE MOLECULAR DAS PLANTAS	91
3.2.6.1. EXTRACÇÃO DE DNA DAS PLANTAS	91
3.2.6.2. ANÁLISE DO DNA POR PCR	91
3.3. RESULTADOS	93



3.3.1. DETERMINAÇÃO DE INFECÇÕES VIRAIS NAS PLANTAS	93
3.3.2. OBTENÇÃO DE PLANTAS LIVRES DE VÍRUS	93
3.3.2.1. TERMOTERAPIA E ISOLAMENTO DE MERISTEMAS	93
3.3.2.2. ANTIVÍRUS QUÍMICO	94
3.3.3. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	96
3.3.3.1. SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS	96
3.3.3.2. TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM</i>	100
3.3.3.2. AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO TRANSIENTE DO GENE <i>UID A</i> .	101
3.3.4. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA POR BOMBARDEAMENTO DE PARTÍCULAS	105
3.3.5. ANÁLISE MOLECULAR DAS PLANTAS	107
3.3.5.1. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE <i>UID A</i> POR PCR	107

3.4. DISCUSSÃO 111

3.4.1. OBTENÇÃO DE PLANTAS LIVRES DE VÍRUS	111
3.4.2. TERMOTERAPIA	111
3.4.3. ANTIVÍRUS QUÍMICO	112
3.4.4. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	113
3.4.4.1. SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS	114
3.4.4.2. ESTUDO DA DETECÇÃO DA INTEGRAÇÃO DO GENE <i>UID A</i> E <i>NPT II</i>	116
3.4.5. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA POR BOMBARDEAMENTO DE PARTÍCULAS	117
3.4.3.2. ESTUDO DA DETECÇÃO DA INTEGRAÇÃO DO GENE <i>UID A</i> E <i>NPT II</i>	117

CAPÍTULO IV

Determinação molecular do sexo das plantas de lúpulo

RESUMO 120

4.1. INTRODUÇÃO 121

4.2. MATERIAL E MÉTODOS 123

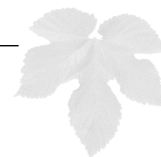
4.2.1. MATERIAL VEGETAL	123
4.2.1.1. EXTRACÇÃO DO DNA	123
4.2.1.2. PCR	123
- GERMINAÇÃO DOS GRÃOS DE PÓLEN DAS PLANTAS COLOCADAS NO CAMPO	124

4.3. RESULTADOS 125

4.3.1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS FLORES	125
4.3.2. DETERMINAÇÃO MOLECULAR DO SEXO DAS PLANTAS	126
- MORFOLOGIA E GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DAS PLANTAS NO CAMPO	127

4.4. DISCUSSÃO 129

4.4.1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS FLORES	129
4.4.2. DETERMINAÇÃO MOLECULAR DO SEXO DAS PLANTAS	129
- MORFOLOGIA E GERMINAÇÃO DOS GRÃOS DE PÓLEN DAS PLANTAS NO CAMPO.	130



CAPÍTULO V

Análise molecular das plantas transformadas

RESUMO	134
5.1. INTRODUÇÃO	136
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	140
5.2.1. EXTRACÇÃO DE DNA DAS PLANTAS	140
5.2.2. EXTRACÇÃO DE RNA DAS PLANTAS	140
5.2.3. ANÁLISE DO DNA DOS TRANSFORMANTES POR PCR	142
5.2.4. ANÁLISE MOLECULAR DAS PLANTAS (SOUTHERN E NORTHERN BLOTTING)	143
5.2.4.1. RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA	143
5.2.4.2. ELECTROFORESE, TRATAMENTO DE GEL E TRANSFERÊNCIA DO DNA	143
5.2.4.3. MARCAÇÃO DA SONDA	144
5.2.4.4. PRÉ-HIBRIDAÇÃO E HIBRIDAÇÃO	144
5.2.4.5. LAVAGENS	145
5.2.4.6. RECUPERAÇÃO DE MEMBRANAS DE SOUTHERN	145
5.2.5. ANÁLISE DO RNA POR NORTHERN	145
5.2.6. ANÁLISE POR DAS-ELISA	146
5.2.7. ANÁLISE POR RT-PCR	147
5.2.8. ANÁLISE DA MANUTENÇÃO DO GENE NAS PLANTAS EM CAMPO	147
5.3. RESULTADOS	149
5.3.1. EXTRACÇÃO DE DNA DAS PLANTAS	149
5.3.1.2. ANÁLISE DO DNA POR PCR	149
5.3.1.3. EXTRACÇÃO DE RNA DAS PLANTAS	151
5.3.2. ANÁLISE DAS PLANTAS TRANSFORMADAS POR SOUTHERN BLOTTING	152
5.3.3. ANÁLISE DAS PLANTAS TRANSFORMADAS POR NORTHERN BLOTTING	153
5.3.4. ANÁLISE POR DAS-ELISA	153
5.3.3. ANÁLISE POR RT-PCR	154
5.3.5. ANÁLISE DA MANUTENÇÃO DO GENE NAS PLANTAS TRANSFERIDAS PARA O CAMPO	155
5.4. DISCUSSÃO	157
5.4.1. ANÁLISE DO DNA POR PCR	157
5.4.2. ANÁLISE MOLECULAR DAS PLANTAS	158
5.4.2.1. ANÁLISE DAS PLANTAS TRANSFORMADAS POR SOUTHERN BLOTTING	158
5.4.3. ANÁLISE POR NORTHERN BLOTTING DAS PLANTAS TRANSFORMADAS	158
5.4.5. ANÁLISE POR DAS-ELISA	159
5.4.4. ANÁLISE DA MANUTENÇÃO DO GENE NAS PLANTAS TRANSFERIDAS PARA O CAMPO	160

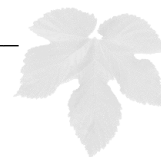
CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES	161
BIBLIOGRAFIA	169
ANEXO I	I
ANEXO II	VI
ANEXO III	IX



Lista de Abreviaturas:

ArMV	(Arabis Mosaic Vírus) Vírus do Mosaico de <i>Arabis</i>
atm	atmosfera
ATP	adenosina 5' -trifosfato
BAP	6- benzilaminopurina
BG	Brews Gold (variedade de lúpulo)
Br	Clone Bragança (clone de lúpulo espontâneo)
CaMV	Vírus do Mosaico da couve-flor
Can	Canamicina
Car	Carbenicilina
Cef	Cefotaxima
cDNA	DNA complementar
Cin	Cinetina
Cm	centímetro,
<i>cpArMV</i>	gene da cápside viral do Vírus do Mosaico de <i>Arabis</i>
CTAB	brometo de hexadeciltrimetilamônio
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoacético
dCTP	2'-desoxi-citidina-5'-trifosfato
DEPC	dietilpirocarbonato
DIECA	sódio dietilditiocarbamato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	2'-desoxinucleósido 5'-trifosfatos
d(T) ₁₆	“primer” da terminação poliT para transcrição reversa do RNA
EDTA	ácido etilenodiamina tetra-acético
ELISA-DAS	teste de ligação enzima-soro imunológico–dupla ligação anticorpo
Er	Eroica (variedade de lúpulo)
g	gramas
GUS	β-glucuronidase
h	horas
IAA	ácido indol-3-acético
IBA	ácido indol-3-butírico
2-iP	6-γ-γ-dimetilalilaminopurina
L	Litro
LB	terminação esquerda do T-DNA
m	metro



m ²	metro quadrado
M	Molar
mA	miliampere
Meio LB	meio de cultura de Luria Broth
min	minutos
mg	miligramas
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MS	meio de cultura de Murashige & Skoog (1962)
m/v	massa/volume
MW	peso molecular
MuLV	Vírus da Leucemia Murine
NAA	ácido α -naftalenoacético
ng	nanogramas
<i>nos</i>	gene da nopalina sintetase
<i>npt II</i>	gene da neomicina fosfotransferase II
NPT II	neomicina fosfotransferase II
O.D.	densidade óptica
PBS	fosfato salino tamponado
psi	libras por polegada quadrada
RB	terminação direita do T-DNA
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
Rpm	rotações por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa da reacção de polimerase em cadeia
s	segundos
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SH	meio de cultura de Skoog & Miller (1957)
ss	Cadeia simples
SSC	0,15 M Cloreto de Sódio + 0,015M Citrato de Sódio
TAE	Solução tampão tris-acetato-EDTA
T-DNA	DNA transferido do plasmídio Ti
TE	Solução tampão Tris-EDTA
ter	sequência terminadora
Ti	plasmídio indutor do tumor provocado por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Tris	tris (Hidroximetil) aminometano
μ E	micro Einstein



μg	microgramas
μL	microlitro
μM	micromolar
<i>uid A</i>	gene da β -glucuronidase
UV	radiação ultravioleta
var.	variedade
<i>vir</i>	genes de virulência
v/v	volume/volume
X-Gluc	5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucuronido
Zea	Zeatina



Resumo

A biotecnologia vegetal tornou-se uma ferramenta fundamental no melhoramento das mais variadas espécies. Na sua vertente de transformação genética, abriu novos horizontes de interesse agrícola e económico, no controlo de doenças e pragas. No lúpulo, a perda de produtividade, devido a infecções virais, levou a que a estratégia de transformação genética, para introdução de resistência a vírus, se tornasse extremamente interessante. Neste trabalho, procurou-se estabelecer condições para obter um sistema de transformação eficiente, com base na introdução do gene da cápside viral. Testou-se o sistema de regeneração em duas variedades (Eroica e Brewer's Gold) e num clone espontâneo (Bragança). Utilizaram-se diferentes meios base e diferentes explantes (folhas, pecíolos e entrenós). Após determinação dos meios com maiores taxas de regeneração, testaram-se nestes, alterações de pH, adição de ácido salicílico e de sulfato de cobre, stresse térmico e diferentes concentrações de açúcar, conseguindo-se aumentar a frequência regenerativa, sem no entanto, o aumento ultrapassar os 10 %. Os entrenós foram os explantes com melhor resposta regenerativa (60 %).

Após determinação molecular do sexo das plantas, seleccionou-se o clone Bragança para transformação genética, por ter taxas de regeneração superiores, encontrando-se ainda em boas condições fitossanitárias e fisiológicas. Este sistema de regeneração, permitiu desenvolver dois processos de transformação: 1) mediado por *Agrobacterium* e 2) bombardeamento de partículas. Nestes utilizaram-se dois plasmídios: o plasmídeo p35SGUSINT contendo os genes *uid A* e *npt II*, para determinação das condições de transformação e, o plasmídeo pROKArMV com os genes *npt II* e *cpArMV* (cápside viral). Os ensaios de transformação mediada por *Agrobacterium* foram optimizados, quanto ao tempo de corte antes da transformação, presença de acetoceringona, tempo de co-cultura, antibióticos para eliminação das bactérias, início da selecção e concentração do antibiótico de selecção. Verificaram-se os melhores resultados com corte dos explantes entre 26 e 48h antes da co-cultura, sem acetoceringona no meio, 48h de co-cultura, utilização da mistura 250 mg/L de carbenicilina e 250 mg/L de cefotaxima para eliminação bacteriana, início da selecção após 3 dias do início da co-cultura, com 25 mg/L de canamicina. No bombardeamento de partículas da optimização resultou: utilização da pressão a 1500 e 2000 psi, a uma distância de 9 cm. Plantas, com presença estável do gene *cpArMV*, determinada por análise de PCR (após 6 meses de selecção), foram testadas por Southern blotting, RT-PCR, DAS-ELISA e Northern blotting. Na transformação mediada por *Agrobacterium* e



por bombardeamento de partículas, a percentagem obtida foi, respectivamente, 0,91 % e 0,76 %. Após 2 anos em terra, as plantas transformadas utilizando os dois processos, foram testadas para o gene da *cpArMV*. Destas, as obtidas por transformação mediada por *Agrobacterium* evidenciaram, pela técnica de Southern blotting, o gene *cpArMV* integrado no genoma.

Abstract

Plant biotechnology has become an essential tool for the improvement of plant cultivars. Genetic engineering, used as a strategy to control diseases and plagues in plants, has been an area of biotechnology with high agronomic and economic interest. In hop case, the lost of productivity, due to viral infections, as made the genetic engineering use to introduce virus resistance, highly worthwhile. In this study, the conditions were established to obtain an efficient transformation system based on the use of capsid viral gene. The regeneration system was tested in two varieties (Eroioca and Brewer's.Gold) and in spontaneous clone (Bragança). Several basal mediums were used, as well as several types of explants (leaves, petiole and stems). The basal mediums with higher regeneration rates were selected and several other conditions were tested on these mediums: alterations on the pH, addition of salicylic acid and copper sulphur, temperature stress and several sugar concentrations. Higher regeneration rates were achieved, but only up to 10%. Stems were the explants that exhibited the best regeneration frequency (60 %).

After molecular identification of the sex of the plant, the clone Bragança was selected for genetic engineering, due to its superior regeneration rates, as well as its good phytosanitary and physiologic conditions.

Using the established regeneration system, it was possible to develop two transformation processes: 1) *Agrobacterium*-mediated and 2) particle bombardment. Two plasmids were used in both processes: plasmid p35SGUSINT with *uid A* and *npt II* genes, for establishment of transformation conditions and, plasmid pROKArMV with *npt II* and *cpArMV* (viral capsid) genes. *Agrobacterium*-mediated transformation assays were optimised for: cutting time before transformation, presence of acetosseringone, period of co-culture, antibiotics used for bacteria elimination, beginning of selection, concentration of the selection antibiotic. Best results were obtained for, cutting of the explants between 26-48h before co-culture, without acetosseringone in the medium, 48h of co-culture, 250 mg/L of carbenicilin and 250 mg/L of cefotaxim for bacteria elimination, beginning of selection 3 days after the beginning of co-culture using 25 mg/L of kanamicin. Particle bombardment conditions optimisation resulted in the use of 1500 and 2000 psi pressure,



at a distance of 9 cm. Transformed plant, showing stable presence of the *cpArMV* gene by PCR (after a selection period of 6 months), was tested by Southern blotting, RT-PCR, DAS-ELISA and Northern blotting. The percentage of transformation was 0.91% for the *Agrobacterium*-mediated process and 0.76% for particle bombardment.

After two years in soil conditions, the plants originated from *Agrobacterium*-mediated and particle bombardment transformation, were tested for the *cpArMV* gene. From these, the plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation, exhibited, through Southern analysis, the *cpArMV* gene integrated in the genome.



CAPÍTULO I

Introdução Geral

Índice

RESUMO	2
1.1. <i>HUMULUS LUPULUS</i> L.	4
1.1.A. CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS E DISTRIBUIÇÃO	4
1.1.B. BREVE HISTÓRIA DAS APLICAÇÕES DO LÚPULO	8
1.1.B.A. PAPEL DO LÚPULO NA INDÚSTRIA CERVEJEIRA	9
1.1.C. PRAGAS E DOENÇAS DO LÚPULO E SUAS CONSEQUÊNCIAS ECONÓMICAS	17
1.1.D. O NASCIMENTO DA VIROLOGIA	19
1.1.E. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS VÍRUS	20
1.1.F. POSSÍVEIS LOCAIS DE PENETRAÇÃO DOS VÍRUS	23
1.1.G. ESTRATÉGIAS DE RESISTÊNCIA E COMBATE A VÍRUS	25
1.2. CULTURA DE PLANTAS <i>IN VITRO</i>	28
1.3. REGENERAÇÃO DE MERISTEMAS <i>IN VITRO</i>	29
1.4. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA	32
1.4.A. TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	33
1.4.B. TRANSFORMAÇÃO POR BOMBARDEAMENTO DE PARTÍCULAS	39
1.4.C. EXPRESSÃO DE TRANSGENES	41
1.5. OBJECTIVOS	44

Resumo

O *Humulus lupulus* L. é uma espécie herbácea perene e dióica da família *Cannabaceae*, de grande valor económico na indústria cervejeira. O lúpulo, como é vulgarmente conhecido, tem um papel determinante nesta indústria em todo o mundo. Actualmente, mais de 40 variedades desta planta são exploradas em mais de 67 925 ha em todo o mundo, atingindo uma produção de cerca de 80 000 toneladas. A sua distribuição espontânea ocorre em zonas temperadas, encontrando-se no hemisfério norte acima dos 32° de latitude até ao máximo de 55°. A sua utilização na indústria cervejeira só começou no século XII, tendo a sua utilização sido polémica, na altura. No século XV a sua utilização no fabrico da cerveja era já universal e hoje o lúpulo produzido para este fim, é uma significativa fonte de rendimento em muitos países.

O lúpulo é uma espécie sensível a um vasto conjunto de pragas e doenças. Os nemátodos e os insectos, causadores de danos nas plantas que comprometem a produção e a sobrevivência das mesmas, são vectores de dispersão de agentes patogénicos, como bactérias e vírus. Existem inúmeros vírus e viróides capazes de infectar e destruir as plantações de lúpulo. Entre os mais comuns destaca-se o Vírus do Mosaico de *Arabidopsis* (ArMV) que causa grandes reduções no conteúdo em α -ácidos, comprometendo a comercialização da produção.

Os vírus são constituídos por um conjunto de uma ou mais moléculas de ácido nucleico, normalmente incluídas numa cápside proteica, ou numa cápside de proteína e lipoproteína, capaz de proporcionar a sua replicação apenas em determinadas células hospedeiras. As listagens mais recentes consideram 9 famílias de vírus de plantas com 33 géneros. De entre eles os Nepovirus, aos quais pertence o Vírus do Mosaico de *Arabidopsis*, têm como ácido nucleico RNA de cadeia dupla, bipartido. As infecções por Nepovirus produzem sintomas como mosaicos, necrose sistémica e cloroses em anel "Ringspots". A transmissão destes vírus é feita por nemátodos via sistema radicular.

Os primeiros trabalhos de cultura *in vitro* de lúpulo são da década de 70 do sec. XX. O objectivo era a obtenção e micropropagação de plantas livres de vírus. A obtenção de plantas após transformação genética é um dos possíveis objectivos da regeneração de plantas *in vitro*. A possibilidade de transferir DNA estranho para células vegetais, foi possível desde que se reconheceu que as bactérias fitopatogénicas, *Agrobacterium tumefaciens*, e a *Agrobacterium rhizogenes* eram capazes de fazer essa transferência. A transformação genética mediada por *Agrobacterium* começou na década de 80 do século XX, envolvendo actualmente, mais de 40 espécies. O *Agrobacterium tumefaciens* transfere uma porção (T-DNA) do seu Ti-plasmídeo para o núcleo das plantas, fungos ou células animais. Existem protocolos de transformação em várias espécies vegetais com base nesta transferência de material genético pelo *Agrobacterium*, sendo provavelmente a metodologia mais difundida. Em mais de 30 países existem mais de 3000 campos de experimentação com plantas transgénicas.



A biolística ou transformação genética por bombardeamento de partículas consiste no choque de partículas densas (microprojectéis de ouro ou tungsténio) a grande velocidade contra as células vegetais, provocando ferimentos de diferentes dimensões. O gene ou genes são introduzidos nas células a transformar, associados a estas partículas. Desde 1988, que esta técnica de transformação tem sido largamente utilizada em herbáceas, monocotiledóneas (em particular, cereais), leguminosas e lenhosas.



1.1. *Humulus lupulus* L.

1.1.a. Características botânicas e distribuição

O *Humulus lupulus* L. é uma espécie pertencente à família *Cannabaceae*, descrita pela primeira vez, em 1949 por Pólya que, em conjunto com o género *Cannabis*, constituem os dois únicos géneros desta família. O lúpulo, como é vulgarmente conhecido, é uma planta herbácea perene, dióica e normalmente diplóide ($2n=20$) (Heale *et al.*, 1989), com óvulos anátropos. Possui algumas características particulares, nomeadamente o seu rápido crescimento, e a capacidade para crescer e rodar em simultâneo, trepando e enrolando os seus caules em volta de um suporte. O lúpulo chega a atingir 7 a 9 metros de altura, em menos de 4 a 5 meses (Heale *et al.*, 1989).

Durante o Inverno, toda a parte aérea da planta senesce, ficando o lúpulo reduzido ao rizoma, até ao início da próxima Primavera. Este rizoma tem gemas e raízes (Fig.1.1.d), organizadas num sistema complexo que pode atingir 7-8 metros de profundidade (Hiller *et al.*, 1996).

Na Primavera e início do Verão, nos chamados Jardins de lúpulo (campos de produção de lúpulo) Fig.1.1.a) e b), as plantas crescem enrolando-se aos suportes no sentido destrógiro, segurando-se a estes graças aos tricomas em forma de bigorna ou ganchos que revestem os caules (Fig.1.1. c). As folhas são cordiformes lobadas verde-escuro, com extremidades finamente recortadas, em geral opostas, com algumas exceções em algumas que, na zona superior, surgem opostas mas isoladas (Hiller *et al.*, 1996).

No fim de Junho, o crescimento vegetativo vertical cessa, como resposta à diminuição do fotoperíodo tendo início o desenvolvimento lateral dos meristemas florais (Hiller *et al.*, 1996).

Por se tratar de uma planta dióica, a morfologia das suas flores, em cada um dos sexos, é bastante diferente. As inflorescências surgem nas axilas das folhas. As inflorescências masculinas são panículas multiflora com cerca de 10 cm de comprimento, enquanto que as femininas se encontram em estróbilos com forma bojuda e arredondada que, dependendo da variedade, quando completamente desenvolvidos, atingem cerca de 5 a 6 cm, (Fig.1.1. e) f) e g)). Nas panículas as anteras são sésseis com deiscência foramina no ápice (Castroviejo *et al.*, 1993). Os estróbilos são constituídos por um elevado número de brácteas externas verde-amareladas e bractéolas internas sobrepostas ligadas a um eixo (<http://biodiversity.uno.edu/delta/>; Benitez *et al.*, 2001). Quando removidas as brácteas, verifica-se que o eixo é revestido por tricomas inseridos



em zig-zag. Cada uma das bractéolas protege, na sua base, um pequeno aquénio (fruto). Tanto o fruto como as brácteas (Fig.1.1. i) estão revestidos de glândulas amarelo-translúcido (Fig.1.1. h, i), contendo uma substância com aspecto de um pó amarelo composto maioritariamente por α e β -ácidos (Fig.1.1. l). Muito do valor comercial do lúpulo depende da abundância deste pó. Com o avanço da época quente, estas brácteas vão adquirindo uma cor acastanhada intensa (Fig.1.1. j). Estas substâncias existem essencialmente nas flores femininas, pelo que, são as plantas femininas que constituem os campos de cultura de lúpulo espalhados pelo mundo (Hiller *et al.*, 1996)



Figura 1.1.- **a)** e **b)** Imagens de campos de lúpulo (jardins de lúpulo). **c)** Início do crescimento vegetativo nos campos de lúpulo. **d)** Porções de rizoma com gemas. **e)** Estróbilos femininos. **f)** e **g)** Fases iniciais do desenvolvimento do estróbilo. **h)** Corte longitudinal de um estróbilo. **i)** Tricomas (glândulas amarelo-translúcido) na base de uma bráctea. **j)** Flores e brácteas maduras e secas de onde se retiram os compostos de interesse económico do lúpulo. **l)** Pó amarelo (α e β -ácidos) isolado das flores.

Distribuição e exigências edafoclimáticas do lúpulo

O lúpulo encontra-se distribuído nas regiões temperada do globo, sendo espontâneo no hemisfério Norte acima dos 32º de latitude e estendendo-se, no máximo, até aos 55º (BH, 2001). Embora a origem da sua comercialização seja europeia, a sua distribuição e exploração actual expande-se pela América do Sul, África do Sul, Nova Zelândia e Austrália (Connell, 1986).

Actualmente, as regiões de maior produção situam-se na Europa, Região Nordeste dos E.U.A., Austrália, Nova Zelândia e África do Sul. No entanto, nos últimos



anos a produção de países como a Ucrânia e a República Popular da China tem vindo a ganhar dimensão (Benitez *et al.*, 2001).

Os locais preferenciais de desenvolvimento do lúpulo espontâneo (Figura 1.2.) são zonas de bosque húmido e junto a margens de riachos e ribeiros (Langer & Hill, 1982).

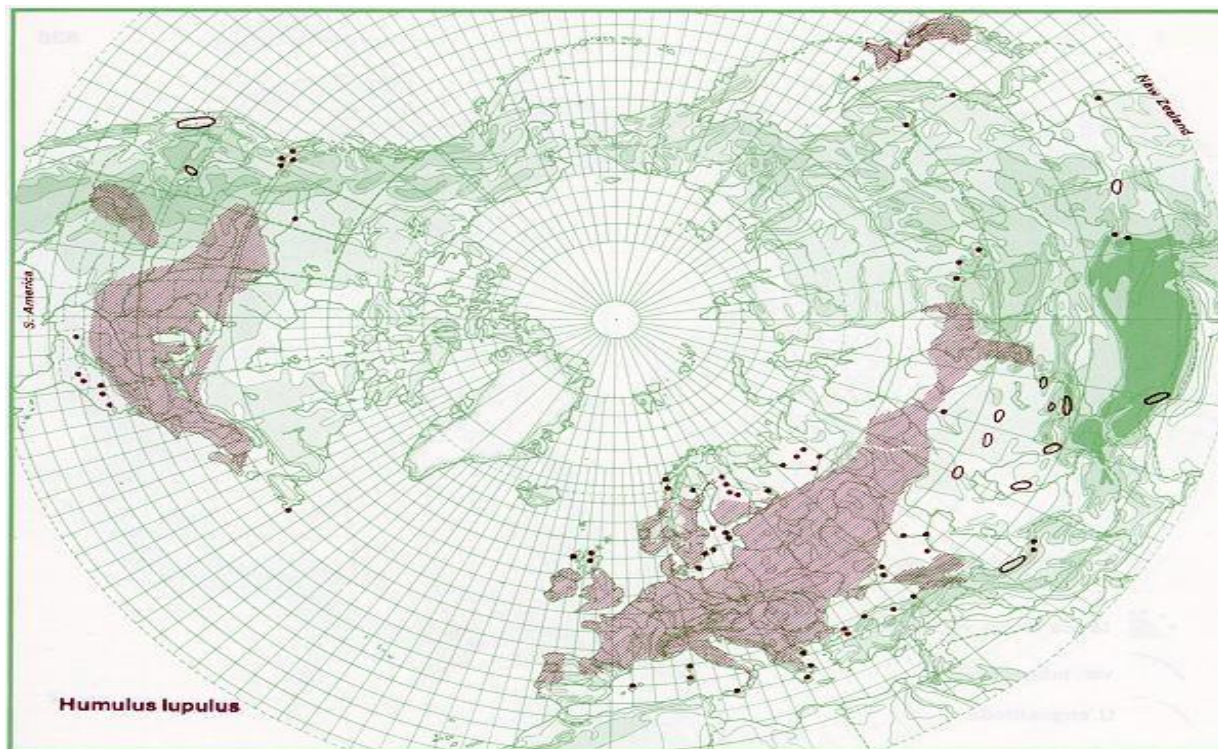


Figura 1.2.-Distribuição do lúpulo no mundo. A roxo observam-se as zonas onde se pode encontrar lúpulo espontâneo (<http://www.life.ca>)

A distribuição do lúpulo está, necessariamente, relacionada com o clima e com as características edafoclimáticas essenciais para o seu desenvolvimento, das quais se destacam: a profundidade, constituição do solo, um número elevado de horas de sol e altas temperaturas no Verão (BH, 2001). Para que haja floração, são necessários pelo menos 120 dias de calor com fotoperíodo de 15 horas e baixas temperaturas no Inverno (Hilton, 2002).

O solo deve ser profundo, com pH entre 6 e 7, leve e bem drenado, mas com grande disponibilidade de água, visto que o lúpulo perde muita água por transpiração. Na Figura 1.3. podemos observar a distribuição do lúpulo espontâneo em Portugal, distribuição claramente associada a características do solo e clima do país. A utilização de fertilizantes ricos em potássio, fosfato e azoto, em explorações comerciais de lúpulo é uma prática corrente, são utilizados fundamentalmente na Primavera, embora no caso



dos compostos azotados, estes possam ser aplicados 2 a 3 vezes, entre Março e Junho (Carter *et al.*, 2000).



Figura 1.3.- Distribuição do lúpulo em Portugal continental (dados fornecidos pelo Banco Português de Germoplasma Vegetal).

O lúpulo desenvolve-se bem em solos ricos em húmus, pelo que, segundo alguns autores, o nome da planta (*Humulus*) deriva da palavra humus, a mistura de solo rica em matéria orgânica, onde a planta se desenvolve. Quanto ao nome específico, pensa-se que terá origem na palavra latina *Lupus* (lobo) porque, no seu rápido crescimento à luz, envolve e estrangula outras plantas, de um modo semelhante aos ataques dos lobos aos rebanhos de ovelhas (Hiller *et al.*, 1996).

Em regiões de crescimento espontâneo, o lúpulo utiliza como suporte para o seu crescimento, árvores, canaviais ou até mesmo muros e paredes altas. Neste contexto, nos jardins de lúpulo foi desenvolvida toda uma estrutura, formada por troncos de madeira robusta, em geral castanheiro, fios (cabos-guia) e arames que são o suporte do crescimento das plantas (<http://www.hhist.html>). Nestes campos, o compasso de plantação deve ser suficientemente largo para permitir a circulação do ar e/ou brisas, com orientação preferencial a sul e sudoeste. Os ventos fortes e tempestades são muito prejudiciais para as plantações de lúpulo, em todas as fases do seu desenvolvimento, provocando a queda de ramos e impedindo que, as extremidades das mesmas, adiram aos cabos-guias, que lhes servem de suporte, podendo mesmo parti-las (<http://www.hhist.html>).



No primeiro ano de cultura, o crescimento do lúpulo é muito reduzido, de tal modo que, alguns produtores cultivam em simultâneo, nesses campos, batatas ou outras espécies hortícolas. Esta prática pode ser prejudicial por poder contribuir para o esgotamento de nutrientes do solo. Em regra, a produção de lúpulo só atinge o seu valor máximo ao fim de três anos, quando as plantas atingem o seu pleno crescimento. Assim, embora os primeiros anos de um campo de lúpulo, possam não ser economicamente rentáveis, estes campos podem manter-se em plena produtividade entre 10 a 20 anos após instalação (National Hop Association of England, 2001a)

O solo, entre as linhas de lúpulos, deve ser mobilizado entre Novembro e Março, quando surgem os novos rebentos. É nessa época que é feita a selecção dos meristemas que irão permanecer, eliminando-se os restantes. Embora esta selecção se faça inicialmente, há sempre desenvolvimento de ramas laterais que têm tendência a formar emaranhados, que devem ser evitados. No Verão, estas ramas laterais, assim como as folhas basais dos caules principais, são cortadas para promover o arejamento e impedir a propagação de doenças. As ramificações dos caules que se desenvolvem no fim do Verão ficarão para promover o desenvolvimento da planta na Primavera seguinte. No início da Primavera serão cortados todos os rizomas, no tamanho adequado, para a multiplicação (15 a 20 centímetros), tendo o cuidado de deixar um gomo em cada porção cortada (<http://www.life.ca>).

1.1.b. Breve história das aplicações do lúpulo

Os primeiros registos de utilização de lúpulo encontram-se no Antigo Egipto, onde a planta era considerada uma erva medicinal, indicada para tratamentos de doenças do tubo digestivo e do fígado (National Hop Association of England, 2001b). Este tipo de uso ainda hoje é referido em estudos etnobotânicos em Portugal. No Parque Natural de Montesinho, há registo do uso das inflorescências de lúpulo secas e verdes, para a preparação de, respectivamente, infusões para fins diuréticos e para transtornos do aparelho digestivo, e licores para auxiliar as digestões (Carvalho, 2005).

Entre os Romanos, o lúpulo foi utilizado como planta ornamental. Os rebentos mais tenros (de cerca de 20 cm) produzidos, na Primavera, eram também apreciados em sopas ou preparados, na actualidade, de um modo semelhante aos espargos. Embora nas zonas rurais de Inglaterra ainda se utilize o lúpulo para este fim (Maton, 1986), a sua utilização como hortícola está em desuso.

No início da Idade Média, o lúpulo voltou a ser utilizado fundamentalmente como erva medicinal em que as folhas e as flores eram o ingrediente fundamental em chás, infusões e banhos (BH, 2001). Estes chás eram utilizados para combater insónias e



problemas digestivos. Mais recentemente, chegou mesmo a recomendar-se como tónico estomacal, a bebida resultante das flores de lúpulo embebidas em “sherry” (Grieve, 1931). Com o mesmo objectivo de evitar insónias, eram também utilizadas as flores secas em almofadas denominadas “almofadas de lúpulo” (<http://www.hhist.html>). Na China, os extractos alcoólicos de lúpulo, eram utilizados, em diversas dosagens e com diferentes graus de sucesso, no tratamento de diferentes tipos de lepra, de tuberculose e de desinteria (Duke, 1983).

Devido às suas características de planta fibrosa, resistente e flexível, o lúpulo é utilizado na Suécia e na Rússia como matéria-prima de eleição para a confecção de vestuário leve e durável, semelhante ao linho (Hiller *et al.*, 1996) (Mansfeld's Database of Agricultural and Horticultural Crops, 2002). Os seus caules são também utilizados na produção de um papel fino designado por *bine*. A zona terminal das flores e folhas pode também ser utilizada para a produção de pigmento castanho, para aplicação industrial. Actualmente, a utilização do lúpulo é bastante diversificada, podendo ir desde a indústria cosmética (em perfumes, champôs, loções e cremes) até à aromatização de tabaco e águas minerais, casos em que se utilizam os seus óleos essenciais. Estes óleos essenciais são também frequentemente utilizados na produção de sobremesas congeladas, gelatinas e pudins, assim como em algumas bebidas não alcoólicas (Duke, 1983). É, no entanto, na produção de cerveja que o lúpulo apresenta o seu maior valor económico a nível internacional.

1.1.b.a. Papel do lúpulo na indústria cervejeira

O primeiro documento escrito registando a utilização de lúpulo na produção de cerveja data do século IX A.C., tendo o primeiro campo de lúpulo sido estabelecido em 859 A.C. na Baviera (Mansfeld's Database of Agricultural and Horticultural Crops, 2002). A sua utilização sistemática na produção de cerveja teve início na Flandres, no século XIII. Foi aí que começou, verdadeiramente, a produção de cerveja, visto que desde o início da sua fabricação na Mesopotâmia, a cerveja era uma bebida adocicada, baseada na fermentação de malte, a que se dava o nome de *A/e* (palavra derivada do termo escandinavo “öl” que denominava a bebida mais apreciada pelos Vikings). Era uma bebida de consumo rápido, à qual, durante a fermentação, se podiam adicionar diferentes tipos de ervas, mel e folhas de algumas árvores, com o objectivo de produzir variantes no sabor base (<http://www.oda.state.or.us/hop/ohc.html>). Um dos maiores problemas do *A/e* era a sua conservação. Este problema foi resolvido com a utilização de lúpulo, visto que esta planta produz compostos com acção bactericida, para bactérias Gram-negativas (Duke, 1983).



A utilização de lúpulo na produção cervejeira não foi pacífica e, durante anos, a sua utilização em Inglaterra foi proibida por ordem real. A ideia generalizada de que o lúpulo adulterava o *Ale*, era traduzida em afirmações como a de John Evelyn: '*Hops*,' says, in his *Pomona* (1670), '*transmuted our wholesome ale into beer, which doubtless much alters its constitution. This one ingredient, by some suspected not unworthily, preserves the drink indeed, but repays the pleasure in tormenting diseases and a shorter life*' (Hiller, *et al.*, 1996). Durante anos, a utilização do lúpulo na cerveja esteve associada à ideia de que tinha sido este o responsável pela revolta contra a corrupção, liderada por Jack Cade em 1450 na zona de Kent, pois estes revoltosos bebiam habitualmente cerveja fabricada com lúpulo. Pensava-se que a utilização de lúpulo no fabrico da cerveja desencadeava alterações de comportamento que levavam a revoltas que podiam pôr em risco reis e senhores feudais (National Hop Association of England, 2001b). Só em 1552, no reinado de Eduardo VI, foi revogada a proibição e o lúpulo pôde passar a ser utilizado.

Os produtores da Flandres estabeleceram-se no condado de Kent, levando consigo a técnica de produção de lúpulo e da nova bebida, à qual foi dado o nome de cerveja (National Hop Association of England, 2001b). A sua produção estendeu-se por toda a Europa e, daí, ao resto do mundo. Em 1870, a produção de lúpulo já se estendia a 53 países, incluindo os E.U.A. onde foi introduzida pela Massachusetts Company em 1672 (Mansfeld's Database of Agricultural and Horticultural Crops, 2002). Deste modo, a cultura de lúpulo desenvolveu-se, tornando-se uma significativa fonte de rendimento económico para alguns países: Estados Unidos (Noroeste e Nova Iorque), Grã-Bretanha (South East e West Midlands), República Checa e Eslováquia, Alemanha, ex-Jugoslávia, França, Bélgica, Polónia, ex-URSS, Canadá, Japão, Espanha, Austrália, China e Roménia. O lúpulo é também produzido noutros países, embora com um significado económico reduzido, (praticamente só para consumo interno), neste grupo de países podemos incluir Portugal (Tabela 1). Actualmente, a produção anual de lúpulo é de cerca de 80 000 toneladas, produzidas em 67 925 ha, utilizando-se aproximadamente 40 variedades diferentes.



Tabela 1: Produção Mundial de cones de lúpulo, anos 1995 e 1999 (em Zentner: 1 Zentner =50 Kg) (Hop Growers of América, 2001a)

Países	Produção de cones 1995	(Zentner) 1999
Bélgica	12 069	8 649
Alemanha	681 081	558 247
Espanha	33 845	31 370
França	22 075	26 333
Irlanda	206	168
Áustria	6 716	6 324
Portugal	2 533	1 174
Grã-Bretanha	81 560	60 44
Comunidade Europeia	840 085	692 409
EUA	715 338	568 306
Austrália	50 980	40 350
Nova Zelândia	15 129	14 811
Jugoslávia	15 325	12 000
Eslovénia	76 200	46 000
Rep. Checa	198 260	122 000
Eslováquia	20 700	6 300
Ucrânia	75 686	7 800
Rússia	–	17 412
Polónia	65 290	53 000
Bulgária	10 126	6 092
Total mundial	2 549 306	1 874 942

Em termos de volume de produção, Portugal é um pequeno produtor. No entanto, como pode observar-se no mapa apresentado na Fig.1.3., o lúpulo espontâneo apresenta uma ampla distribuição no país. Este facto sugere que, embora em termos de cultura a sua distribuição esteja reduzida à zona Nordeste do país, em particular ao distrito de Bragança (Tabela 2), a sua cultura poderá ter futuro, quer para responder às necessidades internas de fabrico de cerveja, quer para aproveitamento da possível variabilidade genética das plantas espontâneas que poderá ser orientada para a obtenção de novas variedades de valor comercial acrescentado, em termos de resistência a doenças e/ou como produtoras de novos aromas e maior produtividade.

Tabela 2- Regiões e áreas de produção de lúpulo nos diferentes países (Hop Growers of América, 2001^a).

País	Região Administrativa	Área de produção	Nº associações produtores	Área (ha)	Nº Produtores	Area média / prod
Bélgica	Vlaanderen	West-vlaanderen Vlaams-Brabant	2	255	56	4,55
Alemanha	Baden-Württemberg Bayern Sachsen Sachsen-Anhalt Thüringen Rheinlandfalz	Tettngeng, Baden Hallertau, Spalt, Hersbruck "Elbe-Saale" "Elbe-Saale" "Elbe-Saale" Rheinpfalz, Bitburg	5	18299	2324	7,87
Espanha	Castilla y León La Roija	Castilla y León La Roija	2	808	797	1,01
França	Nord-Pas de Calais Alsace	Nord Alsace	2	814	114	7,14
Irlanda	Lenster	Kilkenny		7	1	7,00
Áustria	Ostösterreich Südösterreich Westösterreich	Niederösterreich Steiermark Oberösterreich	2	225	76	2,96
Portugal	Norte	Braga Bragança	1	64	14	4,57
Grã-Bretanha	South East West Midlands	Kent Hereford, Worcestershire	5	2214	174	12,72
U.E.			19	22686	3556	6,38

O valor comercial do lúpulo está associado à composição química do secretado das glândulas (tricomias) situadas, em grande quantidade, nas brácteas das flores femininas. Em termos gerais, o secretado é complexo, sendo constituído pelo conjunto de compostos e percentagens que constam da (Tabela 3):

Tabela 3: Composição geral do lúpulo seco em % (Hop Growers of América, 2001b)

Composição	%
Humidade	10 - 11
α -Ácidos	2 - 12
β -Ácidos	2 - 10
Óleos essenciais	0.5 - 2.0
Polifenóis	2 - 5 (dependendo do método de análise)
Lípidos e ceras	2 - 4
Proteínas	12 - 18
Celulose	40 - 50
Péctinas	1 - 2
Cinzas	7 - 9



Dependendo das quantidades relativas de α -Ácidos que as diferentes variedades de lúpulos produzem, podemos classificá-las em dois grandes grupos de variedades: Aroma (o conteúdo em α -Ácidos varia entre 3.83 e 5.14%); Amargo ou Alfa (o conteúdo em α -Ácidos varia entre 8.62 e 9.31%) (Benitez *et al.*, 2001). No entanto, nos últimos anos, têm vindo a ser desenvolvidas, variedades com concentrações de α -Ácidos superiores ao habitual nas variedades consideradas Alfa. Por isso, a estas novas variedades foi atribuído o nome de Super-Alfa, sendo ainda pouco significativa a sua utilização industrial e, portanto, o seu valor comercial (NASS - U.S. Department of Agriculture, 2001).

Em Portugal, actualmente, só se produz a variedade amarga (Nugget), com origem no Oregon, EUA (Oregon Hop Commission, 2001) por serem as variedades amargas, tradicionalmente, as mais apreciadas no país. As primeiras grandes produções de lúpulo, em Portugal, foram feitas com a variedade Brewers Gold (de origem inglesa e muito disseminada, até há alguns anos atrás por países como a Alemanha, França, Bélgica e Espanha), seguindo-se a introdução da variedade Eroica (também de origem americana) e, finalmente, da Nugget. Todas elas têm em comum serem variedades amargas ou Alfa (BRALUPULO comunicação pessoal). Esta escolha indica uma preocupação dos produtores portugueses em tomar a opção mais acertada, ou seja, mais consentânea com as opções internacionais, como pode observar-se na Figura 1.4., onde se apresenta a evolução da preferência dos tipos de lúpulos utilizados na indústria.

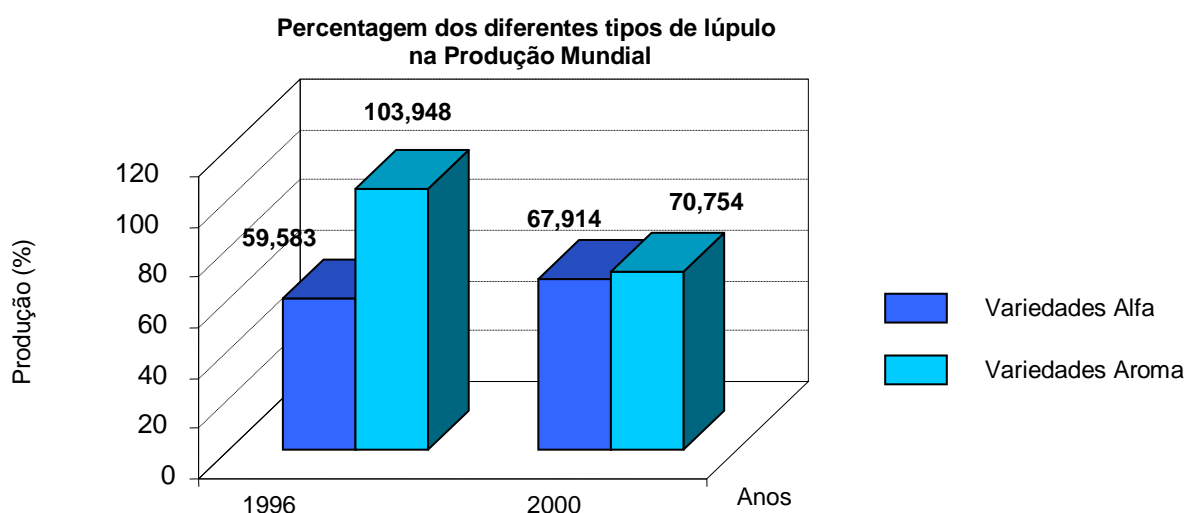


Figura 1.4.- Representação gráfica das percentagens de produção de variedades Alfa e Aroma entre 1996 e 2000 (adaptado de Hop Growers of América, 2001a).

A nível internacional, a produção está concentrada em dois países: Estados Unidos e Alemanha (Tabela 4). No entanto, em países como a China ou a República

Checa, o interesse na produção de lúpulo têm vindo a aumentar substancialmente, com o concomitante acréscimo de produção.

Tabela 4: Produção mundial de Lúpulo (em kg) para o ano 2000, área cultivada (em m²) e produção de variedades Aroma e Alfa (adaptado de Hop Growers of América, 2001^a)

País	Área de Produção (m ²)				Produção (Kg)			Prod. M.T.α
	Aroma	Alfa	Total	Novas	Aroma	Alfa	Total	
Áustria	36421,8	8081599,3	8118021,2	0	6,6	2109,2	2115,8	256,7
Bélgica	748670,9	1728013,4	2476684,4	0	112,5	378,3	490,8	47,6
Bulgária	898405,1	2594043,6	3492448,8	0	51,5	168,2	219,7	D.D
China	959108,1	42864447,0	43823555,2	0	237,6	14800,3	15037,9	D.D
Rep.Checa	59460660,9	1436638,8	60897299,7	3197027,3	4398	288	4686	180,8
Alemanha	103648434,4	72823425,6	176471860,0	9340175,9	15753	12691,6	28444,6	2526
França	7320787,8	505858,7	7826646,5	307562,1	1575,7	100,5	1676,2	62,2
Nova Zelândia	1736107,2	2067950,5	5540165,0	0	343,9	486,7	830,6	105,5
Polónia	14487794,6	7490756,3	21978550,9	0	1450	1100	2550	170,7
Portugal	0	416827,6	416827,6	0	0	42,1	42,1	4,8
Rússia	10849658,4	4366572,7	15216231,2	639405,4	570,1	253,4	823,5	33,6
Eslováquia	3496495,6	0	3496495,6	0	220	0	220	7,7
Eslovénia	16745948,0	696061,6	1744209,7	1226201,6	1686	96,8	1782,8	136,1
Espanha	0	7931865,2	7931865,2	497765,0	0	1412,7	1412,7	149,7
Reino Unido	11319095,3	7523131,3	18842226,7	696061,6	1627,6	1131,5	2759,1	229,3
Ucrânia	9591081,9	2994683,8	12585765,7	3994260,6	552	200	752	38,7
EUA	43734524,0	103587731,3	147322255,4	0	6247,8	24605	30852,8	3020
Jugoslávia	1299045,2	3205121,0	4504166,31	97124,8	104	256,8	360,8	22,1
Africa do Sul	0	4742931,6	4742931,6	0	0	870,2	870,2	89,6
Total 2000	285458116,0	272277460,4	557735576,5	20011772,1	34884,8	60831,3	95716,1	7082
Total 1999	294668792,1	257397119,4	552065911,6	13136140,0	38190,0	54848	93038	6279

Nota:D.D.(dados desconhecidos); Prod. MT (produção expressa em toneladas métricas)

Assim, de 1996 até 2000, a China aumentou a sua área de produção em 4,4% e a República Checa em 0,7%, sendo este acréscimo de cultura apenas acompanhado pela Eslovénia, Ucrânia e Nova Zelândia. Nestes países, além de se aumentar a produção de lúpulo, aumentou-se, em paralelo, a produção de cerveja sendo, neste momento, a China o segundo maior produtor mundial (Tabela 5).

Tabela 5: Os dez maiores produtores de cerveja (Hop Growers of América, 2001a)

País	Produção 1999 (x1000 barris)
EUA	6 248,330
China	4 887,700
Alemanha	2 980,176
Brasil	2 124,194
Japão	1 889,294
Reino Unido	1 528,503
México	1 512,704
Rússia	1 141,344
Espanha	683,010
África do Sul	678,994



Muitos destes países, grandes produtores de cerveja, são também grandes consumidores. Embora na maior parte dos países, a produção seja para exportação, na China a maior parte destina-se ao consumo interno que, neste caso particular, se traduz num mercado gigantesco de milhões de potenciais consumidores. Na lista das 35 maiores cervejeiras mundiais (Tabela 6), a primeira cervejeira chinesa só surge em 26º lugar porque, embora tenha uma produção elevada, está limitada ao mercado interno.

Um estudo da Organização Mundial de Saúde mostrou que países Europeus, nomeadamente a Itália, França e Espanha estão a mudar, gradualmente, os hábitos de consumo de bebidas, substituindo o tradicional consumo de vinho pelo consumo de cerveja (BH, 2005). Se esta tendência se mantiver, a cultura do lúpulo pode vir a ser economicamente importante para os países produtores, nomeadamente os pequenos produtores, como Portugal que têm assim novas possibilidades de mercado.

Tabela 6: As trinta e cinco maiores Cervejeiras do Mundo (Hop Growers of América, 2001a)

	Nome e localização dos grupos cervejeiros	1999 mil HL	% mercado Mundial	Soma % mercado mundial
1	ANHEUSER-BUSCH EUA	113,8	8,46	8,46
2	INTERBREW Bélgica	75,2	5,59	14,05
3	HEINEKEN Holanda	67,7	5,03	19,08
4	AMBEV Brasil	60,8	4,52	23,60
5	SAB África do Sul	56,4	4,19	27,79
6	CARLSBERG Dinamarca	52,6	3,91	31,70
7	PHILIP MORRIS EUA	50,8	3,78	35,47
8	SCOTTISH COURAGE R.U.	44,4	3,30	38,77
9	MODELO México	34,4	2,56	41,33
10	KIRIN Japão	29,4	2,19	43,52
11	COORS E.U.A	26,8	1,99	45,51
12	ASAHI Japão	25,1	1,87	47,37
13	FEMSA(Cuauhtemoc) México	23,6	1,75	49,13
14	DIAGEO/GUINNESS R.U/Irlanda	21,0	1,56	50,69
15	SANTO DOMINGO GROUP Colômbia	21,0	1,56	52,25
16	POLAR GROUP Venezuela	14,1	1,05	53,30
17	KAISER Brasil	13,0	0,97	54,26
18	HOLSTEN GRUPPE Alemanha	11,8	0,88	55,14
19	FOSTER'S BREWING GROUP Austrália	11,7	0,87	56,01
20	MOLSON Canadá	11,7	0,87	56,88
21	QUILMES GROUP Argentina	11,7	0,87	57,75
22	SAPPORO Japão	11,1	0,82	58,57
23	SAN MIGUEL Filipinas	10,4	0,77	59,35
24	LION NATHAN Nova Zelândia	10,2	0,76	60,10
25	SCHINCARIOL Brasil	10,0	0,74	60,85
26	TSINGTAO China	10,0	0,74	61,59
27	BINDING GRUPPE Alemanha	9,9	0,74	62,33
28	BRAU UNION Áustria	9,3	0,69	63,02
29	HITE (ex-CHOSUN) Coreia	9,0	0,67	63,69
30	BGI/CASTEL GROUP França	8,0	0,59	64,28
31	YANJING BREWERY China	7,5	0,56	64,84
32	SUNTORY Japão	6,6	0,49	65,33
33	WARSTEINER Alemanha	6,4	0,48	65,80
34	CHANG Tailândia	6,1	0,45	66,26
35	EFES GROUP Turquia	5,6	0,42	66,67



Embora, em termos comerciais, se considere que os compostos mais importantes do lúpulo são os que conferem à cerveja o seu sabor amargo característico, a verdade é que as glândulas de lupulina produzem outros compostos que têm também papel determinante no processo de produção de cerveja.

Na composição do secretado importa destacar como compostos de presença universal:

A) Os α -Ácidos:

Fórmula estrutural dos α -Ácidos

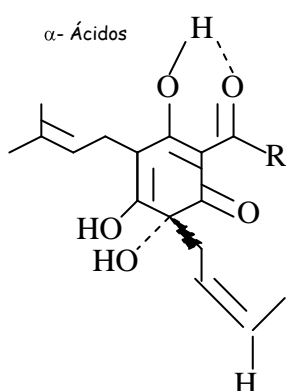


Tabela 7: Os α -Ácidos constituem uma mistura de homólogos e análogos, nomeadamente:

	R	%
Humulona	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	35-70
Cohumulona	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	20-55
Adhumulona	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	10-15
Prehumulona	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	1-10
Poshumulona	CH_2CH_3	1-5

B) Os β -Ácidos:

Fórmula estrutural dos β -Ácidos

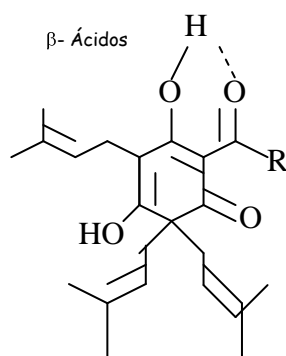


Tabela 8: Os β -Ácidos consistem numa mistura de diferentes compostos:

	R	%
Lupulona	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	30-55
Colupulona	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	20-55
Adlupulona	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	5-10
Prelupulona	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	1-3
Postlupulona	CH_2CH_3	--

Do ponto de vista dos produtores, os α -Ácidos e β -Ácidos constituem a fracção mais interessante, sendo designada por compostos amargos por conferirem amargor à cerveja. O potencial amargo do lúpulo, medido em unidades de alfa-ácidos (AAU), é avaliado pela percentagem de alfa-ácidos de um determinado lúpulo multiplicada pelo peso fresco do mesmo. Embora os α -Ácidos sejam os mais procurados, outros compostos como os Óleos Essenciais, componentes do secretado dos cones, são



também bastante importantes na produção cervejeira. Apesar de os Óleos Essenciais estarem presentes nos extractos em quantidades muito pequenas (partes por milhão), é com base na análise de mais de 200 compostos deste tipo que, se distinguem, quimicamente, as diferentes variedades de lúpulo (Forster & Schmid, 1994).

Os compostos mais comuns são os hidrocarbonetos Terpenos-sesquiterpenos, os Terpenos-sesquiterpenos Álcoois, Cetonas e Compostos Sulfurados. Podem encontrar-se polifenóis, lípidos e resinas em quantidades residuais (Forster & Schmid, 1995), assim como proteínas e compostos orgânicos (ex: potássio, magnésio, cálcio, fosfato, manganês, cobre, zinco, nitrato, etc.). Recentemente, têm vindo a ser encontrados nos extractos outros compostos como pesticidas em quantidades crescentes, facto que tem vindo a tornar-se preocupante (Benitez *et al.*, 2001).

O aumento das quantidades de pesticidas encontrados nos extractos de lúpulo (Forster *et al.*, 1991) está directamente relacionado com o facto de esta planta ser sensível a vários agentes patogénicos, nomeadamente fungos, bactérias, vírus, bem como insectos predadores e nemátodos. A acumulação de pesticidas nos cones das plantas de lúpulo constitui um problema, em termos de trocas comerciais entre países com diferentes valores limite legais aceitáveis de pesticidas. Há também que ter em conta, a possibilidade desses pesticidas contaminarem a cerveja, durante o processo de fabrico (Forster *et al.*, 1991).

1.1.c. Pragas e doenças do lúpulo e suas consequências económicas

Como referido anteriormente, o lúpulo, é sensível a um vasto conjunto de pragas e doenças. Os nemátodos e os insectos, por si só, causam danos nas plantas que, em muitos casos, comprometem a produção ou mesmo a viabilidade e sobrevivência das plantas, podem também funcionar como vectores de dispersão de agentes patogénicos, como bactérias e, fundamentalmente, vírus.

No caso dos nemátodos, as espécies mais vulgarmente associadas a doenças do lúpulo são: *Ditylenchus destructor*, *Heterodera humuli*, *Meloidogyne hapla*, (Hiller *et al.*, 1996), e *Xiphinema diversicaudatum* (Hay & Close, 1992). Alguns destes são responsáveis pela transmissão de vírus capazes de comprometer a produção de toda uma cultura, (ex: Vírus do Mosaico de *Arabis*, é transmitido por nemátodos, por via radicular).

Os insectos mais conhecidos como agentes patogénicos do lúpulo são os afídeos (*Phorodon humuli*) (Farrar & Campbell, 1984) e a aranha vermelha (*Tetranychus telarius*, *T. urticae*). No primeiro caso, o controlo do ataque implica o tratamento de toda a planta, e de todas as plantas (várias vezes por época), podendo ir até 4 vezes por época, o que



significa elevados custos de mão-de-obra e de insecticidas, encarecendo a produção e aumentando a poluição (Hiller *et al.*, 1996)

No caso da aranha vermelha, o problema é mais grave, visto que, pode levar à exaustão dos nutrientes nas folhas, levando à sua queda e ulterior morte das plantas. Nenhum produto até agora desenvolvido, permitiu um sucesso completo para debelar este infestante (comunicação pessoal BRALUPULO; Neve, 1988).

Nas infecções por fungos, podem destacar-se as causadas por: *Pseudoperonospora humuli* (Míldio) um parasita obrigatório (Griffin & Coley-Smith, 1968; Johnson, 1991); *Verticillium albo-atrum*, (mais problemático na primeira metade do século XX, a obtenção de resistência a este fungo tornou-se um dos objectivos de muitos programas de melhoramento. Em Inglaterra, onde este fungo surgiu em 1930, justificou o trabalho desenvolvido no King's College em Londres, tendo em vista a obtenção de variedades resistentes (Heale *et al.*, 1989). Actualmente, muitas das variedades de lúpulo obtidas, apresentam maior ou menor resistência a este fungo (Kenny, 1991; hgrow.html). *Verticillium dahliae*, *Podosphaera castagnei*, (oídio) (Farrar, 1981; Heale, 1985), *Podosphaera humuli*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cactorum*, *Botrytis cinerea* (Bolor cinzento), são outras espécies de fungos patogénicos do lúpulo.

No caso das bactérias patogénicas do lúpulo, merecem realce as seguintes: *Agrobacterium tumefaciens*, *Corynebacterium humuli* e *Pseudomonas cannabina* (Duke, 1983; Heale *et al.*, 1989; Serfontein & Staphorst, 1994). O método mais utilizado, na prevenção e tratamento de infecções por bactérias, é idêntico ao utilizado no tratamento da videira. Consiste na aplicação de compostos de sulfato, uma ou mais vezes, por ano, até debelar a infecção, o que acarreta encargos económicos acrescidos e poluição.

Existem inúmeros vírus e viróides capazes de infectar e destruir a planta de lúpulo, comprometendo a produção. De entre os mais comuns podem destacar-se: Vírus da Necrose em Anel de *Prunus* (PNRSV), Vírus do Mosaico de *Arabis* (ArMV) (Bock, 1966; Adams *et al.*, 1987; Neve, 1988), Vírus do Mosaico de Lúpulo (HMLV), Vírus Latente de Lúpulo (HLV) e Vírus Latente do Lúpulo Americano (AHLV) (Munro, 1987) que causam grandes reduções nos conteúdos em α -ácidos, comprometendo a produção.

No caso particular de viróides, destaca-se o Viróide Latente do Lúpulo (HLVd) (Barbara *et al.*, 1990; Morton *et al.*, 1993). Em geral, estes patogénios são introduzidos na planta através de vectores que podem, eles próprios, ser patogénicos. Uma vez no interior da planta, a infecção viral pode propagar-se rapidamente através dos vasos condutores e/ou via transporte célula a célula.



1.1.d. O nascimento da virologia

As viroses vegetais, embora bem conhecidas actualmente como causas de inúmeras doenças que comprometem a agricultura e a produção vegetal em geral, só após o aparecimento do microscópio electrónico, em meados do século XX, foi possível observar os seus agentes causadores. Existem, no entanto, registos de doenças e sintomas causados por estes organismos desde o século XVI e XVII, nomeadamente nos famosos quadros da escola de pintura flamenga retratando tulipas com sintomas virais (Németh, 1986).

Foi, no entanto, com o botânico alemão Mayer (1843-1942) que o estudo dos sintomas virais começou a ser efectuado de um modo sistemático e científico. Em 1886, este alemão radicado na Holanda, demonstrou o carácter contagioso da doença viral, ao infectar plantas saudáveis com um extracto de plantas infectadas. Estes estudos pioneiros foram continuados por cientistas russos (Ivanowski e Beijerinck) que demonstraram que os vírus eram “partículas” mais pequenas que as bactérias, capazes de se difundir em gel de agar (*in* Németh, 1986).

O estudo das doenças virais avançou, fundamentalmente, em cinco fases; a primeira fase, em que se pretendia compreender qual o agente causador da sintomatologia, ou seja o reconhecimento da existência de vírus; a segunda fase, até aos anos 30 do séc. XX, em que a maior parte dos estudos consistia na catalogação e estudo da transmissão das doenças causadas por vírus; a terceira fase, entre os anos 30 e os 60 do mesmo século que, graças ao desenvolvimento de técnicas de microscopia electrónica, permitiu o esclarecimento da natureza dos vírus e o desenvolvimento de métodos de purificação; uma fase seguinte, que se estendeu até aos anos 80, cuja preocupação foi de caracterizar físico-quimicamente os vírus, as suas proteínas e ácidos nucleicos, bem como a sua genética, recorrendo à utilização de recombinações e mutagénios químicos. Finalmente, a quinta fase, em que a manipulação genética e a recombinação de DNA, abriu novas possibilidades e perspectivas no estudo das viroses (Kavanagh & Spillane, 1995; Dempsey *et al.*, 1998).

No estudo da infecção por determinado vírus, quase podem também seguir-se estas fases. Numa primeira análise, consideram-se, os sintomas que, embora visíveis, podem muitas vezes ser confundidos com infecções por outros agentes patogénicos, ou mesmo com deficiências nutricionais ou anomalias genéticas. Torna-se, assim, importante o isolamento do vírus e a comparação dos sintomas em plantas inoculadas e não inoculadas (Dijkstra & Jager, 1998).

Atendendo a que a produção anual de muitas cultivares essenciais à sobrevivência das populações, é sistematicamente comprometida por infecções virais, o



estudo, caracterização e ulterior desenvolvimento de estratégias de controlo e eliminação das infecções virais é de importância capital.

1.1.e. Características Gerais dos Vírus

Segundo Matthews (1991), um vírus é constituído por um conjunto de uma ou mais moléculas de ácido nucleico, normalmente incluídas numa cápside proteica, ou numa cápside de proteína e lipoproteína, capaz de proporcionar a sua replicação apenas em determinadas células hospedeiras. A replicação do vírus depende da maquinaria proteica da célula hospedeira. Esta replicação está organizada a partir de “pools” de materiais requeridos pelo vírus, em vez de fissão binária. A replicação do vírus processa-se em locais que não estão separados por uma bicamada lipoproteica (membrana) das células hospedeiras dando, continuamente, origem a variantes virais resultantes de vários tipos de modificações no ácido nucleico do vírus.

As listagens mais recentes de vírus consideram 9 famílias de vírus de plantas com 33 géneros. De entre estes, a maior parte movimenta-se no interior da célula hospedeira de duas formas distintas: movimento célula a célula e movimento através do floema (Carrington *et al.*, 1996). Na movimentação célula a célula os vírus passam para a célula seguinte através dos plasmodesmos, sendo factor limitante o tamanho do seu genoma e a arquitectura que, comparativamente com os vírus animais é de menores dimensões. Os vírus vegetais não apresentam genomas superiores a 30 Kb. Podem ser constituídos por RNA ou DNA, de cadeia simples ou dupla, “anti-sense” ou não. 75% dos vírus vegetais possuem RNA de sentido positivo “sense” (tabela 9). O invólucro dos vírus vegetais apresenta diferentes formas: capsidico, filamentoso, icosaédrico, esférico, rígido ou flexível. Invólucros de origem lípidica comuns em vírus animais, não se encontram vulgarmente nos vírus das plantas.

Tabela 9- Percentagem de tipos diferentes de vírus vegetais e percentagem de viroses por eles provocadas. (Adaptada de Matews 1991).

	Número de viroses	Percentagem (%)
RNA sentido positivo (+)	484	76,6
RNA anti-sense (-)	82	13,0
RNA de cadeia dupla	27	4,3
DNA de cadeia simples	26	4,1
DNA de cadeia dupla	13	2,0

De um modo geral, podemos dizer que o genoma dos vírus codifica para uma RNA polimerase (se é um vírus com RNA), uma “Transcriptase Reversa” (TR) (se é um vírus de dupla cadeia de DNA), enzimas de replicação via cDNA (se é um vírus de



cadeia simples de DNA), proteína da cápside (se tiver cápside) e proteases, nos que o genoma codifica uma única poliproteína (Strittmatter *et al.*, 1993).

Em vírus contendo RNA de cadeia dupla de sentido positivo, o genoma está distribuído por diferentes partículas e, nestes casos, uma unidade infecciosa (capaz de infectar o hospedeiro) é constituída por várias partículas. Nos casos em que os vírus estão encapsulados numa só cápside, o seu genoma contém na extremidade 5', genes que codificam uma RNA polimerase dependente de RNA, e na 3' genes da proteína da cápside. Outros genes podem incluir proteínas de movimento célula a célula (que contribuem para a passagem do vírus através dos plasmodesmos de uma célula para a seguinte, permitindo o avanço da infecção), genes de proteínas especificamente envolvidas na transmissão por vectores do vírus, transmissão planta a planta e genes de proteínas envolvidas na regulação da transcrição ou replicação do vírus.

Quando a passagem é feita através de plasmodesmos, passa só o ácido nucleico, associado a proteínas de membrana, através de uma sequência de bases não específica para cada vírus, o que explica que alguns vírus com tamanhos superiores ao diâmetro dos plasmodesmos mantenham a capacidade de infectar plantas célula a célula. Embora, em geral, os vírus vegetais invadam as células adjacentes desprovidos de cápside, existem casos em que o vírus inteiro (ácido nucleico e cápside) é transportado através dos plasmodesmos (Dijkstra *et al.*, 1998).

Existem diferenças entre as estratégias na transmissão planta a planta dos diferentes vírus. É possível a transmissão de vírus completamente encapsulados, enquanto que, outros necessitam de ter uma componente proteica codificada pelo vírus chamada "helper". Noutros casos ainda, é necessário que a proteína da cápside (ou uma das porções dessa proteína) contenha um domínio de leitura directo com uma extensão do terminal C na porção da cápside mais externa do virião completo.

Associados aos vírus surgem muitas vezes viróides, satélites e RNAs defensivos interferentes (DI). Os viróides não são encapsulados e a sua replicação é autónoma. Os satélites e RNAs defensivos interferentes estão encapsulados e necessitam de um "helper" de vírus para se replicarem. Os satélites derivam do "helper" dos seus vírus, partilhando, no entanto, pouco ou mesmo muito pouco, da sequência do genoma do "helper" do vírus. Enquanto que os viróides são sempre patogénicos para as plantas infectadas, os satélites e os DI podem intensificar ou reduzir os sintomas virais. As suas sequências de RNA, inferiores a 400 nucleótidos, têm vindo a ser estudadas na tentativa de serem utilizados na protecção a vírus.

O ácido nucleico dos Nepovirus, aos quais pertence o Vírus do Mosaico de *Arabidopsis* é RNA de cadeia simples, bipartido, ou seja, na cada cápside viral estão inseridas,



independentemente, duas moléculas de RNA independentemente encapsuladas. Estas duas cadeias de RNA têm tamanhos diferentes: a RNA-1 é constituída aproximadamente por 8100-8400 nucleótidos, enquanto que a segunda denominada RNA-2 é menor, tendo entre 3400 a 7200 nucleótidos. A RNA-2 tem valores variáveis de nucleótidos conforme o género a que pertence. Esta variação permite dividir o género em dois subgrupos: no primeiro integram-se os vírus em que a RNA-2 tem até 5400 nucleótidos; no subgrupo II integram-se todos os vírus que tenham RNA-2 com valores superiores a 5400 nucleótidos (E.V., 1995).

Em condições de pH 7 e temperatura ambiente (25°C), o genoma de RNA de cadeia dupla tem zonas helicóidais, formando uma molécula compacta. Esta estrutura secundária é favorecida pela sequência de bases. Nos Nepovirus, em particular, existem estruturas especializadas nas extremidades 5' e 3', nomeadamente sequências Poli A na extremidade 3'. O tamanho destes Poli A é variável para diferentes moléculas de RNA de uma mesma amostra. A capacidade de infecção depende mais do facto de a partícula viral estar completa, do que da presença destes PoliA (Matthews, 1991). No terminal 5', para além da presença de Poli A, cada RNA tem uma pequena proteína codificada pelo vírus (VPg), essencial para a sua infecciosidade. Nos Nepovirus é comum encontrar-se RNA satélites que podem ser encapsulados em várias cópias. No caso particular do Vírus do Mosaico de *Arabidopsis*, o RNA satélite é uma molécula menor que o RNA do vírus mas, quando presente, pode modificar os sintomas. As proteínas da cápside viral resultam da clivagem de uma proteína de tamanho superior, como por exemplo a proteína da cápside do Vírus do Anel Negro do Tomate (TBRV), em que um produto do RNA-2 origina uma proteína de 150 kDa que, por clivagem, origina proteínas de 59 kDa que sofrem modificações, formando a proteína da cápside viral de 57 kDa. Além desta proteína da cápside, o genoma viral codifica para várias outras proteínas como proteases e replicases (Matthews, 1991).

As infecções por estes Nepovirus produzem sintomas que incluem mosaicos, necrose sistémica e "Ringspots" (necroses em anel), em plantas que podem ser de espécies muito diversas, indo desde o tabaco à vinha, amoreira e ao lúpulo. A transmissão destes vírus é feita por nemátodos activos (*Xiphinema diversicaudatum*) (Munro, 1987), via sistema radicular. É, no entanto, possível que a transmissão e disseminação ocorra através das sementes ou grãos de pólen (Matthews, 1991).

O Vírus do Mosaico de *Arabidopsis* encontra-se disseminado por uma vasta área mundial, nomeadamente no centro e leste da Europa, onde a sua presença condiciona a produtividade agrícola, em especial do lúpulo.



1.1.f. Possíveis locais de penetração dos Vírus

A infecção de uma planta por um vírus passa sempre pela penetração da partícula infecciosa, quer pela parte aérea, quer pelas raízes. Para que tal aconteça, é fundamental que haja uma ferida, que pode ter várias origens: ferida mecânica resultante de práticas agrícolas, ferida devido a ataques de herbívoros, ou de vectores como insectos (ex: afídeos, mosca branca, etc.) ou nemátodos. A infecção pode também ser provocada por outros patogéneos como vectores activos (Dijkstra & Jager, 1998).

De entre as feridas mecânicas com origem em práticas agrícolas, podemos destacar as enxertias. Estas resultam da utilização de porta-enxertos e/ou garfos contaminados com vírus que, após enxertia, se espalham por toda a planta. Outra possibilidade de infecção será a transmissão abiótica dos vírus pelo solo que, é rara, visto que só vírus excepcionalmente resistentes podem ser transmitidos por este processo. É possível que uma planta seja infectada ao ser colocada num solo contaminado, ou pela água do solo contaminada, resultante da presença de raízes de plantas, folhas ou ramos de plantas infectadas. No entanto, a contaminação no solo por intervenção de agentes bióticos (ex: fungos e nemátodos) é a mais generalizada.

- **Os fungos como vectores virais**

Os vectores fúngicos pertencem essencialmente a duas classes de parasitas obrigatórios: *Chytridiomycetes* (família *Olpidiaceae*) e a *Plasmodiophoromycetes* (família *Plasmodiophoraceae*) (Dijkstra & Jager, 1998). Embora varie de fungo para fungo, visto que depende do ciclo de vida de cada fungo, a transmissão do vírus é vulgarmente feita através dos zoósporos dos fungos. Nestes casos, a infecção tem início quando os zoósporos entram em contacto com as raízes do hospedeiro, perdem os flagelos e produzem cistos que formam um canal de infecção através das paredes das células da raiz, permitindo que o seu conteúdo penetre nas células vegetais. Formam-se então zoosporângios onde são produzidos novos zoósporos que são ulteriormente libertados no solo por canais de saída. Durante este processo de infecção, os zoósporos podem adquirir vírus, por absorção de água através superfície externa do zoósporo. Durante o processo de enquistamento subsequente, o flagelo recolhe no interior do zoósporo e, nessa altura, o flagelo que tenha adsorvido o vírus, introduzi-lo-á no protoplasto do zoósporo que, ao penetrar pelo canal de infecção, poderá infectar novas células das raízes de outras plantas. Neste caso, as viroses só temporariamente estão associadas aos fungos. No entanto, outros vírus podem ser introduzidos no fungo quando este infecta uma planta anteriormente infectada com o vírus. Durante a formação de esporos fúngicos, o vírus que neles se introduz, pode ficar viável por um período de tempo longo,



podendo infectar novas plantas quando os esporos germinarem e infectarem novas raízes.

- **Os Nemátodos como vectores virais**

São conhecidas duas famílias de nemátodos envolvidas na transmissão de vírus: a Família *Longidoridse* (género *Longidorus* e *Xiphinema*) e a Família *Trichodoridae* (género *Trichodorus* e *Paratrichodorus*). Os vírus transmitidos por diferentes espécies da família *Longidoridse* são nepovirus icosaédricos (ex: Vírus do Mosaico de *Arabis*). Os únicos vírus transmitidos por nemátodos da família *Trichodoridae* são os tobnavirus de forma esférica (ex: TRV –Vírus do Chocalho do Tabaco) (Dijkstra & Jager, 1998)..

Os mecanismos de infecção são bastante semelhantes nas duas famílias. Tanto as larvas, como os nemátodos no estado adulto, são passíveis de transmitir os vírus, uma vez que as partículas de vírus ingeridas aderem ao esófago do nemátodo quando este se alimenta de uma planta infectada, sendo aí retidas. A larva do nemátodo perde o vírus na altura em que passa ao estado adulto e perde a estrutura cuticular que a envolve, substituindo-a por nova camada. Quando um nemátodo infectado se alimenta de uma nova planta, o vírus é transmitido pela saliva, quando o proboscis do nemátodo penetra nas células da planta.

A distribuição dos nemátodos no solo depende de vários factores climáticos (ex: humidade, temperatura, quantidade de oxigénio disponível e mesmo vibrações do solo) sendo a sua distribuição também dependente do tipo de solo e dos hospedeiros preferenciais.

- **Os insectos como vectores virais**

Na transmissão de vírus por insectos, existe alguma versatilidade no modo de transmissão, relacionada com o modo como os diferentes insectos se alimentam. Alguns sugam o conteúdo celular após perfuração das células pelo aparelho bucal, enquanto outros mastigam as folhas das plantas. Destas diferentes estratégias, resultam diferentes tipos de infecções que podem ser classificadas como: infecção não persistente, persistente e semi-persistente.

A infecção não persistente ocorre num curto período de tempo entre a aquisição do vírus pelo insecto e a sua transmissão a uma nova planta da qual o insecto se alimente. Este período de tempo compreende cerca de 1 hora, perdendo o insecto a capacidade de infectar outras plantas em poucas horas. Os vírus são retidos no canal alimentar dos estiletos maxilares do insecto, não havendo multiplicação do vírus no interior do vector.



Na infecção semi-persistente, o vírus também é adquirido num período de tempo muito curto após o acesso do vector à planta infectada. Embora a aquisição, e a subsequente transmissão do vírus sejam processos rápidos, decorrem algumas horas após a aquisição e a transmissão, ao contrário do que acontece na transmissão não permanente onde esse processo ocorre numa hora. Existe uma correlação positiva entre os tempos necessários à aquisição e à transmissão de vírus e os níveis de vírus transmitidos num período de 12 horas.

A infecção persistente de vírus é um processo mais moroso, tanto na aquisição como na transmissão. A aquisição de um vírus pelo insecto, pode ir de 30 minutos a horas ou mesmo vários dias, após os quais o vírus tem, necessariamente, de circular no interior do corpo do insecto e, só quando atinge novamente as glândulas salivares, é possível haver transmissão do mesmo, a novas plantas atacadas pelo insecto. O período de tempo compreendido entre o início da aquisição e a transmissão efectiva do vírus denomina-se período de latência. Ultrapassado este período, o insecto torna-se um vector activo do vírus e, em geral, assim permanece até ao fim da sua vida. As viroses propagadas deste modo denominam-se circulativas. Se o vírus se multiplicar no interior do insecto a virose chama-se propagativa, sendo o vírus transmitido à geração seguinte de vectores, pelos ovos da fêmea.

Na zona temperada, a maioria dos insectos vectores são afídeos, podendo a transmissão dos vírus ser persistente, não persistente e semi-persistente.

1.1.g. Estratégias de Resistência e Combate a Vírus

O controlo das doenças virais pode fazer-se recorrendo a duas abordagens, embora complementares. O controlo indirecto ou preventivo foi negligenciado no passado, o que contribuiu para o alastramento e “importação” de novas e velhas doenças entre os diferentes países e continentes. Complementarmente, existe o controlo directo, corresponde a uma abordagem mais terapêutica e menos preventiva.

— Controlo Indirecto: podem e devem ser tomadas várias acções, nomeadamente o uso de material livre de vírus, quarentena na entrada e saída de material biológico entre diferentes regiões, eliminação dos factores que contribuem para a natural transmissão de vírus e, sempre que possível, utilização de material resistente ou tolerante às infecções.

— Controlo Directo: até há algumas décadas poder-se-ia dizer que se restringia à termoterapia, cultura de meristemas, quimioterapia, microenxertia e protecção cruzada (Németh, 1986). Com o desenvolvimento da genética e da biologia molecular e com o advento das técnicas de manipulação genética, outras possibilidades se colocam, entre



elas a transformação genética. Há que ter em conta, no entanto, que todas as acções de controlo directo e indirecto mesmo não envolvendo manipulação genética continuam a ser válidas e essenciais, permitindo controlar as doenças causadas por vírus.

Em termos históricos, a protecção cruzada teve os seus primeiros passos no início do século XX, com estudos feitos no *Vírus da Necrose em Anel de Tabaco*. Verificou-se que plantas infectadas com um vírus, ao serem infectadas com outro relacionado com o primeiro, não apresentavam sintomas, mas os seus extractos eram capazes de infectar plantas sãs (Fraser, 1990). Embora este potencial de protecção contra vírus mais devastadores tenha sido usado em algumas cultivares, em condições de campo com sucesso, no final dos anos cinquenta (1950), a sua utilização não se generalizou e, sempre que possível, é a última técnica a ser utilizada, visto que, há um risco elevado, por vezes mais elevado do que as vantagens, de introdução de novos vírus num determinado ecossistema agrícola. Por outro lado, nem todos os vírus podem ser utilizados, visto que, a possibilidade de existir protecção cruzada não é universal entre os vírus (Fraser, 1990). O processo subjacente à protecção cruzada ainda não é claro, o que torna mais complicada a sua utilização. Existem algumas teorias relacionadas com o papel da proteína da cápside viral, quer impedindo o encapsulamento dos vírus, quer interferindo com a actividade da replicase. Em todos os casos, os dados disponíveis têm como base resultados com plantas transgénicas, onde foi obtida expressão da proteína da cápside (CP) (Tabela 10).

Tabela 10: Exemplos de plantas transformadas com a cápside viral (CP). Adaptado de (Strittmatter & Wegener, 1993)

Origem do gene da CP (cápside viral)	Espécie transformada	A expressão transgénica protege contra
TMV	Tabaco	TMV
TMV	Tomate	TMV, ToMV
TMV	Tabaco	PVX, AIMV, CMV, SHMV
AIMV	Tabaco	AIMV
AIMV	Tomate	PVX CMV
AIMV	Alfafa	AIMV
AIMV	Tabaco	AIMV
TRV	Tabaco	TRV, PEBV
CMV	Tabaco	CMV
PVX	Batata	PVX
PVX	Batata	PVX
PVX+PVY	Batata	PVX +PVY
PVS	Batata	PVS
PLRV	Batata	PLRV
TSWV	Tabaco	TSWV
TEV	Tabaco	TEV
RSV	Arroz	RSV
GCMV	Tabaco	GCMV



Apresentam-se exemplos de plantas transformadas geneticamente com o gene da cápside viral (CP), Tabela 11.

Tabela 11: Exemplos de transformantes com Cápside viral (CP) nos últimos anos

Origem do gene da CP	Plantas transformadas	Referências
SrMV	Cana de Açúcar	Ingelbrecht et al 1999
SPFMV	Batata doce	Okada et al 2001
RTSV	Arroz	Sivanani et al 1999
SMV	Soja	Wang et al 2001
CMV	Tabaco	Liang et al 1994
SMCV	Melancia	Pang et al 2000
LMV	Alface	Dinnant et al 1997
ArMV	Vinha	Spielmann et al 2000
TYLCV	Tomate	Kunik et al 1994
GFLV	Tabaco	Bardonnet et al 1994
CTV	Citros	Gutiérrez-E. Et al 1997
TMV	Tabaco	Clark et al 1995
TRV	Tomate	Yepes et al 1996
CMV	Tomate	Kaniewski et al 1999
PPV	Ameixoeira	Ravelonandro et al 2000
APMoV	Tabaco	Neves-Borges et al 2001

Na maioria dos casos, a presença da cápside viral é essencial para a resistência ao vírus, não sendo suficiente a presença do RNAm correspondente.

Segundo Powell-Abel e outros (1986), as plantas de tabaco exprimindo a proteína da cápside do Vírus do Mosaico do Tabaco (TMV) apresentam resistência a este vírus. Os trabalhos subsequentes versaram, por um lado, estudos genéticos e moleculares em plantas modelo e, por outro, o estudo de diferentes resistências em várias cultivares com interesse agrícola e económico (ex: milho, soja, tomate, batata, cana-de-açúcar, melão, arroz, abóbora e tabaco) (Miller & Hemenway, 1998). Um fenótipo de resistência demonstra, tipicamente, atraso nos sintomas, redução dos sintomas na zona de inoculação, diminuição ou ausência de movimento sistémico e redução da acumulação do vírus (Miller & Hemenway, 1998).

Embora a utilização comercial da estratégia de transformação genética tenha sido adoptada rapidamente, o mecanismo pelo qual a planta transformada adquire resistência não é ainda completamente claro. Os resultados disponíveis, revelam a existência de diferentes mecanismos de aquisição de resistência induzida por agentes patogénicos (Jackson & Taylor, 1996). Podemos considerar dois mecanismos base: o primeiro, baseado na expressão de proteínas e o segundo nos ácidos nucleicos. As proteínas de origem viral (Vírus do Mosaico de Tabaco –TMV, Vírus do Mosaico de Alfafa – AIMV, Vírus X de Batata – PVX) expressas nos transformantes podem ser da cápside (proteínas do tipo selvagem, ou geneticamente modificadas), ou proteínas de movimento (MP) e, neste caso, as proteínas são sempre modificadas (visto que, só deste modo, existe resistência à infecção) (Baulcombe, 1996). A resistência mediada por ácidos



nucleicos resulta da inibição directa do ciclo de infecção viral pelo transgene ou pelo seu transcrito de RNA (Baulcombe, 1996).

Embora de acordo com os primeiros trabalhos de expressão da proteína capsídica, nomeadamente os relativos a TMV, PVX, CMV (Vírus do Mosaico de Pepino), ou AIMV, existisse uma correlação positiva entre a extensão da protecção e os níveis de transcrição da proteína da cápside viral, o mesmo não se verificou em vários outros estudos em que baixos níveis de transcrição eram muito mais eficientes em termos de protecção (ex: Potivirus). Casos extremos (Vírus do Enrolamento da Folha da *Batata* - PLRV) surgiram, em que se verificou protecção em plantas transformadas, onde não foi possível detectar o gene da cápside viral (Miller & Hemmenway, 1998). Por outro lado, se em determinados casos, a presença do transcrito da proteína da cápside (RNAm) era suficiente para induzir resistência, noutros só se detectava resistência na presença da proteína. São diversos os mecanismos propostos para explicar este efeito e variam de acordo com a planta e o vírus em causa.

1.2. Cultura de plantas *in vitro*

Os primeiros trabalhos sobre cultura *in vitro* do lúpulo datam do início da década de 70, do séc. XX (Vine & Jones, 1969; Adams, 1975). Tinham como objectivo principal, a obtenção e micropropagação de plantas livres de vírus. De entre os objectivos desenvolvidos ulteriormente destacam-se: o desenvolvimento de cultura de células produtoras de diferentes compostos químicos com importância económica (Langezaal & Scheffer, 1992; Heale & Connel, 1989), a cultura de ovários e anteras, a fusão de protoplastos, com vista ao melhoramento genético (Seigner, 1992; Gmelch & Rossbauer, 1993). Na obtenção de plantas livres de vírus utiliza-se, actualmente, uma combinação de termoterapia com cultura de meristemas.

O uso da termoterapia, fundamenta-se no facto de, a temperaturas elevadas, as partículas virais ficarem inactivas na planta, verificando-se uma inibição mais ou menos completa da síntese viral, possivelmente, pela inactivação da replicase viral (Dijkstra & Jager, 1998). A cultura de meristemas baseia-se no facto de, mesmo numa planta sistemicamente infectada as células meristemáticas envolventes do meristema apical não estarem invadidas pelo vírus (Dijkstra & Jager, 1998). Os meristemas livres de vírus podem ser isolados e originar novas plantas livres de vírus (Probasco & Winslow, 1986). É neste passo, que o papel da cultura *in vitro* se mostra primordial, visto que permite a propagação e multiplicação em massa de plantas com origem nos meristemas isolados. Embora esta técnica seja de grande importância para o estabelecimento de campos de lúpulo, visto que permite iniciar a nova cultura utilizando plantas livres de vírus, na



verdade, ela não garante que, uma vez no campo, as plantas que não têm qualquer tipo de resistência, não sejam de novo infectadas (Probasco & Winslow, 1986).

Na tentativa de ultrapassar este problema, têm vindo a ser desenvolvidos programas de cruzamentos controlados (Gunn, 1985; Neve, 1986; Seigner, 1993), de selecção *in vitro* de variedades resistentes a agentes patogénicos (Heale, 1985; Connel & Heale, 1986; Heale *et al.*, 1989) e, mais recentemente, de transformação genética (Lyon de Castro, 2004).

1.3. Regeneração de meristemas *in vitro*

As plantas têm a capacidade de regenerar partes dos seus órgãos e, partindo de células somáticas, formar novas plantas, quer directamente a partir de uma só célula (embriogénese somática directa), quer indirectamente (com origem num *callus* intermédio – embriogénese somática indirecta e organogénese). O desenvolvimento é determinado durante a embriogénese zigótica da planta, quando são definidos os meristemas apical e radicular. Durante o desenvolvimento pós-embrionário, a capacidade mitótica está restrita às zonas onde se encontram os meristemas primários, mas alguns grupos de células diferenciadas mantêm a capacidade de entrar em mitose (Frank *et al.*, 2002).

Na cultura *in vitro*, as pressões externas, a localização e estado fisiológico das células no explante, ou no *callus*, podem induzir modificações no desenvolvimento das células. Assim, células que estavam vocacionadas para diferenciar, proliferar ou morrer, podem ser direccionadas para um programa de desenvolvimento alternativo (Thorpe, 1980; 1994). A este processo, que passa pela aquisição de capacidades de percepção e reconhecimento de sinais específicos relacionados com o desenvolvimento, dá-se o nome de competência (Halperin, 1986). Na presença desses sinais, as células ditas competentes, ou seja, que têm a capacidade de reconhecer esses sinais de alteração do seu programa de desenvolvimento, sofrem um processo de indução (McDaniel *et al.*, 1992). Esta indução conduz à resposta por parte de populações de células que, deste modo, podem evoluir no sentido da organogénese. Esta resposta *in vitro*, é essencialmente induzida de forma empírica, para cada espécie, com algumas excepções como o género *Arabidopsis* (Smigocki & Owens, 1989; Werner *et al.*, 2001) em que, são conhecidos alguns dos genes envolvidos neste processo.

A regeneração de plantas por cultura *in vitro* tem vindo a ser desenvolvida, com os mais variados objectivos. Esta consiste na formação *de novo* de plantas, partindo de porções destas – os explantes. De entre os diferentes objectivos da regeneração de plantas *in vitro*, encontra-se a obtenção de plantas após transformação genética. Só



deste modo é possível obtê-las com a nova informação genética. Assim, para se desenvolver um método eficiente de transformação, é fundamental o estabelecimento de um protocolo de regeneração de novas plantas a partir de material vegetal transformado.

O estudo dos processos de regeneração de novas plantas *in vitro* desenvolveu-se no sentido de multiplicar espécies que, de algum modo, apresentassem problemas nos métodos tradicionais de multiplicação, associado a um valor económico elevado, tanto por serem variedades de interesse agrícola e/ou florestal, como por serem plantas de grande valor ornamental.

Com base em estudos desenvolvidos desde a década de 50 do século XX, o processo organogénico em plantas, tem vindo a ser parcialmente explicado. Sabe-se que, nas angiospérmicas, a morfogénese depende do controlo do padrão de formação, do número de células em divisão e do controlo do crescimento celular (Frank *et al.*, 2002).

Verificou-se que, numa primeira fase do processo morfogénico, razões altas de auxina/citocinina levam à formação de raízes e razões baixas favorecem a formação de meristemas adventícios, sendo a combinação destes dois tipos de fitorreguladores (as auxinas e as citocininas), fundamental na indução de organogénese nas células vegetais *in vitro* (Skoog & Miller, 1957). Com base nos estudos de Skoog & Miller (1957), foi formulada a hipótese de que, as citocininas, em conjunto com as auxinas, teriam papel essencial na morfogénese vegetal, tendo uma influência profunda na formação de raízes e meristemas e no seu desenvolvimento relativo (Werner *et al.*, 2001). A razão entre as concentrações de cada um destes reguladores de crescimento varia com a família, género, espécie e até mesmo variedade da planta em causa (Ducan & Widholm, 1988; Frello *et al.*, 2002).

Segundo alguns autores, o etileno poderá também ter efeito como inibidor e não indutor da organogénese (Perl *et al.*, 1988; Sethi *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1990; Chi *et al.*, 1990; Aloni *et al.*, 1998).

As auxinas estarão mais intimamente ligadas ao processo de replicação do DNA, numa fase inicial do ciclo de divisão celular, enquanto que, as citocininas estarão mais relacionadas com o processo de divisão celular propriamente dito (Taiz & Zeiger, 1991). Apesar de se associarem as citocininas à multiplicação celular, elas podem também estar envolvidas na indução de diferenciação celular (Wener *et al.*, 2001). A participação destes fitorreguladores (auxinas e citocininas) na regulação do ciclo celular é universalmente aceite, mas o processo específico como cada um actua, não está completamente esclarecido. Têm-se multiplicado os trabalhos relacionados com estes fitorreguladores, as enzimas envolvidas na sua activação/inibição e os genes, envolvidos



no ciclo celular afectados por estes compostos (Frank *et al.*, 2000; Mizukami & Fischer, 2000; Werner *et al.*, 2001; Souter & Lindsey, 2000).

Em qualquer planta, a diferenciação celular está, de algum modo, definida desde a fase embrionária. Durante a formação do embrião ficam definidos dois tipos fundamentais de meristemas: meristema apical vegetativo (SAM) e meristema apical da raiz (RAM). Na fase pós-embriónica, a divisão mitótica, está reduzida a estas duas zonas da planta que, além de se manterem, iniciam a formação dos vários órgãos necessários à vida e desenvolvimento da planta. Esses meristemas são sensíveis ao balanço de auxinas/citocininas (Miller *et al.*, 1955; Frank *et al.*, 2002). Esta regulação parece ser parcialmente responsável, pela capacidade de indução de meristemas *in vitro*. Porém o processo de morfogénese é tão complexo que, pequenas variações nas condições de cultura levam a significativas alterações nas células. Apesar de, ainda se desconhecerem todos os mecanismos de actuação dos fitorreguladores, no processo de regeneração *in vitro*, devem ter-se em linha de conta algumas variáveis, tais como o transporte, receptores, luz, temperatura, tipo de explante (Baraldi *et al.*, 1988; Gasper *et al.*, 1996; Jarillo & Cashmore, 1998; Saitou *et al.*, 1999). Pode dizer-se que, as alterações celulares são resultado das alterações bioquímicas, a maioria delas ainda pouco conhecidas que, em última análise, resultam de alterações da expressão génica (Thorpe, 1980; Taiz & Zeiger, 1991). Muitos dos estímulos que afectam a expressão dos genes, direccionando-a para a morfogénese, tem a sua acção a nível do citoplasma, mas exercem o seu efeito a nível do núcleo (Strebbsins, 1992). De um modo geral, os fitorreguladores têm acção sobre determinados genes, podendo ser, através de factores transmembranares e transcripcionais, e/ou sobre enzimas, como as CDKA cinases (Werner *et al.*, 2001; Shwechheimer *et al.*, 1998, Stals & Inzé, 2001). A regulação da concentração dos fitorreguladores vai estar relacionada com a expressão de alguns genes. Em tabaco, verificou-se que estes genes têm o seu nível de RNAm regulado por auxinas e induzido por citocininas (Coenen & Lomax, 1997). Dados recentes indicam que, existe uma interacção reguladora entre as citocininas e um conjunto de genes activos nos SAM como o KNAT1 e STM (Reinhardt *et al.*, 2000; Frank *et al.*, 2002). A alteração da expressão dos genes pode, também estar associada com a modificação do número de receptores hormonais e alteração dos níveis de metilação do DNA (Christianson, 1985; Litz, 1993) sendo muitas vezes o nível de metilação do DNA determinado pela acumulação do seu transcrito (RNA). Este processo de expressão dos genes obedeceria a um modelo de auto-regulação em que os fitorreguladores, como activadores, mediavam a transcrição dos genes envolvidos no processo (Meyer &



Saedler, 1996). Esta é, no entanto, uma área de estudo intenso com muitos pontos a esclarecer.

1.4. Transformação genética

Com o desenvolvimento da Biologia Molecular de plantas nas últimas décadas, tem vindo a ser possível transformar geneticamente diferentes espécies com diversos objectivos. Hoje em dia, existem mais de 3000 campos de experimentação com plantas transgénicas, em mais de 30 países (Birch, 1997). Este processo de transformação genética desenvolveu-se rapidamente desde meados da década de 80 do século XX, envolvendo mais de 40 espécies geneticamente modificadas por motivos económicos variados. Actualmente, os objectivos da transformação genética vão desde a obtenção de novas variedades de espécies comercialmente interessantes (ex: diferentes padrões e cores das flores) (Mol *et al.*, 1999), de espécies resistentes a patógenos e pragas (vírus, viróides, bactérias, fungos e nemátodos) (Fitchen & Beachy, 1993; Strittmatter & Wegener, 1993; Franco-Lara *et al.*, 1999; Nurkiyanova *et al.*, 2000; Peña & Séguin, 2001), ou resistentes a herbicidas e a stresses fisiológicos (Datla *et al.*, 1997), de espécies úteis em estudos fisiológicos (Welsh & Kay, 1997), de sistemas de transcrição (Sugiura, 1997), de silenciamento e metilação do DNA (Meyer *et al.*, 1993; Guo *et al.*, 1998), do controlo químico da expressão génica (Gatz, 1997), da expressão de proteínas específicas (anticorpos de origem vegetal, ou vacinas) (Franken *et al.*, 1997) ou ainda, a síntese de antibióticos e insecticidas (Dempsey *et al.*, 1998).

O primeiro relato de transformação genética de uma planta remonta aos anos 80 com a referência à transformação de tabaco (Horsch *et al.*, 1984). Desde então, têm surgido várias referências sobre transformação de plantas envolvendo mais de 120 espécies de cerca de 35 famílias, incluindo variedades agrícolas, ornamentais, medicinais, frutícolas, espécies florestais ou mesmo espécies arvenses (Birch, 1997).

A transformação genética de plantas baseia-se na capacidade de introduzir e exprimir genes estranhos em plantas. Diferentes métodos para atingir esse objectivo foram sendo desenvolvidos ao longo do tempo. De entre estes, podem salientar-se: fusão de protoplastos com esferoplastos de bactérias, ou com lipossomas; microinjecção; tratamento de protoplastos com catiões polivalentes na presença de DNA; electroporação; bombardeamento de partículas; Agrolística e transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Walden *et al.*, 1990). Alguns destes métodos foram desenvolvidos com o objectivo de ultrapassar dificuldades na obtenção de plantas geneticamente modificadas, particularmente nas plantas denominados recalcitrantes à transformação (ex: cereais, legumes, coníferas e vários tipos de lenhosas). Apenas



algumas dessas dificuldades foram ultrapassadas, o que indica a necessidade de continuar a desenvolver estudos e aperfeiçoar métodos de transformação genética, para espécies menos acessíveis a esta técnica de melhoramento.

A introdução de genes em plantas pode ter como alvo o genoma das células, o DNA de um organito celular ou um vector viral replicativo (Birch, 1997), sendo que, na maior parte dos casos, o objectivo principal é a introdução dos genes estranhos no genoma da planta. Para que esse objectivo seja atingido, têm que ser ultrapassados alguns obstáculos, nomeadamente, a penetração da parede celular (exceptua-se o caso dos protoplastos, cuja parede é previamente removida, por acção de enzimas específicas), transporte no citoplasma sem ser degradado e a entrada no núcleo, seguida de integração no genoma nuclear.

Os vários processos de transformação genética, enumerados anteriormente, podem organizar-se, genericamente, em dois grandes grupos: aqueles em que a transferência do gene ou genes estranhos à planta alvo é mediado por *Agrobacterium*, e aqueles em que o gene ou genes são transferidos directamente para o genoma da planta. No presente trabalho serão referidos apenas o método de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* e o bombardeamento de partículas, por serem os que foram utilizados.

1.4.a. Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

O melhoramento genético de plantas tem vindo a ser realizado desde o início da agricultura. Os programas de melhoramento clássico tem tido êxito graças ao desenvolvimento de técnicas que permitem, através de cruzamentos entre diferentes plantas, a introdução e manutenção de características desejáveis em linhas híbridas. Este método é, no entanto, moroso e incerto, com limitações ligadas ao facto de pressupor a hibridação sexual. Esta nem sempre é possível, quer porque as plantas possuem génotipos muito diferentes, quer porque não existem na natureza, espécies próximas com as características desejadas. Estas limitações têm vindo a ser ultrapassadas, com os métodos de transformação genética desenvolvidos nas últimas décadas, (Watson *et al.*, 1998).

A possibilidade de transferir DNA estranho para células vegetais, só foi possível desde que se reconheceram as bactérias fitopatogénicas, Gram-negativas, *Agrobacterium tumefaciens*, e a *Agrobacterium rhizogenes* como meio de atingir esse propósito (Liu *et al.*, 2001; Pena & Séguin, 2001). O *Agrobacterium tumefaciens* é capaz de transferir uma porção (denominada T-DNA) do seu Ti-plasmídeo, para o núcleo das



plantas superiores, fungos ou até mesmo células humanas (Ditt *et al.*, 2001). A maioria das dicotiledoneas é capaz de ser infectada por esta bactéria (Pena & Séguin, 2001).

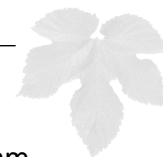
Este processo ocorre na natureza e, pode levar à formação de tumores vegetais, originando a doença conhecida por tumor de galha (crown gall tumor) (Lewin 2001). Esta doença é caracterizada pelo aparecimento de massas de células, em contínua divisão e, sem diferenciação. Estas células têm a capacidade de se multiplicarem, continuamente, mesmo quando transferidas para cultura sem as bactérias e sem fitorreguladores. O plasmídeo do *Agrobacterium* (Ti), tem cerca de 200 kb, é circular, de cadeia dupla, e existe na bactéria como unidade replicativa independente (Watson *et al.*, 1998).

No processo de infecção é fundamental a porção do plasmídeo Ti, que tem a capacidade de ser transferido para o núcleo das células hospedeiras, o T-DNA, que codifica um grupo de genes para a síntese de opinas (aminoácidos específicos derivados da arginina). Estes aminoácidos, entre outros, são utilizados pelas bactérias como fonte de carbono e azoto. De acordo com o tipo de opinas que sintetizam, os plasmídeos podem dividir-se em 4 grupos: (1) nopalínicos (com genes que produzem nopalinas (*nos*) e genes que degradam nopalinas (*noc*); (2) octopínicos (com genes que produzem octopinas (*ocs*) e genes que degradam octopinas (*occ*); (3) agropínicos e, finalmente, (4) os plasmídeos Ri, característicos do *Agrobacterium rhizogenes* (induzem a doença da raiz “cabeluda” – hairy roots). Estes plasmídeos Ri têm genes do tipo agropínico mas, podem ter segmentos derivados de plasmídeos nopalínicos e octopínicos (Lewin, 2001). Um segundo grupo de genes, presente no plasmídeo causa a desregulação do crescimento das células infectadas, dois desses genes (*iaaM* e *iaaH*) codificam enzimas que levam à produção de auxinas. Um terceiro gene (*iptZ*) codifica enzimas que levam à produção de outro fitorregulador, uma citocinina (Walden *et al.*, 1990; Watson *et al.*, 1998).

Ainda não é totalmente conhecido o processo pelo qual o DNA da bactéria é introduzido no genoma da planta, nomeadamente, a forma como o DNA externo penetra no núcleo e se insere no genoma de um eucarionte, dando origem ao único processo na natureza em que há troca de material genético entre diferentes Filos (Ditt *et al.*, 2001).

O T-DNA é sempre acompanhado por proteínas de virulência (proteínas Vir, codificadas por genes de outra zona do Ti, não transferíveis para a célula vegetal com o T-DNA) que estarão envolvidas em vários fases do processo. Algumas dessas proteínas formam um “*pilus*” na superfície da bactéria, através do qual o T-DNA e as proteínas de transferência se deslocam (Gelvin, 2000).

A interacção entre as plantas e a bactéria envolve uma complexa série de sinais químicos que podem ser açúcares ácidos e neutros, compostos fenólicos, opinas,



proteínas Vir, e o próprio T-DNA (Liu *et al.*, 2001). Estes sinais químicos desencadeiam toda a reacção de transferência.

Inicialmente, a presença de compostos fenólicos, de origem vegetal, em resposta a eventuais feridas causadas na planta, é fundamental para que haja a indução dos genes de virulência da bactéria, através do local de reconhecimento do sinal. Assim, a proteína Vir A (uma histidina-quinase ligada à membrana interna da bactéria) ou outra, será o local de reconhecimento na bactéria. O processo ainda não é bem conhecido, mas pensa-se que outras proteínas cromossómicas estejam também envolvidas no processo de reconhecimento (Gelvin, 2000). Açúcares como a arabinose ou a glucose, em baixas concentrações, são fundamentais para este passo inicial, pois promovem a activação de uma proteína (Chv E) cromossómica da bactéria que se liga aos açúcares e interage com a Vir A. A proteína Vir A, uma vez activa, fosforila a proteína Vir G permitindo a sua ligação aos promotores dos genes *vir*, activando a expressão dos genes de virulência. A proteína Vir G é controlada pela expressão de outra proteína cromossómica, a Chv D. O sistema de proteínas de virulência VirA-VirG, colocado numa região de 40 kb fora do T-DNA (Watson, 1998) é ainda influenciado por factores físicos como a temperatura e o pH (Liu *et al.*, 2001).

A produção de açúcares e compostos fenólicos constitui um mecanismo de defesa das plantas, levando à biossíntese de fitoalexinas e de lenhina. A produção daqueles compostos funcionará, para a bactéria, como meio de detecção de alvos de infecção (Walden *et al.*, 1990; Gelvin, 2000).

Depois de ter sido encontrada uma planta em condições de ser infectada, desencadeia-se, na bactéria, o mecanismo de ataque. A proteína VirD2, da bactéria, ligada à planta, liberta o T-DNA do plasmídeo Ti, cortando os extremos (regiões flanqueadoras ou “borders”) constituídos por uma sequência repetida de 25 pares de bases. Sabe-se que para a VirD2 estar activa é necessária a presença de uma outra proteína denominada VirD1 (Ziemienowicz *et al.*, 2001). O T-DNA após ser libertado, associa-se à proteína VirD2 através de uma ligação covalente ao resíduo de tirosina da extremidade 5'. Para que esta ligação ocorra, *in vivo*, numa molécula de cadeia dupla é necessário que, além da proteína VirD2, esteja também presente a proteína VirD1. Para que o T-DNA seja exportado da bactéria é também necessária uma outra proteína Vir, a Vir B, que sendo um complexo membrana-proteína, tem uma acção determinante no transporte do complexo proteína-ácido nucleico para o exterior (Liu *et al.*, 2001).

Pensa-se que a transferência do T-DNA para as células vegetais seja feita de um modo semelhante ao que acontece na conjugação entre bactérias, ou seja, uma



molécula de cadeia simples de T-DNA, ligada a uma única VirD2, entra na planta como um complexo proteína-ácido-nucleico (Gelvin, 2000).

Na formação de uma estrutura semelhante a um “*pilus*”, para passagem do ácido nucleico da bactéria para a planta, estão envolvidas proteínas como as VirB que, formam um complexo ligado à membrana (Liu *et al.*, 2001) e a VirD4 (Gelvin, 2000). Uma vez formado o “*pilus* que se pensa seja formado, fundamentalmente, pela VirB2, pode iniciar-se a passagem do T-DNA da bactéria para a planta. A virulência do *Agrobacterium* está directamente relacionada com a capacidade de produzir esta estrutura o que revela o seu papel fundamental, que alguns autores consideram ser o de fixação. O “*pilus*” deve funcionar como uma âncora que, permite manter a bactéria fixa à planta durante o processo de transferência. Não se sabe, ao certo, como se processa essa passagem. No entanto, associada ao T-DNA, é também transferida a VirE2, proteína importante na transformação e que tem a capacidade de se ligar a cadeias simples de DNA (Gelvin, 2000).

Deste modo, o T-DNA é transferido da bactéria para a planta com uma molécula de VirD2 associada à extremidade 5' e toda a sequência envolvida pela proteína VirE2. Estudos recentes sugerem a capacidade de o *Agrobacterium* transferir, separadamente, o T-DNA e a VirE2, tendo esta proteína uma função de protecção da cadeia de DNA no interior da célula vegetal (Ziemienowicz *et al.*, 2001).

A VirE2 parece não ser essencial para a transferência de DNA. Segundo Hwang & Gevin (2004), uma outra proteína, a VirB2, liga-se ao T-DNA formando o complexo proteína-ácido nucleico. Atingido o núcleo da célula vegetal, o complexo proteína-ácido nucleico tem de entrar no núcleo da célula. Todas as proteínas que têm a capacidade de penetrar no núcleo, possuem sinais de localização nuclear (NLSs) que possibilitam o seu reconhecimento pelos mecanismos de importação do núcleo. Este processo ocorre em duas fases: na primeira o NLS da proteína liga-se ao poro da membrana nuclear; na segunda fase, dá-se a translocação do T-DNA, através do poro nuclear (NPC) com dispêndio de energia.

Os NLSs estão presentes quer no caso da proteína VirD2 como no da VirE2. Sabe-se que, para que haja entrada no núcleo, é essencial que a VirE2 esteja presente (Ziemienowicz *et al.*, 2001). A Vir D2 só consegue transferir, para o núcleo, pequenas cadeias simples de DNA, pelo que o T-DNA é uma cadeia de DNA demasiado longa para que o VirD2 consiga introduzi-la no núcleo da célula vegetal. Embora esta função dependa, estritamente, da presença do NLS do terminal C da proteína, em células em divisão, todo o processo está facilitado (a membrana nuclear desagrega-se no processo de divisão celular) e é possível que, nesses casos, a necessidade do NLS não seja tão

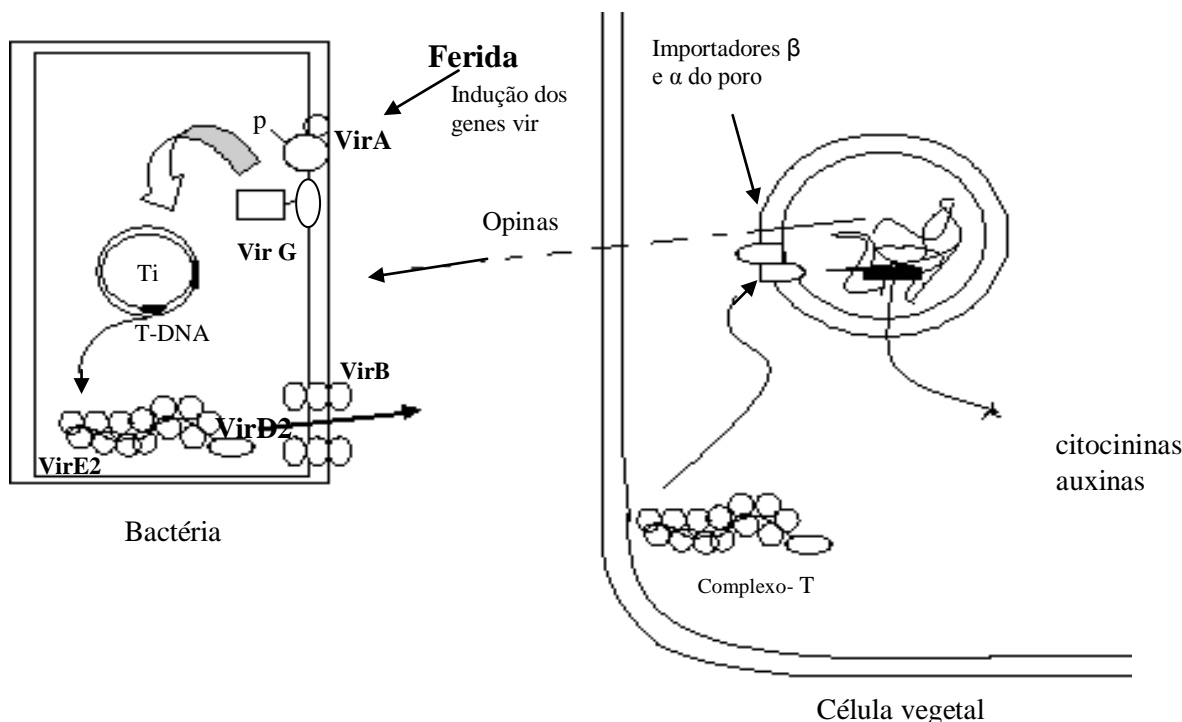


vital para que o transporte ocorra. No caso de cadeias de tamanho superior a 250 nucleótidos (entre 250 e 1000 pb), para que o transporte, através do poro nuclear, se processe de um modo eficiente e rápido, é necessária a presença da VirE2 em conjugação com a VirD2.

No caso particular do T-DNA, a VirE2 envolve a cadeia de nucleótidos, cobrindo as suas cargas negativas, o que possibilita a passagem desta longa cadeia através do poro nuclear da célula vegetal. Pensa-se que, alternativamente ou mesmo em conjugação, esta proteína ligar-se-á aos intermediários de importação no interior do poro, facilitando o transporte (Ziemienowicz *et al.*, 2001).

O papel da VirD2 será o de proteína guia que leva o T-DNA pelo caminho certo, usando para tal, o seu NLS do terminal C que é reconhecido pelo receptor NLS Importador α do poro nuclear. Uma vez ligado a este Importador α , o T-DNA ancora-se ao NCP através do Importador β e, deste modo, o terminal 5' do T-DNA é introduzido directamente no poro, verificando-se a sua rápida deslocação através dele (Figura 1.4.).

Figura 1.4-Esquema ilustrando os passos fundamentais do processo de transformação de plantas mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. (adaptado de Zupan & Zambryski, 1995).



Uma das possíveis razões para que a resposta da planta à infecção por *Agrobacterium* seja tão pouco intensa (uma vez que não há indução de respostas hipersensíveis) pode ser a sua proximidade filogenética à bactéria simbiótica *Rhizobium* e, também, a capacidade do *Agrobacterium* alterar ou contornar as defesas das plantas.



Assim, verificou-se que, 24 a 48h após a interação entre os dois organismos, proteínas com um papel importante na tradução do sinal e nas respostas de defesa da planta a agentes patogénicos, apresentam-se alteradas (Ditt *et al.*, 2001). Embora, resultando numa infecção patogénica e não simbiótica para a planta, a bactéria parece ter os meios necessários para induzir respostas na planta que, normalmente estão associadas a stresses abióticos e a bactérias não patogénicas (alguns partilhados com o *Rhizobium*).

Com base neste processo de transferência genética mediada por *Agrobacterium*, existem múltiplos registos de protocolos de transformação em vários géneros de plantas sendo provavelmente a metodologia mais largamente difundida. A sua utilização está, sem dúvida, associada a dois factos fundamentais: o largo espectro de plantas passíveis de serem sensíveis à bactéria e, por outro lado, a vantagem de ser um método dirigido ao núcleo das células. Para que esta metodologia de transformação genética fosse amplamente utilizada, tiveram de ser efectuadas algumas alterações aos plasmídeos, nomeadamente, a remoção do T-DNA, dos genes responsáveis pela síntese de opinas e de fitorreguladores (obtendo-se plasmídeos ditos desarmados). Este processo não interfere com a transferência para a planta embora seja essencial manter as repetições dos “borders” para que o sinal de reconhecimento da transferência se mantenha. Com esta alteração conseguem-se duas mais valias: por um lado, os genes retirados podem ser substituídos pelos genes de interesse; por outro lado, sem a produção de fitorreguladores e de opinas nas células transformadas torna-se mais fácil controlar, *in vitro*, a regeneração e o desenvolvimento das plântulas transformadas.

A transferência do T-DNA não depende de uma ligação física entre esta porção do plasmídeo e o DNA da planta o que levou ao desenvolvimento de duas abordagens para a construção de vectores desarmados de transformação de plantas: 1) Sistema em Cis ou vectores co-integrativos em que os novos genes são introduzidos numa recombinação homóloga com o T-DNA já existente no plasmídeo Ti; 2) Sistema em Trans ou vectores binários, em que os novos genes estão clonados em pequenos plasmídeos artificiais com T-DNA, sendo a origem de replicação funcional a do *Agrobacterium*. Os pequenos plasmídeos são introduzidos em estirpes de *Agrobacterium* com plasmídeos Ti alterados com uma região *vir* funcional (denominados plasmídeos “helper”) mas sem a região T.

Após transformação, é essencial seleccionar as células que estão transformadas. Para tal foram desenvolvidos marcadores selectivos que conferem resistência a herbicidas ou a antibióticos. Deste modo, uma célula que seja capaz de completar o seu ciclo de vida em meios contendo esses herbicidas ou antibióticos, será uma célula que deverá estar transformada. De entre os genes de selecção mais utilizados podem



destacar-se os seguintes: resistência à canamicina, higromicina, metatrexato e fosfinoltricina. O promotor responsável pela expressão destes genes que conferem as diferentes resistências é, geralmente, de dois tipos: origem viral, nomeadamente do Vírus do Mosaico da Couve-flor (o promotor 35S ou o 19S), ou origem no próprio *Agrobacterium* (em geral os promotores ligados à síntese de octopina ou nopalina). Existem ainda, promotores de origem vegetal, em particular da planta que se pretende transformar.

Juntamente com os genes de selecção, incluem-se também genes marcadores, facilmente detectáveis utilizando testes directos e de fácil observação. Estes testes podem ser reacções químicas ou utilização de luz de comprimentos de onda específicos, em geral U.V.. Com este último tipo de genes, que codificam proteínas “green fluorescent protein” (GFP), é possível determinar, o estado e intensidade de transformação, em simultâneo, com o processo de selecção. Ao mesmo tempo é possível verificar *in situ* as respostas do material ao processo de transformação, o que permite monitorizar toda a técnica, quer pelo conhecimento da taxa de expressão transiente, quer pela determinação das condições de transformação em que esta se processa com taxas mais elevadas. Os genes marcadores mais utilizados são genes que codificam para diferentes compostos de origem não vegetal, como o do cloranfenicol acetiltransferase, β -glucuronidase, luciferase e, mais recentemente, o da proteína GFP. A transformação genética de plantas tem vindo a ser utilizada com objectivos muito diversos como a tolerância ao frio ou à salinidade elevada (exemplos de stresses abióticos), a esterilidade masculina, a resistência a stresses bióticos, ou tendo em vista a biorremediação (Peña & Séguin, 2001).

1.4.b. Transformação por bombardeamento de partículas

Neste processo de transformação genética, o gene ou genes são introduzidos nas células a transformar, associados a microprojecteis de ouro ou tungsténio, disparados a alta velocidade contra o material vegetal. Idealmente, as partículas devem entrar nas células de molde a que a integridade das mesmas se mantenha, e o DNA estranho seja, integrado no genoma de algumas das células bombardeadas, permitindo que, ulteriormente, se consigam obter plantas transgénicas regeneradas a partir dessas células. Na prática, o bombardeamento que consiste no choque de partículas densas a grande velocidade contra as células vegetais, provoca ferimentos de diferentes dimensões. A relação entre a formação de feridas, fundamental para a inserção do material genético e, a capacidade de recuperação das mesmas (que permite às células transformadas recuperarem, originando plantas transgénicas) é fulcral neste processo de



transformação (Bidney *et al.*, 1992). Desde 1988, altura em que Christou e a sua equipa demonstraram as potencialidades desta metodologia, que esta técnica de transformação, tem sido largamente utilizado em herbáceas, monocotiledóneas, leguminosas e lenhosas, por exemplo.

As partículas com tamanhos que variam entre os 0,4 a 2 μm de diâmetro, são tratadas com DNA e diferentes compostos, como a espermidina e o cloreto de cálcio, para promover a adesão do ácido nucleico. As partículas são ulteriormente aceleradas de modo a que atravessem tanto a parede celular como a membrana plasmática atingindo as células alvo de forma não letal. O primeiro registo de um aparelho para acelerar as partículas revestidas com DNA foi concebido por Stanford em 1987. Baseava-se num mecanismo de transferência de impulsos mecânicos utilizando macroprojecteis, que aceleravam as partículas de tungsténio até altas velocidades (328-656 m sec^{-1}), e uma placa de paragem com uma pequena abertura na zona de passagem das partículas. Estes equipamentos têm vindo a ser aperfeiçoados sofrendo alterações, nomeadamente, na fonte de aceleração. A aceleração pode ser gerada por descarga de uma arma (Stanford *et al.*, 1987), por gota de água (Christou, 1988), ar comprimido (Sautter, 1993) ou outros gases como o hélio (Russell *et al.*, 1991).

Das vantagens apontadas ao método de bombardeamento, as mais frequentemente mencionadas são (1) transformação de diferentes espécies agrícolas independentemente do genótipo, (2) a independência da relação hóspede/hospedeiro necessária na transformação mediada por *Agrobacterium*, (3) ausência de limitações e problemas na regeneração de novas plantas, em oposição ao que acontece na transformação por *Agrobacterium* (Christou, 1992). Neste método, a capacidade de utilizar qualquer tipo de tecido para transformação, permite uma liberdade que, muitas vezes, pode fazer a diferença entre o sucesso ou insucesso da transformação, uma vez que o tecido mais acessível à transformação pode não ser, necessariamente, o mais apto para a regeneração (McCown *et al.*, 1991; McCabe *et al.*, 1993; Cho *et al.*, 1999). Por outro lado as micropartículas podem atingir várias células em simultâneo, o que pode aumentar a percentagem de células potencialmente transformadas (Sautter, 1993).

A capacidade de obter plantas transformadas, utilizando este método, depende de vários factores que podem ser controlados atendendo ao seguinte:

- Sistema de regeneração adequado para que as células transformadas possam originar novas plantas com frequência aceitável;
- Flexibilidade na penetração das partículas de modo a permitir que o DNA atinja as células competentes para a regeneração;



- Processos eficientes de selecção para despistar o máximo de quimeras (plantas que têm origem em grupos de células, muitas das quais não são transformadas, o que significa que a planta pode ter porções com origem em células transformadas e outras não);
- A frequência das quimeras é determinada pela posição das células responsáveis pela regeneração (se as plantas regeneradas são fundamentalmente de uma zona em que ocorreu transformação em poucas células, é possível que a frequência de quimeras seja muito elevada).

É importante ter em conta que o processo de bombardeamento depende de factores físicos. De entre estes factores destaca-se a capacidade de atingir as células, evitando, em simultâneo, danos excessivos no tecido, o que comprometeria a capacidade regenerativa (Christou, 1992; Birch, 1997). Nesta perspectiva, é possível otimizar diferentes variáveis como o tamanho e densidade das partículas, a quantidade de DNA, o método de precipitação do DNA e ajustamento dos parâmetros do equipamento que condicionam a capacidade de penetração (Christou *et al.*, 1991). Estes parâmetros variam com o tipo de aparelho utilizado. Nos aparelhos que usam hélio será a sua pressão e a distância entre os diferentes componentes do equipamento (Kikkert, 1993). No sistema de aceleração por descarga eléctrica será a voltagem aplicada (McCabe & Christou, 1993). Nesta metodologia, há que ter em conta factores físicos e ambientais que, podem condicionar a capacidade de “aceitação” do DNA por parte da planta receptora. Neste grupo encontram-se a temperatura, o fotoperíodo e a humidade em que os alvos se encontram durante o bombardeamento podendo, nalguns casos, ser necessário, um tratamento prévio de pré-bombardeamento num regime especial de luz, temperatura e humidade para o sucesso da transformação (Christou, 1994). São factores determinantes o tipo de explante usado e os tratamentos aplicados quer antes quer depois do bombardeamento (Christou, 1995).

1.4.c. Expressão de transgenes

Em inúmeros campos dispersos por todo o mundo, é possível encontrar ensaios de transformação de plantas (plantas transgénicas) sendo que, muitos dos seus produtos, já se encontram no mercado (Birch, 1997; Dempsey *et al.*, 1998) e na indústria alimentar (Walden, 1999). Alguns destes produtos têm já grande expressão no mercado mundial, como seja o tomate “Flavr Savr”, comercializado em 1994 pela empresa Calgene, o milho resistente a insectos “Maximizer” da companhia Ciba Seeds, comercializado em 1996, soja resistente a herbicidas “Roundup Ready”, comercializado em 1996-97 pela empresa Pioneer, “canola” resistente a herbicidas “Innovator”,



comercializada em 1995-96 pela empresa AgrEvo, algodão resistente a insectos “Bollgard”, comercializado em 1996-97 pela empresa Monsanto, (Birch, 1997). No caso do milho, o sucesso da sua utilização traduz-se no facto de mais de um terço do milho cultivado nos Estados Unidos ser Bollgard (Perlak *et al.*, 2001).

Com o desenvolvimento das técnicas de transformação, o controlo da expressão de transgenes é um dos problemas a ter em conta, visto que, frequentemente, as sequências introduzidas são transmitidas à descendência de acordo com as leis de Mendel, com um fenótipo bem definido e de acordo com o esperado. É, no entanto, comum surgirem fenótipos inesperados e cuja transmissão dos caracteres sofra alterações ao esperado. A expressão de transgenes pode ser afectada por uma variedade de genes pré-estabelecidos (genética da planta) e por condições ambientais (Zhong, 2001). Embora não esteja esclarecido todo o mecanismo de integração estável do DNA estranho no genoma da planta sabe-se que o sucesso desta técnica depende de eventos que levam a uma inactivação a nível transcripcional ou postranscripcional denominados por silenciamento (Meyer & Saedler, 1996). Dos eventos que podem levar ao silenciamento, destacam-se alguns que, embora possam originar um mesmo fenótipo, têm sistemas de regulação distintos: o número e a estrutura das cópias integradas (Dale *et al.*, 1993), a região no cromossoma onde é integrada o DNA (Day *et al.*, 2000), a estrutura da cromatina e o estado de metilação desta na zona do promotor (Meyer *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1997) assim como a “força” e especificidade do promotor utilizado (Birch, 1997; Datla *et al.*, 1997).

Um dos tipos mais comuns de silenciamento postranscripcional surge quando existem processos de silenciamento epigénico de transgenes e genes endógenos (co-supressão) que, fundamentalmente, ocorrem quando há supressão da expressão de um gene endógeno depois da introdução de um gene homólogo (Meyer & Saedler, 1996; Zhong, 2001), podendo dar-se a um nível transcripcional ou postranscripcional. O silenciamento postranscripcional resulta da degradação do RNAm na forma anti-sense, aberrante sense ou se produzem formas de cadeia dupla de RNAm. A origem deste silenciamento poderá estar nos processos de recuperação pelos quais as células eliminam patogénios (vírus de RNA) ou os seus produtos indesejados (RNA codificado por viroses de DNA) (Bruening, 1998; Fagard & Vaucheret, 2000). Este silenciamento pode também suprimir a transcrição de genes homólogos endógenos resultando em co-supressão. A co-supressão pode ser induzida por vírus ou por transgenes e ocorre como resposta a dois factores de stresse importantes para a planta, a integração estável de DNA adicional nos cromossomas e a replicação extracromossómica do genoma viral (Ahuja, 2001).



O silenciamento transcricional que resulta da impossibilidade de iniciar a transcrição por metilação e/ou condensação da cromatina, deve-se a mecanismos, pelos quais os transposões, cópias de elementos móveis, e inserções de T-DNA são incorporados. O silenciamento por metilação, normalmente associado a uma inativação transcricional e hereditária, em alguns casos verificou-se também que não era hereditária, podendo ser postranscricional (Ingelbrecht *et al.*, 1994).

Considera-se que a transformação mediada por *Agrobacterium* tem a vantagem de direccionar o DNA para o núcleo da célula alvo. Esta integração é frequentemente conseguida sem alterações no T-DNA (deleções) visto que este penetra no núcleo protegido por um sistema de proteínas que permite manter a integridade da molécula. Estão descritos para a transformação com *Agrobacterium*, padrões complexos de integração, tais como: rearranjos, múltiplas cópias e diferentes locais de inserção (Birch, 1997). Tal também sucede com os métodos directos de transformação como por exemplo o bombardeamento. É conhecido que a frequência de distribuição de cópias e os seus rearranjos variam com os parâmetros de transformação em ambos os métodos (Birch, 1997; Zhong, 2001; Ow, 2002). É exemplo o caso de plantas de trigo em que a frequência de transformação está fortemente correlacionada com a idade das plantas dadoras dos embriões para transformação (Pastori, *et al.*, 2001). Estudos na mesma espécie demonstraram que a concentração de açúcares ou de fitorreguladores é determinante para uma transformação estável (Rasco-Gaunt *et al.*, 2001). Estudos levados a cabo em citrinos (Gutierrez *et al.*, 1997) demonstraram que a posição dos explantes no agar influencia a transformação estável.

No caso específico do *Agrobacterium*, por vezes, podem ser incorporadas sequências do plasmídeo juntamente com os “borders” do T-DNA (Jacobsen, 1996). Essas pequenas porções podem mostrar mais afinidade pela matriz nuclear, levando a uma localização dos genes pouco favorável na heterocromatina, ou sofrer mais intensamente a influência da cromatina envolvente, convergindo para uma maior instabilidade e variabilidade dos transgenes (Mlynárová *et al.*, 1996; Ahuja, 2001).

Assim, e considerando a grande pressão económica e ambiental que a libertação de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) implica (mais informações: Briggs, 1998; Lee, 1998; Kuiper *et al.*, 2001; Bowles & Klee, 2001), o grande objectivo futuro na manipulação genética será, não tanto o de transformar plantas com genes de interesse, mas sim manter essas plantas estavelmente transformadas ao longo das gerações futuras. O controlo genético dos organismos transgénicos é hoje uma preocupação mundial, obedecendo por isso a regras que pretendem controlar, não só a sua estabilidade, como a interacção com espécies relacionadas (fluxo genético - gene flow e



polinização cruzada), acção sobre espécies não alvo (espécies que, não sendo o objectivo da resistência introduzida na transformação, podem ser afectadas pelos produtos do gene expresso nas plantas transgénicas), e o efeito sobre a saúde humana (Genetically Modified Pest-Protected Plants: Science and Regulation, 2000). Neste contexto, a preocupação na estabilidade genética das plantas transformadas, foi necessariamente uma preocupação deste trabalho. Preocupação que se traduz no acompanhamento, ao longo do tempo, dos transgenes livres de pressão selectiva.

1.5. Objectivos

O melhoramento genético de uma planta alvo de ataque por vários agentes patogénicos, capazes de comprometer gravemente a produtividade e a economia da produção, é um objectivo permanente de produtores, técnicos e investigadores. O objectivo deste trabalho foi, o estabelecimento e desenvolvimento de culturas *in vitro*, de um clone espontâneo, o clone Bragança. Foram ainda objectivos o desenvolvimento de um protocolo de transformação para obtenção de plantas de *Humulus lupulus* L., clone Bragança, resistentes ao Vírus do Mosaico de *Arabis*, assim como o estudo da expressão transiente e, avaliação da expressão transgénica, nas plantas transformadas, obtidas após transferência de genes por bombardeamento de partículas e transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.



CAPÍTULO II

Organogénesse

Índice

RESUMO	46
2.1. INTRODUÇÃO	47
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	50
2.2.1. MICROPROPAGAÇÃO E ORGANOGÉNESE	50
2.2.1.1. MATERIAL VEGETAL	50
2.2.1.2. MÉTODO DE DESINFECÇÃO DO MATERIAL FRESCO	50
2.2.1.3. CONDIÇÕES DE PROPAGAÇÃO	50
2.2.1.5. EFEITO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE STRESSE	52
2.3. RESULTADOS	54
2.3.1. ORGANOGÉNESE EM FOLHAS	54
2.3.2. ORGANOGÉNESE EM PECÍOLOS E ENTRENÓS	54
2.3.3. DIFERENTES CONDIÇÕES DE STRESSE	57
2.4. DISCUSSÃO	66
2.4.1. ORGANOGÉNESE EM FOLHAS	66
2.4.2. ORGANOGÉNESE EM PECÍOLOS E ENTRENÓS	67
2.5.3. DIFERENTES CONDIÇÕES DE STRESSE	69



Resumo

As culturas *in vitro*, utilizadas nos ensaios de organogénese, foram estabelecidas a partir de meristemas de plantas de lúpulo de campo. O material foi colocado em cultura em Abril-Maio. No processo de regeneração foram testadas duas variedades comerciais (Er e BG) e um clone espontâneo recolhido no distrito de Bragança (Br). O meio utilizado na micropropagação foi o meio Adams modificado (15 g/L glucose com 0,75 mg/L IBA e 0,2 mg/L BA), para todas as variedades, com crescimento igualmente rápido, nas diferentes variedades e clone. Foi determinado qual o melhor meio e melhor explante, para a obtenção de organogénese. Foram testados vários meios base e várias combinações de fitorreguladores. Verificou-se que, para cada variedade, o meio com maior taxa de regeneração foi diferente. Assim, para a variedade BG o melhor meio foi o meio MS suplementado com 3 mg/L Zea e 0,025 mg/L de IAA, enquanto que, para a variedade Er o meio testado, com taxa de regeneração mais elevada, foi o meio SH suplementado com 1,5 mg/L Zea e 0,025 mg/L IAA. Para o Clone Br, o meio seleccionado para os ensaios posteriores de regeneração, foi o meio MS com 15 g/L de sacarose e 1,5 mg/L de Cinetina e 0,02 mg/L de IAA. Foram testadas alterações de pH, adição de ácido salicílico, adição de sulfato de cobre, stresse térmico e diferentes concentrações de sacarose, com o objectivo de aumentar a taxa de regeneração. Verificou-se que, no caso das alterações ao meio e condições térmicas, a percentagem de regeneração aumentou sem, no entanto, ultrapassar 10% acima do valor inicial.

Estudou-se a capacidade regenerativa de folhas, pecíolos e entrenós. As folhas não apresentaram capacidade morfogénica para meristemas, verificando-se que a morfogénese se expressou sempre na forma de raízes, tendo por isso, sido abandonado como material de partida para a transformação. Os pecíolos embora com uma boa resposta, num balanço final de plantas regeneradas por explante apresentaram valores inferiores aos obtidos com os entrenós.

Com base nestes resultados, foram usados apenas os entrenós, como explante de partida para os ensaios subsequentes de transformação.

O clone Br foi o material vegetal usado para os ensaios de transformação genética, uma vez que apresentou maiores taxas de regeneração e, por outro lado, se encontrava em boas condições fitossanitárias e fisiológicas.

Parte das plantas micropropagadas foram aclimatadas, com passagem directa do meio de micropropagação para vasos. Destas plantas 14 de cada (variedades e clone), foram colocadas em campo nos viveiros da Escola Superior Agrária de Bragança. Parte das plantas regeneradas foram igualmente aclimatadas e colocadas em vasos nas estufas da Escola Superior Agrária de Bragança.



2.1. INTRODUÇÃO

O grau de eficiência na obtenção de plantas por organogénese a partir de células ou tecidos em cultura *in vitro* é, reconhecidamente, um passo essencial para a ulterior utilização em processos de melhoramento. O domínio de um processo organogénico possibilita a aplicação de técnicas de manipulação genética aplicáveis ao melhoramento de cultivares com grande valor económico. A definição de um processo organogénico reprodutível é fundamental e, em muitos casos, constitui um passo limitante na transformação genética de plantas mediada por *Agrobacterium* ou por bombardeamento de partículas (duas técnicas utilizadas neste trabalho) para a introdução de genes de interesse (Litz & Gray, 1992).

Tendo em conta que, na família das *Cannabaceae* existem apenas dois géneros, verificámos que o número de trabalhos publicados, para cada um deles, na área da cultura *in vitro* é reduzido. Assim, no caso de *Cannabis sativa* L. os estudos situam-se mais nas áreas da farmacologia e medicina (Lindemayr & Jager, 1980) ou da fisiologia (Mandolino *et al.*, 1999). Assim, em termos de propagação, multiplicação e organogénese, existem poucas referências a trabalhos utilizando essa espécie. No género *Humulus*, os trabalhos publicados são também escassos, visto que, em muitos países eles têm sido desenvolvidos em empresas, em estreita relação com a indústria cervejeira, sendo os resultados pouco divulgados. Estes trabalhos estão mais direccionados para a classificação e caracterização de variedades e clones espontâneos de lúpulo (Small, 1980; Pillay & Kenny 1996a; Pillay & Kenny 1996b; Murakami 2001; Patzak 2001) e para aspectos químicos e técnicos da produção cervejeira (Palamand & Aldenhof, 1973; Menary *et al.*, 1983; Benitez & Magadan, 1996; De Cooman *et al.*, 1998) e, por vezes, para a aplicabilidade em medicina (Langezaal *et al.*, 1992; Matousek *et al.*, 2002). Neste enquadramento, a disponibilidade de dados relativos à organogénese nas *Cannabaceae*, em particular em *Humulus lupulus* L., é reduzida, tornando-se essencial o estudo aprofundado de cada variedade ou clone utilizado em trabalhos de organogénese.

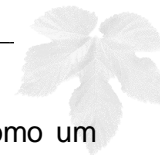
No caso particular do lúpulo, cada variedade funciona como se fosse uma planta diferente, com requisitos e meios de regeneração diferentes, como podemos verificar da análise de alguns trabalhos prévios de cultura *in vitro* de lúpulo (Griffin & Coley-Smith, 1968; Adams, 1975; Robins *et al.*, 1985; Probasco & Winslow, 1986; Connel & Heale, 1986; Heale *et al.*, 1989; Langezaal & Scheffer, 1992; Batista *et al.*, 1996; Šustar-Vozlič *et al.*, 1996; Gurriaran *et al.*, 1999; Fortes & Pais, 2001; Smýkalová *et al.*, 2001). Na maior parte destes trabalhos o objectivo foi a micropropagação, regeneração de plantas



resistentes a fungos, termoterapia, ou produção de compostos secundários com interesse económico. Em alguns, no entanto, o objectivo foi a organogénese a partir de material adulto (Batista *et al.*, 1996; Šustar-Vozlič *et al.*, 1996; Gurriaran *et al.*, 1999; Fortes & Pais, 2001; Smýkalová *et al.*, 2001).

Manipulando o meio de cultura no que se refere ao tipo e concentração de fitorreguladores e à presença de alguns compostos e/ou condições, é possível aumentar a taxa de regeneração de um explante. De entre os compostos utilizados, destaca-se o nitrato de prata (AgNO_3), o ácido acetilsalicílico e o sulfato de cobre (CuSO_4). O AgNO_3 foi usado, com sucesso, no aumento da taxa de morfogénese *in vitro* e redução de formação de *callus* em cassava (Zhang *et al.*, 2001) e em *Cucumis sativus* L. Verificou-se não só o aumento da taxa de regeneração, como do número de meristemas obtidos por explante (Mohiuddin *et al.*, 1997). O efeito do ácido acetilsalicílico, como fitorregulador de resposta a stresses bióticos, é já conhecido, nomeadamente, como indutor de sistemas de resposta em cascata, quer a nível enzimático, quer a nível de expressão de genes (Raskin, 1992; Shulaev *et al.*, 1995; Taiz & Zaiger, 1998; Wees Saskia *et al.*, 2000). Embora o seu modo de acção não esteja totalmente esclarecido, a sua utilização na indução de morfogénese, tem sido intensificada com resultados positivos em diferentes espécies, nomeadamente em macieira (Romani, 1989), gerânio (Hutchinson & Saxena, 1996), e cafeeiro (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2001). O CuSO_4 sendo um cofactor de várias enzimas, tem um papel importante fornecendo um micronutriente essencial no desenvolvimento vegetal (Taiz & Zaiger, 1998). Por outro lado, da sua presença e concentração, pode depender a absorção e acumulação de ferro (Fe) e manganês (Mn), micronutrientes essenciais ao desenvolvimento das plantas (Ye *et al.*, 2001).

De entre as alterações às condições de cultura, com vista ao aumento da taxa de regeneração, encontram-se: alterações de luz (intensidade e comprimento de onda), alterações do agente gelificante (tipo e concentração) e da temperatura. No caso das alterações luminosas, um período de indução no escuro favorece a morfogénese (Compton, 1999), embora este processo não seja induzido de igual modo em todas as plantas, nem em todas as variedades de uma mesma espécie. Diferentes agentes gelificantes podem alterar a capacidade regenerativa, como se verifica para o gladiolo (Chauvin *et al.*, 1999), ou na capacidade de multiplicação de algumas variedades checas de lúpulo (Smykalová *et al.*, 2001). O possível aumento da taxa de regeneração, após um período de permanência no frio, é um efeito que estará associado a quebras de dormência e variações de teores de fitorreguladores, nomeadamente, de giberelinas (Taiz



& Zaiger, 1998) e/ou, alterações do pH celular, podendo o frio ser encarado como um stresse abiótico (Hausman *et al.*, 2000).

O trabalho reportado neste capítulo de organogénese consistiu na definição dos requisitos essenciais à regeneração de um clone espontâneo (clone Bragança), e duas variedades comerciais (Eroica e Brewer's Gold) de Lúpulo, com o objectivo de definir um protocolo reprodutível para ulterior utilização em transformação genética.

Neste trabalho foram testados diferentes tipos de explante de plantas micropropagadas das variedades e do clone Bragança, de molde a definir qual o explante, e as condições de cultura, mais adequadas para uma eficaz regeneração.



2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Micropropagação e Organogénese

2.2.1.1. Material vegetal

O material vegetal utilizado nos diferentes ensaios foi obtido de plantas femininas de lúpulo de duas variedades (var.) – Brewers Gold (BG) e Eróica (Er) – propagadas *in vitro*, e de um clone espontâneo da região de Bragança que se denominou Clone Br. A var. BG foi estabelecida em cultura a partir de explantes recolhidos de plantas existentes no Jardim Botânico de Lisboa. A var. Er foi micropropagada a partir de explantes obtidos de 5 plantas cedidas pela Doutora Anabela Martins da Escola Superior Agrária de Bragança.

2.2.1.2. Método de desinfeção do material fresco

O material proveniente de plantas da var. BG foi desinfectado de acordo com a seguinte metodologia:

- Lavagem em água corrente (os caules são esfregados cuidadosamente com uma escova macia para não danificar o material)
- Imersão em solução de hipoclorito de sódio 7%, com Triton 100X (6 gotas/100 ml) durante 10-15 minutos. Durante os últimos 2 minutos do tratamento, o material foi submetido a ultra-sons.
- 2 a 3 lavagens em água destilada esterilizada por autoclavagem a 120°C e 1 atmosfera (atm) durante 25 minutos.

2.2.1.3. Condições de propagação

Na propagação das plantas utilizou-se meio de Adams (1975) modificado (20 g/L de glucose e 0,75 mg/L de ácido indolbutinico (IBA) e 0,2 mg/L de benzil amino-purina (BA), que denominamos Adams 1.

Para micropropagação das plantas foram inoculados os meristemas axilares e apicais. Os meristemas foram colocados na vertical no meio de cultura (esterilizado por autoclavagem de 15 minutos a 120°C e 1 atm) e mantidos num fotoperíodo de 16/8h (luz/escurecimento) obtido com lâmpadas “day-light” 35 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ e uma temperatura de 25 \pm 2°C. Os meristemas foram inoculados em frascos de vidro fechados com película de polietileno (película aderente), durante as primeiras 3 semanas, após o que se utilizaram rolhas de papel de alumínio. A subcultura das plantas ocorreu a intervalos de 6 semanas. Todas as plantas foram colocadas em cultura seguindo o mesmo processo (Fig.2.1.).

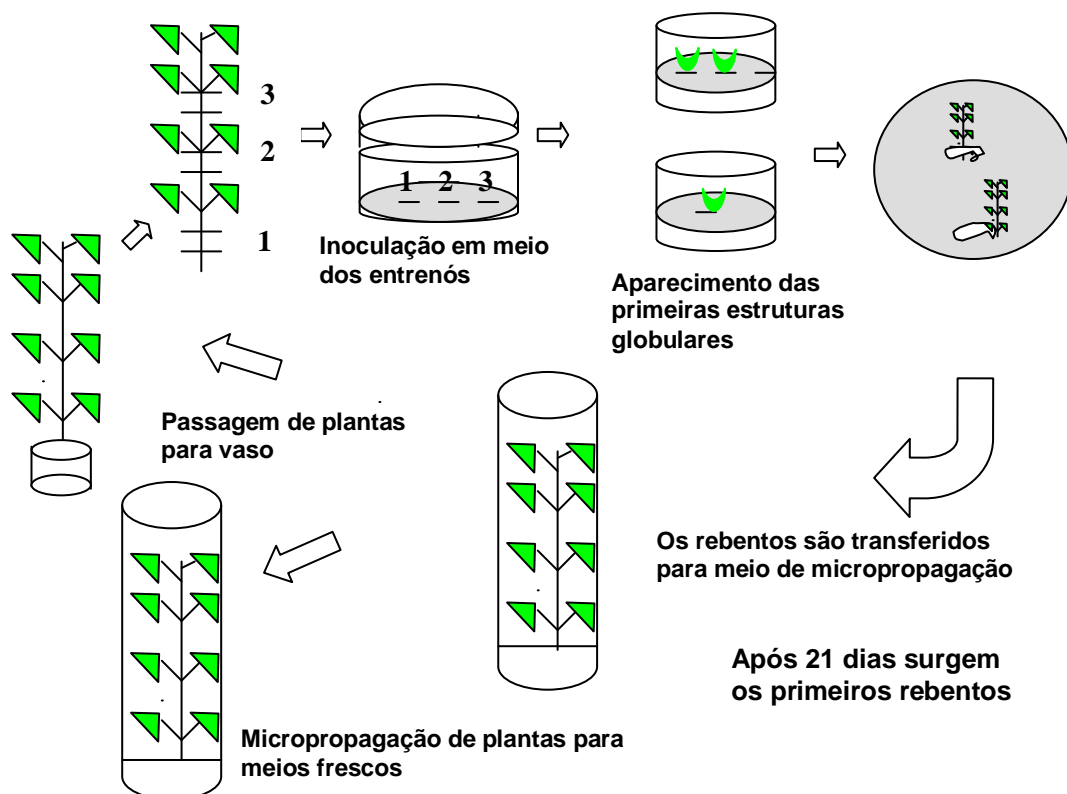


Figura 2.1. – Representação esquemática do processo de obtenção das plantas de lúpulo *in vitro*, partindo de plantas espontâneas ou em vaso.

2.2.1.4. Indução de meristemas adventícios (organogénese)

Todos os ensaios foram feitos em tubo de cultura. Os meios testados foram os de Adams (Adams, 1975), MS (Murashige & Skoog, 1962) e SH (Kubo *et al.*, 1975). Foram utilizados 10 mL de meio sólido em cada tubo de cultura (7 g/L de agar-agar). Como fonte de carbono utilizou-se a sacarose (15 g/L). As diferentes suplementações hormonais testadas encontram-se na Tabela III (Anexo I). O anti-oxidante utilizado em todos os meios foi a Cisteína (15 mg/L). As condições de luz e fotoperíodo foram as utilizadas na micropropagação. Foram inoculados segmentos de 1,5 a 2 cm de comprimento do 1º, 2º e 3º entrenós (Fig. 2.1), pecíolos correspondentes aos 1º, 2º e 3º par de folhas, de acordo com a Fig. 2.1 (explantos de aproximadamente 1,5 cm de comprimento) e as folhas correspondentes aos pecíolos utilizados.



2.2.1.5. Efeito de Diferentes Condições de stresse

Para as duas variedades (BG e Er) e para o Clone Br foram testadas condições de stresse físico e químico, prévias à indução de meristemas adventícios. Para todos os ensaios para teste de condições de stresse foram utilizados entrenós como explante:

I) Baixa temperatura – as plantas foram colocadas em meio de cultura (Tabela 2.1.), em tubos de cultura (10 mL de meio sólido) e mantidas a uma temperatura de 4°C durante 15 dias. Após este período os entrenós foram inoculados no mesmo meio inicial preparado de fresco. Alguns explantes foram cortados e colocados em caixa de Petri nas mesmas condições dos tubos de cultura, por períodos de 15 dias e 1 mês, após o que foram inoculados.

II) Nutricional – foram testados stresses nutricionais nos meios MS (variedade BG e Clone Br) e SH (variedade Er) (Tabela 2.1.), contendo 5 g/L de sacarose, meios com a suplementação de sacarose 20 g/L e meios constituídos por água e agar. As plantas completas estiveram nestes meios durante 6 semanas após o que foram utilizadas para recolha de explantes a inocular nos meios frescos de indução (Tabela 2.1.).

III) Redução do pH (em MS de 5,7 para 5,6 e 5,5 e em SH de 5,1 para 4,9 e 4,4) - os meios de indução em que se verificou uma maior capacidade organogénica foram seleccionados (meio I8 para a variedade BG e Clone Br e meio I6.1 para a variedade Er), os explantes cortados e colocados em meio fresco a pH reduzido (Tabela 2.1.). As observações foram feitas durante 6 semanas.

IV) Adição de Ácido Acetilsalicílico (0,69 mg/L) - testou-se o efeito deste composto nos meio MS (variedade BG e Clone Br) e SH (variedade Er), comparando com os mesmos meios sem Ácido Acetilsalicílico e com o meio constituído apenas por água e agar. As plantas foram cortadas e os explantes colocados nestes meios durante 6 semanas, após o que foram transferidos para meio fresco de indução (Tabela 2.1.).

V) Adição de Nitrato de Prata (AgNO₃) (1 mg/L) – foi testado o efeito deste composto nos meio MS (variedade BG e Clone Br) e SH (variedade Er), comparando com os mesmos meios sem AgNO₃ e com o meio constituído apenas por água e agar. As plantas foram cortadas e os explantes colocados nestes meios durante 6 semanas, após o que, foram transferidos para meio fresco de indução (Tabela 2.1.).

VI) Adição de Sulfato de Cobre (CuSO₄) (0,1, 10, 55, 555 mg/L) - as diferentes concentrações foram testadas no meio MS suplementado com 3 mg/L Zeatina (Zea) e



0,025 mg/L ácido indol acético (IAA) (meio I2 da Tabela 2.1.). Os resultados foram comparados com os obtidos no mesmo meio sem adição de sulfato de cobre. As observações foram feitas durante 6 semanas.

Tabela 2.1. – Meios utilizados para a indução de organogênese, após tratamento de stresse. Depois da fase de indução os explantes foram transferidos para estes meios.

Meio de Indução	Meio base	Zea	IAA	Cinetina (Kin)
I0	MS		0,025	2,5
I1	MS	2,5	0,025	
I2	MS	3	0,025	
I3	MS		0,02	1,5
I4	MS	5	0,025	
I5	MS	2	0,01	
I6	MS		0,01	2
I7	MS		0,025	3
I8	MS	1,5	0,025	
I6.1	SH	1,5	0,025	
I7.1	SH		0,03	1,5

Nota – Concentração em mg/L.

As alterações na taxa de regeneração nos ensaios com e sem indução de stresse os dados foram avaliados utilizando um programa de simulação, baseado nas premissas do teste χ^2 que implementa o algoritmo deste programa: ACTUS (Oliveira & Almada, 1998). São testes de independência por simulação para análise de tabelas de contingência, equivalentes aos testes de χ^2 de independência, mas que permite a utilização de tabelas de dados maiores. Este teste é utilizado para uma análise de χ^2 quando os dados não seguem as premissas do teste χ^2 , nomeadamente quando as células das tabelas apresentam valores baixos ou nulos. Os testes estatísticos foram aplicados aos valores em bruto, antes de ser determinada a frequência de regeneração.



2.3. RESULTADOS

2.3.1. Organogênese em folhas

A regeneração de plantas de lúpulo ocorreu, exclusivamente, em pecíolos e entrenós. A indução de organogênese em folhas apenas resultou na formação de raízes. Das folhas induzidas 100% formaram raízes, mesmo em meios contendo razões auxina/citocinina muito baixas (1/100). Estes resultados apresentaram alguma consistência, nas diferentes variedades testadas, visto que, em todas elas, se obtiveram raízes em percentagens elevadas (BG 86%, Er 91% e Br 100%), mesmo em baixas concentrações de auxinas (inferior a 0,01mg/L).

Nas variedades, esporadicamente surgiram estruturas que, embora apresentassem morfologia semelhante a estados iniciais de embriogênese, acabavam por abortar sem evoluírem para estádios mais avançados de desenvolvimento morfogénico.

As folhas de lúpulo revelaram-se um material muito frágil, que uma vez retirado do tubo de ensaio, para ser manipulado antes da transformação, desidrata rapidamente, levando à morte celular que condiciona, ou até mesmo compromete, a capacidade organogénica da planta.

Por estes motivos foram abandonadas as folhas, como material de partida para a indução de organogênese, tendo sido seleccionados os pecíolos e os entrenós.

2.3.2. Organogênese em pecíolos e entrenós

Após uma semana em cultura, os explantes de todas as plantas testadas (var. e clone) apresentaram-se intumescidos, aumentando o volume, fundamentalmente, nas zonas de corte onde, por vezes, se apresentaram acastanhados ou amarelados. Estes explantes do Clone Br começaram a formar estruturas globulares com cor verde após 21-22 dias de cultura. O seu desenvolvimento levou ao aparecimento de plântulas ao fim de 25 a 28 dias após o início da cultura (Fig. 2.2. b). Em simultâneo, na zona mediana do explante, surgiram células indiferenciadas que formaram *calli* translúcidos e que, por vezes, evoluíram rapidamente até ao aparecimento de estruturas globulares, mantendo-se estacionárias e com tendência para se tornarem acastanhadas (Fig. 2.2. g). Quando os *calli* apresentam este aspecto necrótico, acabam por se desagregar e morrer sem se desenvolverem mais. Em alguns explantes surgem *calli* verdes bastante compactos, contrastando com a grande friabilidade dos *calli* brancos. Em geral, estes *calli* verdes compactos originaram massas globulares semelhantes às já descritas que, de igual forma, originaram plântulas ao fim de 4 semanas (Fig. 2.2. e, i, j, m).



A regeneração ocorreu em meio base, sem necessidade de transferência para outro meio, durante todo o processo de regeneração. Desde o início da formação dos primeiros rebentos, até à formação de plântulas, decorreram duas a três semanas. Ocasionalmente, surgiram estruturas densas amareladas que, embora se desenvolvam atingindo alguns milímetros, nunca formam rebentos, acabando por se desagregar e morrer por necrose (Fig. 2.2. c e Fig. 2.2. d). Alterando a composição dos meios (meio sem fitorreguladores, ou com uma razão auxina/citocinina inferior) foi testada a indução da capacidade de regeneração destas estruturas. Os resultados destes ensaios foram negativos, visto que, as estruturas acabaram por apresentar necrose generalizada, sem dar origem a plântulas.

Nos meios MS 1/2 e MS 1/4 não houve formação de meristemas, surgindo apenas *calli* muito friáveis. No meio base SH, os explantes do clone de Br formaram algumas estruturas globulares que se mostraram inviáveis, acabando por apresentar clorose e morrendo após 3 semanas. Na variedade Er, os explantes inoculados em meio SH, formaram algumas estruturas globulares viáveis, que originaram plântulas (Fig. 2.2. a), ao contrário dos meios MS testados nesta variedade (Fig. 2.2. q), onde a regeneração foi reduzida (Tabela 2.2.). O meio Adams não apresentou qualquer vantagem em relação aos meios MS testados, visto que, os meristemas formados acabaram por morrer. Foi no meio base MS que surgiram a maior quantidade de rebentos viáveis (na variedade BG e no Clone Br), variando a percentagem de rebentos obtida, com as diferentes concentrações hormonais testadas (Tabela 2.2.). Nas experiências por nós realizadas verificou-se que, apesar de haver várias estruturas inviáveis com forma globular, somente na presença de estruturas globulares ocorre a regeneração.

Nos meios, MS, Adams e SH suplementados com IBA, NAA, ou 2,4D (Anexo I), formaram-se raízes na superfície do explante (Fig. 2.2. n). Em todos os meios testados só houve regeneração quando se utilizou IAA como suplemento auxínico. A frequência de regeneração variou de acordo com as diferentes concentrações de IAA testadas nos meios (Tabela 2.2.). Se o material for mantido nos mesmos meios com IBA, NAA ou 2,4 D, ocorre a formação de raízes em toda a superfície do explante, estas apresentam-se cobertas de pêlos radiculares.

Nos meios MS e SH, contendo 2iP e BAP, verificou-se a formação de *calli*, mas não houve formação de meristemas viáveis (Fig. 2.2. f). Nos meios contendo Cinetina (Cin) ou Zeatina (Zea), a regeneração ocorreu, ocasionalmente com valores elevados (37%) no meio com Cin (meio I7) (Tabela 2.2.), sendo no entanto, em termos gerais superior no caso dos meios suplementados com Zea (meios I8; meio I5; meio I2 e meio



l1). Exceção feita ao meio l4, em que a taxa de regeneração foi baixa (1,5%) (Fig. 2.2. o) (Tabela 2.2.)

As plântulas regeneradas, quando transferidas para meio de micropropagação, apresentam desenvolvimento e enraizamento normal (Fig. 2.2. h)

A capacidade regenerativa mantém-se, tanto nos pecíolos como nos entrenós, por períodos relativamente longos (35 a 45 dias), sendo possível remover as plântulas regeneradas e manter a capacidade regenerativa dos explantes, durante mais 30 a 45 dias, dependendo dos meios de cultura utilizados. Esta capacidade regenerativa não é sazonal, mas varia com o tempo de subcultura do explante. Plantas com cerca de 2 meses de subcultura, têm uma capacidade regenerativa mais elevada, comparativamente com plantas mais jovens, ou com 3 meses. Plantas com idades de subcultura superiores a 3 meses morrem por deficiência nutricional ou por desidratação do meio.

Nos meios testados, o comportamento dos dois tipos de explante (pecíolos e entrenós) é idêntico. Porém no caso dos pecíolos, a morte por necrose foi superior, por ser um material mais frágil, danificando-se mais facilmente na manipulação. O número final de plântulas obtidas por pecíolo é ligeiramente inferior ao obtido utilizando entrenós como explante.

A capacidade organogénica quer nos pecíolos, quer nos entrenós da var. BG foi inferior à demonstrada pelo Clone Br. Só foi possível obter regeneração da var. BG em meios base MS, com suplementação hormonal de IAA e Zea (Fig. 2.2. l) (Tabela 2.2.).

Tabela 2.2.: Meios com melhor resposta à indução de meristemas, Concentração (mg/L).

Meio de Indução	Meio base	Zeatina (mg/L)	IAA (mg/L)	Cinetina (mg/L)	% Regeneração (Bragança-Br)	% Regeneração (Eroica-Er)	% Regeneração (Brewers Gold-BG)
l1	MS	2,5	0.025		30	5,4	3,2
l2	MS	3	0.025		28	3	10,5
l3	MS		0.02	1.5	60	2,3	5,8
l4	MS	5	0.025		1,5	1,4	1,8
l5	MS	2	0.01		21	13	5,5
l6	MS		0.01	2	2,4	2	1,7
l7	MS		0.025	3	37	5,1	4
l8	MS	1,5	0.025		40	3,2	6,3
l6.1	SH	1,5	0.025		1,6	30	3,7
l7.1	SH		0.03	1.5	1,9	18	2,7

As plantas regeneradas desenvolveram-se normalmente, apresentando um sistema radicular funcional o que permitiu a aclimação e a sua passagem para terra com sucesso (Fig. 2.3. c, d, e, f). Assim, para a variedade BG o melhor meio foi o meio



MS suplementado com 3 mg/L Zea e 0,025 mg/L de IAA, enquanto que, para a variedade Er o meio testado, com taxa de regeneração mais elevada, foi o meio SH suplementado com 1,5 mg/L Zea e 0,025 mg/L IAA. Para o Clone Br, o meio seleccionado para os ensaios posteriores de regeneração, foi o meio MS com 15 g/L de sacarose e 1,5 mg/L de Cinetina e 0,02 mg/L de IAA.

2.3.3. Diferentes condições de stresse

A aplicação dos diferentes tipos de stresses descritos na Tabela 2.1., não resultou, de uma forma geral, em alterações significativas da taxa de regeneração (Tabela 2.3.). Nesta tabela apresenta-se a variação na taxa de regeneração (os valores apresentados são a diferença entre a taxa de regeneração inicial e a taxa de regeneração final, após aplicação das condições de stresse aos explantes), nos diferentes meios de indução e, diferentes condições de stresse aplicadas aos explantes.

Com base nesta tabela verifica-se que, os meios utilizados (Br: Meio I3; Er: Meios I5 e I6.1; BG: Meios I2 e I6.1) para a indução de stresse têm valores iniciais de regeneração muito variáveis (entre 3,7% e 60%). É no entanto claro que, no processo de indução, essa variação não se mantém, ou seja os meios em que há aumento da regeneração, esse aumento é independente do valor inicial de regeneração ser alto, ou baixo (Tabela 2.3.).

Tabela 2.3.: Resultados da indução, para os vários tipos de stresse aplicados, nos meios seleccionados. Os dados foram testados com o programa ACTUS. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$; (-) não testado; (morte) o material morreu não se obtendo dados; (MS) meio MS; (SH) meio SH

Tipo de stresse		Controlo	Temperatura	Ácido acetilsalicílico	Nutricional	AgNO ₃	CuSO ₄	pH
Variedades	Meio base	Regeneração inicial (%)	mês/planta (%)	0,69 mg /L (%)	5 g/L (%)	1mg/L (%)	0,1mg/L (%)	(%)
Brewers Gold	MS (I2)	10,5	1	6,5	4,39	8,3	27,8*	0,4
	SH(I6.1)	3,7	0	2,8	-	4*	-	0
Eróica	MS (I5)	13	Morte	0	-	4,2	Morte	0
	SH(I6.1)	30	3,4	0	0	7,8**	0	0,2
Bragança	MS (I3)	60	2	2,1	1,8	3,2	3	0
	SH	-	-	-	-	-	-	-

A regeneração aumentou significativamente, em algumas das condições de stresse (Tabela 2.3.). No entanto, na maioria dos casos, o stresse foi demasiado agressivo para a sobrevivência do explante (comprometendo a possível resposta após



subcultura para meio fresco), ou o efeito foi pouco efectivo na regeneração, não se verificando um aumento significativo da mesma.

I) Baixa temperatura

Após aplicação de baixas temperaturas, a variedade BG mantida em meio MS forma *callus* pouco desenvolvidos, densos e de cor verde. Nestes formam-se agregados muito densos que evoluem e, originam novos meristemas, embora o aumento da percentagem de regeneração tenha sido reduzida (1%). Nos meios base SH, os *calli* apresentaram-se muito friáveis com coloração branca e pouco desenvolvidos. Apesar de os meios utilizados diferirem nas concentrações e suplementações de fitorreguladores, os resultados nestes diferentes meios não são muito evidentes numa fase inicial, após o que (nas subseqüentes subculturas em meio fresco), se observam algumas diferenças que se prendem mais com o número de meristemas por explante do que com diferenças na quantidade de explantes com regeneração. Assim, no meio com maior razão citocinina/auxina (meio I7.1, Tabela 2.1.) os resultados são mais evidentes (3,4%; Tabela 2.3.) comparativamente com o meio sem stresse, ou com o meio I6.1 (0,1%, valor não apresentado na Tabela 2.3.), em que essa relação é mais reduzida (Tabela 2.1.).

Na variedade Er, nos meios base MS o stresse pelo frio, provocou clorose acentuada ao longo do tratamento, acabando por provocar a morte dos explantes aquando da sua passagem para meio fresco. Pelo contrário, em meio base SH ocorreu crescimento, originando na subcultura seguinte um aumento da frequência de regeneração de 3,4%, embora esse aumento não fosse estatisticamente significativo. O crescimento ocorreu nas zonas mais medianas do explante (zona central), formando áreas densas e verdes, contrastando com a zona mais periférica do explante que desenvolveu *calli* muito friável e branco (Fig.2.2. p, q). Em alguns explantes, a zona de crescimento periférica pode atingir 1 a 2 cm de diâmetro, acabando por envolver todo o explante. Este, no entanto, apresenta vitrificação.

Para o Clone Br, o stresse térmico só foi aplicado às culturas em meio base MS visto que, no meio base SH não se verificou indução de organogênese superior a 2-3%. Os resultados obtidos sugerem que o stresse térmico aumenta a taxa de organogênese em 2%, não tendo esta diferença significado estatístico (Tabela 2.3.)

II) Nutricional (deficiência em açúcares)

O stresse nutricional, aplicado às culturas da variedade BG, em meios com 5 g/L de sacarose, induziu o aumento do número de explantes, que formaram rebentos, em cerca de 2,4% (Tabela 2.3.). No entanto, os explantes colocados em meio contendo



apenas água e agar, originaram *calli* brancos vitrificados, bem desenvolvidos, sem raízes e mantendo verde a zona mediana do explante.

Na presença de 5 g/L de sacarose, os explantes da variedade Er apresentam zonas verdes e zonas vitrificadas, crescimento rápido, sem formação de meristemas. Ocasionalmente, surgem algumas raízes. Nos meios só com água e agar desenvolvem-se raízes, na superfície de *calli* muito friáveis de coloração branca.

No meio MS com 5 g/L de sacarose, o Clone Br apresenta um reduzido acréscimo da capacidade organogénica, uma vez que a taxa de formação de zonas densas capazes de originar meristemas foi de 1,8% (Tabela 2.3.). No meio desprovido de sacarose, apenas se formaram *calli* vitrificados, friáveis e não clorofilinos, tal como acontece na variedade BG para a regeneração nas mesmas condições de suplementação de sacarose.

Em nenhum dos ensaios realizados para as variedades Er e BG e para o clone Br as diferenças nos resultados foram estatisticamente significativas.

III) Redução do pH

Os resultados de pH expressos na Tabela 2.3. referem-se ao valor mais elevado de pH, ou seja, no caso do meio MS – 5,6 e no caso do meio SH – 4,9. Visto que, para os valores mais baixos, o meio de cultura ficou excessivamente líquido para poder suportar o explante, levando a condições de anóxia que, se traduziram na morte dos explantes.

A redução do pH do meio, para valores inferiores ao estipulado para os dois meios base testados (SH – pH 4,9; MS – pH 5,6), não alterou significativamente a taxa de regeneração. Aumentando, no entanto, a taxa de oxidação e morte do material vegetal. Assim os resultados para BG, Er e Br não sofreram alteração, mantendo-se a taxa de regeneração, previamente obtida, nos meios originais (sem alteração do pH - Tabela 2.3.) utilizados para as diferentes plantas.

IV) Adição de Ácido Acetilsalicílico

Para a variedade BG, a adição de ácido acetilsalicílico, nos meios MS resultou na formação de *calli* muito desenvolvidos, com a zona central muito clorofilina, formação de estruturas globulares, mas com formação de zonas com diferentes texturas ao longo de todo o explante. Na zona mediana do explante, mais densa, surgem agregados que acabam por evoluir formando rebentos. Embora a taxa de regeneração atingida com a adição de ácido acetilsalicílico ao meio, seja superior à atingida sem essa adição, a diferença (Tabela 2.3.), não ultrapassa 1%, não sendo estatisticamente significativa. Nos



meios com água e agar, há formação de *calli* vitrificados, brancos muito friáveis, não ocorrendo organogénese.

Na variedade Er, os explantes apresentam formação de raízes nos meios MS e SH com adição de ácido acetilsalicílico (13,2% dos explantes), não havendo formação de estruturas globulares capazes de originar meristemas. Surgem algumas zonas com *calli* incipientes que acabam por fenolisar e morrer. Nos meios só com água e agar formam-se raízes em 70,8% dos explantes, não ocorrendo formação nem de *calli*, nem de qualquer outra estrutura.

Nos meios com adição de ácido acetilsalicílico, testados para os explantes do Clone Br, verificou-se um aumento da taxa de regeneração em cerca de 2,1% (valor não estatisticamente significativo) (Tabela 2.3.). Os explantes apresentaram na zona de corte formação de *calli* não clorofilinos, com aspecto friável, embora não se desagreguem facilmente. Estes *calli* não formam meristemas, aparecendo os meristemas em zonas medianas e clorofilinas do explante. Nos meios de água e agar verificou-se a formação de *calli* friáveis e vitrificados que não evoluíram no sentido organogénico, antes oxidaram e morreram.

V) Adição de AgNO_3

A adição de AgNO_3 aos meios MS induziu, de um modo geral, um aumento da resposta organogénica (Tabela 2.3.). O aumento da resposta organogénica varia entre os 8,3% (diferença estatisticamente significativa, $P < 0,05$) obtida nos explantes da variedade BG, 4,2% (diferença estatisticamente significativa, $P < 0,05$) dos explantes da variedade Er e 3,2% (diferença estatisticamente não significativa, $P > 0,05$) dos explantes do Clone Br (Tabela 2.3.). Os explantes da variedade BG apresentam zonas intensamente verdes, rodeadas de *calli*, de onde surgem várias zonas com agregados densos que originam novos meristemas. Nos meios com água e agar, há formação de *calli* vitrificados, brancos e de fácil desagregação, não se observando organogénese.

Os explantes da variedade Er, cultivados em meio SH formaram *calli* muito compactos e clorofilinos, originando meristemas na zona mais afastada (oposta) do contacto com o meio de cultura. A variação da percentagem de organogénese é de 7,8% (diferença estatisticamente muito significativa, $P < 0,001$), sendo superior à obtida em meios de cultura sem suplementação de AgNO_3 (Tabela 2.3.). Nos meios contendo apenas água e agar formam-se raízes, não se formando nem *calli* nem qualquer outra estrutura organogénica.

Os resultados obtidos para o Clone Br, em meio MS, revelam um ligeiro aumento da percentagem de zonas densas, com capacidade de formação de meristemas,



apresentando valores de taxa de regeneração superiores aos meios sem o AgNO_3 , em cerca de 3,2% (diferença estatisticamente não significativa - Tabela 2.3.). A cor dos agregados variou entre o verde intenso e o verde amarelado, com alguma oxidação nas zonas não diferenciadas. Os meristemas surgiram na zona mais interna (zona central) do explante. Nos meios de água e agar houve formação de *calli*, friáveis e vitrificados, sem capacidade organogênica, que oxidaram e morreram.

VI) Adição de CuSO_4

Os ensaios levados a cabo, com a adição aos meios de cultura de CuSO_4 (Sulfato de Cobre) revelam a ocorrência de morte dos explantes, quer em concentrações mais elevadas de 555 mg/L (em que a taxa de mortalidade atingiu os 100%), de 55 mg/L (em que a taxa de mortalidade atingiu os 40%), quer nas mais baixas (10 mg/L com 25,1% de taxa de mortalidade). Apenas nas concentrações de 0,1 mg/L não ocorreu morte generalizada do material. Com esta concentração de CuSO_4 (0,1 mg/L), formaram-se *calli* de cor branca, com crescimento acentuado, na variedade BG. Para a variedade Er, a percentagem de morte manteve-se elevada (40% de taxa de mortalidade), não originando meristemas, mas sim *calli* brancos que acabaram por oxidar e morrer. Na variedade BG, os *calli* desenvolveram-se originando agregados capazes de formar novos meristemas numa percentagem de 27,8% superior ao atingido nos meios sem adição de Sulfato de Cobre (valor estatisticamente significativo – Tabela 2.3.). Nos explantes do Clone Br a percentagem de regeneração foi inferior à da variedade BG (Tabela 2.3.), não ultrapassando os 3% (valor não significativo estatisticamente) acima do valor atingido nos meios controlo. Nos explantes do Clone Br que não originaram meristemas, houve grande proliferação de *calli* brancos, pouco densos que, após duas subculturas em meio fresco, oxidaram e morreram.





Figura 2.2.- Regeneração dos explantes nos diferentes meios testados **a)** Meristema da var. Er formado a partir de entrenó, em meio SH. **b)** Aspecto geral de vários explantes de clone Br com formação de meristemas (setas), em meio MS. **c)** e **d)** Pormenores de estruturas embrionárias anômalas, que surgem junto com os agregados verdes que dão origem aos meristemas. **e)** Meristemas emergindo dos agregados numa estrutura desenvolvida de *calli* brancos (meio MS/2). **f)** e **g)** *calli* brancos com estruturas globulares. **h)** Frasco com plantas regeneradas do clone Br. **i)** Meristemas desenvolvidos na superfície de *calli* brancos com 1 mês, var. BG. **m)** Meristemas emergindo de um conjunto de agregados e estruturas brancas (setas). **n)** Pecíolo onde surgem somente raízes. **o)** *calli* de clone Br oxidados que não originam meristemas (meio I4). **p)** *calli* de var. Er brancos com zonas centrais verdes que não chegam a formar meristemas (meio I6). **q)** *calli* de var. Er oxidado e branco onde não surgem meristemas (meio I3).

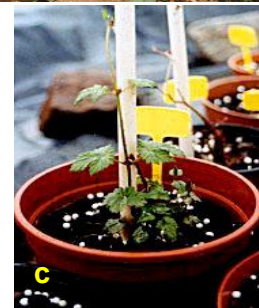




Figura 2.3 – **a)** Aspecto geral da plantação experimental de lúpulo, efectuada com plantas resultantes de micropropagação. Variedade Eróica (linha esquerda), Variedade Nugget (linha central, var. comercial feminina usada na determinação molecular do sexo, Cap. IV) e clone Bragança. (linha direita) **b)** Pormenor de uma planta da Variedade Eroica



Figura 2.3 – **c)** Pormenor de uma planta de var. Eróica em vaso nas estufas da Escola Superior Agrária de Bragança. **d)** Aspecto geral dos vasos, na estufa, com as plantas resultantes de regeneração. **e)** e **f)** Pormenor de uma planta obtida por regeneração do clone Bragança.





2.4. DISCUSSÃO

2.4.1. Organogénesse em folhas

Os resultados da indução de organogénesse nas folhas demonstraram que, nos diferentes ensaios e meios, o balanço endógeno de auxinas/citocininas é promotor de rizogénesse espontânea. Tal resultado sugere que o lúpulo possui uma concentração elevada de auxinas nas folhas plenamente expandidas (únicas folhas testadas). Embora não tenham sido testados, os meristemas apicais terão, provavelmente, um balanço auxina/citocinina superior à unidade que permite um crescimento e desenvolvimento da parte aérea vegetativa da planta muito rápidos. Este crescimento e desenvolvimento apresentam características que apontam para balanços auxina/citocinina favoráveis às auxinas, tais como: uma forte dominância apical, diferenciação vascular e aparecimento frequente de raízes adventícias. Este crescimento será essencial para o desenvolvimento da planta, quando colocada no campo, visto que em cerca de 6 meses pode atingir os 9 metros de altura. Esta velocidade de desenvolvimento deverá estar associada a um processo fisiológico que passa por um balanço eficiente de fitorreguladores, associado a um bom transporte.

O papel das auxinas será eventualmente preponderante, visto que, são fitorreguladores facilmente transportados desde os seus locais de síntese (ápices caulinar e raízes) por via floémica e célula a célula (Salisbury & Ross, 1992). Ao serem transportadas para as folhas, zona não meristemática da planta, manteriam aí um balanço auxina/citocinina capaz de promover a rizogénesse, quando colocadas em cultura *in vitro*. Isto porque, ao utilizarmos folhas plenamente expandidas, usaram-se folhas mais velhas, com valores de concentração de citocininas provavelmente mais baixos. As citocininas na parte aérea da planta são produzidas, maioritariamente nos meristemas (Azcón-Bieto & Talón 2000), embora transportáveis pelo floema e pelo xilema (dependendo do local de síntese), ainda persistem dúvidas sobre a efectividade do transporte vascular atendendo à imobilidade das citocininas (conversão de citocininas em formas mais polares que ficam retidas no interior das células) (Azcón-Bieto & Talón 2000). Visto que as plantas donde foram retirados os explantes, nestes ensaios, eram plantas *in vitro* com um sistema radicular incipiente, comparativamente com a parte aérea da planta, a concentração endógena de citocininas destas folhas poderia ser baixo. Estes valores mais baixos poderão ser consequência por um lado, de se tratar de um tecido não meristemático e, por outro, de uma maior concentração de auxinas diminuir a concentração de citocininas activas (Azcón-Bieto & Talón 2000). Outra possível



explicação para a rizogênese nas folhas de lúpulo será a de poder existir uma maior actividade da enzima citocinina oxidase, que degradaria as citocininas isoprenoídicas, regulando as citocininas, na folha, para níveis endógenos mais baixos.

2.4.2. Organogênese em pecíolos e entrenós

Apesar de existirem referências sobre organogênese em lúpulo (Rakousky & Matousek, 1994; Gurriaran *et al.*, 1999) ela foi conseguida em variedades diferentes das utilizadas neste estudo. Os meios de regeneração utilizados nesses trabalhos, com resultados positivos, demonstraram não serem os ideais para as variedades e clone utilizadas neste trabalho, sugerindo uma grande influência do genótipo na resposta organogénica. No caso da variedade BG, nos meios testados, as taxas de regeneração obtidas são reduzidas (Tabela 2.2. dos resultados), tal como referenciado para os meios utilizados por Batista e colaboradores em 1996.

De um modo geral, para a obtenção de novos rebentos em *H. lupulus* L. (tanto nas variedades BG e Er, como no Clone Br) verificou-se que a concentração de auxina adicionada ao meio terá de ser muito reduzida comparativamente com a concentração de citocinina. Embora, para regeneração de meristemas a razão auxina/citocinina seja, em regra, baixa (Skoog & Miller, 1957), no lúpulo, a auxina endógena deverá ser bastante elevada, ou a sensibilidade desta planta às auxinas é elevada, visto que, para que haja indução de meristemas, a razão auxinas/citocininas no meio tem de ser bastante baixa, na ordem 1:100 (auxinas/citocininas). O mesmo acontece com outras espécies como *Dubotsta myoporoides* (Khanam *et al.*, 2000) e *Arabidopsis sp.* (Frank *et al.*, 2000), em que, não só a concentração, mas também a sensibilidade aos fitorreguladores varia. As duas variedades e o clone estudados não respondem igualmente aos diferentes tipos e concentrações de fitorreguladores, o que está de acordo com resultados descritos para outras plantas como o crisântemo (Annadava *et al.*, 2000), o *Amaranthus sp.* (Bennici *et al.*, 1997) ou a lavanda (Dronne *et al.*, 1998) em que as respostas são também dependentes do genótipo.

Por outro lado, são evidentes variações na indução de meristemas entre as diferentes variedades, não só em termos de concentração relativa de fitorreguladores, mas também em termos de componentes do meio base. Na variedade Er, ao contrário da variedade BG e do Clone Br, o meio SH foi mais eficiente levando a taxas de regeneração elevadas, comparativamente com as taxas de regeneração obtidas com o meio MS. O meio MS foi aquele em que se obtiveram melhores taxas de regeneração (Tabela 2.2.) para a variedade BG e para o Clone Br.



Considerando a composição em minerais dos dois meios base, verifica-se que a grande diferença entre eles reside na fonte de azoto e na quantidade de cálcio disponível. Com base nesta diferença, podemos sugerir que a regeneração da variedade Er requer uma fonte de azoto na forma de nitratos em detrimento da amoniacal, assim como uma maior disponibilidade de cálcio no meio. A disponibilidade e a necessidade de nutrientes ao longo do período de regeneração varia tanto de acordo com as espécies e variedades, como com o tipo de células que constituem os explantes (Ramage & William, 2003). Estudos em tabaco revelaram que em culturas de *calli* organogénicos a utilização de azoto é elevada comparativamente com a utilização do mesmo em culturas de *calli* não organogénicos (Hardy & Thorpe, 1990). Embora o cálcio seja um elemento essencial (com várias funções, nomeadamente a de mensageiro secundário) com papel importante na translocação dos fitorreguladores e tenha, por isso, também um papel fundamental na regeneração, a sua utilização a partir do meio base, só se dá numa fase ulterior do processo de regeneração. Segundo alguns autores, inicialmente, a fonte de cálcio é de origem endógena e, só mais tarde será utilizado o Ca^{2+} do meio de cultura (Ramage & William 2003). Podemos sugerir que a variedade Er necessita de maior quantidade de cálcio no meio, visto que apresenta melhores taxas de organogénese no meio mais rico em cálcio. Esta necessidade poderá, eventualmente, estar relacionada com um esgotamento precoce do cálcio endógeno, o que teria de ser determinado com análises dos conteúdos em cálcio dos explantes ao longo do tempo de cultura.

Embora a capacidade regenerativa de entrenós e pecíolos seja semelhante, o número de meristemas obtidos a partir de entrenós, ao fim de 1 mês, é superior ao de pecíolos, o que pode estar relacionado com a própria estrutura dos entrenós, visto que, noutras plantas como em *Chrysanthemum* sp. (Annadava *et al.*, 2000), e em *Onobrychis viciifolia* Scop. (Özgen *et al.*, 1998), também se verifica que, ao fim de um mês, os entrenós apresentam uma taxa de regeneração superior aos pecíolos.

Nos meios testados, em simultâneo com os meristemas adventícios, surgiram estruturas semelhantes a embriões somáticos (Fig. 2.3.). Apesar destas estruturas terem sido transferidas para meios diferentes dos da indução de meristemas, e de terem sido testados vários meios para o seu desenvolvimento, nunca foi possível o seu correcto desenvolvimento. A indução de um dos processos de morfogénese (organogénese) implica, de algum modo, a inibição do outro (embriogénese), como foi referido para *Cercis canadensis* (Geneve & Kester, 1990)

A regeneração *in vitro* de meristemas de lúpulo parece ter origem em massas nodulares como foi previamente descrito (Batista *et al.*, 1996) e também para diferentes variedades checas de lúpulo (Smykalová *et al.*, 2001), para *Acácia manginum* (Xie &



Hong, 2001) e, para *Garcinia mangostana* L. (Te-chato & Liu, 1999). No que se refere a *H. lupulus* pode dizer-se que houve uma grande variabilidade de respostas à indução de morfogénese, nas variedades e clone testados, de acordo com a composição dos meios de cultura e com as suplementações de fitorreguladores.

2.5.3. Diferentes condições de stresse

I) Baixa temperatura

Tal como muitas outras plantas de climas temperados, as plantas de lúpulo estão expostas a um período de frio intenso, antes da entrada em dia longo e a temperatura se tornar mais amena, ou seja antes de, na Primavera, iniciar o processo de desenvolvimento dos meristemas latentes que permaneceram no rizoma desde a morte da parte aérea.

Na presença de temperaturas baixas (4 a 0°C) ocorrem nas plantas várias adaptações fisiológicas que permitem controlar o stresse provocado pelas baixas temperaturas. Estas adaptações podem traduzir-se numa alteração na expressão dos genes, alterando diversos mecanismos do metabolismo, como sejam o do carbono e o do azoto (Guy, 1990). A acumulação de açúcares no citoplasma e, a produção de novas proteínas durante o stresse pelo frio, poderá permitir a adaptação ao mesmo (Hausman *et al.*, 2000). Por outro lado, a temperatura pode ter como efeito associado, a alteração do pH do citoplasma, ao inibir os transportadores membranares de protões, podendo alterar toda a actividade enzimática, nomeadamente o transporte polar de auxinas. Estes efeitos causados pelo frio, no entanto, variam com as espécies e as variedades (de acordo com a sua tolerância a temperaturas baixas). Nas plantas tolerantes a baixas temperaturas, a variação no pH é manifestamente reduzida. Neste caso considera-se que a adaptação ao frio passa por duas etapas: na primeira, atingem-se temperaturas baixas, mas acima de zero graus (2 a 4°C); na segunda fase, a indução é feita com temperaturas abaixo dos zero graus (-3 a -5°C). Estas duas etapas são essenciais para uma tolerância máxima, uma vez que se tem vindo a considerar que as alterações de pH citoplasmático da primeira fase funcionarão como mensageiro secundário para a expressão de genes essenciais à segunda fase (Yoshida *et al.*, 1999). De entre estes genes essenciais à segunda fase encontram-se genes que estão relacionados com o metabolismo dos açúcares e do azoto, e responsáveis de alguma maneira pela resposta organogénica das plantas pós-tratamento pelo frio. Verifica-se, no entanto, que as respostas ao tratamento de frio, das plantas de lúpulo *in vitro*, não foram de molde a aumentar significativamente a regeneração de novos meristemas.



Embora o lúpulo seja uma planta que tenha, necessariamente, que passar por uma fase de frio (Inverno), para quebrar a dormência e desenvolver a sua parte aérea na Primavera, o processo de indução de organogênese pelo frio não funcionou exactamente do mesmo modo *in vitro* e *ex-vitro*, como aliás, já foi descrito para outras espécies de plantas (Hausman *et al.*, 2000). Para o Clone Br houve, no entanto, um aumento da taxa de regeneração, embora reduzida. Este resultado indicia que a planta poderá ser sensível à indução de regeneração pelo frio. A metodologia utilizada poderá não ter sido a mais adequada, devendo ser alterada para tempos de indução mais curtos (uma a duas semanas) e com abaixamento de temperatura sucessivo, visto que, a aquisição de resistência depende de um arrefecimento progressivo com gradual desidratação das células (Taiz & Zeiger, 1998), e o processo utilizado nestes ensaios foi brusco e prolongado. O efeito da exposição súbita ao frio prolongado, antes de uma completa aclimação, poderá ter condicionado a viabilidade celular, levando a danos irreversíveis nas células e, à sua ulterior morte (Salisbury & Ross, 1992).

II) Nutricional (deficiência em açúcares)

Nos ensaios com reduzida suplementação de açúcares nos meios, verificou-se um pequeno aumento da taxa de regeneração. Dado que existem outros registos de aumento da taxa de regeneração em lúpulo, utilizando concentrações de 15 g/L de sacarose (Smýkalová *et al.*, 2001) este valor foi usado como referencial no nosso ensaio. Assim, foram testadas concentrações mais baixas de açúcares, que podemos considerar como sub-óptimas para o crescimento vegetativo do lúpulo. Esta estratégia prende-se com o facto de em meio de multiplicação em cultura, o lúpulo (pelo menos as variedades e clone utilizados neste estudo) regenerar mais meristemas no período entre as 4 semanas e as 6 – 7 semanas (é necessário proceder à transferência para meio fresco após 8 semanas de cultura), do que antes desse período, o que indicou que a diminuição da disponibilidade de açúcares aumenta a capacidade regenerativa do lúpulo. A aplicação de um stresse produzido por insuficiência de fonte de carbono poderia ser indutora de uma maior capacidade morfogénica. Embora a taxa de regeneração tenha aumentado para a var. BG e clone Br, o mesmo não se verificou para a var. Er. Esta variação na resposta, em função da variedade, foi já descrita, tanto para outras plantas, como *Morus indica* e *Morus alba* (Sahoo *et al.*, 1997, Bhau & Wakhlu, 2001), como para o lúpulo (Smýkalová *et al.*, 2001).

A importância dos açúcares como fonte de carbono é indiscutível, nomeadamente se considerarmos que os explantes colocados *in vitro* não são fotoautotróficos. Os açúcares têm papel preponderante na obtenção de energia indispensável ao



metabolismo, mas também na regulação e armazenamento de vários compostos na forma glicosilada. De entre estes compostos podemos destacar os fitorreguladores, como é o caso das citocininas e as auxinas, em que o armazenamento das primeiras e o transporte das segundas implica a utilização de resíduos de açúcares (Lea & Leegood, 1999).

Podemos considerar que, as respostas aos stresses se processam em 4 fases: fase de alerta, fase de resistência, fase de esgotamento e fase de regeneração (Azcón-Bieto & Talón 2001). A primeira fase será aquela em que há o alerta para que se desencadeiem as respostas ao stresse, que levam à fase de resistência (onde as respostas são executadas), se a planta não tem mecanismos de resistência, ou o stresse é demasiado intenso, ou ainda demasiado longo, pode surgir a fase de esgotamento que, levada até às últimas consequências, resultará na morte da planta. Por último, na fase de regeneração em que, se a planta conseguiu resistir e ultrapassar o stresse, haverá a alteração de todo o metabolismo, com expressão de enzimas que permitem a adaptação às novas condições (Azcón-Bieto & Talón, 2001). Com base nesta estrutura de resposta aos stresses, podemos considerar que nos nossos ensaios com baixa concentração de açúcares, o stresse foi demasiado longo, ou demasiado intenso e grande parte das plantas de lúpulo testadas, não conseguiu ultrapassar a fase de esgotamento, acabando por morrer.

III) Adição de Ácido Acetilsalicílico

O ácido Salicílico está descrito como um fitorregulador com diversos efeitos, dos quais, os mais conhecidos e bem estudados, são os de regulação da floração, termogenesis e resistência a doenças (Shulaev *et al.*, 1995; Greenberg *et al.*, 2000), nomeadamente na “resistência sistémica adquirida” (*systemic acquired resistance* - SAS) (Raskin I, 1992; Shulaev *et al.*, 1995) e na interacção com outros sistemas de resistência das plantas (Wees *et al.*, 2000). No entanto, em concentrações adequadas e na forma de salicilatos, pode actuar como factor alostérico de diversas enzimas controlando, por exemplo, a conversão do ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC) em etileno (Romani *et al.*, 1989). Segundo Saxena & Rashid (1980) a utilização de ácido Acetilsalicílico no meio, dependendo das espécies em cultura e das concentrações utilizadas, podem promover um claro aumento das taxas de regeneração e de embriogénese (Quiroz-Figuero *et al.*, 2001), embora, certas concentrações possam ser inibitórias da regeneração, pelo menos numa fase avançada do processo (Christianson & Duffy, 2002). Em *H. lupulus* a adição de ácido Acetilsalicílico ao meio de indução de



morfogénese aumenta a capacidade organogénica. Este aumento, tendo em conta os resultados descritos por outros autores (Hutchinson & Saxena, 1996), está dentro dos padrões esperados para a utilização de concentrações de ácido Acetilsalicílico na ordem dos μM . O aumento das taxas de organogénese é no entanto, para algumas plantas, tanto maior quanto mais próxima dos picomoles se encontrar a concentração de ácido Acetilsalicílico no meio. Assim, os valores de taxas de regeneração obtidos para o lúpulo (nomeadamente para o Clone Br e a var. BG), poderiam sofrer ainda alterações, se as plantas de lúpulo fossem testadas no meio de indução da organogénese, com concentrações de ácido Acetilsalicílico mais baixas. A actuação do ácido Salicílico estará relacionada, por um lado, com a inibição da produção de etileno (Romani *et al.*, 1989) e, por outro, com a alteração nas enzimas produzidas (Minibayeva *et al.*, 2003) em situação de stresse. Assim sabe-se que o ácido Salicílico inibe a actividade da catalase e da peroxidase, o que poderá levar a uma reorganização de todo o processo de desenvolvimento e crescimento das plantas sob stresses (Pasternak *et al.*, 2005). Visto que o ácido Salicílico é um sinalizador intermediário envolvido nas respostas das plantas a alguns stresses e todo o processo de manipulação (corte e transferência dos explantes para o meio de indução), pode ser indutor de stresse, com alterações a nível metabólico, a presença de ácido Acetilsalicílico no meio, pode permitir o controlo de algumas das respostas a este stresse, nomeadamente a produção de etileno, ou alterações no transporte polar das auxinas. Este transporte das auxinas depende directamente do pH, que em situações de stresse é alterado, podendo levar à alteração do transporte deste fitorreguladores (Pasternak *et al.*, 2005) observando-se uma reorientação no crescimento das plantas. Esta reorientação associada a situações de stresse, pode de um modo geral traduzir-se na aceleração da formação de raízes laterais, aceleração da germinação ou incremento na razão meristemas adventícios/raiz (Pasternak *et al.*, 2005).

Embora a utilização de compostos como ácido Acetilsalicílico tivesse sido usado com sucesso por outros autores (Saxena & Rashid, 1980), o aumento da taxa de regeneração em lúpulo não atingiu valores que fossem significativos, para o objectivo final de transformação.

IV) Adição de AgNO_3

As taxas de regeneração em lúpulo aumentaram ligeiramente (aumentos significativos para as var. Er e BG), em meios de indução de regeneração com AgNO_3 embora, em outras espécies o aumento nas taxas de regeneração tivesse sido mais significativo (Mohiuddin *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001). O facto de os explantes no



lúpulo terem sido obtidos a partir de plantas adultas, ao contrário das referências conhecidas, em que o material de partida foi cotilédones, poderá ser responsável pela diferença na resposta. O AgNO_3 tem um papel fundamental na inibição da acção do etileno (Taiz & Zeiger, 1998; Mohiuddin *et al.*, 1997). *In vitro*, o etileno promove a formação de *calli* e inibe a formação de meristemas (Williams *et al.*, 1990). A acção do AgNO_3 será impedir que o etileno libertado pelos entrenós colocados em cultura, direcione a resposta celular no sentido da formação de *calli*. Visto que a libertação de etileno pelos entrenós, embora seja inferior à que ocorre nos nós ou meristemas apicais na planta, é superior quando os entrenós são colocados na horizontal (Taiz & Zeiger, 1998) (posição em que os entrenós foram colocados em todos os ensaios de regeneração de plantas de lúpulo), seria de esperar alteração na frequência de regeneração, na presença de AgNO_3 . O aumento na taxa de regeneração está de acordo com os resultados referenciados, embora não tão elevado como noutras espécies (Mohiuddin *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001), o que poderá estar relacionado com o facto de se ter utilizado, como material de partida, entrenós que, são porções da planta onde a produção de etileno não é tão elevada (Salisbury & Ross, 1992). Embora, a concentração de AgNO_3 utilizada esteja dentro dos valores considerados indutores de regeneração (Bais *et al.*, 2000), poderá não ser a mais indicada para o lúpulo (nomeadamente para o Clone Br), podendo com grande probabilidade, variar com a variedade ou clone utilizada.

V) Adição de CuSO_4

O cobre é um cofactor de várias enzimas, como cobre/zinco superóxido dismutase, a ascorbato oxidase e proteínas da cadeia transportadora de electrões, como a plastocianina, ou a citocromo oxidase. No entanto, o seu excesso pode causar stresse oxidativo (Raeymaekers *et al.*, 2003; Rea *et al.*, 2002), danos nas membranas celulares, por alteração do conteúdo em lípidos (Quartacci *et al.*, 2001), ou expressão dos genes associados às proteínas VSP (vegetative-storage-protein), responsáveis pela acumulação de azoto, na forma de aminoácidos nos vacúolos, em órgãos em desenvolvimento e/ou completamente diferenciados (Mira *et al.*, 2002). Neste processo, os aminoácidos ficam armazenados quando a carga do floema estar pouco activa, por haver pouca solicitação dos centros metabólicos, como por exemplo, no caso de tecidos em fases iniciais de formação. A presença de cobre levará a uma maior acumulação de aminoácidos que pode traduzir-se numa melhor disponibilidade de nutrientes essenciais, como o azoto, numa fase ulterior. Assim, podemos considerar que o aumento da taxa de regeneração (BG e Br) pode estar relacionado com a acumulação de VSP, que



culminaria com a maior disponibilidade de nutrientes na fase de desenvolvimento dos meristemas. Os resultados negativos obtidos para Er, nomeadamente a morte do material, indicam uma maior sensibilidade que levaria ao stresse oxidativo, com o aumento da produção de jasmonatos, etileno e H_2O_2 (Hartley-Whitaker *et al.*, 2001). A acção destes compostos, as transcrições dos seus genes e as suas vias metabólicas, resultam da resposta das plantas, a feridas ou acção de agentes patogénicos que, muitas vezes, se traduz na morte celular.

A adição de $CuSO_4$ levou a resultados diversos para as diferentes variedades, variando entre a morte, aumentos não significativos de 3% na taxa de regeneração e aumentos significativos de 27,8% (Tabela 2.3). Tal facto, pode estar relacionado com a diferente sensibilidade das variedades à toxicidade ao cobre, podendo essa diferença dever-se a variações na expressão de genes, como os que codificam para as proteínas MT (enzimas de baixo peso molecular que se ligam a metais pesados e são codificadas por famílias multigene). A expressão e activação destas enzimas, é induzida pela presença de metais, em particular pelo cobre, mas varia com os ecótipos e variedades, como descrito para a *Arabidopsis* (Murphy & Taiz, 1995).

VI) Redução do pH

A alteração do pH no meio de indução, não modifica positivamente a taxa de regeneração dos explantes, independentemente da variedade ou clone. A taxa de regeneração baixou, sendo acompanhada por um acréscimo substancial na oxidação e ulterior morte do material. Para os valores de pH utilizados, o agar não polimerizou, pelo que o meio, bastante líquido, levou a que o material vegetal ficasse mergulhado, impossibilitando as trocas gasosas, causando oxidação e morte. O facto de haver pouco O_2 disponível num meio mais líquido e sem agitação, poderá ter levado à diminuição da capacidade de absorção dos minerais, quer por falta de energia para o transporte activo, quer pelo facto das enzimas responsáveis pelo mesmo transporte sofrerem alterações e, eventualmente, perderam actividade (Taiz & Zeiger, 1998). A liquefacção do meio seria, até certo ponto, vantajosa pois, poderia permitir uma maior difusão dos minerais ficando, deste modo, mais facilmente acessíveis ao explante. Os diferentes minerais têm diferentes pH óptimos de absorção, variando a sua disponibilidade para a planta de acordo com os mesmos. Ao longo de uma cultura verifica-se que o pH do meio vai variando, sendo a variação mais acentuada, numa cultura organogénica (Ramage & Williams, 2003). Assim, a disponibilidade diferencial dos minerais face a uma alteração do pH, poderia levar a um stresse capaz de induzir uma maior capacidade organogénica. Não se verificando esta hipótese, podemos considerar que os valores iniciais de pH eram



inadequados para uma absorção eficaz de azoto e fósforo, dois dos minerais mais determinantes numa fase inicial da organogénese (Taiz & Zeiger, 1998), condicionando deste modo, o desenvolvimento dos explantes que, aliado às deficientes trocas gasosas levaram à oxidação e morte do material.

As condições de stresse testadas mostraram que as taxas de regeneração obtidas são ligeiramente superiores às obtidas na ausência de stresse, sem no entanto serem, na sua generalidade, estatisticamente significativos.

Neste contexto, concluiu-se que o protocolo de regeneração a utilizar em ensaios de transformação, foi aquele que, apesar de inicialmente não apresentar a frequência de regeneração mais elevada apresenta, ao fim de 30 dias, a taxa de regeneração mais elevada, permitindo a obtenção de mais plântulas a partir de um mesmo explante.

Todos os ulteriores ensaios de transformação foram levados a cabo em material proveniente de plantas do Clone Br. Esta escolha deveu-se ao facto de este clone ter apresentado elevadas taxas de regeneração e de ser um clone com interesse potencial para a região de produção de lúpulo no país. O meio seleccionado (M14 anexo I; meio I3 na tabela 2.2.) foi aquele em que o clone Br não apresentou formação de *calli*, obtendo-se uma taxa de regeneração bastante elevada, pelo que foi o meio usado em todos os ensaios subsequentes de transformação genética.



CAPÍTULO III

Transformação Genética

Índice

RESUMO:	79
3.1. INTRODUÇÃO	81
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	83
3.2.1. AVALIAÇÃO DA EXISTÊNCIA DE INFECÇÕES VIRAIS NAS PLANTAS POR DAS-ELISA	83
3.2.2. MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE PLANTAS LIVRES DE VÍRUS	84
3.2.2.1. TERMOTERAPIA E ISOLAMENTO DE MERISTEMAS	84
3.2.2.2. ANTIVÍRUS QUÍMICO	84
3.2.3. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	85
3.2.3.2. ESTIRPES UTILIZADAS E PLASMÍDIOS	86
3.2.3.3. SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS	86
3.2.3.4. TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM</i>	87
3.2.3.5. SELECÇÃO DO MATERIAL APÓS TRANSFORMAÇÃO	88
3.2.4. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA POR BOMBARDEAMENTO DE PARTÍCULAS	88
3.2.4.1. MATERIAL VEGETAL	89
3.2.4.2. PREPARAÇÃO DA LIGAÇÃO DO DNA ÀS PARTÍCULAS DE OURO	89
3.2.4.3. BOMBARDEAMENTO	89
3.2.4.4. SELECÇÃO DO MATERIAL APÓS TRANSFORMAÇÃO	90
3.2.5. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO TRANSIENTE	90
3.2.6. ANÁLISE MOLECULAR DAS PLANTAS	91
3.2.6.1. EXTRACÇÃO DE DNA DAS PLANTAS	91
3.2.6.2. ANÁLISE DO DNA POR PCR	91
3.3. RESULTADOS	93
3.3.1. DETERMINAÇÃO DE INFECÇÕES VIRAIS NAS PLANTAS	93
3.3.2. OBTENÇÃO DE PLANTAS LIVRES DE VÍRUS	93
3.3.2.1. TERMOTERAPIA E ISOLAMENTO DE MERISTEMAS	93
3.3.2.2. ANTIVÍRUS QUÍMICO	94
3.3.3. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	96
3.3.3.1. SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS	96
3.3.3.2. TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM</i>	100
3.3.3.2. AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO TRANSIENTE DO GENE <i>UID A</i> .	101
3.3.4. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA POR BOMBARDEAMENTO DE PARTÍCULAS	105
3.3.5. ANÁLISE MOLECULAR DAS PLANTAS	107
3.3.5.1. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE <i>UID A</i> POR PCR	107
3.4. DISCUSSÃO	111
3.4.1. OBTENÇÃO DE PLANTAS LIVRES DE VÍRUS	111
3.4.2. TERMOTERAPIA	111
3.4.3. ANTIVÍRUS QUÍMICO	112



3.4.4. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	113
3.4.4.1. SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS	114
3.4.4.2. ESTUDO DA DETECÇÃO DA INTEGRAÇÃO DO GENE <i>UID A</i> E <i>NPT II</i>	116
3.4.5. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA POR BOMBARDEAMENTO DE PARTÍCULAS	117
3.4.3.2. ESTUDO DA DETECÇÃO DA INTEGRAÇÃO DO GENE <i>UID A</i> E <i>NPT II</i>	117



Resumo

Neste capítulo determinaram-se os métodos e condições para a obtenção de plantas transformadas, utilizando duas técnicas distintas: transformação mediada por *Agrobacterium* e bombardeamento de partículas. As plantas utilizadas na transformação foram testadas quanto à presença dos vírus: ArMV (Vírus do Mosaico de *Arabidopsis*), ApMV (Vírus do Mosaico da Macieira), PPV (Vírus Postular da Ameixeira), PNRSV (Vírus da Necrose em Anel de *Prunus*), SGV (Vírus do Fendilhamento do Caule), através de DAS-ELISA. As plantas infectadas foram sujeitas a métodos de eliminação de vírus: termoterapia com isolamento e cultura de meristemas, e micropropagação em meio com um antivírus químico Isovir® cujo princípio activo é a Isoprinosina.

Utilizou-se o plasmídeo p35SGUSINT e o plasmídeo pROKArMV (construção com o gene da cápside viral do ArMV). Os plasmídios contêm o mesmo gene marcador selectivo, o *npt II*.

Os antibióticos de eliminação de bactérias foram a cefotaxima e/ou carbenicilina em diferentes concentrações e combinações. Várias concentrações de canamicina foram testadas em explantes transformados. O tempo para a aplicação de selecção foi também testado. A transformação foi testada com e sem a utilização do composto fenólico acetosseringona na co-cultura das bactérias com o material vegetal. As estirpes de *Agrobacterium* utilizadas foram a LBA 4404, a EHA 105 e a C1C58 com o plasmídeo 35SGUSINT. No bombardeamento de partículas os “macrocarriers” foram colocados a 6mm do ecrã de paragem e as amostras colocadas a diferentes distâncias. Foram testadas várias pressões de bombardeamento dos explantes.

Os ensaios de teste DAS-ELISA mostraram que as plantas “stock” não estavam infectadas com o Vírus do Mosaico de *Arabidopsis*, nem com qualquer outro dos vírus testados, excepto em 20% das plantas do clone Br, infectadas com PNRS. As plantas foram submetidas a termoterapia e isolamento de meristemas, e cultura em meio com antivírus químico filtrado e meio com antivírus químico autoclavado. O crescimento médio foi determinado em cada uma das condições anteriores. Foi verificada a taxa de morte dos explantes e a percentagem de material livre de vírus obtido. A taxa de morte, nas plantas em meio com antivírus autoclavado, é superior à ocorrida em meio com antivírus filtrado. Nos explantes colocados em 25mg/L de canamicina existe um decréscimo de cerca de 5% na regeneração em relação às plantas controlo. Para os 50mg/L de canamicina esta diminuição na regeneração foi cerca de 13%. A frequência de regeneração com *Agrobacterium* foi inferior, cerca de 6%, à das plantas controlo. A frequência de regeneração dos explantes transformados por bombardeamento de partículas foi mais baixa 3% que a das plantas controlo. A taxa de resultados positivos foi de 70%, nos explantes transformados com a estirpe C1C58, 65%, com a estirpe LBA4404 e 30% com a estirpe bacteriana EHA 105. Independentemente da estirpe bacteriana usada, a expressão de gene *uid A*, decresceu ao longo do tempo, sendo inferior a 2% ao fim de 4 meses.

Nos ensaios com a construção p35SGUSINT obteve-se 50 plantas em que a taxa integração dos genes, confirmada por PCR, 2 meses após a transformação, foi de 39,4% para o gene *uid A* e de 85,3% para o gene *npt II*.

Conclui-se que, quer na transformação mediada por *Agrobacterium*, quer no bombardeamento de partículas, 48h de pré-cultura dos explantes permitiram a obtenção de maior número de transformantes. A pressão selectiva nos meios deve começar a exercer-se até os 3 primeiros dias após transformação, com uma concentração de canamicina de 25mg/L. Na transformação mediada por *Agrobacterium*, os antibióticos de eliminação da bactéria devem ser usados numa mistura de cefotaxima e carbenicilina na concentração de 250mg/L cada. No bombardeamento de partículas, as condições para a obtenção de mais plantas transformadas serão as de 1500psi de pressão e com as amostras a 6cm do ecran de paragem.



3.1. INTRODUÇÃO

O lúpulo é uma planta perene que possui um ciclo sexual anual o que, em termos de melhoramento convencional, representa uma vantagem. O facto de se tratar de uma planta dióica pode, porém, constituir uma desvantagem. O melhoramento convencional para além de envolver plantas masculinas, que do ponto de vista económico têm pouco interesse e, vão interferir nas características da planta feminina, implicam a espera de 3 a 4 anos até a produção ser passível de avaliação pelo produtor. Neste sentido, atendendo ao grande valor económico do lúpulo, e ao enorme prejuízo causado anualmente por numerosos agentes patogénicos, nomeadamente vírus, a que espécie é sensível, a transformação genética pode ser a resposta para um problema que se repete todos os anos com consequências sempre devastadoras (Adams, 1975). As infecções causadas por este tipo de organismos pode conduzir, não só, à perda de produtividade das cultivares, como também à alteração do seu conteúdo em α -ácidos e óleos essenciais. Assim, relativamente aos primeiros, os valores podem baixar até 40% e aumentar em percentagem semelhante nos segundos, nomeadamente, no que se refere a alguns sesquiterpenos (Patzak *et al.*, 2001).

Embora o lúpulo não possa ser considerada uma planta recalcitrante à transformação, visto que existem poucos trabalhos de transformação envolvendo esta espécie, sendo o nível de conhecimento pouco profundo, a verdade é que, dos registos de trabalhos nesta área envolvendo o lúpulo, existem dados que apontam para alguma dificuldade na introdução estável dos genes de interesse (Oriniaková & Matoušek, 1996; Horlemann *et al.*, 2003, Lyon de Castro, 2004), o que deixa em aberto uma vasta gama de possibilidades para trabalhos futuros. Por outro lado, a micropropagação e multiplicação *in vitro* de diversas variedades de lúpulo tem vindo a ser desenvolvida com bons resultados. Assim, uma vez obtidas plantas transformadas, estas podem ser multiplicadas, de um modo seguro, e após todos os testes exigidos, transferidas para os jardins de lúpulo com sucesso para o produtor. Dado que na família do lúpulo só existem dois géneros, *Humulus* e *Cannabis*, a base de estudo prévio ao nível deste *taxon* não é muito rica, pois também existem poucas referências de transformação genética envolvendo plantas deste segundo género.

No processo de transformação genética várias fases decisivas devem ser concretizadas para a obtenção de plantas estavelmente transformadas. Uma delas é a obtenção de organogénese e outra, no caso particular da transformação mediada por *Agrobacterium*, a capacidade de infecção por parte da bactéria. A capacidade do lúpulo



ser sensível ao *Agrobacterium*, já foi provada por vários trabalhos (Horlemann *et al.*, 2003; Lyon de Castro, 2004) incluindo o presente trabalho.

O bombardeamento de partículas tem sido utilizado em plantas lenhosas e em geral com taxas elevadas de sucesso (Jauhar, 2001; Altpeter *et al.*, 2005). Tornou-se o método alternativo para as plantas menos sensíveis a *Agrobacterium* e, em várias situações, um eficiente método alternativo de transformação. Embora seja um método expedito e determinante para as plantas pouco sensíveis a *Agrobacterium*, tem sido usado, de uma maneira mais geral, na transformação de diferentes espécies de plantas, independentemente da sua sensibilidade ao *Agrobacterium*, tendo sido recentemente utilizado com sucesso em lúpulo, num trabalho complementar ao presente (Lyon de Castro, 2004).

Quer no método utilizando o *Agrobacterium* como vector, quer no caso do bombardeamento de partículas, os vectores contêm um gene repórter e um gene marcador de selecção. Estes genes são extremamente úteis na determinação dos passos e factores essenciais para o processo de transformação, nomeadamente na fase inicial do processo.

Este trabalho tem como objectivo determinar a possibilidade de se obter a transformação estável de plantas de lúpulo. Por um lado, pretendemos determinar os métodos e condições essenciais para a transferência de DNA para as células vegetais (determinação da expressão transiente) e, por outro, desenvolver as técnicas de cultura *in vitro* adequadas para a obtenção de plantas transformadas.

Após o desenvolvimento do protocolo de transformação e deste ter sido testado numa planta modelo (*Nicotiana tabacum*), foi efectuada a transformação em lúpulo. Por fim, foi aplicado e avaliado o protocolo de transformação, com uma construção contendo a proteína da cápside do Vírus do Mosaico de *Arabidopsis*, nas plantas de lúpulo do clone Bragança.



3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Avaliação da existência de infecções virais nas plantas por DAS-ELISA

As plantas utilizadas na transformação tiveram origem em plantas recolhidas inicialmente no campo, por esse motivo foram testadas em relação à presença de alguns vírus, através do método de “dupla sanduíche de anticorpos” – “Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay” (DAS-ELISA). Foram analisadas 30 plantas do clone Bragança, e 15 plantas das variedades Eroica e Brewers Gold. Cada ensaio teve duas réplicas. Os valores de padrão do teste DAS-ELISA são obtidos mediante a utilização da seguinte fórmula (1): média dos valores $+2\sigma$ = valor abaixo do qual se considera que as amostras não estão infectadas.

A presença de possíveis infecções virais provocadas pelo Vírus do Mosaico de *Arabis* (ArMV), Vírus do Mosaico da Macieira (ApMV) Vírus Postular da Ameixieira (PPV), Vírus da Necrose em Anel de *Prunus* (PNRSV), Vírus do Fendilhamento do Caule (SGV), foi verificada nas plantas em cultura usando para isso um anti-soro policlonal contra as partículas virais purificadas (Sanofi, Alemanha). A presença de vírus foi detectada utilizando o procedimento DAS-ELISA (Clark & Adams, 1977).

As amostras foram moídas em tubos de “eppendorf” de 2mL, utilizando homogeneizadores eléctricos com pontas esterilizáveis substituíveis e ajustáveis ao fundo dos tubos. Plantas saudáveis de tabaco foram utilizadas como controlo negativo do método DAS-ELISA. O controlo positivo foi efectuado para cada um dos vírus testados recorrendo ao “kit” (Empresa Sanofi, Alemanha). As soluções tampão utilizadas foram fornecidas com o anticorpo ou, quando tal não aconteceu, foram preparadas soluções cuja composição se encontra descrita em anexo (Anexo III).

Foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 poços (Greiner, Frickenhausen, Alemanha), previamente revestidas, com 200 μ L (por poço da placa) de uma diluição da imunoglobulina de 1:1000, em solução tampão de revestimento (“coating buffer”), correspondente ao vírus em estudo (Anexo III). As placas foram incubadas a 4°C durante a noite (12 horas). Após a incubação foram lavadas com a solução tampão de lavagem (Anexo III). Em cada poço colocou-se 200 μ L da amostra, submetendo-a a uma nova incubação de 3-4 horas a 4°C. Terminada esta incubação, os poços foram novamente lavados com solução tampão de lavagem, a que se seguiu uma incubação com o anticorpo conjugado com uma fosfatase alcalina (diluído 1:1000 em solução tampão com o conjugado). Esta incubação durou 1-2h após o que se seguiu nova lavagem e finalmente incubação com 200 μ L/poço de substrato da enzima (4-nitrofenil-



fosfato), a 1mg/L em tampão substrato (Anexo III). Após 1-2h à temperatura ambiente a absorvência das amostras foi determinada por espectrofotometria a 405nm num leitor de placas (microplate reader 3550 Bio-Rad, Alemanha).

3.2.2. Métodos de obtenção de plantas livres de vírus

As plantas em cultura que apresentaram valores positivos nos testes DAS-ELISA foram seleccionadas para serem sujeitas a métodos de eliminação dos vírus, nomeadamente termoterapia com isolamento e cultura de meristemas, e micropropagação em meio com um antivírus químico.

3.2.2.1. Termoterapia e Isolamento de meristemas

As plantas *in vitro* com aproximadamente 4cm de altura foram colocadas numa câmara de cultura, com 40% de humidade, a 36°C luz, e 27°C escuro, com um fotoperíodo de 16-8h, durante 4 semanas.

Foram feitas semanalmente observações às plantas, com o objectivo de, verificar se as condições de cultura não comprometiam a sobrevivência das mesmas. Quando o tempo de termoterapia terminou, foram isolados os meristemas apicais das plantas.

O isolamento dos meristemas foi efectuado à lupa (ampliação de 7,5x), com porções de lâminas de barbear esterilizadas previamente em álcool a 96%, e flamejamento. Após o isolamento, feito em condições de esterilidade em bancada de fluxo laminar, os meristemas foram colocados em caixas de Petri contendo meio Adams 1 (Capítulo 2). Após aparecimento do segundo par de folhas, foram transferidos para tubo, mantendo-se, no entanto, o meio de cultura. Depois de um período de 2 meses em cultura, o material foi de novo analisado utilizando a técnica de DAS-ELISA.

3.2.2.2. Antivírus químico

Foi testado um antivírus comercial (Isovir ® Laboratório Fidelis, Lda) na forma de comprimidos, cujo princípio activo é o p-acetomidobenzoato de dimetilamino-isopropanolinosina (Isoprinosina). O comprimido foi dissolvido em HCl 10 N, filtrado e utilizado numa concentração de 2mg/mL.

Como método de esterilização do composto foram testados a filtração e a autoclavagem. Para cada tratamento foram utilizados três frascos, cada um com três plantas. O ensaio teve duas réplicas.



Uma vez que, nos meios de cultura em que o antívirus foi inserido, houve alterações na solidificação do meio, foi verificado o pH do meio isoladamente e, do meio após a adição de antívirus (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Ensaio com antívirus em meios de propagação de plantas de *Humulus lupulus* L..

Tratamento	Tipo de meio	pH
Sem Antívirus	Sólido	6,0
	Líquido	5,5
Antívirus autoclavado	Sólido	4,5
	Líquido	5,0
Antívirus filtrado	Sólido	5,0
	Líquido	5,0

Foi também testada a adição de uma pequena camada líquida do antívirus, sobre o meio já solidificado. Realizaram-se dois ensaios e utilizaram-se 10 plantas por ensaio. O antívirus foi adicionado depois de esterilizado por filtragem (filtros de 20 μ m). Após aplicação do antívirus, o material foi mantido no mesmo meio de micropropagação anteriormente utilizado para as plantas em cultura *in vitro* (Adams 1), durante 4 semanas e transferido para novo meio, sem antívirus. O ensaio foi seguido semanalmente e, ao fim de 2 meses de cultura, o material foi submetido a uma análise de DAS-ELISA, para detectar a presença de vírus.

3.2.3. Transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Em todos os ensaios de transformação de *Humulus lupulus* L, foi utilizado o sistema de regeneração previamente estabelecido, para a regeneração adventícia de meristemas (Capítulo 2). Os explantes utilizados na transformação foram entrenós de lúpulo, provenientes de plântulas micropropagadas a partir de meristemas axilares e apicais de plantas adultas (ver Capítulo 2, Fig. 2.1.)

Com o objectivo de testar a metodologia de transformação e a construção usada, foram feitos ensaios de transformação em folhas de *Nicotiana tabacum*. As folhas foram removidas de culturas *in vitro* estabelecidas, utilizando sementes cedidas pela Dr.^a Ana Lúcia Sintra da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Estas plantas foram subcultivadas de 3 em 3 semanas para meio fresco MS/2 (meio MS reduzido a metade nas concentrações de macro e micronutrientes), 20g/L de sacarose, pH 5,7, 8g/L de agar (V-Reis, Lisboa, Portugal), sem fitorreguladores e sem alteração da concentração de vitaminas. As culturas foram mantidas a 24 \pm 2°C sob um fotoperíodo de 16h luz/8h escuro, obtido com lâmpadas “day-light” 35 μ Em⁻²s⁻¹.

3.2.3.2. Estirpes utilizadas e plasmídios

As estirpes de *Agrobacterium* utilizadas foram LBA 4404 (Hoekema *et al.*, 1983) com o plasmídio p35SGUSINT (Vancanneyt *et al.*, 1990) (Fig. 3.1) e o plasmídio pROK ArMV (Gölles *et al.*, 1997); as estirpes EHA 105 (Hood *et al.*, 1993) e C1C58 com o plasmídio p35SGUSINT. O plasmídio p35SGUSINT contém um intrão no gene repórter *uid A*, que codifica para a β -glucuronidase (GUS) no *Agrobacterium*. Todos os plasmídios contêm o mesmo gene marcador selectivo *npt II*, que codifica para a neomicina fosfotransferase (NPT II).

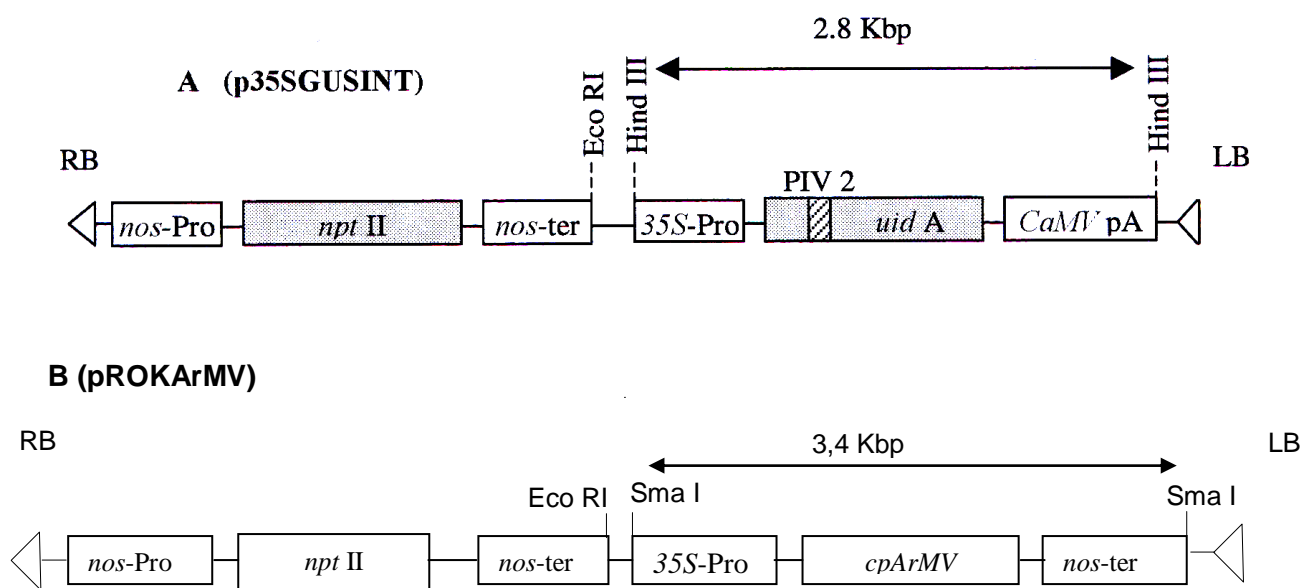


Figura 3.1: Plasmídios utilizados na transformação de *Humulus lupulus* L. *npt II*, região que codifica o gene da neomicina fosfotransferase; *uid A*, região que codifica o gene da β -glucuronidase; PIV2, intrão vegetal; *cpArMV* região que codifica para o gene da cápside viral do Vírus do Mosaico de *Arabid*; *nos-Pro*, promotor do gene da nopalina sintetase; *nos-ter*, sequência do terminador do gene da nopalina sintetase; *35S-Pro*, promotor 35S do Vírus do Mosaico da Couve-flor; *CaMV pA*, sinal de poliadenilação do Vírus do Mosaico da Couve-flor; RB “border” direito do T-DNA; LB “border” esquerdo do T-DNA.

3.2.3.3. Sensibilidade a antibióticos

Os explantes (entrenós de plantas de lúpulo) foram colocados em meio de regeneração fresco (Capítulo 2) com cefotaxima e/ou carbenicilina. As concentrações de antibióticos testadas foram as seguintes: Cefotaxima 250mg/L (cef), Carbenicilina 250mg/L (carb) e conjugações dos dois antibióticos (cef. 250 + carb. 200mg/L; cef. 250 + carb. 250mg/L; cef. 300 + carb. 250mg/L; cef. 350 + carb. 250mg/L; cef. 200+ carb. 250mg/L). Os resultados foram observados em termos de regeneração obtida após 21 dias, nos meios suplementados com antibióticos. Mediante os resultados obtidos nos ensaios de sensibilidade a antibióticos, utilizou-se uma combinação dos antibióticos cef. e



carb. nos ensaios de *Agrobacterium tumefaciens*, com o objectivo de eliminar as bactérias após o período de co-cultura planta - bactérias. Os explantes foram transferidos para meio de regeneração fresco, com carb. e cef., sem qualquer pressão selectiva (adição de canamicina), ou com a selecção aplicada aos 0, 3, 8, 14 e 21 dias, após o período de co-cultura. A concentração de can. foi testada em explantes transformados e em explantes não transformados, nas concentrações de 0,6, 12,5, 25, 50, 75mg/mL.

Os resultados obtidos foram analisados por análise de variância (ANOVA) a um factor e para comparações múltiplas de médias utilizou-se o teste Tukey HSD de comparações múltiplas (SYSTAT versão 5.0).

3.2.3.4. Transformação mediada por *Agrobacterium*

Nos ensaios iniciais, para a determinação da expressão transiente e modelação do processo de transformação utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, seleccionou-se a estirpe LBA 4404 com o plasmídeo p35SGUSINT.

O processo de co-cultura iniciou-se pela preparação da suspensão de bactérias, obtida pela colocação em 20mL de meio LB de uma colónia da estirpe LBA 4404, isolada em meio sólido. O meio de cultura utilizado para a multiplicação das bactérias (LB), é composto por: 5g/L de extracto de levedura, 10g/L de triptona, 10g/L de cloreto de sódio e 15g/L de agar (V-Reis, Lisboa), pH 7,2. Colocou-se no meio de cultura 50mg/L dos antibióticos canamicina e rifampicina para a selecção, em meio líquido, das bactérias LBA 4404, EHA 105 e C1C58 com o plasmídeo p35SGUSINT. Para as bactérias LBA 4404 e C1C58 com o plasmídeo pROKArMV, usou-se 100mg/L de estreptomicina e 50mg/L de can.. A suspensão de bactérias cresceu com agitação de 120 rpm, a 28°C durante a noite. As culturas de bactérias foram utilizadas quando o seu crescimento se encontrava em fase exponencial (Absorvência 600nm= 0,6 – 0,8). Após a medição da Absorvência, a cultura foi diluída 1:50 (v/v) numa solução de sacarose 0.3% (Laimer da Câmara Machado *et al.*, 1992). Inicialmente, foi testada a utilização do composto fenólico acetosseringona na co-cultura das bactérias C1C58 com os explantes vegetais. A acetosseringona foi testada em ensaios de transformação, na concentração de 20µm, sendo a expressão transiente do gene *uid A* dos explantes resultantes desses ensaios, comparada com a expressão do mesmo gene em ensaios de transformação, onde não foi adicionada acetosseringona.

Nos ensaios de transformação com pré-cultura, o material vegetal foi previamente cortado 26h ou 48h antes e colocado a incubar a 22 ± 2°C no escuro, em meio de regeneração.



Nos ensaios com imersão, o material foi mergulhado numa solução de sacarose 0,3% e bactérias (OD=0,6), sendo a solução diluída para um valor final de 0,2. Nestes ensaios, utilizaram-se explantes provenientes de entrenós. Após a imersão, cuja duração variou entre 10 e 12 minutos, os entrenós foram secos em papel de filtro estéril e colocados em meio fresco de regeneração com antibióticos. Em simultâneo, foi testada a utilização da cultura bacteriana, na transformação, sem diluição em solução de sacarose.

3.2.3.5. Selecção do material após transformação

Após 48 a 72 horas de co-cultura, os explantes foram transferidos para meio de cultura idêntico ao utilizado durante a co-cultura, ao qual foi adicionado 250mg/L de carb e 250mg/L de cef. Parte do material foi transferido para meio com 25mg/L de canamicina (can.), para além dos antibióticos de eliminação das bactérias. Três semanas depois, o material foi novamente transferido para meio de selecção suplementado com 50mg/L de can. Os meristemas regenerados foram transferidos para meio de micropropagação contendo antibióticos de selecção (50mg/L de can). Depois desta sub-cultura o material foi seguido semanalmente, até a transferência seguinte, para meio fresco, que ocorreu após 6 semanas.

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o teste de análise de variância, ANOVA a um factor.

3.2.4. Transformação genética por bombardeamento de partículas

Após dois dias de pré-cultura, no escuro, os explantes foram transferidos para a luz (condições descritas na secção 3.2.3.1), e transformados por bombardeamento de partículas. Depois do bombardeamento as condições de cultura foram semelhantes às condições de co-cultura com *Agrobacterium* (meio de regeneração contendo 25mg/L de can. como antibiótico de selecção. Três semanas depois o material foi transferido para meio fresco de regeneração contendo 50mg/L de can.).

Foram usados dois plasmídios diferentes: plasmídio p35SGUSINT, (contendo os genes *npt II* e *uid A*) e o plasmídio pROKArMV. O primeiro foi utilizado com o objectivo de determinar as melhores condições de transformação e, o segundo para introdução do gene de interesse (gene da cápside viral do ArMV). Os plasmídios foram propagados em culturas de *Escherichia coli*, crescidas durante 12h, a 37°C e a 180 rpm. Os plasmídios foram isolados recorrendo ao protocolo comercial Plasmid Midi (Quiagen, Dusseldorf, Alemanha) e de acordo com as instruções do mesmo.



3.2.4.1. Material vegetal

Os entrenós de plantas, mantidas durante 2 meses em cultura, utilizados como explantes, foram seccionados e colocados em meio de indução 48h antes do bombardeamento. Imediatamente antes do bombardeamento, o material foi colocado no centro da caixa de Petri, num diâmetro aproximado de 2cm.

3.2.4.2. Preparação da ligação do DNA às partículas de ouro

O DNA dos plasmídios foi ligado a partículas de ouro de 1 μ M (BioRad Laboratories, Hércules, U.S.A.), previamente esterilizadas, utilizando para isso um protocolo modificado de McCabe e Christou (1993): 3 mg de partículas foram mergulhadas em 50 μ L CaCl₂ (2,5M), 20 μ L Espermidina (0,1M) e 7,5 μ L de DNA (1 μ g/ μ L). A solução foi preparada adicionando sequencialmente os componentes e submetendo-a a alguns segundos no vórtex, entre cada adição. A mistura ficou a incubar 15 minutos, seguida de centrifugação (5 segundos a 10000 rpm), após a qual, o sobrenadante foi descartado. As partículas foram lavadas em 140 μ L de etanol a 70%, seguida de outra lavagem em 140 μ L de etanol a 100%, finalmente o material foi ressuspenso em 48 μ L de etanol 100%, com breve passagem pelo sonicador.

3.2.4.3. Bombardeamento

O aparelho utilizado para os bombardeamentos foi o PDS-1000/ He delivery system (BioRad Laboratories, Hércules, U.S.A.). O funcionamento deste equipamento baseia-se num aumento de pressão conseguido com hélio, que acelera o “macrocarrier” na superfície do qual foram colocadas as partículas envolvidas com DNA. As partículas são colocadas numa pequena câmara onde, a pressão de hélio é aumentada até ao valor seleccionado. Um disco de ruptura sela a câmara até a pressão ser atingida, rompendo nessa altura e criando um “disparo” que liberta uma onda de choque que arrasta o “macrocarrier” e acelera as partículas que continuam para além do ecrã de paragem, onde o “macrocarrier” fica retido. As partículas penetram no material permitindo a entrada do DNA nas células.

O aparelho utilizado nos bombardeamentos encontra-se numa câmara de fluxo laminar, o que permite que todo o procedimento decorra em condições de assepsia. Antes de ter início o processo de bombardeamento dos explantes, o material acessório (anéis de suporte dos macrocarriers, redes de detenção, suporte da amostra, suporte dos discos de ruptura e dispositivo de lançamento), o aparelho de bombardeamento e a bancada de fluxo laminar foram previamente desinfectados. A desinfectação consistiu na



exposição a U.V. e vaporização com etanol comercial, excepto os anéis de suporte dos macrocarriers e as redes de detenção que foram esterilizados por imersão em etanol comercial 20 minutos. Um volume de 6 μ L da suspensão de partículas de ouro e DNA foi pipetado e colocado na superfície dos “macrocarriers”. Após secagem dos “macrocarriers” na bancada de fluxo laminar, estes foram colocados a 6mm do ecrã de paragem e as amostras foram colocadas a 6, 9 e 12cm. Os explantes foram bombardeados a 1300, 1500 e 2000 Psi (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. – Distâncias e pressões testadas nos explantes submetidos a transformação por bombardeamento de partículas

Pressão (psi)	Distância (cm)		
1300	6	9	12
1500	6	9	12
2000	6	9	12

Os resultados foram expressos em número de explantes com manchas azuis, correspondentes à determinação histoquímica da presença da proteína do GUS. Os dados foram testados com o programa ACTUS (Oliveira & Almada, 1998), tal como descrito no Capítulo 2.

3.2.4.4. Selecção do material após transformação

Após a transformação, o material foi colocado em meio de regeneração com uma pressão selectiva de 25mg/L de can., sendo esta concentração aumentada para 50mg/L, na subcultura seguinte. As condições de luz e temperatura foram as mesmas do material *in vitro* que deu origem aos explantes (Capítulo 2).

Como controlo, foram colocados 15 explantes não transformados em meio de selecção e seguidos por um período de duas subculturas. Ao contrário do que aconteceu na transformação mediada por *Agrobacterium*, o meio de selecção foi suplementado apenas com can.. As restantes condições de cultura mantiveram-se (luz e temperatura), após transformação.

3.2.5. Determinação da expressão transiente

A actividade da β -glucuronidase foi detectada no material vegetal transformado por bombardeamento, ou *Agrobacterium*, recorrendo ao método histoquímico descrito por Jefferson (1987). Secções dos explantes, ou plântulas regeneradas após transformação,



foram incubadas durante 20h a 37°C, numa solução de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucuronido (X-Gluc, Amresco, Dolon, U.S.A.). O material foi colocado em tubos “ependorf” contendo a mistura de reacção constituída por: 1Mg de X-Gluc, dissolvido em 10 μ L de dimetilsulfoxido (DMSO), e diluído a 0,4mg/L em tampão fosfato 100mM (pH 7,2), contendo Triton X-100 a 0,5% (v/v). A solução foi filtrada sob vácuo (1Minuto) e, o tecido foi incubado nesta mistura de reacção, durante a noite. A formação do produto de reacção foi seguida por observação periódica em microscopia de luz invertida. Terminada a incubação, as secções foram lavadas em etanol a 70%, durante várias horas, para extracção dos pigmentos fotossintéticos. No caso da transformação mediada por *Agrobacterium*, a detecção da expressão da β -glucuronidase nos entrenós foi efectuada logo após co-cultura, aos 10 e 20 dias e ao fim de 1, 2, 3 e 4 meses. No caso da transformação por bombardeamento de partículas a detecção foi feita 1 a 2 dias após bombardeamento. A expressão transiente foi avaliada por contagem das marcas azuis indicativas da presença de GUS. Explantes controlo, não transformados, sofreram o mesmo tratamento de incubação e lavagem em etanol a 70%.

3.2.6. Análise molecular das plantas

3.2.6.1. Extracção de DNA das plantas

Folhas e meristemas apicais de plântulas jovens foram utilizados para a extracção de DNA. Para a análise do DNA por PCR o processo foi feito 1Mês após a transformação. A extracção de DNA foi efectuada de acordo com o protocolo descrito no anexo 2 adaptado a partir de Yang e King (1993) e modificado de Doyle e Doyle (1987). Após extracção do DNA, avaliou-se a quantidade e grau de pureza, por espectrofotometria de absorção molecular, através da absorvência a 260nm e a sua integridade foi testada em gel de agarose (0,8%) em tampão TAE (40mM Tris, pH 7,8; 2mM EDTA).

3.2.6.2. Análise do DNA por PCR

O DNA genómico das plantas foi usado para a amplificação por polimerase em cadeia dos genes presentes nos plasmídeos. Com esta análise pretendeu-se verificar se os genes estariam inseridos no genoma vegetal ou não. Numa primeira abordagem foram amplificados os genes *uid A* e o *npt II*, seguida da determinação do gene de interesse, codificante da proteína da cápside viral do ArMV (Capítulo 5).

As plantas que foram transformadas por bombardeamento de partículas com o plasmídeo p35SGUSINT foram também analisadas, para a presença do gene *npt II*. A



análise por PCR para o gene *npt II* foi feita com os seguintes “primers”: 5'-GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTGG-3' e o 5'-ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTAA-3'. O programa utilizado foi o seguinte: 95°C, 5 minutos para a abertura inicial das cadeias; 94°C, 1Minuto; 65°C, 1Minuto; 72°C, 1Minuto; 30 ciclos, no final um passo de elongação de 10 minutos a 72°C para terminar as cadeias ainda incompletas. A análise para o gene *uid A* foi feita com os “primers”: 5'-CCC GGC AAT AAC ATA CGG CGT-3' e 5'-CCT GTA GAA ACC CCA ACC CGT-3' e usado o seguinte programa: 94°C, 5 minutos para a abertura inicial das cadeias; 94 °C, 1Minuto, 60°C, 1Minuto; 72°C, 3 minutos; 30 ciclos e final o passo 10 minutos a 72°C para terminar as cadeias ainda incompletas.

A visualização dos produtos de PCR foi feita por electroforese em géis de agarose (1,2%) em solução tampão TAE (40mM Tris, pH 7,8, 2mM EDTA) com Brometo de Etídio a 0,3 µg/mL. A determinação da concentração do DNA, foi feita por espectrofotometria de absorção molecular, a 260nm. O peso molecular foi determinado por comparação com marcadores de peso molecular conhecido.

Os resultados obtidos foram analisados por análise de variância (ANOVA) a um factor.



3.3. RESULTADOS

3.3.1. Determinação de infecções virais nas plantas

Os ensaios de teste DAS-ELISA mostraram que as plantas de partida (plantas “stock”), utilizadas no desenvolvimento deste trabalho, não estavam infectadas com o Vírus do Mosaico de *Arabidopsis*, nem com qualquer outro dos vírus testados. Porém, verificou-se a existência de valores muito próximos do limite a partir do qual foi considerado que as plantas estavam infectadas (valores de 0,04 para um valor padrão de 0,034), em 20% das plantas do clone Br com PNRS (Fig. 3.2.). As plantas de BG e da variedade Er não apresentavam valores passíveis de serem considerados infecção. Com base nestes resultados, procedeu-se a tratamentos de termoterapia e terapia química, nas plantas do clone Br que apresentavam infecção com o vírus PNRS. Como nem todas as plantas apresentaram valores positivos de infecção, seleccionaram-se as plantas livres de vírus para prosseguir os ensaios de transformação genética e aplicou-se o tratamento às restantes.

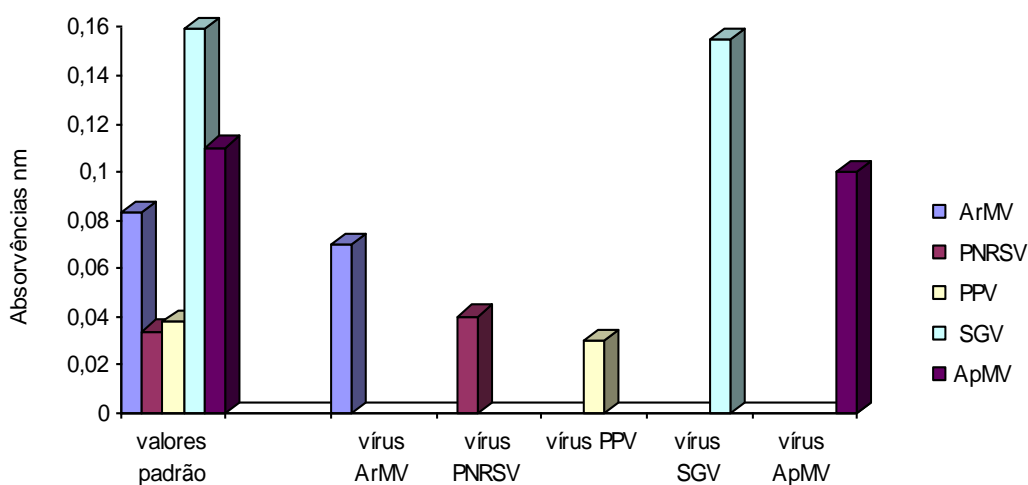


Figura 3.2. – Detecção de vírus por DAS-ELISA nas plantas “stock” do clone Bragança. Os valores de padrão para os diferentes vírus foram obtidos mediante a utilização da fórmula (1) descrita no material e métodos.

3.3.2. Obtenção de plantas livres de vírus

3.3.2.1. Termoterapia e Isolamento de meristemas

O material resistiu à temperatura elevada, embora apresentasse taxas de crescimento mais baixas, principalmente a partir da segunda semana de termoterapia. Assim, nas plantas submetidas a termoterapia, somente ao fim de 3,5 a 4 semanas, o



crescimento médio das plantas era idêntico ao das obtidas em condições normais, ao fim de duas semanas. O isolamento dos meristemas provocou a morte de 10% dos explantes, condicionando, assim, o número de plantas obtido no final do tratamento de termoterapia e isolamento de meristemas (Tabela 3.3.).

Tabela 3.3. – Número de plantas mortas e infectadas após o isolamento dos meristemas, resultantes da termoterapia.

Plantas	Morte	Infecção	Sobrevivência	Total
Meristemas isolados	3	8	19	30
Meristemas controlo	2	0	10	12

Nota: Meristemas controlo são plantas retiradas da termoterapia e subcultivadas, sem serem isolados os meristemas.

O isolamento de meristemas revelou-se delicado e determinante da sobrevivência dos mesmos. Como pode verificar-se na Tabela 3.3, a morte e infecções foram superiores nos meristemas sujeitos a isolamento, comparativamente com os que não sofreram esta manipulação. Os meristemas isolados deste modo, desenvolveram-se de forma normal, ou seja, de forma semelhante às plantas micropropagadas, não sujeitas a termoterapia e isolamento de meristemas (Fig. 3.3.).

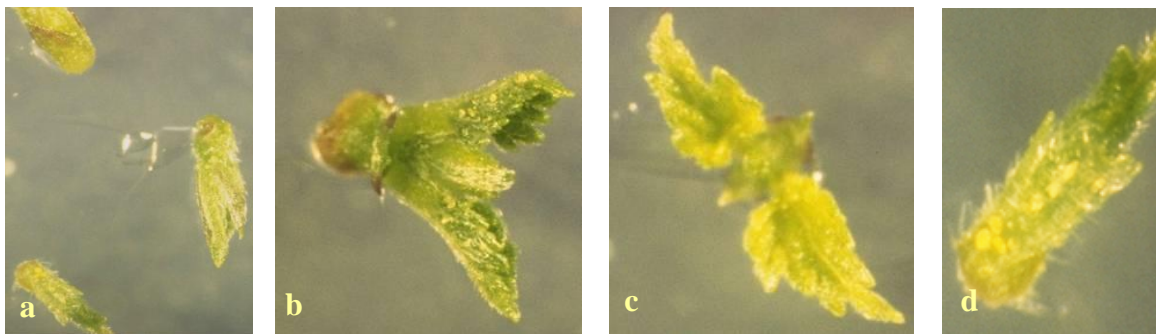


Figura 3.3. – Meristemas isolados após termoterapia. **a)** e **d)** meristemas após uma semana de isolamento. **b)** e **c)** meristemas após duas semanas de isolamento (Ampliação 7x).

3.3.2.2. Antivírus químico

A introdução do antivírus, no meio de cultura, provocou a alteração do pH deste, após autoclavagem, liquefazendo-o e criando condições de anóxia ao material que, por acumulação de fenóis, acabou por morrer. Verificou-se que o pH após autoclavagem era inferior a 5,2. Apesar de, antes da autoclavagem, se proceder ao acerto do pH do meio, este manteve a alteração na capacidade de solidificação.



Da observação da Tabela 3.4., verifica-se que, num total de 18 plantas para cada uma das condições, a percentagem de infecções e contaminações foi semelhante nos dois métodos. O mesmo, no entanto, não é verdade quanto à ocorrência de morte. No meio contendo antivírus filtrado, a percentagem de morte é aproximadamente metade, da que se verifica no meio com antivírus autoclavado. Por outro lado, verifica-se que, a percentagem de material livre de vírus no meio com antivírus filtrado é de 55,6%, o que se aproxima do dobro da percentagem de plantas sem vírus, obtidas em meio com antivírus autoclavado (27,8%). Foi feita uma avaliação mais detalhada da ocorrência de morte (pela presença de antivírus no meio de cultura) nos dois processos (Fig. 3.4.).

Tabela 3.4: Efeito do processo de esterilização do antivírus químico, (filtração ou autoclavagem), nas plantas *in vitro* de lúpulo. **Plantas infectadas** - plantas com contaminações bacterianas ou fúngicas. **Plantas livres de vírus** - plantas com valores de DAS-ELISA negativos para os diferentes vírus testados. **Plantas contaminadas** - plantas que, após o teste DAS-ELISA, apresentam valores acima do valor padrão para o qual se considera as plantas livre de vírus.

	Antivírus Filtrado		Antivírus Autoclavado	
	Nº de plantas	%	Nº de plantas	%
Morte	5	27,8	10	55,6
Plantas Infectadas	2	11,1	3	16,7
Plantas livres de vírus	10	55,6	5	27,8
Plantas contaminadas	1	5,6	0	0
Total de Plantas testadas	18	100	18	100

Da análise da Figura 3.4. verificou-se que a morte ocorrida em meio com antivírus autoclavado, é superior à ocorrida em meio com antivírus filtrado, embora os valores não sejam significativamente diferentes.

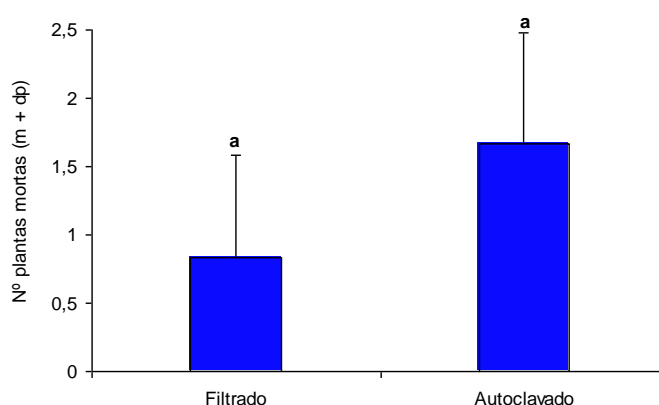


Figura 3.4: Número de plantas de lúpulo mortas após utilização antivírus filtrado ou autoclavado no meio de cultura. (m + dp) = média + desvio padrão. Valores com a mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de $p = 0,05$.

Após o tratamento com o antivírus autoclavado ou filtrado, o número de plantas isentas de vírus, foi significativamente diferente (Fig. 3.5), verificando-se, no final do



tratamento, que a utilização do antivírus químico filtrado, permitiu obter um número superior de plantas isentas de vírus.

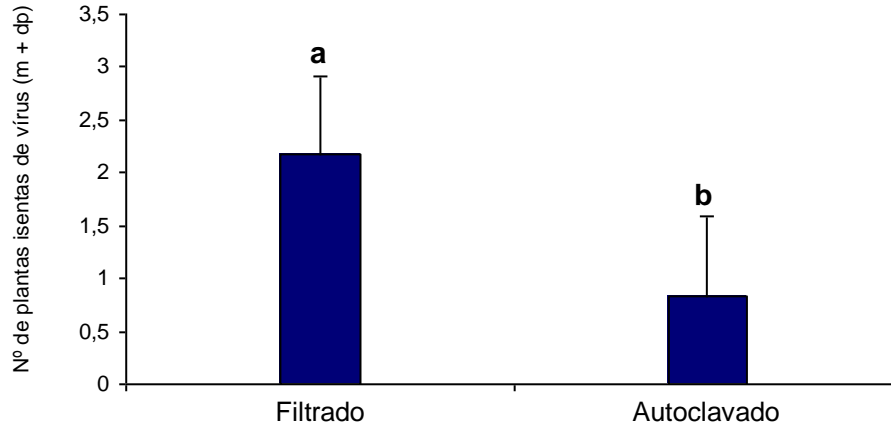


Figura 3.5: Número de plantas isentas de vírus, após tratamento com o antivírus químico autoclavado e o antivírus químico filtrado. (m + dp) = média + desvio padrão. Os valores com as letras **a** e **b** diferem entre si ao nível de $p=0,01$.

Em alternativa à inclusão do antivírus filtrado no meio de cultura, foi testada a utilização de uma fina camada líquida de meio com antivírus, sobre o meio de cultura sólido. A colocação dos meristemas sobre essa camada, revelou-se bastante negativa, já que 80% (de um total de 20 plantas testadas) dos meristemas apresentaram clorose intensa, acabando por morrer. Dos restantes 20%, apenas 1% apresentou valores de DAS-ELISA considerados negativos para a infecção viral.

3.3.3. Transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

3.3.3.1. Sensibilidade a antibióticos

Nos ensaios de sensibilidade a antibióticos, foram testados tanto os antibióticos de eliminação do *Agrobacterium* (cef. e carb.), como o antibiótico de selecção (can.). Os resultados mostraram que, para o tempo a partir do qual o material foi sujeito a selecção (colocado em meios com can.), a opção que proporcionou uma maior taxa de regeneração, foi até aos 3 dias, baixando significativamente entre o 3º e o 8º dia, só voltando a aumentar ao 8º dia, sendo no entanto, esse aumento da taxa de regeneração não significativo entre o 14º e o 21º dia, após co-cultura (Fig. 3.6. A).

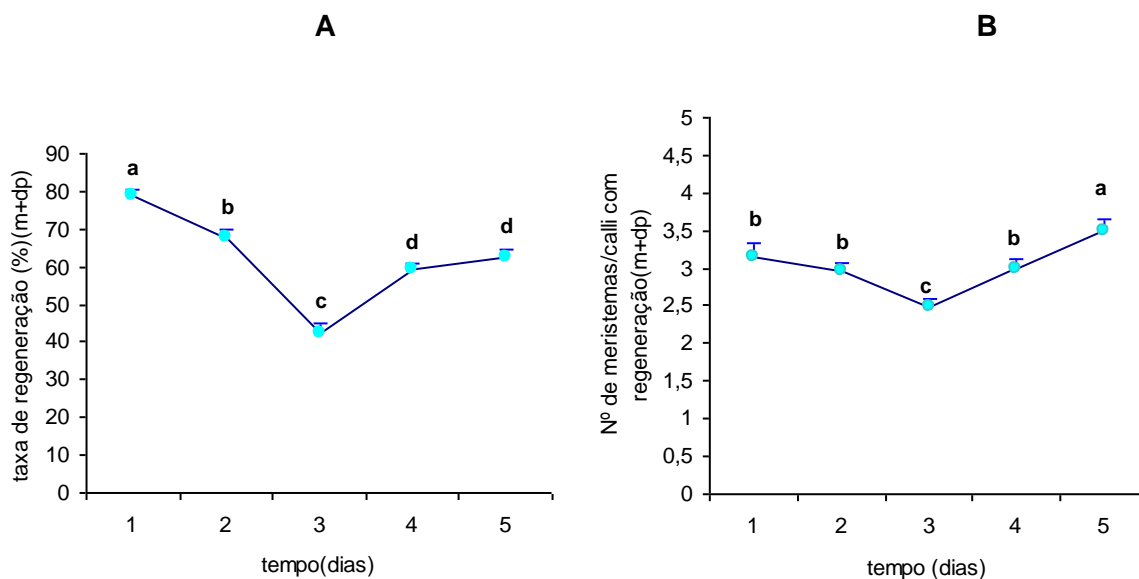


Figura 3.6.: **(A)** Variação da taxa de regeneração dos explantes e **(B)** razão meristemas/*calli* na presença de canamicina (25mg/mL), em tempos diferentes de aplicação do antibiótico de selecção, após a transformação. **1** (zero dias); **2** (3 dias); **3** (8 dias); **4** (14 dias); **5** (21 dias). (m+dp) = média + desvio padrão. Os valores com a mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de $p = 0,05$.

O número de meristemas obtidos, por cada explante que regenerou, também sofreu o mesmo padrão, diminuindo no 8º dia (Fig. 3.6. B). No entanto, neste caso não existiram diferenças significativas no número de meristemas por explante, ao 3º dia e ao 14º dia, mas verificou-se um aumento significativo no 21º dia após a transformação. Assim, observou-se que, a regeneração e o número de meristemas obtidos, em cada explante, foi inferior no 8º dia, embora essa redução tenha sido mais evidente na regeneração. A maior taxa de regeneração foi obtida no dia 0, mas o maior número de plantas por explante só se conseguiu no dia 21º, após transformação. Como se pode verificar pelos gráficos da Fig. 3.6., a taxa de regeneração teve uma recuperação a partir do 14º dia. Assim, verificou-se que a combinação com maior volume final de plantas putativamente transformadas (isto é: maior número de explantes com regeneração associado a maior número de rebentos por explante), foi a que teve a aplicação de antibiótico no meio no 21º dia, após transformação.

A sensibilidade aos antibióticos foi testada, somente, nas plantas de lúpulo, verificando-se que, a resistência aos antibióticos, sejam de resistência (Fig. 3.7 e 3.8), sejam os utilizados na eliminação do *Agrobacterium* (Fig. 3.9 e 3.10), variou com a concentração de antibiótico aplicada.

Na Figura 3.7, verifica-se que até uma concentração de 25mg/L a variação na capacidade de regeneração não é significativa, mantendo-se aproximadamente o número de explantes com capacidade regenerativa entre o controlo (sem can.) e os



meios com 6 ou 12,5mg/L (Fig. 3.7). Nos explantes colocados em 25mg/L de can. existe uma quebra na capacidade regenerativa, baixando significativamente o número de explantes com rebentos. Esta diminuição é traduzida num abaixamento de cerca de 5%, uma vez que no controlo temos cerca de 70% de regeneração e com 25mg/L a taxa de regeneração não atinge os 65%. Para os 50mg/L de can. esta diminuição é mais visível com uma regeneração de apenas 57%, verificando-se uma diferença para o valor do controlo de cerca de 13%.

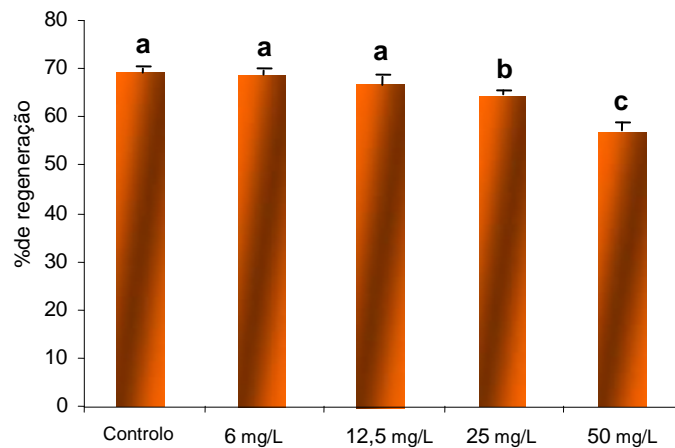


Figura 3.7: Percentagens de rebentos obtidos em meio de regeneração com diferentes concentrações de can. Os valores com letras iguais não diferem significativamente entre si ao nível de $p = 0,05$. (m+dp) = média + desvio padrão

Na Figura 3.8, está expressa a percentagem de rebentos por explante, verificando-se que o número de rebentos, por explante, baixa significativamente com o aumento da concentração de can. no meio.

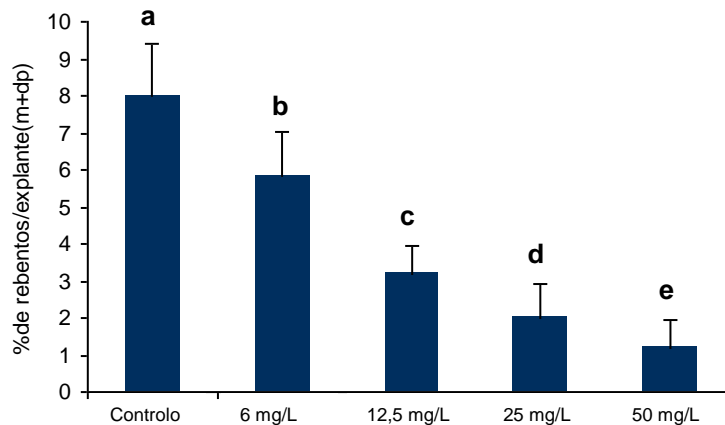


Figura 3.8: Efeito da concentração de can. na formação de rebentos por explante. Os valores com letras iguais não diferem significativamente entre si ao nível de $p = 0,05$. (m+dp) = média + desvio padrão



Contrariamente ao que se passa com a frequência de regeneração, o número de rebentos obtidos, por explante, nas diferentes concentrações de can., foi bastante inferior ao obtido no controlo. Verificou-se que em todas as concentrações testadas os valores obtidos em termos de rebentos/explante, sofreram uma variação significativa em relação ao controlo, baixando à medida que a concentração de antibiótico testada aumentava. Assim, para a concentração de 50mg/L de can. o número de rebentos por explante foi cerca de 1%, enquanto no controlo atingiu os 8%.

Da observação da Fig. 3.9. verifica-se que, para os antibióticos de eliminação das bactérias, o lúpulo resiste a concentrações elevadas, mantendo a capacidade regenerativa dos explantes, mesmo a essas concentrações. A bactéria é eliminada de um modo mais eficiente com a conjugação dos dois antibióticos utilizados.

Com a utilização de um só antibiótico, cef. ou carb., é possível eliminar as bactérias, contudo isso implica o recurso a grandes concentrações de antibiótico. Este facto constitui um aspecto negativo, na medida em que a taxa de regeneração é bastante baixa, não excedendo os 18%.

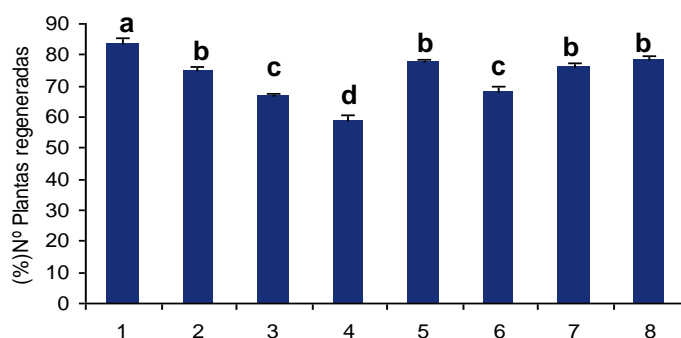


Figura 3.9.: Efeito dos antibióticos Cef. e Carb. na percentagem de regeneração dos explantes. Os valores com a mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de $p = 0,05$ (1) Controlo (explantes não sujeitos à presença dos antibióticos), (2) 250mg/L de cef./250mg/L carb., (3) 300mg/L cef./250mg/L carb., (4) 350mg/L cef./250mg/L carb., (5) 250mg/L cef., (6) 250mg/L carb., (7) 250mg/L de cef./200mg/L carb., (8) 200mg/L de cef./250mg/L carb.. (m+dp) = média + desvio padrão.

A conjugação dos antibióticos cef. e carb. com concentrações superiores a 250mg/L resultou em taxas de regeneração muito baixas. No entanto, a eliminação de contaminações bacterianas com concentrações de antibiótico inferiores a 250mg/L foi inviável e conduziu à morte dos explantes (Fig. 3.10.B). Assim, dos diversos ensaios efectuados verificou-se que, a acção conjunta dos antibióticos cef. e carb., em concentrações de 250mg/L, foi eficaz na eliminação do *Agrobacterium* e afectou pouco a regeneração dos explantes.

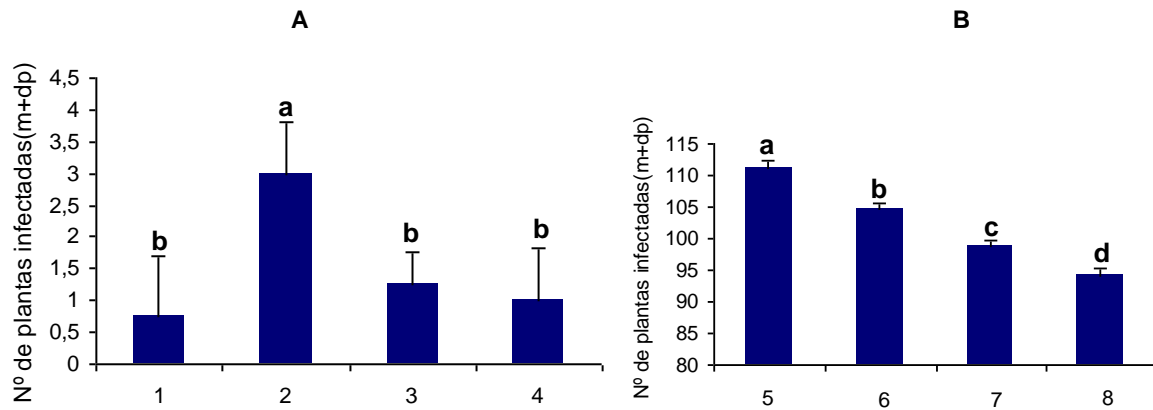


Figura 3.10: Número de plantas infectadas com bactérias, após utilização de diferentes concentrações de antibióticos (A) (1) Controlo, (2) 250mg/L cef. e 250mg/L carb., (3) 300mg/L cef. e 250mg/L carb., (4) 350mg/L cef. e 250mg/L carb.. Os valores com as letras a, e b, diferem entre si significativamente ao nível de $p=0,01$. (B) continuação do (A) (5) 250mg/L cef., (6) 250mg/L carb., (7) 250mg/L cef. e 200mg/L carb., (8) 200mg/L cef. e 250mg/L carb.. Os valores com as letras a, b, c e d diferem entre si significativamente ao nível de $p=0,01$.

Neste caso, as taxas de regeneração foram superiores a 90%, pelo que se optou pela utilização de 250mg/L de ambos os antibióticos nos ensaios posteriores.

3.3.3.2. Transformação mediada por *Agrobacterium*

Na optimização do processo de transformação mediada por *Agrobacterium*, testou-se a diluição da cultura de bactérias 1:50 (v/v) numa solução 0,3% de sacarose. Este procedimento não apresentou qualquer vantagem no processo de transformação, relativamente à cultura não diluída. Assim, optou-se por estabelecer uma metodologia sem recorrer à diluição das culturas de *Agrobacterium*.

Os resultados obtidos na transformação mediada por *Agrobacterium*, apontam para uma frequência de regeneração, após transformação, mais baixa que a obtida, quer no controlo, quer quando foi utilizado o bombardeamento de partículas. A frequência de regeneração utilizando o *Agrobacterium* é ligeiramente inferior (cerca de 6%), à das plantas controlo (Fig. 3.11.). Enquanto que a frequência de regeneração dos explantes transformados por bombardeamento de partículas foi de 23%, 3% inferior aos valores atingidos nas plantas controlo.

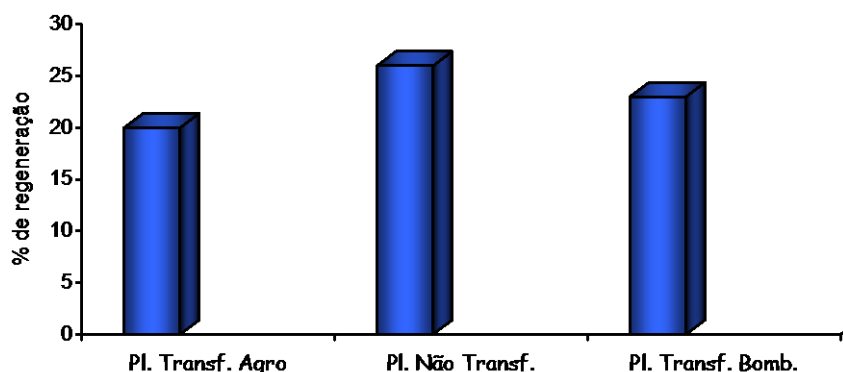


Figura 3.11.: Percentagem de regeneração após transformação. PI. Transf. Agro. – Plantas resultantes de transformação mediada por *Agrobacterium*; PI Não Transf. – Plantas controlo, não transformadas; PI. Transf. Bomb. – Plantas resultantes de transformação utilizando como método o bombardeamento de partículas.

3.3.3.2. Avaliação histoquímica da expressão transiente do gene *uid A*.

A determinação da expressão transiente do gene *uid A*, por análise histoquímica em explantes de *Nicotiana tabacum*, 10 dias após co-cultura, revelou uma taxa de marcação histoquímica da proteína do GUS de cerca de 90 %. Nesta marcação, obteve-se a formação de precipitados azuis, com coloração intensa, em diferentes zonas do explante. Subsequentemente, na análise histoquímica efectuada em explantes de lúpulo (Fig. 3.12. a, c, f), observou-se a presença de precipitados azuis, menos intensos que em *Nicotiana*, e com menor frequência. O teste histoquímico, realizado nos explantes de lúpulo, 10 dias após a co-cultura (Fig.3.12. e), apresentou uma taxa de resultados positivos (determinada com base na percentagem de explantes com marcação do GUS) de 70%, nos explantes transformados com a estirpe C1C58. Em corte longitudinal (Fig. 3.12. d), as células marcadas encontram-se junto aos feixes condutores. A planta não transformada (controlo) sujeita ao teste histoquímico não apresentou marcação para o GUS (Fig. 3.12. b).

A utilização de acetosseringona na co-cultura não apresentou vantagens significativas, uma vez que as percentagens de expressão transiente obtidas, com e sem acetosseringona, foram similares, 70,3% e 69,8% respectivamente. Os dados revelaram ainda que, independentemente da estirpe bacteriana usada, a expressão de gene *uid A*, que codifica para a β -glucuronidase, decresceu ao longo do tempo (Fig. 3.12. a, c, f), sendo inferior a 2% ao fim de 4 meses.

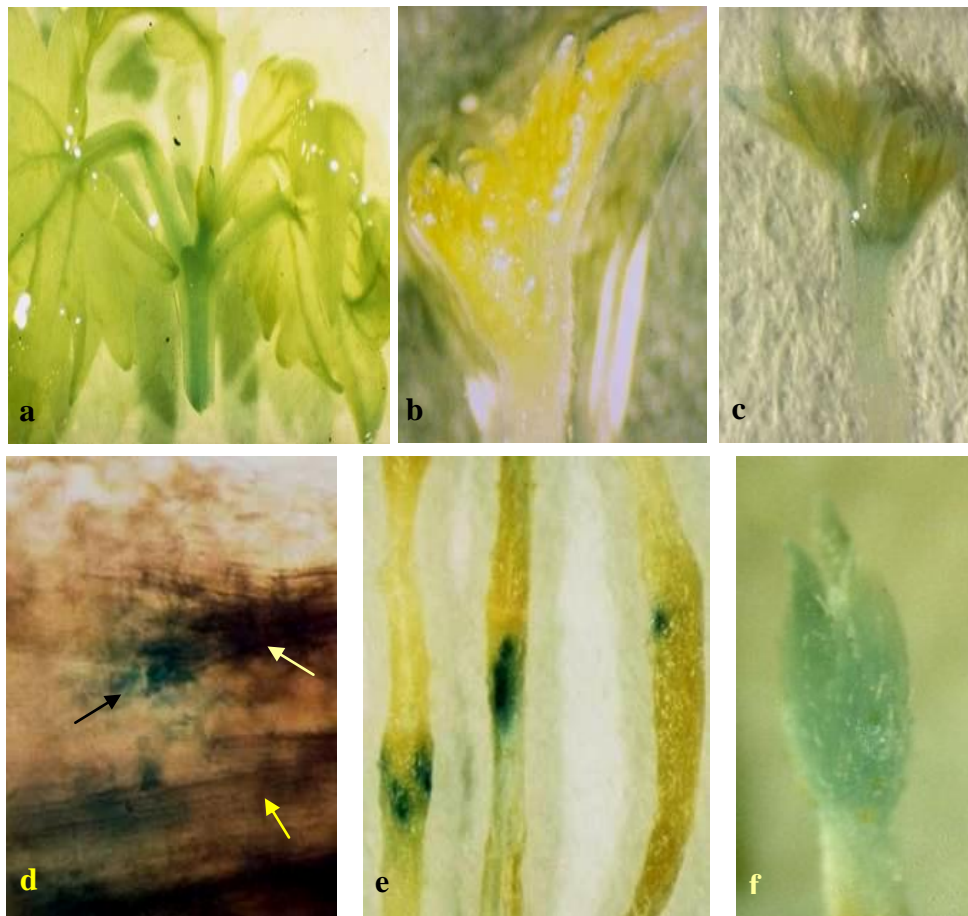


Figura 3.12.: **a)** Marcação histoquímica do GUS, num meristema, 3 meses após transformação, com a estirpe C1C58. **b)** Planta não transformada, sujeita ao teste histoquímico. **c)** Marcação histoquímica do GUS num meristema, após transformação com a estirpe LBA 4404. **d)** Observação de células marcadas em corte longitudinal (setas amarelas - feixes condutores; seta negra - células marcadas). **e)** Marcações histoquímicas do GUS, em explantes 10 dias após transformação, com a estirpe C1C58. **f)** Meristema com marcação histoquímica do GUS, de uma planta 2 meses após transformação, com a estirpe EHA 105.

Nos ensaios de transformação verificou-se que a utilização de 48h de pré-cultura foi mais eficiente, com percentagens de expressão transiente de 70% (em dois ensaios com 20 explantes cada). Nos ensaios em que se utilizou 26h de pré-cultura, a percentagem de expressão transiente não ultrapassou os 60%. Sem pré-cultura a expressão transiente foi mais reduzida, sendo os valores de 55% (Tabela 3.6.).

Tabela 3.6: Expressão transiente nos explantes em função do tempo de pré-cultura

	Explantes com marcação	Expressão transiente (%)	Nº total de explantes
Sem pré-cultura	22 (10+12)	55	40
Pré-cultura de 26h	24(10+14)	60	40
Pré-cultura de 48h	28(13+15)	70	40



Os resultados obtidos com as diferentes estirpes de bactérias: LBA 4404, EHA 105 e C1C58 contendo o plasmídeo p35SGUSINT, também mostraram algumas diferenças, embora estas não sejam igualmente significativas para cada estirpe, ao fim de 3-4 meses (Fig. 3.13.).

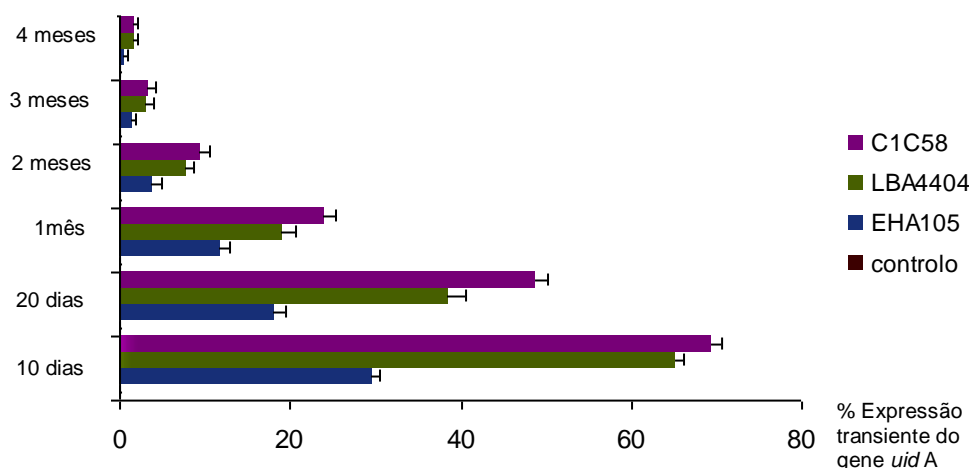


Figura 3.12: Variação da expressão transiente do gene *uid A*, em explantes de lúpulo. Explantes com marcação histoquímica do GUS positiva, ao longo dos primeiros 4 meses de cultura, após a transformação, com as estirpes de bactérias EHA105, C1C58 e LBA4404. (m+dp)= média + desvio padrão.

Os valores de percentagem de expressão transiente apresentados anteriormente dizem respeito aos ensaios efectuados com a estirpe C1C58, no caso das outras estirpes, os valores são mais baixos, verificando-se uma maior diferença para o caso da estirpe bacteriana EHA 105. Nesta estirpe, os valores de expressão de GUS não ultrapassaram os 30 % inicialmente, baixando após 3-4 meses para níveis da ordem dos 0,5 %. No caso da estirpe LBA 4404, os valores foram mais aproximados dos valores obtidos para a estirpe C1C58, sendo de 65 % os valores obtidos após 10 dias e de 1,8 % após 3-4 meses de cultura (Fig. 3.13.).

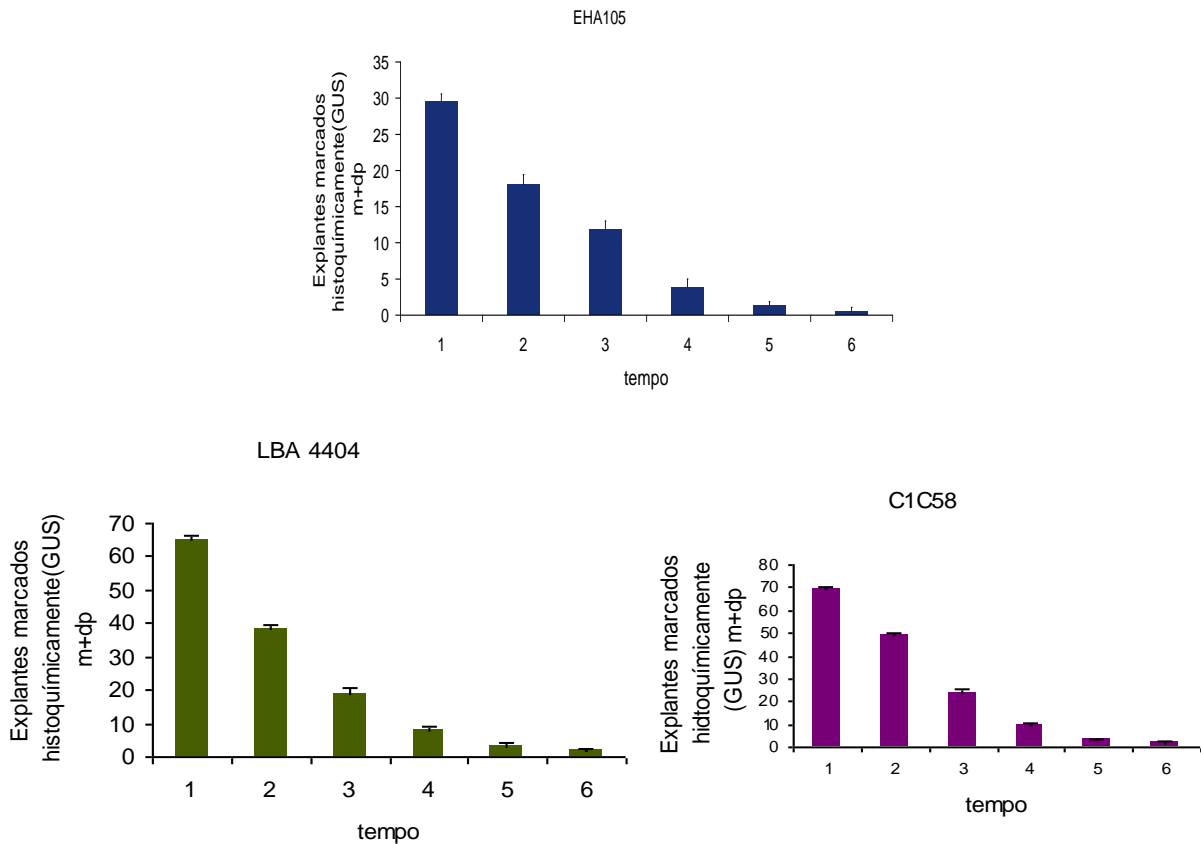


Figura 3.12: Variação da expressão transitória do gene *uid A*, ao longo dos primeiros 4 meses de cultura, para as estirpes bacterianas, EHA105, C1C58 e LBA 4404. os nº1;2;3;4;5;6 dos gráficos são respectivamente 10 e 20 dias, 1, 2, 3 e 4 meses.

Após o processo de transformação, os explantes foram cultivados em meio de selecção durante os 2 meses seguintes, em caixas de Petri, tendo formado rebentos no primeiro mês após transformação (Fig. 3.14.b). As plantas obtidas foram seleccionadas para análise por PCR, para determinação da presença do gene *uid A*. Em 2% do total de plantas obtidas, a pressão selectiva da can. só foi visível ao fim de duas passagens por meio com antibiótico (aproximadamente 4 meses). Nos primeiros 2 a 3 meses em meio de cultura com antibiótico, estas plantas apresentaram um fenótipo em tudo igual às plantas controlo. Assim, só depois de 4 meses em meio de selecção (meio com antibiótico) com 50mg/L de can., foi possível observar na planta sintomas de sensibilidade ao antibiótico: perda de clorofila e início de necrose que, acaba por levar à morte da planta (Fig. 3.14.a e 3.14.c). Deste modo, somente após 4 meses foi possível observar a resistência das plantas em cultura, de um modo mais objectivo, pelo que se optou por analisar as plantas por PCR, após 4 meses de cultura em meio selectivo.



Figura 3.14.: **a)** Planta em meio de seleção com 50mg/L de can. após 4 meses de cultura. **b)** Explantes em caixas de Petri, com meios de seleção, no primeiro mês após transformação (setas - rebentos). **c)** Várias plantas transformadas, em tubo com meio de seleção, após 4 meses. As plantas são todas da mesma idade e duas delas apresentam clorose por sensibilidade ao antibiótico (setas).

3.3.4. Transformação genética por bombardeamento de partículas

Os resultados para os diferentes ensaios de pressão e distância mostraram que, para este material (entrenós), a pressão em que foram obtidos resultados significativos foi a de 1500 psi à distância de 9 e 6cm, e 2000 psi à distância de 6cm (Tabela 3.7). Para a pressão de 2000 psi, as plantas transformadas com os “carriers” a uma distância de 6cm, apresentam valor estatisticamente significativo de número de pontos de marcação da expressão de GUS (manchas azuis) (Fig. 3.15). Para a pressão de 1300 psi, a todas as distâncias, observou-se, no teste histoquímico, um número bastante inferior de marcas da presença do gene *uid A*, e os valores não foram estatisticamente significativos. Os resultados obtidos com a construção 35SGUSINT serviram de base para a transformação com a construção com a *cpArMV*. Assim, a pressão de 1300 psi foi abandonada nos ensaios de transformação seguintes. A



distância de 6cm e 2000 psi de pressão também não foram utilizadas nos ensaios seguintes, tendo-se optado pela pressão de 1500 psi nas duas distâncias mais curtas.

Tabela 3.7.: Expressão transiente em entrenós de lúpulo bombardeados com p35SGUSINT. Os resultados estão expressos em explantes com manchas azuis. Os dados foram testados com o programa ACTUS. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$. Entre parêntesis encontra-se a percentagem de frequência das manchas azuis nos explantes.

Pressão (psi)	Distância (cm)		
	6	9	12
1300	255 (56,3%)	208 (41,5%)	370 (73,8%)
1500	394** (98,5%)	295** (43,8%)	370 (64,8%)
2000	175** (43,8%)	323 (80,8%)	179 (44,8%)

O material bombardeado com o p35SGUSINT foi também testado quanto à presença dos genes *uid A* e *npt II*, por PCR. O plasmídeo com a construção para o gene *cpArMV* também apresentou resultados que foram no entanto somente analisados por PCR, uma vez que não tem o gene *uid A*, na construção.

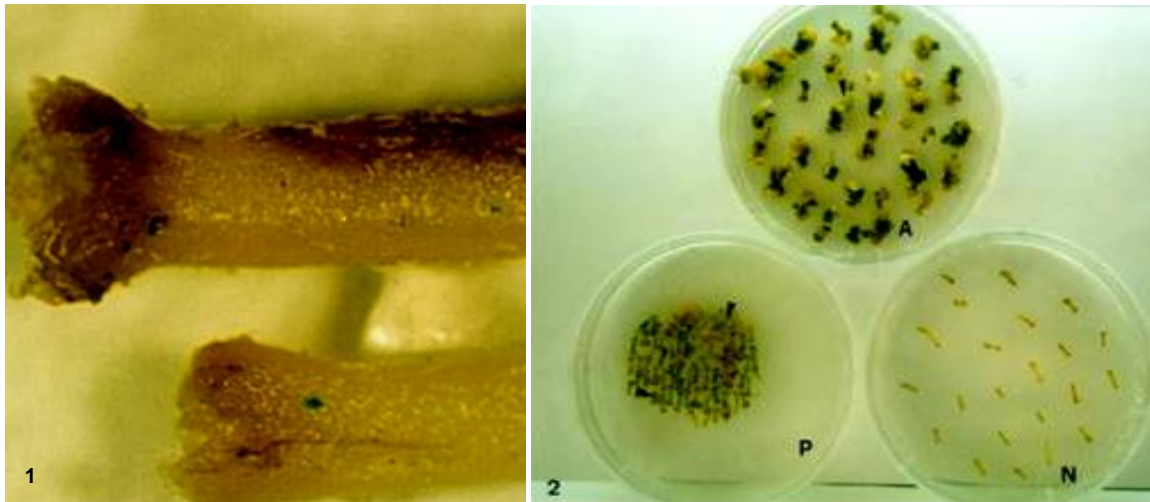


Figura 3.15.: Marcação histoquímica com X-Gluc, da actividade da β -glucuronidase (Gluc) em explantes de lúpulo 1) Entrenós transformados por bombardeamento de partículas. 2) **A)** Entrenós em meio de selecção após transformação mediada por *Agrobacterium*. As setas assinalam meristemas. **P)** Entrenós em meio de selecção, após transformação com bombardeamento de partículas. As setas assinalam meristemas. **N)** Entrenós controlo, não transformados, em meio de selecção.



3.3.5. Análise molecular das plantas

3.3.5.1. Avaliação da presença do gene *uid A* por PCR

Foram obtidas plantas putativamente transformadas de *Humulus lupulus*, quer após transformação mediada por *Agrobacterium*, quer após bombardeamento de partículas (Fig. 3.15.2) Nos ensaios em lúpulo utilizando o p35SGUSINT com o gene marcador *uid A* e gene de selecção *npt II*, obtiveram-se 50 plantas em que a presença dos genes foi confirmada, por PCR, 2 meses após a transformação (tempo correspondente a uma subcultura). Findo este período, as plantas analisadas deixavam, com frequência, de apresentar, no gel dos produtos de PCR, a banda correspondente aos genes introduzidos, o que, no caso do gene *uid A*, confirma os resultados obtidos nos testes histoquímicos feitos anteriormente (Fig. 3.13).

A Fig. 3.16 mostra a frequência de integração dos genes *uid A* e *npt II*, nas plantas putativamente transformadas, ao fim de 2 e 4 meses após transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. A frequência de integração do gene *uid A* foi inferior à do gene *npt II*, quer inicialmente, quer ao fim de quatro meses. Analisando os valores de cada um dos genes, nos dois tempos testados, observou-se que os dois genes apresentaram valores de detecção diferentes, sendo a taxa de detecção aos dois meses de 39,4 % para o gene *uid A* e de 85,3 % para o gene *npt II*.

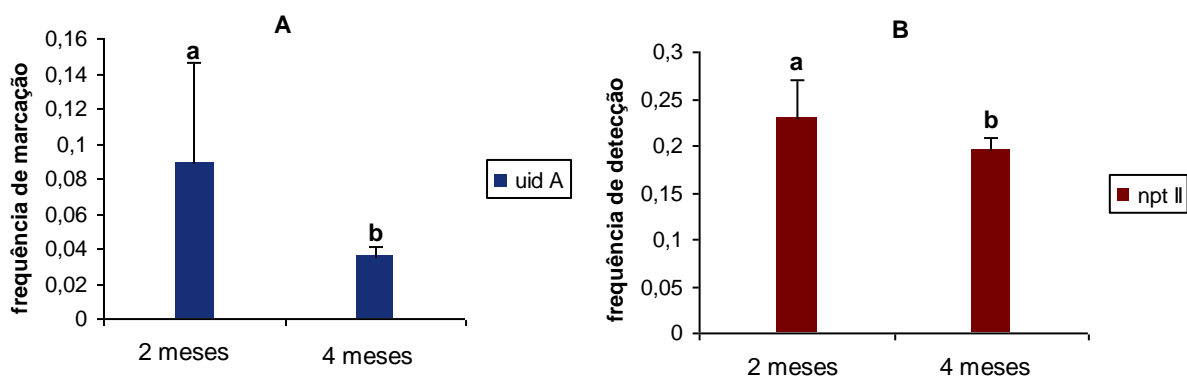


Figura 3.16.: Frequência de detecção dos genes *uid A* (A) e *npt II* (B) ao fim de 2 e 4 meses (m+dp). Em cada gráfico os valores com as letras **a**, e **b**, diferem entre si significativamente ao nível de $p=0,01$.

Comparando as taxas de detecções dos dois genes, verificou-se que o gene *uid A* teve uma taxa 45,9% inferior à do gene *npt II*, e aos quatro meses essa taxa diminuiu 20,8% estabelecendo-se em 18% (Fig.3.17.). Assim, não só os valores de marcação dos dois genes foram diferentes, como essa diferença não foi constante no tempo, sendo mais evidente ao fim de dois meses.

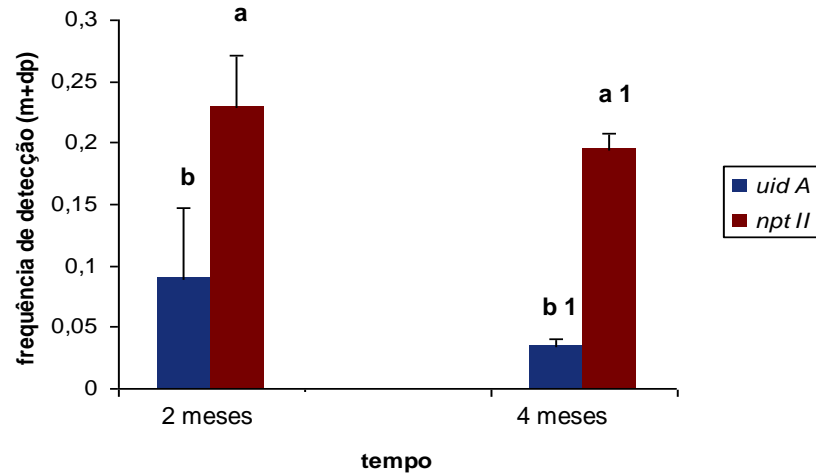


Figura 3.17.: Variação da frequência de detecção dos genes *uid A* e *npt II*, em plantas analisadas 2 e 4 meses após transformação. (m+dp)=média+desvio padrão. Valores com letras **a**, e **b**, diferem entre si significativamente ao nível $p=0,01$. Valores com letras **a1**, e **b1**, diferem entre si significativamente ao nível $p=0,01$.

A análise das plantas transformadas por PCR (Fig. 3.18.), revelou que a detecção do gene *npt II* foi mais frequente, do que a do gene *uid A*.

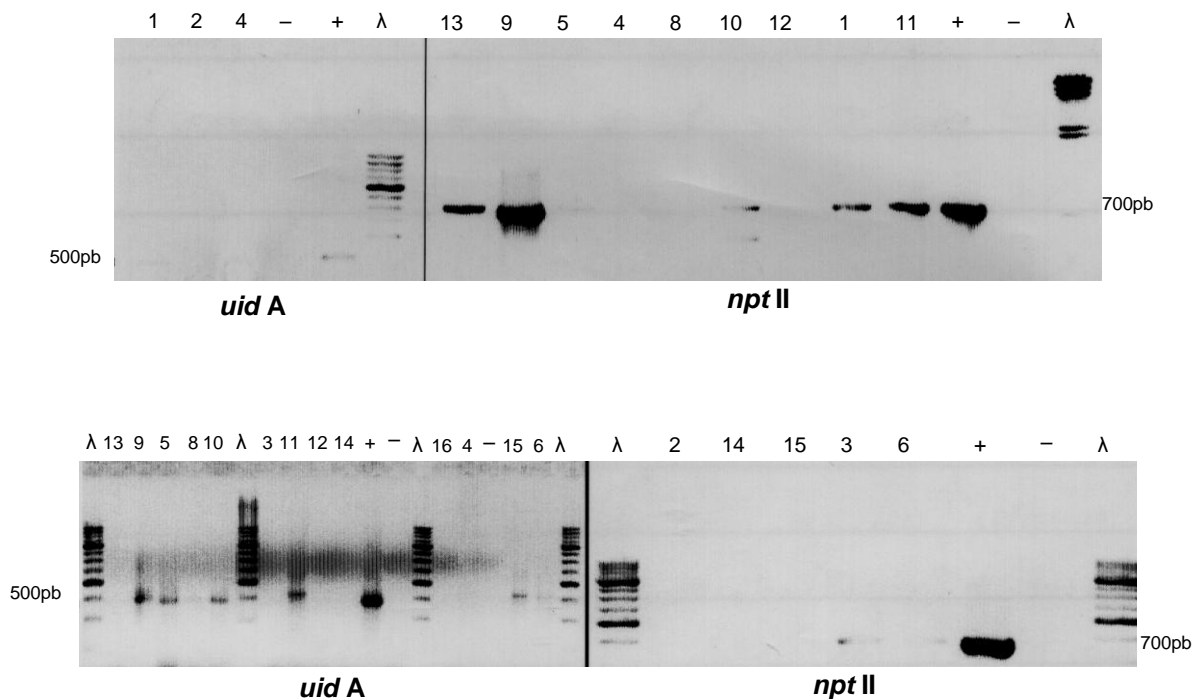


Figura 3.18.: Amplificação dos genes *uid A* e *npt II* a partir de DNA genómico de plantas de lúpulo transformadas. (λ) Marcador molecular; (+) positivo (fragmento do gene isolado por PCR); (-) negativo (mistura de reacção sem DNA); amostras **1, 2, 3 e 4** plantas transformadas por bombardeamento; **5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16**, plantas transformadas por *Agrobacterium*.



Em todas as plantas analisadas, esta diferença na detecção foi constante e, semelhante à expressão transiente do gene *uid A*, determinada histoquímicamente.

Verificou-se que, apesar de o gene *npt II* estar em várias plantas, as mesmas, uma vez analisadas para a presença do gene *uid A*, não apresentaram marcação (ex: 1). Algumas plantas não apresentaram marcação para o gene *uid A*, nem marcação para o gene *npt II* (ex: plantas 4, 8, 2). Existiu marcação para o gene *npt II* mas, não para o gene *uid A* (ex: plantas 3, 1, 10, 13). Verificou-se ainda, num número reduzido de plantas, a marcação para o gene *uid A*, e ausência de marcação para o gene *npt II* (ex: planta 15).

A regeneração e o desenvolvimento das plantas transformadas não foram alterados após a transformação. Parte das plantas analisadas foram posteriormente transferidas para vaso, sendo esta aclimação um processo em tudo semelhante ao efectuado para as plantas regeneradas, com uma percentagem de sucesso equivalente.

Nos testes feitos a plantas transformadas com o gene da *cpArMV* obtiveram-se resultados semelhantes (Capítulo 5). Verificou-se que, tal como anteriormente, nem todas as plantas expressavam os dois genes da construção (*cpArMV* e *nptII*) de igual modo.

Na tabela 3.8 apresenta-se os resultados obtidos na transformação dos explantes de lúpulo com a construção do gene da cápside viral do ArMV. As plantas, que constam da tabela, foram posteriormente analisadas, sendo os resultados dessas análises apresentados no Capítulo 5.

Tabela 3.8: Resultados da transformação com construção pROKArMV

	Transformação com <i>Agrobacterium</i>	Transformação com bombardeamento de partículas
Nº de explantes sujeitos a transformação	3000	2625
Nº de plantas regeneradas em meio de selecção com canamicina	1290	1443
Nº de plantas resistentes a 2 subculturas em meio de selecção com canamicina	200	130

Dos explantes sujeitos ao processo de transformação, somente 2 plantas mostraram manter o gene introduzido de um modo estável. Esta estabilidade traduziu-se na manutenção do gene durante, pelo menos, 2 anos após a transformação. Numa fase precoce o gene foi detectado por PCR durante 6 a 8 meses, após o que deixou de



ser detectável. As plantas em que o gene permaneceu integrado nos respectivos genomas, foram analisadas por Southern blotting e Northern blotting (resultados apresentados no Capítulo 5). Nestas plantas, a expressão do gene da cápside viral foi testada por DAS-ELISA, sendo os resultados dessas análises apresentados no Capítulo 5.



3.4. DISCUSSÃO

3.4.1. Obtenção de plantas livres de vírus

A determinação de infecções virais nas plantas que serviram de base a todo o trabalho posterior de transformação, revelaram que, de um modo geral, as plantas apresentavam um estado fitossanitário satisfatório. Os valores obtidos no caso das plantas de Br demonstraram infecção com o vírus PNRSV em apenas um quinto do “stock” de plantas, o que permitiu a utilização das restantes 80% como material de partida para a transformação. O processo de determinação por DAS-ELISA, das infecções virais, mostrou ser uma ferramenta apropriada, embora existam registos de alguns vírus que permanecem nas plantas *in vitro* em títulos suficientemente baixos, pelo que não são detectados com este método (Knapp *et al.*, 1995). No entanto, o leque de vírus analisado pareceu-nos suficientemente alargado e os valores de DAS-ELISA suficientemente baixos (nos 80% não infectados), para nos permitirem a utilização das plantas “stock” em transformação com segurança. Actualmente é possível utilizar outros métodos de detecção como RT-PCR (reverse transcriptase PCR), PCR-imunocaptura, cromatografia líquida e PCR em tempo real (Eun *et al.*, 2000; Beuret, 2004). Embora estes sejam métodos mais sensíveis e nalguns casos capazes de determinar e quantificar vírus, são métodos excessivamente dispendiosos. Outros trabalhos utilizaram igualmente com sucesso DAS-ELISA de rotina, na determinação das infecções virais (Abbott *et al.*, 1993; Spielmann *et al.*, 2000; Pang *et al.*, 2000; Johansen *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; François *et al.*, 2002).

3.4.2. Termoterapia

O método de aplicação de temperaturas elevadas (entre 30 e 36°C) às plantas *in vitro*, para eliminação de viroses, já é utilizado desde os anos 50 do século XX (Posnette & Cropley, 1956; Welsh & Nyland, 1965; Vine & Jones 1969; Adams, 1975; Probasco & Winslow, 1986) quer utilizando só a temperatura, quer associando-a ao isolamento dos meristemas apicais. A eliminação dos vírus depende, não só do vírus em causa, como das próprias plantas infectadas (Knapp *et al.*, 1995). Embora ainda não seja completamente claro, pensa-se que a eliminação dos vírus estará associada tanto à inactivação das partículas virais na planta infectada, como à inactivação da própria síntese das ditas partículas, por parte do vírus, por inactivação de, entre outras, moléculas da replicase viral (Dijkstra & Jager, 1998). As infecções virais estão



dependentes de duas vertentes: a infecção célula a célula e a infecção a longa distância, e qualquer delas, dependente de uma interacção entre o vírus e o hospedeiro. As proteínas virais responsáveis pelo movimento, a longa distância e célula a célula, estão intimamente ligadas às estruturas citoplasmáticas, relações que implicam gastos de energia (Carrington *et al.*, 1996). A temperatura mais elevada, a actividade metabólica das células hospedeiras é alterada, condicionando assim a formação e a actividade das proteínas virais responsáveis pelo movimento. A termoterapia associada ao isolamento de meristemas *in vitro* (Chiari & Bridgen, 2002), assegura de um modo geral, mesmo nos vírus que se sabe que conseguem invadir os meristemas apicais, a obtenção de plantas livres de vírus. Em muitos casos estes métodos são já utilizados comercialmente, para a obtenção de plantas “stock” isentas de vírus e para o intercâmbio de material vegetal a nível internacional. De entre as plantas comerciais utilizadas pode-se destacar-se o morangueiro, a batateira e várias plantas ornamentais (Dijkstra & Jager, 1998).

Da análise dos nossos resultados verificou-se a ocorrência de necrose de alguns meristemas, que nos parece estar relacionada, preponderantemente, com a manipulação dos meristemas aquando do seu isolamento. Embora a bibliografia refira, como causa de morte, a utilização de material de vidro, pela toxicidade do cobre e chumbo presente no vidro (Dijkstra & Jager, 1998), neste trabalho foi utilizado, exclusivamente, material de Pyrex®, pelo que esse problema não se põe. O facto de se terem obtido plantas livres de vírus após este tratamento (os testes foram repetidos 6 meses depois, com resultados positivos), leva-nos a concluir que o processo de termoterapia e ulterior isolamento de meristemas foram eficientes para a eliminação de viroses de lúpulo, como verificado em trabalhos anteriores com esta (Adams, *et al.*, 1975; Matousek *et al.*, 1995) e outras espécies (Knapp *et al.*, 1995; Dijkstra & Jager 1998). A temperatura de terapia terá sido a indicada, e o isolamento feito com meristemas suficientemente reduzidos para permitir a efectiva limpeza de vírus dos mesmos. Parâmetros fundamentais na sobrevivência do material manipulado e na efectiva eliminação dos vírus.

3.4.3. Antivírus químico

A obtenção de plantas livres de vírus após utilização do antivírus Isoprinósina, foi eficaz para os vírus testados neste trabalho, visto que se conseguiu este objectivo sem que o crescimento e normal desenvolvimento das plantas fossem comprometidos.

Os dois métodos de utilização deste composto antiviral, testados neste trabalho, mostraram que em qualquer um dos casos foi possível obter plantas isentas de vírus. Os



resultados obtidos com a utilização do antivírus filtrado foram melhores, tendo-se obtido, cerca do dobro das plantas, comparativamente com a utilização do antivírus autoclavado.

Atendendo à maior percentagem de morte no material vegetal e ao número inferior de plantas isentas de vírus obtidas no tratamento com antivírus autoclavado, comparativamente com os resultados obtidos com a utilização de antivírus filtrado, podemos considerar que durante a autoclavagem houve alteração do meio. Assim, várias hipóteses se põem: (1) A alteração seria de parte das moléculas do composto, podendo essa alteração ser de algum modo tóxica para as plantas e limitaria o grau de eficiência antivírica do composto. (2) Não há toxicidade do composto apesar da alteração do pH comprometer a capacidade antivírica do mesmo. (3) A alteração do meio, mais liquefeito e com maior acidificação, poderá ser a causa destes resultados. Visto que a acidificação poderá alterar a tomada dos minerais do meio, e a anóxia associada à maior liquidez do meio, compromete a respiração e consequentemente sobrevivência das plantas. Para testar estas hipóteses teriam que ser feitos mais ensaios com antivírus autoclavado, a pH superior, de molde a controlar a acidez e liquidez do meio, para que esses parâmetros sejam desprezáveis em futuros testes com antivírus autoclavado.

O modo como este composto actua na planta deverá ser objecto de estudo ulterior. Na bibliografia disponível, não se encontram referências à utilização deste tipo de compostos, como meio de tratamento de plantas. O antivírus utilizado é prescrito para o combate a vírus animais e, embora existam diferenças nos processos de infecção entre vírus animais e vegetais, alguns passos e características são semelhantes, razão pela qual decidimos testá-lo. A diferença mais importante será talvez o modo de dispersão pelo hospedeiro. Os vírus vegetais têm de ultrapassar uma barreira extra, a parede celular das células que infectam. Dado que este composto revelou alguma eficácia no controlo da infecção viral, e sendo originalmente aplicado a vírus animais, sugere que, o seu modo de acção não estará relacionado com um efeito na mobilidade do vírus, mas sim na sua própria expressão, como agente infeccioso.

3.4.4. Transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Vários factores influenciam a capacidade de transferência de genes entre *Agrobacterium* e o material vegetal, nomeadamente, a estirpe bacteriana, condições de crescimento e estado fisiológico das plantas e da bactéria, métodos e tempos de co-cultura, métodos de inoculação bacteriana, tempos de aplicação e concentração de antibióticos, sejam de eliminação, ou de selecção do material transformado (Amoah *et al.*,



2001) a presença ou não, de fitorreguladores no meio de co-cultura (Gutiérrez-E, *et al.*, 1997). Todos estes factores condicionam a eficácia do processo de transformação. Sendo essencial determinar as condições óptimas, para cada espécie ou, variedade de planta utilizada, uma vez que, mesmo para variedades diferentes de uma mesma espécie, as condições óptimas podem ser diferentes (Nontaswatsri *et al.*, 2004). O facto de existir um método otimizado de regeneração, não implica que esse seja o melhor meio de produção de plantas transformadas, uma vez que as células vegetais podem ter competências diferentes para regeneração e transformação (Geier & Sangwan, 1996).

Verificou-se que o tipo de estirpe bacteriana e de vectores de expressão podem ser determinantes para o processo de transformação em plantas diferentes e mesmo em explantes diferentes (zonas diferentes da planta utilizadas como alvo da transformação) (Amoah *et al.*, 2001). A transferência do T-DNA pode ser afectada pelo tamanho e/ou organização da região, dando origem a duplas cadeias intactas, ou a diferentes formas de cadeias simples do T-DNA (Steck, 1997), o que poderá ter efeito na mobilidade e introdução deste nos tecidos a transformar.

3.4.4.1. Sensibilidade a antibióticos

Os resultados obtidos para os antibióticos de eliminação da bactéria permitiram concluir que a melhor opção foi a combinação de cef. e carb. nas concentrações de 250/250mg/L. Consideramos esta a melhor combinação de concentrações, visto que permitiu a eliminação das bactérias sem comprometer a capacidade regenerativa dos explantes vegetais.

A utilização de dois antibióticos para a eliminação das bactérias, está relacionada com a menor eficiência demonstrada por cada um deles, quando usados separadamente. A dificuldade na eliminação das contaminações bacterianas poderá estar associada ao facto de o lúpulo ter a sua epiderme completamente revestida de diferentes tipos de tricomas, que dificultam a acção química na superfície do material vegetal. Assim, embora a concentração de antibiótico usada tenha sido elevada, a mistura de antibióticos permitiu eliminar as bactérias e não ser excessivamente nociva para as células vegetais. Estes resultados podem ainda estar relacionados com o facto de a cef. ser descrita como um antibiótico capaz de promover a regeneração de meristemas, em diferentes espécies (Yepes & Aldwinkle, 1994; Pinto Sintra, 2001).

A utilização de acetosseringona na co-cultura é descrita como indutor da transcrição dos genes de virulência do *Agrobacterium*, tendo o seu papel sido demonstrado em transformação genética de diferentes espécies lenhosas (James *et al.*,



1993; Cervera *et al.*, 1998, Miguel 1998; Ramesh *et al.*, 2004). No entanto, neste trabalho não se revelou determinante na obtenção de material transformado. O mesmo resultado já foi descrito em lúpulo, por outros autores (Oriniakova *et al.*, 1999), para uma variedade diferente. Este facto poderá ser explicado por o seu efeito promocional ser dependente da espécie usada, do genótipo da planta, e da estirpe bacteriana usada (Godwin *et al.*, 1991; Ainsley *et al.*, 2001).

A aplicação de can. ao meio de selecção, sendo um antibiótico bastante selectivo, e um dos mais utilizados, vai também depender da sensibilidade revelada pelas células vegetais. Deste modo o tempo de aplicação, e a quantidade aplicada, dependem do material vegetal utilizado. Enquanto algumas plantas são bastante resistentes a este antibiótico, como é o caso da noqueira, que se pensa seja devido à existência de actividade da canamicina fosfotransferase endógena (Dandekar, 1992), outras apresentam extrema sensibilidade, como são os casos de *V. rupestris*, *Rubus*, *Prunus dulcis*, *Castanea sativa*, *Vitis vinífera*, (Fiola *et al.*, 1990; Gray & Meredith, 1992; Seabra 1998; Pinto Sintra, 2001). No caso do lúpulo, a sensibilidade é elevada, uma vez que as plantas testemunha morreram na presença de pequenas quantidades de can., ou seja, não deverá existir canamicina fosfotransferase endógena nestas plantas. Considera-se que a can. pode ser responsável pela inibição da regeneração de células transformadas, mesmo quando estas produzem neomicina fosfotransferase, isto porque, essas células serão inibidas pela morte das células circundantes, não resistentes à can. (Draper *et al.*, 1988). Nas células transformadas de lúpulo, algo de semelhante acontece, uma vez que a selecção inicial mais adequada será a de 25mg/L de can. Se for utilizada uma quantidade superior, o material acaba por não regenerar, possivelmente por inibição das células envolventes que não resistem e morrem. Se a can for colocada no meio mais tarde, após a transformação (ex: 25 dias), a concentração de can. suportada, é mais elevada (50mg/L). Nesta fase, as células transformadas já se multiplicaram e iniciaram a regeneração dos meristemas, o que permite uma maior resistência à inibição provocada pela eventual morte das células circundantes não transformadas. No entanto, a aplicação de pressão selectiva aos transformantes, mais tarde no processo de regeneração, poderá dar origem a um maior número de quimeras. A possibilidade de aparecerem células que regeneram sem estarem transformadas, num meio de selecção, poderá estar relacionada com a inactivação da can. pelas células circundantes transformadas, durante o desenvolvimento meristemático (Maximova *et al.*, 1998).



3.4.4.2. Estudo da detecção da integração do gene *uid A* e *npt II*

Os resultados desta avaliação permitem-nos concluir que, embora o resultado seja apenas indicativo, visto que alguns dos explantes que mostraram resultados positivos, mais tarde se revelaram negativos, o gene *uid A*, não apresenta os mesmos valores de marcação que o gene de selecção *npt II*, apesar de se encontrarem na mesma construção. Confirmou-se que os valores de marcação histoquímica e de detecção dos genes por PCR diminuem ao longo do tempo, de modo semelhante no caso deste gene, *uid A*, (Seabra, 1998). A expressão transiente do GUS tem origem, maioritariamente, nas cópias de T-DNA não integradas, e como tal não está, necessariamente, relacionada com a integração estável do transgene. No entanto, estes ensaios podem servir de guia durante o processo de transformação, como se pode verificar dos vários registos de trabalhos em que são utilizados (Wagmann & Zambryski 1995; Gutiérrez-E, *et al.*, 1997; Okada *et al.*, 2001; Ainsley *et al.*, 2001; Amoah *et al.*, 2001; Ramesh *et al.*, 2004). Da observação dos resultados de transformação obtidos, com as diferentes estirpes de *Agrobacterium* utilizadas (em todas as transformações com o gene *uid A*, a construção utilizada foi a p35SGUSINT), pode concluir-se que a estirpe mais eficiente na transferência do T-DNA foi a C1C58 (com mais de 70 % de expressão transiente), embora os resultados com a estirpe LBA4404 tenham sido aproximados (65 % de expressão transiente). Estes resultados revelaram que a estirpe LBA4404 foi eficaz na transformação de plantas de lúpulo, como se verifica pelos valores de expressão transiente obtidos, concordantes com referências anteriores (Spielmann *et al.*, 2000). Assim, visto que a construção original para o gene da *cpArMV* (Da Câmara Machado *et al.*, 1992) utilizava esta estirpe, optou-se pela sua utilização nas transformações subsequentes mediadas por *Agrobacterium*.

A variabilidade na virulência das estirpes de *Agrobacterium*, para determinadas dicotiledóneas, está directamente relacionada com a eficiência dos genes *vir* envolvidos na transferência do T-DNA, e por outro lado, no tipo de cromossoma da estirpe utilizada (Armitage *et al.*, 1988). Embora a estirpe EHA 105, tenha um plasmídeo “Helper “ T-DNA derivado do pTiBo542, que é um plasmídeo Ti hiper-virulento da *A. tumefaciens* A281 (Hood *et al.*, 1993), e o oncogene da estirpe parental da EHA105, os resultados não foram os esperados. Sendo a hipervirulência da estirpe A281 relacionada com o *loci vir G* e 3'- *vir B* (Jin *et al.*, 1987), esperaríamos que resultasse numa maior transcrição dos genes *vir*, o que teria como consequência, um aumento da eficiência no transporte do T-DNA através das paredes celulares bacterianas (Van Wordragen & Dons, 1992). No entanto, apesar destas características, o que se verificou foi uma menor eficácia na transferência do T-DNA por esta estirpe. Dependendo da espécie, as plantas podem ter



susceptibilidades diferentes às várias estirpes de *Agrobacterium*. Essa diferença está associada à toxicidade das estirpes de bactérias que, pode ter origem nas suas diferentes taxas de crescimento, produção de polissacáridos, etc. (Armitage *et al.*, 1988).

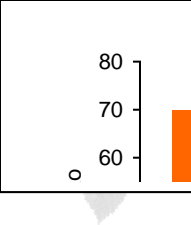
O período de pré-cultura teve um efeito benéfico nas frequências de transformação no lúpulo, sendo a extensão desse período um dado também determinante na obtenção de mais explantes transformados. O efeito deste período não é muito claro, existindo registos de espécies em que longos períodos de pré-cultura são negativos para a transformação (De Bondt *et al.*, 1994; Janssen & Gardener, 1993). No entanto, noutros casos o período de pré-cultura revelou-se importante, por permitir que os tecidos vegetais recuperassem das feridas, permitindo um tempo para ultrapassar o stress e, estabelecer a divisão celular. A integração do T-DNA ocorre quando as células vegetais estão em divisão, o que significa que, nessa fase, será muito superior o número de explantes capazes de expressar a actividade da β -glucuronidase, porque a probabilidade de haver integração, será também, muito superior. Assim, ao estabelecer um período de pré-cultura, permite-se que haja um desfaseamento de tempo entre a presença das bactérias e o início da divisão celular das células do lúpulo, o que acerta os dois tipos de células para uma fase que beneficia a sua inter-relação. Dos resultados obtidos (superiores em cerca de 44 % para o corte às 48h, comparativamente com o corte às 26h), essa fase deverá ser de aproximadamente 48h.

3.4.5. Transformação genética por bombardeamento de partículas

3.4.3.2. Estudo da detecção da integração do gene *uid A* e *npt II*

Trabalhos realizados com a técnica de bombardeamento de partículas, permitem verificar que se o DNA é transferido directamente, no interior de células activamente em divisão, será possível obter uma maior quantidade de células transformadas (Birch, 1997). Este será também um modo de ultrapassar o problema da dependência genética das estirpes de *Agrobacterium*, e a variabilidade na toxicidade para as células vegetais (Christou, 1995). De acordo com estes pressupostos, e tendo em conta que a frequência de regeneração com transformação mediada por *Agrobacterium*, foi baixa, este método de transformação foi igualmente testado neste trabalho.

Os testes de expressão transiente foram feitos para grande número de explantes, uma vez que o número de variáveis a otimizar no processo de transformação, utilizando o bombardeamento de partículas, é elevado. De entre os parâmetros a testar, a profundidade de penetração das partículas, a força de impacto, o tamanho das partículas.



Vários destes parâmetros, sendo puramente físicos, são mais claros nos resultados, permitindo opções mais lineares. Uma vez que é fundamental atingir a células competentes para a regeneração, um dos parâmetros mais importantes será a profundidade de penetração. A tecnologia utilizada mostrou, já no passado, ser apropriada, permitindo a obtenção de transformantes em diferentes espécies (Christou *et al.*, 1991; McCabe & Martinell, 1993; Miguel, 1998).

Os resultados de PCR confirmaram os resultados histoquímicos do material transformado, ou seja, que a integração deste gene no genoma da planta não é sempre estável, podendo perder expressão após algum tempo de transformação (vários meses). O mesmo não se passa com o gene que codifica para a resistência ao antibiótico can, que se mostrou muito mais estável. Com base nestes resultados podemos considerar que o problema pode ser de duas ordens, ou a construção utilizada não permite uma integração estável deste gene no genoma da planta, ou o processo de transformação não será o mais apropriado. Para além disso, podemos considerar o lúpulo como uma planta recalcitrante, com sérias dificuldades na obtenção de transformação genética estável, atendendo a que, noutros trabalhos realizados com lúpulo (Horlemann *et al.*, 2003), se verificou que a integração estável foi obtida com a mesma dificuldade. Deste modo podemos considerar que o plasmídeo usado terá sido demasiado grande, o que pode ter levado a problemas no bombardeamento, uma vez que plasmídios de tamanho superior a 10 kbp podem sofrer fragmentação no processo de bombardeamento (Birch, 1977). Os plasmídios utilizados estavam muito próximos ou ultrapassavam esse limite.

Podemos concluir que quer na transformação mediada por *Agrobacterium*, quer no bombardeamento de partículas, 48h de pré-cultura dos explantes permitem a obtenção de maior número de transformantes. Com igual objectivo, a pressão selectiva dos meios deve começar a exercer-se até os 3 primeiros dias após transformação, com uma concentração de can. de 25mg/L. No caso particular da transformação mediada por *Agrobacterium*, os antibióticos de eliminação da bactéria devem ser usados numa mistura de cef. e carb. na concentração de 250mg/L cada. No bombardeamento de partículas, as condições para a obtenção de mais plantas transformadas serão as de 1500 psi de pressão e com os “carriers” a 6cm. Em todos os ensaios a pressão selectiva foi mantida até as plantas serem transferidas para terra, o que provavelmente terá contribuído para uma maior estabilidade do gene do *npt II*, permitindo, por outro lado, a eliminação de escapes resistentes às primeiras duas subculturas em meio de selecção.



CAPÍTULO IV

Determinação molecular do sexo das plantas de lúpulo

Índice

RESUMO	120
4.1. INTRODUÇÃO	121
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	123
4.2.1. MATERIAL VEGETAL	123
4.2.1.1. EXTRAÇÃO DO DNA	123
4.2.1.2. PCR	123
- GERMINAÇÃO DOS GRÃOS DE PÓLEN DAS PLANTAS COLOCADAS NO CAMPO	124
4.3. RESULTADOS	125
4.3.1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS FLORES	125
4.3.2. DETERMINAÇÃO MOLECULAR DO SEXO DAS PLANTAS	126
- MORFOLOGIA E GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DAS PLANTAS NO CAMPO	127
4.4. DISCUSSÃO	129
4.4.1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS FLORES	129
4.4.2. DETERMINAÇÃO MOLECULAR DO SEXO DAS PLANTAS	129
- MORFOLOGIA E GERMINAÇÃO DOS GRÃOS DE PÓLEN DAS PLANTAS NO CAMPO	130



Resumo

O lúpulo é uma planta dióica cujo valor económico reside nas plantas femininas, sendo por isso importante determinar o sexo das plantas. Sabendo que em condições óptimas de cultura, somente ao fim de 2-3 anos se consegue a floração do lúpulo e, por consequência, saber o sexo da planta, tem todo o interesse fazer uma determinação precoce do sexo das plantas. Neste trabalho porque se trabalhou com uma planta espontânea que até à data dos ensaios moleculares não tinha florido, não sendo por isso possível saber qual o sexo da planta, o interesse da determinação era acrescido.

Foi feita a determinação do sexo do clone Bragança, utilizando “primers” específicos de um marcador exclusivo do cromossoma Y. Deste modo só em plantas masculinas (portadoras do cromossoma Y) seria possível amplificar em PCR esse fragmento de DNA específico. Os testes foram feitos com o clone Bragança e nas variedades certificadamente femininas. Foram testadas plantas transformadas e plantas não transformadas.

Em seguida, e uma vez que as plantas entretanto floriram, as flores femininas e masculinas foram analisadas morfológicamente. Foi recolhido o pólen das plantas masculinas. Este pólen foi estudado quanto à morfologia e capacidade germinativa. A taxa de germinação foi testada após 2, 4 e 6h em meio de germinação.

Verificou-se que o clone Bragança é uma planta masculina, e que os processos de regeneração e transformação não alteraram, visivelmente, as características associadas ao sexo. Em termos morfológicos, as plantas apresentaram flores semelhantes às plantas controlo e concordantes com os resultados moleculares.

Os grãos de pólen das plantas geneticamente modificadas apresentaram uma morfologia idêntica aos das plantas não manipuladas geneticamente, no entanto, a capacidade germinativa não ultrapassou os 50% atingidos após 4h, sendo de 39% às 2h e mantendo os 50% às 6h. O resultado da germinação do polén recolhido poderá ter sido condicionado pelas condições de recolha e conservação do mesmo, assim como pela composição dos meios utilizados para a germinação, que deverão ainda ser otimizados para o lúpulo.



4.1. INTRODUÇÃO

Do ponto de vista industrial as plantas femininas de lúpulo têm maior valor comercial, o que relega para segundo plano as plantas masculinas. Até 1976 as plantas masculinas eram utilizadas pelos produtores ingleses, como fonte de polinização dos campos de lúpulo. Esta prática consistia em plantar uma a duas plantas masculinas por campo de lúpulo, com o objectivo de haver polinização das plantas femininas. Esta polinização permitia que se desenvolvessem sementes, as quais levavam a uma maior acumulação de resinas nas brácteas femininas. A acumulação extra de resina permitia um aumento na componente amarga do extracto final de lúpulo. No entanto, esta técnica foi abandonada por indicação do English Hop Marketing Board, uma vez que as cervejeiras europeias não pretendiam extractos com as características que possuíam as plantas dos de lúpulo com semente (<http://www.rsc.org/pdf/boooks/brewsc>), visto que, a presença da semente com os seus lípidos e óleos levava à floculação da cerveja (BH, 2005). Assim as plantas masculinas passaram a ser exclusivamente utilizadas na criação e desenvolvimento de novas variedades comerciais (Versluys, 1969; Likens & Nickerson, 1973; Bakshi *et al.*, 1994). Estas novas variedades, introduzidas nos circuitos comerciais há várias décadas, são desenvolvidas no sentido do melhoramento, da estabilidade ao armazenamento, do conteúdo em alfa-beta ácidos, do aroma, da resistência a agentes patogénicos (fungos, em particular), e da capacidade de crescer em climas específicos (Neve, 1988). No entanto, só é possível verificar as características agronómicas e industriais das plantas masculinas, pelas da sua progenitora o que dificulta o processo de melhoramento (Neve, 1986; Neve, 1988; Seigner, 1992).

Embora a floração no lúpulo dependa do estágio de desenvolvimento da planta, dos ciclos sazonais do fotoperíodo (pelo menos 12 a 20 nós no caule e 7h30m a 8h30m de escuro) (Hintermeier, 1993), quando as plantas de lúpulo são colocadas em vaso, mesmo que sob condições adequadas à floração, esta não ocorre no primeiro ano de cultura. As plantas em vaso têm limitações espaciais para o desenvolvimento radicular o que pode contribuir para retardar a floração em alguns anos (BRALUPULO, comunicação pessoal), mesmo que o ciclo dia-noite seja o correcto. Por outro lado, em termos vegetativos, as plantas não apresentam dimorfismo sexual. Deste modo, uma vez que as plantas transgénicas e controlo colocadas em vaso, não floriram nos dois primeiros anos, foi necessário recorrer a outros métodos, com o intuito de determinar o carácter sexual das mesmas.



Os estudos moleculares realizados com lúpulo estão restritos à identificação de variedades (Pillay & Kenny, 1996b; Patzak, 2001; Murakami, 2001), ou à determinação de infecções virais (Foster & Mills, 1991; Petrzik & Svoboda, 1997) e de viróides (Matousek *et al.*, 1995). Foi no entanto possível verificar o sexo das plantas de lúpulo em estudo (clone Br, e confirmação do sexo das variedades comerciais: Er e Nugget) utilizando o método de análise do DNA por PCR, desenvolvido para variedades Checas (Poley *et al.*, 1997). Esta determinação molecular do sexo de plantas, foi também utilizada com sucesso em *Cannabis sativa* L., planta pertencente à mesma família do lúpulo (Mandolino *et al.*, 1999). Em paralelo fez-se a observação morfológica das plantas que incluiu corte e observação das flores produzidas pelo clone Br e pelas variedades Nugget e Er. Tal análise constituiu uma alternativa rápida e expedita para a determinação precoce do sexo das plantas. Como complemento, e porque no último ano as plantas floriram, foi possível observar morfológicamente as flores das variedades Nugget e Er e do clone Br. Foi verificada a capacidade de germinação dos grãos de pólen produzidos pelas plantas colocadas em campo e em vaso, com o intuito de verificar a morfologia e fisiologia dos mesmos. Esta análise teve como objectivo verificar se todo o processo de regeneração e transformação não teriam, de algum modo, comprometido a produção e capacidade germinativa dos grãos de pólen do clone Bragança.



4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Material Vegetal

Plantas estabelecidas em cultura *in vitro*, há pelo menos 2 anos, foram testadas molecularmente quanto ao seu sexo. Foram utilizadas plantas da variedade Er, Nugett, e o clone Br. Verificaram-se também as plantas colocadas no campo de todas as variedades mencionadas e do clone.

4.2.1.1. Extração do DNA

O DNA foi extraído de acordo com o descrito no Anexo II. Utilizando-se uma quantidade de material vegetal reduzida, cerca de 100 mg de peso fresco. A determinação da concentração de ácidos nucleicos foi feita por espectrofotometria de absorção molecular, com leitura da absorvência a um comprimento de onda de 260 nm. Foi determinada igualmente a integridade do DNA em gel de agarose (0,8 % m/v) em solução tampão TAE (40 mM Tris, pH 7,8; 2 mM EDTA). Para a determinação do sexo da planta, em cada ensaio de PCR, foram utilizados 100 ng de DNA.

4.2.1.2. PCR

Foi utilizado o programa descrito por Polley e colaboradores (1997) com “primers” específicos para as porções de DNA determinantes na distinção de plantas femininas, de masculinas. As sequências usadas foram as seguintes: 5'-ACA GAG TAC AAC TCA GAA ACA AAC C-3', e 5'-AA G GTC GCA CAA TGA CCG-3'. O programa de PCR teve a seguinte sequência: para a abertura inicial das cadeias 3 minutos a 94°C, seguido de 45 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 65°C, 2 minutos a 72°C, no final dos 45 ciclos, 7 minutos a 72°C para terminar as cadeias ainda incompletas. Os produtos da ampliação por PCR foram aplicados num gel de agarose (1,2 %), em solução tampão TAE (40 mM Tris-HCl, pH 7,8, 2 mM EDTA), com brometo de etídio a 0,3 µg/mL, correndo a electroforese a 75 V, durante 2 horas, após o que foi visualizado num transiluminador, U.V. Transilluminator 2000 (BioRad Laboratories, Hércules, U.S.A).

Foram feitas 3 réplicas de cada ensaio, para todas as amostras testadas em PCR, para confirmação dos resultados.



- Germinação dos grãos de pólen das plantas colocadas no campo

As plantas de *H. lupulus* das variedades Er e BG e do clone Bragança foram colhidas, seccionadas manualmente e observadas à lupa (ampliação de 7,5 x). O pólen foi recolhido e a sua capacidade de germinação foi testada em meio de germinação composto por 0,01 % H_3BO_3 ; 3 % Polietilenoglicol (PEG) 4000; 10 % Sacarose; 0,07 % $CaCl_2$.

As observações dos grãos de pólen foram feitas às 2h, 4h e 6h.

As taxas de germinação foram determinadas para cada uma das observações segundo a seguinte formula: número de grãos de pólen germinados/número de grãos de pólen total x100, o número de grãos de pólen total, foi o número de grãos de pólen observados inicialmente com uma ampliação de 400x (10x40).

Em paralelo o aspecto morfológico dos grãos de pólen foi observado em microscopia óptica, tendo sido verificado o tamanho, forma e aspecto geral dos grãos recolhidos da planta masculina, desenvolvida no viveiro da Escola Agrária de Bragança. Os grãos de pólen foram medidos com o auxílio de uma ocular micrométrica, com uma ampliação de 400x (10x40).



4.3. RESULTADOS

4.3.1. Aspectos morfológicos das flores

No ano 2003 o clone Bragança floriu, o que permitiu verificar, que as inflorescências eram de facto masculinas, como se pode confirmar, comparando a Fig. 4.1. onde se apresentam esquemas das flores masculinas (a), com a Fig. 4.2. (a, c) onde se podem observar fotografias das plantas masculinas, obtidas no campo de ensaios situado nos viveiros da Escola Superior Agrária de Bragança. Nesta imagem, (Fig. 4.2. b) e d)) podem observar-se inflorescências axilares femininas com aparência coniforme em que o pedúnculo se encontra coberto de pêlos de diferentes tipos (aculeiformes, naviculares e estrelados) e o detalhe de um corte de um estróbilo feminino, onde é possível observar as flores femininas envolvidas pelas brácteas revestidas de abundantes glândulas. Foi possível comparar estes estróbilos e flores femininas com o esquema da Fig. 4.1. e com as flores das plantas femininas das plantações de cariz comercial, localizadas na região de Bragança. Verificou-se que do ponto de vista morfológico eram idênticas.

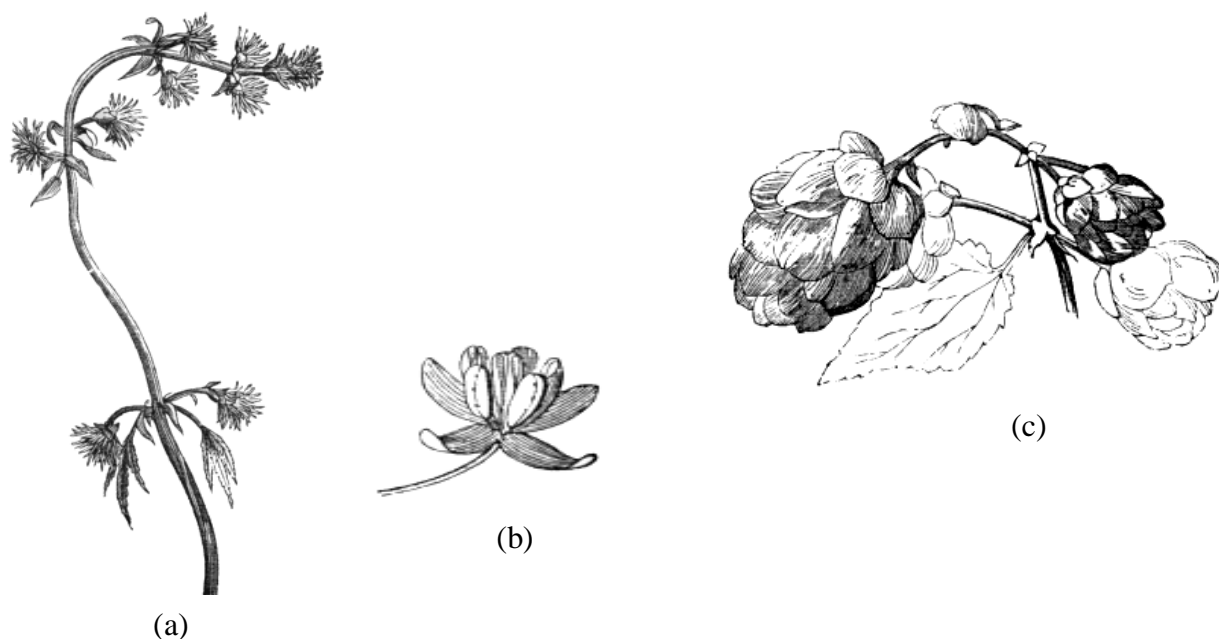


Figura 4.1. – Aspectos morfológicos das flores masculinas (a) e (b), e do estróbilo feminino (c) do lúpulo (<http://www.life.ca>).



Figura 4.2: a) Aspecto geral das flores masculinas do clone Br b) Pormenor das flores femininas da variedade Er, no campo. c) Pormenor de uma inflorescência do clone Br, no campo. d) Corte de um estróbilo feminino da variedade Nugget e) Pormenor das anteras recolhidas do clone Br, pode observar-se as bolsas secretoras e o pólen. f) Pormenor das flores masculinas do clone Br.

4.3.2. Determinação molecular do sexo das plantas

Uma vez que a determinação do sexo nas plantas de lúpulo envolve a presença de um cromossoma Y, todo o polimorfismo presente neste cromossoma será especificamente masculino, porque este polimorfismo só é transmitido de macho para macho. É com base nestes dados que foi determinado por amplificação aleatória dos polimorfismos de DNA – RAPD (random amplified polymorphic DNA), por ser este o tipo de marcador capaz de discriminar plantas macho de plantas fêmeas (Polley *et al.*, 1997). Foi este marcador transformado num outro de locais de sequência marcada – STS (“sequence tagged sites”) que foi usado como fragmento a amplificar por PCR. A presença deste fragmento de 1,2 kb nos produtos de PCR, permitiu determinar que se estava na presença de uma planta macho de lúpulo.

Das análises feitas por PCR, verificou-se que as plantas das variedades comerciais eram todas plantas femininas, visto que em nenhuma delas foi possível amplificar este fragmento específico de plantas macho. Posteriormente às análises moleculares foi possível fazer a observação morfológica, que tal como vimos na secção anterior, viria a confirmar os resultados moleculares.



Da observação do gel dos produtos de PCR (Fig. 4.4.), podemos verificar que só aparecem as bandas do peso molecular esperado (1,2kb) nas plantas de Bragança, enquanto que todas as amostras das variedades comerciais, não apresentam banda alguma.

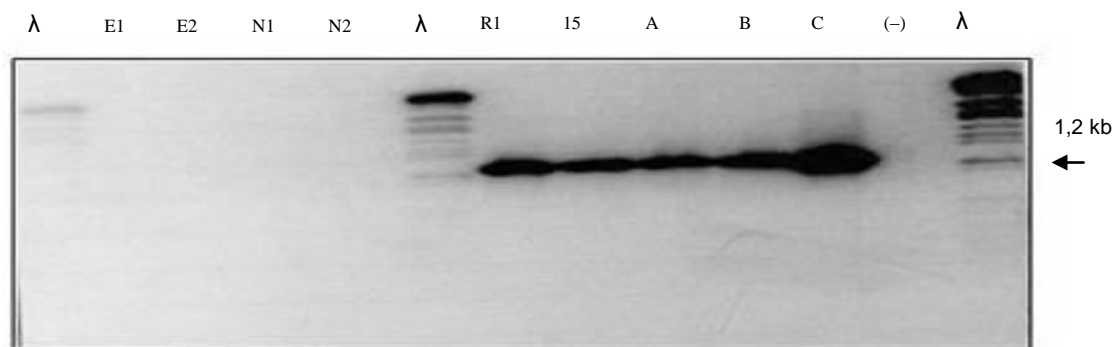


Figura 4.4.: Determinação do carácter sexual de plantas de *H. lupulus* por PCR. Plantas comerciais femininas: **E1**, **E2** (variedade Er), **N1**, **N2** (variedade Nougett). Plantas resultantes da transformação de plantas do clone Br, por *Agrobacterium*: **R1,15**. Plantas resultantes da transformação de plantas do clone Br, por bombardeamento de partículas: **(A)** correspondendo a transformação a **1500** psi e a **9** cm **(B)** correspondendo a transformação a **1500** psi e a **12** cm de distancia dos “carriers”. **C** Planta controlo (não transformada) do clone Br. **(-)** Controlo negativo do PCR. **λ** (DNA do fago λ digerido com Ava III).

Na Figura 4.4. é possível verificar que somente as plantas resultantes do clone Br, mesmo as sujeitas a transformação, apresentam a presença da banda associada às plantas de sexo masculino. Todas as plantas de origem comercial (var. Er e var. Nougett) sendo certificadamente plantas femininas, não apresentaram a banda associada ao sexo masculino.

- Morfologia e germinação de grãos de pólen das plantas no campo

Com base nas medições realizadas em microscopia óptica, verificou-se que os grãos de pólen possuíam 25 µm de diâmetro. Apresentavam um espessamento da parede, que forma 3 gomos em cujo centro aparecem poros (Fig. 4.5.).

Apesar de ter ocorrido germinação, ela por vezes não pareceu ocorrer de uma forma normal, surgindo o tubo polínico sem orientação definida, enrolado sobre ele próprio. No entanto verificou-se que, em alguns casos, a germinação parecia ser mais definida, surgindo tubos polínicos mais longos e sem enrolamento (Fig. 4.6.). As taxas de germinação atingiram o seu valor máximo às 4h, com 50%, mantendo o mesmo valor nas 6h e sendo de 39% às 2h. Na Fig. 4.5. pode observar-se o aspecto morfológico dos grãos de pólen das plantas transgênicas do clone Bragança, verificando-se que o aspecto é semelhante aos grãos de pólen produzidos por plantas não transformadas.

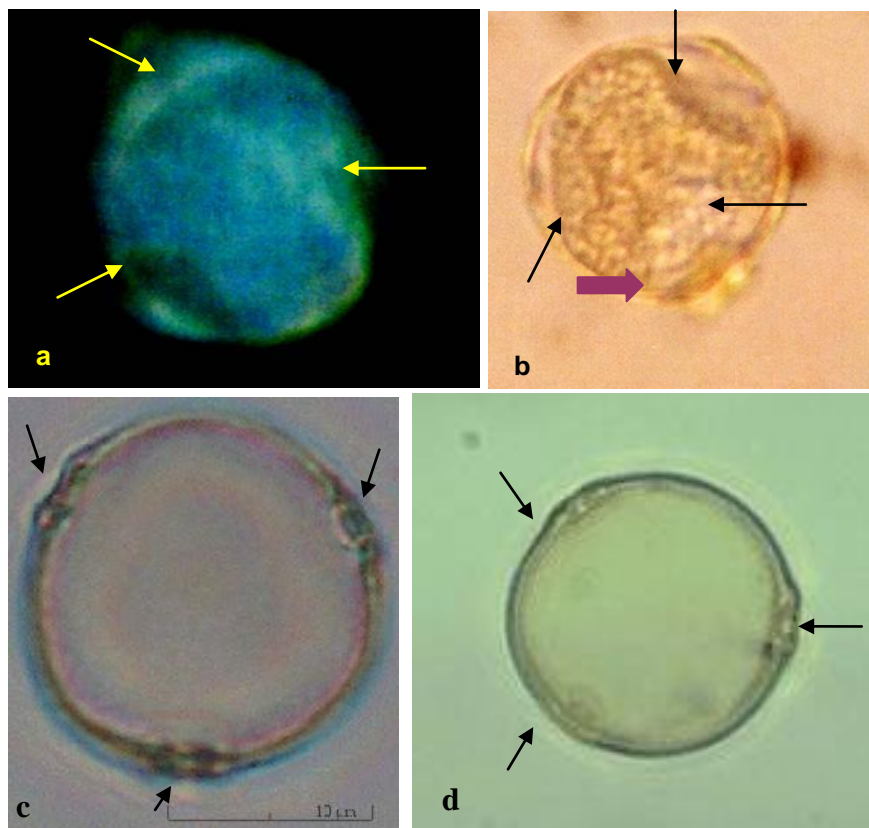


Figura 4.5. Aspecto morfológico dos grãos de pólen isolados. (a e b) As setas indicam os 3 gomos (b) Seta espessa início da germinação do tubo polínico (ampliação total 400 x). (c e d) Aspecto morfológico de grãos de pólen provenientes de plantas não manipuladas, (c) imagem retirada de www.123-net-Cours-Éléments de Botanique. fr (UFR de Pharmacie et Ingénierie de la Santé – ANGERS). Na imagem está inserida uma escala de 10 µm. (d) imagem retirada de www.kv.geo.uu.se

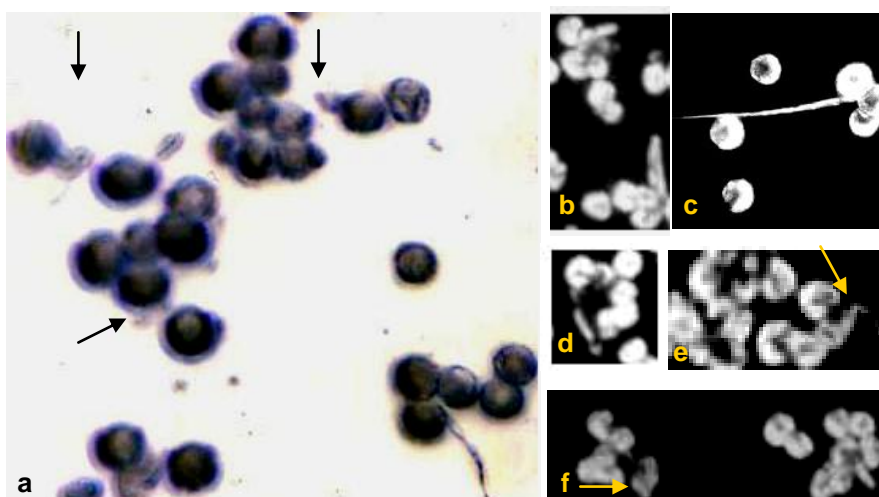


Figura 4.6. Germinação dos grãos de pólen. a) Tubos polínicos enrolados com extremidades bojudas e atrofiadas (setas) ampliação total 100x. (b) e d) Tubos polínicos após 4h em meio de germinação (ampliação total 40x). c) Germinação dos grãos de pólen após 6h (ampliação total 40x). e) e f) Germinação após 2h (seta) ampliação total 40x.



4.4. DISCUSSÃO

4.4.1. Aspectos morfológicos das flores

As plantas transformadas assim como as plantas que embora não transformadas passaram por cultura *in vitro*, nomeadamente as plantas regeneradas, apresentaram morfologia em tudo semelhante as plantas cultivadas e espontâneos descritos na bibliografia.

As inflorescências surgiram em panículas axilares, bracteadas com brácteas de cerca de 2 mm, decrescentes em tamanho até ao ápice. As anteras tinham cerca de 0,75 mm e sésseis, tal como foi descrito para esta espécie por Castroviejo e outros (1993). Assim em termos morfológicos as plantas não sofreram alterações. Se nas plantas regeneradas e multiplicadas ocorreu variação somaclonal, como o descrito para *Curcuma longa* L. (Salvi *et al.*, 2001), ela não se manifestou visivelmente em termos morfológicos. Por outro lado, as plantas transformadas apresentaram também morfologia em tudo idêntica á descrita para o lúpulo, o que poderá significar que a integração dos transgenes não ocorreu em zonas do genoma passíveis de causar alterações (co-supressão de genes endógenos) manifestáveis na forma de alterações morfológicas. No entanto, será necessário a utilização de técnicas mais finas (ex: técnicas moleculares, como análise por “Random amplified polymorphic DNA (RAPD)”) para assegurar que não ocorreram variações somaclonais (Salvi *et al.*, 2001).

4.4.2. Determinação molecular do sexo das plantas

Considerando os resultados obtidos na amplificação por PCR, verificou-se que, tal como descrito por Polley e outros (1997), os “primers” utilizados apresentaram capacidade para amplificar uma zona específica do genoma das plantas de lúpulo do sexo masculino, tornando, deste modo, possível a identificação do carácter sexual das mesmas de uma forma rápida e expedita. Este processo tem a vantagem acrescida de permitir a determinação do sexo nas fases iniciais do desenvolvimento, sem necessidade de esperar pela floração, que por vezes, como no caso do clone Br., só ocorreu 2 anos depois da transferência para terra.

Em termos morfológicos, verificou-se que as plantas de origem comercial eram de facto do sexo feminino, pela observação das flores. Este era o resultado esperado, uma vez que somente as plantas femininas têm interesse comercial, e estas plantas foram



cedidas, inicialmente, a partir de lotes comerciais utilizados na cultura do lúpulo em Trás-os-Montes.

A confirmação morfológica do sexo das plantas e também o facto de o pólen ter germinado permite-nos considerar que, o clone de lúpulo espontâneo Bragança tem todo um potencial para ser utilizada como instrumento de melhoramento genético das cultivares de interesse económico.

No caso do clone Br, por se tratar de um clone espontâneo, recolhido na primavera, teria 50% de probabilidades de ser uma planta masculina. Com a determinação de que se trata de uma planta masculina podemos assegurar tratar-se, de facto, de uma planta espontânea e não uma planta de origem comercial, que tivesse, de algum modo, ultrapassado as barreiras dos campos de lúpulo cultivados. Por outro lado, desde o início da cultura de lúpulo com fins industriais que, embora não sendo usados para a produção de cerveja, as plantas masculinas têm um papel preponderante nos cruzamentos com vista à aquisição de novas características ou ao melhoramento de características já estabilizadas. Podemos pois dizer que as plantas masculinas, tal como preconizado por outros autores (Neve, 1988; Kralj & Haunold, 1987; Kenny, 1991; Seigner, 1992; Bakshi *et al.*, 1994), podem ter um papel importante na obtenção de novas variedades de lúpulo com interesse cervejeiro, pelo que, esta planta espontânea pode ser aplicada em programas de melhoramento no sentido da obtenção de novas variedades. Por outro lado, trabalhos desenvolvidos com base na herança e transmissão dos genes de interesse, em sucessivas gerações, mostraram casos em que essa transmissão era estável (Chen *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 2000; Butterfield *et al.*, 2002). Neste sentido, uma estratégia para obtenção de plantas com múltiplas resistências, ou novas apetências de interesse económico, será a de conduzir o cruzamento entre plantas transgênicas (no caso do lúpulo: masculinas e femininas) para diferentes genes (Butterfield *et al.*, 2002). Será pois, de todo o interesse, num futuro próximo, testar cruzamentos utilizando este clone espontâneo.

- Morfologia e Germinação dos grãos de pólen das plantas no campo

Embora uma percentagem importante de grãos de pólen tenha germinado, o processo não apresentou os resultados esperados. Nalguns casos o tubo polínico não se desenvolveu linearmente, apresentando uma forma atrofiada ou enrolada sobre si mesmo. Estes resultados poderão estar relacionados, por um lado, com o tempo de germinação dos grãos de pólen, que embora não muito afastado do tempo da sua produção (foram recolhidos em fim de Agosto, início de Setembro, e utilizados nos testes em Novembro), poderá não ter sido o mais adequado à obtenção de taxas de germinação



elevadas. Por outro lado, o facto de ser o primeiro ano em que ocorreu floração, permite-nos sugerir que no primeiro ano a produção de flores e de grãos de pólen seja, não só inferior, como de menor viabilidade.

Outro factor a ter em consideração nos nossos resultados prende-se com o meio utilizado nos testes que, podendo não ser o mais indicado para esta espécie, pode ser também responsável pelas anomalias germinativas encontradas. Para determinar, de um modo mais definitivo, as taxas de germinação das plantas do clone Br, terão que ser feitos mais testes de germinação nos próximos anos, de modo a poderem determinar-se taxas de germinação e estados fisiológicos óptimos para o pólen de lúpulo.

O aspecto morfológico e dimensões dos grãos de pólen recolhidos e analisados nas plantas geneticamente modificadas são em tudo idênticos aos descritos para esta espécie (www.kv.geo.uu.se; Castroviejo *et al.*, 1993). Assim sendo, podemos afirmar que, a esse nível não parece ter havido alterações detectáveis que possam dever-se ao facto das plantas terem sido manipuladas geneticamente.



CAPÍTULO V

Análise molecular das plantas transformadas

Índice

RESUMO	134
5.1. INTRODUÇÃO	136
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	140
5.2.1. EXTRACÇÃO DE DNA DAS PLANTAS	140
5.2.2. EXTRACÇÃO DE RNA DAS PLANTAS	140
5.2.3. ANÁLISE DO DNA DOS TRANSFORMANTES POR PCR	142
5.2.4. ANÁLISE MOLECULAR DAS PLANTAS (SOUTHERN E NORTHERN BLOTTING)	143
5.2.4.1. RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA	143
5.2.4.2. ELECTROFORESE, TRATAMENTO DE GEL E TRANSFERÊNCIA DO DNA	143
5.2.4.3. MARCAÇÃO DA SONDA	144
5.2.4.4. PRÉ-HIBRIDAÇÃO E HIBRIDAÇÃO	144
5.2.4.5. LAVAGENS	145
5.2.4.6. RECUPERAÇÃO DE MEMBRANAS DE SOUTHERN	145
5.2.5. ANÁLISE DO RNA POR NORTHERN	145
5.2.6. ANÁLISE POR DAS-ELISA	146
5.2.7. ANÁLISE POR RT-PCR	147
5.2.8. ANÁLISE DA MANUTENÇÃO DO GENE NAS PLANTAS EM CAMPO	147
5.3. RESULTADOS	149
5.3.1. EXTRACÇÃO DE DNA DAS PLANTAS	149
5.3.1.2. ANÁLISE DO DNA POR PCR	149
5.3.1.3. EXTRACÇÃO DE RNA DAS PLANTAS	151
5.3.2. ANÁLISE DAS PLANTAS TRANSFORMADAS POR SOUTHERN BLOTTING	152
5.3.3. ANÁLISE DAS PLANTAS TRANSFORMADAS POR NORTHERN BLOTTING	153
5.3.4. ANÁLISE POR DAS-ELISA	153
5.3.3. ANÁLISE POR RT-PCR	154
5.3.5. ANÁLISE DA MANUTENÇÃO DO GENE NAS PLANTAS TRANSFERIDAS PARA O CAMPO	155
5.4. DISCUSSÃO	157
5.4.1. ANÁLISE DO DNA POR PCR	157
5.4.2. ANÁLISE MOLECULAR DAS PLANTAS	158
5.4.2.1. ANÁLISE DAS PLANTAS TRANSFORMADAS POR SOUTHERN BLOTTING	158
5.4.3. ANÁLISE POR NORTHERN BLOTTING DAS PLANTAS TRANSFORMADAS	158
5.4.5. ANÁLISE POR DAS-ELISA	159
5.4.4. ANÁLISE DA MANUTENÇÃO DO GENE NAS PLANTAS TRANSFERIDAS PARA O CAMPO	160



Resumo

Após o processo de transformação com o gene *cpArMV*, as plantas foram analisadas para determinar a sua presença no genoma. Esta análise constou de amplificação do gene por PCR com “primers” específicos, Southern e Northern blotting. Os transformantes foram sujeitos a RT-PCR e a testes DAS-ELISA com o objectivo de verificar se o RNA do gene se estava a transcrever e se era traduzido, originando a proteína da cápside viral, detectável pelos testes imunológicos.

Das 1290 plântulas obtidas a partir dos 3000 explantes sujeitos a transformação mediada por *Agrobacterium*, 200 resistiram a 2 subculturas em 50mg/L de Canamicina. Estas 200 plantas foram analisadas por PCR, 4 meses após a transformação tendo-se verificado que em 20 plantas se verificava amplificação do gene *cpArMV*. Nem todas as plantas apresentaram os dois genes da construção *npt II* e *cpArMV*, cerca de 0,9% apresentaram só o gene *cpArMV*, ou nenhum dos dois. As plantas foram, ulteriormente, analisadas por RT-PCR para a presença do gene *cpArMV*. A amplificação do gene não ocorreu em todas as plantas que, previamente, tinham apresentado amplificação por PCR simples, verificou-se que 5% das plantas analisadas apresentavam a banda correspondente à presença e transcrição do gene.

Por bombardeamento de partículas, foram transformados 2625 explantes dos quais 1443 deram origem a plântulas. Das plantas obtidas, 130 resistiram a 2 subculturas em 50mg/L de Canamicina. Feita a análise por PCR verificou-se que, 4 apresentaram a banda correspondente à amplificação do gene *cpArMV*. Estas foram também, ulteriormente, analisadas por RT-PCR para a presença do gene *cpArMV*, tendo-se verificado 2 plantas com a banda correspondente.

As plantas analisadas por Southern mostraram a integração do gene *cpArMV* e do gene *npt II* no seu genoma. Verificou-se que existe integração, tanto em plantas transformadas por bombardeamento de partículas, como nas que sofreram transformação mediada por *Agrobacterium*. São, no entanto, em maior número as que apresentam a banda correspondente ao gene, quando transformadas por *Agrobacterium* (4% para o *Agrobacterium* e 1% para o bombardeamento de partículas).

Das plantas putativamente transformadas e analisadas por DAS-ELISA, verificou-se que, entre 2% – 5% destas, apresentavam valores passíveis de serem considerados positivos quanto à presença e expressão do gene. Nas plantas analisadas, os valores mais elevados foram obtidos para as plantas em que a transformação foi mediada por *Agrobacterium*. No caso das plantas transformadas por bombardeamento de partículas, embora o número de plantas analisadas, tenha sido menor (uma vez que menos plantas apresentaram Southern positivos), verificou-se que, além de se obter menos plantas com valores positivos, os valores de absorvência atingidos por estas, também são menores

Das plantas analisadas, somente uma, obtida por transformação mediada por *Agrobacterium*, apresentou bandas correspondentes à transcrição do gene *cpArMV* por Northern



blotting. Todas as outras plantas analisadas, quer as resultantes de transformação por bombardeamento de partículas, quer as que resultaram da transformação mediada por *Agrobacterium*, não apresentaram marcação nos Northern blottings efectuados.

O DNA de uma planta resultante de transformação mediada por *Agrobacterium* e uma planta resultante de transformação por bombardeamento de partículas, colocadas em vaso em 2000 e analisadas em 2003 foram sujeitas a Southern blotting não radioactivo. A planta que apresentou marcação positiva no ensaio foi a que sofreu transformação mediada por *Agrobacterium*.

Dos resultados apresentados podemos concluir que foi possível obter plantas com transformação estável com o gene da cápside viral do Vírus do Mosaico de *Arabidopsis*. O método de transformação que se mostrou mais eficiente foi o de transformação mediada por *Agrobacterium*, conseguindo-se que o transformante mantivesse a transcrição do gene, dois anos após transferência para substrato, sem pressão selectiva.

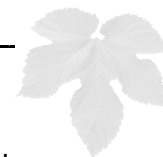


5.1. INTRODUÇÃO

Na sequência do processo de transformação é fundamental determinar se o material transformado o foi de facto, e determinar se a metodologia se revela interessante para diferentes abordagens, sejam elas científicas ou económicas. Embora, em alguns casos, nomeadamente, em plantas ditas recalcitrantes (ex: espécies lenhosas), a obtenção de plantas transformadas apresente frequências muito baixas, a conjugação desta técnica com a multiplicação *in vitro*, pode resolver graves problemas económicos e agronómicos. Assim, e mesmo que a frequência de obtenção de plantas transformadas seja baixa, as técnicas de cultura *in vitro* associadas à transformação, permitem multiplicar as plantas obtidas, num curto espaço de tempo, sem alterações genéticas, na maioria dos casos, que comprometam a transformação (Scorza, 1991).

Nos últimos 15 anos, e com base nas diferentes técnicas de transformação genética, foram transformadas mais de 100 espécies de plantas. As cultivares transformadas ocupam já, à escala global, 44,2 milhões de hectares. Os exemplos mais difundidos destas cultivares são as do milho, trigo, soja, tomate, batata, algodão e arroz (Mohan *et al.*, 2003).

A integração do DNA transgénico no genoma da planta tem, normalmente, lugar associada a um processo não homólogo ou de recombinação ilegítima, ou seja integração sem uso de grandes sequências de DNA homólogo (Risseeuw *et al.*, 1997). No entanto, a integração dos transgenes ao acaso, a reorganização do DNA transgénico depois da integração no genoma vegetal, assim como a variação no número de cópias e a configuração do transgene podem levar a um fenómeno a que se dá o nome de silenciamento (Pawlowski & Somers, 1998). O silenciamento pode ter várias causas e pode ser afectado por vários factores, ainda não completamente compreendidos. Uma das possibilidades de silenciamento está relacionada com o grau de metilação do DNA, visto que, pode haver uma correlação directa entre inactivação transcripcional e metilação do DNA no promotor, ou em regiões codificantes (Meyer & Saedler, 1996). Nas plantas, apesar de existir uma sequência simétrica para a manutenção da metilação (sequência CG ou CNG), surgem metilações, em resíduos de C, fora destas sequências simétricas. No entanto, os dados disponíveis, até agora, apontam para a ausência deste tipo de metilação em genes endógenos. Só surge metilação não simétrica em transgenes, considerando-se portanto que esta não será uma metilação codificada na sequência, mas sim determinada pela estrutura secundária dessa sequência (Meyer &



Saedler, 1996). Outro modelo de silenciamento é o silenciamento mediado por RNA tratando-se, neste caso, de um silenciamento pós-transcricional. É um processo complexo e pode envolver ligações RNA-RNA, RNA-DNA, RNA-proteína e proteína-proteína (Fagard & Vaucheret, 2000). Este processo tem uma origem ancestral e terá sobrevivido entre os eucariotas como método de vigilância do RNA, funcionando como mecanismo de defesa natural contra ácidos nucleicos invasivos, incluindo viroses, transposões e outras sequências genômicas altamente repetitivas (Kasschau & Carrington, 1998; Voinnet *et al.*, 1999; Guo & Ding, 2002; Wang & Metzloff, 2005). O silenciamento do RNA também tem um papel preponderante no desenvolvimento de animais e plantas, por permitir um controlo genético que pode ocorrer pela degradação do RNA translacional e inibição ou modificação da cromatina (Wang & Metzloff, 2005). As plantas parecem ter mais tipos diferentes de silenciamento de RNA que qualquer outro organismo. Nelas, o silenciamento pode ser sistemicamente transmitido, podendo mesmo espalhar-se de uma região alvo inicial, para uma sequência 5' e 3' não alvo, adjacente.

A integração de um transgene pode, por outro lado, levar a fenómenos de co-supressão, em que há diminuição, ou total inibição, da expressão de um gene endógeno depois da introdução de um transgene. Este processo pode ocorrer se a integração do transgene se der num gene ou na sua proximidade. Se o gene interrompido pela inserção do transgene for vital para a planta, não se obtêm plantas viáveis após a transformação (N.A.S., 2000). Se pelo contrário, o gene não for essencial para o crescimento e desenvolvimento, é possível regenerar plantas transformadas, embora possam ter alterações inesperadas nos seus caracteres, com consequências negativas, do ponto de vista prático. Em muitos casos a co-supressão tem a sua regulação associada ao desenvolvimento da planta e a factores ambientais, como a intensidade da luz, ou as condições de germinação e de crescimento. Pensa-se que existirá uma ligação entre os mecanismos de regulação da diferenciação morfogénica e a indução de co-supressão. É frequente o silenciamento ser despoletado depois de um período “lag”, podendo desenvolver-se em diferentes estágios do desenvolvimento ou sincronizado num estágio específico do desenvolvimento (Meyer & Saedler, 1996). O resultado da inserção de um transgene no genoma da planta pode ter o efeito oposto do descrito anteriormente e causar uma activação, ou super-activação, de um gene adjacente. Nestes casos, a região reguladora do transgene estimula um gene residente vizinho e, potencialmente, causa um aumento na expressão desse gene. Uma das possíveis consequências nefastas deste processo é a intensificação da expressão de genes de biossíntese de toxinas vegetais. A sobreprodução destes compostos, devido à integração



de transgenes, será semelhante à que ocorre com mutações, activação por elementos de transposição, ou outros processos que induzem variabilidade genética (N.A.S., 2000).

É importante não esquecer que estes efeitos pleiotrópicos não são exclusivo dos organismos transgênicos. Tal como já foi documentado em variedades novas ou já estabelecidas, as cultivares resultantes de melhoramento tradicional e outros métodos não-transgênicos, podem ter igualmente concentrações potencialmente perigosas de compostos naturais tóxicos (N.A.S., 2000). Este problema pode ser ultrapassado com a realização de testes que minimizem o risco de introduzir, inadvertidamente, concentrações potencialmente perigosas de toxinas, conhecidas ou suspeitas, nas cultivares comerciais transgênicas, ou melhoradas convencionalmente.

Embora, para o lúpulo já existam referências de transformação bem sucedida, quer com a utilização de bombardeamento de partículas (Lyon de Castro, 2004) quer, com a utilização de transformação mediada por *Agrobacterium* (Horlemann *et al.*, 2003), o processo ainda permanece com muitas incertezas e dúvidas. Muitas destas incertezas estão relacionadas com o facto das referências disponíveis de transformação mediada por *Agrobacterium*, serem com genes marcadores e não com genes de interesse prático.

A determinação da estabilidade de um gene, introduzido no genoma da planta, é um requisito importante para a utilização de uma cultivar para fins agronómicos. Esta estabilidade e expressão podem ser influenciadas, como já vimos, por diferentes factores genéticos, mas também podem ser influenciadas por factores ambientais (Elkind *et al.*, 1994). Por outro lado, noutras espécies verificou-se que a expressão do gene era instável nas primeiras 4 a 5 gerações de propagação, mas posteriormente estabilizava (Bettany *et al.*, 1998). Outros registos mostram ainda que, pode haver alterações na expressão do gene na passagem da planta para o solo (Borkowska *et al.*, 1995).

A capacidade de um vírus infectar uma planta está relacionado, com a sua capacidade de ultrapassar as defesas da própria planta, mover-se na planta, e expressar os seus próprios genes. Alguns vírus podem ultrapassar os processos de silenciamento associados às defesas anti-virais das plantas, interferindo directamente com a actividade do sinal mensageiro de silenciamento. A perda de actividade deste sinal leva a uma diminuição da metilação dos transgenes virais, diminuindo assim o silenciamento destes genes (Guo & Ding, 2002). O Vírus da Tristeza dos Citrinos é um exemplo da existência de supressores virais de silenciamento, capazes de actuar a vários níveis das vias de silenciamento anti-viral na planta. Estes supressores, codificados pelo RNA do vírus, têm a capacidade de actuar a nível intracelular e intercelular, não alterando a metilação do DNA, mas alguns destes supressores, são capazes de actuar no mecanismo de



exportação do sinal mensageiro de silenciamento (Lu *et al.*, 2004). Este revela uma estratégia sofisticada de contra-defesa de um vírus que possui um genoma de RNA de grandes dimensões.

A transformação com o gene da proteína da cápside induz resistência a vírus, que pode ter como base a interferência do produto funcional proteico do gene, no normal ciclo replicativo do vírus, ou o silenciamento associado à acumulação de RNA (Guo *et al.*, 1998).

Com este tipo de estratégia de transformação com o gene da proteína da cápside, no nosso caso (*cpArMV*), pode conseguir-se, não só resistência a este Nepovírus, como a alguns outros vírus relacionados. O que poderá considerar-se uma vantagem acrescida, a médio - longo prazo, neste tipo de estratégia.

Das abordagens possíveis para determinar se o gene inserido no genoma da planta foi de facto inserido e de um modo estável, foram utilizadas neste trabalho as análises por Southern blotting, Northern blotting, e a análise por RT-PCR e DAS-ELISA. A confirmação da presença do gene e da sua expressão foi testada, tanto em plantas *in vitro*, como posteriormente nas plantas cultivadas em vaso. É determinante verificar se o gene continua presente, a longo prazo, uma vez que em cultivares como o lúpulo, os processos de cruzamentos entre plantas macho e fêmea, são a base do melhoramento tradicional, sendo estes transgênicos estáveis, uma mais valia nesse processo.



5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Extração de DNA das plantas

Das 1290 plântulas obtidas a partir dos 3000 explantes sujeitos a transformação mediada por *Agrobacterium*, 200 resistiram a 2 subculturas em 50mg/L de Canamicina. Estas 200 plantas foram analisadas por PCR, 3 meses após a transformação. Dos 2625 explantes sujeitos a bombardeamento de partículas, 1443 deram origem a plântulas, das quais 130 resistiram a 2 subculturas em 50mg/L de Canamicina. Também a estas plântulas foi feita a análise por PCR ao fim de 4 meses. Ulteriormente foram analisadas por RT-PCR para a averiguar a presença do gene *cpArMV*. O material utilizado para a extração de DNA genómico foram folhas e meristemas apicais, retirados de plântulas jovens. Para a análise de DNA por PCR o processo de extração foi feito após a transformação (utilizando os meristemas recém-formados), tal como descrito no Capítulo 3. Para as restantes análises (RT-PCR, Southern blotting, Northern blotting), as plantas foram sujeitas a este processo 4 a 5 meses após a transformação (utilizando-se neste caso, toda a parte aérea da planta, aproximadamente 200 mg). Neste processo o material foi macerado em almofariz em azoto líquido. A extração de DNA foi feita de acordo com o protocolo baseado na utilização de CTAB (*cetyltriethylammoniumbromide* – trietil – cetil - brometo de amónio) (Anexo II), este protocolo foi adaptado a partir de Yang & King (1993, Institut fur Gartenbauliche Pflanzenzuchtung, Ahrensburg, Alemanha; modificado de Doyle & Doyle, 1987). A avaliação do grau de pureza e integridade do DNA extraído foi determinada como descrito no Capítulo 3.

5.2.2. Extração de RNA das plantas

O RNA foi extraído de plantas transformadas com o gene da cápside viral do ArMV, que mostraram integração do gene e de plantas controlo. A solução tampão de extração utilizado na extração do RNA foi o seguinte: 100mM Tris HCl, pH 9; 200mM NaCl; 20mM EDTA, pH 8; 1% (m/v) SDS; 5mM DTT.

Após a homogeneização de 160 mg de material fresco em azoto líquido, foram adicionados 3mL de solução tampão de extração por grama de peso fresco. O material vegetal foi novamente homogeneizado, tendo sido adicionado ¼ de volume de fenol, seguiu-se uma incubação a 65°C, 5 minutos. Foi adicionado ¼ volume clorofórmio:álcool isoamílico (25:1) e homogeneizado no vórtex. O material vegetal foi centrifugado a 12000g durante 10 minutos após o que foi recolhida a fase aquosa. A esta fase aquosa foi adicionado igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), misturado por



inversão seguido de homogeneização no vórtex. Fez-se nova centrifugação a 5000g, 10 minutos e recolheu-se a fase superior. Após a repetição desta centrifugação e recolha do líquido, seguiu-se nova centrifugação a 1000g durante 10 minutos. Ao sobrenadante recolhido foi adicionado Cloreto de lítio (LiCl) para uma concentração final de 2M. Seguiu-se uma incubação a 4°C, durante a noite de forma a ocorrer a precipitação do RNA. Centrifugou-se a 10000g, 10 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuscitado em 0,4mL de LiCl 2M e repetiu-se a centrifugação. O RNA foi dissolvido em 0,2mL de H₂O destilada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). Adicionou-se uma solução de NaCl 0,2M, durante 30 minutos a 0°C. Foi centrifugado 10 minutos a 10000g, transferido o RNA no sobrenadante para um tubo de reacção “eppendorf” de 2mL e centrifugado a 12000 rpm, durante 1 minuto. Adicionou-se 1/10 de Acetato de Sódio (AcNa) 3M e 2,5 volumes de Etanol absoluto. Precipitou-se a - 70°C, durante 30 minutos (ou a - 20°C durante a noite). Após a precipitação, o precipitado foi lavado em 0,4mL de etanol 70% (v/v), centrifugado a 10000 g, durante 10 minutos, a 4°C seguido da eliminação do etanol 70%, por secagem ao ar e ulterior dissolução em 20µL de H₂O destilada previamente tratada com DEPC (H₂O DEPC dd).

O RNA foi armazenado a - 20°C. A sua integridade foi verificada por electroforese em gel de agarose (1%) em solução tampão TAE, contendo brometo de etídio. A sua absorvência foi determinada a 260 nm para quantificação.

No caso das plantas controlo foi testado um outro protocolo de extracção de RNA, que utilizou solução Tampão XT (3,5mL/g de tecido), 10mM DTT, 1% NP-40 e 2% (w/v) PVP-40. O material foi incubado neste tampão a 80°C e homogeneizado no vórtex rapidamente. Adicionou-se 300µL de proteinase K à mistura e deixou-se incubar durante hora e meia com agitação a 42°C. Foi adicionado 2 M KCl a uma concentração final de 160mM, e incubou-se em gelo 1h. Seguiu-se uma centrifugação a 10000 rpm, 20 minutos (4°C). Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 1/3 volume de 8M LiCl numa concentração final de 2M LiCl, deixou-se a incubar durante a noite a 4°C. Foi recolhido o precipitado centrifugando a 10000 rpm, 20 minutos, 4°C. Em seguida lavou-se o precipitado com 5mL de 2M LiCl (4°C). Após a lavagem o precipitado foi a centrifugar a 10000 rpm, 10 minutos, a 4°C. Descartou-se o sobrenadante. Este passo de lavagem foi repetido 3 vezes. O precipitado foi ressuscitado em 4mL de 10mM de solução tampão Tris -HCl (pH 7,5). Em seguida o material insolúvel foi removido centrifugando a 10000rpm, a 4°C, 10 minutos. Adicionou-se 1/10 do volume de Acetato de Potássio 2M (pH 5,5). As amostras foram incubadas 15 minutos em gelo, seguidos de uma centrifugação a 10000rpm, a 4°C, 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo



tubo e adicionou-se 2,5 volumes de Etanol 100%. Deixou-se o ácido nucléico a precipitar durante a noite, a -20°C. Centrifugou-se a 900 rpm, 30 minutos, a 4°C e descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 1-2mL de Etanol a 70% e centrifugado a 9000 rpm, a 4°C, 5 minutos. Após o que foi ressuspenso em 200µL H₂O DEPC-dd. O RNA foi precipitado com 1/10 volumes de 3M AcNa a pH 6 e 2,5 volumes de Etanol 100% a - 20°C, durante 1-2 horas. Foi centrifugado a 14000rpm durante 20 minutos a 4°C e lavado com Etanol 70%. Seguido de nova centrifugação de 5 minutos, seco e ressuspenso em H₂O DEPC dd.

Sempre que o RNA se apresente contaminado com DNA é necessário fazer um tratamento com DNase, com a seguinte mistura: Amostra, 2µL DNase, 40mM de solução tampão Tris-HCl pH 7,5 + 6mM MgCl₂, H₂O DEPC dd até um volume final de 100µL, e incubado 10 minutos a 37°C.

A utilização de um protocolo diferente para as plantas controlo, prendeu-se com o facto de haver uma maior disponibilidade deste material, permitindo obter RNA para vários testes, de uma só extracção. Assim sendo, o RNA obtido nas extracções iniciais das plantas controlo foi suficiente para não ser necessário testar outros protocolos.

Extracção da DNase com Fenol/Clorofórmio

Aos 100µL de RNA, juntaram-se 100µL de Fenol (4°C) e 100µL de clorofórmio: álcool isoamílico. A mistura foi agitada fortemente no vórtex durante 5 minutos, findos os quais sofreu uma centrifugação de 5 minutos a 1300 rpm. Foi retirada a fase aquosa para novo “ependorf” e adicionado um volume de clorofórmio:álcool isoamílico. Seguiu-se novamente 5 minutos de forte agitação e homogeneização no vórtex. Centrifugou-se a 1300 rpm, 5 minutos e foi retirada a fase aquosa para novo “ependorf”. Adicionou-se um volume de Etanol 95% e centrifugou-se. Depois de seco, o precipitado foi dissolvido em H₂O DEPC dd.

5.2.3. Análise do DNA dos transformantes por PCR

O DNA extraído das plantas transformadas por *Agrobacterium* ou por bombardeamento de partículas, com o plasmídeo pROKArMV, foi amplificado por PCR para o gene que codifica para a proteína da cápside viral do ArMV com os seguintes “primers”: 5'-CCT AAA GAT TGC CAG GCG GG – 3' e o 5' – CGA GAT GCT CCA TCC ATG CC – 3'. O programa de amplificação usado foi o seguinte: 95°C, 5 minutos; e seguido de 30 ciclos de 92°C, 1 minuto; 59°C, 1 minuto; 72°C, 1 minuto e 40 segundos; e no final 72°C, 10 minutos. A amplificação ocorreu num termociclador Perkin-Elmer (Perkin-Elmer, Foster City, U.S.A.). A amplificação do gene *npt II* do plasmídeo



pROKArMV foi feita de acordo com o descrito no Capítulo 3 (secção 3.2.5.2.). A análise por PCR das plantas transformadas por bombardeamento de partículas, com o mesmo plasmídeo, foi feita de acordo com o estabelecido no Capítulo 3 (secção 3.2.5.2.).

Depois da amplificação por PCR, os produtos de reacção foram visualizados por electroforese em géis de agarose (0,8%) em solução tampão TAE (40mM Tris, pH 7,8, 2mM EDTA) com brometo de etídio a 0,3µg/mL. No gel foram incluídos, em simultâneo com os produtos de PCR, o controlo negativo (mistura de PCR sem DNA), e o controlo positivo (produto de PCR obtido com o DNA do gene *cpArMV* isolado). As plantas em que o gene permaneceu integrado nos respectivos genomas (8 plantas resultantes da transformação mediada por *Agrobacterium* e 4 plantas resultantes de bombardeamento de partículas) foram posteriormente analisadas por Southern blotting, RT-PCR e Northern blotting. Nestas plantas, a expressão do gene da cápside viral foi testada por DAS-ELISA

5.2.4. Análise molecular das plantas (Southern e Northern blotting)

5.2.4.1. Restrição enzimática

O DNA genómico das 20 plantas putativamente transformadas por *Agrobacterium* e das 4 plantas transformadas por bombardeamento de partículas com o vector pROKArMV (plantas com amplificação do gene *cpArMV* por PCR), foi digerido com enzimas de restrição durante a noite a 37°C. A mistura de reacção (num volume de 5µL): solução tampão da enzima (10x), 1mM de Espemidina, 10µg de DNA e 1-5 U/µg DNA de enzima de restrição *Eco RI* (Promega, Madison, U.S.A.), e/ou *Sma I* (Promega, Madison, U.S.A.).

5.2.4.2. Electroforese, tratamento de gel e transferência do DNA

Após a restrição, os fragmentos de DNA e 80 pg da sonda (fragmento de 1284 bp do *cpArMV*, amplificado e isolado com os “primers” e nas condições anteriormente descritas, capítulo 3, a partir do plasmídeo pROKArMV) foram separados num gel de agarose (0,8%) com 0,3µg/mL de brometo de etídio, durante 6 a 8 horas, a baixa voltagem (40 a 50 V).

O gel sofreu uma depuração parcial, por imersão numa solução de 0,2 M de HCl, durante 10 minutos, para eliminação de pequenos fragmentos de DNA. Em seguida foi desnaturado, 2x20 minutos, numa solução desnaturante (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH), Seguiram-se duas passagens por água miliQ autoclavada, e por uma solução



neutralizante (1mM EDTA, 1,5 NaCl, 0,5 M Tris HCl, pH 7,5), durante trinta minutos (2x15 minutos).

Durante 10 minutos o gel esteve imerso, numa solução de SSC 10x concentrado seguindo-se a transferência do DNA por capilaridade para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-M+ da Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra) utilizando uma solução de SSC 20x (3M NaCl, 0,3M citrato de sódio, pH 7) e papel 3MM. A transferência foi feita durante a noite, de acordo com procedimentos definidos (Sambrook *et al.*, 1989). Uma vez terminada a transferência do DNA, o gel foi novamente observado num transiluminador (Ultra-Lum, Inc., U.S.A.) sobre radiação U.V., para confirmar a eficiência da transferência.

A membrana foi lavada, durante 5 a 10 minutos, numa solução de SSC 10x, sendo em seguida colocada num transiluminador (radiação U.V.) durante 3 minutos, para promover as ligações do DNA à membrana, após o que foi transferida para a estufa a 80°C, durante 60 minutos. Depois deste tratamento a membrana foi guardada a 4°C, até ulterior utilização.

5.2.4.3. Marcação da sonda

A sonda foi obtida por amplificação em PCR do fragmento da cápside viral do ArMV clonado no plasmídeo pROKArMV, com 1284pb. As condições de amplificação foram descritas anteriormente (secção 5.2.2.). O fragmento ampliado foi separado num gel de agarose de 1,2% (m/v), em solução tampão TAE e purificado por QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Dusseldorf, Alemanha).

A marcação radioactiva da sonda foi feita com 50ng de DNA desnaturado, por ebulição durante 5 minutos, colocação em gelo, após o que se seguiram as instruções do “Megaprime DNA labelling Kit” (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra).

5.2.4.4. Pré-hibridação e hibridação

No processo de pré-hibridação utilizou-se a seguinte solução tampão: solução T tampão fosfato 0,5M; pH 7,2, reagente de bloqueamento a 2% (“Bloquing reagent” Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra), SDS 7% (m/v). A solução tampão foi previamente aquecido a 65°C e a hibridação decorreu, neste tampão, durante 60 minutos. Na hibridação, depois de desnaturada a sonda, por ebulição a 95°C durante 5 minutos, esta foi adicionada à solução tampão de pré-hibridação numa concentração de 10ng/mL. A hibridação decorreu em agitação, a 65°C, durante a noite.



5.2.4.5. Lavagens

A quantidade de solução tampão de lavagem utilizado é calculada considerando que se utiliza 1mL/cm² de membrana a lavar. A lavagem tem como objectivo eliminar as ligações não específicas da sonda à membrana: Na 1ª lavagem utilizou-se 2xSSC (300mM NaCl, 30mM citrato de sódio, pH 7), 0,5% (m/V) SDS (a 65°C), 5 minutos seguidos de mais 5 minutos. Na 2ª Lavagem utilizou-se 0,2xSSC (30mM NaCl, 3,0mM citrato de sódio), 0,1% SDS (a 42°C) durante 14 minutos. Na 3ª lavagem usou-se 2xSSC à temperatura ambiente durante 15 minutos.

As lavagens foram efectuadas sempre com agitação e controladas com o detector de radiação de Geiger, como meio de verificar a marcação específica.

Após as lavagens, as membranas foram colocadas em saco selado sobre um filme de autorradiografia (Hyperfilm™- MP) e expostas durante a noite, a – 70°C.

5.2.4.6. Recuperação de membranas de Southern

As membranas com o DNA, e já hibridadas foram em alguns casos recuperadas para serem utilizadas em nova hibridação. Uma solução de 0,1% de SDS, onde foi mergulhada a membrana, foi submetida a ebulição, durante 5 minutos. Este procedimento foi repetido, após o que a membrana foi lavada 2x em SSC, sendo por fim guardada a 4°C.

5.2.5. Análise do RNA por Northern

Após a extracção do material, este sofre uma electroforese em gel de 1,5% de agarose, em solução tampão fosfato 10mM (pH 6,8). As amostras para o gel foram preparadas, juntando glioxal mix (1,5 x) na proporção de 1µL da mistura por cada µg de RNA, após o que foram incubadas durante 1h a 50°C. Em seguida foram colocadas 5 minutos no gelo. Depois de colocado a solução tampão de carregamento “loading buffer”, as amostras foram aplicadas no gel e fez-se a electroforese em voltagem constante, de 100 V, duas horas, com reciclagem da solução tampão da tina.

Transferência:

Processa-se de forma semelhante à transferência do Southern blotting.



Remoção do Glioxal:

A membrana foi incubada 5 minutos em solução tampão Tris-HCl 20mM, pH 8 e 1mM EDTA, previamente aquecido. O processamento posterior da membrana é semelhante ao das membranas de Southern blotting, anteriormente descrito.

5.2.6. Análise por DAS-ELISA

A expressão do gene da cápside viral do Vírus do Mosaico de *Arabidopsis*, nas plantas de lúpulo transformadas, foi avaliada usando testes imunológicos baseados na utilização de anti-soros policlonais contra a cápside viral purificada. A presença desta proteína nas plantas foi detectada por imunoenaios enzimáticos de dupla sanduíche de anticorpos – (Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay DAS-ELISA) segundo o protocolo adaptado de Clark & Adams (1977) por Gonçalves & Trujillo (1986).

As amostras, previamente congeladas em azoto líquido, foram maceradas directamente num tubo de reacção “eppendorf” com a ajuda de um homogeneizadores eléctricos com pontas esterilizáveis substituíveis e ajustáveis ao fundo dos tubos. O processo de extracção foi feito a frio pela homogeneização de 120 mg de tecido vegetal em 1,5mL de solução tampão de extracção (Anexo III). Como controlo negativo foram utilizadas plantas de *Quenopodium sp.* ou de *Nicotiana tabacum*, livres de vírus. Para controlo positivo utilizaram-se amostras hidrolisadas fornecidas pelo “kit” de detecção do ArMV (Sanofi, Alemanha) (Anexo III).

Microplacas de poliestireno de 96 células foram utilizadas para determinar a presença de vírus. As placas foram incubadas durante a noite a 4°C com 200mL de solução tampão de “revestimento”, fornecido pelo “kit” de detecção do ArMV (Sanofi, Alemanha). À solução tampão adicionou-se a imunoglobulina específica do Vírus do Mosaico de *Arabidopsis*, diluída 1000x.

Depois de lavar as placas 3 a 4 vezes com solução tampão de lavagem (incluído no “kit”, Sanofi, Alemanha), introduziram-se as amostras e os controlos nas respectivas células da placa. A incubação decorreu durante 1 a 2 horas, tendo-se procedido a nova lavagem (3 a 4 vezes). Seguidamente adicionou-se, de acordo com o descrito para o “kit”, tampão com o anticorpo conjugado com uma fosfatase alcalina e incubou-se durante 3h. Finalmente, após nova lavagem, adicionou-se o substrato da enzima (4-Nitrofenil fosfato) de acordo com as indicações do “kit”. A reacção foi avaliada por espectrofotometria de absorção molecular, num leitor de placas (microplate reader 3550 Bio-Rad, Alemanha) a 405 nm, tendo como referência um comprimento de onda de 690 nm, esta avaliação foi feita entre 30 minutos e 2h após a adição do substrato.



A determinação dos valores de absorvência considerados positivos para a presença da proteína da cápside do ArMV, nas plantas analisadas, foi feita de acordo com o descrito no Capítulo 3 (secção 3.2.1).

5.2.7. Análise por RT-PCR

O cDNA foi sintetizado a partir de RNA total isolado das plantas transformadas. A mistura de reacção, num volume final de 20µL, continha 5mM MgCl₂, 1mM dNTPs, 20 U de Inibidor RNase (Perkin-Elmer, Foster City, U.S.A.), 50 U MuLV (Murine Leucemia Vírus) Transcriptase Reversa (Perkin-Elmer, Foster City, U.S.A.), 2,5 µM Oligo d (T)₁₆ (Perkin-Elmer, Foster City, U.S.A.) e 1 µg RNA em solução tampão para Transcriptase Reversa (10mM Tris-HCl pH 8,3, 50mM KCl, 0,1% (v/v) Triton X-100). Esta mistura foi incubada durante 10 minutos à temperatura ambiente, seguida de incubação por 15 minutos a 42°C, 5 minutos a 99°C e 5 minutos a 5°C. Retiraram-se alíquotas de 5µL, para amplificar a porção de DNA correspondente ao fragmento que codifica para a cápside viral do ArMV. Nos ensaios de PCR foi utilizado um termociclador Perkin-Elmer (Perkin-Elmer, Foster City, U.S.A.). Nesta reacção de PCR foram usadas as condições e “primers” já descritos anteriormente (Capítulo 3). Os amplicões foram separados por electroforese, utilizando um gel de 1% de agarose, marcado com brometo de etídio em solução tampão TAE. A visualização das bandas correspondentes aos amplicões foi feita num transiluminador sob luz ultravioleta.

5.2.8. Análise da manutenção do gene nas plantas em campo

O DNA de uma planta transgênica colocada em vaso durante 3 anos, sem pressão selectiva dos genes de resistência a antibióticos, e plantas não transformadas colocadas no campo (controlo negativos), foram analisados por Southern blotting não-radioactivo (DIG Nonradioactive System, DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Roche, Alemanha).

Foram utilizadas 10 a 12µg de DNA da planta transformada e das plantas controlo. Este DNA foi digerido usando 10 unidades de enzima por µg de DNA com a enzima de restrição *Sma* I (Promega, Adison, U.S.A.), para se obter um fragmento interno que contém a *cpArMV*, ou *Eco* RI (Promega, Adison, U.S.A.) para gerar a extremidade do T-DNA. As condições das reacções de digestão encontram-se descritas na secção 5.2.4.1.

Os fragmentos de DNA foram separados por electroforese em gel de agarose (1,2%) em solução tampão TAE. Após o tratamento de depuração, desnaturação e neutralização (já descrito na secção 5.2.4.2.), o gel foi utilizado para a transferência do



DNA por capilaridade para uma membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra), de acordo com Sambrook e outros (1989).

A sonda, um fragmento de 1,2kb do *cpArMV*, foi marcada com digoxigenina usando o “DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II” (Roche, Alemanha) de acordo com o descrito no protocolo incluso.

A membrana foi pré-hibridada a 42°C, durante 30 minutos, com 18µL de 0,2M EDTA, 20µL Dig High Prime (Roche, Alemanha), 150µL H₂O, em recipiente fechado com agitação, seguida de hibridação, a 42°C, durante a noite. O processo de hibridação iniciou-se com a substituição da solução de pré-hibridação pela solução de hibridação: sonda marcada Dig-Labeled DNA (20 ng/µL) adicionada à Dig Easy Hyb. As lavagens da membrana foram feitas de acordo com o descrito no manual de utilização do Kit, sendo as primeiras à temperatura ambiente e a última a 68°C.

A detecção de sinal foi feita de acordo com o método “pronto a usar - ready-to-use” CSPD (Roche, Alemanha). A membrana foi colocada a incubar em tampão de lavagem (0,1 M ácido maleico, 0,15 M NaCl, pH 7,5; 0,3% Tween 20), durante 30 minutos com agitação, em solução bloqueante (10x “Bloquing reagent” (Roch, e Alemanha), solução tampão ácido maleico (1:10). Seguiu-se uma incubação de 30 minutos, em solução anti-corpo (anti-digoxigenina-AP (Roche, Alemanha) 1:1000 em solução bloqueante). A membrana foi lavada 2x15 minutos e equilibrada com solução tampão de detecção (0,1M Tris-HCl, 0,1M NaCl, pH 9,5). A detecção foi feita com a aplicação de 1mL de CSPD ready-to-use (Roche, Alemanha). O saco onde se encontrava a membrana foi selado e ficou a incubar a 37°C por 10 minutos. A membrana foi exposta a um filme Lumi-Imager durante 15 minutos a 15 - 25 °C, sendo a revelação feita por um processo idêntico ao já descrito para o método radioactivo.



5.3. RESULTADOS

5.3.1. Extração de DNA das plantas

O processo de extração do ácido nucléico das células do lúpulo foi adaptado do protocolo mini-CTAB (Anexo II), de modo a conseguir obter-se material suficiente para as análises posteriores, partindo de quantidades reduzidas de material fresco. Embora o processo de extração permitisse a obtenção de DNA puro, a quantidade de peso fresco (~200 mg) correspondia a uma planta com, pelo menos, 2 meses de subcultura (aproximadamente 10 cm de altura). A necessidade deste tempo de subcultura, está directamente relacionada com o facto do lúpulo ser uma planta com um peso fresco reduzido, em particular quando em cultura *in vitro*. Assim, foi necessário este período mínimo de 2 meses de subcultura para se obter os 200 mg necessários à extração dos ácidos nucléicos.

O material vegetal utilizado apresentava um desenvolvimento dentro dos padrões normais do crescimento das plantas controlo (não transformadas). Os meristemas, além de alongarem e crescerem, formando folhas e novos meristemas, também desenvolveram a capacidade de criar um sistema radicular, em tudo semelhante às plantas controlo. O DNA foi obtido em boas condições, de integridade e pureza. O rendimento da extração, embora tenha sido optimizado com os acertos feitos no protocolo, continua a obrigar à utilização de material com períodos de cultura relativamente longos.

5.3.1.2. Análise do DNA por PCR

As plantas putativamente transformadas foram analisadas ao fim de 3 meses, o que implica que já se encontravam em meio de selecção, há 2 - 3 subculturas. Foram analisadas unicamente as plantas que apresentavam um crescimento normal (semelhante às plantas controlo). Todas as outras (5% do total de plantas regeneradas após transformação) que se desenvolveram na forma de meristemas após a transformação, mas que apresentavam dificuldades de crescimento (perda de clorofila, ausência de sistema radicular) foram eliminadas sem serem submetidas a análise.

Das 200 plantas putativamente transformadas utilizando *Agrobacterium* e analisadas por PCR (Fig. 5.1: rg4', rg4, r, ra, rg3 rg2' e r0), verificou-se que, nem todas apresentaram a banda correspondente ao gene *cpArMV*. Idêntico resultado foi obtido para as plantas resultantes da transformação com bombardeamento de partículas (Fig. 5.1.: pb1, abc2). Assim, do total de plantas putativamente transformadas e analisadas, 20% apresentaram uma banda de 1284 pb correspondente à presença do gene *cpArMV*.



Enquanto que a frequência de integração do gene *npt II* foi de 30% (Fig. 5.1.). Verificou-se a presença de várias plantas com marcação para o gene do *npt II* (Gel 1, Fig. 5.1: rg4', rg4, r, ra, rg3, pb1, abc2, rg2', r0), no entanto, algumas das plantas positivas quanto a presença do *npt II*, não apresentaram o gene correspondente a construção *cpArMV* (No gel 2 da Fig. 5.1: rg4', abc2).

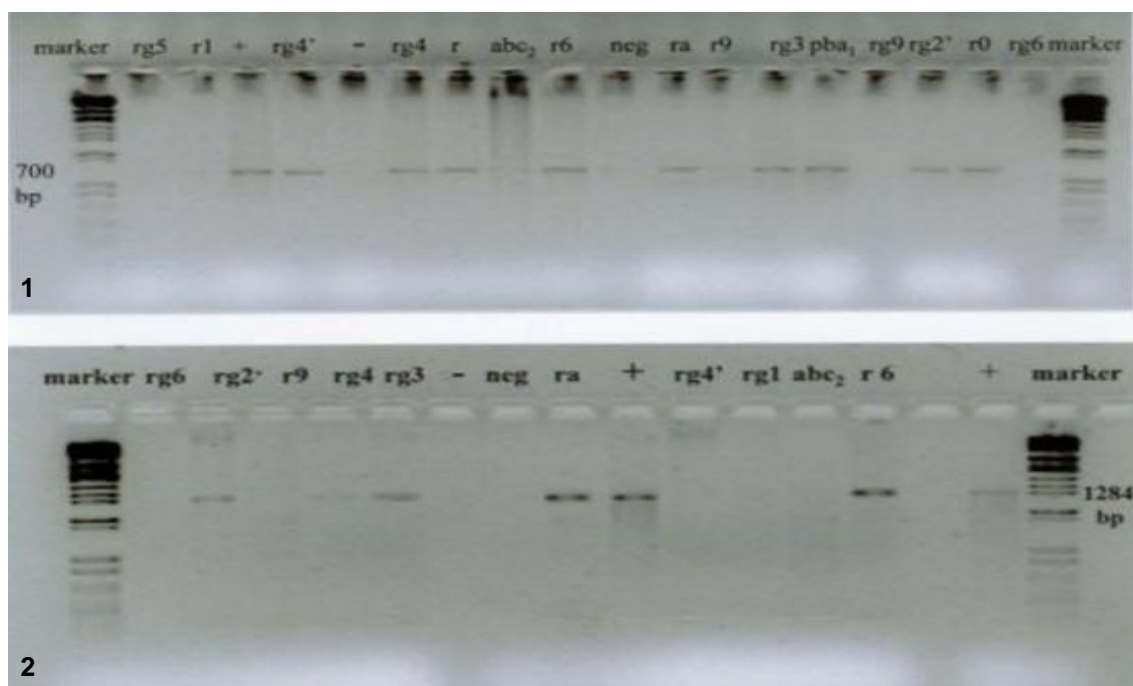


Figura 5.1: Detecção dos genes *npt II* (1) e *cpArMV* (2). Plantas transformadas por *Agrobacterium*: rg4', rg4, r, ra, rg3, rg2', r0. Plantas transformadas por bombardeamento de partículas: pb1, abc2.

Tal como observado na integração conjunta dos genes *uid A* e *npt II*, a frequência de plantas analisadas positivamente para a presença dos genes *cpArMV* e *npt II*, diminuiu ao longo do tempo. Não só, nem todas as plantas apresentaram os dois genes da construção *npt II* e *cpArMV*, como algumas (cerca de 0,9%, ao fim de 4-5 meses) apresentaram só o gene *cpArMV*, ou nenhum dos dois. Esta diminuição traduziu-se na perda de resistência ao antibiótico de selecção (canamicina) em mais de 80% dos casos nos 2 anos seguintes.

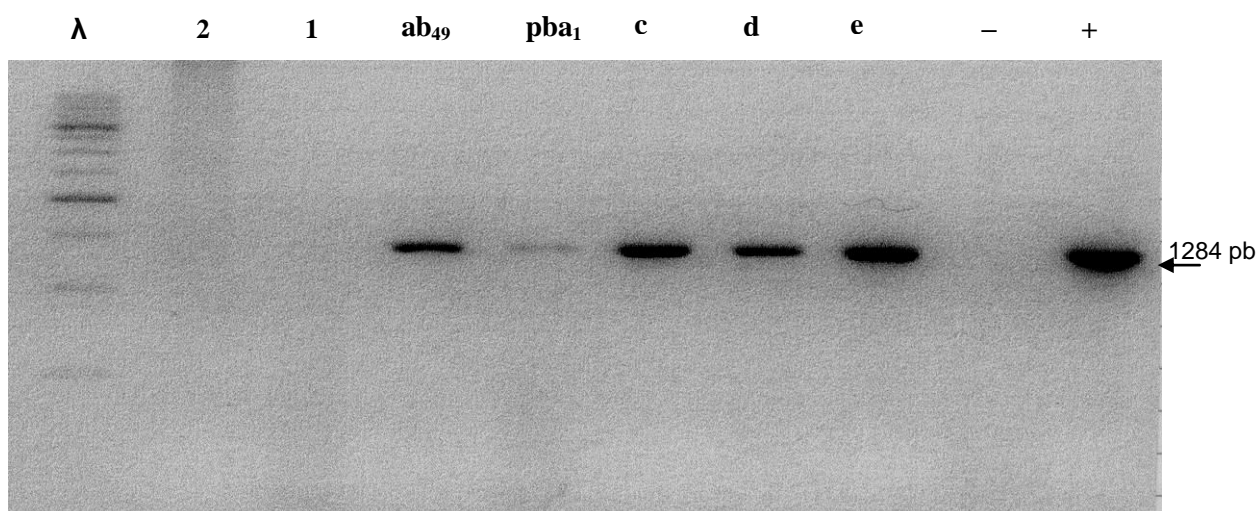


Figura 5.2.: Produtos de PCR do gene da cápside viral do ArMV. As plantas **ab₄₉**, **pba₁** e **2** foram plantas transformadas por bombardeamento de partículas. As plantas **c**, **d**, **e**, sofreram transformação mediada por *Agrobacterium*. A planta **1** é uma planta controlo não transformada. Controlo positivo (+) fragmento do gene do plasmídeo isolado por PCR. Controlo negativo (-) mistura de reacção sem DNA. λ (marcador molecular XIV).

Dos explantes sujeitos ao processo de transformação, somente 2 plantas mostraram manter o gene introduzido de um modo estável. Esta estabilidade traduziu-se na manutenção do gene durante, pelo menos, 2 anos após a transformação. Numa fase precoce o gene foi detectado, por PCR, em 10 plantas durante 6 a 8 meses (Fig. 5.2.). Findo este período o gene deixou de ser detectável por PCR.

5.3.1.3. Extracção de RNA das plantas

O RNA das plantas foi obtido em boas condições de pureza e integridade, sendo a quantidade, a única limitação (10 μ g / 0,4g peso fresco), o que obrigou à utilização de uma quantidade de material fresco relativamente elevada. Verificou-se que o maior rendimento foi obtido no protocolo apresentado (adaptado a quantidades de material inferiores), para as plantas teste (10 μ g / 0,2g peso fresco). A diferença de rendimento dos dois métodos foi evidente, como atesta a Fig. 5.3.. A utilização de um protocolo diferente para as plantas controlo, prendeu-se com o facto de haver uma maior disponibilidade deste material, permitindo obter RNA para vários testes, de uma só extracção. Assim sendo, o RNA obtido nas extracções iniciais das plantas controlo foi suficiente para não ser necessário testar outros protocolos.

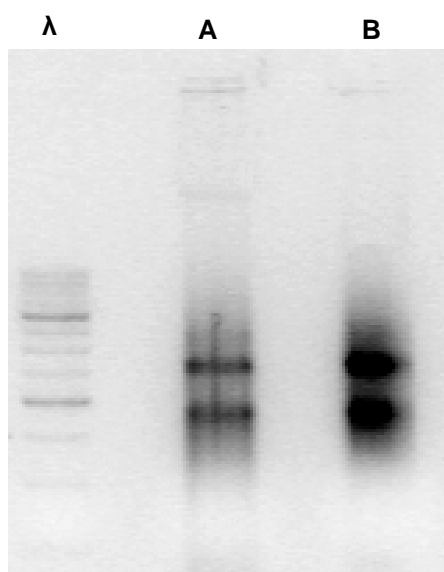


Figura 5.3.: RNA total de plantas de *Humulus lupulus* L. em gel de agarose 1%. **A)** RNA extraído de uma planta transformada. **B)** RNA extraído de uma planta controle. (**λ**) Marcador molecular XIV.

5.3.2. Análise das plantas transformadas por Southern blotting

As plantas analisadas por Southern blotting mostraram a integração do gene *cpArMV* no genoma das plantas. Em alguns casos, porém, a banda correspondente à integração era pouco intensa e noutros, mais extremos, essa marcação estava mesmo ausente, (ex: planta b, presente no gel dos produtos de PCR da Fig. 5.2.) não sendo por isso seleccionadas para análises ulteriores. Uma vez que a construção com o gene *cpArMV* só tem um local de reconhecimento para a enzima *Eco RI* (Capítulo 3, Fig. 3.1.), a restrição das amostras de DNA com esta enzima deveriam gerar fragmentos com parte da inserção e parte do DNA da planta. O número e tamanho dos fragmentos depende do número de locais de integração, da distância entre o local de corte da enzima na construção e do local de corte seguinte da enzima no DNA da planta. Nas análises efectuadas, foi possível verificar que as plantas evidenciavam a integração de uma só cópia do gene, no que diz respeito à digestão com *Eco RI* (Fig. 5.4.).

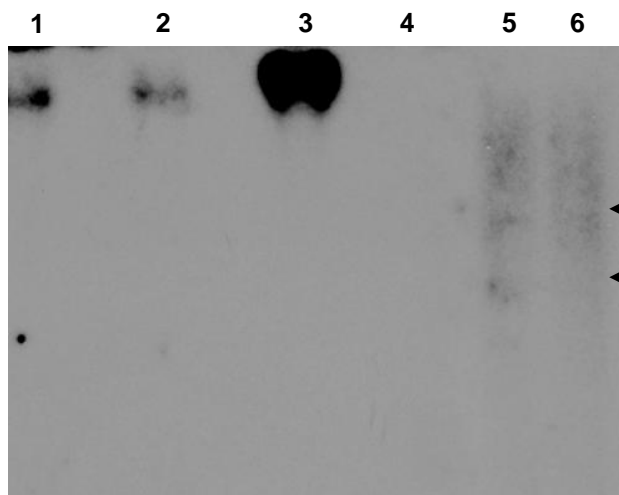


Figura 5.4.: Southern blotting de lúpulo transformado com pROKArMV. Linhas 1, 2: DNA genómico (6-8µg) digerido com enzima *Eco RI*, de duas plantas transgênicas (linha 1: transformação por *Agrobacterium*, linha 2: transformação por bombardeamento de partículas. linha 3: 0,8ng de plasmídeo digerido com enzima *Eco RI*. Linha 4: planta não transformada. Linha 5: 0,8ng de plasmídeo cortado com enzima *Sma I*. Linha 6: planta da linha 1 cortada com enzima *Sma I*. Setas mostram as bandas correspondentes ao gene *cpArMV* e ao restante plasmídeo.



Na digestão com enzima *Sma I*, verificou-se a existência de duas bandas, o que implicará a existência de um local de inserção. Esta integração ocorreu, tanto em plantas transformadas por bombardeamento de partículas, como nas que sofreram transformação mediada por *Agrobacterium*. São, no entanto, em maior número as que apresentaram a banda correspondente ao gene, quando transformadas por *Agrobacterium* (4% para o *Agrobacterium* e 1% para o bombardeamento de partículas).

5.3.3. Análise das plantas transformadas por Northern blotting

Das plantas analisadas com transformação mediada por *Agrobacterium*, somente uma apresentou marcação na detecção por auto-radiografia da sonda, *cpArMV* do plasmídeo isolado (detecção por Northern blotting). Observou-se uma mancha na zona correspondente ao gene da *cpArMV* (Fig. 5.5. linha 3). Esta mancha corresponde à presença do transgene, o que nos permite considerar que as plantas analisadas apresentavam capacidade de expressar o gene.

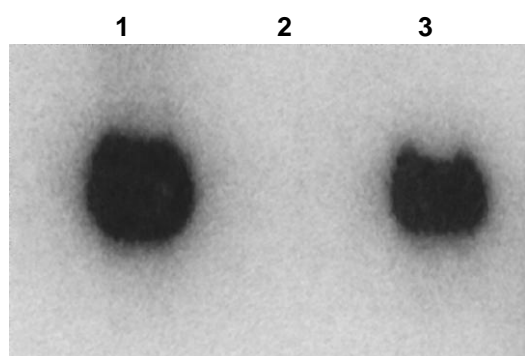


Figura 5.5.: Northern blotting de uma planta resultante de transformação mediada por *Agrobacterium*. Linha 1: RNA de uma planta de *Nicotiana tabacum* transformada com a construção contendo o gene da *cpArMV*. Linha 2: RNA de uma planta não transformada. Linha 3: RNA da planta transformada por *Agrobacterium* (rg₂).

Todas as outras plantas analisadas quer as transformadas por bombardeamento de partículas, quer as que sofreram transformação mediada por *Agrobacterium*, não apresentaram marcação nos Northern blottings a que foram sujeitas.

5.3.4. Análise por DAS-ELISA

Considerando a fórmula de determinação dos positivos (ver Capítulo 3, secção 3.2.1.) dos testes DAS-ELISA, nas plantas com valores de absorvência superiores a 0,278, considera-se que há expressão a proteína da cápside. Das plantas putativamente transformadas e analisadas por DAS-ELISA, verificou-se que entre 2% – 5%, apresentaram valores passíveis de serem considerados positivos (i.e. com expressão da proteína da cápside) (Tabela 5.1). Nas análises efectuadas consideramos positivos os valores superiores a 0,4, como forma de aumentar a margem de segurança.

Os valores de absorvência mais elevados foram obtidos para as plantas em que a transformação foi mediada por *Agrobacterium* (Tabela 5.1.). No caso das plantas



transformadas por bombardeamento de partículas, embora o número de plantas analisadas tenha sido menor (uma vez que menos plantas apresentaram Southern blotting com marcação correspondente à presença do gene), verificou-se que, além de se obterem menos plantas com resultados de DAS-ELISA positivos, os valores de absorvência atingidos por estas, também foram menores.

Tabela 5.1.: Valores de ELISA obtidos para as plantas transformadas utilizando *Agrobacterium* (todos os r), e bombardeamento de partículas (todas as ab), (+) plantas consideradas positivas, (-) plantas consideradas negativas.

Técnica de transformação genética										
	Mediada por <i>Agrobacterium</i>								Bombardeamento de partículas	
	rg 4	r 0	rg 3	r6	rg 2	rg 1	rg 5	r 1	pba 1	ab 49
Absorvência	0.323	0.305	0.451	0.470	0.502	1.039	0.714	0.153	0.128	0.453
Classificação	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+

Os valores de absorvência obtidos para as plantas transformadas com *Agrobacterium* são superiores aos obtidos por bombardeamento de partículas, respectivamente 5% e 2%. Estes valores estão próximos, para os dois métodos de transformação, dos obtidos na marcação por Southern blotting.

5.3.3. Análise por RT-PCR

A expressão do gene *cpArMV* foi analisada por RT-PCR. Das plantas analisadas 5% mostraram a banda correspondente à presença e transcrição do gene. Na Fig. 5.6. podem visualizar-se os produtos da RT-PCR de plantas transformadas (4, 5, 6, 7 e 8), embora, para a planta 8, o nível de transcritos fosse baixo. Nem todas as plantas que, previamente, tinham apresentado amplificação por PCR simples, apresentaram a banda correspondente aos transcritos na análise por RT-PCR. Estando no entanto os resultados relacionados com os obtidos no Southern blotting, uma vez que, as plantas que apresentaram marcação neste teste, apresentaram amplificação também por RT-PCR.

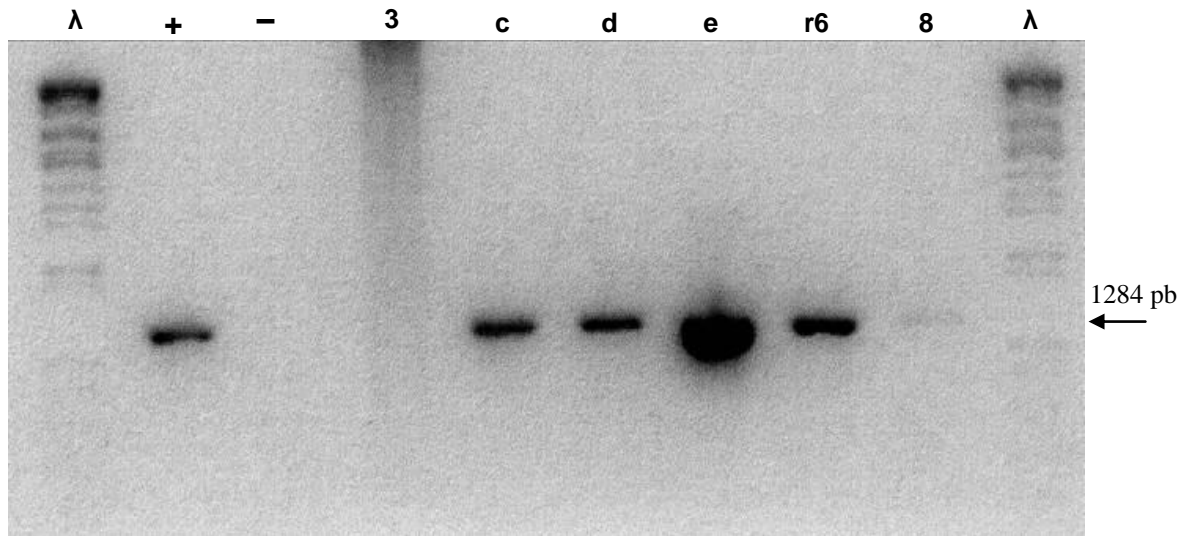


Figura 5.6. – Expressão do *cpArMV* por RT-PCR. As plantas das linhas 4, 5, 6 e 7 resultaram de transformação mediada por *Agrobacterium*. As plantas da linha 3 e 8 resultaram de bombardeamento de partículas. (+) Corresponde ao controle positivo. (-) Corresponde ao controle negativo. (λ) Corresponde ao marcador molecular, DNA do fago lambda cortado com enzima *Hind III*.

Os resultados positivos de RT-PCR, tanto para as plantas transformadas por bombardeamento de partículas, como por *Agrobacterium*, confirmam os resultados obtidos nas técnicas de DAS-ELISA, em que o número de plantas na transformação mediada por *Agrobacterium* com amplificação ou marcação foi superior (Fig. 5.7.).

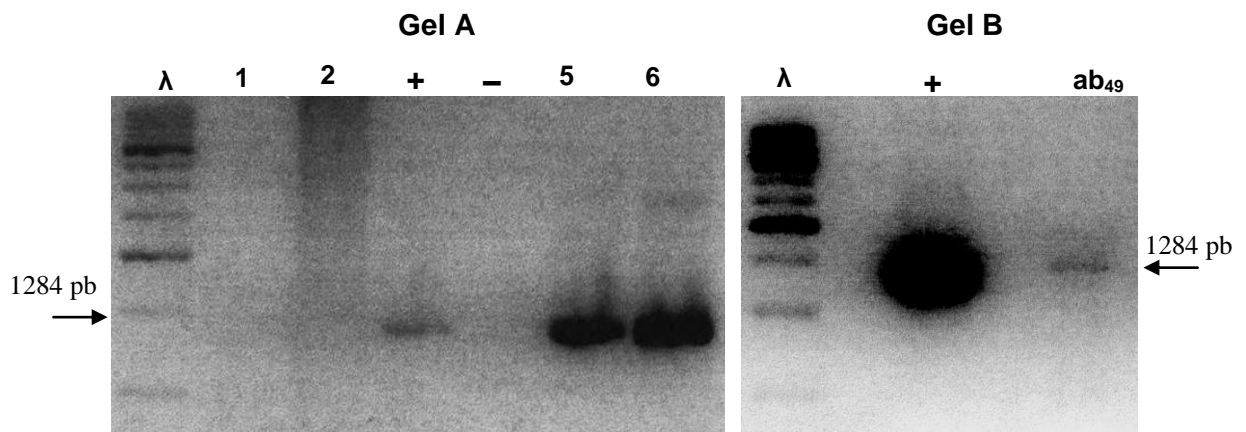


Figura 5.7. – Produtos de RT-PCR. Linhas 1, 2 e 7 correspondem a plantas transformadas por bombardeamento de partículas. Linhas 5 e 6 correspondem a plantas transformadas por *Agrobacterium* (+) Corresponde ao positivo. (-) Corresponde ao negativo. (λ) Corresponde ao marcador molecular lambda cortado com enzima *Hind III*.

5.3.5. Análise da manutenção do gene nas plantas transferidas para o campo

Duas das plantas transformadas, uma por bombardeamento de partículas e outra por *Agrobacterium* foram transplantadas para substrato, aclimataram e sobreviveram por



3 anos em terra. Destas, apenas a que tinha sido transformada por *Agrobacterium* evidenciou a permanência do gene *cpArMV* por Southern blotting (Fig. 5.8.).

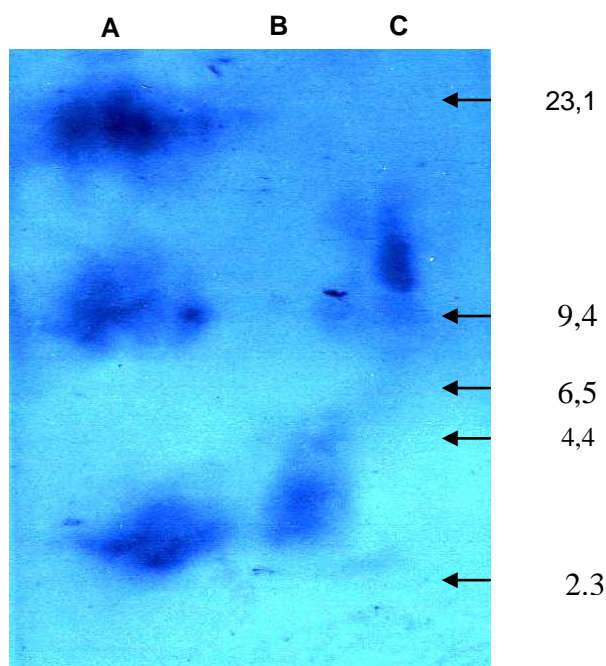


Figura 5.8. – Southern blotting do clone de *H. lupulus* transformado com pROKArMV e colocado em terra há mais de 2 anos. Foi usada como sonda um fragmento de 1,2 Kbp do gene da cápside viral do ArMV. **A)** Clone transformado digerido com enzima *Sma I* e *Eco RI*. **B)** Plasmídeo digerido com enzima *Sma I*. **C)** Plasmídeo digerido com enzima *Eco RI*.

Na Fig. 5.8. é visível a marcação correspondente ao corte do DNA pelas enzimas de restrição *Sma I* e *Eco RI*, e mais intensamente uma mancha correspondente a um fragmento de peso molecular bastante superior ao esperado. Assim, estamos na presença de pelo menos dois locais de inserção do gene *cpArMV* na planta, uma vez que surge mais uma mancha de maior peso molecular (23,1kbp), que o esperado das digestões com as enzimas de restrição utilizadas (com enzima *Sma I* surge fragmento de 3,4kbp, com *EcoR I* um fragmento cujo tamanho dependeria da distância entre o sitio onde o transgene se integrou no genoma e o 1º local de flanqueamento no DNA da planta.



5.4. DISCUSSÃO

5.4.1. Análise do DNA por PCR

O rendimento dos processos de extração dos ácidos nucleicos foi baixo, por motivos associados à morfologia da planta e às condições de cultura. Assim, por ser uma planta trepadeira de caules fibrosos e longos, e com folhas só nos entrenós, o lúpulo tem pouco peso fresco. Além disso o grau de hidratação do material em cultura é muito elevado, donde em termos de quantidade de ácidos nucleicos disponíveis nas plantas de lúpulo, *in vitro*, o rendimento é necessariamente baixo.

O gene *cpArMV* foi integrado nas plantas que sofreram transformação mediada por *Agrobacterium*, e nas que foram transformadas por bombardeamento de partículas. A percentagem de plantas que mantiveram o gene integrado ao fim de 6 meses, contudo, foi bastante baixo, não ultrapassando os 2 a 5%. Este resultado mostra que, ainda que num número reduzido de plantas, foi possível a incorporação estável do transgene. Outros trabalhos utilizando a transformação mediada pela estirpe de bactérias LBA 4404 de *Agrobacterium*, e a construção 35SGUSINT, revelaram-se pouco conclusivos quanto à integração estável de genes no lúpulo (Horlemann *et al.*, 2003; Oriniakova *et al.*, 1999). A planta utilizada nestes registos foi uma variedade checa, em que as marcações histoquímicas do GUS, embora visíveis, também diminuíram com o tempo. Nesse caso, não foi mesmo possível obter qualquer marcação por Southern blotting (Oriniakova *et al.*, 1999). É pois possível que, no caso do lúpulo, possa existir um processo de silenciamento dos transgenes e/ou as construções usadas não sejam as mais eficientes, ou ainda que o processo de regeneração associado, apesar dos resultados obtidos, não seja o mais apropriado, pois as células com maior capacidade morfogénica não são, necessariamente, as mais acessíveis, ou as mais sensíveis à infecção por *Agrobacterium*. O processo de bombardeamento, apesar de ter uma maior capacidade de penetração nos tecidos, não se revelou mais eficiente na frequência de obtenção de transformações estáveis. Assim considerarmos que, embora as células alvo possam ser atingidas, não será esse o maior factor limitante. Apesar de já existirem vastos conhecimentos quanto aos factores bacterianos envolvidos na transferência genética inter-reinos (*Monera versus Plantae*) (Ditt, 2001), o conhecimento do que se passa no hospedeiro ainda está pouco claro. Trabalhos recentes (Radclyffe *et al.*, 2003) indicam que nas células eucarióticas a intensificação da sensibilidade à transformação mediada por *Agrobacterium*, está intimamente relacionada com a síntese de purinas nas células hospedeiras. Deste modo, a utilização de inibidores da síntese de purinas, pode



umentar substancialmente a eficiência de transformação, sem que isso esteja dependente de anteriores manipulações genéticas. Este poderá ser um caminho a seguir em posteriores trabalhos de transformação utilizando o lúpulo.

5.4.2. Análise molecular das plantas

5.4.2.1. Análise das plantas transformadas por Southern blotting

Os resultados obtidos nestas análises demonstram que apesar de positivos, as plantas com marcação correspondente à presença do gene continuam a corresponder a uma baixa percentagem do total de transformadas, o que deixa em aberto a possível melhoria em todo o processo (ex: tipo e condições de cultura), com vista ao aumento da frequência de plantas com transformação estável.

As hibridações por Southern blotting dão a informação de que, existe mais do que um local de inserção nas plantas transgênicas, na digestão pela enzima *Sma I*. A razão para este resultado pode ser diversa, desde múltiplas inserções, integrações aberrantes capazes de gerarem novos locais durante o processo de integração do plasmídeo, ou ainda, a deleção de partes do T-DNA. Alguns autores consideram que a instabilidade genética é induzida em *loci* particulares do genoma, que se tornam locais preferenciais de integração do T-DNA, por recombinação ilegítima (Risseeuw *et al.*, 1997). A indução dessa instabilidade terá origem no stresse existente nas células de explantes e *calli* em cultura, habitualmente utilizados como alvos de transformação. Assim sendo, será importante, por um lado, ter em atenção as construções utilizadas de modo a minimizar as metilações e outros processos de silenciamento, e por outro, considerar novas e diferentes técnicas de transformação, como seja a infiltração, de forma a poder ser ultrapassado o stresse causado pela própria cultura *in vitro*. Esta seria pois uma possibilidade a levar em conta para aumentar o número de plantas com integração estável dos genes de interesse.

5.4.3. Análise por Northern blotting das plantas transformadas

Com os resultados obtido com a técnica de Northern blotting, podemos concluir que, somente uma parte muito pequena das plantas transformadas apresenta a transcrição do gene introduzido. No entanto, os resultados obtidos para as análises de RT-PCR indicam uma maior frequência de plantas, não só com o gene introduzido, como com a sua transcrição o que, numa primeira análise, parece um contra-senso. Embora não tivesse sido testada a resistência das plantas à inoculação com o vírus, no sentido de determinar o grau de resistência e capacidade de recuperação das plantas



transformadas, estes resultados podem ser comparáveis a outros trabalhos (Lentini *et al.*, 2003), em que o gene, não sendo detectável por Northern blotting, o foi por RT-PCR, apresentando as plantas resistência à infecção. Nestes estudos, revelou-se que as linhas de plantas com resistência, expressam o gene da proteína da cápside viral, mas abaixo do limite de detecção dos Northern blotting. O facto de existir esta discrepância de resultados entre as técnicas de RT-PCR e de Northern blotting, poderia ser analisada em paralelo com ensaios de resistência à infecção viral. Se a resistência fosse efectiva estes resultados significariam eventualmente uma resistência mediada por RNA, e não exclusivamente pela presença da cápside viral.

Os processos de silenciamento são já objecto de estudo em diferentes tipos de plantas e métodos de transformação (Guo & Ding, 2002), podendo ser processos complexos e múltiplos, que determinam o tipo e a intensidade de resistência das plantas transformadas.

5.4.5. Análise por DAS-ELISA

Os resultados obtidos, embora para um pequeno número de plantas, são bastante promissores quanto à possibilidade de obtenção de plantas com a expressão da proteína da cápside viral, o que poderá implicar uma efectiva resistência às infecções virais provocadas pelo Nepovirus em causa, e eventualmente, uma protecção cruzada, com resistência a vários outros vírus aparentados com o ArMV.

O facto de haver uma expressão da proteína somente em algumas das plantas transformadas, não implica necessariamente que não exista uma possível resistência à infecção viral, uma vez que a resistência pode ser determinada ao nível da transcrição e presença do RNA da cápside (Guo *et al.*, 1998).

A expressão da cápside viral em plantas transformadas por bombardeamento de partículas é inferior à expressão obtida para as plantas transformadas com *Agrobacterium*, o que pode estar associado aos locais de inserção e aos processos de silenciamento (Mlynárová *et al.*, 1996). No caso das transformações por bombardeamento de partículas a integração será menos direccionada, o que poderá dar origem a maior número de escapes, que não apresentariam qualquer expressão, quer do RNA, quer da proteína.



5.4.4. Análise da manutenção do gene nas plantas transferidas para o campo

Com este ensaio foi possível verificar que, apesar de as plantas se encontrarem há mais de 2 anos em terra, o que significa que não estão sujeitas as pressões de meios de selecção, a expressão do transgene manteve-se.

A utilização de genes repórter e de selecção é uma prática comum e universalmente utilizada, existindo no entanto relatos de alterações na expressão normal das proteínas das plantas por interferência desses genes (Page & Angell, 2002). Em alguns trabalhos, na tentativa de contornar os problemas associados à presença de genes de selecção (problemas estruturais e mesmo de possível saúde pública) vários outros genes foram testados (Kunze *et al.*, 2001; Zhengquan *et al.*, 2004) ou mesmo a sua total ausência (Permingeat *et al.*, 2003). É, no entanto, quase obrigatório para que seja viável a selecção de um lote elevado de plantas transformadas, a utilização destes genes. Estas plantas, sem pressão selectiva, permitem-nos considerar que o gene se mantém de facto estável, permitindo um bom ponto de partida para estudos futuros de resistência a inoculações virais. A obtenção, ainda que de uma única planta transformada, permite que, utilizando métodos de micropropagação, se consiga um grande número de plantas com uma transformação estável e com boas possibilidades de serem resistentes ao ArMV.

A planta analisada que resultou de bombardeamento de partículas, e não apresentou marcação no Southern blotting, poderá ter como explicação o facto de, fazendo esta técnica recurso a meios não-radioactivos, possa ser menos sensível. Acresce ainda que a sua expressão poderá ser mesmo menos intensa, não sendo obrigatoriamente (como já foi referido anteriormente) não resistente. Existe ainda a possibilidade de a planta ter, de facto, perdido o gene durante o processo de desenvolvimento durante os dois anos de ausência de pressão selectiva. Mais testes serão necessários para se poder concluir quanto à permanência e eficiência de expressão do transgene nestas plantas.



CAPÍTULO VI

Conclusões

Índice

CONCLUSÕES	162
REGENERAÇÃO DE LÚPULO	163
MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO E OBTENÇÃO DE PLANTAS LIVRES DE VÍRUS	164
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA	165
CONCLUSÃO FINAL	166
PERSPECTIVAS FUTURAS	167

Conclusões

A Biotecnologia vegetal, na sua vertente de transformação genética, pode abrir novos horizontes e possibilidades, no controlo de doenças e pragas, em cultivares extremamente susceptíveis, como é o caso do lúpulo. Assim, e sabendo que nos últimos 15 anos foram transformadas mais de 100 espécies de plantas contra doenças e pragas, nomeadamente, milho, trigo, soja, tomate, batata, algodão e arroz (Babu *et al.*, 2003), o melhoramento das cultivares de lúpulo através da transformação genética será sem dúvida uma opção de futuro. O facto de, com o auxílio destas técnicas, o melhoramento das plantas de interesse agronómico ou agro-florestal ser mais rápido e direccionado, cria possibilidades complementares ao melhoramento tradicional. Numa agricultura cada vez mais pressionada por necessidades urgentes de um mundo em expansão e pela limitação dos seus próprios recursos, esta mais valia técnica pode tornar-se determinante.

No caso de algumas plantas, nomeadamente espécies lenhosas, esta possibilidade torna-se muito importante devido a todas as limitações de tempo que, o melhoramento tradicional implica. No lúpulo, embora não sendo uma planta lenhosa e não tendo uma fase juvenil prolongada, tem a particularidade de ser uma planta dióica, em que, o interesse agronómico e comercial está restrito à planta feminina, o que torna limitado o número de genes a manipular e as características dos cruzamentos. As linhas de acção mais comuns na biotecnologia vegetal estão relacionadas com a produtividade e a obtenção de variedades que sejam, em simultâneo, produtivas e mais resistentes a pragas e doenças. Neste sentido, direccionou-se este estudo no sentido de obter plantas transformadas resistentes ao Vírus do Mosaico de *Arabidopsis*. Visto que para cada espécie, e até para cada variedade dentro de uma mesma espécie, as condições de regeneração e de transformação podem variar, como se de uma outra espécie se tratasse, foi fundamental, desenvolver e otimizar um protocolo de regeneração e transformação do lúpulo, de modo a constituir uma mais valia para todo o processo.

Atendendo a que o lúpulo é uma cultivar de grande valor comercial, fundamental a nível mundial na indústria cervejeira, a manipulação genética pode trazer benefícios por ser direccionada e rápida. A propagação *in vitro* é um método extremamente expedito e funcional para multiplicar novas variedades comerciais, com origem em material geneticamente manipulado. A manipulação genética do lúpulo poderá ter diferentes propósitos, desde a melhoria das características das variedades, ou mesmo a criação de novas variedades, até à introdução de resistência a doenças. O lúpulo é uma planta extremamente susceptível a uma gama alargada de doenças, das quais se podem



destacar as causadas por infecções virais. As infecções provocadas por estes organismos comprometem a produtividade e qualidade dos campos de lúpulo e, necessariamente, tem consequências na indústria cervejeira. Os métodos de controlo e combate destas contaminações, uma vez as plantas colocadas no campo, não são eficientes, o que as torna um problema e pode ser determinante para os pequenos produtores como Portugal que, não dispõe de campos alternativos, em caso de contaminação.

O sistema de regeneração associado a um protocolo de transformação genética adequado serviu de base de trabalho para a introdução de resistência à infecção viral, provocada por Vírus do Mosaico de *Arabidopsis* (ArMV), utilizando para isso a estratégia de introdução do gene da cápside do vírus.

O trabalho foi organizado em 3 fases, numa fase inicial foram testados diferentes meios e optimizado o protocolo de regeneração de lúpulo. Na segunda fase determinaram-se as condições fitossanitárias do material de partida e, desenvolveram-se possíveis métodos alternativos de obtenção de plantas livres de vírus. A fase final foi a que compreendeu a transformação de plantas propriamente dita.

Regeneração de lúpulo

Todas as culturas *in vitro*, utilizadas na transformação, foram estabelecidas a partir de meristemas de plantas de lúpulo de campo. O material foi colocado em cultura em Abril-Maio, altura em que, o crescimento das plantas no campo é mais intenso. No processo de regeneração foram testadas duas variedades comerciais (Er e BG) e um clone espontâneo recolhido no distrito de Bragança. O meio utilizado na micropropagação foi o meio Adams modificado, para todas as variedades, com crescimento igualmente rápido, nas diferentes variedades e clone. Estas plantas de lúpulo, foram estudadas no sentido de determinar qual o melhor meio e melhor explante, para a obtenção de organogénese. Foram testados vários meios base e várias combinações hormonais, verificando-se que, para cada variedade, o meio com maior taxa de regeneração era diferente. Assim, para a variedade BG o melhor meio foi o meio MS suplementado com 3 mg/L Zea e 0,025 mg/L de IAA, enquanto que, para a variedade Er o meio testado, com taxa de regeneração mais elevada, foi o meio SH suplementado com 1,5 mg/L Zea e 0,025 mg/L IAA. Para o clone Br, o meio seleccionado para os ensaios posteriores de regeneração, foi o meio MS com 15 g/L de sacarose e 1,5 mg/L de Cinetina e 0,02 mg/L de IAA. Foram testadas alterações de pH, adição de ácido Acetilsalicílico, adição de sulfato de cobre, stresse térmico e diferentes concentrações de açúcares, com o



objectivo de aumentar a taxa de regeneração. Verificou-se que, no caso das alterações ao meio e condições térmicas, a percentagem de regeneração aumentou sem, no entanto, este ultrapassar em 10 % os resultados obtidos sem aplicação dos stresses.

Estudou-se a capacidade regenerativa de folhas, pecíolos e entrenós. As folhas não apresentaram capacidade morfogénica para meristemas, verificando-se que a morfogénese se expressou sempre na forma de raízes, tendo por isso, sido abandonado como material de partida para a transformação. Os pecíolos embora com uma boa resposta, num balanço final de plantas regeneradas por explante apresentaram valores inferiores aos obtidos com os entrenós. Com base nestes resultados, foram usados apenas os entrenós, como explante de partida para os ensaios subsequentes de transformação.

O clone Bragança foi o material vegetal usado para os ensaios de transformação genética, uma vez que apresentou maiores taxas de regeneração e, por outro lado, encontrava-se em boas condições fitossanitárias e fisiológicas.

Métodos de determinação e obtenção de plantas livres de vírus

Os métodos tradicionais de obtenção de plantas livres de vírus passam pela utilização de termoterapia e isolamento de meristemas. Desde a década de 70 do século XX que estes métodos são utilizados, associando o tratamento das plantas a técnicas, então recentes, de micropropagação *in vitro*. Este método, embora possa ser eficiente, implica tratamentos longos e agressivos para as próprias plantas. No sentido de verificar se a utilização de antivírus químicos poderiam ser uma abordagem a ter em conta, foi testado um composto comercial. O composto comercial foi testado em paralelo com a utilização de termoterapia e isolamento de meristemas.

Dos ensaios dedicados a este composto foi necessário determinar qual o seu modo de utilização, condições e concentrações, testar os seus efeitos nas plantas e nos meios de cultura. Todos os controlos da efectividade deste composto, assim como da termoterapia e isolamento de meristemas, foram feitos com análises de DAS-ELISA, feitas periodicamente, alargando-se esses testes até aos 6 meses, após o tratamento aplicado.

Verificou-se que o material vegetal, não só apresentou boas taxas de sobrevivência, como de facto, os testes DAS-ELISA, mostraram plantas livres de vírus. Embora, a obtenção de plantas isentas de vírus, tenha sido semelhante nos dois processos testados, a mais valia conseguida pela rapidez e menor manipulação, com a utilização do antivírus químico, revelou-se extremamente interessante e prometedora.



Transformação genética

As plantas de lúpulo do clone Bragança foram transformadas, utilizando dois métodos: transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* e bombardeamento de partículas. Os explantes sujeitos a transformação foram os entrenós. Inicialmente, a construção utilizada para a transformação foi o p35SGUSINT, com os genes *uid A* e *npt II*. Numa primeira abordagem, foi testada histoquimicamente a expressão transiente do gene *uid A*. Os ensaios de transformação mediada por *Agrobacterium*, foram otimizados, em tempo de corte dos explantes antes da co-cultura, presença de acetosseringona, tempo de co-cultura, antibióticos de eliminação das bactérias, início da selecção, concentração do antibiótico de selecção a aplicar. Uma vez optimizadas estas variantes, verificou-se que, os melhores resultados, foram obtidos com corte dos explantes entre as 26h e as 48h antes da co-cultura, sem acetosseringona no meio, 48h de co-cultura, utilização de uma mistura de 250 mg/L de Carbenicilina e de 250 mg/L de Cefotaxima, para eliminação das bactérias, início da selecção após 3 dias do início da co-cultura, selecção inicial com 25 mg/L de Canamicina.

Para o bombardeamento de partículas a optimização teve como resultados a utilização de 1500 a 2000 psi, com uma distância de 9 cm, sendo o período de pré-corte dos explantes igual à transformação mediada por *Agrobacterium*. O início da selecção e a concentração de antibiótico de selecção foram os mesmos utilizados previamente para a transformação mediada por *Agrobacterium*.

Ao longo do tempo, a presença do gene *uid A*, detectada histoquimicamente, e por PCR, foi sendo perdida. Material analisado previamente, com resultados positivos para a presença do gene, mostrava, ao fim de 5 a 6 meses, que o gene já não era detectável. Em simultâneo, a presença do gene *npt II*, foi detectado numa frequência muito superior. Foram feitas transformações com a construção pROKArMV contendo o gene *cpArMV*, tendo sido determinado que, ao longo do tempo, este gene também era igualmente instável, verificando-se, no entanto, que a manutenção do gene era mais efectiva que no caso da construção p35SGUSINT.

No material transformado e que evidenciou a presença estável do gene (mais de 6 meses), foram feitos testes por Southern blotting, RT-PCR, DAS-ELISA e Northern blotting. Para algumas plantas, estes testes foram positivos quanto à presença e expressão do gene da *cpArMV* e do *npt II*. Foram testadas ainda, plantas com origem em transformação mediada por *Agrobacterium* e bombardeamento de partículas, 3 anos após transferência para terra sem pressão selectiva, para o gene da *cpArMV*, verificando-se marcação positiva quanto à presença e expressão do gene por Southern blotting.

Dos dois métodos de transformação testados observou-se uma maior estabilidade na manutenção do gene inserido, quando foi utilizado o *Agrobacterium* como vector. As percentagens de transformação obtidas pelos dois métodos foram igualmente baixas, considerando os resultados em explantes analisados, com mais de 6 meses de transformação. Assim, para a transformação mediada por *Agrobacterium* a percentagem foi de 0,91 %, enquanto que, a transformação por bombardeamento de partículas foi de 0,76 %. Na análise feita às plantas transgênicas desenvolvidas no campo, somente as obtidas por transformação mediada por *Agrobacterium*, evidenciaram o gene *cpArMV* integrado no genoma, pela técnica de Southern blotting.

Conclusão final

Neste trabalho foi possível determinar métodos e otimizar procedimentos, com vista à transformação de *Humulus lupulus* L. Embora, a instabilidade do processo tenha sido um dos maiores problemas deste estudo, foi possível obter plantas com transformação estável, considerando as análises mais de 6 meses após a transformação. Foi ainda possível obter uma planta com a presença do gene após 3 anos de transferência para terra, sem pressão selectiva.

Este trabalho abre novas perspectivas para a transformação do lúpulo em geral, que sendo uma planta extremamente sensível a diferentes e variados agentes patogénicos, tem extrema importância para a indústria cervejeira, a nível Mundial.

O facto de ter sido possível transformar um clone espontâneo, traz um valor acrescido, em dois aspectos fundamentais: a possibilidade de haver um modelo específico para o lúpulo, e o conhecimento com base em clones espontâneos, para a manipulação genética de novas variedades, com novas possibilidades em termos de aromas e resistências.

As possíveis limitações neste trabalho, poderão estar relacionadas com o facto de, o processo de regeneração, embora sendo extremamente produtivo, possa envolver mais do que uma célula, o que torna difícil a obtenção de plantas com transformação estável em vez de quimeras ou escapes. Por outro lado, a susceptibilidade da planta ao *Agrobacterium* parece ter ficado bem evidente, verificando-se uma boa interacção planta-bactéria, evidente na expressão transiente do gene *uid A* (GUS), donde o aumento da frequência de transformação poderá estar ainda associada a possíveis melhoramentos na construção utilizada.



Perspectivas futuras

No decorrer deste trabalho abriram-se perspectivas e surgiram novas vertentes de estudo que não houve oportunidade de explorar. Entendemos que seria necessário proceder a um conjunto de ensaios que se prendem com os resultados por nós obtidos, nomeadamente no que respeita o uso do antivírus químico, a integração dos genes no genoma da planta, o teste da resistência ao Vírus do Mosaico de *Arabidopsis* e a subsequente produção de variedades de interesse económico através de cruzamentos controlados.

Assim, será de todo o interesse desenvolver mais ensaios com o antivírus químico utilizado, Isoprinosina, tentando perceber a sua actuação sobre as partículas virais e se o seu efeito se estende a outros grupos de vírus.

No sentido de ultrapassar o problema da estabilidade de integração dos genes, seria interessante testar outras construções com promotores mais eficientes e tentar visualizar no genoma da planta, onde se inserem os genes introduzidos. Essa visualização (com análise genómica por técnicas de fluorescência, como multicolor FISH) (Pedersen *et al.*, 1997) permitiria determinar se a frequência de inserção dos genes nos cromossomas é aleatória, e se num mesmo cromossoma há variações na frequência e local de inserção. Deste modo, pensamos que talvez fosse possível estabelecer uma relação em termos de localização da inserção e estabilidade do transgene.

Com as plantas já por nós obtidas, entendemos que o passo a seguir será a multiplicação e o teste de resistência ao Vírus do Mosaico de *Arabidopsis*. Testes com o agente infeccioso permitirão determinar se os diferentes clones de transgenes possuem resistência/tolerância ao vírus e qual o grau desta, para cada um deles. Após os ensaios de infecção em laboratório seguir-se-á o desenvolvimento das plantas em estufa, viveiro e, finalmente no campo. A determinação da existência efectiva de alterações genéticas passíveis de alterar a fisiologia das plantas é igualmente essencial, dada a preocupação dos decisores políticos em relação às plantas geneticamente modificadas. Alterações que podem ser responsáveis pela produção de toxinas, ou interferir na quantidade e qualidade dos compostos secundários, são determinantes para a indústria cervejeira e para os consumidores. Com os clones resistentes seleccionados, será de extremo interesse, num futuro próximo, testar cruzamentos utilizando estes clones transformados. Para isso importa aprofundar os dados disponíveis em termos de produção e viabilidade do pólen destas plantas.

Como resultado destes cruzamentos poderão obter-se variedades de grande interesse económico, acrescido do facto de serem resistentes a uma das maiores causas de perdas na produção dos campos de lúpulo na Europa e Austrália.



Bibliografia

- Abbott M. S., Pugh T. A., Pringle A. T. (1993) Biotechnological advances in brewing. Gump B. H. ed., beer and wine Production (ACS Symp. Ser. 536), 150:180.
- Adams A. N., Barbara D. J., Davies D. L. (1987). The etiology of hop chlorotic disease. Ann. Appl. Biol. 11, 365:371.
- Adams, A. N. (1975). Elimination of viruses from hop (*Humulus lupulus*) by heat therapy and meristem culture. J. Hort. Sci., 50, 151:160.
- Ahuja, M.R. (2001). Recent advances in molecular genetics of forest trees. Euphytica, 12, 173:195.
- Ainsley P. J., Collins G.G., Sedgley M. (2001). Factors affecting *Agrobacterium* - mediated gene transfer and the selection of transgenic *calli* in paper shell almond (*Prunus dulcis* Mill.). Journal of Horticultural Science and Biotechnology, vol 76, Issue 5, 522:528.
- Ziemienowicz A., Merkle T., Schoumacher F., Hohn B., Rossi L. (2001). Import of *Agrobacterium* T-DNA into Plant Nuclei: Two Distinct Functions of Vir D2 and VirE2 proteins. Plant Cell, 13, 369:384.
- Aloni R., Wolf A., Feigenbaum P., Avni A., Klee H. J. (1998). Plant Physiol., 117, 841:849.
- Amoah B.K., H. Wu, C. Sparks, H.D. Jones (2001). Factors influencing *Agrobacterium* - mediated transient expression of *uid A* in Wheat inflorescence tissue. Journal of Experimental Botany, vol. 52, nº 358, 1135:1142.
- Annadava S., Rademaker W., Ramanna M., Odayakumar M., Jong J. (2000) Response of stem explants to screening and explant source as a basis for methodical advancing of regeneration protocols for Chrysanthemum. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 62 (1) 47:55.
- Armitage P., Walden R., Draper J. (1988). Vectors for the transformation of plant cells using *Agrobacterium*. In J. Draper, R Scoot, P. Armitage, R. Walden, eds, Plant genetic transformation and gene expression – a laboratory manual, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1:67.
- Azcón-Bieto J., Talón M. (2001). Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U., Edificio Valrealty, Madrid, Edicions Universitat de Barcelona, Barcelona.
- Babu R.M., Sajeena A., Seetharaman K., Reddy M. S. (2003). Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management- an over view. Crop Protection, vol. 22, Issue 9, 1071:1086.



- Bais P. H., Sudha S. G., Ravishankar A. G. (2000). Putrescine and Silver Nitrate Influences Shoot Multiplication, In Vitro Flowering and Endogenous Titrers of Polyamines in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19, 238:248.
- Bakshi S. K., Jotshi P. N., Kitchlu S., Bhat B.K. (1994). RRL (H) 82: a new high alpha-acid Hop. *J. Am. Soc. Brwe. Chem.*, 52(1), 35:36.
- Baraldi R., Rossi F, Lercari B. (1988). In vitro shoot development of *Prunus* GF 655-2: interaction between light and benzyladenine. *Physiologia Plantarum*, vol. 74, 440:443.
- Barbara D. J., Morton A., Adams A. N., Green C. P. (1990). Some effects of hop latent viroid on two cultivars of hop (*Humulus lupulus*) in the U.K. *Ann. Appl. Biol.*, 117, 359:366.
- Bardonnnet N., Hans F., Serghini M.A., Pinck L. (1994). Protection against virus infection in tobacco plants expressing the coat protein of grapevine fanleaf nepovirus. *Plant Cell Reports* 13, 357:360.
- Batista D., Sousa M.J., Pais M.S. (1996). Plant regeneration from shoot and petiolo-derived callus of *Humulus lupulus* L. (hop) clone Bragança and var. Brewer's Gold. *In Vitro Cell. Develop. Biol.* 32, 37:41.
- Baulcombe David C. (1996). Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *The Plant Cell*, 8, 1833:1844.
- Benitez J.L., Magadan J.A. (1996). Aproximacion a la determinación del momento optimo de madurez del lúpulo. *Cerveza y Malta*, XXXIII (2), 130, 19:21.
- Benitez J.L., Forster A., De Keukeleire D., Moir M., Sharpe F.R., Verhagen C.L., Westwood K.T. (2001). Hops and Hop Products, European Brewery Convention, Manual of Good Practice. Prepared for EBC Technology & Engineering Forum with the assistance of EU under the AIR programme. Produced at BRF International. pp 19:22
- Bennici A., Grifoni T., Schiff S., Bovelli R. (1997). Studies on *callus* growth and morphogenesis in several species and lines of *t Amaranthus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Vol. 49(1) 29:33.
- Beunet C. (2004). Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 115, 1:8
- Bettany Andrew J.E., Dalton Susan J., Timms E., Morris P. (1998). Stability of transgene expression during vegetative propagation of protoplast-derived tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants. *Journal of Experimental Botany*, vol.49, nº. 328, 1797:1804.
- BH (2001). Beer & Health Dossiers – Hop Properties of the hop plant. www.bierengezondheid.be
- BH (2005). Beer & Health Dossiers - The Hop in the brewing process and as medicinal plant. www.bierengezondheid.be
- Bhau B.S., Wakhlu A.K. (2001). Effect of genotype, explant type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 66, 25:29.



- Bidney Dennis, Scelonge Chris, Martich Joanie, Burrus, Monique, Sims Lynn, Huffman Gary (1992). Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, 18, 301:313.
- Birch R.G. (1997). Plant transformation: Problems and Strategies for Practical Application. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 297:326.
- Bock K.R. (1966). Arabis mosaic and *Prunus* necrotic ringspot viruses in hop (*Humulus lupulus* L.). *Ann. Appl. Biol.* 57, 131:140.
- Borkowska M., Kleczkowski K., Pawelczak A., Wielgat B. (1995). Transformation of diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system. II Stability of transformation in tubers, micropropagated and greenhouse grown plants. *Acta Physiologia Plantarum*, 17, 275:280.
- Bowles Dianna, Klee Harry (2001). Introduction to the Special Issues on Plant GM Technology. *The Plant Journal*, 27(6), 481:482.
- Briggs Steven (1998). Plant genomics: More than food for thought. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 95, 1986:1988 (colloquium paper).
- Bruening George (1998). Plant gene silencing regularized. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol 95, 23, 13349:13351.
- Butterfield M.K., Irvine J.E., Garza M.V., Mirkov T.E. (2002). Inheritance and segregation of virus and herbicide resistance transgenes in sugarcane. *Theor. Appl. Genet*, 104, 797:803.
- Campbell B.T., Baenziger P.S., Mitra A., Sato S., Clemente T. (2000). Inheritance of multiple transgenes in wheat. *Crop Sci.* 40, 1133:1141.
- Carrington J., Kasschau K., Mahajan S., Schaad M. (1996). Cell-to-cell and Long-distance transport of viruses in plants. *The Plant Cell*, vol.8, 1669:1681.
- Carter P.R., Oelke E.A., Kaminski A.R., Hanson C.V., Combs S.M., Doll J.D., Worf G.L., Oplinger E.S. (2000) Hop - Alternative Fields Crops Manual. www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/hop.html
- Carvalho A., (2005) Etnobotánica del Parque Natural de Montesinho. Plantas tradicion y saber popular en um território del Nordeste de Portugal. Madrid, Universidade Autónoma – Tesis Doutoral.
- Castroviejo S., Aedo C., Cirujano S., Laínz M., Montserrat P., Morales R., Muñoz Garmendia F., Navarro C., Paiva J., Soriano C. (1993) Flora Ibérica: plantas vasculares de la Peninsula Ibérica e Islas Baleares. Vol.III, ed. Real Jardín Botánico, C.S.I.C. (Madrid) 257:258.
- Cervera M., Pina J.A., Juarez J., Navarro L., Pena L. (1998). *Agrobacterium* – mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Reports*, 18, 271:278.



- Chauvin Jean-Eric, Marhadour Sylvie, Cohat Joseph, Le Nard Marcel (1999). Effects of gelling agents on *in vitro* regeneration and kanamycin efficiency as a selective agent in plant transformation procedures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58 (3), 213:217
- Chen L., Marmey P., Taylor A.J., Brizard J.P., Espinoza C., D'Cruz P., Huet H., Zhang S., De Kochko A., Beachy R., Fauquet C. (1998). Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. *Nat. Biotechnol.* 16, 1060:1064.
- Chi Gek-Lan, Barfield Donna G., Sim Guek-Eng, Pua Eng-Chong (1990). Effect of AgNO₃ and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant Brassica genotypes. *Plant Cell Reports* 9, 195:198.
- Chiari A., Bridgen M. (2002). Meristem culture and virus eradication in *Alstroemeria*. *Plan Cell, Tissue and Orgasn Culture* 68, 49:55.
- Cho Myeong-Je, Jiang Wen, Lemaux Peggy G. (1999). High-frequency transformation of oat via microprojectile bombardment of seed-derived highly regenerative cultures. *Plant Science* 148, 9:17.
- Christianson ML, Duffy S. (2002). Dose-Dependent Effect of Salicylates in Moss, *Funaria hygrometrica*. *Journal of Plant Growth Regulation* 21, 200:208.
- Christianson ML, Warnick DA (1988). Organogenesis *in vitro* as a developmental process. *HortSci* 23, 515:519.
- Christou Paul, (1992). Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *The Plant Journal*, 2 (3), 275:281.
- Christou Paul, (1994). Gene transfer to plants via particle bombardment. *Plant Molecular Biology Manual*, A2, 1:15, Second edition, Kluwer Academic Publishers, Belgium.
- Christou Paul, (1995). Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment. *Euphytica*, 85, 13:27.
- Christou Paul, McCabe D, Swain W. (1988) Stable transformation of soybean callus by DNA- coated gold particules. *Plant Physiol.* 87, 671:674.
- Christou Paul, Tameria L. Ford, Kofron Matt (1991). Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology*, 9, 957:962.
- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34, 475:483.
- Clark W.G., Fichen J.H., Beachy R.N. (1995). Studies of coat protein-mediated resistance to TMV. *Virology*, 206, 307:313.
- Coenen Catharina; Lomax L. Terri (1997), Auxin-Cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends in plant science*, vol 2, n°9.



- Compton M. (1999). Dark pre-treatment improves adventitious shoot organogenesis from cotyledons of diploid watermelon. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53(3) 185:188
- Connel Sara A., Heale J.B. (1986). Development of an in vitro selection system for novel sources of resistance to *Verticillium* Wilt in Hop. *Plant tissue culture and it's agricultural applications* L.A. Withers & P.G. Alderson (eds) Butterworths, University Press, Cambridge, U.K.
- Da Camara Machado A., Regner A., Steinkellner H., Mattanovich D., Hanzer V., Weiss H., Laimer da Câmara Machado M., Katinger H. (1992). Coat protein-mediated protection against plum pox virus. The XVth international Symposium on Virus and Virus diseases of Temperature Fruit Crops and the XVth International Symposium on Fruit Diseases, July 8-13, Viena, Austria, *Acta-Hortic*, 203:210
- Dale P.J., Irwin J. A., Scheffler J.A. (1993). The experimental and commercial release of transgenic crop plants. *Plant Breeding* 111, 1:22.
- Dandekar A. (1992). Transformation. In FA Hammerschlag, RE Litz, eds, *Biotechnology of perennial fruit crop*, CAB International, Wallingford, 141:168.
- Datla Raju, Anderson William J., Selvaraj Gopalan (1997). Plant promoters for transgene expression. *Biotechnology Annual Review*, 3, 269:296.
- Day D. Christopher, Lee Elsa, Kobayashi Janell, Holappa D. Lynn, Albert Henrik, Ow W. David (2000). Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes & Development* 14, 2869:2880.
- De Bondt A., Eggermont K., Druart P., Devil M., Goderis I., Vandeleydewn J., Broekaert W.E. (1994). *Agrobacterium* - mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.)- an assessment of factors affecting gene-transfer efficiency during early transformation steps. *Plant Cell Rep.* 13, 587:593.
- De Cooman L., Everaert E., De Keukeleire D. (1998). Quantitative analysis of Hop acids, essential oils and flavonoids as a clue to the identification of Hop varieties. *Phytochemical analysis*, vol 9, 145:150.
- Dempsey A., Silva H., Klessig D. (1998). Engineering disease and pest resistance in plants. *Trends in Microbiology*, vol.6, nº 2, 54:6.
- Dijkstra J., Jager C. (1998). Practical plant virology, protocols and exercises: Production of Virus-free material from infected plants. Springer lab. manual. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 205:208.
- Dinnant S., Maisonneuve B., Albouy J., Chupeau Y., Chupeau M., Bellec Y., Gaudefroy F., Kusiak C., Souche S., Robaglia C., Lot H. (1997). Coat protein gene-mediated protection in *Lactuca sativa* against Lettuce mosaic potyvirus strains. *Molecular Breeding*, 3 (1), 75:86.
- Ditt R. F., Nester E. W., Comai L. (2001) Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol 98, Issue 19, 10954:10959.



- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19, 11:15.
- Draper J., Scott R., Hami J. (1988). Transformation of dicotyledonous plant cells using the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the Ri plasmid of *A. rhizogenes*. In J. Draper, R Scott, P. Armitage, R Walden, eds, *Plant genetic transformation and gene expression – a laboratory manual*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 71:159.
- Dronne S., Colson M., Moja S., Faure O. (1998) Plant regeneration and transient gus expression in a range of lavandin (*Lavandula x intermedia Emeric ex Loise Leur*) cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* Vol. 55(3) 193:198.
- Ducan David R., Widholm Jack M (1988). Improved plant regeneration from maize callus cultures using 6-benzylaminopurine. *Plant Cell Reports* 7, 452:455.
- Duke, J. A. (1983). *Humulus lupulus* L. *Handbook of energy crops*.
- Elkind Y., Nir B., Nadler-Hassar T. (1994). A model and experimental design for quantitative analysis of genetic and environmental variation of T1 transgenic plants. *Journal of Cellular Biochemistry*, 18A, 109.
- Eun. Jin-Cherng, A., Seoh M., Wong S. (2000). Simultaneous quantitation of two orchid viruses by the TaqMan[®] real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, vol. 87, n^o 1-2 Junho, 151:160.
- E.V.-Encyclopedia of Virology plus (CD-ROM). (1995). Copyright Academic Press.
- Fagard M., Vaucheret H. (2000). (Trans) gene silencing in plants: How many mechanisms? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 167:194.
- Farrar R. F. (1981). Weed Control in Hops. *English Hops*, 1 (2), 8:9.
- Farrar R. F., Campbell C. A. M. (1984). Idling Hop Gardens. *English Hops*, 4 (1), 12.
- Fiola J.A., Hassan M.A., Swartz H.J., Bors R.H., McNicols R. (1990). Effect of thidiazuron, light influence rates and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. *Plant Cell Tiss Org Cult* 20, 223:228.
- Fitchen H., Beachy R.(1993). Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. *Annu. Rev. Microbiol.*, 47, 739:763
- Forster G.D., Mills P.R. (1991). Cell-free translation of American hop latent virus RNA. *Virus Genes*, 5(4), 327:334
- Forster A., Beck B., Gehrig M. (1991). Pesticides residues remaining in hop at the production of hop products. 23rd EBC Congress, Lisbon 1991.
- Forster A. Schmidt R, (1994). The characterization and classification of Hop varieties. EBC-symposium on hops, 30.05.-01.06.1994 in Zoeterwoude printed in EBC Monograph XXII, 251:270
- Forster A. Schmidt R, (1995). Investigations on Hop polyphenols. The 25th EBC Congress, Brussels, 1995



- Fortes A.M., Pais M.S. (2001). An electron probe X-ray microanalysis study during organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget. *Plant Science* 160, 5, 933:941.
- Franco-Lara Liliana, McGeachy D. Kara, Commandeur Uli, Martin R. Robert, Mayo - Mike A., Barker Hugh (1999). Transformation of tobacco and potato with cDNA encoding the full-length genome of Potato leafroll virus: evidence for a novel virus distribution and host effects on virus multiplication. *Journal of General Virology*, 80, 2813:2822.
- François I., De Bolle M., Dwyer G., Goderis I., Woutors P., Verhaert P., Proost P., Shaaper W., Cammue B., Broekaert W. (2002). Transgenic expression in *Arabidopsis* of a polyprotein construct leading to production of two different antimicrobial proteins. *Plant Physiology* 128, 1346:1358.
- Frank Markus, Guivarc'h Anne, Krupková Eva, Lorenz-Meyer Irina, Chriqui Dominique, Schmulling Thomas (2002). TUMOROUS SHOOT DEVELOPMENT (TSD) genes are required for co-ordinated plant shoot development. *The Plant Journal*, Vol 29 (1), 73:85.
- Frank Markus, Rupp Hans-Michael, Prinsen Els, Motyka Václav, Van Onckelen Harry, Schmulling Thomas (2000). Hormone Autotrophic Growth and differentiation identifies mutant lines of *Arabidopsis* with altered cytokinin and auxin content or signaling. *Plant Physiol*, Vol 122, 721:730.
- Franken Eva, Teuschel Ute, Hain Rüdiger (1997). Recombinant proteins from transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 411:416.
- Fraser, R (1990). The genetics of resistance to plant viruses. *Annu.Rev. Phytopath.* 28, 179:200.
- Frello Stefan, Stummann Bjarne Mejnert, Serek Margreth (2002). Shoot regeneration of *Campanula carpatica* Jacq. (Campanulaceae) via callus phase. *Scientia Horticulturae* Vol 93, 85:90.
- Gasper T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reind D, Thorpe T (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 32, 272:289.
- Gaz C. (1997). Chemical control of gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 89:108.
- Geier T., Sangwan R. (1996). Histology and chimeral segregation reveal cell-specific differences in the competence for shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Koeleria* internode explants. *Plant Cell Rep.* 15, 386:390.
- Gelvin Stanton B. (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* Vol 54, 223:256.
- Geneve R., Kester S. (1990). The initiation of somatic embryos and adventitious roots from developing zygotic embryo explants of *Cercis canadensis* L. cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 22, 71:76.
- Gmelch F., Rossbauer G. (1992). Hop growing; hop breeding, hop advisory service. *Bodenkultur Pflanzenbau, March (Suppl. 2, Hans Pfuelf Insti. Annu. Rep. 1992)*, 1:53.



- Godwin I., Tood G., Ford-Lloyd B., Newbury H.,(1991). The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium* – mediated transformation vary according to plant species. *Plant Cell Reports*, 9, 671:675.
- Gölles R., da Câmara Machado A., Minafra A., Moser R., Katinger H. and Laimer da Câmara Machado M. (1997). Regeneration of *Vitis* sp. transformed with coat protein gene sequences of four different grapevine viruses. Extended abstracts 12th Meeting ICVG, Lisbon, Portugal, 29 September – 2 October 1997, 138.
- Gonçalves D., Trujillo EE. (1986). Tomato spotted wilt virus in papaya and detection of the virus by ELISA. *Plant Dis.* 70, 501:506.
- Gray D.J., Meredith C.P. (1992). Grape. In FA Hammerschlag, RE Litz, Eds, *Biotechnology of perennial fruit crops*, CAB International, Wallingford, 229:262.
- Greenberg J.T., Silverman F.P., Liang H. (2000). Uncoupling Salicylic Acid-Dependent Cell Death and Defense-Related Responses From Disease Resistance in the Arabidopsis Mutant *acd5*. *Genetics* 156, 341:350.
- Griffin M.J. and Coley-Smith J. R. (1968). The establishment of Hop Tissue Cultures and Their infection by downy mildew *Pseudoperonospora humuli* (Miy. & Tak.) Wilson under aseptic conditions. *J. Gen. Microbiol.*, 53, 231:236.
- Gunn R.E. (1985). *Frontiers of Research. English Hops* 5 (4), 12.
- Guo Shan H., Cervera Maria T., Garcia Juan A. (1998). Plum Pox potyvirus resistance associated to transgene silencing that can be stabilized after different number of plant generations. *Gene*, 206, 263:272.
- Guo Shan H., Ding Shou W. (2002). A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *The EMBO journal*, 21 (3), 398:407.
- Gurriaran M. J., Revilla M, A., Tames R. S. (1999). Adventitious shoot regeneration in cultures of *Humulus lupulus* L. (hop) cvs. Brewer's Gold and Nugget. *Plant Cell Reports*, 18, 12, 1007:1011.
- Gutiérrez-E. M. A., Luth D., Moore G. A. (1997) Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in Citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports*, 16, 745:753.
- Guy CL. (1990). Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 187:223.
- Halperin W (1986). Attainment and retention of morphogenic capacity *in vitro*. In IK Vasil, ed, *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, vol.3, *Plant regeneration and genetic variability*, Academic Press, New York, 3:47.
- Hardy L., Thorpe A. (1990). Nitrate assimilation in shoot-forming tobacco callus cultures. *In Vitro Cell Development Biology*, Vol. 26, 525:530.
- Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Meharg AA (2001). Copper and arsenate induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. *Plant Cell Environment* 24, 713:722.



- Hausman J.F., Evers D., Thiellement H., Jouve L. (2000). Compared responses of poplar cuttings and in vitro raised shoots to short-term chilling treatments. *Plant Cell Reports* 19, 954:960.
- Hay F. S., Close R. C. (1992). Distribution of *Xiphinema diversicaudatum* (Micoletzky, 1927) Thorne, 1939 in commercial hop (*Humulus lupulus* L.) gardens in New Zealand and implications for the spread of arabis mosaic virus. *New Zealand Journal of Crops and Horticultural Science*, Vol 20, 367:370.
- Heale J. B. (1985). Powdery Mildew and Verticillium Wilt Research Day. *English Hops*, vol 5 (2), 12:14.
- Heale J. B., Legg T., Brar J., Fabb A., Bainbridge B.(1989) Application of plant tissue culture and molecular biology techniques to “progressive” wilt of hops caused by *Verticillium albo-atrum*. *Eur. Brew. Conv. Monogr.*, XV, Symposium on Plant Biotechnology, Helsinki, 70:83.
- Heale J. B., Legg T., Connell S. (1989). *Humulus lupulus* L. (Hop): In vitro culture; Attempted production of bittering components and novel disease resistance. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol.7, Medicinal and Aromatic Plants II, ed.by Y. P. S. Bajaj, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Hiller Susan, Gingrich Gale A, Haunold Alfred (1996) Growing Hops - In the Home Garden. vol 19, nº5.
- Hilton, J.F. (2002). Hops 2002. Hopsteiner (www.hopsteiner.com)
- Hintermeier, P. (1993). The flowering of hop. *Hopfen Rundsch.* 44 (7), 186, 188:189. (alemão).
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykas PJ, Schilperoort RA (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303, 179:180.
- Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for transfer to plants. *Transgenic Res* 2, 208:218.
- Hop Growers of America (2001a). 2000 Statistical Report. 45th Annual HGA Convention Seattle, Washington
- Hop Growers of America (2001b).Archives Hopnet. www.usahop.org/stats.cfm
- Horlemann C., Schwekendiek A., Höhnle M., Weber G. (2003). Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Reports*, 22, 210:217.
- Horsch R., Fraley R., Rogers S., Sanders P., Lloyd A., (1984). Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science*, 223, 496:498.
- Hutchinson M.J., Saxena P.K. (1996). Acetylsalicylic acid enhances and synchronizes thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) tissue cultures. *Plant Cell Rep.* 15, 512:515.



- Hwaang H., Gelvin S. (2004). Plant proteins that interact with Vir B2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. *Plant Cell*, 16(11), 3148:3167
- Ingelbrecht I.L., Irvine J.E., Mirkov T.E. (1999). Post transcriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in an monocot that has a complex poliploid genome. *Plant Physiol.*, 119, 1187:1197.
- Ingelbrecht Ivan, Van Houdt Helena, Van Montagu Marc, Depicker Ann (1994). Poasttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10502:10506.
- Jackson Andrew O., Taylor Crispin B.(1996). Plant-microbe interactions: life and death at the interface. *The Plant Cell* 8, 1651:1668.
- Jacobsen E, Visser R, Wolters A., Kuipers G., Heeres P. (1996). An Integrated perspective on the use of genetic engineering and traditional methods for the improvement of crop species like potato. Curso de iniciação à engenharia genética de plantas, Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (IBET), Oeiras, Portugal, 15-28 Setembro.
- James D., Uratsu S., Cheng J., Negri P., Viss P., Dandekar M. (1993). Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium* – transformation of apple. *Plant Cell Reports*, 12, 559:563.
- Janssen B.J., Gardner R.C. (1993). The use of transient GUS expression to develop an *Agrobacterium* – mediated gene transfer system for kiwifruit. *Plant Cell rep.* 13, 28:31.
- Jarillo J. A. and Cashmore A. R. (1998). Enlightenment of the COPI-HY5 complex in photomorphogenesis. *Trends in plant science*, vol. 3, nº5, 161:163.
- Jin S., Komari T., Gordon M. P., Nester E. W. (1987). Genes responsible for the supervirulent phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. *J. Bacteriol* 169, 4417:4425.
- Jefferson R.A, (1987) Assaying chimeric genes in plants: the Gus fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5, 387:405.
- Johansen E. I., Lund S. O., Hjulsager C. K., Laursen J. (2001). Recessive resistance in *Pisum sativum* and Potyvirus pathotype resolved in gene for cistron correspondence between host and virus. *Journal of Virology*, vol. 75, nº 14, 6609:6614.
- Johnson D. A. (1991). Two degree-day models for predicting initial emergence of Hop shoot systemically infected with *Pseudoperonospora humuli*.
- Kaniewski W., Ilardi V., Tomassoli L., Mitsky T., Layton J., Barba M. (1999). Extreme resistance to cucumber mosaic virus (CMV) in transgenic tomato expressing one or two viral coat proteins. *Molecylar Breeding*, 5, 111:119.
- Kasschau K. D., Carrington J. C. (1998). A counterdefensive strategy of plant Viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* vol. 95, 461:470
- Kavanagh T., Spillane C. (1995). Strategies for engineering virus resistance in transgenic plants. *Euphytica* 85, 149:158.



- Kenny S. T. (1991). Registration of five hop germplasms for hop downy mildew research. *Crop Science*, vol 31, Setembro-Outubro.
- Khanam N., Khoo C., Khan A. G. (2000). Effects of cytokinin/auxine combinations on organogenesis, shoot regeneration and tropane alkaloid production in *Duboisia myoperoides*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 62(2) 125:133.
- Kikkert JR (1993). The Biolistic® PDS-1000/He device. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 33, 221:226.
- Knapp E., Hanzer V., Weiss H., Camara Machado A., Weiss B., Wang Q., Katinger H., Laimer Camara Machado M. (1995). New aspects of virus elimination in fruit trees. *Acta Horticulturae*, 386, 409:418.
- Kralj D., Haunold A. (1987). The breeding potential of native hops (*Humulus lupulus* L.) from Yugoslavia. *Monatsschr. Brauwiss.*, Julho, vol. 40(7), 287:293.
- Kubo S., Kagami Y., Nonaka K. (1975). Culture of stem tip of the hop and elimination of virus symptoms. *Rep Res Lab Kirin Brewing*, 18, 55:62.
- Kuiper H. A., Kleter G. A., Noteborn J. M., Kok E. J. (2001). Assessment of food safety issues related to genetically modified foods. *The Plant Journal*, 27(6), 503:528.
- Kunik T., Salomon R., Zamir D., Navot N., Zeidan M., Michelson I., Gafri Y., Czosnek H. (1994). Transgenic tomato plants expressing the tomato Yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. *Bio/Technology* 12, 500:506.
- Laimer da Câmara Machado M., da Câmara Machado A., Hanzer V., Weiss H., Regner F., Steinkellner H., Mattanovich D., Plail R., Knapp E., Kalthoff B., Katinger H. (1992). Regeneration of transgenic plants of *Prunus armeniaca* containing the coat protein gene of Plum Pox Virus. *Plant Cell Rep* 11, 25:29.
- Langer R.H.M., Hill G. D. (1982). *Agricultural Plants*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Langezaal C. R., Scheffer J.J. (1992). Initiation and growth characterization of some hop cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 30, 159-164.
- Langezaal C. R., Chandra A., Scheffer J. J. (1992). Antimicrobial screening of essential oils and extracts of some *Humulus lupulus* L. cultivars. *Pharm.Weekbl. Sci.*, 14 (6), 353:356.
- Lea J. P., Leegood C. R. (1999). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, 2th edition, John Wiley & Sons Ltd., Baffins Lane, Chichester, West Ssex PO19 1 UD, England
- Lee M. (1998). Genome projects and gene pools: New germplasm for plant breeding, *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 95, 2001:2004. (Colloquium paper).
- Lentini Z., Lozano I., Tabares E., Fory L., Domínguez J., Cuervo M., Calvert L. (2003). Expression and inheritance of hypersensitive resistance to rice hoja blanca virus mediated by the viral nucleocapsid protein gene in transgenic rice. *Theor Appl Genet*, 106, 1018:1026.



- Lewin B. (2001) Genes VII, Oxford University Press and Cell Press, 2000; trad. Henrique Ferreira, Giancarlo Pasquali, Luciane Passaglia, Mauro Teixeira, Sandra Milach, Mauricio Bogo, Artmed Editora, Porto Alegre.
- Liang X., Zhu Y., Mi J., Chen Z. (1994). Production of virus resistant and insect tolerant transgenic tobacco plants. *Plant Cell Reports*, 14, 141:144.
- Lindemayr H., Jager S. (1980). Occupational immediate type allergy to hemp pollen and hashish. *Derm Beruf Umwelt*, 28(1), 17:19 (artigo em alemão)
- Likens, S.T., Nickerson, G.B. (1973). Factors controlling the storage stability of hops. *Pros. Am. Soc. Brew. Chem.*, 62:66
- Litz RE (1992). Organogenesis and somatic embryogenesis. In Hammerschlang FA, Litz RE, eds, *Biotechnology of perennial fruits crops*. CAB International, London, 3:34.
- Litz RE (1993). Organogenesis and somatic embryogenesis. *Acta Hort* 336, 199:205.
- Liu Z., Jacobs M., Schaff A., McCullen A., Binns N., (2001). ChvD, a Chromosomally Encoded ATP-Binding Cassette Transporter-Homologous Protein Involved in Regulation of Virulence Gene Expression in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, Vol 183, Nº 11, 3310:3317.
- Lu R., Folimonov A., Shintaku M., Li W., Falk B., Dawson W., Ding S. (2004). Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(44), 15742:7.
- Lyon de Castro D. (2004). Transformação genética de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) var. Eroica para a introdução de resistência a fungos. Lisboa, FCUL – Tese de Doutorado.
- Mandolino G., Carboni A., Forapani S., Faeti V., Ranalli P. (1999). Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theoretical and applied genetics*, vol. 98, issue 1, 86:92.
- MacDaniel CN (1992). Determination to flower in *Nicotiana*. In AA Pederson, ed, *Current topics in developmental biology*, Academic Press, New York, 1:37.
- Mansfeld's Database of Agricultural and Horticultural Crops (2002). Mansfeld's database Taxonomy Module Query for Names. htm © of the electronic version: IPK Gatersleben 2002.
- Maton A., (1986). Cultivation of Hop Shoots in Winter. *English Hops*, May, 8-9.
- Matousek J., Trnena L., Svoboda P., Oriniakova P., Lichtenstein C.P. (1995). The gradual reduction of viroid levels in hop mericlones following heat therapy: a possible role for a nuclease degrading dsRNA. *Biol. Chem. Hoppe Sleyler*, 376 (12), 715:721.
- Matousek J., Novák P., Patzak J., Krofta K. (2002). Analysis of true chalcone synthase from *Humulus lupulus* L. and biotechnology aspects of medicinal hops. *Rostlinná výroba*, 48(1), 7:14.
- Mattheuws, R. (1991). *Plant Virology*, Third Edition (San Diego: Academic Press, Inc.)



- Maximova S., Dandekar A., Guiltinan M. (1998). Investigation of *Agrobacterium* – mediated tgransformation of apple using green fluorescent protein: High transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting. *Plant Mol Biol* 37, 549:559.
- McCabe D., Christou P. (1993). Direct DNA transfer using electric discharge particle acceleration (ACCELL™ technology). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33, 549:559.
- McCabe D., Martinell J. (1993). Transformation of elite cotton cultivars via Particle Bombardment of meristems. *Bio/Technology*, vol. 11, Maio, 596:598.
- McCown B. H., McCabe D. E., Russel D. R., Robison D. J., Barton K. A., Raffa K. F. (1991). Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration. *Plant Cell Reports*, 9, 590:594.
- McDaniel C.N. (1992). Determination to flower in *Nicotiana*. In AA Pederson, ed, *Current topics in developmental biology*, Academic Press, New York, 1:37
- Menary C., Williams A., Doe E. (1983). Enzymic degradation of α -acids in Hops. *J. Inst. Brew.*, vol. 89, 200:203.
- Meyer P., Saedler H. (1996). Homology-dependent gene silencing in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 23:48
- Meyer P., Van Blokland R., Charrier B., Mueller A., Ingram R., Scollan C. (1997). Analysis of transgene stability. European Community COST 824- Working Group 3: Transformation of gametic cells. Workshop "Genetic transformation and fate of the inserted genes"- Ercolano (Napoli), Italia, 10-12 Abril.
- Meyer P., Heidmann I., Niedenhof I. (1993). Differences in DNA-methylation are associated with a paramutation phenomenon in transgenic petunia. *The Plant Journal*, 4 (1), 89:100.
- Miguel C. (1998). Adventitious regeneration and genetic transformation of almond (*Prunus dulcis* Mill.). Lisboa, FCUL – Tese Doutoramento
- Miguel C., Druart P., Oliveira M. (1996). Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (*Prunus dulcis* Mill.) explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 32, 148:53.
- Miller D., Hemenway C. (1998). History of Coat Protein-Mediated protection in *Method in Molecular Biology*, vol. 81, *Plant Virology Protocols: From virus isolation to transgenic resistance*. Ed. Por G. D. Foster e S. C. Taylor, Humana Press Inc., Totowa, N. Jersey.
- Miller, C., Skoog, F., Okumura, M., Von Saltza, M., Strong, F. (1955) Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *J.Am.Chem.Soc.*78, 13754:1380
- Minibayeva F., Mika A., Lüthje S. (2003) Salicylic acid changes the properties of extracellular peroxidase activity secreted from wounded wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Protoplasma* 221, 67:72.
- Mira H., Martínez N., Peñarrubia L. (2002). Expression of a vegetative-storage-protein gene from *Arabidopsis* is regulated by copper, senescence and ozone. *Planta* 214, 939:946



- Mizukami Y., Fischer L. (2000). Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell number during organogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Plant Biology, Vol. 97, Issue 2, 942:947.
- Mlynárová L., Keizer C., Stiekema J., Nap J. (1996). Approaching the lower limits of transgene variability. The Plant Cell, 8, 1589:1599.
- Mohan R., Sajeena A., Seethanaman K., Reddy M. (2003). Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management – an over view. Crop Protection, vol. 22, Issue 9, 1071:1086
- Mohiuddin A., Chowdhury M., Abdullah Z., Napis S. (1997). Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber in vitro shoot regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 51 (1): 75:78
- Mol J., Cornish E., Mason J., Koes R. (1999). Novel coloured flowers. Current Opinion in Biotechnology, 10, 198:201.
- Morton A., Barbara D., Adams A. (1993). The distribution of hop latent viroid withing plants of *Humulus lupulus* and attempts to obtain viroid-free plants. Ann. Appl. Biol., 123, 47:53.
- Munro D. (1987). Viruses infecting hop *Humulus lupulus*, in Australia. Aust. J. Agric. Res., 38, 83:90.
- Murakami A. (2001). Strutral differences in the intergenic spacer of 18S-26S rDNA and molecular phylogeny using partial external transcribed spacer sequence in Hop, *Humulus lupulus*. Breeding Science 51, 163:170.
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15, 473:497
- Murphy A., Taiz L. (1995). Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten Arabidopsis ecotypes, correlation with copper tolerance. Plant Physiology, 109, 945:954.
- (N.A.S.) The National Academy of Sciences (2000). Genetically Modified Pest-Protected Plants: Science and Regulation.
<http://www.nap.edu/openbook/0309069300/html>
- National Hop Association of England (2001a). What is a Hop. [www.hops.co.uk/sectionone/what is a hop.htm](http://www.hops.co.uk/sectionone/what%20is%20a%20hop.htm)
- National Hop Association of England (2001a). Hop history. [www.hops.co.uk/sectionone/hop history.htm](http://www.hops.co.uk/sectionone/hop%20history.htm)
- Németh, M. (1986). Virus mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. Akadémiai Kiadó, Budapest and Martinus Nijhoff Publishers, Budapest. Hungary, pp 841.
- Neve A. (1988). Hop Breeding. Pauls P. L. C. Breewing Room Book, 1986-1988, pg 66-67
- Neves-Borges A., Collares W., Pontes J., Breyne P., Farinelli L., de Oliveira D. (2001). Coat protein RNAs-mediated protection against Andean potato mottle virus in transgenic tobacco. Plant Science, 160, 4 699-712.



- Nontaswatsi Chalerm Sri, Fukai Seiichi, Goi Masanori (2004). Revised cocultivation conditions produce effective *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Science*, 166, 59-68
- Nurkiyanova K., Ryabov V., Commandeur U., George H., Canto T., Gray M., Mayo A., Taliensky M. (2000). Tagging Potato leafroll virus with the jellyfish green fluorescent protein gene. *Journal of General Virology* 81, 617-626.
- Okada Y., Saito A., Nishiguchi M., Kinura T., Mori M., Hanada K., Sakai J., Miyazaki C., Matsuda Y., Murata T. (2001). Virus resistance in transgenic sweet potato (*Ipomoea batatas* L.(Lam)) expressing the coat protein gene of sweet potato feathery mottle virus. *Theor. Appl. Genet.* 103, 743-751.
- Oregon Hop Commission (2001). Oregon Hop Varieties. www.oda.state.or.us/hop/ohc.
- Oliveira, R., Almada V. (1998). Mating tactics and male-male courtship in the lek-breeding cichlid *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology*, 52, 1115:1129.
- Oriniakova P., Pavingerova D., Matousek J. (1999). Methodical aspects of hop (*Humulus lupulus* L.) genetic transformation. *ROSTLINNA VYROBA*, 45: (5) 219-227
- Ow D. (2002). Recombinase-directed plant transformation for the post-genomic era. *Plant Molecular Biology*. 48, 183-200.
- Özgen M., Özcan S., Sevimay C. S., Sancak C., Yildiz M. (1998). High frequency adventitious shoot regeneration in sainfoin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52(3), 205:208
- Page A., Angell S. (2002). Transient expression of reporter proteins can alter plant gene expression. *Plant Science* 163, 431:437.
- Palamand S.R., Aldenhoff J.M. (1973). Bitter tasting compounds of beer. Chemistry and taste properties of aroma hop resin compounds. *J. Agr. food chem.*, vol.21. n°4.
- Pang Z., Jan J., Tricoli M., Russel F., Carney J., Hu S., Fuchs M., Quemada D., Gonsalves D. (2000). Resistance to squash mosaic canovirus in transgenic squash plants expressing its coat protein genes. *Molecular Breeding*, 6, 87:93.
- Pasternek T., Rudas V., Potters G., Jansen M. (2005). Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 53, 299:314.
- Pastori M., Wilkinson D., Steele H., Sparks A., Jones D., Parry J. (2001). Age-dependent transformation frequency in elite wheat varieties. *Journal of Experimental Botany*, vol 52, n° 357 857:863.
- Patzak J., Matoušek J., Krofta K., P. Svoboda (2001). Hop Latent Viroid (HLVd)-Caused Pathogenesis: Effects of HLVd Infection on Lupulin Composition of Meristem Culture-Derived. *Biologia Plantarum*, 44 (4), 579:585.
- Patzak J. (2001). Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica*, 121, 9:18.



- Pawlowski W.P., Somers D. A. (1998). Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.95, 12106:12110
- Pedersen C., Zimny J., Becker D. (1997). Localization of introduced genes on the chromosomes of transgenic barley, wheat and triticale by fluorescence in situ hybridization. Theor. Appl. Genet., 94, 749:757.
- Pena L., Séguin A. (2001) Recent advances in the genetic transformation of trees. Trends in Biotechnology, Vol 19, N° 12, 500:506.
- Perl A., Aviv D., Galun E. (1988). Ethylene and in vitro culture of potato. Suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, planting efficiency and transient expression of an alien gene. Plant Cell Rep. 7, 403:406.
- Perlak J., Oppenhuizen M., Gustafson K., Voth R., Sivasupramaniam S., Heering D., Carey B., Ihrig A., Roberts K. (2001). Development and commercial use of Bollgard® cotton in the USA- early promises versus today's reality. The Plant Journal, 27 (6), 489-501.
- Permingeat H., Alvarez M., Cervigni G., Ravizzini R., Vallejos R. (2003). Stable wheat transformation obtained without selectable markers. Plant Molecular Biology 52, 415:419.
- Petrzik K., Svoboda P. (1997). Screening of apple mosaic virus in hop cultivars in Czech Republic by reverse transcription-polymerase chain reaction. Acta Virol. 41(2), 101:103.
- Pillary M., Kenny S. (1996a). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in hop, *Humulus lupulus*: level of genetic variability and segregation in F₁ progeny. Theor. Appl. Genet, 92, 334:339.
- Pillary M., Kenny S. (1996b). Structure and inheritance of ribosomal DNA variants in cultivated and wild hop, *Humulus lupulus* L. Theor. Appl. Genet. 93, 333:340.
- Pinto-Sintra, A. (2001) Contribuição para o estudo das condições de cultura *in vitro* e bases para a transferência de genes em castas durientes de *Vitis vinífera* L.. Vila Real, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro - Tese de Doutoramento.
- Polley A., Seigner E., Ganai W. (1997). Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers. Genome, 40: 357-361.
- Posnette, A., Copley R. (1956). Apple mosaic viruses. Host reaction and strain interference. J. Hort. Sci. 31: 119-133
- Powell-Abel, P., Nelson, R., De, B., Hoffman, N., Rogers, S., Frayley, R., Beachy, R. (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science 232, 738-743.
- Probasco G., Winslow S. (1986). The use of shoot-tip culture to eliminate viruses from Hop varieties grown in the United States. MBAA Technical Quarterly, vol. 23, 26-31.
- Quartacci M., Cosi E., Navari-izzo F. (2001). Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. Journal of Experimental Botany, Vol 52, n° 354, 77:84



- Quiroz-Figueroa F., Méndez-Zeel M., Larqué-Savedra A., Loyola-Vargas V. (2001). Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. *Plant Cell Reports* 20:679-684.
- Radclyffe L. Roberts, Matthew Metz, Dave E. Monks, Matthew Lockwood Mullaney, Tyler Hall, Eugene W. Nester (2003). Purine synthesis and increased *Agrobacterium tumefaciens* transformation of yeast and plants. *PNAS*, vol., 100 n°11: 6634-6639
- Raeymaekers T., Potters G., Asard H., Guisez Y., Horemans N. (2003). Copper-mediated oxidative burst in *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 cell suspension cultures. *Protoplasma* 221, 93:100
- Rakouský S., Matoušek J.(1994). Direct organogenesis in hop-a prerequisite for application of *A. tumefaciens*-mediated transformation. *Biol. Plant.* 36, 191-200
- Ramage C., Williams R. (2003). Mineral uptake in tobacco leaf discs during different developmental stages of shoot organogenesis. *Plant Cell Reports* 21: 1047-1053.
- Ramesh S., Nagadhara D., Reddy D., Rao V. (2004). Production of transgenic indica rice resistant to yellow stem borer and sap-sucking insects, using super-binary vectors of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, Vol. 166, Issue 4: 1077-1085.
- Rasco-Gaunt S., Riley A., Cannell M., Barcelo P., Lazzeri A. (2001) Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment. *Journal of Experimental Botany*, vol 52, n°357, 865-874.
- Raskin I (1992). Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiology* 99:799-803.
- Ravelonandro M., Scorza R., Callahan A., Levy L., Jacquet C., Monsion M., Damstreegt V. (2000). The use of transgenic fruit trees as a resistance strategy for virus epidemics: the plum pox (sharka) model. *Virus Research*, 71, 1-2, 63-69.
- Rea G., Metoui O., Infantino A., Federico R., Angelini R. (2002). Copper Amine Oxidase expression in defense responses to wounding and *Ascochyta rabiei* invasion. *Plant Physiology*, 128, 865:875.
- Reinhardt D., Mandel T., Kuhlemeier C. (2000). Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell*, vol 12, pp. 507-518.
- Risseuw E., Franke-van Dijk M., Hooykaas P. (1997). Gene targeting and instability of *Agrobacterium* T-DNA loci in the plant genome. *The Plant Journal*, 11 (4), 717-728.
- Robins R., Furze M., Rhodes M. (1985). Alfa-acid degradation by suspension culture cells of *Humulus lupulus*. *Phytochemistry* 24:709-714.
- Romani R., Hess B., Leslie C. (1989) Salicylic acid inhibition of ethylene production by apple discs and other plant tissues. *Journal of Plant Growth Regulation*. 8: 63-69.
- Russell J., Roy M, Sanford J. (1991). Optimization of a helium-driven biolistics device for genetic transformation of tobacco cell suspension cultures. *In Vitro* 27, 97A.
- Sahoo Y., Pattnaik S., Chand P. (1997). Plant regeneration from callus cultures of *Morus indica* L. derived from seedlings and mature plants. *Scientia Horticultura* 69, 85:98.



- Saitou Tsutomu, Tokutomi Satoru, Harada Hiroshi, Kamada Hiroshi (1999). Quantitative correlation between the concentration of photoreactive phytochrome and light-induced formation of adventitious shoots in horse-radish hairy roots. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 50, nº 341, pp. 1837-1844.
- Salisbury F., Ross C. (1992) *Plant Physiology*, 4th edition Wadsworth Publishing Company, Belmont, California 94002, a division of Wadsworth, Inc.
- Salvi N., George L., Eapen S. (2001). Plant regeneration from leaf base callus of turmeric and random amplified polymorphic DNA analysis of regenerated plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66, 113:119.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York).
- Sanford, J., Klein, T., Wolf, E., Allen, N. (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J. Part. Sci. Tech.*, 6, 559-563.
- Sautter C. (1993). Development of a microtargeting device for particle bombardment of plant meristems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33, 251-257.
- Saxena P., Rashid A. (1980) Differentiation of bud cells on the protonema of the moss *Anoetangium thomsonii*. Effect of aspirin and salicylic acid. *Z Pflanzenphysiol* 99:187-189.
- Schwechheimer C., Zourelidou M., Bevan M. (1998). *Plant Transcription Factor Studies*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 127-50.
- Scorza R. (1991). Gene transfer for the genetics improvement of perennial fruit and nut crops. *HortSci* 26: 1033-1035.
- Seabra, R. (1998). Transformação genética de *Castanea sativa* Mill. e caracterização molecular do género *Castanea*. Lisboa, FCUL – Tese Doutoramento.
- Seigner E. (1992). Conventional breeding and biotechnology work together on the way to a healthy plant. Anther culture/ovary culture. *Monatsschr. Brauwiss.*, 45(7/8), 242-251.
- Seigner E. (1993). Biotechnological methods in hop breeding. *Hopfen Rundsch. (Int. Ed.)* Aug. 8-12.
- Serfontein S., Staphorst J. (1994). Crown gall of hop caused by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 in South Africa. *Plant Pathology*, 43, 1028-10230.
- Sethi Urmil, Basu Atanu, Guha-Mukherjee Sipra (1990). Control of cell proliferation and differentiation by modulators of ethylene biosynthesis and action in brassica hypocotyl explants. *Plant Science* 69, 225-229.
- Shulaev V., León J., Raskin I. (1995). Salicylic Acid a Translocated Signal of Systemic Acquired Resistance in Tobacco? *The Plant Cell*, Vol 7, 1691-1701
- Sivamani E., Huet H., Shen P., Org A., Kochko A., Fauquet C., Beachy R. (1999). Rice plants (*Oryza sativa* L.) containing rice tungro spherical virus (RTSV) coat protein transgenes are resistant to virus infection. *Molecular Breeding*, 5, 177-185.



- Skoog F, Miller C. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation the plant tissue cultured in vitro, Symp Soc Exp Biol 11, 118:131.
- Small E. (1980). The relationship of hop cultivars and wild variants of *Humulus lupulus*. Can. J. Bot., vol 58, 676:686.
- Smigocki A. Owens L. (1989). Cytokini-to-Auxin ratios and morphology of shoots and tissues transformed by a chimeric isopentenyl transferase gene. Plant Physiol. vol. 91, 808:811.
- Smýkalová I., Ortová M., Lipavská H., Patzak J. (2001). Efficient *in vitro* micropropagation and regeneration of *Humulus lupulus* on low sugar, starch-Gelrite media. Biologia Plantarum 44 (1), 7:12.
- Souter M., Lindsey K. (2000). Polaraty and signalling in plant embryogenesis. Journal of Experimental Botany, Vol 51, n° 347, 971:983.
- Spielmann A., Knastanova S., Douet-Orhant V., Gugerli P. (2000). Analysis of transgenic grapevine (*Vitis rupestris*) and *Nicotiana benthamiana* plants expressing an Arabis mosaic virus coat protein gene. Plant Science 156, (2), 235:244.
- Stals H., Inzé D. (2001). When plant cells decide to divide. Trens in Plant Science Vol.6, n° 8.
- Stebbins G. (1992). Comparative aspects of plant morphogenesis: a cellular, molecular and evolutionary approach. Am J Bot. 79, 589:598.
- Steck T. (1997). To plasmid type effects of T-DNA processing in *Agrobacterium tumefaciens*. FEMS Microbiology Letters, 147, 121:125.
- Strittmatter G., Wegener D. (1993). Genetic Engineering of Disease and Pest Resistance in Plants: Present State of the Art. Invited Trends Article, 48c, 673:688.
- Sugiura M. (1997). Plant in vitro transcription systems. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 383:398.
- Šustar-Vozlič J., Bohanec B., Javornik B. (1996). Hop callus culture and attempts of shoot regeneration. Book of abstracts. Proceedings of IPBA, 57:63. Rogla.
- Taiz L., Zeiger E. (1998). Plant Physiology. 2^aed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, U.S.A. pp. 792
- Te-chato S., Liu M. (1999). Plant regeneration of mangosteen via nodular callus formation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol, 59 (2), 89:93
- Thorpe T (1980). Organogenesis in vitro: strutral physiological, and biochemical aspects. In IK Vasil, ed, International review of cytology, Sppl 11A, Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture, Academic Press, New York, 71:111
- Thorpe T (1994). Morphogenesis and regeneration. In IK Vasil, T. Thorpe, eds, Plant Cell and Tissue Culture, Kluwer Academic Publications, Dordrecht.



- U.S. Department of Agriculture, National Agricultural Statistics Service (NASS) (2001). Hop Stocks. www.usda.gov/nass/.
- Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Shanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M (1990) Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in Agrobacterium-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* 220, 245:250.
- van Wordragen F., Dons M., (1992). Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of recalcitrant crops. *Plant Mol. Biol. Rep.* 10, 12:36.
- Versluys, J. (1969). Choice of male and female parents of seedling populations of hop in relation to the alpha-acid content and the time of ripening of the female progeny. *J. Inst. Brew.*, 75(1), 25:32
- Vine, J., Jones P. (1969). The culture of shoot tips of hops (*Humulus lupulus* L.) to eliminate viruses. *J. Hort. Sci.*, 44, 3, 281:284.
- Voinnet O., Pinto M.Y., Baulcombe D.C. (1999). Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *P.N.A.S.*, vol.96, Issue 24, 14147:14152.
- Waigmann E., Zambryski P. (1995). Tobacco Mosaic Virus movement protein-mediated protein transport between trichome cells. *The Plant Cell*, Vol. 7, Issue 12, 2069:2079.
- Walden R., Koncz C., Schell J. (1990). The use of gene Vectors in plant Molecular Biology. *Methodos in Molecular and Cellular Biology*, vol 1, n°516, 175:194.
- Walden, R (1999). *Cell Culture, Transformation and Gene Technology. Plant Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd edn. Edited by P.J.Lea and R.C. Leegood. John Wiley & Sons Ltd.England.
- Wang M., Metzloff M. (2005). RNA silencing and antiviral defense in plants. *Current Opinions in Plant Biology*, 8, 216:222.
- Wang X., Eggenber A., Nutter Jr., Hill J. (2001). Pathogen-derived transgenic resistance to soybean mosaic virus in soibean. *Molecular Breeding*, 8, 119:127.
- Watson J., Gilman M., Witkowski J., Zoller M. (1998) *Recombinant DNA. Second Edition*, Scientific American Books, Distributed by W. H. Freeman and Company, New York.
- Wees M., Swart M., Pelt A., Loon C., Pieterse J. (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate-and jasmonate-dependet defense pathways in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.97, n° 15, 8711:8716.
- Welsh F., Nyland G. (1965). Elimination and separation of viruses in apple clones by exposure to dry hest. *Can. J. Plant Sci.* 45, 443:454.
- Welsh S., Kay A. (1997). Reporter gene expression for monitoring gene transfer. *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 617:622.
- Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmülling T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.98, Issue 18, 10487:10492.



- Williams J., Pink D., Biddington L. (1990). Effect of silver nitrate on long-term culture and regeneration of callus from *Brassica oleracea* var. Gemmifera. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol 21, 61:66.
- Ye, Z., Cheung K., Wong M. (2001). Copper uptake in *Typha latifolia* as affected by iron and manganese plaque on the root surface. *Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne de Botanique*, 79 (3), 314:320
- Yepes L., Aldwinckle H. (1994). Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and affect of antibiotics in morphogenesis. *Plant Cell, Tiss Org Cult* 37, 257:269.
- Yepes L., Fuchs M., Slightom J., Gonsalves D. (1996). Sense and antisense coat protein gene constructs confer high-levels of resistance to tomato ringspot nepovirus in transgenic *Nicotiana* species. *Phytopathology*, 86, 417:424.
- Yoshida S., Hotsubo K., Kawamura Y., Murai M., Arakawa K., Takezawa D. (1999). Alterations of intracellular pH in response to low temperature stresses. *Journal of Plant Research*, 112, 225:236.
- Xie D., Hong Y. (2001). In vitro regeneration of *Acacia manginum* via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 66 (3), 167:173.
- Zhang P., Phansiri S., Puonti-Kaerlas J. (2001). Improvement of cassava shoot organogenesis by the use of silver nitrate in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67 (1), 47:54
- Zhengquan H., Huamin S., Guocheng H., Shihong Z., Yonghong Y., Zongxiu S. (2004). Phosphomannose-isomerase (*pmi*) gene as a selectable marker for rice transformation via *Agrobacterium*. *Plant Science* 166, 17:22
- Zhong G. (2001). Genetic issues and pitfalls in transgenic plant breeding. *Euphytica* 118, 137:144.
- Zupan J, Zambryski P. (1995) Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol* 107, 1041:1047.

<http://biodiversity.uno.edu/delta/>

<http://www.rsc.org/pdf/books/brewsc>

<http://www.life.ca>

<http://www.oda.state.or.us/hop/ohc.html>

<http://hgrow.html>

www.kv.geo.uu.se

[www.123-net-course- Éléments de Botanique.fr](http://www.123-net-course-Éléments de Botanique.fr) (UFR de Pharmacie et Ingénierie de la Santé - ANGERS)



Anexo I

**Tabela III: MEIOS DE CULTURA TESTADOS NOS ENSAIOS DE REGENERAÇÃO
(MEIOS BASE E SUPLEMENTAÇÕES DE FITORREGULADORES)**

**Tabela III₁ – Suplementações hormonais testadas para o meio SH
(organogénese).**

Meio	BA	2,4D	IAA	KIN	Zea	Meio	BA	IAA	2iP	Zea	IBA
SH6	1	0,25				SH17	2				0,2
SH7		0,25			1.5	SH18	1				0,1
SH8		0,25			5	SH19	2	0,2			
SH9			0,25		1.5	SH20	1	0,1			
SH10			0,25		3	SH21				1	0,1
SH11	1,5		0,3			SH22				2	0,01
SH12			0,3	1,5		SH23				2	0,2
SH13	2,5					SH24		0,2		2	
SH14	2,5			1		SH25		0,1		1	
SH15	1		0,2			SH26		0,2	5		
SH16			0,2	1							

Concentração (mg/L)

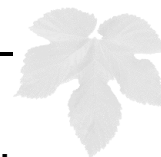


Tabela III₂ – Meios base MS testados para diferentes concentrações de fitorreguladores.

Meio	NAA	2,4D	Kin	BA	IBA	Zea	IAA	Meio	IBA	Zea	2iP	IAA
M14			1,5				0,02	M39		4		0,01
M15			1				0,02	M40	0,005	4		0,005
M16	0,25			1				M41			5	0,025
M17		0,5		1				M42			8	0,025
M18		0,25		1				M43		2,5		0,025
M19		0,5		2				M44	0,01	2,5		0,015
M20		0,01		1				M45	0,015	2,5		0,01
M21		0,1		1,5				M46		2,5	2,5	0,025
M22								M47		8		0,025
M23			1					M48	0,01	3		0,015
M24				1				M49		1		0,1
M25				2,5				M50		2,5		0,025
M26			1	2,5				M51		3		0,025
M27				1			0,2	M52		5		0,025
M28			1				0,2	M53		4		0,025
M29				1,5			0,3	M54	0,01	3		0,01
M30			1,5				0,3	M55	0,01	5		0,015
M31				2	0,2			M56	0,01	4		0,015
M32					0,2	2		M57			8	0,01
M33				1	0,1			M58			5	0,01
M34					0,1	1		M59		3		0,1
M35					0,01	2		M60		3		0,5
M36				2			0,2	M61		1,5		0,02
M37						2	0,2	M62		1		0,02
M38				1			0,1	M63			1,5	0,02

Concentração (mg/L).



Tabela III₃ – Meios de cultura, com meio base MS/2 e MS/4 (meios MS em que a concentração de micronutrientes foi reduzida respectivamente para 1/2 e 1/4), testados com diferentes concentrações de fitorreguladores.

Meio	IAA	IBA	Zea	2iP	Meio	IAA	IBA	Zea	2iP
M/2	0,01		5		M/4	0,1			3
M/2.1	0,015	0,01	5		M/4.1	0,015	0,01	5	
M/2.2	0,01			5	M/4.2	0,1		3	
M/2.3	0,015	0,01	3		M/4.3	0,01			5
M/2.4	0,01	0,015	2,5		M/4.4	0,01	0,015	2,5	
M/2.5	0,025		3		M/4.5	0,01		5	
M/2.6	0,1		3		M/4.6	0,01	0,015		2,5
M/2.7	0,025			3	M/4.7	0,015	0,01		5
M/2.8	0,1			3					

Concentração (mg/L).



Tabela III₄ – Suplementações de fitorreguladores testadas para o meio base Adams.

Meio	IBA	IAA	Zea	BA	Meio	IBA	Zea	BA	2iP
Ad15	0,5			1,5	Ad22	0,2	1	0,2	
Ad16		0,025		2,5	Ad23	0,4	2		
Ad17		0,025	2,5		Ad24		2		
Ad18	0,2		1		Ad25		2,5		
Ad19	0,5		1,5		Ad26				5
Ad20	0,2		1	2	Ad27		5		
Ad21	0,2			1	Ad28	0,4			2

Concentração (mg/l).



Anexo II



Protocolo Mini-CTAB:

Método de extracção de DNA para PCR, **MINI-CTAB**, baseado em Yang, H.Y. e King 1993 do Institut fur Gartenbauliche Pflanzenzuchtung, Ahrensburg, Alemanha; modificado de Doyle e Doyle, 1987):

Solução Tampão CTAB:

- 2 % (w/v) CTAB
- 1,4 M NaCl
- 20 mM EDTA
- 100 mM Tris HCl (pH=8)
- 1 % (v/v) β -mercaptoetanol

Solução Tampão de lavagem:

- 70 % Etanol
- 10 mM Acetato de Amónio

Solução Tampão TE:

- 10 mM Tris HCl (pH=8)
- 1 mM EDTA

Procedimento:

- Recolher o material vegetal (folhas e meristemas apicais) num tubo de “ependorf” de 1,5 mL, adicionar azoto líquido e macerar com varetas de vidro buriladas e estéreis (esterilização com passagem por etanol a 96 %, seguida de HCL 1N, após o que são colocadas na estufa a 120°C por 2h)
- Adicionar 500 μ L de solução tampão CTAB (2 %) pré-aquecido a 65°C. O material é moído um pouco mais e fica a incubar 10 minutos a 65°C para romper as membranas.
- Adicionar 500 μ L diclorometano:álcool isoamilico (24:1), e agitar continuamente durante 10 minutos para separar as proteínas. Centrifugar 2 minutos à temperatura ambiente, numa centrifuga de bancada à velocidade máxima.
- Transferir a fase superior para novo tubo e adicionar 300 μ L de isopropanol a -20°C para precipitar o acido nucléico. Centrifugar 2 minutos à temperatura ambiente. Descartar o sobrenadante.



-
- Adicionar 500 μ L de solução tampão de lavagens, agitar suavemente durante 2 minutos. Centrifugar 2 a 3 minutos. Descartar o sobrenadante.
 - Ressuspender o precipitado em 25 μ L de solução tampão TE, pH=8.

Protocolo alterado utilizado nas amostras para Southern blotting, PCR (amostras maiores) ou RT-PCR:

- Retirar o material vegetal na bancada de fluxo laminar, parte da planta deve ser transferida para meio fresco. O material a ser utilizado na extração, deve ter um peso fresco mínimo de 200 miligramas. Congelar os 200 miligramas em azoto líquido, o material congelado é colocado em almofarizes previamente esterilizados e arrefecidos.
- Com o pilão e depois de colocar areia de quartzo estéril, o material é macerado no interior do almofariz com azoto líquido.
- Juntar 200 mL de solução tampão CTAB pré-aquecido (65°C), e macerar mais um pouco.
- Adicionar mais 300 mL de solução tampão e deixar no banho-maria a 65°C durante 12 - 15 minutos. Mexer cada 4 minutos.
- Adicionar 500 mL de Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamilico agitar durante 10 minutos vigorosamente.
- Centrifugar 10 minutos (10000 g, a -4°C)
- Transferir fase aquosa para novo tubo com uma micropipeta de 200 mL. Adicionar RNase (10 mg/mL em 10 mM de solução tampão Tris HCl, 15 mM NaCl, pH 7,5; fervida por 15 minutos, depois arrefecida à temperatura ambiente e conservada a -20°C) tratada a uma concentração final de 100 μ g/mL, mexer e incubar a 37°C durante 15 minutos.
- Adicionar 0,6 volume de Isopropanol frio (-20°C). Mexer total mas ligeiramente, por inversão do tubo várias vezes. Recolher o precipitado centrifugando a 5000 g, durante 10 minutos a 4°C.
- Adicionar 500 mL de solução tampão de lavagem, agitar ligeiramente o precipitado por minutos e centrifugar (10 minutos, 10000 g, a 4°C).
- Inverter os tubos e secar em papel absorvente aproximadamente 1h.
- Adicionar quantidade adequada de solução tampão TE e dissolver a 4°C sem agitação durante a noite.



Anexo III



Soluções Tampão utilizadas nos ensaios de dupla sanduíche anticorpo - enzima ligada a soros imunológicos (DAS-ELISA):

Solução Tampão de Extração:

PBS	Na Cl	8,0 g/L
	KH ₂ PO ₄	0,2 g/L
	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,9 g/L
	KCl	0,2 g/L
	NaN ₃	0,2 g/L
Tween 20		0,05% (v/v)
BSA		2 g/L
pH		7,2-7,4

Solução Tampão de Revestimento:

Na CO ₃	1,59 g/L
NaHCO ₃	2,53 g/L
NaN ₃	0,20 g/L
pH	9,6 g/L

Solução Tampão de Lavagem:

PBS	Na Cl	8,0 g/L
	KH ₂ PO ₄	0,2 g/L
	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,9 g/L
	KCl	0,2 g/L
	NaN ₃	0,2 g/L
Tween 20		0,05 % (v/v)
pH		7,4

Solução Tampão Conjugado:

PBS	Na Cl	8,0 g/L
	KH ₂ PO ₄	0,2 g/L
	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,9 g/L
	KCl	0,2 g/L
	NaN ₃	0,2 g/L
Tween 20		0,05 % (v/v)
PVP24000		20,0 g/L
BSA		2,0 g/L



MgCl ₂ .6H ₂ O	0,2 g/L
pH	7,4

Solução Tampão do Substrato:

Dietanolamina	9,7 % (v/v)
NaN ₃	0,20 g/L
pH	9,8

As soluções tampão foram fornecidas por Sanofi, e Bioreba (AG, Ebringen, Alemanha)