



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais

Estudo da biodiversidade molecular de *Quercus suber*
e caracterização de genes envolvidos na resposta de defesa
à infecção por *Phytophthora cinnamomi*.

Ana Cristina Hurtado de Matos Coelho

Faro

2003

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais

Estudo da biodiversidade molecular de *Quercus suber*
e caracterização de genes envolvidos na resposta de defesa
à infecção por *Phytophthora cinnamomi*.

Dissertação para prestação de provas de doutoramento.

Ana Cristina Hurtado de Matos Coelho

Faro

2003

Aos meus pais Mário Júlio e Maria Vitória

Ao meu marido Paulo

Ao meu filho Ricardo

AGRADECIMENTOS

Je remercie le Professeur Doutor Alex Bollen du Laboratoire de Génétique Appliquée de L'Université Libre de Bruxelles, le financement d'une partie de ce travail et la possibilité de travailler en Belgique. Merci Alex de croire que j'étais capable.

Agradeço também:

-ao Doutor Alfredo Morais Cravador, Professor Catedrático da Universidade do Algarve e orientador desta tese, a revisão final do trabalho, os comentários e a discussão;

-à Dr^a Alexandra Magnólia Bandeira, Professora Coordenadora da ESE da Universidade do Algarve, aposentada, pelo apoio prestado na concessão da dispensa de serviço docente e durante todo o processo;

-ao Doutor José Pereira Ferraz, Professor Catedrático da Universidade do Algarve, Vice-Reitor, pelos momentos agradáveis durante as viagens por todo o país para a recolha das folhas de sobreiros e azinheiras; lembro com saudade as saídas de campo ricas em ensinamentos sobre a doença do declínio;

-ao Doutor Eng^o Manuel Bravo Lima, Investigador Coordenador da Unidade de Taxonomia Numérica da Estação Agronómica Nacional, aposentado, pela contribuição e orientação indispensáveis na análise de dados por taxonomia numérica;

-aos amigos Verónica Silva, António Fragoso de Almeida, Fátima Sobral e Marília Horta, por terem partilhado comigo as alegrias e as dificuldades ao longo destes seis anos.

-ao meu irmão Jorge, à minha cunhada Ana e aos meus sobrinhos Nuno e João, por todo o carinho e apoio demonstrados;

-aos meus sogros Isabel e João, aos meus cunhados Luís Manuel e Maria do Carmo e aos meus sobrinhos Tiago, Renato e Joana, por todo o carinho e compreensão pela minha ausência;

-às minhas primas Júlia Maria e Águeda Silva, pela preocupação e o apoio que me deram durante a gravidez do Ricardo;

-aos tios e primos directos ou por afinidade, pela amizade;

-aos amigos Cristina Santos, Sandra Oliveira, Paulo e Cristina Mena, pelo apoio e amizade;

-ao Diogo Teixeira, pela ajuda prestada nos aspectos relacionados com a Informática;

-aos amigos António Vinagre e Carla Dionísio, pela ajuda na leccionação das disciplinas;

-aos colegas Dina Neves, Paula Caetano, Nelson Sousa e Teresa Sancho, por toda a colaboração prestada no laboratório;

-aos colegas da ESE da Universidade do Algarve Rute Monteiro, Maria Santos, Aurízia Anica, Nuno Vieira, Ana Oliveira e Mafalda Guerreiro, pelas palavras de incentivo durante a realização do trabalho;

-aos colegas do Laboratoire de Génétique Appliquée de L'Université Libre de Bruxelles, pour le support et l'accueillement; un merci spécial à mon collègue de séquençage Ives Decrem;

-às colegas Ingrid Santos, Maria do Rosário Marques e à D. Deolinda, por me terem recebido de forma tão carinhosa na Estação Zootécnica Nacional;

-ao Sr. João Pereira Lopes, pela permissão para estudar os sobreiros da Herdade dos Leitões, em Montargil; ao Sr. Manuel Inácio, pela ajuda preciosa na identificação das árvores;

-ao Sr. César Santos e ao Sr. Rodrigues, da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, pela ajuda na recolha das folhas nos povoamentos de sobreiro e azinheira em Trás-os-Montes;

-à la famille Bollen je remercie l'amitié et à Shanna son sourire;

-a todos os docentes e funcionários da Escola Superior de Educação da Universidade do Algarve que, de algum modo, contribuíram para este trabalho;

-a todos os amigos que sempre me acompanharam e que não foram mencionados;

Aos meus pais Mário Júlio e Maria Vitória, ao meu marido Paulo e ao meu filho Ricardo dedico-lhes esta tese e agradeço o amor, carinho, dedicação e compreensão em todos os momentos. Obrigada por tudo.....

Este trabalho só foi possível graças ao apoio financeiro de:

-Programa nº 3/PRODEP/98-Financiamento à Formação Avançada no Ensino Superior-Medida 5/Acção 5.2.;

-NATO, Science for Stability Programme, no âmbito do projecto PO-CORKOAKS II;

-Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), no âmbito dos projectos PRAXIS XXI-3/3.2/FLOR/2112/95 e POCTI/AGR/34389/99.

Resumo

O sobreiro (*Quercus suber* L.) é uma espécie autóctone que se encontra distribuída em todo o território de Portugal Continental. São excepção as regiões montanhosas mais frias do norte e centro, as regiões salinas junto ao litoral e as zonas do interior de acentuada aridez. Os indivíduos desta espécie apresentam características morfológicas muito variadas com ocorrência de diversas gradações entre caracteres do mesmo órgão e diferentes graus de tolerância, aparente, à doença do declínio. A semelhança genómica descrita dentro do género *Quercus* determina a ausência de barreiras reprodutivas e possibilita fenómenos de hibridação nos povoamentos mistos de *Q. suber* e *Q. rotundifolia*. O recurso à análise do DNA para determinação do perfil genético dos indivíduos de uma espécie, consiste no método mais recente de individualização biológica.

No presente estudo, foi avaliada a variabilidade genética em *Q. suber* por AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), com cinco combinações de *primers* diferentes, que permitiram diferenciar 313 árvores provenientes do Algarve, Alentejo e Trás-os-Montes, de acordo com o seu genótipo. O perfil genético de cada sobreiro resultou da análise de 291 *loci* aleatórios do genoma, presentes na forma de fragmentos monomórficos e polimórficos. A avaliação quantitativa das semelhanças ou dissemelhanças entre os indivíduos foi determinada pelo método de análise de dados/taxonomia numérica. A percentagem de polimorfismo detectada nos sobreiros é de 71 % e é indicadora de índices elevados de variabilidade na espécie. A diversidade genética é semelhante nas populações estudadas do Algarve, Alentejo e Trás-os-Montes. A elevada variação fenotípica que se observa em *Q. suber* ao nível da qualidade da cortiça produzida e da aparente tolerância à doença do declínio é reflectida nos padrões AFLP. Os valores dos coeficientes de semelhança genética variam entre 0,88 e 0,61, o que significa que, apesar da elevada diversidade genética, os sobreiros partilham entre si 60 % do genoma. No grupo dos 313 indivíduos de *Q. suber* observa-se uma tendência para a separação em dois subgrupos.

Na análise por AFLP com uma das combinações de *primers*, a combinação I9, foram incluídas 52 azinheiras provenientes das mesmas três regiões, Algarve, Alentejo e Trás-os-Montes, dos sobreiros. Duas destas azinheiras foram estudadas, também, com as outras quatro combinações de *primers* referidas para os sobreiros. Em todas as

combinações de *primers* houve diferenciação entre os 313 indivíduos da espécie *Q. suber* e os dois indivíduos da espécie *Q. rotundifolia*, em concordância com a classificação sistemática destes *Quercus*. Na análise em que se incluíram as 52 azinheiras e os 313 sobreiros, identificaram-se indivíduos pertencentes a uma terceira espécie. Através da determinação de perfis genéticos de indivíduos de espécies diferentes do género *Quercus* é possível determinar as relações filogenéticas existentes entre eles. Um dos 291 marcadores AFLP está presente em quase todas as azinheiras e em onze sobreiros e este facto revela que pode ter sido adquirido por hibridação entre as duas espécies de *Quercus*. A metodologia usada permitiu identificar marcadores moleculares potencialmente correlacionados com fenótipos de tolerância à doença do declínio e à qualidade da cortiça. Alguns marcadores só estão presentes em sobreiros de determinada região e podem ser o resultado dum processo de adaptação ao meio.

Em Portugal e Espanha a doença do declínio afecta, de um modo geral, os povoamentos de sobreiro e azinheira, atinge indivíduos de todas as idades e manifesta-se na forma de declínio lento ou morte súbita. O fungo do solo, *Phytophthora cinnamomi*, aparece invariavelmente associado aos locais de declínio e tem sido isolado, com frequência, a partir de raízes de sobreiros e azinheiras. *Q. suber* e *Q. rotundifolia* são, portanto, hospedeiros de *P. cinnamomi* e o fungo é capaz de colonizar os tecidos, sendo desconhecidos os mecanismos moleculares da interacção entre o hospedeiro e o agente patogénico.

Através da análise do RNA mensageiro, por cDNA-AFLP, de raízes de *Q. suber* e *Q. rotundifolia* infectadas com *P. cinnamomi*, de folhas de plântulas de sobreiros cultivados em solos artificialmente infestados e de folhas de sobreiros localizados em locais de declínio, naturalmente infestados com o fungo, foram identificados fragmentos de genes que se expressam de forma diferencial durante a interacção. As sequências de quatro destes fragmentos apresentam homologia com genes relacionados com o sistema de defesa noutras espécies de plantas. As sequências nucleotídicas foram determinadas a partir dos cDNAs correspondentes obtidos por RACE-PCR ou, alternativamente, a partir dos genes isolados num banco genómico de *Q. suber* em *Lambda* FIX II escrutinado com sondas específicas. Foram identificados e caracterizados em *Q. suber*, os genes *QsCAD1*, *QsRPs*, *QsPDI* e *QsRSH* que codificam uma cinamil álcool desidrogenase 1, uma proteína de resistência a *P. cinnamomi*, uma isomerase de pontes dissulfureto proteica e uma proteína do tipo RelA/SpoT, respectivamente. Pelo menos

três destes genes estão potencialmente envolvidos na resposta à infecção por *P. cinnamomi*; com efeito a expressão de *QsCAD1*, *QsRPC* e *QsPDI* aumenta durante as primeiras 24 horas de interacção.

É conhecido que o sistema de defesa nas plantas é multifacetado e que a transcrição dos genes do metabolismo de fenilpropanóides é activada durante a interacção com agentes patogénicos. A partir de fragmentos obtidos por PCR com *primers* de sequência heterogénea definidos a partir de sequências conhecidas de genes do metabolismo de fenilpropanóides doutras espécies de plantas, foram determinadas sequências nucleotídicas parciais codificando uma peroxidase (*QsPOX*), uma cinamil álcool desidrogenase 2 (*QsCAD2*) e uma fenilalanina amónia liase (*QsPAL*) em *Q. suber*. Com base nesta informação foram clonados, sequenciados e caracterizados, parcial ou completamente, o cDNA e/ou DNA dos genes *QsPOX* (1 e 2), *QsCAD2* e *QsPAL* que codificam duas peroxidases catiónicas, uma cinamil álcool desidrogenase e uma fenilalanina amónia liase, respectivamente. A expressão destes genes foi analisada por RT-PCR e hibridação com sondas específicas marcadas com digoxigenina, a partir de RNA total extraído de raízes de *Q. suber* que estiveram em contacto com o fungo durante 24 horas, verificando-se que *QsPOX2* e provavelmente, *QsPOX1*, estão envolvidas na resposta de defesa. Relativamente aos genes *QsCAD2* e *QsPAL* os resultados não foram conclusivos.

Tendo em consideração a homologia entre as sequências de aminoácidos deduzidas dos genes identificados em *Q. suber* com a de proteínas já caracterizadas noutras espécies, foi possível conceber um modelo hipotético que ilustra os acontecimentos iniciais da interacção entre o fungo e o hospedeiro. Deste modo, considera-se que a infecção de *Q. suber* por *P. cinnamomi* apresenta contornos de interacção compatível e incompatível. O fungo induz a expressão de genes potencialmente implicados na desactivação de factores de virulência (toxinas) e de genes de defesa implicados no reconhecimento de factores de avirulência. A variante da doença do declínio denominada “morte súbita” estaria associada à produção duma isoforma do produto do gene *QsCAD1*, incapaz de converter o factor de virulência (toxina) produzido pelo fungo, num produto não tóxico para a célula. Num sobreiro que sofreu morte súbita foi identificado um fragmento polimórfico deste gene que apoia esta hipótese. O declínio lento resultaria da resistência parcial ao fungo, relacionada com a rapidez de reconhecimento dos factores de avirulência.

ABSTRACT

Quercus suber L. is autochthonous in Portugal and is distributed all over the country. Exceptions are the mountain regions of the North and Centre of Portugal, the coastal regions and the interior of the country with pronounced dryness. The individuals of this species have morphological characteristics rather divergent. It is common to observe several gradations in organ characters and different levels of apparent tolerance to the decline disease. It is known that the genomic similarity between different species of the genus *Quercus* eliminates reproductive barriers and makes hybridization possible to occur in mixed stands of *Q. suber* and *Q. rotundifolia*. The determination of the genetic profile of the individuals is actually based upon DNA analysis, the most modern approach to achieve biological individualization.

In the present study, the genetic variability of *Q. suber* was evaluated by AFLP (amplified fragment length polymorphism) using five different primer combinations. The method allowed to differentiate 313 trees, from Algarve, Alentejo and Trás-os-Montes. The genetic profile of each tree is composed of 291 *loci*, randomly positioned in the genome, and consists of monomorphic and polymorphic fragments. The quantitative evaluation of the similarities and dissimilarities among the individuals was determined by numerical taxonomy.

The degree of polymorphism observed in *Q. suber* is 71 %, denoting a high level of variability within this species and amidst regional populations from Algarve, Alentejo and Trás-os-Montes. The AFLP fingerprint reflects the phenotypic variation observed for the quality of cork and for the apparent tolerance to the decline disease. The coefficients of genetic similarity vary from 0.88 to 0.61, which means that the analysed trees share 60 % of the genome. From the AFLP analysis it can be observed that the group of 313 cork oak trees tends to segregate in two subgroups.

The AFLP analysis performed with the primer combination I9 included 52 holm oak trees located in the same regions. Two out of these 52 were also analysed with the remaining four primer combinations used for cork oak trees. The method allowed to differentiate the individuals according to the taxonomic classification of *Quercus*. Moreover the I9 analysis separated the individuals in three groups, suggesting the existence of a third species besides *Q. suber* and *Q. rotundifolia*. One of the 291 AFLP

fragments is present in almost all holm oak trees and in eleven cork oak trees, suggesting that it originates from hybridization events. Other molecular markers identified by AFLP are potentially correlated to phenotypic characteristics like tolerance to decline disease and quality of cork. Some AFLP markers are only present in trees from a particular region, denoting a possible environmental adaptation.

In affected areas of Portugal and Spain, cork oak and holm oak trees exhibit a range of symptoms and a variable rate of decline disease expression while others die suddenly. The soil borne pathogen *Phytophthora cinnamomi* is consistently associated with the cork oak and holm oak decline as it has been frequently isolated from roots of trees suffering from decline disease. *Q. suber* and *Q. rotundifolia* are hosts of *P. cinnamomi* which is able to colonize their tissues. The molecular mechanisms involved in the interaction between *Q. suber* and *P. cinnamomi* are unknown.

Messenger RNA's extracted from roots of *Q. suber* and *Q. rotundifolia* infected with *P. cinnamomi*, from leaves of cork oak seedlings, grown in soils artificially infested, and from leaves of cork oak trees in naturally infested soils, were analysed by cDNA-AFLP. The analysis revealed fragments of genes that were differentially expressed during infection. Four of these fragments showed sequence homology with genes involved in the defence system of other species. Sequences were established from the corresponding cDNA's produced by RACE-PCR or from genes isolated by screening of a genomic library of *Q. suber* with specific probes.

Four genes of *Q. suber* coding for a cinnamyl alcohol dehydrogenase 1, a resistance protein against *P. cinnamomi*, a protein disulphide isomerase and a RelA/SpoT-like protein, named respectively, *QsCAD1*, *QsRPe*, *QsPDI* and *QsRSH* were cloned and characterised. At least three of these genes are potentially involved in the response to infection by *P. cinnamomi*, as the expression of *QsCAD1*, *QsRPe* and *QsPDI* increases during the first 24 hours of interaction.

It is known that the defence system in plants has multiple forms; one of these forms is the activation, during infection, of the transcription of genes involved in the phenylpropanoid metabolism. Partial nucleotide sequences from genes coding a peroxidase, a cinnamyl alcohol dehydrogenase 2 and a phenylalanine ammonia-lyase were determined in fragments produced by PCR using primers of heterogeneous composition, designed in the most conserved regions of known genes from other species. Partial or complete sequencing and characterization of cDNA or DNA from

genes of two cationic peroxidases (QsPOX1 e QsPOX2), one cinnamyl alcohol dehydrogenase 2 (QsCAD2) and one phenylalanine ammonia-lyase (QsPAL) were thus achieved in *Q. suber*.

The expression of the mRNA of these genes in roots of *Q. suber* seedlings infected with *P. cinnamomi* was assessed by RT-PCR and hybridization with specific probes. The levels of mRNA from *QsPOX1*, and probably from *QsPOX2*, raised following infection. Results were not conclusive for *QsCAD2* and *QsPAL*.

Consistent homology was found between the aminoacid sequences deduced from DNA or cDNA of all the genes identified in *Q. suber*, and those from proteins involved in the defence response in other species. This allowed the conception of a hypothetical model that illustrates the initial events of the interaction between *Q. suber* and *P. cinnamomi*.

The infection of *Q. suber* by *P. cinnamomi* has a mixed profile of compatible and incompatible interaction. The pathogen induces in the host the expression of genes involved in the deactivation of virulent factors (toxins) and of genes involved in the defence response after recognition of avirulence factors.

The sudden death is probably related to the inefficient deactivation of virulent factors as a result of an altered protein coded by an isoform of the *QsCAD1* gene. The identification of a polymorphic fragment of this gene in a tree that was affected by sudden death supports this hypothesis.

Progressive decline could be the result of partial resistance related to a more or less efficient recognition of avirulence factors and consequent defence response.

DEDICATÓRIA	I
AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	V
ABSTRACT	VIII
ÍNDICE	XI
A HISTÓRIA DE UM SOBREIRO	XV
I. ESTUDO DA BIODIVERSIDADE MOLECULAR DE <i>Quercus suber</i>	1
I.1. INTRODUÇÃO	1
I.1.1. O género <i>Quercus</i>	1
I.1.1.1. Taxonomia e bio-sistemática.....	1
I.1.1.2. Organização genómica.....	4
I.1.1.3. Hibridação entre espécies de <i>Quercus</i>	6
I.1.1.4. Diversidade genética.....	14
I.1.1.4.1. <i>Metodologias usadas na análise da diversidade genética</i>	20
I.1.1.4.2. <i>Análise da variabilidade genética entre indivíduos</i>	26
I.1.2. O sobreiro (<i>Quercus suber</i> L.)	31
I.1.2.1. Biologia e ecologia da espécie.....	31
I.1.2.2. Aspectos celulares e moleculares da formação da cortiça.....	39
I.1.2.3. A doença do declínio.....	41
I.1.2.3.1. <i>Aspectos gerais da doença do declínio em <i>Quercus</i></i>	41
I.1.2.3.2. <i>Aspectos da patogenicidade de <i>P. cinnamomi</i></i>	45
I.2. OBJECTIVOS	49
I.3. MATERIAL E MÉTODOS	50
I.3.1. Material vegetal	50
I.3.2. Extração de DNA genómico	63
I.3.3. Análise do genoma de <i>Q. suber</i> por AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	64
I.3.4. Clonagem dos fragmentos de AFLP	67
I.3.5. Análise das sequências nucleotídicas dos fragmentos AFLP	68
I.3.6. Análise dos dados	68
I.4. RESULTADOS	69
I.4.1. Análise da variabilidade genética em <i>Q. suber</i> por AFLP/Taxonomia Numérica	69
I.4.1.1. Análise dos perfis AFLP.....	69
I.4.1.1.1. <i>AFLP-Amplificação I1</i>	71
I.4.1.1.2. <i>AFLP-Amplificação I2</i>	83
I.4.1.1.3. <i>AFLP-Amplificações I3 e I10</i>	93
I.4.1.1.4. <i>AFLP-Amplificação I9</i>	104
I.4.1.1.5. <i>AFLP-Soma das amplificações I1, I2, I3, I9 e I10</i>	113
I.4.1.2. Identificação e sequenciação de potenciais marcadores AFLP.....	124
I.5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	127
I.5.1. Variabilidade genética em <i>Q. suber</i>	127
I.5.2. A utilização dos perfis AFLP para análise taxonómica	129
I.5.3. Estabelecimento de correlações entre genótipo e fenótipo através de marcadores moleculares	132
I.5.4. Vantagens e desvantagens da metodologia AFLP	133
II. ASPECTOS MOLECULARES DA INTERACÇÃO ENTRE <i>Q. suber</i> E <i>P. cinnamomi</i>	136
II.1. INTRODUÇÃO	136
II.1.1. Processo infeccioso	136
II.1.2. As defesas dos hospedeiros contra os fungos parasitas	142

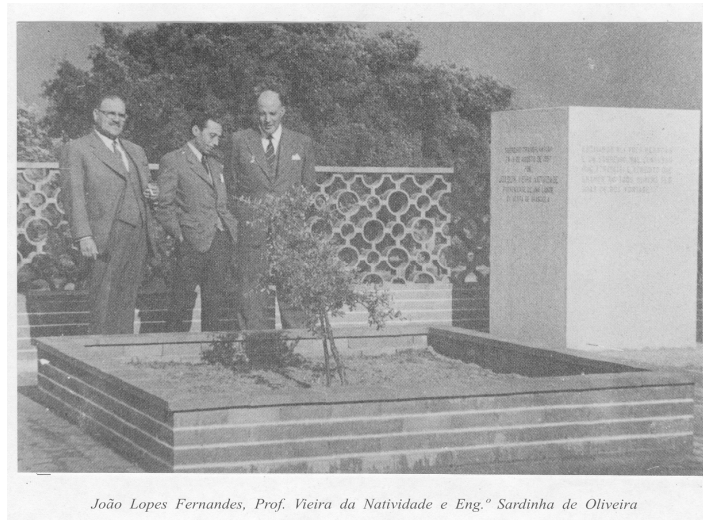
II.1.3. Factores de virulência e factores de avirulência produzidos pelos fungos patogénicos.....	144
II.1.4. Interação Phytophthora infestans/Nicotiana.....	151
II.1.5. Interação criptogéina/células do tabaco.....	153
II.1.6. Genes de plantas mediadores da resistência a doenças (Genes R).....	160
II.2. OBJECTIVOS.....	169
II.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	170
II.3.1. Análise do mRNA de Q. suber e Q. rotundifolia por cDNA-AFLP.....	170
II.3.1.1. Identificação e preparação das amostras.....	170
II.3.1.1.1. Folhas jovens de sobreiros cultivados em solos infestados artificialmente, com <i>P. cinnamomi</i>	170
II.3.1.1.2. Raízes de sobreiros e azinheiras infectadas com <i>P. cinnamomi</i>	171
II.3.1.1.3. Folhas jovens de sobreiros e azinheiras localizados em locais de declínio.....	172
II.3.1.1.4. Micélio de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	172
II.3.1.2. Extracção e purificação de RNA total.....	175
II.3.1.3. Síntese de cDNA.....	176
II.3.1.4. Digestão do cDNA e ligação de adaptadores sintéticos.....	178
II.3.1.5. Reacções de pré-amplificação e de amplificação.....	178
II.3.1.6. Separação dos fragmentos amplificados em gel de poliacrilamida.....	181
II.3.1.7. Recuperação, clonagem e sequenciação dos fragmentos cDNA-AFLP.....	181
II.3.1.8. Análise das sequências nucleotídicas dos fragmentos cDNA-AFLP.....	182
II.3.2. Amplificação com primers de sequência heterogénea.....	183
II.3.2.1. Extracção de DNA genómico de <i>Q. suber</i>	183
II.3.2.2. Selecção de primers de sequência heterogénea.....	183
II.3.2.3. Condições das reacções de amplificação.....	185
II.3.2.4. Clonagem e sequenciação dos fragmentos amplificados.....	186
II.3.3. Determinação de sequências complementares das extremidades de mRNAs por RACE-PCR 5'/3'.....	190
II.3.3.1. Material vegetal.....	190
II.3.3.2. Extracção e purificação de RNA total.....	190
II.3.3.3. Amplificação das extremidades 3' e 5' de mRNAs após a síntese de cDNA <i>in vitro</i>	191
II.3.3.3.1. Amplificação da extremidade 3' de mRNAs pelo método do kit RACE.....	191
II.3.3.3.2. Amplificação da extremidade 3' de mRNAs pelo método do kit GeneRacer.....	193
II.3.3.3.3. Amplificação da extremidade 5' de mRNAs pelo método do kit GeneRacer.....	194
II.3.3.4. Clonagem dos produtos PCR no vector pCRII e determinação da sequência nucleotídica.....	196
II.3.4. Construção de um banco genómico de Q. suber.....	198
II.3.4.1. Introdução ao método.....	198
II.3.4.2. Extracção de DNA genómico.....	198
II.3.4.3. Digestão parcial do DNA genómico com <i>Sau3AI</i>	199
II.3.4.4. Preenchimento parcial das extremidades 3' dos fragmentos digeridos.....	200
II.3.4.5. Separação dos fragmentos de DNA por centrifugação num gradiente de sacarose.....	201
II.3.4.6. Ligação dos fragmentos de DNA ao vector <i>Lambda FIX II</i> e encapsulamento.....	202
II.3.4.7. Determinação do título do banco genómico de <i>Q. suber</i>	203
II.3.4.8. Amplificação do banco genómico de <i>Q. suber</i>	204
II.3.4.9. Pesquisa de sequências nucleotídicas no banco genómico de <i>Q. suber</i>	205
II.3.4.9.1. Plaqueamento de fracções representativas do banco genómico e transferência para membrana.....	205
II.3.4.9.2. Marcação das sondas com digoxigenina.....	206
II.3.4.9.3. Hibridação do DNA dos bacteriófagos com as sondas marcadas.....	208
II.3.4.9.4. Detecção e isolamento de clones de fagos recombinantes que hibridaram com as sondas (clones positivos).....	209

II.3.4.9.5. Síntese da sonda por amplificação a partir do DNA dos clones dos fagos recombinantes positivos.....	210
II.3.4.10. Extração do DNA do bacteriófago λ	211
II.3.4.11. Digestão do DNA do bacteriófago λ com <i>Not</i> I.....	212
II.3.4.12. Amplificação com <i>primers</i> específicos e <i>primers</i> T3 ou T7.....	213
II.3.4.13. Sequenciação e análise das sequências nucleotídicas dos clones positivos.....	214
II.3.5. Análise semi-quantitativa por RT-PCR e hibridação.....	214
II.3.5.1. Amostras de raízes de <i>Q. suber</i>	214
II.3.5.2. Extração de RNA total e síntese de cDNA <i>in vitro</i>	215
II.3.5.3. Amplificação do cDNA sintetizado <i>in vitro</i>	215
II.3.5.4. Hibridação dos produtos PCR com sondas marcadas com digoxigenina.....	217
II.3.6. Pesquisa de polimorfismos por PCR-RFLP nos genes que codificam uma PDI (protein disulphide isomerase) e uma proteína de resistência (R) de <i>Q. suber</i>.....	219
II.3.6.1. Identificação das árvores.....	219
II.3.6.2. Amplificação de fragmentos dos genes <i>duma</i> PDI (<i>protein disulphide isomerase</i>) e <i>duma</i> proteína de resistência (R) de <i>Q. suber</i>	219
II.3.6.3. Digestão dos fragmentos amplificados com <i>Mse</i> I, <i>Hind</i> III e <i>Eco</i> RI.....	220
II.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	221
II.4.1. Identificação e caracterização de genes de <i>Q. suber</i> envolvidos na resposta à infecção por <i>P. cinnamomi</i>.....	221
II.4.1.1. Análise do mRNA de <i>Q. suber</i> e <i>Q. rotundifolia</i> por cDNA-AFLP.....	221
II.4.1.2. Gene que codifica uma cinamil álcool desidrogenase 1 de <i>Q. suber</i> (<i>QsCAD1</i>).....	229
II.4.1.2.1. Clonagem do mRNA transcrito do gene <i>QsCAD1</i> de <i>Q. suber</i>	229
II.4.1.2.2. Sequência de aminoácidos deduzida do cDNA de <i>QsCAD1</i>	231
II.4.1.2.3. Análise filogenética.....	236
II.4.1.2.4. Expressão de <i>QsCAD1</i> em raízes de <i>Q. suber</i>	241
II.4.1.3. Gene que codifica uma proteína de resistência de <i>Q. suber</i> (<i>QsRPc</i>).....	245
II.4.1.3.1. Sequências de quatro alelos do gene <i>QsRPc</i> de <i>Q. suber</i>	245
II.4.1.3.2. Clonagem de mRNAs transcritos do gene <i>QsRPc</i>	249
II.4.1.3.3. Estrutura da proteína deduzida do gene <i>QsRPc</i>	253
II.4.1.3.4. Expressão do gene <i>QsRPc</i> em raízes de <i>Q. suber</i>	261
II.4.1.3.5. Pesquisa de polimorfismos no gene <i>QsRPc</i> , por PCR-RFLP.....	264
II.4.1.4. Gene de <i>Q. suber</i> (<i>QsPDI</i>) que codifica uma proteína do tipo PDI (<i>protein disulphide isomerase</i>).....	270
II.4.1.4.1. Sequência e estrutura do gene <i>QsPDI</i>	270
II.4.1.4.2. Região do promotor do gene <i>QsPDI</i>	273
II.4.1.4.3. Proteínas do gene <i>QsPDI</i>	276
II.4.1.4.4. Expressão do gene <i>QsPDI</i> em raízes de <i>Q. suber</i>	279
II.4.1.4.5. Pesquisa de polimorfismos no gene <i>QsPDI</i> , por PCR-RFLP.....	284
II.4.1.5. Gene que codifica uma proteína do tipo RelA/SpoT de <i>Q. suber</i> (<i>QsRSH</i>).....	287
II.4.1.5.1. Clonagem e caracterização de sequências parciais do gene <i>QsRSH</i>	287
II.4.1.5.2. Sequência de aminoácidos deduzida da sequência de DNA do gene <i>QsRSH</i>	293
II.4.2. Determinação e caracterização de genes do metabolismo de fenilpropanóides, relacionados com a defesa de <i>Q. suber</i> contra <i>P. cinnamomi</i>.....	297
II.4.2.1. Amplificação de fragmentos de genes do metabolismo de fenilpropanóides com <i>primers</i> de sequência heterogênea.....	297
II.4.2.2. Genes de peroxidases catiônicas de <i>Q. suber</i> (<i>QsPOX1</i> e <i>QsPOX2</i>).....	303
II.4.2.2.1. Sequência e estrutura do gene <i>QsPOX1</i>	303
II.4.2.2.2. Análise da região do promotor de <i>QsPOX1</i>	305
II.4.2.2.3. Estrutura da proteína deduzida do gene <i>QsPOX1</i>	312
II.4.2.2.4. Identificação <i>duma</i> isoforma da peroxidase <i>QsPOX1</i>	316

II.4.2.2.5. Relação de QsPOX1 e QsPOX2 com a patogênese em <i>Q. suber</i>	319
II.4.2.2.6. Microssatélite presente no intrão 3 de QsPOX1.....	323
II.4.2.3. Gene que codifica uma cinamil álcool desidrogenase 2 de <i>Q. suber</i> (QsCAD2).....	325
II.4.2.3.1. Clonagem de sequências parciais do gene QsCAD2 de <i>Q. suber</i>	325
II.4.2.3.2. Sequência em aminoácidos deduzida das sequências de DNA e cDNA de QsCAD2....	326
II.4.2.3.3. Expressão do gene QsCAD2 em raízes de <i>Q. suber</i>	330
II.4.2.3.4. Análise filogenética de cinamil álcool desidrogenases.....	333
II.4.2.4. Gene que codifica uma fenilalanina amónia liase de <i>Q. suber</i> (QsPAL).....	336
II.4.2.4.1. Clonagem do mRNA transcrito do gene QsPAL de <i>Q. suber</i>	336
II.4.2.4.2. Expressão do gene QsPAL em raízes de <i>Q. suber</i>	340
II.5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	346
III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	351
ANEXO I - Sequências nucleotídicas dos fragmentos AFLP.....	i
ANEXO II - Sequências nucleotídicas dos fragmentos cDNA-AFLP.....	iv
ANEXO III – ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ANEXO IV – ÍNDICE DE TABELAS.....	xi

A história de um sobreiro.

Em 19 de Agosto de 1957, Joaquim Vieira da Natividade transplantou para a Herdade dos Leitões um sobreiro proveniente de uma lande da serra de Grândola. O acontecimento ficou registado numa lápide colocada junto ao sobreiro. Uma fotografia tirada na ocasião mostra Vieira da Natividade acompanhado por João Lopes Fernandes e Sardinha de Oliveira. Naquele momento, Vieira da Natividade proferiu as seguintes palavras: “Estávamos ali três pessoas e um sobreiro mas, confesso que acreditei e acredito que éramos ao todo quatro pessoas de boa vontade”.



João Lopes Fernandes, Prof. Vieira da Natividade e Eng.º Sardinha de Oliveira

Em 22 de Maio de 1997, passados 40 anos, uma equipa da Universidade do Algarve (fotografia), recolheu folhas do sobreiro transplantado por Vieira da Natividade para analisar o genoma. O sobreiro passou a ter o número de código BS108HL e foi integrado num estudo de biodiversidade molecular.



Sobreiro BS108HL



Dina Neves e José Ferraz
Paula Caetano e Alfredo Cravador

Marília Horta e Cristina Coelho

E foi assim, que este trabalho de investigação começou.

I. ESTUDO DA BIODIVERSIDADE MOLECULAR DE *Quercus suber*.

I.1. INTRODUÇÃO

I.1.1. O género *Quercus*.

I.1.1.1. Taxonomia e bio-sistemática.

A família *Fagaceae* comporta actualmente nove géneros, nos quais estão incluídas cerca de 1000 espécies, tornando esta família num dos grupos mais numerosos da ordem Fagales e um dos mais importantes economicamente (Manos *et al.* 2001). O género *Quercus* L., composto por cerca de 600 espécies de árvores e arbustos distribuídos pelo hemisfério Norte, é um dos géneros mais extensos desta família (Samuel *et al.* 1998). Os carvalhos são membros proeminentes das florestas temperadas de folha caduca do Norte da América, Europa e Ásia, existindo também elementos de folha perene próprios das florestas mediterrânicas e subtropicais (Manos *et al.* 1999). A classificação do género *Quercus* com base em dados morfológicos reconhece a existência dos subgéneros *Cyclobalanopsis* e *Quercus*. O subgénero *Quercus* está dividido nas secções *Lobatae* Loudon (carvalhos vermelhos do Norte e Sul da América), *Protobalanus* Schwarz (carvalhos intermédios do Oeste da América do Norte) e *Quercus* (carvalhos brancos dos hemisférios Este e Oeste). Da secção *Quercus* fazem parte dois grupos de carvalhos brancos existentes na Eurásia e denominados *Ilex* e *Cerris* (Nixon 1993).

Em 1990, Bellarosa *et al.* analisaram os genes do RNA ribossómico (rRNA) das espécies *Q. cerris*, *Q. coccifera*, *Q. trojana*, *Q. ilex*, *Q. suber* e *Q. macrolepis* por hibridação com sondas dirigidas para estes genes (*Southern blot*), com o objectivo de esclarecer a taxonomia dos carvalhos do Mediterrâneo. Estes autores verificaram que os genes do rRNA de todas as espécies estudadas possuem perfis de restrição com fragmentos de tamanhos idênticos nas regiões 18 S e 25 S, enquanto que nas regiões intergénicas estes tamanhos são variáveis. O DNA correspondente ao RNA ribossómico (rDNA) de *Q. suber* é constituído por cinco tipos de genes com 11,5, 11,0, 8,6, 8,5 e 8,3 kb, existindo uma semelhança elevada entre esta espécie e *Q. cerris*, *Q. trojana* e *Q. macrolepis*, enquanto que o rDNA relativo às espécies *Q. coccifera* e *Q. ilex* é muito

diferente do das restantes espécies analisadas. Estes resultados estão em conformidade com o modelo taxonómico proposto por Schwarz (1964) para o género *Quercus*, no qual se considera que *Q. ilex* e *Q. coccifera* pertencem ao subgénero *Schlerophylloids*, ao passo que as restantes espécies estudadas pertencem ao subgénero *Cerris*.

Posteriormente, foram usadas sequências nucleotídicas da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) dos genes 18 S e 26 S de 10 espécies de *Quercus* representativas de quatro subgéneros, para construir uma árvore evolutiva que representasse a melhor hipótese genealógica (Samuel *et al.* 1998). A árvore construída possui dois ramos divergentes (I e II). Na primeira bifurcação do ramo I aparece a espécie mediterrânica de folha perene *Q. suber* em posição basal ligada em paralelo a um grupo de carvalhos de folha caduca constituído pelas espécies *Q. macrolepis* (Mediterrâneo) e pelo par *Q. acutissima* (Ásia) e *Q. rubra* (América do Norte). No ramo II localiza-se a espécie de folha perene *Q. virginiana* (América do Norte) associada em paralelo a três ramos constituídos pelo par *Q. ilex* e *Q. coccifera*, espécies de folha perene da região mediterrânica, por *Q. cerris* (Europa/Ásia) e pelo par *Q. petraea* e *Q. robur* (Europa) (Samuel *et al.* 1998). Estes resultados afastam-se da classificação taxonómica tradicional no que diz respeito à espécie *Q. cerris*, incluída no subgénero ou secção *Cerris*. Segundo estes autores, os dados retirados das sequências nucleotídicas da região ITS sugerem que a secção ou subgénero *Cerris* é polifilética, encontrando-se a espécie *Q. cerris* localizada no ramo II e o grupo no qual está incluído *Q. suber*, no ramo I. Os estudos efectuados por Bellarosa *et al.* (1990) já referidos anteriormente, também referem a existência de afinidades entre *Q. suber* e *Q. macrolepis*, contrariamente ao que acontece com a espécie *Q. cerris*.

Dados moleculares resultantes de análises de restrição efectuadas em DNA de cloroplastos, em DNA das regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e da região codificante duma unidade repetida do rDNA nuclear 5,8 S, foram usados em 1999 por Manos *et al.* em estudos de filogenia, bio-geografia e diferenciação molecular do género *Quercus* subgénero *Quercus* (Fagaceae). A análise combinada destes dados sugere que existe a seguinte relação entre quatro dos grupos monofiléticos: (*Cerris*-(*Lobatae*-(*Protobalanus* + *Quercus sensu stricto*))). Os dados moleculares apoiam a ideia dos carvalhos brancos (grupos *Cerris* e *Ilex sensu Nixon*), estritamente existentes na Europa e Ásia, serem grupos monofiléticos colocados em ramos da árvore evolutiva que derivam directamente da base do subgénero *Quercus*.

Ainda, segundo estes autores, o subgénero *Quercus* está dividido em quatro secções, duas estritamente americanas (secções *Lobatae* e *Protobalanus*), uma existente na América e na Eurásia (secção *Quercus sensu stricto*) e uma estritamente Euroasiática (secção *Cerris*). As duas espécies mediterrânicas, *Q. suber* e *Q. ilex*, pertencem a grupos distintos da secção *Cerris*. Num dos grupos está incluída a espécie *Q. ilex* e espécies de *Quercus* de folha perene, tais como *Q. coccifera*. No outro grupo estão colocadas espécies de *Quercus* de folha caduca, tais como o *Q. cerris*, assim como a espécie de folha perene *Q. suber* (Manos *et al.* 2001).

De facto, e apesar de não se saber se a divergência entre *Q. ilex* e *Q. suber* ocorre apenas ao nível da secção, verifica-se que estas duas espécies representam linhagens diferentes do género *Quercus* quando se fazem interpretações taxonómicas com base em evidências morfológicas ou com base em dados moleculares do DNA dos cloroplastos ou do DNA ribossómico.

Uma outra questão pertinente consiste na distinção entre *Q. ilex* e *Q. rotundifolia*. Para alguns botânicos as azinheiras (*Q. ilex*) compreendem duas sub-espécies a *ilex* e a *rotundifolia*, enquanto que outros consideram *Q. rotundifolia* como uma espécie diferente de *Q. ilex* e não como uma sub-espécie. Lebreton *et al.* (2001) referem que a extensão ecológica e a variabilidade biológica de *Quercus ilex* L. é tão complexa que qualquer caracterização sistemática é perigosa. Estes autores investigaram a variabilidade de *Q. ilex* pela determinação de substâncias químicas (flavonoides) presentes nas folhas e pela medição do peso seco, do comprimento e das nervuras das folhas. Foram estudadas árvores provenientes de onze locais distintos da região mediterrânica ocidental (Portugal, Espanha, Magreb, França e Itália). Os resultados obtidos reflectem a existência, nestes carvalhos, de um índice elevado de polimorfismo. Por este motivo, os autores acharam mais prudente considerar as azinheiras como um complexo específico *Quercus* aggr. *ilex* L. que compreende duas espécies distintas *Q. ilex* e *Q. rotundifolia*, propondo para a segunda uma subespécie nova denominada *maghrebiana*. *Q. rotundifolia* está presente na Península Ibérica e *Q. (ilex) rotundifolia* subsp. *maghrebiana* está presente no Norte de África. (Lebreton *et al.*, 2001).

I.1.1.2. Organização genómica.

O tamanho do genoma é um parâmetro útil em vários aspectos da biologia celular e molecular, na ecologia, na fitogeografia e em estudos de sistemática e evolução.

Zoldos *et al.* (1998) determinaram o tamanho do genoma e o seu conteúdo em guaninas (G) e citosinas (C), por citometria de fluxo de sete espécies de *Quercus*, quatro de folha caduca (*Q. cerris*, *Q. petraea*, *Q. pubescens* e *Q. robur*) e três de folha perene (*Q. coccifera*, *Q. ilex* e *Q. suber*). O tamanho dos genomas varia entre 1,88 (*Q. robur*) e 2,00 pg/2C (*Q. ilex*), considerando que 2C designa a quantidade relativa de DNA presente num núcleo somático possuidor de uma única cópia do genoma (Hartman, *et al.* 1998). O tamanho do genoma de *Q. suber* é de 1,91 pg/2C que corresponde, aproximadamente, a 8×10^8 pb, possuindo uma percentagem de GC de 39,7, valor este que se integra no valor médio medido para as restantes espécies (39,9 %). Duas das espécies de carvalhos estudadas, *Q. ilex* e *Q. coccifera*, possuem um conteúdo em DNA 6 % superior às restantes espécies analisadas. Em termos de classificação das espécies, estas estimativas do tamanho do genoma estão de acordo com o modelo taxonómico proposto por Schwarz (1964), que classificou *Q. ilex* e *Q. coccifera* como subgénero *Sclerophyllodrys*, agrupando as outras cinco espécies deste estudo nos subgéneros *Quercus* e *Cerris*. Zoldos *et al.* também tentaram correlacionar a quantidade de DNA presente em várias populações de *Q. petraea* e *Q. robur* com a sua origem geográfica, quando estas se encontravam separadas por mais de 1000 km de distância, por considerarem que podem ocorrer variações genéticas nos carvalhos ao nível morfológico, fisiológico, de isoenzimas e conteúdo em DNA, quando estão expostos a condições ecogeográficas distintas. Verificaram que os valores dos conteúdos em DNA são uniformes em quatro populações de *Q. robur*, não obstante a sua origem geográfica, enquanto que o conteúdo em DNA determinado em duas populações de *Q. petraea* é variável. Estes resultados foram confirmados pela contagem do número de cromossomas presente nas células de alguns indivíduos das populações de *Q. petraea*, verificando-se que possuíam células com cariótipos com mais um, dois ou três cromossomas para além do número de cromossomas comum a todas as espécies estudadas que é de $2n=24$. Curiosamente, observaram também que células diferentes do

ápice de uma mesma raiz possuíam um número distinto de cromossomas podendo ser 24 ou 25, 24 ou 26 e 24, 26 ou 27 (Zoldos *et al.* 1998).

Em 1938, Natividade referia que “Os estudos cariológicos revelaram-se até agora, por sua vez, impotentes para auxiliar a resolver os problemas sistemáticos do género *Quercus*. Nem no número, nem na forma, nem nas dimensões dos cromossomas foi possível evidenciar diferenças significativas entre as espécies estudadas”. Passados 65 anos vários autores continuam a referir a ausência de diferenciação cromossómica entre as várias espécies de carvalhos, estabelecendo que o número básico de cromossomas $n = 12$ é absolutamente estável no género *Quercus* (D’Emérico *et al.*, 2000; Zoldos *et al.* 1999). Este aspecto reflecte-se nas precárias barreiras reprodutivas que existem entre as espécies do género *Quercus*, resultando em fenómenos de hibridação natural e de transferência de material genético entre as espécies que podem ocorrer mesmo entre carvalhos com características morfológicas e fisiológicas muito diferentes.

Um estudo comparativo da organização genómica dos genes ribossómicos e da heterocromatina efectuado em 11 espécies de *Quercus*, pertencentes a quatro subgéneros originários da Europa e América do Norte, com recurso à citogenética (*C-banding*, *fluorochrome banding*), citogenética-molecular (*FISH-fluorescence in situ hybridization*) e técnicas de biologia molecular (*dot-blot*), revelou não existir diferenciação cromossómica entre as várias espécies de carvalhos estudadas, concluindo que possuem um cariótipo comum, com cromossomas metacêntricos e sub-metacêntricos e com um par de satélites associado a cromossomas sub-telocêntricos (Zoldos *et al.* 1999). Estes autores verificaram que a posição e o número dos *loci* do DNA correspondente aos rRNAs 18 S-26 S e 5 S são muito conservados ao nível do género e que estes genes se encontram localizados na heterocromatina perto dos centrómeros dos cromossomas, numa região rica em sequências repetidas de GC e AT. A associação de genes com sequências muito repetidas deve aumentar a possibilidade de ocorrerem trocas desiguais de material genético e duplicação de genes, aumentando desse modo o número de cópias. A quantificação do DNA nuclear revelou uma notável semelhança ao nível do tamanho do genoma entre as 11 espécies (Zoldos *et al.* 1999).

Contudo, apesar da semelhança genómica, que determina a ausência de barreiras reprodutivas e possibilita fenómenos de hibridação, verifica-se que as espécies de *Quercus* se mantêm distintas, tanto ao nível morfológico como ao ecofisiológico. Por este motivo, Zoldos *et al.* (1999) consideram que o trabalho realizado contribuiu para

consolidar a hipótese das espécies de *Quercus* serem grupos dominantes de indivíduos caracterizados por alelos resultantes de co-adaptação e correlacionados com aspectos fenotípicos, tal como havia sido referido por Van Valen, em 1976.

Segundo D'Emerico *et al.* (2000), *Quercus suber* possui um cariótipo caracterizado por 14 cromossomas metacêntricos e 10 sub-metacêntricos; o par de cromossomas número 1 exibe um satélite. *Quercus ilex* possui 18 cromossomas metacêntricos, 4 sub-metacêntricos e 2 sub-telocêntricos; o par de cromossomas número 2 exibe um satélite.

I.1.1.3. Hibridação entre espécies de *Quercus*.

Os híbridos naturais existem em muitos grupos de plantas e animais e constituem um tema muito interessante no estudo da evolução das espécies. Não existe, contudo, uniformidade de opiniões quanto à importância e consequências da hibridação natural no processo evolutivo. A hibridação natural já foi considerada como um processo evolutivo fundamental, como um epifenómeno evolutivo ou seja, como um fenómeno secundário e acidental que acompanha um outro, reputado primário, como um processo que ajuda a finalizar a especiação ou, ainda, como um impedimento para a evolução divergente (Arnold *et al.* 2001). Na realidade, a maior parte dos estudos sobre hibridação natural assenta em duas suposições: 1) que a hibridação natural não afecta a história evolutiva das formas que hibridam entre si, porque existe uma probabilidade muito pequena de produzir génotipos novos com uma aptidão relativa superior; 2) que, mesmo que ocorra transferência de genes, estes não irão contribuir para os padrões de diversificação ou adaptação, porque os híbridos serão sempre eliminados pela selecção natural. Estas duas suposições derivam da observação de que os cruzamentos entre indivíduos de espécies ou sub-espécies diferentes dão muitas vezes origem a génotipos menos férteis ou menos viáveis do que os produzidos em cruzamentos de indivíduos geneticamente semelhantes. Arnold *et al.* em 1999 e 2001 questionaram estes pressupostos e apresentaram exemplos experimentais de fenómenos de hibridação ocorridos entre animais ou entre plantas que não confirmam aquelas suposições. Num dos exemplos, fazem referência à investigação efectuada em espécies de tentilhão (género *Geospiza*) que habitam as ilhas Galápagos, levada a cabo por Peter e Rosemary Grant durante mais de duas décadas. Recentemente, estes investigadores foram

testemunhas de uma mudança na aptidão à sobrevivência e procriação que foi acompanhada de transição no *habitat*, dos híbridos descendentes dos cruzamentos entre *G. fuliginosa*, *G. fortis* e *G. scandens*. Estas alterações foram relacionadas com o fenómeno natural *El Niño* verificando-se que, antes da sua existência, os tentilhões híbridos eram muito raros e não se reproduziam mas, depois do aparecimento deste fenómeno, os resultados dos cruzamentos F1 (*G. fortis* x *G. fuliginosa* e *G. fortis* x *G. scandens*) e dos cruzamentos destes híbridos com progenitores *G. fortis* davam origem a indivíduos com aptidões equivalentes ou superiores às dos seus progenitores. Na realidade, o fenómeno natural alterou o tipo de sementes utilizado na alimentação destas aves e a hibridação permitiu o aparecimento de indivíduos com bicos que se adequam melhor ao novo tipo de alimento, melhorando a sua capacidade de sobrevivência relativamente aos progenitores. Grant e Grant concluíram que a hibridação tinha aumentado a variação genética, criando genótipos híbridos que eram mais aptos no novo *habitat*, contrariando a suposição 2 de Arnold *et al.* (1999 e 2001).

A hibridação natural observada entre duas espécies de pinheiro, *Pinus contorta* e *Pinus banksiana*, foi documentada por vários autores (Critchfield, 1980, 1984 e 1985; Wagner *et al.*, 1987; Wheeler e Guries, 1987) e descrita no trabalho publicado por Arnold *et al.* (1999), para exemplificar de que forma a hibridação natural pode afectar o processo evolutivo das espécies. Critchfield analisou, com recurso à morfologia, à bioquímica e a marcadores moleculares, populações fósseis e contemporâneas de *P. contorta* e *P. banksiana*. Os resultados obtidos mostraram que tanto a hibridação ocorrida no passado como a mais recente tinham afectado a distribuição da variação genética e, possivelmente, a diversidade ecológica e taxonómica nestas espécies. A área ocupada actualmente por híbridos destas duas espécies é pequena e este facto foi associado à quebra reprodutiva que caracteriza as primeiras gerações de híbridos. Contudo, o impedimento que se verifica na formação das primeiras gerações de híbridos não é consistente nem com a distribuição genética nem com a variação morfológica que se observa nestas duas espécies. Verificaram, estes autores, que os fenómenos de introgressão de *P. banksiana* em *P. contorta* são limitados nas regiões em que actualmente predominam híbridos mas, por outro lado, existem populações de *P. contorta* separadas destas regiões por longas distâncias, que contêm genes de *P. banksiana* resultantes de introgressão. Foi então concluído que os fenómenos de introgressão de *P. banksiana* em *P. contorta* aconteceram ainda antes do último período

glacial e que a hibridação natural teve influência na evolução deste complexo de espécies (Arnold *et al.*, 1999 e Arnold *et al.*, 2001).

Começa de certa forma a ser consensual considerar que existem, no genoma de uma espécie, regiões que estão co-adaptadas, enquanto outras podem sofrer recombinação, com produção de novos genótipos que são favorecidos pela selecção natural. Nos cruzamentos com indivíduos híbridos, as interacções favoráveis ou desfavoráveis entre genes dependem do tipo de genótipos e a descendência estará sujeita a selecção favorável ou desfavorável.

A existência de híbridos no género *Quercus* L., resultante de cruzamentos entre várias espécies de carvalhos, tem sido relatada com frequência (Rushton, 1993). Os carvalhos brancos nos Estados Unidos da América formam um amplo complexo de espécies férteis entre si, ocupando grandes extensões com o formato de povoamentos mistos. Deste grupo de carvalhos fazem parte 16 espécies diferentes morfologicamente e em 14 dessas espécies são conhecidos híbridos naturais que resultaram de cruzamentos dentro do grupo. As árvores das espécies *Q. alba* e *Q. stellata* podem, por exemplo, tanto uma como outra, formar híbridos naturais com 11 espécies de carvalhos brancos. Whittemore e Schaal em 1991 pesquisaram a existência de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) no DNA dos cloroplastos e no rDNA em populações de cinco espécies de carvalhos brancos (*Q. alba*; *Q. emoryi*; *Q. macrocarpa*; *Q. michauxii*; *Q. stellata*; *Q. virginiana*) com o objectivo de analisar os efeitos genéticos provocados pela hibridação natural. A informação contida no DNA dos cloroplastos e no DNA das mitocôndrias é herdada do progenitor feminino e passa de geração em geração sem estar sujeita a fenómenos de recombinação. Portanto, essa informação, preservada ao longo do tempo, reflecte o passado genético do indivíduo e pode ajudar a identificar fenómenos de hibridação que tenham ocorrido ao longo das gerações. Aqueles autores encontraram oito padrões de restrição diferentes (A a H) nas análises efectuadas ao DNA dos cloroplastos, verificando que um deles é comum à maioria das árvores analisadas e que os outros estão associados a uma determinada localização geográfica. Os padrões D e H são raros e são os únicos presentes em apenas uma espécie (*Q. alba*). Os genótipos F, B e G estão limitados a determinadas regiões geográficas e são os genótipos comuns a duas ou mais espécies localizadas em povoamentos mistos. Nas espécies *Q. macrocarpa*, *Q. alba*, e *Q. michauxii*, por exemplo, predomina o genótipo B e as populações representativas destas 3 espécies estão todas localizadas numa pequena região do Texas oriental. Naquela análise de

RFLP foram encontrados vários fragmentos com tamanhos que variam de 9 a 10,5 kb, verificando-se que a variabilidade de perfis era elevada no interior das populações. Estes resultados não permitiram comparar espécies nem foi encontrada nenhuma relação com a localização geográfica. Neste estudo concluiu-se que os genótipos dos cloroplastos dos carvalhos brancos, nos Estados Unidos, são partilhados pelas espécies que povoam, em simultâneo, um determinado local e que, por isso, não representam um conjunto isolado de genes. O fenograma resultante da análise de grupos realizada com os dados de RFLP não reflete a separação entre espécies mas está de acordo com a localização geográfica das populações. Observou-se, também, que existem trocas de genes entre espécies de carvalhos que estão afastadas taxonomicamente umas das outras e que teriam, teoricamente, menor capacidade para hibridar. *Q. virginiana* é uma espécie de carvalho de folha perene muito diferente, morfologicamente, de *Q. stellata*, que é uma espécie de folha caduca. Os dois grupos não formam, normalmente, povoamentos com árvores intermédias híbridas. No entanto, partilham o genótipo G relativo ao RFLP do DNA dos cloroplastos. Estes autores verificaram também que a circulação de genes entre espécies que povoam a mesma área geográfica é superior àquela que se verifica entre populações da mesma espécie localizadas em regiões afastadas. Em 1976, Van Valen referia ser possível que *Q. macrocarpa*, no Quebec, trocasse mais genes com *Q. bicolor*, localizado na mesma região, do que com *Q. macrocarpa* do Texas, devido à elevada proporção de híbridos detectados no Quebec. O nível de transferência de genes encontrado é surpreendente, se considerarmos que é raro identificarem-se híbridos naturais que se reconheçam morfologicamente e que os carvalhos brancos analisados são o resultado de aproximadamente 100 gerações. É também possível que o elevado fluxo de genes que se verificou pela análise do DNA dos cloroplastos não seja representativo da globalidade do genoma dum carvalho. Segundo estes autores, as espécies de carvalhos que coexistem num mesmo lugar têm capacidade para permanecer distintas, não obstante os fenómenos de introgressão e por isso, o conceito de espécie, que se baseia no isolamento genético total entre espécies para explicar a sua distinção, não se aplica aos *Quercus* (Whittemore e Schaal, 1991; Burger, 1975). Propõem, como modelo mais apropriado para os *Quercus*, que se considerem as espécies como “picos” adaptativos; a tendência para as espécies se fundirem, devido ao fluxo de genes por introgressão, é equilibrada pela selecção de grupos de alelos co-adaptados (Whittemore e Schaal, 1991). Van Valen propôs, em 1976, que os carvalhos fossem considerados como multi-espécie, ou seja, como um

grupo de espécies férteis entre si, que trocam genes no âmbito de fenómenos de hibridação natural e que ocupam a mesma região geográfica.

Na Europa, as populações de *Q. robur* e *Q. petraea* têm sido as mais estudadas. Estas espécies partilham a mesma área de distribuição, mas têm preferências ecológicas distintas. *Q. petraea* prefere solos secos, bem drenados e pobres em sais minerais, enquanto *Q. robur* prefere solos húmidos e mais ricos em sais minerais. No estado adulto é possível distinguir estas espécies pelos caracteres fenotípicos, mas a classificação é dificultada pela existência de uma grande diversidade de formas intermédias ou pouco típicas, de ambas as espécies. (Bodenes, 1996) As investigações realizadas sobre a variabilidade genética destas espécies ao nível do DNA dos cloroplastos, por PCR-RFLP, revelou a existência de 6 haplotipos distribuídos na forma de “manchas” (Petit *et al.*, 1997). Estas manchas correspondem a grandes extensões de floresta povoadas, em simultâneo, por *Q. robur* e *Q. petraea*, caracterizadas por um único haplotipo do DNA dos cloroplastos. A partilha sistemática entre espécies, do genoma dos cloroplastos, herdado do progenitor feminino, sugere que, durante a recolonização da Europa por espécies florestais, após a última glaciação há cerca de 10000 anos, as sementes devem ter sido espalhadas a longas distâncias e, em seguida, devem ter ocorrido trocas inter-espécies, resultando em fenómenos de hibridação (Petit *et al.*, 1997). Recentemente foram pesquisados, por PCR-RFLP, polimorfismos no DNA dos cloroplastos de 2155 árvores representantes de 426 populações de *Q. robur* e *Q. petraea* localizadas na Bélgica, Holanda, Luxemburgo, Alemanha, República Checa e Áustria e foram encontrados 11 haplotipos. Os haplotipos mais representados foram encontrados com frequências semelhantes nas duas espécies (König *et al.*, 2002). Por sua vez, estudos efectuados com isoenzimas revelaram que estas espécies partilham o mesmo tipo de alelos sendo os valores das frequências alélicas muito semelhantes (Müller-Starck *et al.*, 1993).

Em 1999, Samuel publicou os resultados das análises por RAPD, do genoma de populações de *Q. robur* e de *Q. petraea* e comparou os perfis dos marcadores moleculares com a classificação morfológica e com os resultados obtidos com isoenzimas, para as mesmas populações. Morfologicamente, as populações tinham sido caracterizadas como *Q. petraea* pura, *Q. robur* pura e população mista. Na população mista, algumas árvores individuais tinham sido classificadas fenotipicamente como tipo-*robur*, tipo-*petraea* ou supostos híbridos F1. Com 14 *primers* diferentes foram amplificados, por PCR, 147 fragmentos, dos quais 13 são comuns a todos os indivíduos,

6 são partilhados pelos indivíduos pertencentes à população de *Q. petraea* pura e estão ausentes nas amostras de *Q. robur* e cinco foram observados na maior parte dos indivíduos da população de *Q. robur* pura e em nenhum dos indivíduos da população de *Q. petraea* pura. Nos indivíduos híbridos os perfis são compostos por combinações destes fragmentos, não apresentando nenhum dos indivíduos um perfil correspondente à soma das bandas específicas de uma e de outra das espécies. A análise por isoenzimas tinha revelado a existência duma semelhança genética significativa entre *Q. robur* e *Q. petraea*, com excepção para o locus *Got-2*. Neste locus, o alelo 125 era predominante (95-100 %) nas populações puras de *Q. petraea*, enquanto nas populações de *Q. robur* era raro (0-4%). Frequências alélicas intermédias tinham sido encontradas em indivíduos localizados nos povoamentos mistos. Ao combinar as duas técnicas observou-se que um dos indivíduos, caracterizado como tipo-*petraea*, era homozigótico para o alelo 125 do locus *Got-2* e possuía um perfil RAPD com cinco fragmentos (em seis) derivados de *Q. petraea* e um (em cinco) derivado de *Q. robur*. Um dos aspectos interessantes deste estudo foi verificar que os resultados obtidos por RAPD, conjuntamente com as isoenzimas, parecem ser suficientes para classificar o genótipo de um indivíduo em particular, como o de uma espécie pura ou como o de um híbrido. Tal como Whittemore e Schaal, Samuel considera poder existir uma extensa troca de genes entre as populações das espécies de carvalhos que partilham a mesma área geográfica. Este autor refere ainda que os indivíduos classificados como híbridos, em vez de serem combinações em proporções iguais dos progenitores, são provavelmente o resultado de cruzamentos repetidos entre híbridos e entre híbridos e os progenitores (Samuel, 1999).

Em Portugal e Espanha, as áreas ocupadas por azinheiras e por sobreiros sobrepõem-se com formação de povoamentos mistos, nalgumas regiões. A hibridação entre *Q. ilex* e *Q. suber* vem definida na Flora Portuguesa de Gonçalo Sampaio (1947) da seguinte forma: “*Q. Morísii* (Borzi) (*Q. suber* x *Q. ilex*): cortiça pouco desenvolvida ou quási nula, não excedendo nunca 1 cent. de espessura. Sul do Tejo. *Azinheira-macha*.”. Natividade, em “Subericultura” (1950), também faz alusão à existência de híbridos entre *Q. ilex* x *Q. suber*, *Q. cerris* x *Q. suber*, *Q. Afares* x *Q. suber*, considerando que em Portugal e em Espanha, só se encontra no estado espontâneo o híbrido entre *Q. suber* e *Q. ilex*, designado por carvalho cerqueiro. Este autor refere que a hibridação natural de *Q. suber* com outras espécies de carvalhos ocorre com frequência e que, na descendência dos híbridos, se encontram fenótipos intermédios que estabelecem a transição, quase insensível, entre os progenitores. Ao estudar os

caracteres da folha, da densidade estomática e da produção suberosa nos híbridos F2 de *Q. ilex* x *Q. suber*, este autor verificou que estas características segregavam independentemente, sem que se registasse nítida dominância. Na descendência do carvalho cerqueiro encontram-se todos os termos de transição entre as peridermes dos carvalhos e a periderme do sobreiro, o que levou a atribuir às árvores produtoras de cortiça preguenta ou madeirenta uma origem híbrida.

Um dos problemas com que se depara a cultura do sobreiro no que diz respeito à selecção de fenótipos com interesse económico é, precisamente, a escolha de indivíduos que não apresentem sinais de hibridação com outros *Quercus*, em idade jovem e no meio de uma população de sobreiros extremamente heterogénea. Em 1992, foram estudadas 102 árvores adultas das espécies *Q. suber* (44) e *Q. ilex* (58) com três sistemas enzimáticos polimórficos (esterase, 3 alelos; amino-peptidase, 4 alelos; fosfatase ácida, 2 alelos), com o intuito de identificar alelos que fossem específicos de cada uma das espécies. Estes alelos foram usados para classificar, como *Q. ilex* ou como *Q. suber*, 35 árvores jovens localizadas na mesma região e também para diagnosticar precocemente a presença de híbridos (Elena-Rossello *et al.*, 1992). Estes autores verificaram que, para a amino-peptidase, os alelos classificados como 1 e 2 são específicos de *Q. ilex* e que os alelos 3 e 4 são específicos de sobreiros. Também, para a esterase e a fosfatase ácida, foram encontrados alelos que permitem distinguir *Q. ilex* de *Q. suber*. De acordo com os 3 sistemas enzimáticos, das 35 árvores jovens, 29 foram classificadas como *Q. ilex*, 5 como *Q. suber* e 1 como híbrido das duas espécies. Estes autores concluíram que é possível classificar árvores no estado jovem e identificar híbridos recorrendo a isoenzimas. Consideram que os fenómenos de hibridação devem ser pouco frequentes, mas não raros, porque observaram que, nos povoamentos mistos e em anos muito frios e secos, pode ocorrer sobreposição do período de floração das duas espécies, aumentando a possibilidade de ocorrência de hibridação (Elena-Rossello *et al.*, 1992).

A partilha de genomas de organelos citoplasmáticos (cloroplastos; mitocôndrias) entre grupos taxonómicos diferentes de plantas, tem sido observada com frequência e pode ter origem em fenómenos de hibridação e introgressão. A variação ao nível do DNA dos cloroplastos e do DNA mitocôndrico foi estudada por PCR-RFLP em 97 populações de sobreiros (*Q. suber*) de Marrocos e em 31 populações de azinheiras (*Q. ilex*) e o nível de introgressão foi quantificado (Belahbib *et al.*, 2001). Num primeiro ensaio efectuado em 24 populações de *Q. suber* e *Q. ilex* foram encontrados dois

haplotipos (I e S) para o DNA dos cloroplastos e das mitocôndrias que correspondem a linhas evolutivas divergentes. O haplotipo I caracteriza todos os indivíduos da espécie *Q. ilex* e o haplotipo S predomina nos indivíduos da espécie *Q. suber* e está praticamente ausente em *Q. ilex*. Em seguida, a análise foi alargada a 73 populações, realizada com mais uma combinação de *primers* do que a análise anterior e foram identificados os haplotipos I1, I2, I3, I4, S1 e S2. Quatro dos haplotipos (S1, I1, I2 e I4) encontrados são partilhados pelas duas espécies, sendo I2 o haplotipo mais comum em *Q. ilex*. Este haplotipo é também encontrado, frequentemente, em *Q. suber* quando as duas espécies crescem em povoamentos mistos ou próximas uma da outra. O nível de diferenciação encontrado entre as 73 populações de *Q. suber* em Marrocos foi de 0,84, um valor bastante superior ao encontrado em *Q. ilex* que foi de 0,33. Os níveis de introgressão relativos aos genomas dos organelos citoplasmáticos encontrados para *Q. ilex* e *Q. suber*, que são duas espécies pertencentes a grupos taxonómicos afastados, são semelhantes aos encontrados para espécies de carvalhos mais próximas entre si (Belahbib *et al.*, 2001). Segundo estes autores, a elevada frequência com que foi encontrado o haplotipo I em *Q. suber*, sugere que tenha ocorrido hibridação entre *Q. ilex* e *Q. suber* e que, devido à hereditariedade feminina dos genomas dos organelos citoplasmáticos, *Q. ilex* tenha funcionado como progenitor feminino e *Q. suber* como progenitor masculino. O cruzamento destes híbridos com progenitores masculinos de *Q. suber* teria resultado, após algumas gerações, na produção de descendentes com mais ou menos características de *Q. suber*. Estas reflexões parecem fazer sentido quando verificamos que os sobreiros possuidores de haplotipo I se encontram em áreas de povoamento misto e apresentam morfologia típica de *Q. suber*, pelo menos no que diz respeito à formação da cortiça. Ainda mais interessante é a observação de que todos os sobreiros localizados nas regiões mais isoladas possuem o haplotipo I. Belahbib *et al.* (2001) fazem duas sugestões para tentar explicar esta substituição dos genomas dos organelos citoplasmáticos nos sobreiros:

1. captura citoplasmática: os sobreiros com haplotipos S, presentes inicialmente nestas florestas, teriam estado em contacto com azinheiras com haplotipos I. Progressivamente, estes sobreiros teriam sido substituídos por outros sobreiros que teriam adquirido o haplotipo I, por hibridação com azinheiras no sentido *Q. ilex* (progenitor feminino) x *Q. suber* (progenitor masculino); em seguida, teriam ocorrido novos cruzamentos dos híbridos com *Q. suber*. Por algum motivo, esta substituição terá

sido favorecida pela selecção natural. Nas regiões em que os sobreiros possuem os haplotipos S e I, o processo não se teria completado;

2. captura nuclear: o sobreiro teria colonizado estas florestas através de grânulos de pólen envolvidos em processos de hibridação com azinheiras já existentes. Como a colonização com *Q. suber* através de sementes não é indispensável nesta situação, também não é necessário um mecanismo para eliminar o haplotipo S.

O trabalho realizado por Boavida *et al.* (2001) sobre a reprodução sexual em *Q. suber*, veio apoiar as hipóteses sugeridas por Belahbib *et al.*, no que diz respeito ao sentido em que ocorre a hibridação. Segundo Boavida *et al.*, os cruzamentos entre *Q. suber* e *Q. ilex* só são possíveis num sentido ou seja, com *Q. suber* a funcionar como progenitor masculino e *Q. ilex* como progenitor feminino. Estes autores observaram que, quando *Q. ilex* funciona como progenitor feminino os grânulos de pólen de *Q. suber* germinam, penetram a superfície do estigma e progridem ao longo do tecido de propagação, com produção de semente na ordem dos 25 %. No entanto, quando os grânulos de pólen de *Q. ilex* polinizam os pistilos de *Q. suber*, ocorre inibição do crescimento do tubo polínico logo que este atinge o tecido de propagação. A produção de semente nestes cruzamentos inter-específicos é 10 % inferior à produção de semente obtida nos cruzamentos intra-específicos entre dois sobreiros. De acordo com os resultados obtidos, estes autores consideram que a hibridação natural entre *Q. ilex* e *Q. suber* deve ser um acontecimento pouco frequente, por não haver sobreposição das épocas de floração destas duas espécies e por se verificar uma compatibilidade unidirectional. Observaram que os tecidos femininos de *Q. suber* e de *Q. ilex* controlam o número de tubos polínicos que crescem no estigma, favorecendo os genótipos com os quais interagem favoravelmente.

I.1.1.4. Diversidade genética.

As diferenças genéticas que determinam a diferenciação entre indivíduos residem nas moléculas do DNA e a determinação do perfil genético, com base no DNA dos organismos, é o método mais recente de individualização biológica. A singularidade genética é adquirida por herança ou por mutação. Nos organismos diplóides, uma cópia do genoma é herdado do progenitor feminino e a outra do progenitor masculino. O processo de recombinação que ocorre na meiose assegura a originalidade do genoma

dos descendentes, de tal forma que o dos progenitores nunca é globalmente reconstituído. Existem dois tipos de recombinação homóloga, o *crossing over* (recombinação recíproca) e a conversão genética (recombinação não-recíproca). A recombinação recíproca envolve a troca equitativa de sequências homólogas entre cromossomas homólogos, produzindo combinações novas nos segmentos dos cromossomas. Neste processo, normalmente, a organização espacial dos genes mantém-se inalterada. Na recombinação não-recíproca ocorre a troca desigual de sequências ou seja, uma sequência é substituída por outra, com perda de uma das sequências envolvida no mecanismo de recombinação. Quando se pretende determinar a relação de semelhança ou de diferença que existe entre indivíduos de uma mesma espécie, analisam-se regiões do genoma que diferem com frequência de indivíduo para indivíduo ou seja, locais polimórficos (Krawczak e Schmidtke, 1998). Uma população é monomórfica num determinado *locus* se esse *locus* possuir apenas um alelo. Um *locus* diz-se polimórfico se dois ou mais alelos coexistirem numa população. Mas, num *locus* polimórfico, quando um dos alelos tem uma frequência superior ou igual a 99 %, há pouca probabilidade de observar os outros alelos, a não ser que a amostra seja muito grande. Por isso, em termos práticos, considera-se que um *locus* é polimórfico quando a frequência do alelo mais comum é inferior a 99 %. Uma das formas mais simples de medir o nível de polimorfismo numa população é calcular a percentagem de *loci* polimórficos (P) dividindo o número de *loci* polimórficos pelo número total de *loci* analisados. Esta medição depende do número de indivíduos em estudo, porque quanto mais pequena for a amostra, mais difícil se torna identificar *loci* polimórficos (Graur e Li, 1999). A diversidade genética ao nível do DNA pode resultar, por mutação, da substituição de uma ou mais bases, da perda de segmentos de DNA de tamanho variável por eliminação, da aquisição de segmentos de DNA por inserção ou duplicação e de mecanismos moleculares de rearranjo (inversão). A eliminação e a inserção podem ocorrer por *crossing over* desigual entre dois cromossomas, de tal forma que a perda dum segmento num cromossoma, resulta na adição desse segmento ao outro cromossoma. A probabilidade de ocorrência de *crossing over* desigual aumenta quando existem no DNA segmentos duplicados colocados uns a seguir aos outros (*tandem*). Um outro mecanismo de eliminação consiste num *crossing over* intra-cromossómico, que resulta da recombinação de duas sequências que são repetição uma da outra e que estão localizadas no mesmo cromatídeo e na mesma orientação. Os mecanismos de inversão podem resultar de *crossing over* intra-cromossómico entre dois segmentos

homólogos orientados em sentidos opostos (Graur e Li, 1999; Krawczak e Schmidtke, 1998). Para além dos mecanismos mutacionais, existem outros mecanismos que contribuem para a variabilidade das espécies tais como o fluxo de genes, a selecção natural de génotipos mais aptos em determinadas condições ou o denominado “desvio genético” (*genetic drift*). O fluxo de genes pode resultar, por exemplo, de fenómenos de hibridação ou do cruzamento entre populações isoladas fisicamente. A selecção natural de génotipos é um mecanismo pouco compreendido verificando-se que, apesar de todos os indivíduos numa população terem a mesma probabilidade de contribuir com os seus genes para as gerações futuras, a ligação génotipo-fenótipo determina que apenas alguns génotipos tenham continuidade na descendência. O “desvio genético” é o processo pelo qual há flutuação aleatória da frequência alélica ao longo das gerações, observando-se que a sobrevivência de alelos raros depende da sua frequência inicial (Krawczak e Schmidtke, 1998).

Uma das consequências desastrosas da expansão das populações humanas é a extinção de outras espécies de seres vivos. Num levantamento feito recentemente, foram registadas cerca de 9000 espécies de árvores em vias de extinção incluindo mais de metade das 600 espécies de coníferas existentes no mundo (Newton *et al.*, 1999). Após reconhecimento da destruição causada surgiu a vontade de conservar, constatando-se que a escolha das estratégias a adoptar é dificultada pela ausência de critérios objectivos e pela escassez de informações. Nos programas de conservação, a abordagem científica passa pelo estudo da variabilidade genética das espécies de árvores. O grau e a distribuição da variação genética nas populações que fazem parte de uma espécie, são de uma importância fundamental para o seu potencial evolutivo e determinam a sua probabilidade de sobrevivência. Segundo Newton *et al.*, (1999) a variação intra-específica define-se como o grau de variação genética existente nas populações que compõem uma espécie e, quando é avaliada com recurso a marcadores moleculares, deveria denominar-se “variação genética por marcadores moleculares”, para se diferenciar da determinação quantitativa da variação genética obtida a partir de dados fenotípicos que, segundo estes autores, fornece mais informações acerca da capacidade adaptativa das populações.

Q. suber tem sido, recentemente, uma das espécies referidas para integração em programas de conservação, não porque esteja em vias de extinção mas porque sofre de um acentuado declínio e porque a sua manutenção em determinadas regiões é crucial para a fixação de populações e para evitar a erosão dos solos e a desertificação. O

elevado valor económico da cortiça também torna o sobreiro num candidato prioritário a estes programas. Ter um conhecimento aprofundado da variação genética desta espécie torna-se crucial para a definição de estratégias a adoptar nos programas de selecção e de manutenção da sua diversidade genética.

A diversidade genética em *Quercus* tem sido estudada com recurso a características morfológicas, químicas, bioquímicas e moleculares. A análise morfológica das bolotas produzidas por populações de *Q. ilex*, com proveniência em Espanha e em Itália, revelou que as formas dos frutos eram comuns, mas que em Espanha existe uma heterogeneidade morfológica superior entre indivíduos da mesma espécie e entre bolotas da mesma árvore. As mesmas bolotas foram analisadas quanto ao seu conteúdo em estigmasterol, brassicasterol e colesterol, verificando-se que o teor destas substâncias nas amostras de Espanha é inferior ao das amostras de Itália. O oposto acontece relativamente ao teor em avenasterol. A análise em componentes principais realizada com a globalidade dos resultados não mostra separação entre os frutos provenientes dos dois países (Pelleau, 1984; citado por Lebreton *et al.*, 2001). A variabilidade genética do complexo *Q. ilex* foi analisada com recurso à morfologia, a isoenzimas e ao DNA dos cloroplastos, tendo sido observado que a relação entre a diversidade genética e a localização geográfica varia consoante o tipo de marcador considerado (Michaud, 1993). No estudo isoenzimático, por exemplo, foram encontrados vários alelos característicos de determinadas populações e a separação destas populações relativamente a outras está de acordo com a barreira que representa o mar Mediterrâneo (Michaud, 1993). Lebreton *et al.* (2001) estudaram a variabilidade de vários parâmetros foliares do complexo *Q. ilex* em populações provenientes de 11 regiões do Mediterrâneo ocidental, ao nível intra-individual (para evidenciar diferenças existentes entre as folhas de uma mesma árvore), ao nível intra-populacional (entre árvores de uma determinada população) e ao nível intra-específico (entre populações do complexo *Q. ilex*). Estes autores verificaram que os coeficientes médios de variação intra-individual e intra-populacional são semelhantes no que diz respeito aos parâmetros morfológicos do comprimento (L; 16 %), da largura (l; 18 %), do alongamento (L/l; 13 %) e do índice de espinescência (28 %). O número de nervuras é um parâmetro menos variável entre indivíduos duma mesma população do que é em cada indivíduo dessa população, de tal forma que a análise da variabilidade individual tem de se efectuar num número elevado de folhas. O peso das folhas também se revelou um parâmetro inter-individual bastante variável (coeficiente de variação de 28 %). Ao nível intra-populacional os

parâmetros bioquímicos apresentam uma variabilidade semelhante à dos parâmetros morfológicos, cerca de 20 % para três flavonóides. Quer para os parâmetros morfológicos quer para os bioquímicos, a variabilidade ao nível inter-populacional é inferior ao valor da variabilidade intra-populacional ou seja, estatisticamente, a diferença média existente entre duas populações é menor do que a existente entre dois indivíduos de uma mesma população, considerados ao acaso. Estes autores concluíram que a variabilidade do grupo taxonómico (complexo *Q. ilex*) está representada a vários níveis e, por esse motivo, são compreensíveis as dificuldades encontradas quanto à escolha de parâmetros eficazes que permitam identificar, na natureza, as diferenças com objectividade (Lebreton *et al.*, 2001).

Tal como Lebreton *et al.* descreveram para o complexo *Q. ilex*, também Natividade refere, em 1950, relativamente a *Q. suber*, que “...*Quercus suber* é uma espécie extremamente polimorfa e o número de formas botânicas referido na bibliografia suberícola eleva-se a algumas dezenas”. Este autor faz referência às variedades genuína P. Cout., *occidentalis* (Gay) e *subcrinita* P. Cout., que incluem várias formas, alertando para o facto dos exemplos referidos não traduzirem o intenso polimorfismo do sobreiro, mas reunirem apenas os biótipos mais característicos e distinguíveis de acordo com a forma das cúpulas, folhas e frutos. Entre os caracteres que apresentam a variação mais acentuada é feita referência à arborescência e ao vigor, à forma, recorte e dimensões das folhas, à época de floração, à cor do perianto das flores masculinas, porosidade e cor do tecido suberoso, entre outras. Natividade descreve, também, a existência de diferenças morfológicas acentuadas entre indivíduos descendentes de uma mesma árvore, assim como a ocorrência de várias gradações entre caracteres do mesmo órgão. E, para expressar a grande diversidade encontrada no sobreiro, Natividade, escreveu que “...em rigor, cada indivíduo se pode considerar uma forma botânica distinta.”.

A variabilidade genética em *Q. suber* tem sido muito estudada com recurso a isoenzimas. Toumi e Lumaret, em 1998, investigaram a variabilidade genética de 11 *loci*, em 40 populações de *Q. suber* da bacia mediterrânica ocidental e encontraram uma percentagem de polimorfismo (P) de 76 %. O valor médio da heterozigocidade observada ($H_o=0,283$), a diversidade genética total ($H_t=0,31$) e o número médio de alelos, por *locus* e por população ($A_t=2,0$), observados por estes autores, são semelhantes aos que foram obtidos por Elena-Rossello e Cabrera (1996), quando estudaram 13 *loci* de 7 sistemas enzimáticos em 7 populações de sobreiros da região

mediterrânica. Os valores de heterozigocidade ($H_o=0,28$) e do coeficiente de diferenciação inter-populações ($F_{st}=11\%$) obtidos por Toumi e Lumaret são superiores aos valores referidos por Jiménez *et al.* (1999) ($H_o=0,145$; $F_{st}=3,3\%$) num estudo realizado em 18 populações de *Q. suber*, localizadas em Portugal, Espanha, Marrocos e Itália, com 12 sistemas enzimáticos. Segundo Jiménez *et al.* (1999) os resultados deste estudo não são comparáveis com os resultados de Elena-Rossello e Cabrera (1996) e Toumi e Lumaret (1998), porque o número de *loci* analisados em comum é muito pequeno e porque dos sistemas enzimáticos analisados por Elena-Rossello e Cabrera e por Toumi e Lumaret faziam parte peroxidases e estearases, sistemas enzimáticos que apresentam uma variabilidade elevada e dependente do estado de desenvolvimento da planta e dos tecidos analisados. Na análise efectuada por Jiménez *et al.* (1999), a diferenciação inter-populações corresponde a apenas 3% da diversidade total.

Kremer e Petit (1993) apresentaram uma síntese bibliográfica dos estudos realizados com isoenzimas em 33 espécies do género *Quercus*. A extensão e organização da diversidade genética foram investigadas a três níveis hierárquicos: complexo, espécie e população. A diversidade total ao nível da espécie e da população varia muito entre as espécies (de 0,06 a 0,4). Espécies distribuídas por grandes áreas, em contínuo, tais como *Q. petraea* e *Q. rubra*, exibem níveis elevados de diversidade genética. Num complexo, a maior parte da diversidade genética nuclear está distribuída no interior das populações (74%). A diferenciação entre espécies é responsável por 23% da diversidade genética e a diversidade entre populações contribui com apenas 3%.

Em 2001, Toumi e Lumaret alargaram a análise isoenzimática realizada em *Q. suber* a mais três espécies de folha perene da região mediterrânica, *Q. ilex*, *Q. coccifera* e *Q. alnifolia* com o objectivo de estabelecer relações taxonómicas entre estas espécies. O valor mais elevado para a diversidade total ($H_t=0,40$) e para a diversidade genética no interior das populações ($H_s=0,33$) foi observado em *Q. coccifera*, enquanto os valores mais baixos ($H_t=0,13$; $H_s=0,12$) foram observados em *Q. alnifolia*. Os valores observados em *Q. ilex* e *Q. suber* são intermédios, aproximando-se dos valores observados em *Q. coccifera*. A proporção atribuída à diferenciação entre populações não excedeu os 19%. Relativamente às distâncias genéticas intra-específicas, o valor mais elevado foi observado em *Q. coccifera* e o mais baixo em *Q. suber*, indicando que nesta espécie a semelhança genética entre as populações é grande. Estes autores sugerem que os parâmetros A_t e H_t podem estar relacionados positivamente com a área de distribuição da espécie (isto é, o seu valor ser directamente proporcional àquela

área). Verificaram que *Q. coccifera* é a espécie que possui os parâmetros At e Ht mais elevados e que é a espécie com a área de distribuição mais vasta (partes ocidental e oriental da bacia mediterrânica). Em oposição, os valores mais baixos dos referidos parâmetros foram obtidos em *Q. alnifolia*, cuja área de distribuição está restrita aos solos muito básicos do centro de Chipre. Contudo, a hipótese não se adequa ao perfil genético e à área geográfica ocupada por *Q. suber*. Nesta espécie, os valores de At e Ht são intermédios em relação aos das outras duas espécies, devido à baixa frequência com que aparecem *loci* com alelos raros e à pequena diferenciação observada entre as populações de *Q. suber* que ocupam a área de distribuição observada. Portanto, At e Ht não são proporcionais com a extensa área geográfica povoada por esta espécie. Como explicação, estes autores sugerem que a causa se deve à intervenção do homem, que seleccionou, de forma empírica, sementes de sobreiros produtores de cortiça de boa qualidade, e que homogeneizou geneticamente as populações ao fazer a sua dispersão (Toumi and Lumaret, 2001). Jiménez *et al.* (1999) interpretam a estrutura genética da espécie de maneira diferente. Estes autores encontraram níveis de diversidade semelhantes entre as populações naturais de *Q. suber* e as populações em que há intervenção do homem e, por esse motivo, consideram que a distância que separa duas áreas povoadas por *Q. suber* não é suficiente para evitar a troca de genes entre as populações, que adquirem, rapidamente, a mesma estrutura genética. O facto da maior parte da variação genética estar distribuída no interior das populações é, segundo os autores, um reflexo da existência de cruzamentos com outras espécies do mesmo género, situação comum nos carvalhos.

I.1.1.4.1. Metodologias usadas na análise da diversidade genética.

As análises da diversidade genética com recurso às isoenzimas apresentam algumas limitações. A detecção da actividade destas proteínas pode ser dificultada por factores que estão associados à especificidade dos tecidos que as produzem, ao controlo da expressão que é exercido durante o desenvolvimento da planta ou ainda à indução da expressão em resposta a alterações do meio ambiente. As duplicações genéticas dão origem a perfis difíceis de interpretar que podem comprometer o cumprimento dos objectivos que se pretendem atingir (Hahn e Grifo, 1996).

Nos últimos anos tem-se assistido ao desenvolvimento de métodos com base em biologia molecular, envolvendo o DNA, que podem ser usados para estimar a variação genética entre e intra espécies. A análise de polimorfismos genéticos ao nível do DNA decorre da aplicação de uma ou mais técnicas que visam o estudo de um *locus* de cada vez (abordagem *locus*-único) ou que estudam em simultâneo vários *loci* (abordagem múltiplo-*locus*). Enquanto na abordagem múltiplo-*locus* se produz, num único ensaio, um perfil genético (*fingerprint*), na abordagem *locus*-único, para se obter um perfil genético semelhante ao obtido na abordagem múltiplo-*locus*, é necessário combinar vários ensaios. A tabela 1 faz referência a algumas técnicas de biologia molecular usadas para estimar a variação genética entre indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes. Cada classe de marcadores moleculares tem características particulares, no que diz respeito ao trabalho necessário para desenvolver um marcador antes da sua aplicação de forma sistemática numa população, aos requisitos experimentais de utilização do marcador e ao tipo de dados que produz.

Tabela 1. Descrição de algumas técnicas de biologia molecular usadas para determinar a variação genética (Adaptado de Newton <i>et al.</i> , 1999).			
T é c n i c a	Acrônimo	M e t o d o l o g i a	Vantagens/desvantagens
Marcadores codominantes locus-único			
<i>Restriction fragment length polymorphism</i>	RFLP	DNA genómico digerido com endonucleases de restrição e analisado em seguida, por <i>Southern blotting</i> e hibridação com recurso a sondas.	Algumas sondas podem ser aplicadas a mais do que um grupo taxonómico. Requer, normalmente, o uso de radioisótopos e de DNA de boa qualidade numa quantidade da ordem dos microgramas.
<i>Cleaved amplified polymorphic sequences</i>	CAPS PCR-RFLP	Amplificação, por PCR, de fragmentos de DNA nuclear ou organelar com <i>primers</i> específicos. Digestão dos fragmentos amplificados com enzimas de restrição e visualização, por electroforese em gel de agarose ou poliacrilamida.	Requer quantidades de DNA na ordem dos nanogramas. A determinação da sequência dos <i>primers</i> dirigidos especificamente para determinados <i>loci</i> é laboriosa e dispendiosa. Por vezes podem usar-se <i>primers</i> universais dirigidos para <i>loci</i> específicos. Neste caso, genes codificados por mais do que um <i>locus</i> ou os pseudogenes podem ser amplificados a partir do DNA genómico, ocasionando erros na identificação dos alelos e nas frequências alélicas.
Microsatélites ou <i>Simple sequence repeats</i>	SSRs	Utilização de <i>primers</i> específicos para amplificação, por PCR, de regiões hipervariáveis dos genomas nuclear e organelar, constituídas por motivos repetidos, por exemplo, (GA) _n	Análise inequívoca de alelos de um único <i>locus</i> . As regiões do genoma que possuem os microsatélites variam entre os grupos taxonómicos impossibilitando a utilização dos <i>primers</i> em várias espécies. O desenvolvimento de <i>primers</i> específicos sempre que se pretende analisar uma espécie nova é dispendioso e laborioso.
Marcadores dominantes múltiplo-locus			
<i>Random amplified polymorphic DNA</i>	RAPD	Amplificação por PCR de fragmentos distribuídos ao acaso no genoma inteiro com <i>primers</i> de sequência curta (10 bases).	Permite analisar regiões codificantes e não codificantes de quase todos os genomas de árvores. A reprodutibilidade dos resultados é baixa e podem aparecer amplificações que correspondem a artefactos. A localização dos marcadores moleculares é desconhecida, a não ser que se efectuem cruzamentos controlados.
<i>Amplified fragment length polymorphism</i>	AFLP	DNA genómico é digerido com duas enzimas de restrição, uma que corta com muita frequência e outra com pouca frequência. Às extremidades protuberantes ligam-se adaptadores oligonucleotídicos sintéticos complementares e amplificam-se fragmentos de DNA distribuídos por todo o genoma usando <i>primers</i> que se hibridam nos adaptadores e que possuem 1, 2 ou 3 bases adicionais na extremidade 3'. Um dos <i>primers</i> é marcado com fluorescência ou radioactividade e os fragmentos amplificados são separados em gel de poliacrilamida.	Os AFLP são mais reprodutíveis do que os RAPDs, mas mais dispendiosos. É possível automatizar a leitura das bandas.

Algumas das técnicas usadas para determinar marcadores moleculares, tais como AFLPs e RAPDs, não necessitam do conhecimento prévio de sequências de DNA da espécie que se pretende analisar, porque aplicam a PCR para amplificar múltiplas regiões do genoma com *primers* que não são específicos e que podem ser usados em todos os organismos vivos. Estes métodos são particularmente úteis para uma primeira análise do genoma duma espécie. No entanto, os marcadores AFLP ou RAPD são lidos normalmente como marcadores dominantes e, por isso, não é possível determinar a variação específica de um *locus* único. Alguns autores fizeram referência à possibilidade de ler bandas electroforéticas, com origem em *loci* heterozigóticos, considerando a intensidade da banda (Ajmone-Marsan *et al.*, 1997).

Estas técnicas têm sido aplicadas em *Quercus*, de forma isolada ou combinada, consoante o propósito a que se destinam e o objectivo que se pretende atingir. Bakker *et al.* (2001) usaram os microssatélites e os AFLPs para analisar o número, o tamanho e a distribuição no espaço, de clones de *Q. robur* e *Q. petraea* de populações antigas, localizadas em regiões densamente povoadas pelo homem e que serviram ao longo de gerações para o pastoreio. Com base em seis *loci* de microssatélites, foram identificados 14 genótipos distintos, nove em *Q. robur* e cinco em *Q. petraea*, numa área com 80 árvores. A análise por AFLP resultou na obtenção de 69 fragmentos polimórficos com duas combinações de *primers* e as 80 árvores foram agrupadas em 14 grupos que reúnem indivíduos muito semelhantes entre si (95 %-100 %). Estes 14 grupos correspondem aos clones identificados com os microssatélites, com a diferença de que entre alguns indivíduos colocados no mesmo grupo AFLP, havia até um máximo de seis bandas electroforéticas que os diferenciava. Estes autores consideram que estes polimorfismos podem ser o resultado de mutações somáticas ou que podem ser artefactos criados na reacção de amplificação, apesar de terem verificado a sua existência noutros genótipos e de serem fragmentos reprodutíveis (Bakker *et al.*, 2001). Em *Q. suber*, a análise por AFLP foi usada precisamente para verificar a estabilidade genética de plantas provenientes de culturas de tecidos (clones). Partindo do pressuposto que a qualidade da cortiça é geneticamente controlada, teria todo o interesse seleccionar árvores adultas e proceder à propagação vegetativa por embriogénese somática com produção de clones geneticamente estáveis. Hornero *et al.* (2001) induziram a embriogénese somática, a partir de folhas de rebentos colhidos em três árvores adultas e analisaram os clones produzidos, por AFLP, com três combinações de *primers* diferentes. Numa das árvores, o perfil AFLP das folhas dos rebentos e dos

embriões somáticos era idêntico, enquanto nas linhas embriogénicas produzidas a partir das outras duas árvores foram detectados níveis de polimorfismo de 5,6 % e 7,3 %. Como os clones de *Q. robur* e *Q. petraea* analisados por Bakker *et al.* eram provenientes de propagação vegetativa, é provável que a variação genética detectada na análise por AFLP tenha a sua origem em mutações somáticas.

Em 2002, Mariette *et al.* compararam os níveis de diversidade genética inter-populações e intra-populações, detectados com marcadores AFLP e microssatélites, em povoamentos mistos de *Q. petraea* e *Q. robur*. Os resultados obtidos pelos microssatélites e pelos AFLPs foram semelhantes, mostrando que a diversidade genética no interior das populações e a diferenciação genética entre populações é superior em *Q. petraea* do que em *Q. robur*. Nos AFLPs, a variação inter-locus (variação entre indivíduos com base em amostras de loci do genoma) é sempre muito superior à variação intra-locus (variação para todos os loci entre indivíduos de uma população) e por isso não foi possível distinguir populações com base nesta técnica. Aqueles autores referem que quando se pretende encontrar diferenças na análise da diversidade a vários níveis, devemos optar por analisar mais loci do que analisar mais indivíduos (Mariette *et al.*, 2002). Uma das limitações associadas ao uso de microssatélites traduz-se na não correspondência das regiões hipervariáveis entre espécies diferentes impedindo a transferência dos primers da PCR que amplifica especificamente estas regiões, de uma espécie para outra. No entanto, em *Q. suber* foram testados 24 conjuntos de primers que tinham sido desenvolvidos para *Q. myrsinifolia*, *Q. petraea* e *Q. robur* com uma taxa de sucesso de 54 % (13 loci). Foram detectados níveis elevados de variabilidade genética relativamente ao número de alelos (7,5 alelos/locus polimórfico) e à heterozigocidade observada ($H_o=0,572$) (Hornero *et al.*, 2001). A verificação de que alguns destes marcadores são conservados entre espécies do género *Quercus*, permite que se iniciem estudos de diversidade genética em *Q. suber* sem que seja necessário passar pelas etapas de desenvolvimento de microssatélites nesta espécie.

A variação genética em carvalhos tem sido estudada principalmente com recurso à técnica PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) aplicado ao DNA dos cloroplastos (cpDNA). O genoma destes organelos do citoplasma é herdado do progenitor feminino e funciona como uma unidade de transmissão não sujeita a recombinação. Em consequência, os padrões de variação do cpDNA reflectem o fluxo de genes através de sementes. Foram desenvolvidos primers universais que hibridam em regiões não codificantes do genoma

dos cloroplastos, consideradas as regiões que apresentam as taxas de mutação mais elevadas. A variação genética ao nível do DNA dos cloroplastos (cpDNA) dos carvalhos brancos da Europa foi estudada por um consórcio de 16 laboratórios (Petit *et al.*, 2002). Neste estudo foram identificados, pelo menos, 32 haplotipos correspondentes a seis linhagens diferentes, partilhados por seis espécies de *Quercus*, estruturados de acordo com a localização geográfica e que reproduzem a história da recolonização pós-glaciar das populações (Petit *et al.*, 2002). Na Europa, muitos animais e plantas sobreviveram ao período glacial Quaternário em refúgios isolados, localizados no sul do continente. É previsível que, durante a longa fase de isolamento geográfico, as populações se diferenciasssem geneticamente umas das outras. Após o final da última era glacial, as populações anteriormente isoladas entraram em contacto umas com as outras durante a recolonização do Norte e Centro da Europa e a amplitude com que foi transferido o material genético (fluxo de genes) entre elas determinou a distribuição da informação genética actual. Em Itália, ao estudarem a variação do cpDNA em 194 populações de quatro espécies de carvalhos brancos (*Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens* e *Q. frainetto*) Fineschi *et al.* (2002) verificaram que a Sicília, a Sardenha e a Córsega constituíram os três principais refúgios destas espécies de carvalhos brancos, desempenhando um papel fundamental na conservação das populações e da diversidade genética (Fineschi *et al.*, 2002). Trinta e quatro populações das 194 (17,5 %) estão representadas por mais do que um haplotipo (PCR-RFLP) e não foram encontrados haplotipos específicos de uma espécie, verificando-se que a distribuição dos haplotipos em cada espécie reflecte a localização geográfica. O valor da diversidade genética total observado em Itália é inferior ao valor observado na Península Ibérica e nos Balcãs. Os valores dos coeficientes de diferenciação genética são elevados, indicando que uma grande parte da diversidade genética corresponde à diversidade entre populações, o que é sugerido pelo facto de existirem regiões caracterizadas pela presença de um único haplotipo (Fineschi *et al.*, 2002). Dentro do mesmo âmbito e com o mesmo objectivo foram estudadas 426 populações de *Q. robur* e *Q. petraea* da Europa Central (Bélgica, Holanda, Luxemburgo, Alemanha, República Checa e Áustria), tendo-se observado a existência de 11 haplotipos pertencentes a quatro linhagens diferentes com origem em refúgios existentes na Península Ibérica, na Península Alpenina e na Península Balcânica (König *et al.*, 2002). No estudo realizado por Petit *et al.* (2002) em 2613 populações de carvalhos brancos, os autores observaram que a partilha do genoma dos cloroplastos, que se verifica nas espécies de carvalhos brancos, não é extensiva a outras secções do

género. Os haplotipos do cpDNA característicos de *Q. suber*, *Q. cerris* e *Q. ilex* não foram encontrados nos carvalhos brancos. A troca de genes entre os carvalhos brancos e as espécies da secção *Cerris* ou *Q. ilex* parece ser mais limitada (Petit *et al.* 2002). No entanto, a grande divergência encontrada ao nível das sequências do cpDNA das espécies *Q. suber* e *Q. ilex* não impede estas espécies de trocar este tipo de genomas entre si, como foi observado por Belahbib *et al.* (2001) para as populações de Marrocos.

Se bem que seja importante analisar a variabilidade das espécies ao nível do cpDNA, é necessário ter em conta que os padrões de variação das populações, com base na análise deste tipo de genoma, podem ser muito diferentes dos padrões obtidos na análise de *loci* de genes do núcleo, herdados de ambos os progenitores. Finkeldey e Mátyás (2003) compararam os padrões de variação genética obtidos por análise ao cpDNA e por análise de perfis de isoenzimas, em 28 populações de carvalhos da Suíça. Os perfis isoenzimáticos caracterizam as populações de acordo com a espécie, mas não reflectem a diferenciação das populações com base nos haplotipos do cpDNA. A história das populações, durante a época glacial e após esta época, não é ilustrada pela variação dos *loci* dos genes do núcleo.

A utilização de marcadores moleculares como fonte de informação para estudos de conservação das espécies deve ser suportada, de preferência, por dados com proveniência na análise de genomas dos organelos citoplasmáticos e do núcleo.

I.1.1.4.2. *Análise da variabilidade genética entre indivíduos.*

Para analisar a variabilidade genética entre indivíduos é necessário conjugar a aplicação de metodologias (tais como AFLP e RAPD) que identificam caracteres nos indivíduos com a aplicação de métodos teóricos de classificação, que utilizam esses caracteres para estabelecer as relações de parentesco que existem entre cada par de indivíduos. O termo “classificação” deve ser entendido como a ordenação dos objectos de estudo em grupos, com base nas suas relações de parentesco. As classificações que têm por objectivo descrever as afinidades que existem entre objectos da natureza criam hipóteses, com a justificação científica principal de estimular novas investigações que deverão testar essas hipóteses (Sokal, 1974). A taxonomia numérica é um método que permite a avaliação quantitativa das semelhanças (ou dissemelhanças) entre objectos, entidades ou OTUs (*Operational Taxonomic Units*) e o seu agrupamento com base nos

caracteres e respectivos estados (Sneath e Sokal, 1973; Cabral *et al.*, 1977, cit. por Matos, 2001). Nas classificações politéticas, os grupos de indivíduos ou objectos podem partilhar entre si um grande número de propriedades mas não têm necessariamente de ter todos em comum nenhuma dessas propriedades. Uma das consequências da classificação politética é a necessidade de usar o maior número de caracteres possível para classificar indivíduos. Todos os caracteres fenéticos reflectem uma parte da constituição do genoma dos indivíduos e, teoricamente, quanto maior for o número de caracteres fenéticos examinados, melhor será a avaliação das relações fenéticas e, por consequência, genéticas, que existem entre os indivíduos (Sackin e Jones, 1993). As classificações baseadas em muitas propriedades terão um carácter generalista, ou seja, não servirão da melhor maneira um determinado objectivo, mas podem ser úteis para uma grande variedade de objectivos (Sokal, 1974).

A figura 1 apresenta, na forma de esquema, as metodologias a seguir num estudo de taxonomia numérica (Lima, 1996).

Nos métodos hierárquicos, o ponto de partida numa classificação é uma matriz de t por n , que é uma tabela de t objectos ou OTUs, cada um deles descrito na forma de n caracteres. A cada carácter são atribuídos estados ou valores e em análises do genoma com recurso a marcadores dominantes múltiplo-*locus* são, normalmente, usados caracteres binários (Sackin e Jones, 1993). Eles representam a ausência ou presença de um determinado fragmento e são-lhes atribuídos respectivamente, os valores 0 ou 1. Estes caracteres binários podem ser “dicotómicos” e, neste caso, a ausência de fragmento em dois objectos não é considerada como semelhança ou podem ser “alternativos” e, neste caso, a ausência de fragmento em dois objectos é considerada como semelhança (Gower, 1971).

No cálculo do grau de parecença entre pares de OTUs definidos por caracteres binários podem ser aplicados, para além de outros, os coeficientes *simple matching* (SM) e *Jaccard* (J). Um coeficiente de semelhança S_{jk} mede o grau de semelhança entre duas OTUs ou seja, quando duas OTUs k e j são comparadas para um carácter i , se $S_{jki}=0$ então k e j são diferentes, se $S_{jki}=1$, então são semelhantes (Gower, 1971).

O coeficiente SM traduz a proporção de caracteres com o mesmo estado (ambos zero ou ambos 1) no par de OTUs que está a ser comparado. No caso de existirem valores omissos ou seja, por exemplo, caracteres com interpretação duvidosa num objecto, com o coeficiente SM são ignorados. O coeficiente de J é semelhante ao coeficiente SM, excepto que os caracteres com o mesmo estado zero no par de OTUs

que está a ser comparado são ignorados. Por outras palavras, o coeficiente SM atribui o mesmo estatuto ao par (00) e ao par (11), enquanto o coeficiente J ignora o par (00). Não existe nenhuma regra que ajude o investigador a decidir se deve usar o coeficiente SM ou o J. Pode ser útil usar os dois coeficientes. Por isso, inicialmente, aplicam-se os dois coeficientes e determinam-se os coeficientes de correlação cofenética entre as matrizes de semelhança obtidas com o coeficiente J e com o coeficiente SM e em seguida, se forem muito diferentes, opta-se por um (Sackin e Jones, 1993). Sackin e Jones referem que, nesta escolha, a intuição deve manter-se como guia.

Depois de atribuir os códigos aos caracteres e de calcular a matriz triangular de semelhanças, procede-se à análise de grupos por métodos de tipo hierárquico. O método mais adequado no estudo das relações fenéticas que existem num grupo de organismos, com base no grau de semelhança é o UPGMA (*Unweighted pair-group method with arithmetic means*). Este método foi originalmente desenvolvido para construir fenogramas taxonómicos, ou seja, árvores que reflectem as semelhanças fenotípicas entre OTUs (Sokal e Michener, 1958, cit. por Graur e Li, 2000). O método UPGMA emprega um algoritmo de agrupamento sequencial, de forma que, de entre todas as OTUs, são identificadas as duas OTUs mais semelhantes, que passam a ser tratadas como uma OTU única, também denominada OTU composta ou grupo; em seguida, calcula-se a semelhança entre esta OTU composta e cada uma das restantes e o processo volta ao início com os novos grupos de OTUs. A semelhança mais elevada ou a menor distância pode agora ser encontrada entre os grupos de OTUs que se formaram nos dois primeiros ciclos da análise ou entre os grupos de OTUs formados e as restantes OTUs. O processo termina após $t-1$ ciclos em que t é o número total de OTUs quando todas as OTUs se juntam para formar um único grupo (Sackin e Jones, 1993).

As técnicas de classificação incluem, normalmente, a análise de grupos e a ordenação em espaços reduzidos. Os métodos de ordenação pela análise em componentes principais ou pela análise em coordenadas principais permitem representar as OTUs como pontos num espaço multidimensional, ocupando uma posição de acordo com as suas características iniciais. Estes métodos permitem projectar as OTUs nos seus eixos principais, de tal forma que o primeiro eixo contém a maior variação possível, o segundo contém a maior variação possível que ainda resta e assim sucessivamente (Sackin e Jones, 1993). A ordenação pela análise em componentes principais define um espaço de $k < n$ dimensões, que são combinações lineares dos n caracteres originais usados na descrição das OTUs (Sokal, 1974). Nesta técnica, os eixos iniciais,

representando cada um deles uma característica, são substituídos por um sistema de novos eixos, designados por componentes principais, em que cada um dos novos eixos é uma combinação linear das características utilizadas, devidamente ponderadas. Estes novos eixos são ortogonais e, portanto, não correlacionados e dispostos por ordem decrescente (Sneath e Sokal, 1973; Cabral *et al.*, 1977; Curvelo-Garcia *et al.*, 1987). A análise em coordenadas principais é uma variante do método anterior. Enquanto que na análise em componentes principais se partia directamente do conjunto de variáveis, numa análise em coordenadas principais (que mantém todas as características e propriedades do primeiro) os cálculos são efectuados a partir da matriz de semelhanças ou de distâncias (Gower, 1966). Para ajudar a detectar distorções nas projecções resultantes da análise em coordenadas principais ou em componentes principais, sobrepõe-se aos gráficos de duas ou três dimensões a “árvore de expansão mínima” (Sokal, 1974). Esta “árvore” é formada por um conjunto de linhas rectas que unem todas as OTUs, de tal modo que não ocorram circuitos fechados, que cada OTU esteja ligada a, pelo menos, outra OTU e que o comprimento total deste conjunto de linhas seja mínimo (Gower e Ross, 1969; Rohlf, 1982).

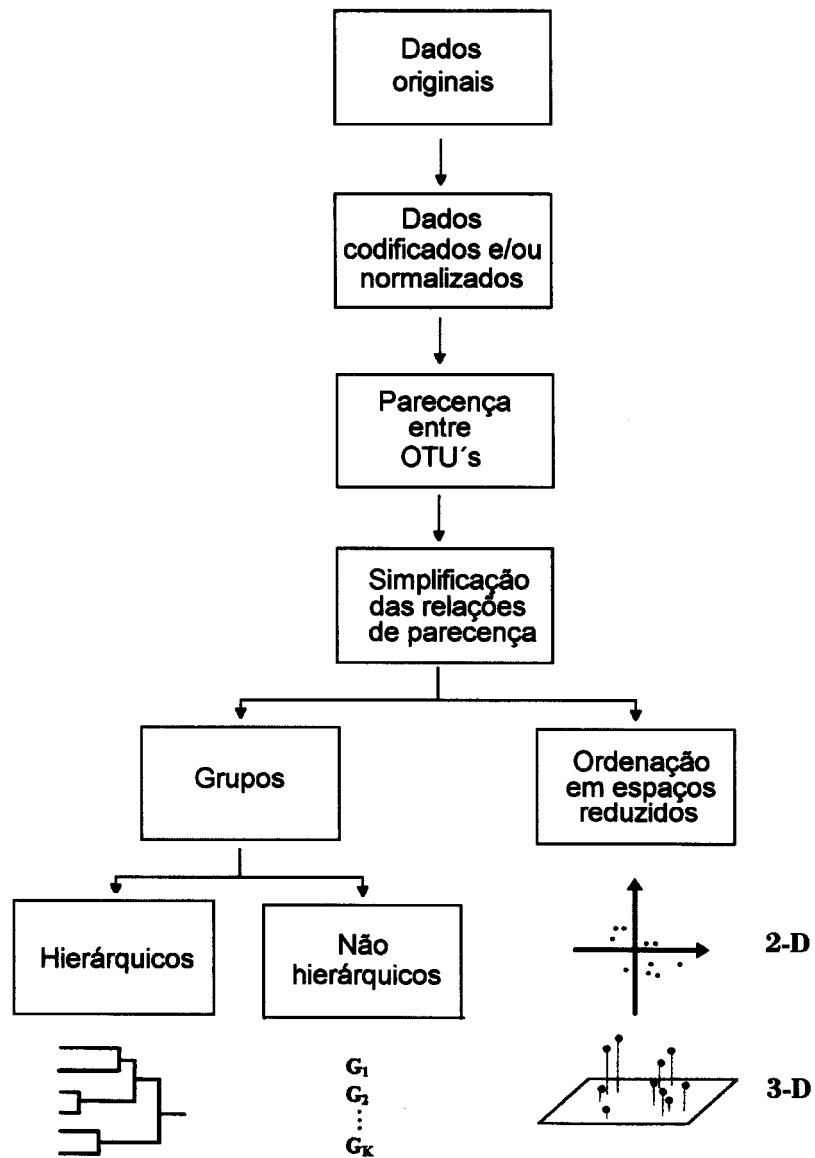


Figura 1. Esquema geral das metodologias a serem adoptadas num estudo de taxonomia numérica (Lima, 1996)

I.1.2. O sobreiro (*Quercus suber* L.).

I.1.2.1. Biologia e ecologia da espécie.

O sobreiro (*Quercus suber* L.) é uma espécie autóctone em Portugal Continental, de meia-luz, termófila e xerófila. A área de distribuição do sobreiro está centrada na região mediterrânica ocidental, encontrando-se as maiores extensões contínuas no sudoeste da Península Ibérica e nas costas magrebina (Marrocos, Argélia e Tunísia). Encontra-se também na Europa atlântica (noroeste da Península Ibérica e Landes francesa), na costa mediterrânica de Espanha, França e Itália, nas ilhas do Mediterrâneo ocidental (Baleares, Córsega, Sardenha e Sicília) e pontualmente no Mediterrâneo oriental (ex-Jugoslávia, Albânia e Grécia) (Correia e Oliveira, 2002).

No elenco das espécies florestais representadas na floresta portuguesa prevalecem largamente as espécies autóctones, resinosas ou folhosas. No sul de Portugal Continental, prevalecem grandes unidades de vegetação florestal homogénea, dominadas por carvalhos perenifólios (*Q. suber* e *Q. rotundifolia*) que constituem, geralmente, o extracto arbóreo, pouco denso, de sistemas agro-silvo-pastoris (montados). Quando a utilização do sobcoberto não é viável constituem-se formações florestais mais típicas, acompanhadas por um sub-bosque muito variado (Morais e Pereira, 2000).

Em Portugal existem 592 301 ha de povoamentos florestais puros constituídos exclusivamente por sobreiros que correspondem a 72 % dos povoamentos (unicamente sobreiros mais povoamentos mistos) e que representam cerca de 21 % da área florestal do país. Os restantes povoamentos florestais são mistos com azinheira, pinheiro bravo, pinheiro manso ou outras árvores folhosas e resinosas, em que o sobreiro é a espécie dominante ou a dominada (Figura 2; Direcção Geral de Florestas, 2001).

O sobreiro encontra-se em todo o território de Portugal Continental, excepto nas regiões montanhosas mais frias do norte e centro, excessivamente húmidas, nas regiões salinas, junto ao litoral e nas zonas de acentuada aridez e continentalidade, caso das regiões fronteiriças do centro e sul (Figura 3, Direcção Geral de Florestas, 2001; Correia e Oliveira, 2002).

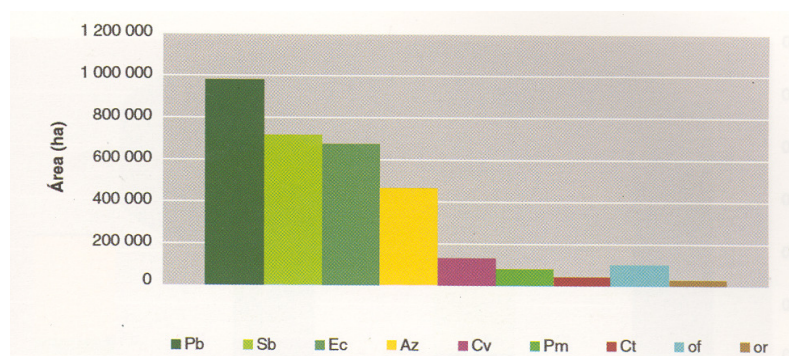


Figura 2. Áreas dos tipos de povoamento florestal em Portugal continental. Pb: pinheiro-bravo; Sb: sobreiro; Ec: eucaliptos; Az: azinheira; Cv: carvalhos; Pm: pinheiro-manso; Ct: castanheiro; of: outras folhosas; or: outras resinosas (Direcção Geral de Florestas, 2001).

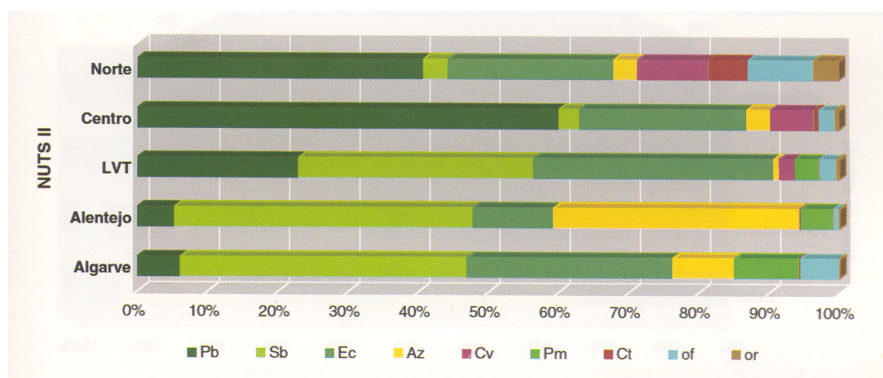


Figura 3. Distribuição percentual dos tipos de povoamento florestal, por NUTS II (*Nomenclatura das Unidades Territoriais para Fins Estatísticos*). Pb: pinheiro-bravo; Sb: sobreiro; Ec: eucaliptos; Az: azinheira; Cv: carvalhos; Pm: pinheiro-manso; Ct: castanheiro; of: outras folhosas; or: outras resinosas; LVT: Região Lisboa e Vale do Tejo (Direcção Geral de Florestas, 2001).

Quanto ao estado de vitalidade dos povoamentos de sobreiro, avaliado pela Direcção Geral das Florestas em 1997/1998, foi verificado que 56 % dos povoamentos apresentavam danos ligeiros, 6 % mostravam indícios de erosão e 1,5 % eram árvores mortas em pé (Direcção Geral de Florestas, 2001).

Q. suber é uma espécie de vida longa que, quando não é descortificada, pode atingir 300 anos ou mais. A idade, normalmente, não ultrapassa os 120-150 anos de idade quando se realiza a tiragem da cortiça, começando a produção de cortiça a decair por volta dos 100 anos (Correia e Oliveira, 2002). O tronco é pouco elevado, com 10 a 20 metros e pode adquirir uma grossura até dois metros de diâmetro. A periderme é constituída por uma assentada geradora (felogénio, câmbio cortical ou assentada

geradora súbero-felodérmica) e pelos tecidos a que esta dá origem: a cortiça, tecido de protecção que substitui a epiderme e a feloderme, que constitui o prolongamento radial do córtice primário (Natividade, 1950). A copa inicia-se, nalguns casos, a 4 ou 5 metros, tem uma forma ampla, semiesférica e lobulada. A raiz central é apumada, pode penetrar mais de um metro quando o terreno o permite e tem várias raízes laterais que possibilitam grande expansão no sentido horizontal (Moro, 2002). Nas raízes grossas, quando não estão enterradas, o felogénio radicular produz cortiça análoga à do tronco (Natividade, 1950). As folhas são perenes, alternadas e coriáceas, com orla não recortada, dentes espaçados pouco aguçados, com 10-14 nervuras secundárias, comprimento até 6 cm e largura de 1,5-3 cm, são verdes e velosas na página superior, revestidas de denso tomento na página inferior, com pecíolo veloso de 1 cm de comprimento (Moro, 2002). As folhas persistem em geral dois anos, às vezes três, nos terrenos mais frescos. Excepcionalmente, a árvore pode ficar desprovida de toda ou da maior parte da folhagem. O sobreiro floresce de Abril a Junho, mas nalgumas árvores este período pode prolongar-se devido à descontinuidade do crescimento dos ramos durante o ciclo vegetativo anual. As flores masculinas são carminadas, possuem 5-6 anteras e dispõem-se em longos amentilhos delgados, pendentes na axila das folhas e provêm de gomos da extremidade do lançamento do ano anterior ou de gomos da base do ramo do próprio ano. As flores femininas estão dispostas em curtas espigas de 2-5 flores e encontram-se na axila das folhas da parte média ou na extremidade do lançamento anual (Natividade, 1950; Varela e Valdivieso, 1996). As glandes têm, tal como as folhas, tamanho e formas variáveis e estão protegidas, em parte, por uma cúpula granulosa ou escamosa, suspensa por um pedúnculo. O sobreiro começa a frutificar por volta dos 15- 20 anos de idade e a frutificação é alternada. O ciclo reprodutivo não é fixo e existem biótipos em que a maturação dos frutos é anual, biótipos em que é bienal e biótipos que possuem as duas formas (Bellarosa, 2002). A existência de mais do que uma estratégia reprodutiva na mesma espécie foi confirmada por Elena-Rossello *et al.* (1993), ao observarem a variabilidade fenológica intra-populacional e inter-populacional de três populações naturais de *Q. suber*, durante um período de três anos. Verificaram que o dispêndio de energia, na produção de estruturas reprodutivas masculinas e femininas e em funções vegetativas, varia de indivíduo para indivíduo dentro de uma mesma população, o que permitiu separar as árvores em quatro grupos: 1- árvores masculinas, que produzem poucas flores femininas e nunca produzem glandes; 2- árvores femininas, que produzem poucas flores masculinas ou em que o

amadurecimento destas flores não atinge a produção de grãos de pólen; 3- árvores vegetativas que não têm inflorescências masculinas nem femininas e que possuem uma biomassa em folhas superior às outras; 4- árvores que produzem os dois tipos de inflorescência e em que a produção de glandes é elevada. Nas populações examinadas, o tempo requerido para a maturação das glandes ou seja, desde a polinização até à queda do fruto maduro, varia de população para população. Numa das populações ocorre o ciclo curto, que corresponde à maturação anual das glandes, noutra ocorre o ciclo longo, com a maturação bienal dos frutos e na terceira ocorrem os dois ciclos. A plasticidade fisiológica observada pode resultar da adaptação desta espécie a condições climáticas variáveis e imprevisíveis que caracterizam o clima mediterrânico (Elena-Rossello *et al.* 1993). De um modo geral, e em virtude de ser muito prolongado o período de floração, as glandes não amadurecem todas ao mesmo tempo; o período de amadurecimento inicia-se em Setembro e vai até Janeiro (Moro, 2002). A produtividade média anual de glande de sobreiro nos povoamentos puros desta espécie, em Portugal, é de 343034 toneladas por ano ou 579 kg por hectare e por ano (Direcção Geral das Florestas, 2001). No momento da disseminação natural, a maior parte das glandes com proveniência na mesma população está no mesmo estado de maturação morfológica e fisiológica. O seu conteúdo em água varia entre 44 % e 47 % e a taxa de germinação é em regra superior a 92 %. O tempo de germinação das glandes é, no entanto, lento e explica-se pela existência de um estado de dormência embrionário que parece depender da árvore produtora. A diferença de atitude germinativa apresentada pelas glandes pode ser expressão da heterogeneidade genética que caracteriza o sobreiro (Merouani, *et al.*, 2001).

A temperatura média anual óptima para o sobreiro é de 15-19 °C, não suportando bem temperaturas inferiores a -5 °C. Os valores óptimos de precipitação situam-se entre 600 e 800 mm, não vegetando com precipitações inferiores a 400 mm. Resiste bem à seca estival, desde que a humidade relativa seja de, pelo menos, 50 %. Os bioclimas mediterrânicos em que vegeta são o semi-árido, nas variantes de invernos frescos ou temperados; o sub-húmido, nas variantes de invernos frios, frescos ou temperados; o húmido, nas variantes de invernos frios a quentes; o per-húmido, nas variantes de Invernos frescos a quentes (Sauvage, 1961, cit. por Correia e Oliveira, 2002). Vegeta em todo o tipo de solos, com excepção para os excessivamente argilosos ou dos que apresentam hidromorfismo acentuado, em altitudes de 500 a 600 m. Vegeta mal nos solos com fraca capacidade de retenção para água, caso das texturas arenosas. É nos

solos profundos de subsolo permeável que o sobreiro encontra as melhores condições de desenvolvimento. Não tolera os solos excessivamente calcários e os derivados de arenitos, em que os nutrientes se encontram predominantemente nos primeiros 10-15 cm, sendo praticamente vestigiais a maiores profundidades (Correia e Oliveira, 2002).

O sobreiro tem sido predominantemente explorado em montado ou em sobreiral. O montado é um sistema agro-silvo-pastoril com uma densidade de árvores por hectare que pode variar de 20 a 120 árvores e em que a produção de cortiça aparece associada à agricultura, silvo-pastorícia, cinegética e apicultura. O sobreiral caracteriza-se por densidades mais elevadas, que já não permitem a consociação com a agricultura, associando-se, geralmente, a produção de cortiça à cinegética, silvo-pastorícia e apicultura (Correia, 1993; Correia e Oliveira, 2002).

Os sistemas agro-silvo-pastoris ocupam, em área, o segundo lugar na floresta portuguesa e localizam-se, em Portugal, a sul do rio Tejo, nas regiões onde se juntam a influência climática mediterrânica e a continentalidade ibérica (Figura 4, Correia, 1993).

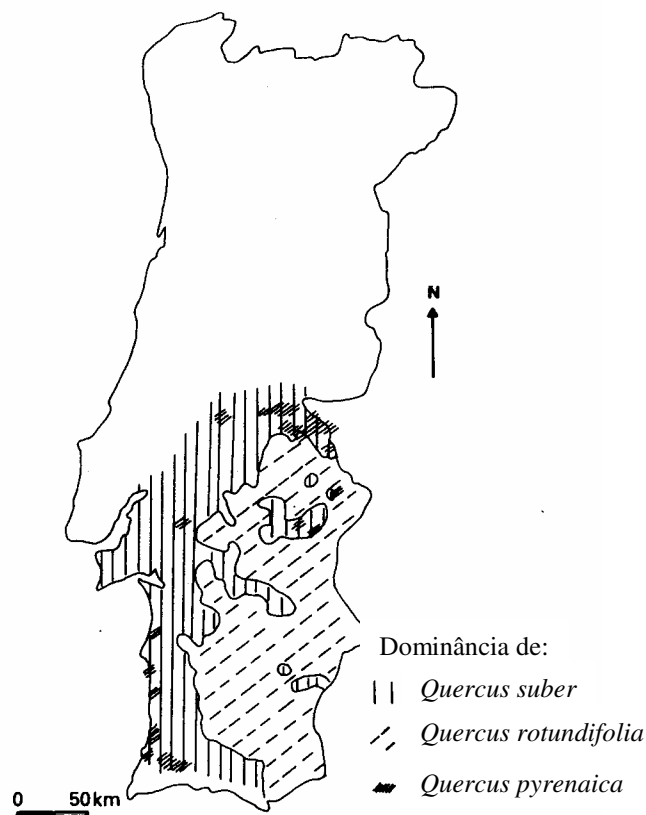


Figura 4. Distribuição de povoamentos de *Q. suber* e *Q. rotundifolia* em Portugal (Correia, 1993).

Nas zonas onde se verifica a influência atlântica, o domínio pertence ao sobreiro, na sua expressão de massas densas denominados sobreirais e à medida que se progride para o interior, os povoamentos tornam-se mais abertos e adquirem a forma de montados onde o sobreiro coexiste com a azinheira. Nas condições de maior secura a azinheira ocupa as regiões florestais, com diversos graus de coberto, sendo raros os sobreirais (Almeida, 2000).

O clima na região sul é tipicamente mediterrânico, com Verões secos e longos, com temperaturas que ascendem aos 30-40 °C e uma precipitação média de 500 a 600 mm, concentrada no período de Outubro a Março, distribuída de forma irregular e apresentando flutuações anuais significativas. Os solos desta região derivam do xisto ou granito, são pobres em matéria orgânica e têm pouca capacidade de retenção de água (Correia, 1993).

O funcionamento do montado pode ser ilustrado na forma de um sistema quase fechado, em que as actividades de agricultura e silvo-pastorícia estão presentes e se complementam (Figura 5, Correia, 1993).

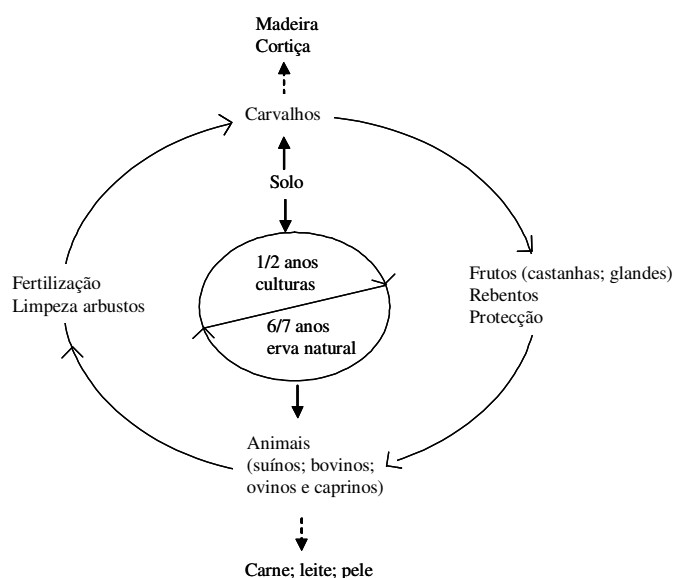


Figura 5. Esquema que ilustra o funcionamento do montado como um sistema quase fechado, em que as componentes agro-silvo-pastoris estão presentes e se complementam (Correia, 1993).

A manutenção do equilíbrio destes sistemas é feita pelo homem, que retira como rendimento a madeira, a cortiça, os frutos que fazem parte da dieta dos animais que pastam, a carne, o leite, a pele e a lã. Em cada 6 a 8 anos, dependendo do tipo de solo, os animais são transferidos de local e os solos são cultivados durante um ou dois anos,

com predomínio para culturas de trigo, centeio, aveia, ou cevada. O número de animais por hectare de pasto deve ser equilibrado, de forma a preservar um certo número de rebentos novos de carvalhos e manter a reflorestação natural. Por seu lado os carvalhos beneficiam com a fertilização proporcionada pelos animais e com a eliminação de vegetação competitiva.

Os montados são também o *habitat* ecológico de uma grande variedade de animais selvagens (perdiz, pombo bravo, coelho bravo, lebre, mangusto, javali, sapo, etc) incluindo algumas espécies raras como a cegonha negra e a cegonha branca (*Ciconia nigra*; *Ciconia ciconia*), as águias (*Hieraetus pennatus*; *Circaetus gallicus*), os milhafres (*Milvus migrans*; *Elanus caeruleus*), veados e cervos (*Dama dama*; *Cervus elaphus*), o lince ibérico (*Lynx pardina*) e a doninha (*Mustela nivalis*) (Palma *et al.*, 1985, cit. por Correia, 1993). Apesar das grandes vantagens deste sistema e da sua adaptação às regiões a sul do Tejo, o montado tem-se deteriorado nos últimos anos. O cultivo das terras tem-se tornado menos importante no sistema rotativo e em substituição, tem sido dado relevo à produção animal, com o uso dos solos apenas para a prática da pastorícia. A extracção da cortiça é quase sempre a primeira prioridade. Nalguns casos, os montados transformaram-se em terrenos de caça ou são usados para turismo rural (Correia e Mascarenhas, 1999). Os montados ficam predispostos a sofrer erosão se o número de animais for excessivo ou se as plantações foram muito frequentes (Shakesby *et al.*, 2002). O abandono que se verifica nalguns montados e que causa o desenvolvimento de matas de arbustos, tem uma influência negativa na vitalidade das árvores porque a vegetação compete com os sobreiros e azinheiras pela água e pelos nutrientes. Os riscos de incêndio também aumentam (Correia e Mascarenhas, 1999).

A principal produção do sobreiro é a cortiça que é retirada do tronco e consiste num material biológico natural e renovável, com características únicas e que até ao momento não foi substituído por produtos sintéticos. A produção mundial de cortiça é de cerca de 380 000 toneladas por ano, sendo 51 % dessa produção de origem portuguesa (Ferreira *et al.*, 2000). A produtividade média anual de cortiça de reprodução nos povoamentos puros de sobreiro é igual a 100 741 toneladas por ano ou seja, 170 kg por hectare e por ano (Direcção Geral das Florestas, 2001). O Alentejo constitui a região suberícola mais importante do país, com uma produção de cortiça no valor de 115 milhões de euros, sendo a cortiça o produto mais importante do sector primário da região. A principal aplicação da cortiça é como vedante, sendo também utilizada na construção civil, na indústria do calçado, do frio, naval, dos transportes, de

máquinas, têxtil, química e farmacêutica, pesqueira, artesanato, de embalagens, material escolar e aeronáutica espacial. Em 1998, a rolha de cortiça natural representou 59 % do valor exportado de cortiça, correspondendo estas exportações a 700 milhões de euros e cerca de 32 % do valor total das exportações florestais (Lopes e Ribeiro, 2000).

O ciclo de produção da cortiça compreende, normalmente, 9 a 10 anos de crescimento entre dois descortiçamentos, de modo a assegurar a espessura necessária para a produção de rolhas de calibre 27-32 mm e de 32-40 mm. A qualidade da cortiça é determinante para a sua utilização como rolha e para a valorização do produto, porque o rendimento e sobretudo, o perfil de qualidade da rolha, dependem da qualidade da prancha de cortiça utilizada (Ferreira *et al.*, 2000). Durante a vida da árvore, sujeita a descortiçamentos sucessivos, a produção de cortiça aumenta no início, estabiliza e depois decresce, naturalmente, com a idade. A primeira cortiça retirada chama-se cortiça virgem, a segunda segundeira e a partir da terceira tiragem denomina-se amadia. O decréscimo no calibre começa por volta da 5^a tiragem de cortiça amadia (cerca dos 70 anos de idade da árvore) e acentua-se muito depois da 12^a tiragem (cerca dos 120 anos de idade) (Natividade, 1950). As pranchas de cortiça são caracterizadas comercialmente em 6 classes de qualidade, por observação visual e são referidas como: 1^a-3^a boa qualidade; 4^a-5^a qualidade média; 6^a qualidade má (refugo). A qualidade da cortiça é estabelecida, principalmente, de acordo com a porosidade que resulta da presença de canais lenticulares que atravessam as pranchas. Ferreira *et al.* (2000) caracterizaram a cortiça produzida em 5 montados da região de Alcácer de Sal e verificaram que, em média, a espessura das pranchas é de 33,8 mm, pertencendo 75 % da cortiça analisada às classes comerciais superiores a 27 mm, estando aptas para a produção de rolhas. Foi observada uma grande variabilidade nos parâmetros da espessura total, densidade e produtividade, apresentando coeficientes de variação médios superiores a 20 % entre indivíduos de uma mesma população. A variação entre montados não é estatisticamente significativa. Em todos os montados existem árvores produtoras de cortiça de boa qualidade e árvores produtoras de cortiça de má qualidade. As características dos poros observados por análise de imagem são semelhantes em todas as amostras, com poros 4 vezes mais longos do que largos, com um contorno geralmente irregular e uma forma elipsoidal. Foi observada uma grande variabilidade entre amostras de cortiça colhidas no mesmo montado e entre montados diferentes, quer ao nível da porosidade total quer ao nível da porosidade correspondente às classes de dimensões dos poros (Ferreira *et al.* 2000).

Dada a grande importância económica da cortiça, tem-se tentado encontrar aspectos fisiológicos e morfológicos do sobreiro associados à produção de cortiça de boa qualidade. Courtois e Masson (1999) determinaram a composição mineral das folhas de sobreiro e da cortiça, com o objectivo de encontrarem uma relação entre o conteúdo de um ou mais elementos minerais e a qualidade da cortiça. Verificaram que o conteúdo em potássio da cortiça está associado à sua qualidade, mas que a qualidade da cortiça parece ser independente da composição mineral das folhas, que é considerada como um indicador da nutrição mineral do sobreiro.

O meio ambiente tem influência no crescimento da cortiça ao longo dos anos. A precipitação influencia de forma positiva o crescimento e a falta de água é um factor limitante. As chuvas durante o mês de Novembro e Dezembro têm uma influência positiva no crescimento da cortiça, no ano seguinte. A temperatura exerce, normalmente, um efeito negativo no crescimento da cortiça. No entanto, temperaturas moderadamente baixas contribuem para um aumento do crescimento da cortiça, excepto nos meses de Janeiro e Fevereiro e no início da actividade do felogénio (Abril a Maio). Durante os meses de Abril e Maio, o crescimento da cortiça é estimulado por um aumento da temperatura, mas no final da Primavera, quando a temperatura começa a subir e atinge valores elevados no Verão, ocorre um abrandamento do crescimento até ao início do Outono (Caritat *et al.*, 2000).

I.1.2.2. Aspectos celulares e moleculares da formação da cortiça.

Durante o crescimento e desenvolvimento do sobreiro, os ramos e as raízes engrossam, por acção do câmbio, rompe-se a epiderme e forma-se um tecido protector secundário pluriestratificado, denominado súber ou tecido suberoso (felema). O novo revestimento dos ramos passa a denominar-se periderme e é constituído pelo felogénio, pelo tecido suberoso a que o felogénio dá origem e pela feloderme, que constitui o prolongamento radial do córtice primário (Strasburger, 1994; Natividade, 1950). No tronco, nas raízes e nos ramos mais grossos, o desprendimento das camadas suberosas e a regeneração do felogénio resulta na formação da cortiça, um tecido protector terciário formado por células mortas repletas de gases (Strasburger, 1994). Na cortiça, cada parede que separa duas células contíguas apresenta cinco folhetos: dois de natureza celulósica, dois folhetos suberificados e um folheto médio lenhificado (Natividade,

1950). O tecido suberoso é impermeável, muito leve, elástico e isola a árvore do calor intenso e da radiação solar. A cor escura tem a sua origem na deposição de corantes (taninos) que evitam a penetração de parasitas (insectos e fungos) (Strasburger, 1994).

A suberização ocorre em tecidos específicos e é um processo que resulta, em simultâneo, da acumulação de polímeros poli-fenólicos nas paredes celulares, com formação de uma matriz poli-fenólica e da deposição de polímeros poli-alifáticos na região entre a membrana plasmática e a parede celular das células, com formação de uma matriz poli-alifática (Kolattukudy, 1984; Bernards, 2002). A suberina constitui o principal componente da cortiça, abrangendo cerca de 40 % Wt/Wt do peso seco das células. Os restantes componentes da cortiça incluem lignina (20 %), hidratos de carbono (20 %), ceras e outras substâncias orgânicas (15 %) (Rocha *et al.*, 2001).

Recentemente, o conceito de suberina foi reformulado. No novo modelo, a suberina é observada como uma macromolécula que inclui dois domínios, um poli-fenólico e outro poli-alifático. O domínio poli-fenólico da suberina possui uma quantidade significativa de precursores não associados à lignificação, principalmente ácidos hidrocínâmicos e derivados destes ácidos, ligados covalentemente entre si e fixados na parede celular primária. O domínio poli-alifático é descrito como uma rede linear tridimensional de poli-ésteres ligados por pontes de glicerol. Este domínio está ligado covalentemente ao domínio poli-fenólico da suberina, na superfície da parede celular, através do glicerol (Razem *and* Bernards, 2002).

Em 2000, Bernards *et al.* verificaram, experimentalmente, que a actividade das enzimas PAL (fenilalanina amónia liase), 4-CL (4-coumaril-CoA ligase) e CAD (cinamil álcool desidrogenase) aumentava após o início da suberização em tecidos de tubérculos de batata. Estas enzimas integram as vias metabólicas da produção de precursores que compõem os domínios poli-alifático e poli-aromático da suberina. Existem evidências de que a polimerização dos precursores fenólicos que compõem o domínio poli-fenólico da suberina ocorre na presença de peróxido de hidrogénio, o que sugere a existência de peroxidases implicadas no processo. No modelo proposto por Bernards e Razem (2001), as substâncias fenólicas sintetizadas no citoplasma são transportadas até à matriz de hidratos de carbono da parede celular, na qual podem actuar como estimuladores duma oxidase dependente de NAD(P)H, localizada na membrana plasmática. A função da oxidase será a de produzir radicais livres de oxigénio, na face exoplasmática da membrana, onde decorrerá uma reacção de desproporção, com produção de peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio

produzido seria usado por uma peroxidase associada à parede celular e que catalisaria a ligação entre as substâncias fenólicas que integram a matriz do domínio poli-fenólico da suberina.

I.1.2.3. A doença do declínio.

I.1.2.3.1. *Aspectos gerais da doença do declínio em Quercus.*

Em 1992, Brasier relata que carvalhos das espécies *Q. suber* e *Q. ilex* estão a morrer subitamente ou sofrem de declínio em Portugal e Espanha. A descrição baseia-se nos resultados da investigação realizada pela equipa da Universidade do Algarve, liderada por Ferraz que tinha vindo a observar a existência de árvores que apresentavam exsudações no tronco, desfoliação da copa, presença de rebentos epicórmios e que morriam subitamente, numa ou duas estações. Como os sintomas apresentados pelas árvores indicavam um mau funcionamento ao nível do sistema radicular, suspeitou-se do envolvimento na doença, de agentes patogénicos presentes no solo. Com base nesta hipótese, foram observadas as raízes dos sobreiros de locais de acentuado declínio, verificando-se que apresentavam necroses e que estavam desprovidas das raízes mais finas. O possível envolvimento, no declínio do sobreiro, de um fungo patogénico, veio a confirmar-se com o isolamento de *Phytophthora cinnamomi* a partir das raízes de sobreiro e do solo dos locais de declínio. *P. cinnamomi* é um fungo exótico extremamente agressivo, indígeno da região de Celebes, na Nova-Guiné e é parasita de mais de 900 espécies de plantas lenhosas (Brasier, 1992; Brasier *et al.*, 1993).

Nos últimos 10 anos foi feita uma caracterização mais detalhada da doença do declínio de *Q. suber* e *Q. rotundifolia*. Os trabalhos desenvolveram-se no sentido de provar que *P. cinnamomi* é um agente patogénico do sobreiro e da azinheira, capaz de colonizar os tecidos e também, no sentido de saber quais as condições de *stress* edafo-climáticas que contribuem para que *P. cinnamomi* seja considerado o factor principal da causa de morte do sobreiro e da azinheira, no nosso país.

Segundo Marcelino (2001), a doença do declínio manifesta-se, de um modo geral, nos povoamentos de sobreiro e azinheira, atinge indivíduos de todas as idades e é um fenómeno que pode ocorrer em árvores isoladas, em grupos de duas e três árvores ou em grandes extensões. O declínio pode ser lento, denunciado por uma redução do

crescimento da árvore, aparecimento de exsudações no tronco, clorose das folhas seguida de queda gradual e presença de ramos, parcial ou totalmente, desfolhados. Na denominada “morte súbita das árvores”, a árvore seca normalmente a seguir ao Verão e as folhas de cor castanha permanecem durante algum tempo presas aos ramos secos. *P. cinnamomi* foi isolado, com sucesso, em várias regiões do país, a partir de amostras de raízes finas de sobreiros e azinheiras, bem como de amostras de solos associados. No Algarve, o fungo foi isolado em 79 % dos locais analisados e foi encontrada uma relação entre o grau de desfoliação apresentado pelas árvores e a presença do fungo. Ao estudar a relação entre *P. cinnamomi* e a exposição das árvores, a autora refere que “Apesar de se observarem árvores doentes localizadas em todas as orientações, os resultados evidenciaram que os locais expostos a Sul, apareciam mais infestados e com maior número de árvores infectadas comparativamente com os locais expostos a Norte” (Marcelino, 2001).

Em Espanha, o declínio de *Q. ilex* foi avaliado na região de Huelva, nos locais de El Cuco, La Pizarra e Los Manantiales. Nesta região, o declínio está distribuído na forma de foco de doença que pode atingir até 10 hectares, verificando-se que, em cada foco, os sintomas de declínio apresentados pelas árvores diminuem do centro para a periferia (Sánchez *et al.*, 2002). Os sintomas de enfraquecimento geral que caracterizam o declínio, a queda das folhas ou a “morte súbita” das árvores, mostram-se relacionados com a presença de necroses nas raízes das árvores doentes e com os isolamentos de *P. cinnamomi* obtidos a partir de raízes com necrose (Sánchez *et al.*, 2002).

A doença do declínio do sobreiro e da azinheira enquadra-se no panorama descrito para muitas florestas da Europa e doutras partes do mundo, em que se observa um enfraquecimento das plantas lenhosas persistentes. Este enfraquecimento designa uma doença complexa, causada por mais de um agente simples biótico ou abiótico, actuando simultaneamente ou em diferentes ocasiões. Devido à multiplicidade de factores em questão, as linhas de investigação desenvolvidas para caracterizar a doença têm sido dirigidas no sentido de explorar a importância a atribuir a factores relacionados com o meio ambiente e à presença de agentes patogénicos.

Em 1996, Jung *et al.* fizeram um rastreio das espécies de *Phytophthora* presentes em raízes de árvores doentes de *Q. robur* e *Q. petraea*, no solo envolvente, em tecidos com cancro e em cursos de água localizados nas regiões em declínio do Centro e Sul da Europa. O declínio destes carvalhos caracteriza-se pela diminuição da copa, perda de vitalidade e morte das gemas e dos ramos da parte superior da copa, presença de grupos

de folhas na forma de tufos na extremidade dos ramos, amarelecimento ou descoloração das folhas, redução do tamanho das folhas, existência de ramos epicórmios, exsudações no tronco, presença de necroses no cortéx e no câmbio e redução no diâmetro de crescimento. Na pesquisa das espécies de *Phytophthora* foram identificadas, no solo e em raízes finas que apresentavam necroses, oito espécies de *Phytophthora* que não incluíam *P. cinnamomi*. Após a realização de testes de patogenicidade com os isolamentos obtidos em plântulas, os autores verificaram que a maior parte deles provocava a morte das extremidades das raízes e o aparecimento de necroses no córtex das raízes. As inoculações nos ramos resultaram em lesões necróticas na região cortical e as lesões radiculares provocaram a obstrução dos vasos do xilema, reduzindo a capacidade de condução de água e nutrientes. Os problemas que levam ao mau funcionamento das raízes foram apontados como factores responsáveis pelos sintomas que se observam na parte superior das árvores e, portanto, indicadores do envolvimento das espécies de *Phytophthora* como principais responsáveis (Jung *et al.*, 1996).

Não obstante a relação encontrada entre *Phytophthora spp.* e o declínio destes carvalhos, manteve-se a questão de saber que factores do meio ambiente contribuem para este processo ou, por outras palavras, que alterações ambientais se processaram na Europa que levaram ao desequilíbrio da relação hospedeiro-parasita, mantida entre os carvalhos e os fungos *Phytophthora spp.*, que são habitantes naturais e largamente disseminados nos solos Europeus.

Recentemente, Thomas *et al.* (2002) investigaram a acção de vários factores abióticos (poluição do ar, eutroficação por azoto, *stress* químico dos solos, condições climáticas extremas, condições edáficas) e bióticos (desfoliação por insectos, infecção por fungos patogénicos e microorganismos) no declínio de *Q. robur* e *Q. petraea* na Europa Central. Em termos gerais, estes autores consideram que as causas do declínio devem ser atribuídas mais a factores abióticos do que bióticos. A desfoliação provocada pelos insectos em dois anos consecutivos, combinada com invernos com muito gelo e verões muito secos, são apontados como sendo os principais factores a contribuir para a doença do declínio nos dois carvalhos estudados. Os tipos de solos foram considerados factores adicionais de *stress*, principalmente os argilosos, onde não existe uma distribuição contínua da humidade e que apresentam tendência para alagamento. O excesso de azoto que, em situação de falta de água resulta numa diminuição de fenóis e seus derivados nas folhas, tornando as árvores mais susceptíveis à desfoliação provocada por insectos, foi considerado como outro factor de *stress*. De entre o

complexo número de factores que contribuem para o declínio estão excluídos os gases poluentes (SO_2 , O_3 , NO_2) existentes na atmosfera. Quanto aos factores bióticos, Thomas *et al.* observaram que a infecção das raízes finas por *Phytophthora spp.*, em particular *P. quercina*, pode enfraquecer as árvores em locais ricos em CaCl_2 , com $\text{pH} > 3,4$ e que em combinação com condições locais que favorecem o encharcamento, condições climáticas extremas (gelo; seca) ou desfoliação provocada por insectos, também contribuem para o declínio.

Alguns autores defendem que existem dois tipos de doenças complexas em carvalhos, apelidadas de “declínio dos carvalhos” e a diferença entre elas reside nas condições edáficas dos locais. Nos locais em que os solos são ricos em CaCl_2 , têm um $\text{pH} > 3,5$ e uma textura areno-argilosa ou só argilosa, é comum o isolamento de espécies de *Phytophthora* da rizosfera dos solos. Nesta situação, a transparência da copa das árvores está correlacionada com a diminuição dos valores de vários parâmetros medidos nas raízes (comprimento da raiz principal, comprimento das raízes finas, densidade da extremidade das raízes) e portanto, a presença de *Phytophthora spp.* representa um factor que contribui para a doença do declínio. No entanto, nos solos arenosos ou areno-argilosos com $\text{pH} \leq 3,9$ não foram isoladas espécies de *Phytophthora* e nesta situação os factores abióticos são os que mais contribuem para o declínio dos carvalhos (Jung *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2002).

As espécies de *Phytophthora* isoladas com mais frequência em regiões com carvalhos doentes no Centro (Alemanha, Suíça, Hungria) e Sul da Europa (França, Itália), foram *P. quercina*, *P. cambivora*, *P. citricola* e *P. gonapodyides* (Jung *et al.*, 1996; Hansen e Delatour, 1999; Jung *et al.*, 2000). Em 2002, registaram-se mais isolamentos de *P. cambivora*, *P. cinnamomi* e *P. cactorum* no Centro e Sul da Itália e de *P. quercina* no Norte e Centro deste país, obtidos a partir de amostras de solo retirado da base de carvalhos de cinco espécies diferentes, em locais de declínio (Vettraino *et al.*, 2002). No Norte e Centro da Europa e no Norte da Itália, *P. quercina* é apontada como a espécie que aparece com mais frequência associada a carvalhos com sintomas de declínio (Vettraino *et al.*, 2002, Jung *et al.*, 2000).

P. cinnamomi aparece relacionado com o declínio que afecta três espécies de *Quercus* no México. Os sintomas do declínio de *Q. glaucoides*, *Q. peduncularis* e *Q. salicifolia* são semelhantes aos que foram descritos para as outras espécies de *Quercus*, com a diferença relativa do tempo que medeia entre o aparecimento dos sintomas na parte exterior da árvore e a morte, que varia de espécie para espécie. *Q. glaucoides*,

após o aparecimento dos primeiros sintomas nas folhas, começa a enfraquecer e no espaço de semanas a alguns meses, morre, enquanto que *Q. salicifolia* entra em declínio e pode permanecer assim durante muitos meses ou até anos, antes de morrer. A outra espécie de *Quercus* tem um comportamento intermédio. Algumas árvores afectadas apresentam cancos que se caracterizam por regiões do floema de cor vermelha escura, delimitada por uma zona negra (Tainter, 2000). Um dos aspectos interessantes deste trabalho foi a observação de que o declínio tinha tido origem num local específico, tinha alastrado na forma de mancha e que a expansão dessa mancha tinha sido travada pela mudança no tipo de solo e vegetação. Os cancos descritos por Tainter são semelhantes aos produzidos por *P. cinnamomi* na “doença da tinta”. Esta doença afecta *Quercus rubra* L., uma das principais plantas ornamentais em França. O fungo, para além de provocar o aparecimento de cancos no tronco, também infecta as raízes e provoca grandes danos quando coloniza os tecidos corticais do tronco, principalmente o floema secundário e o câmbio (Robin *et al.*, 1994).

I.1.2.3.2. Aspectos da patogenicidade de *P. cinnamomi*.

O fungo do solo, *P. cinnamomi*, aparece em Portugal e Espanha invariavelmente associado aos locais de declínio e tem sido isolado com frequência a partir de raízes de sobreiros e azinheiras. A comprovação de que os sobreiros e as azinheiras são hospedeiros de *P. cinnamomi* e a reprodução da doença, em condições controladas, têm sido estudados em vários trabalhos de investigação.

Em testes de patogenicidade realizados com *P. cinnamomi* em raízes de sobreiros e de azinheiras de plantas jovens, provenientes da germinação de sementes, Marcelino (2001) observou que passadas 24 h de contacto entre o fungo e a planta se observam necroses e que a extensão da lesão aumenta com o tempo de contacto, sendo a progressão mais rápida na azinheira do que no sobreiro. Ao observar a invasão dos tecidos em cortes histológicos realizados com as raízes infectadas, a autora verificou que ao fim de 24 horas, era possível observar hifas no parênquima cortical e no floema e passados 3 dias de infecção, o fungo, para além de se encontrar no floema, também tinha invadido o xilema e o cilindro central, sendo evidente a colonização intercelular. Na indução da infecção em solos artificialmente infestados e saturados com água verifica-se uma grande diferença na susceptibilidade a *P. cinnamomi* por parte de

sobreiros e azinheiras com 6 meses de idade. Nos sobreiros, as lesões desenvolvem-se nas raízes finas e o fungo penetra na periderme e progride até ao floema secundário, enquanto nas azinheiras as lesões estão presentes em todas as raízes, independentemente da espessura e o fungo observa-se na epiderme, na exoderme, no parênquima cortical e no cilindro central (Marcelino, 2001).

A diferença na susceptibilidade a *P. cinnamomi* por parte dos sobreiros e das duas espécies de azinheiras (*Q. rotundifolia*; *Q. ilex*; Lebreton *et al.*, 2001) tem sido descrita por outros autores. Sánchez *et al.* (2002) infestaram o solo de plantas de sobreiro e azinheira (*Q. ilex*), de 12 e 18 meses de idade, com *P. cinnamomi* e submeterem as plantas a três regimes de rega diferentes: encharcamento, rega normal e saturação temporária. Após 4 semanas, as plantas destas duas espécies sujeitas a encharcamento, apresentavam grandes necroses nas raízes e sintomas de doença na parte aérea. Em *Q. ilex* havia grandes diferenças na severidade dos sintomas ao nível das raízes e da parte aérea entre as plantas inoculadas e os controlos, enquanto que em *Q. suber*, as diferenças só eram significativas ao nível das raízes. Segundo estes autores, o encharcamento favoreceu a infecção e a expressão dos sintomas na parte aérea das plantas de ambas as espécies, com mais incidência em *Q. ilex*. Em ensaios semelhantes realizados com plantas de 1 e 2 anos de idade das espécies *Q. ilex*, *Q. suber* e *Q. rubra*, observou-se que *Q. ilex* era a espécie mais susceptível ao fungo e que *Q. rubra* era a menos susceptível das três (Robin *et al.* 2001). As infecções nas raízes destes carvalhos causadas por *P. cinnamomi*, foram mais severas em situações de excesso de água do que em situações de privação de água (Robin *et al.* 2001)

Luke *et al.* (2000) mostraram que *P. cinnamomi*, para além de ser capaz de invadir os tecidos das raízes, também é capaz de colonizar os tecidos dos ramos. Estes autores testaram a patogenicidade de 34 espécies de fungos isolados de *Q. suber* incluindo *P. cinnamomi*, em sobreiros com um ano de idade. As inoculações com *P. cinnamomi* realizaram-se ao nível dos ramos de plantas submetidas a *stress* hídrico (por falta de água) e com rega normal. Observou-se que, ao nível do tronco e no sistema de rega normal, *P. cinnamomi*, para além de outras espécies de fungos, causava a morte das plantas inoculadas e induzia a formação de cancrios e de necroses vasculares mas, em situação de carência de água, a acção do fungo era limitada.

Parece evidente que os sintomas que se visualizam na parte aérea das plantas infectadas têm origem num mau funcionamento da raiz. Os efeitos causados nas raízes de *Q. ilex* por *P. cinnamomi* reflectem-se, nas plantas infectadas, por uma redução da

biomassa na parte aérea, redução da biomassa radicular, decréscimo do potencial hídrico nas folhas [*predawn leaf water potencial*, Ψ_{wp} (Mpa)], redução na condutância ao nível dos estomas, decréscimo na composição em carbono isotópico e diminuição dos conteúdos de azoto e fósforo nas folhas (Maurel *et al.*, 2001; Marcelino, 2001; Luque *et al.*, 1999).

Os organismos patogénicos das plantas fazem parte dos ecossistemas florestais de todo o mundo podendo alterar, de forma subtil ou profunda, a diversidade, a estrutura e a função desses ecossistemas. Alguns afectam a esperança de vida das árvores e o sucesso reprodutivo e outros a composição das espécies e a sua produtividade (Hansen, 1999). A manutenção dos ecossistemas florestais de sobreiros e azinheiras em Portugal vai depender, em parte, da viabilidade da germinação natural das sementes e da sobrevivência das plantas jovens usadas nos programas de reflorestação. De acordo com os resultados obtidos em vários trabalhos, o futuro não é muito promissor. Em ensaios realizados com sementes germinadas de *Q. ilex* e *Q. suber* colocadas em solos naturalmente infestados com *P. cinnamomi*, verificou-se que nenhuma das plântulas de *Q. ilex* sobrevivera. Em *Q. suber*, a sobrevivência das plântulas varia com a origem das sementes, com o tipo de solo e com a interacção entre estes dois factores, mantendo-se um índice de mortalidade elevado. O decréscimo na mortalidade das sementes em solos esterilizados, relativamente a solos infestados, também depende do tipo de solo (Rodríguez-Molina *et al.* 2002). Num ensaio realizado em solos artificialmente infestados observou-se que havia um atraso no início da germinação das sementes e que grande parte das sementes só emitia raízes (Marcelino, 2001).

Os resultados obtidos em laboratório são confirmados com dados provenientes de programas de reflorestação. Durante a década de 90, a região do Algarve recebeu apoios financeiros da União Europeia para aplicação de vários programas de arborização da região. Em 1999, a Direcção Geral das Florestas fez a apreciação dos resultados físicos que resultaram da aplicação desses programas. Nas conclusões do relatório vem referido que: “Confirmam-se as características pioneiras das resinosas pinheiro bravo e pinheiro manso, às quais estão associadas grandes sobrevivências. O sobreiro e a azinheira, espécies do género *Quercus*, mais evoluídas, têm um comportamento oposto, associando-se às classes de sobrevivência mais baixas. Conclui-se, portanto, que a utilização destas em povoamentos iniciais deverá ser criteriosamente ponderada e se se optar pelo seu uso, as acções de arborização terão que estar associadas

a importantes investimentos no acompanhamento dos povoamentos, com o objectivo final de que os mesmos sejam bem sucedidos” (Louro, 1999).

I.2. OBJECTIVOS.

A semelhança genómica entre as várias espécies de *Quercus* determina a ausência de barreiras reprodutivas e possibilita fenómenos de hibridação. Em Portugal, as espécies *Q. suber* e *Q. rotundifolia* formam populações mistas em muitas regiões e, naquelas em que as duas espécies não co-habitam, a distância não deve ser suficientemente grande para impedir fenómenos de hibridação por polinização ou migração de sementes. O estudo da diversidade genética de *Q. suber*, por utilização de marcadores moleculares, deve auxiliar a diferenciar os sobreiros de acordo com o seu genótipo e explorar a relação genética existente entre eles. Os perfis genéticos dos indivíduos podem estar correlacionados com a expressão de fenótipos associados com a resistência/tolerância à doença do declínio ou com a qualidade da cortiça produzida. A comparação dos perfis moleculares dos sobreiros com os das azinheiras deve permitir a identificação de regiões do genoma comuns às duas espécies.

O método AFLP desenvolvido por Zabeau e Vos (1993), permite analisar muitas regiões diferentes do genoma ao mesmo tempo em vários indivíduos. A avaliação quantitativa das semelhanças ou dissemelhanças entre os indivíduos nessas regiões é determinada pelo método de análise de dados/taxonomia numérica. Os polimorfismos associados aos fragmentos de DNA podem ser relacionados com factores de produção, resistência a doenças ou outras características com interesse.

Assim, foram objectivos do presente trabalho de análise do genoma de *Q. suber* por AFLP e Taxonomia Numérica, estudar a sua biodiversidade contribuindo para um conhecimento mais alargado do genoma desta espécie e, em particular, identificar marcadores moleculares úteis para definir padrões relacionados, nomeadamente, com a caracterização da espécie, com a adaptação a factores abióticos, com a qualidade da cortiça e com a tolerância à doença do declínio.

I.3. MATERIAL E MÉTODOS.

I.3.1. *Material vegetal.*

Para analisar a variabilidade genética em *Q. suber*, por aplicação das técnicas de AFLP¹ (Zabeau e Vos, 1993) e Taxonomia Numérica (Sneath e Sokal, 1973; Cabral *et al.*, 1977), foram colhidas folhas muito jovens de 313 sobreiros. As árvores estudadas estão distribuídas por três regiões de Portugal Continental: Trás-os Montes, Alentejo e Algarve, localizadas nas manchas relativas a povoamentos de sobro e azinho referidas no mapa geográfico (Figura 6). Os lugares de recolha das amostras foram, em Trás-os-Montes, Maçores, Morais, Sta Combinha, Adeganha, Cardanha, Romeu e Benlhevai; no Alentejo: Montargil, Grândola e Almodôvar; no Algarve: S. Brás de Alportel, Barranco do Velho, Javali, Parises, Cachopo, Algoz, S. Bartolomeu de Messines, S. Marcos da Serra, Monchique, Barragem da Bravura e Porto de Lagos.

Na literatura científica é frequentemente referida a possibilidade de ocorrer hibridação entre *Q. suber* e *Q. rotundifolia* quando estas duas espécies povoam simultaneamente um mesmo local (Elena-Rossello, 1992). Por este motivo, foram incluídas no estudo de biodiversidade 52 azinheiras (*Q. rotundifolia*) localizadas nas mesmas manchas de montado dos sobreiros estudados.

As 365 árvores pertencentes às espécies *Q. suber* e *Q. rotundifolia* que foram analisadas são apresentadas em forma de lista na Tabela 2. O código atribuído a cada uma das árvores é composto pela letra correspondente à região (A-Algarve, B-Alentejo, C-Trás-os-Montes), pelo número atribuído à árvore precedido por um S de sobreiro ou por um A de Azinheira e pela identificação da localização geográfica (Algarve: A-Algoz, C-Cachopo, BV-Barranco do Velho, J-Javali, M-Monchique, P-Parises, PB-Pincho/Barragem da Bravura, PL-Porto de Lagos, SBA-S. Brás de Alportel, SMS-S. Marcos da Serra; Alentejo: A-Almodôvar, HA-Herdade do Azinhal/Grândola, HL-Herdade dos Leitões/Montargil; Trás-os-Montes: A-Adeganha, B-Benlhevai, C-Cardanha, Mc-Maçores, M-Morais, R-Sta Combinha/Romeu.

¹ *Amplified Fragment Length Polymorphism.*

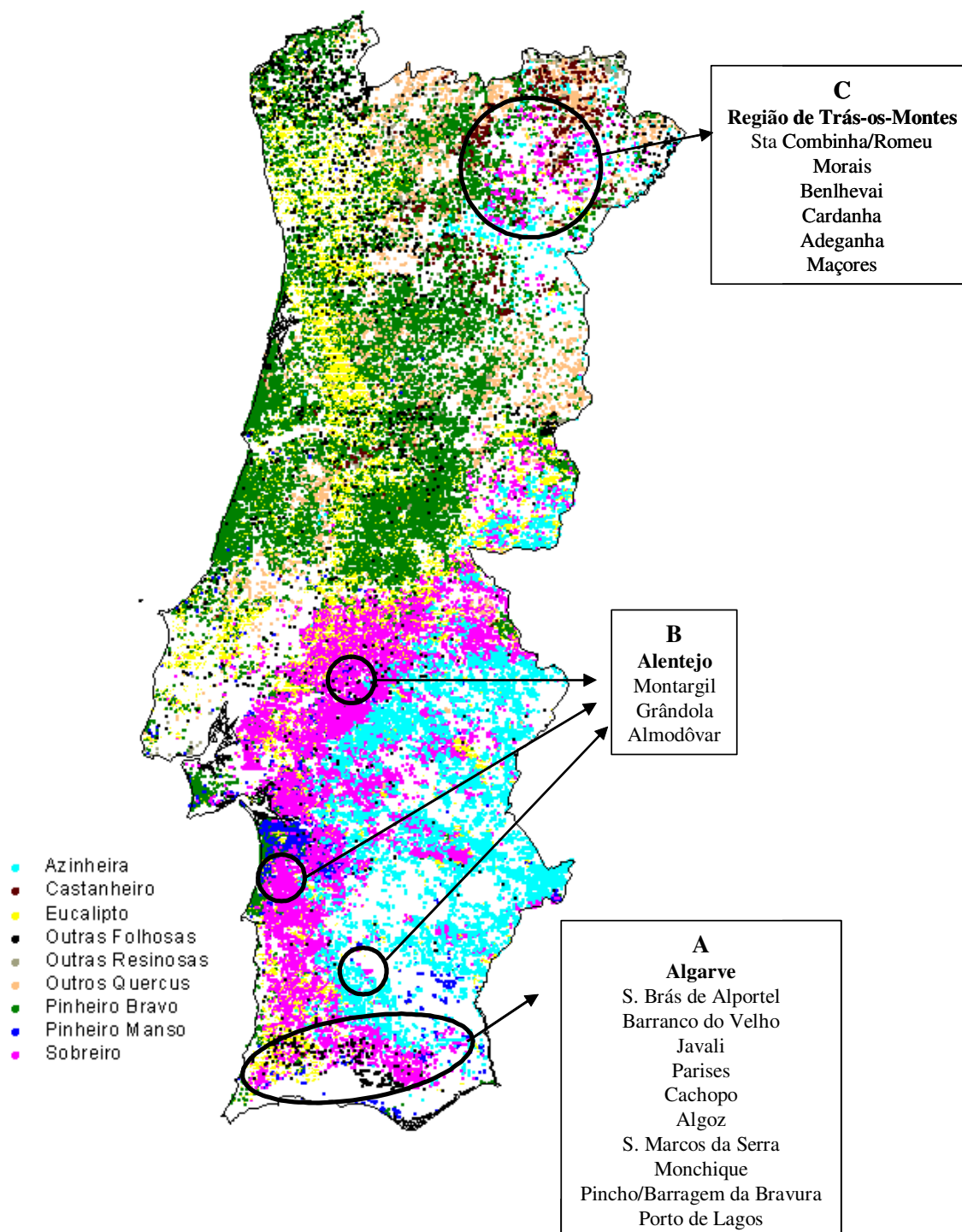


Figura 6. Mapa geográfico de Portugal Continental com identificação das espécies florestais que povoam o território. As zonas onde foram colhidas as amostras nas regiões do Algarve (A), Alentejo (B) e Trás-os-Montes estão assinaladas no mapa (Direcção Geral de Florestas, Ministério da Agricultura Desenvolvimento Rural e Pescas, www.dgf.min-agricultura.pt).

Na tabela 2 figuram, ainda, os valores relativos ao grau de desfoliação de cada uma das árvores e a classificação atribuída à qualidade da cortiça de 98 sobreiros de Trás-os-Montes e de 19 sobreiros da Herdade do Azinhal (Grândola, Alentejo). Ao longo do estudo as árvores serão referidas pelo código-grau de desfoliação-qualidade da cortiça sempre que os dados tenham sido determinados [exemplo: CS5.6M-1-M = sobreiro de Trás-os-Montes (lugar de Morais) nº 5.6, com grau de desfoliação 1 e cortiça de má qualidade].

O grau de desfoliação foi determinado no momento da recolha das folhas, de acordo com a escala proposta por Cadahia *et al.* em 1991, composta por 5 graus:

G. D. 0 - até 10% de desfoliação (árvore saudável)

G. D. 1 - de 11 a 25 % de desfoliação

G. D. 2 - de 26 a 60 % de desfoliação

G. D. 3 - de 61 % a 90 % de desfoliação

G. D. 4 - de 91 % a 100 % (árvore morta).

O grau de desfoliação apresentado pelas árvores pode ser um indicador da incidência e da severidade da doença do declínio. Esta doença é um fenómeno muito complexo, pois é o efeito cumulativo de várias interacções entre o patógeno, hospedeiro e condições ambientais. Existem contudo evidências experimentais de que *Phytophthora cinnamomi* R., um fungo filamentososo presente no solo, é o factor que mais contribui para o declínio (Brasier *et al.*, 1993; Moreira, 2001). As figuras 7, 8 e 9 são imagens de sobreiros aos quais foram atribuídos graus de desfoliação 0, 2 e 4, respectivamente.

Durante a selecção dos sobreiros, no campo, observaram-se, morfológicamente, as suas folhas. A forma, o tamanho, a cor, a presença ou ausência de picos nas extremidades e a saliência das nervuras são aspectos das folhas que variam de indivíduo para indivíduo dentro da mesma espécie. Por vezes, encontraram-se variações morfológicas nas folhas de um mesmo indivíduo, localizadas em regiões diferentes da árvore. A figura 10 apresenta imagens de folhas colhidas em doze sobreiros da Herdade do Azinhal (Grândola, Alentejo) e ilustra as observações registadas no caderno de campo, não se pretendendo contudo, neste trabalho, analisar as variações morfológicas das folhas, nem relacionar as suas diferenças com os perfis de AFLP.

A caracterização da qualidade da cortiça de 98 sobreiros de Trás-os-Montes foi efectuada no âmbito do projecto PAMAF n° 4076 da responsabilidade do Professor Fortunato Fonseca da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD). A qualidade da cortiça de 19 sobreiros da Herdade do Azinhal (Grândola, Alentejo) foi caracterizada no âmbito do projecto PAMAF n° 4053, sob orientação da Professora Helena Pereira (Instituto Superior de Agronomia). A cada árvore foi atribuída uma classificação, de acordo com a qualidade da cortiça (Tabela 2). Estes dados foram gentilmente cedidos pela Associação dos Produtores Florestais do Vale do Sado, Alcácer do Sal e pelo Professor Fortunato Fonseca (UTAD).

Tabela 2. Sobreiros e azinheiras analisados, com o respectivo número de código, localização geográfica, data de recolha das amostras, grau de desfoliação atribuído e caracterização da qualidade da cortiça produzida.

Código das árvores	Localização geográfica	Data de recolha das folhas	Grau de desfoliação	Qualidade da cortiça
ALGARVE				
AS52A	Algoz	10-4-99	1	-
AS53A	Algoz	10-4-99	2	-
AS54A	Algoz	10-4-99	2	-
AS218A	Algoz	10-4-99	3	-
AS219A	Algoz	10-4-99	1	-
AS220A	Algoz	10-4-99	0	-
AA2A	Algoz	10-4-99	2	-
AS41C	Cachopo	21-4-99	2	-
AS42C	Cachopo	21-4-99	2	-
AS43C	Cachopo	21-4-99	1	-
AS44C	Cachopo	21-4-99	1	-
AS45C	Cachopo	21-4-99	2	-
AS46C	Cachopo	21-4-99	1	-
AS47C	Cachopo	21-4-99	1	-
AS48C	Cachopo	22-4-99	2	-
AS49C	Cachopo	22-4-99	2	-
AS50C	Cachopo	22-4-99	3	-
AS51C	Cachopo	22-4-99	3	-
AS241C	Cachopo	22-4-99	2	-
AS242C	Cachopo	22-4-99	0	-
AS243C	Cachopo	22-4-99	2	-
AS244C	Cachopo	22-4-99	2	-
AS245C	Cachopo	22-4-99	0	-
AS246C	Cachopo	22-4-99	0	-
AA67C	Cachopo	9-4-99	0	-
AA68C	Cachopo	9-4-99	1	-
AA74C	Cachopo	22-4-99	0	-
AS15BV	Barranco do Velho	19-4-99	1	-
AS16BV	Barranco do Velho	19-4-99	1	-
AS17BV	Barranco do Velho	19-5-99	0	-
AS18BV	Barranco do Velho	19-5-99	1	-
AS19BV	Barranco do Velho	19-5-99	2	-
AS20BV	Barranco do Velho	10-5-99	2	-
AS21BV	Barranco do Velho	19-5-99	3	-
AS22J	Javali	19-4-99	2	-
AS23J	Javali	19-4-99	3	-
AS24J	Javali	19-4-99	0	-
AS26J	Javali	19-4-99	1	-
AS234BV	Barranco do Velho	19-4-99	1	-
AS260BV	Barranco do Velho	10-5-99	2	-
AS261BV	Barranco do Velho	10-5-99	1	-
AS262BV	Barranco do Velho	10-5-99	4	-
AS263BV	Barranco do Velho	10-5-99	3	-
AS264BV	Barranco do Velho	10-5-99	3	-
AS293BV	Barranco do Velho	10-5-99	3	-
AS294BV	Barranco do Velho	10-5-99	0	-
AA36BV	Barranco do Velho	9-4-99	0	-
AA37BV	Barranco do Velho	9-4-99	2	-
AA38BV	Barranco do Velho	9-4-99	0	-
AA39BV	Barranco do Velho	9-4-99	2	-
AA40BV	Barranco do Velho	9-4-99	?	-
AA41BV	Barranco do Velho	9-4-99	2	-
AA42BV	Barranco do Velho	9-4-99	1	-
AA43BV	Barranco do Velho	9-4-99	1	-
AS85M	Monchique	5-5-99	1	-
AS86M	Monchique	5-5-99	1	-
AS87M	Monchique	5-5-99	2	-
AS88M	Monchique	5-5-99	2	-
AS89M	Monchique	5-5-99	3	-
AS90M	Monchique	5-5-99	2	-
AS91M	Monchique	5-5-99	1	-
AS92M	Monchique	5-5-99	1	-
AS93M	Monchique	5-5-99	2	-
AS94M	Monchique	5-5-99	1	-
AS255M	Monchique	5-5-99	1	-
AS256M	Monchique	5-5-99	3	-
AS28P	Parises	20-4-99	1	-
AS29P	Parises	20-4-99	1	-
AS30P	Parises	20-4-99	2	-
AS31P	Parises	20-4-99	1	-

AS32P	Parises	20-4-99	2	-
AS33P	Parises	20-4-99	1	-
AS235P	Parises	20-4-99	1	-
AS236P	Parises	20-4-99	3	-
AS237P	Parises	21-4-99	2	-
AS238P	Parises	21-4-99	1	-
AS239P	Parises	21-4-99	3	-
AS240P	Parises	21-4-99	0	-
AS60PB	Pincho/B. Bravura	6-5-99	2	-
AS61PB	Pincho/B. Bravura	6-5-99	3	-
AS62PB	Pincho/B. Bravura	6-5-99	2	-
AS63PB	Pincho/B. Bravura	6-5-99	3	-
AS64PB	Pincho/B. Bravura	6-5-99	2	-
AS65PB	Pincho/B. Bravura	6-5-99	1	-
AS66PB	Pincho/B. Bravura	6-5-99	1	-
AS67PB	Pincho/B. Bravura	6-5-99	1	-
AS68PB	Pincho/B. Bravura	6-5-99	1	-
AS69PB	Pincho/B. Bravura	6-5-99	1	-
AS70PB	Pincho/B. Bravura	6-5-99	2	-
AS257PB	Pincho/B. Bravura	6-5-99	0	-
AS258PB	Pincho/B. Bravura	6-5-99	3	-
AS259PB	Pincho/B. Bravura	6-5-99	3	-
AS287PB	Pincho/B. Bravura	2-5-00	1	-
AS289PB	Pincho/B. Bravura	2-5-00	3	-
AS292PB	Pincho/B. Bravura	2-5-00	2	-
AS58PL	Porto Lagos	10-4-99	3	-
AS59PL	Porto Lagos	10-4-99	2	-
AA4PL	Porto Lagos	10-4-99	3	-
AS1SBA	S. Brás Alportel	17-4-99	2	-
AS2SBA	S. Brás Alportel	17-4-99	2	-
AS3SBA	S. Brás Alportel	17-4-99	3	-
AS4SBA	S. Brás Alportel	17-4-99	2	-
AS5SBA	S. Brás Alportel	17-4-99	2	-
AS6SBA	S. Brás Alportel	17-4-99	1	-
AS7SBA	S. Brás Alportel	17-4-99	1	-
AS8SBA	S. Brás Alportel	17-4-99	2	-
AS9SBA	S. Brás Alportel	17-4-99	2	-
AS10SBA	S. Brás Alportel	17-4-99	1	-
AS11SBA	S. Brás Alportel	16-4-99	1	-
AS12SBA	S. Brás Alportel	16-4-99	1	-
AS13SBA	S. Brás Alportel	16-4-99	1	-
AS14SBA	S. Brás Alportel	16-4-99	1	-
AS230SBA	S. Brás Alportel	16-4-99	0	-
AS231SBA	S. Brás Alportel	16-4-99	0	-
AS232SBA	S. Brás Alportel	17-4-99	1	-
AS233SBA	S. Brás Alportel	17-4-99	4	-
AS286SBA	S. Brás Alportel	2-5-00	1	-
AS288SBA	S. Brás Alportel	2-5-00	1	-
AS290SBA	S. Brás Alportel	2-5-00	1	-
AS291SBA	S. Brás Alportel	2-5-00	1	-
AA1SBA	S. Brás Alportel	8-4-99	0	-
AA23SBA	S. Brás Alportel	8-4-99	2	-
AA24SBA	S. Brás Alportel	8-4-99	1	-
AA25SBA	S. Brás Alportel	8-4-99	0	-
AA26SBA	S. Brás Alportel	8-4-99	0	-
AA27SBA	S. Brás Alportel	8-4-99	2	-
AA28SBA	S. Brás Alportel	8-4-99	0	-
AA29SBA	S. Brás Alportel	8-4-99	1	-
AA30SBA	S. Brás Alportel	8-4-99	0	-
AA31SBA	S. Brás Alportel	8-4-99	1	-
AA32SBA	S. Brás Alportel	8-4-99	2	-
AA33SBA	S. Brás Alportel	8-4-99	0	-
AA34SBA	S. Brás Alportel	8-4-99	2	-
AA35SBA	S. Brás Alportel	8-4-99	3	-
AS71SMS	S. Marcos da Serra	15-4-99	2	-
AS72SMS	S. Marcos da Serra	15-4-99	1	-
AS73SMS	S. Marcos da Serra	15-4-99	1	-
AS74SMS	S. Marcos da Serra	15-4-99	3	-
AS75SMS	S. Marcos da Serra	15-4-99	1	-
AS76SMS	S. Marcos da Serra	15-4-99	3	-
AS77SMS	S. Marcos da Serra	15-4-99	1	-
AS78SMS	S. Marcos da Serra	15-4-99	1	-
AS79SMS	S. Marcos da Serra	15-4-99	2	-
AS80SMS	S. Marcos da Serra	15-4-99	1	-
AS82SMS	S. Marcos da Serra	15-4-99	0	-
AS83SMS	S. Marcos da Serra	15-4-99	0	-
AS224SMS	S. Marcos da Serra	15-4-99	2	-
AS225SMS	S. Marcos da Serra	15-4-99	1	-
AS226SMS	S. Marcos da Serra	15-4-99	1	-
AS227SMS	S. Marcos da Serra	15-4-99	1	-
AS229SMS	S. Marcos da Serra	15-4-99	0	-

AA5SMS	S. Marcos da Serra	15-4-99	?	
ALENTEJO				
BS95A	Almodôvar	11-4-99	0	-
BS97A	Almodôvar	11-4-99	0	-
BS98A	Almodôvar	11-4-99	0	-
BS99A	Almodôvar	11-4-99	2	-
BS100A	Almodôvar	11-4-99	2	-
BS101A	Almodôvar	14-4-99	2	-
BS102A	Almodôvar	14-4-99	1	-
BS103A	Almodôvar	14-4-99	1	-
BS104A	Almodôvar	14-4-99	1	-
BS105A	Almodôvar	14-4-99	0	-
BS107A	Almodôvar	14-4-99	0	-
BS221A	Almodôvar	11-4-99	1	-
BS222A	Almodôvar	11-4-99	4	-
BS223A	Almodôvar	14-4-99	1	-
BA6A	Almodôvar	11-4-99	1	-
BA7A	Almodôvar	11-4-99	3	-
BA8A	Almodôvar	11-4-99	2	-
BA9A	Almodôvar	11-4-99	3	-
BA10A	Almodôvar	11-4-99	0	-
BA11A	Almodôvar	11-4-99	3	-
BA12A	Almodôvar	11-4-99	2	-
BA13A	Almodôvar	11-4-99	2	-
BA14A	Almodôvar	11-4-99	1	-
BA15A	Almodôvar	11-4-99	2	-
BA16A	Almodôvar	11-4-99	1	-
BA70A	Almodôvar	11-4-99	1	-
BA71A	Almodôvar	11-4-99	1	-
BA72A	Almodôvar	14-4-99	1	-
BS266HA	Herdade Azinhal, Grândola	18-05-00	2	5 ^a
BS267HA	Herdade Azinhal, Grândola	18-05-00	2	2 ^a
BS268HA	Herdade Azinhal, Grândola	18-05-00	2	4 ^a
BS269HA	Herdade Azinhal, Grândola	18-05-00	2	4 ^a
BS270HA	Herdade Azinhal, Grândola	18-05-00	2	4 ^a
BS271HA	Herdade Azinhal, Grândola	18-05-00	2	6 ^a
BS272HA	Herdade Azinhal, Grândola	18-05-00	2	6 ^a
BS273HA	Herdade Azinhal, Grândola	18-05-00	2	5 ^a
BS274HA	Herdade Azinhal, Grândola	18-05-00	1	5 ^a
BS275HA	Herdade Azinhal, Grândola	18-05-00	2	5 ^a
BS276HA	Herdade Azinhal, Grândola	18-05-00	2	6 ^a
BS278HA	Herdade Azinhal, Grândola	18-05-00	2	1 ^a
BS279HA	Herdade Azinhal, Grândola	18-05-00	2	2 ^a
BS280HA	Herdade Azinhal, Grândola	18-05-00	0	R
BS281HA	Herdade Azinhal, Grândola	18-05-00	0	5 ^a
BS282HA	Herdade Azinhal, Grândola	18-05-00	1	3 ^a
BS283HA	Herdade Azinhal, Grândola	18-05-00	2	6 ^a
BS284HA	Herdade Azinhal, Grândola	18-05-00	4	6 ^a
BS285HA	Herdade Azinhal, Grândola	18-05-00	2	5 ^a
BS108HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	0	-
BS109HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	1	-
BS110HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	3	-
BS111HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	3	-
BS112HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	2	-
BS113HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	2	-
BS114HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	1	-
BS115HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	2	-
BS116HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	2	-
BS117HL	Herdade Leitões, Montargil	26-4-99	1	-
BS118HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	1	-
BS119HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	0	-
BS120HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	0	-
BS121HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	2	-
BS122HL	Herdade Leitões, Montargil	28-4-99	0	-
BS123HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	1	-
BS124HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	1	-
BS125HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	0	-
BS126HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	2	-
BS127HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	2	-
BS128HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	3	-
BS129HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	2	-
BS130HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	1	-
BS131HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	?	-
BS132HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	?	-
BS133HL	Herdade Leitões, Montargil	28-4-99	0	-
BS134HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	0	-
BS135HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	3	-
BS136HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	2	-
BS137HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	0	-

BS138HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	3	-
BS139HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	1	-
BS140HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	1	-
BS141HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	3	-
BS142HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	1	-
BS143HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	3	-
BS144HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	0	-
BS145HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	1	-
BS146HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	1	-
BS147HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	1	-
BS148HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	2	-
BS149HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	3	-
BS150HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	1	-
BS151HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	0	-
BS152HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	0	-
BS153HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	1	-
BS154HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	1	-
BS155HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	1	-
BS156HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	2	-
BS157HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	0	-
BS247HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	4	-
BS248HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	0	-
BS249HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	4	-
BS250HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	0	-
BS251HL	Herdade Leitões, Montargil	30-4-99	0	-
BS252HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	0	-
BS253HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	0	-
BS254HL	Herdade Leitões, Montargil	1-5-99	2	-

TRÁS-OS-MONTES

CS7.5A	Adeganha	16-6-99	1	Má
CS7.6A	Adeganha	16-6-99	1	Má
CS7.7A	Adeganha	16-6-99	2	Boa
CS8.1B	Benlhevai	16-6-99	1	Boa
CS8.3B	Benlhevai	16-6-99	2	Boa
CS7.1C	Cardanha	25-5-99	1	Boa
CS7.2C	Cardanha	25-5-99	2	Boa
CS7.3C	Cardanha	25-5-99	1	Boa
CS7.4C	Cardanha	25-5-99	1	Má
CS1.1Mc	Maçores	16-6-99	0	Boa
CS1.2Mc	Maçores	16-6-99	1	Má
CS1.3Mc	Maçores	25-5-99	3	Boa
CS1.4Mc	Maçores	16-6-99	1	Boa
CS1.5Mc	Maçores	16-6-99	2	Boa
CS1.6Mc	Maçores	16-6-99	1	Boa
CS1.7Mc	Maçores	16-6-99	1	Boa
CS1.8Mc	Maçores	16-6-99	2	Boa
CS1.9Mc	Maçores	16-6-99	1	Boa
CS1.11Mc	Maçores	16-6-99	1	Boa
CS1.12Mc	Maçores	16-6-99	2	Boa
CS1.13Mc	Maçores	16-6-99	2	Boa
CS1.14Mc	Maçores	16-6-99	2	Boa
CS1.15Mc	Maçores	16-6-99	2	Boa
CS1.16Mc	Maçores	16-6-99	2	Boa
CS4.1M	Morais	15-6-99	2	Boa
CS4.3M	Morais	15-6-99	1	Má
CS4.4M	Morais	15-6-99	2	Má
CS4.5M	Morais	15-6-99	2	Boa
CS4.6M	Morais	26-5-99	1	Má
CS4.7M	Morais	26-5-99	1	Boa
CS4.8M	Morais	26-5-99	1	Má
CS4.9M	Morais	26-5-99	2	Má
CS5.0M	Morais	15-6-99	1	Boa
CS5.1M	Morais	15-6-99	1	Má?
CS5.2M	Morais	15-6-99	1	Boa
CS5.3M	Morais	15-6-99	1	Má?
CS5.4M	Morais	15-6-99	2	Boa
CS5.5M	Morais	15-6-99	3	Boa
CS5.6M	Morais	15-6-99	1	Má
CS5.7M	Morais	15-6-99	1	Boa
CS5.8M	Morais	15-6-99	1	Boa
CS5.9M	Morais	15-6-99	1	Má
CS5.10M	Morais	15-6-99	2	Boa
CS5.11M	Morais	15-6-99	2	Má
CS5.12M	Morais	15-6-99	2	Boa
CS5.13M	Morais	15-6-99	2	Má
CS5.14M	Morais	15-6-99	1	Má
CS5.15M	Morais	15-6-99	2	Boa
CS5.16M	Morais	15-6-99	2	Boa
CS5.17M	Morais	15-6-99	2	Boa

CS5.18M	Morais	15-6-99	2	Boa
CS5.19M	Morais	15-6-99	2	Boa
CS5.20M	Morais	15-6-99	2	Boa
CS5.21M	Morais	15-6-99	2	Boa
CS5.22M	Morais	18-6-99	1	Boa
CS5.23M	Morais	18-6-99	2	Boa
CS5.24M	Morais	18-6-99	0	Boa
CS5.25M	Morais	18-6-99	2	Má?
CS5.26M	Morais	18-6-99	1	Boa
CS5.27M	Morais	18-6-99	1	Má
CS5.28M	Morais	18-6-99	2	Boa
CS5.29M	Morais	18-6-99	1	Má
CS5.30M	Morais	18-6-99	1	Má
CS5.31M	Morais	18-6-99	1	Boa
CS5.32M	Morais	18-6-99	2	Má
CS5.33M	Morais	18-6-99	2	Má
CS5.34M	Morais	18-6-99	1	Boa
CS5.35M	Morais	18-6-99	2	Boa
CS5.36M	Morais	18-6-99	1	Boa
CS5.38M	Morais	18-6-99	0	Má?
CS5.39M	Morais	18-6-99	0	Má?
CS5.40M	Morais	18-6-99	2	Boa
CS5.41M	Morais	18-6-99	2	Boa
CS5.42M	Morais	18-6-99	2	Boa
CS5.43M	Morais	18-6-99	2	Boa
CS5.44M	Morais	18-6-99	0	Má
CS5.45M	Morais	18-6-99	1	Má
CS5.46M	Morais	18-6-99	1	Boa
CS5.47M	Morais	18-6-99	0	Má?
CS5.48M	Morais	18-6-99	1	Má?
CS5.50M	Morais	18-6-99	0	Má?
CS5.52M	Morais	18-6-99	2	Boa
CA44M	Morais	26-5-99	1	
CA45M	Morais	26-5-99	2	
CA46M	Morais	26-5-99	1	
CA47M	Morais	26-5-99	0	
CA48M	Morais	26-5-99	0	
CA49M	Morais	26-5-99	0	
CA50M	Morais	26-5-99	2	
CA51M	Morais	26-5-99	1	
CS9.7R	Sta Combinha/Romeu	17-6-99	2	Má
CS9.8R	Sta Combinha/Romeu	17-6-99	1	Má
CS9.9R	Sta Combinha/Romeu	17-6-99	2	Má
CS9.10R	Sta Combinha/Romeu	17-6-99	2	Má
CS9.11R	Sta Combinha/Romeu	17-6-99	1	Má
CS9.12R	Sta Combinha/Romeu	17-6-99	2	Má
CS9.14R	Sta Combinha/Romeu	17-6-99	0	-
CS9.23R	Sta Combinha/Romeu	26-5-99	2	Boa
CS9.24R	Sta Combinha/Romeu	17-6-99	2	Má
CS9.25R	Sta Combinha/Romeu	17-6-99	3	Boa
CS9.26R	Sta Combinha/Romeu	17-6-99	2	Boa
CS9.27R	Sta Combinha/Romeu	17-6-99	2	Má
CS9.28R	Sta Combinha/Romeu	17-6-99	2	Má
CS9.29R	Sta Combinha/Romeu	26-5-99	2	Má
CS9.30R	Sta Combinha/Romeu	17-6-99	2	Boa
CS9.31R	Sta Combinha/Romeu	17-6-99	2	Má
CA18R	Romeu	26-5-99	0	
CA19R	Romeu	26-5-99	0	

Observações:**1ª Coluna:** código de identificação das árvores:

AS52A letra A, B ou C identifica a região; A (Algarve); B (Alentejo); C (Trás-os-Montes);

AS52A letra S (sobreiro) ou A (azinheira);

AS52A número da árvore;

AS52A localização geográfica na região.

2ª Coluna: localização geográfica em Portugal e na Região.**3ª Coluna:** data de recolha no campo de rebentos ou de estacas para abrolhamento em estufa.**4ª Coluna:** grau de desfoliação; (?) não atribuído.**5ª Coluna:** classes da qualidade da cortiça:

Boa (B) se o valor médio da porosidade em ambas as faces (barriga e intermédia) for igual ou menor que 5%;

Má ? (M?) se o valor médio da porosidade na face da barriga for igual ou menor que 2% e o valor médio da porosidade na face intermédia for maior que 5%;

Má (M) se o valor médio da porosidade em qualquer das faces (barriga ou intermédia) for maior que 5%;

1ª a 6ª e refugo (R): classes de qualidade industrial.

(-) Não determinada.



Figura 7 Sobreiro BS281HA com G.D. = 0; 0 a 10 % de desfoliação.



Figura 8. Sobreiro BS268HA com G.D. = 2; 26 a 60 % de desfoliação.



Figura 9. Sobreiro BS284HA com G.D. = 4; 91 a 100 % de desfoliação.

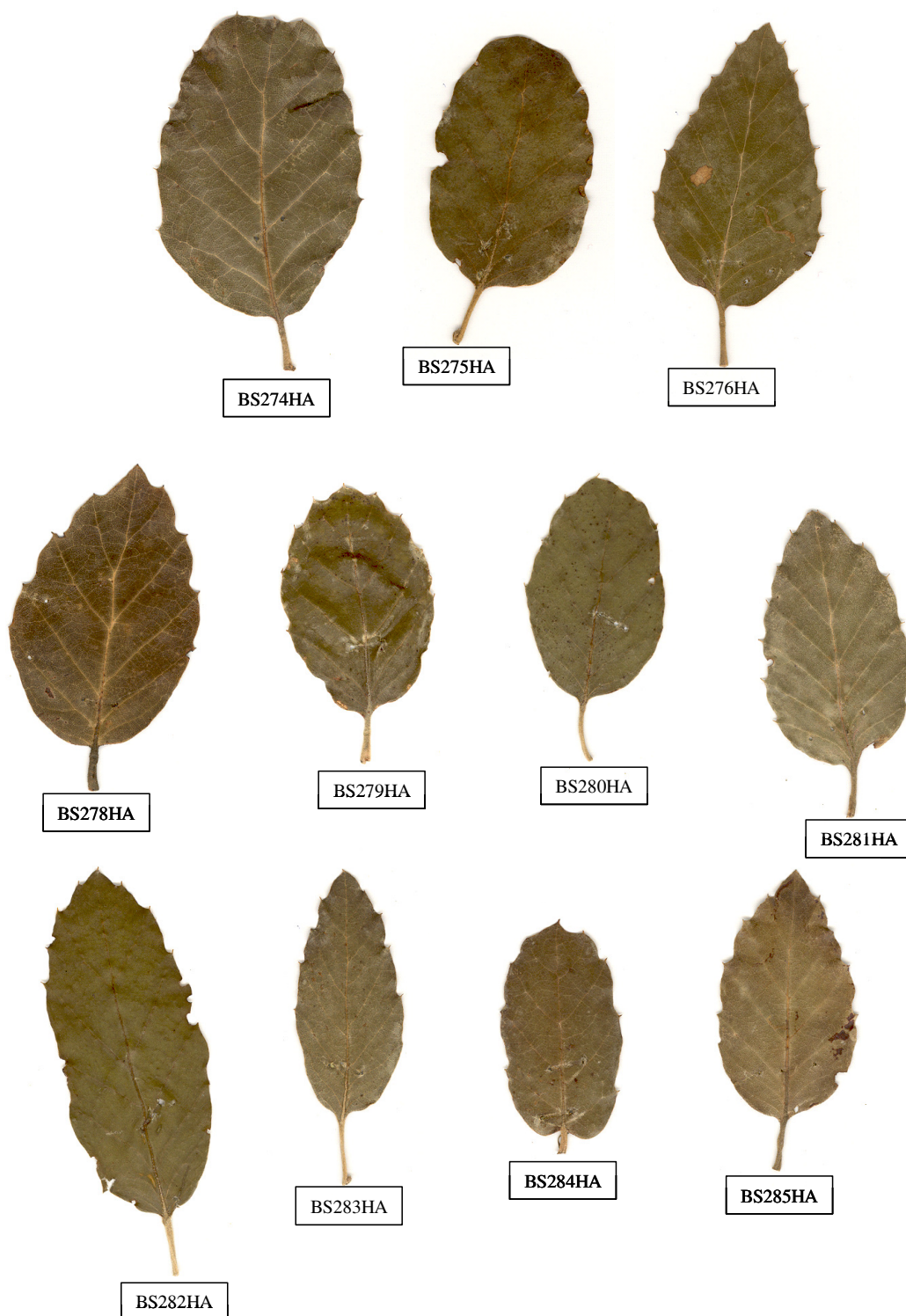


Figura 10. Folhas de sobreiros da Herdade do Azinhal, Grândola, Alentejo. Ilustração da variedade de formas observadas nas folhas de algumas amostras seleccionadas.

1.3.2. Extração de DNA genómico.

O DNA genómico foi extraído a partir de 50 mg de folhas muito jovens de sobreiro com o *kit* da Qiagen DNeasy, com as seguintes modificações: as folhas foram esmagadas num tubo *ependorf* (1,5 ml), até serem reduzidas a pó, na presença de azoto líquido, com a ajuda de uma ponta de plástico com extremidade cónica accionada por um berbequim. Em seguida foram adicionados 100 µl de tampão AP1 incluído no *kit* e as folhas foram maceradas na presença do tampão durante alguns segundos. O restante procedimento decorreu de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. O procedimento usado consistiu, inicialmente, em romper e desorganizar, por meios mecânicos, o tecido celular e promover a lise com digestão do RNA, em simultâneo. As proteínas e os polissacarídeos sofreram precipitação salina e, juntamente com os restos de tecido celular, foram precipitados por centrifugação e foram removidos por filtração. O DNA presente no filtrado celular ligou-se a uma membrana de sílica-gel e os metabolitos celulares, hidratos de carbono, compostos fenólicos e proteínas foram removidos por lavagem da membrana. O DNA purificado foi eluído com tampão AE, incluído no *kit*, ou água. A partir de 50 mg de tecido vegetal extraíram-se, em média, 15-30 µg de DNA apresentando valores de 1,8-2,0 para o rácio das absorvências medidas a 260 nm e a 280 nm, num espectrofotómetro. A análise por electroforese em gel de agarose 1 %, na presença de brometo de etídio, mostrou um tamanho superior a 25 kb.

As folhas de rebentos de sobreiro e azinheira utilizadas na extração do DNA genómico foram recolhidas no campo durante os meses de Abril a Junho, imediatamente colocadas em gelo seco e armazenadas, até utilização, numa arca a -80°C. Quando as árvores não possuíam rebentos, colhiam-se pequenos ramos e provocava-se o abrolhamento em estufa. Os ramos foram podados, retirando-se todas as folhas e ramificações laterais e em seguida, foram desinfectados por imersão numa solução de um fungicida (Benlate; 3 g/L), durante 30 min, e imersos, após lavagem com água, numa solução de lixívia comercial (20 % V/V), durante mais 30 min. Após a desinfecção, foram submersos em água corrente durante 5 min. Os ramos tratados foram colocados em baldes com as extremidades inferiores em contacto com água, numa estufa a 25°C. De dois em dois dias, a água foi substituída e as estacas foram borrifadas com uma solução de BAP (6-benzylaminopurine, 10 mg/ml). Após 3 a 4 semanas

apareceram os primeiros rebentos que foram retirados e guardados a -80 °C até utilização.

I.3.3. Análise do genoma de *Q. suber* por AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

A análise por AFLP foi realizada tal como foi descrita por Zabeau e Vos (1993), com algumas modificações. Seiscentos nanogramas (600 ng) de DNA genómico foram digeridos com *EcoRI/MseI* (2,5 U/cada), na presença de tampão de reacção 5 vezes concentrado (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM AcMg, 250 mM AcK), num volume total de 25 µl (AFLP Core Reagent Kit, GIBCO BRL). A reacção de digestão decorreu a 37°C durante 2 h e em seguida, a enzima foi inactivada a 70 °C durante 15 min. Ao DNA digerido foram ligados oligonucleótidos sintéticos (adaptadores): adaptador *EcoRI* 5' AATTGGTACGCAGTCTAC3' e 5' CTCGTAGACTGCGTACC3'; adaptador *MseI* 5' TACTCAGGACTCAT3' e 5' GACGATGAGTCCTGAG3'. A ligação decorreu a 37°C durante 2 h e foi catalisada pela T4 DNA ligase (1 U), na presença de 5 pmol de adaptador *EcoRI* e 50 pmol do adaptador *MseI*, ATP (0,4 mM), Tris-HCl (10 mM; pH 7,5), AcMg (10 mM), AcK (50 mM), num volume total de 50 µl. A solução de DNA genómico digerido e ligado aos adaptadores foi diluída 5 vezes e 5 µl desta solução foram utilizados como DNA alvo numa reacção de pré-amplificação. A reacção de pré-amplificação foi realizada num volume total de 50 µl com 5 µl de tampão 10 vezes concentrado [Tris-HCl (100 mM, pH 8,3), MgCl₂ (15 mM), KCl (500 mM)], 0,2 µl da enzima Taq DNA polimerase (5 U/µl; Boehringer Mannheim), 15 pmol de *primer EcoRI+A* (5' GACTGCGTACCAATTCA 3') e 15 pmol de *primer MseI+A* ou *MseI+T* [5' GATGAGTCCTGAGTAA(A/T) 3']. Esta reacção decorreu durante 28 ciclos compostos por: 30 s a 94 °C; 60 s a 60 °C; 60 s a 72 °C. O produto da reacção de pré-amplificação foi diluído 10 vezes e 5 µl deste produto foram utilizados como DNA alvo em cada uma das reacções de amplificação selectiva. Nas reacções de amplificação foram utilizadas 5 combinações de *primers* possuindo na extremidade 3' três nucleotídeos selectivos (*EcoR* I-XXX; *Mse* I-XXX), denominadas:

I1 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTCACC3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAAATT3');

I2 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTCACC3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAAACC3');

- I3 (*EcoRI* 5'GACTGCGTACCAATTCATG3'; *MseI* 5'GATGAGTCCTGAGTAAACC3');
I9 (*EcoRI* 5'GACTGCGTACCAATTCACC3'; *MseI* 5'GATGAGTCCTGAGTAATGG3')
I10 (*EcoRI* 5'GACTGCGTACCAATTCACC3'; *MseI* 5'GATGAGTCCTGAGTAATTG3').

Em todas as reacções de amplificação o *primer EcoRI-XXX* foi marcado radioactivamente com [$\gamma^{33}\text{P}$] ATP (Redivue, Amersham Pharmacia) pela adição dum grupo fosfato na extremidade 5'. A reacção de marcação foi catalisada pela T4 kinase polinucleotídica e foi efectuada num volume de 0,5 μl com 0,1 μl *primer* (50 ng/ μl), 0,02 μl de enzima (10 U/ μl ; T4 PNK; Gibco BRL), 0,1 μl do tampão de kinação [*Foward Reaction Buffer*: Tris-HCl (350 mM, pH 7,6), MgCl₂ (50 mM), KCl (50 mM), β -mercaptoetanol (5 mM); Gibco BRL] e 0,1 μl [$\gamma^{33}\text{P}$] ATP (2500 Ci/mmol). A reacção decorreu a 37 °C durante 40 min e a enzima foi inactivada por incubação a 80 °C durante 15 min.

O marcador de massa molecular 30-330 pb (AFLP *DNA ladder*, Gibco BRL) foi marcado com [$\gamma^{33}\text{P}$] ATP numa reacção de substituição de um grupo fosfato na extremidade 5' do DNA. A reacção foi catalisada pela T4 kinase polinucleotídica e foi efectuada num volume de 11 μl com 5 μl de marcador 30-330 pb, 2 μl de enzima (10 U/ μl ; T4 PNK; Gibco BRL), 2 μl do tampão de kinação [*Exchange Reaction Buffer*: Imidazole-HCl (250 mM, pH 6,4), MgCl₂ (60 mM), β -mercaptoetanol (5 mM); ADP (350 μM); Gibco BRL] e 2 μl [$\gamma^{33}\text{P}$] ATP (2500 Ci/mmol). A reacção de kinação decorreu a 37 °C durante 10 min com desnaturação posterior da enzima por incubação a 80 °C durante 15 min. Adicionaram-se aos 11 μl , 10 μl de TE [Tris-HCL (10 mM), pH 8,0, EDTA (0,1 mM)], 50 μl da solução corante desnaturante de formamida [10 ml formamida, xileno cianol (10 mg), bromofenol azul (10 mg), 200 μl EDTA (0,5 M)] e conservou-se a -20 °C.

A reacção de amplificação selectiva foi realizada num volume de 20 μl contendo: 2 μl de tampão 10 vezes concentrado da enzima Taq DNA polimerase (5 U/ μl ; Boehringer Mannheim), 0,08 μl da enzima, 25 ng do *primer EcoRI-XXX* marcado com ^{33}P , 30 ng do *primer Mse I-XXX* e 0,4 μl de dNTPs [mistura de desoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP e dTTP (5 mM); Boehringer Mannheim]. O programa de amplificação foi o seguinte: 13 ciclos com desnaturação, 30 s a 94 °C; hibridação dos *primers*, 30 s a 65 °C (com decréscimo de 0,7 °C em cada ciclo até atingir a temperatura de 56 °C); polimerização, 60 s a 72 °C, seguidos de 18 ciclos com 30 s a 94 °C, 30 s a 56 °C e 60 s a 72 °C.

Os produtos resultantes da reacção de amplificação foram separados por electroforese num gel desnaturante de poliacrilamida [Gel-Mix 6 Sequencing System: 5,7 % acrilamida, 0,3 % bisacrilamida, Ureia (7 M), Tris-Borato (100 mM), EDTA (1 mM), TEMED (3 mM), pH 8,3, APS (solução persulfato de amónia 10 %) Gibco BRL], após a adição de 20 µl da solução corante desnaturante de formamida e colocação a -20 °C, durante 24 h. Na electroforese usou-se o sistema de sequenciação da BioRad, com vidros de dimensões 38 x 50 cm, pentes de 48 e 96 poços, tampão de corrida TBE 0,5 [Tris-Borato (45 mM), EDTA (1 mM), pH 8,3] e aplicaram-se entre 3 e 5 µl dos produtos da amplificação, com corante. Antes da aplicação das amostras foi efectuada uma pré-electroforese a 90 W, durante 1 h. As amostras e o marcador foram desnaturadas a 95 °C durante 5 min e mantidas em gelo até à sua aplicação. As corridas electroforéticas foram realizadas a uma potência constante de 90 W até o corante xileno de cianol percorrer 35 cm.

Os vidros do sistema de sequenciação (BioRad) em que decorreram a migração e a separação dos fragmentos amplificados foram tratados separadamente com Bind-Silane e Repel-Silane (Amersham Pharmacia). O tratamento de um dos vidros com Repel-Silane consiste em cobrir a superfície do vidro com 5 ml do produto e passar em seguida uma solução de etanol (95 %). O procedimento é repetido duas vezes e termina com duas passagens com etanol. No caso do vidro tratado com Bind-Silane, foi preparada uma solução com 100 µl de ácido acético glacial (Merck), 2 ml de etanol, 2 ml de água e 10 µl de Bind-Silane que foi, em seguida, espalhada pela superfície do vidro. Após 5 min a secar sob uma câmara de fumos, passou-se etanol (95 %) 3 vezes na superfície do vidro. Este tratamento permite que o gel de poliacrilamida adira ao vidro tratado com Bind-Silane, evitando a transferência do gel para papel, como vem descrito na maior parte dos protocolos publicados. O gel foi fixado, por imersão, numa solução de metanol a 10 % e ácido acético a 10 %, durante 10 min, seco durante 2 h numa câmara com ventilação e aquecimento e em seguida, exposto a uma película autorradiográfica (Kodak Biomax Film), durante 40 h. A revelação da película foi efectuada manualmente numa câmara escura. A película foi colocada 2 min na solução de revelação (Kodak LX-24 *X-ray developer*), 1 min em água e 4 min na solução de fixação (Kodak AL-4 *X-ray fixer*), com agitação suave. O processo terminou com a colocação do filme em água corrente durante 15 min.

Depois da revelação, os vidros com o gel foram colocados numa solução de NaOH (2 M) durante 24 h e foram lavados, em seguida, com água e detergente, para que pudessem ser reutilizados.

I.3.4. Clonagem dos fragmentos de AFLP.

Dezasseis fragmentos resultantes das amplificações I1, I2, I3, I9 e I10, correspondentes a bandas electroforéticas polimórficas e monomórficas foram clonados, sequenciados e analisados. Para isso, as amostras que possuíam os fragmentos pretendidos foram aplicadas num gel de poliacríalmida que foi transferido, após a migração electroforética, para papel (Whatman 3MM). Após secagem num secador de géis, foram feitas marcações radioactivas, necessárias para orientação do gel com a película autorradiográfica e o gel foi posto em contacto com a película, durante 40 h. Depois de revelada a película, fizeram-se coincidir as marcas radioactivas do gel com as da película e recortou-se o gel com as bandas de interesse. Os rectângulos de papel *Whatman* com o gel foram colocados em tubos com 40 µl de água e mantidos em gelo durante 10 min. Após hidratação, os tubos foram colocados a 95 °C durante 15 min e transferidos, logo em seguida, para gelo. O conteúdo foi centrifugado durante alguns segundos, o sobrenadante foi guardado e 5 µl desta solução foram utilizados como DNA alvo em reacções de re-amplificação. As reacções de re-amplificação decorreram nas mesmas condições das reacções de amplificação que estiveram na origem da amplificação de cada um dos fragmentos.

Os produtos da re-amplificação foram separados por electroforese em gel de agarose 2 %, corado com brometo de etídio e os fragmentos com o tamanho aguardado, foram recortados do gel de agarose e purificados com o *kit Qiaquick PCR Purification* (Qiagen). Os fragmentos *pcr* purificados foram clonados no vector *PCRII Topo* do *kit Topo TA Cloning* (Invitrogen) e sequenciados num sequenciador automático Perkin Elmer/Applied Biosystems Model ABI PRISM 377. As reacções de sequenciação foram preparadas com o *kit* ABI PRISM *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*, e iniciadas com os *primers* universais M13 directo (5' GTAAAACGACGGCCAG 3') e M13 reverso (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3').

I.3.5. Análise das sequências nucleotídicas dos fragmentos AFLP.

As sequências nucleotídicas dos fragmentos AFLP foram comparadas com sequências de genes já identificados noutras espécies, presentes no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information), por utilização do programa fastA integrado no software GCG (*Genetics Computer Group*, University of Wisconsin, Madison, 1981).

I.3.6. Análise dos dados.

Os fragmentos AFLP, separados por electroforese no gel de poliacrilamida e visualizados na forma de bandas, foram codificados como 1 (presença de banda) ou 0 (ausência de banda) e a matriz resultante foi analisada com recurso aos métodos de análise de dados/taxonomia numérica através do programa NTSYS-PC (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*, versão 2.0) (Rohlf, 1997; Rohlf, 1998).

Construíram-se matrizes de semelhança para cada uma das combinações de *primers*, individualmente e para o conjunto total de dados. A semelhança genética (GS) existente entre os pares foi determinada com recurso ao coeficiente *Jaccard* [Jaccard, 1908; $GS(ij)=a/(a+b+c)$], em que GS (ij) é a medida da semelhança genética entre os indivíduos *i* e *j*, *a* é o número de fragmentos de DNA polimórficos que são partilhados por *i* e por *j*, *b* é o número de bandas presente em *i* e ausente em *j* e *c* é o número de bandas presente em *j* e ausente em *i*. Efectuaram-se análises de grupo usando o método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages*) (Sneath e Sokal 1973), sendo os resultados apresentados na forma de fenogramas, nos quais se visualizam os grupos (*clusters*) formados por indivíduos com génotipos semelhantes. A partir da matriz de semelhança foi feita a análise em coordenadas principais e os resultados visualizados em gráficos a duas ou três dimensões. À análise em coordenadas principais sobrepôs-se a árvore de expansão mínima (Gower e Ross, 1969).

I.4. RESULTADOS.

I.4.1. *Análise da variabilidade genética em Q. suber por AFLP¹/Taxonomia Numérica.*

I.4.1.1. Análise dos perfis AFLP.

Os génotipos de 313 sobreiros e de 2 azinheiras (Tabela 2) foram analisados por AFLP com cinco combinações de *primers* que possuíam na extremidade 3' três nucleótidos selectivos (*EcoRI*-XXX e *MseI*-XXX), denominadas I1, I2, I3, I9 e I10 (I.3.3). Estes *primers* hibridam nos adaptadores que se ligaram às extremidades protuberantes dos fragmentos de DNA genómico resultantes da digestão com *EcoRI* e *MseI*. Na análise efectuada com a combinação I9 foram incluídas mais 50 azinheiras para além das duas acima referidas. A figura 11 mostra os perfis AFLP obtidos para os sobreiros CS9.28R, CS9.29R, CS9.30R e CS9.31R, localizados no lugar de Sta Combinha/Romeu na região de Trás-os-Montes, com as combinações de *primers* I1, I2, I3, I9 e I10.

Os perfis AFLP resultantes das amplificações I1, I2, I3, I9 e I10 foram analisados individualmente e em conjunto e o grau de diversidade da espécie determinado. Foram construídas matrizes de semelhança para cada uma das combinações de *primers* e para o conjunto total de dados, com base no coeficiente de *Jaccard*, com quantificação do grau de parecença existente entre os sobreiros. Estas matrizes foram também submetidas à análise de grupos pelo método UPGMA e à análise em coordenadas principais. O resultado destas análises reflecte as relações genéticas existentes entre as árvores e é apresentado na forma de um fenograma e de projecção dos pontos representativos das árvores nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2 ou 1 e 3. A perspectiva de ordenação também é apresentada num espaço a três dimensões.

¹ *Amplified Fragment Length Polymorphism.*

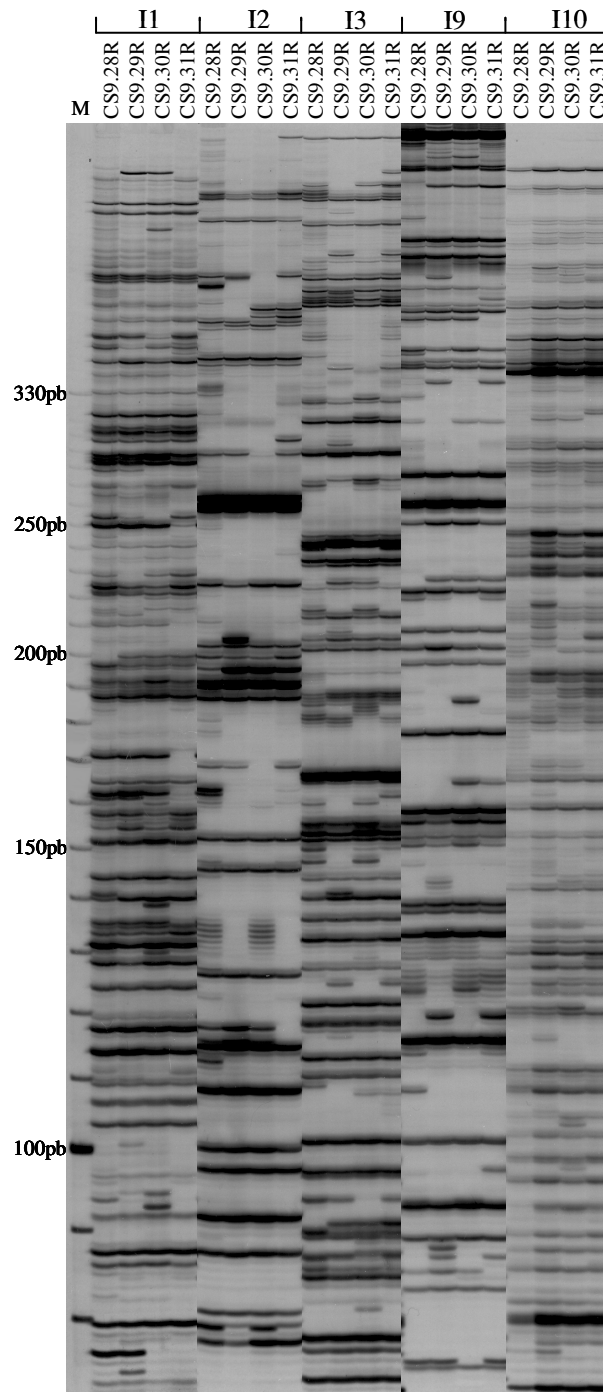


Figura 11. Exemplo dos perfis AFLP obtidos para os sobreiros CS9.28R, CS9.29R, CS9.30R e CS9.31R, localizados no lugar de Sta Combinha/Romeu na região de Trás-os-Montes, com as combinações de *primers* I1, I2, I3, I9 e I10. M: marcador de massa molecular.

I.4.1.1.1. AFLP-Amplificação II.

O perfil AFLP do genótipo de 47 sobreiros obtido com o par de *primers* *EcoRI-ACC/MseI-ATT* (combinação II) está representado na figura 12. Na mesma figura estão identificados os 57 fragmentos que foram seleccionados para integrar a matriz original de dados II, denominados J1 a J57. Os fragmentos seleccionados correspondem a bandas que se visualizam com facilidade nos 313 sobreiros e nas 2 azinheiras por serem intensas e por estarem individualizadas. Os tamanhos dos fragmentos J20 a J57 foram determinados por comparação com o marcador de peso molecular 30-330 pb e variam entre 120 pb e 330 pb. Os tamanhos dos fragmentos J1 a J16 são superiores a 358 pb, que foi o valor obtido para o fragmento J17, por determinação da sequência nucleotídica. O marcador de massa molecular utilizado não permitiu estimar os tamanhos dos fragmentos superiores a 330 pb, por não possuir fragmentos de DNA de referência com tamanhos superiores. Os dados relativos aos fragmentos AFLP amplificados com a combinação II estão registados na tabela 3.

Os marcadores J3, J31, J44, e J57 são marcadores monomórficos nas duas espécies incluídas neste estudo, *Q. suber* e *Q. rotundifolia*, enquanto que os marcadores J7, J19, J21, J22, J28, J30, J41 e J49 são marcadores que estão presentes em todos os sobreiros e ausentes nas duas azinheiras. A percentagem de polimorfismo observado nesta combinação de *primers* é de 93 %, se considerarmos a relação existente entre os fragmentos polimórficos e o número total de fragmentos seleccionados nas duas espécies e decresce para 79 % se excluirmos as azinheiras.

A presença de cada um dos 45 marcadores polimórficos identificados nos sobreiros foi quantificada para as regiões do Algarve, Alentejo e Trás-os-Montes, verificando-se que 90 % dos marcadores se encontram distribuídos de forma equitativa pelos sobreiros das três regiões analisadas. Observaram-se, contudo, marcadores que predominam nos sobreiros de determinada região, tais como o J18 na região do Algarve e o J34 na região de Trás-os-Montes. Os fragmentos J5, J15, J20, J36, J43 e J52 foram considerados como raros, por estarem presentes em percentagens inferiores a 10 % nalgumas regiões ou mesmo ausentes. Nenhum dos 91 sobreiros analisados na região do Alentejo possui o fragmento J5 e nenhum dos 98 sobreiros da região de Trás-os-Montes possui o fragmento J43. Os sobreiros CS8.3B-2-B e CS5.36M-1-B são os únicos, em Trás-os-Montes, a possuir os fragmentos J15 e J18, respectivamente. Verificou-se,

também, que os fragmentos polimórficos J4, J6, J10, J24, J27, J40, J51, J53 e J55 estão presentes numa ou nas duas azinheiras (AA1SBA-0; AA2A-2) incluídas na análise.

Os fragmentos amplificados nas 315 árvores foram codificados como 1 (presença de banda) ou como 0 (ausência de banda) e a matriz de dados resultante (matriz-II) foi analisada com recurso aos métodos de análise de dados/taxonomia numérica, de modo a estabelecer as relações de parecência global entre cada par de genótipos. A matriz original II é composta por 57 caracteres x 315 OTUs, correspondendo os caracteres aos fragmentos AFLP e as Unidades Taxonómicas Operacionais (OTUs) às árvores. Para determinar a semelhança genética (GS; genetic similarity) existente entre as 315 árvores foi calculada uma matriz de semelhança baseada no coeficiente de *Jaccard*. Neste caso, a semelhança genética entre cada par de árvores é definida pelo número de fragmentos polimórficos partilhado por ambas e, deste modo, o coeficiente de semelhança é igual a 1 se duas árvores forem idênticas e igual a 0 se forem diferentes.

Nos sobreiros, o valor do coeficiente de semelhança varia entre 0,95 para os genótipos CS9.10R-2-M e BS127HL-2 e 0,40 para os pares de OTUs BS98A-0/AS76SMS-3 e CS8.3B-2-B/BS251HL-0. O menor coeficiente de semelhança (0,13) foi encontrado entre o sobreiro CS5.35M-2-B e a azinheira AA2A-2. Na população de sobreiros de Trás-os-Montes os valores para os coeficientes de semelhança variam entre 0,90 (CS9.10R-2-M/CS5.2M-1-B) e 0,42 (CS7.1C-1-B/CS58.1B-1-B), ao passo que nos sobreiros do Alentejo os valores são de 0,91 (BS154HL-1/BS151HL-0) e de 0,44 (BS142HL-1/BS267HA-2-2^a). No Algarve os sobreiros que possuem os genótipos mais semelhantes são o AS232SBA-1 e o AS258PB-3 com um coeficiente de *Jaccard* de 0,94 e os que possuem os genótipos menos semelhantes são o AS289PB-3 e AS65PB-1 com um coeficiente de 0,42.

Para visualizar melhor as relações fenéticas existentes entre as árvores, foi efectuada uma análise de grupos pelo método de agregação UPGMA (*Unweighted Pair Group Method*) a partir da matriz de semelhanças e o resultado foi apresentado na forma de fenograma. No fenograma resultante destaca-se um grupo (II-IA) formado pelas duas azinheiras e um grupo (II-IIS) constituído pelos sobreiros, ligados por um coeficiente de semelhança baixo (Figura 13). O grupo dos sobreiros está dividido em dois grandes grupos (II-IIS1 e II-IIS2) que, por sua vez, se subdividem em vários subgrupos mais pequenos. Seis sobreiros, AS53A-2, AS227SMS-1, CS7.5A-1-M, BS109HL-1, CS5.20M-2-B e AS76SMS-3 não pertencem aos dois grupos referidos. O

nível de semelhança genética existente entre os sobreiros dos grupos I1-IIS1 e I1-IIS2 é superior a 40 %. A correlação cofenética existente entre a matriz de semelhança e a matriz de valores cofenéticos criada a partir da matriz resultante do algoritmo de agrupamento SAHN (*Sequential Agglomerative Hierarchical Nested cluster analysis*) é de 0,75835. Valores para a correlação cofenética inferiores a 0,8 e superiores a 0,7 são indicadores de que os grupos formados e apresentados no fenograma são, de certa forma, um resultado distorcido da realidade.

A análise do fenograma é dificultada pela enorme quantidade de pequenos grupos e subgrupos que se formam, muito pouco distanciados geneticamente uns dos outros. Devido à sua complexidade, a descrição dos resultados incidirá sobre os sobreiros que foram agrupados de acordo com os marcadores AFLP e que, em simultâneo, partilham as mesmas características relativamente ao grau de desfoliação, à qualidade da cortiça ou à localização geográfica.

No grupo I1-IIS1 seleccionou-se um subgrupo identificado no fenograma como I1-IIS1A (Figura 13). O grupo I1-IIS1A é constituído por 8 sobreiros que têm em comum os marcadores J7, J23, J29, J51 e J47 e caracteriza-se pelo facto de serem todos oriundos da região do Algarve.

No grupo I1-IIS2, seleccionaram-se subgrupos formados por sobreiros produtores de cortiça de boa ou de má qualidade. O subgrupo I1-IIS2A é constituído por 5 sobreiros de Trás-os-Montes que produzem cortiça de má qualidade, enquanto que no subgrupo I1-IIS2B estão agrupados 4 sobreiros de Trás-os-Montes que produzem cortiça de boa qualidade. Nestes subgrupos existem, também, sobreiros de outras regiões que não possuem a cortiça classificada.

A matriz de semelhanças foi, também, estudada pela análise em coordenadas principais: as 315 árvores foram ordenadas num espaço definido pelas duas primeiras dimensões. A projecção dos pontos representativos das 315 árvores nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2 mostra as 315 OTUs divididas em 3 grupos (Figura 14). O grupo I1-IA constituído pelas duas azinheiras e os grupos I1-IIS1 e I1-IIS2 compostos por sobreiros. O resultado da análise em coordenadas principais confirmou a existência dos três grupos principais sugeridos pelo fenograma, não sendo possível identificar os subgrupos que compõem os grupos I1-IIS1 e I1-IIS2. Os seis sobreiros que não pertencem aos grupos I1-IIS1 e I1-IIS2 no fenograma não aparecem separados dos dois grupos de sobreiros formados na análise em coordenadas principais. Aos pontos correspondentes aos sobreiros nos gráficos da projecção a duas dimensões foram

atribuídas cores e texturas de acordo com a localização geográfica, grau de desfoliação (G.D.) ou qualidade da cortiça, para melhor visualização dos grupos e para facilitar a sua análise.

Os sobreiros do grupo I1-IIS1A no fenograma são todos da região do Algarve e estão identificados na figura 14. Na projecção segundo os dois primeiros eixos estes sobreiros não se encontram agrupados, mas há quatro sobreiros do grupo que estão localizados em áreas em que predominam sobreiros do Algarve e que foram assinaladas a sombreado no gráfico. A análise em coordenadas principais revelou, também, a existência de duas regiões no grupo I1-IIS2, assinaladas a sombreado na mesma figura. Numa região predominam sobreiros de Trás-os-Montes e na outra, sobreiros do Alentejo e Algarve. Os sobreiros do Algarve e Alentejo estão dispersos pelas duas áreas correspondentes aos grupos de sobreiros.

No gráfico da projecção dos pontos representativos das 315 árvores nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais, identificaram-se todos os sobreiros aos quais foi atribuído G.D. zero e assinalaram-se três áreas em que predominam sobreiros são (Figura 15).

Os cinco sobreiros de Trás-os-Montes do grupo I1-IIS2A do fenograma que produzem cortiça de má qualidade subdividem-se em dois subgrupos mais pequenos e ocupam posições afastadas na projecção em coordenadas principais (Figura 16). Contudo, quando se sobrepõe a árvore de expansão mínima, verifica-se que, na realidade, o sobreiro CS5.9M-1-M se encontra ligado ao sobreiro CS4.8M-1-M e que este, por sua vez, está ligado ao sobreiro CS5.39M-0-M? (Figura 16). A ordenação proposta pela árvore de expansão mínima confirma o agrupamento apresentado no fenograma relativamente a um dos subgrupos do grupo I1-IIS2A. Este método revelou, também, que o sobreiro CS5.9M-1-M está ligado à azinheira AA1SBA-0 e que os sobreiros CS9.8R-1-M e CS4.9M-2-M do grupo I1-IIS2A estão ligados aos sobreiros do Alentejo BS280HA-0-R e BS269HA-2-4^a, respectivamente, produtores de cortiça de má qualidade. O sobreiro BS280HA-0-R produziu cortiça classificada como refugo e a cortiça retirada ao sobreiro BS269HA-2-4^a foi classificada de 4^a categoria. Os marcadores AFLP comuns aos sobreiros do grupo I1-IIS2A que estão ligados entre si e à azinheira AA1SBA-0 são J6, J10, J24, J27, J40 e J55.

Na figura 16 foram assinaladas a tracejado duas regiões em que predominam sobreiros produtores de cortiça de boa qualidade.

Na projecção bidimensional o eixo 1 põe em contraste o grupo I1-IIS1 e o grupo I1-IIS2. Para analisar quais os caracteres que mais contribuíram para a formação destes grupos, projectaram-se os 57 marcadores AFLP nos eixos 1 e 2 (Figura 17; transparência). Os marcadores associados ao eixo 1 que mais contribuíram para a separação foram J38, J39, J40, J17, J34, J45, J53, J6, J55, J9, J51, J4, J33, J11, J43, J48, J15, J54 e J29 (Figura 17; transparência).

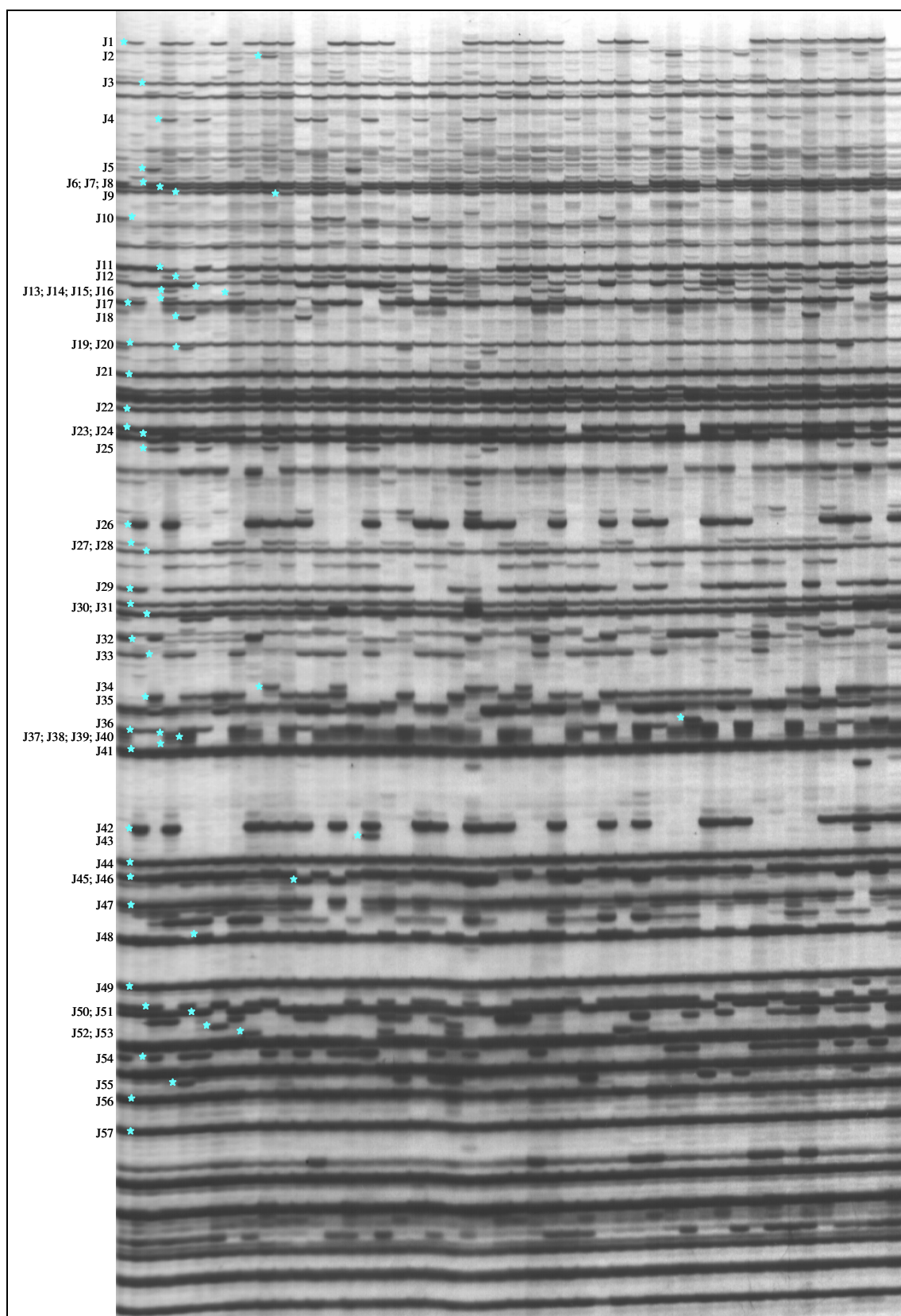


Figura 12. Separação por electroforese em gel de poliacrilamida dos fragmentos amplificados com o par de *primers* *Eco*RI-ACC/*Mse*I-ATT (combinação I1) na análise por AFLP, realizada em 47 sobreiros (colunas). Identificação (* azul) dos fragmentos que foram codificados na forma de ausência (0) ou presença (1) nas 315 árvores analisadas (313 sobreiros e 2 azinheiras) e que integraram a matriz de dados I1 [57 fragmentos AFLP (J1-J57) x 315 OTUs].

Tabela 3. Dados relativos aos fragmentos AFLP que foram obtidos por amplificação com a combinação de *primers* I1 e que foram seleccionados para a matriz original de dados I1. Coluna 1: código atribuído aos marcadores. Coluna 2: definição dos fragmentos AFLP como monomórficos (M) ou polimórficos (P). Coluna 3: determinação da presença, em percentagem, de cada um dos marcadores nos sobreiros das regiões do Algarve (A), Alentejo (B) e Trás-os-Montes (C). Coluna 4: identificação das azinheiras que possuem os fragmentos seleccionados. Coluna 5: valor do tamanho dos fragmentos indicado por ordem decrescente em pares de bases (pb), determinado por comparação com o marcador de massa molecular 30-330 pb ou por sequenciação (J17 e J42).

Fragmentos AFLP	M/P	Presença nos sobreiros (%)			Azinheiras	Tamanho (pb)		Fragmentos AFLP	M/P	Presença nos sobreiros (%)			Azinheiras	Tamanho (pb)
		A	B	C						A	B	C		
J1	P	58,4	71,4	70,4	-	>358	J30	M	100	100	100	-	>220	
J2	P	14,4	19,8	23,5	-	>358	J31	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	>220	
J3	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	>358	J32	P	16,0	15,4	19,4	-	>210	
J4	P	39,2	45,1	31,6	AA2A	>358	J33	P	46,4	40,7	48,0	-	>210	
J5	P	2,4	0,0	6,1	-	>358	J34	P	9,6	6,6	33,7	-	>200	
J6	P	94,4	95,6	93,9	AA1SBA;AA2A	>358	J35	P	64,8	65,9	55,1	-	200	
J7	M	100	100	100	-	>358	J36	P	3,2	4,4	7,1	-	>190	
J8	P	90,4	80,2	87,8	-	>358	J37	P	52,8	59,3	73,5	-	>190	
J9	P	8,8	14,3	14,3	-	>358	J38	P	61,6	65,9	73,5	-	>190	
J10	P	12,8	9,9	10,2	AA1SBA	>358	J39	P	61,6	67,0	73,5	-	>190	
J11	P	70,4	65,9	68,4	-	>358	J40	P	61,6	67,0	75,5	AA1SBA	>190	
J12	P	44,0	40,7	43,9	-	>358	J41	M	100	100	100	-	>180	
J13	P	33,6	20,9	33,7	-	>358	J42	P	46,4	44,0	19,4	-	171	
J14	P	36,0	25,3	42,9	-	>358	J43	P	7,2	9,9	0,0	-	170	
J15	P	7,2	5,5	1,0	-	>358	J44	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	>160	
J16	P	16,8	9,9	11,2	-	>358	J45	P	91,2	90,1	88,8	-	>160	
J17	P	91,2	94,5	90,8	-	358	J46	P	16,0	24,2	15,3	-	>160	
J18	P	12,8	7,7	1,0	-	>330	J47	P	93,6	94,5	99,0	-	>150	
J19	M	100	100	100	-	>330	J48	P	58,4	78,0	72,4	-	>150	
J20	P	9,6	9,9	2,0	-	330	J49	M	100	100	100	-	>140	
J21	M	100	100	100	-	>300	J50	P	66,4	71,4	56,1	-	>140	
J22	M	100	100	100	-	300	J51	P	88,0	78,0	90,8	AA1SBA;AA2A	140	
J23	P	98,4	97,8	99,0	-	290	J52	P	1,6	2,2	1,0	-	>130	
J24	P	39,2	53,8	52,0	AA1SBA	>280	J53	P	16,0	15,4	15,3	AA2A	>130	
J25	P	29,6	35,2	43,9	-	280	J54	P	43,2	39,6	50,0	-	>130	
J26	P	52,0	49,5	21,4	-	250	J55	P	20,0	22,0	28,6	AA1SBA;AA2A	130	
J27	P	56,8	48,4	71,4	AA1SBA;AA2A	>240	J56	P	97,6	97,8	99,0	-	>120	
J28	M	100	100	100	-	>240	J57	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	>120	
J29	P	74,4	67,0	65,3	-	230								

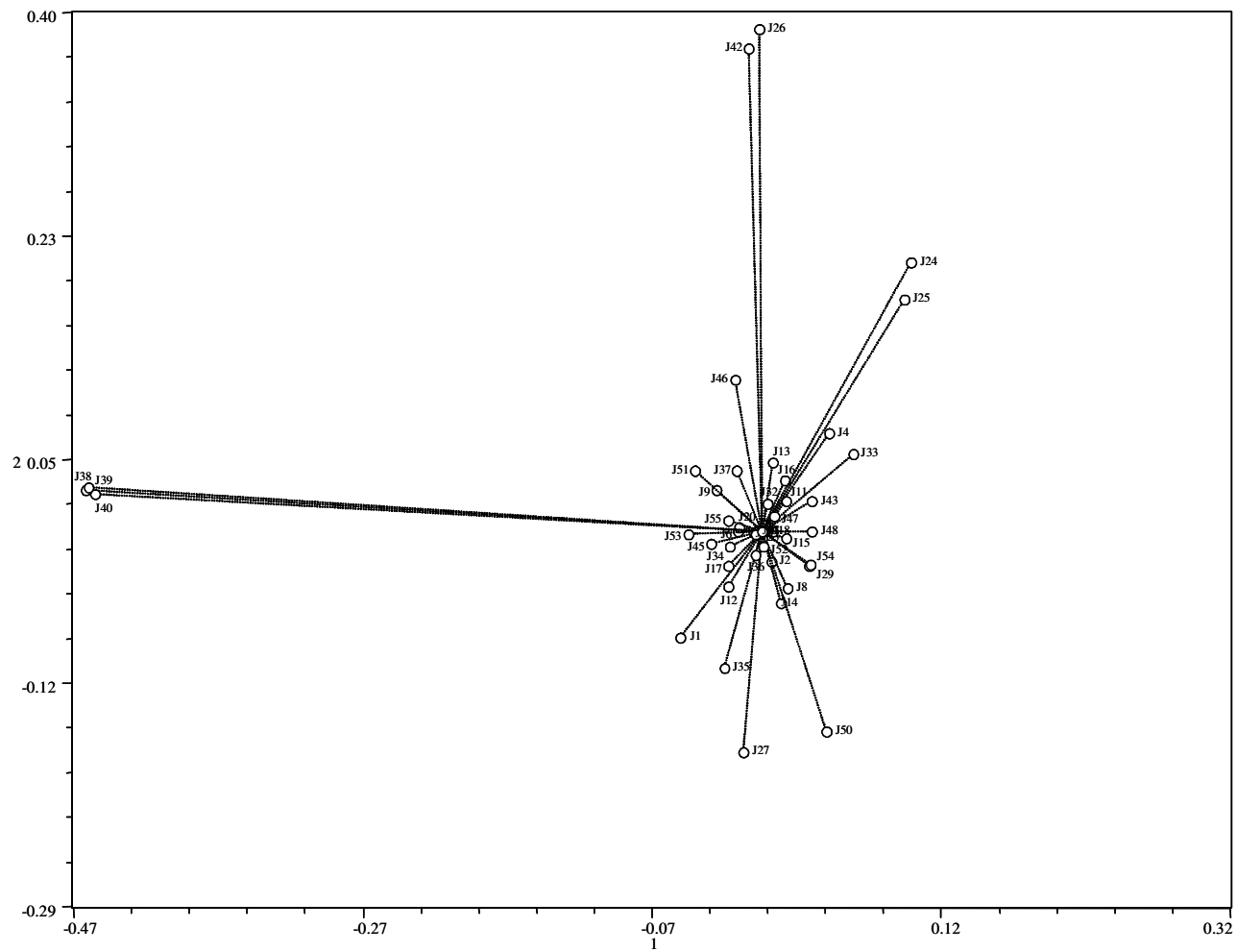


Figura 17. Projecção dos pontos representativos dos 57 marcadores AFLP (J1 a J57) nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2.

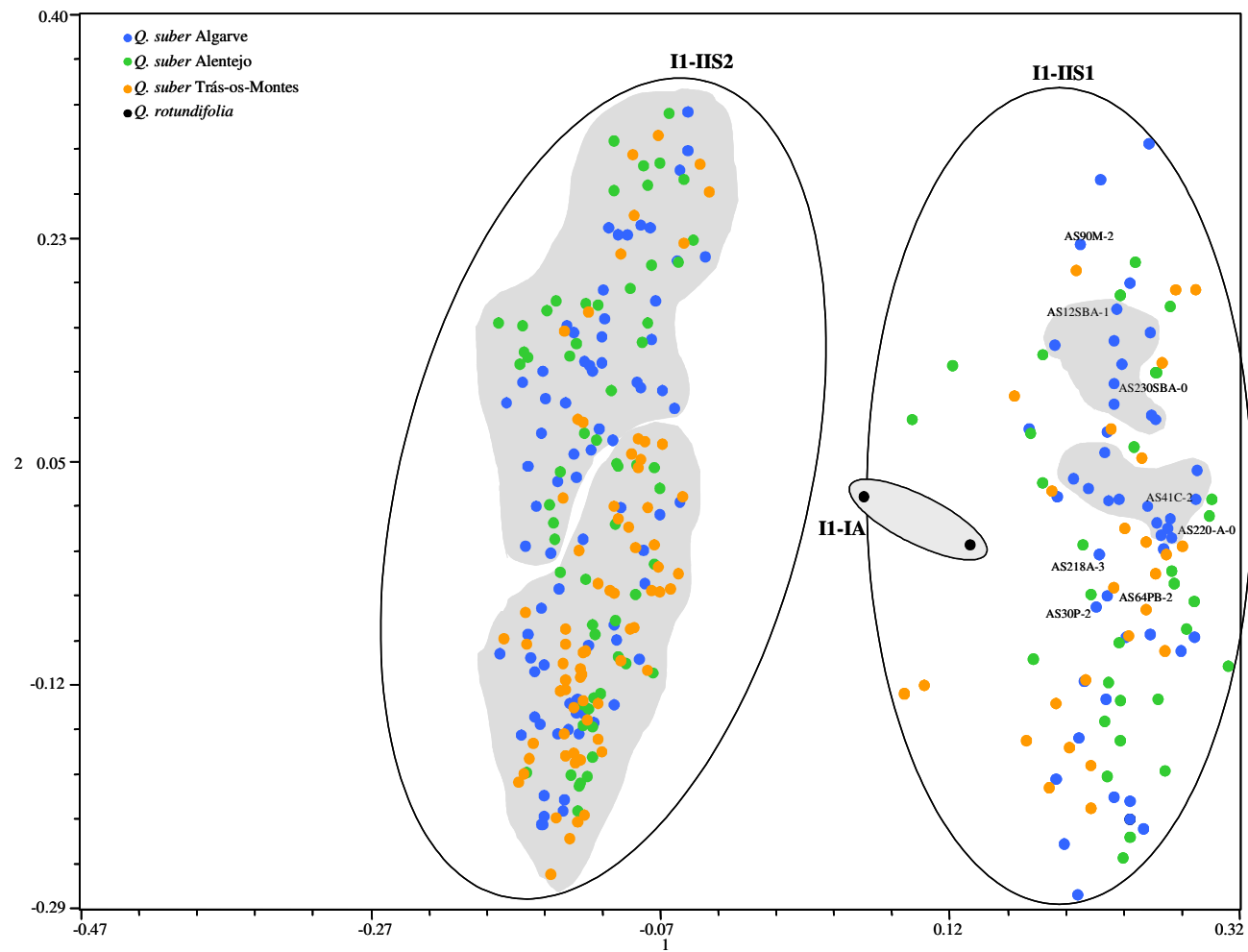


Figura 14. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais, baseada no coeficiente de *Jaccard*. A atribuição de cores consoante a origem geográfica das árvores está indicada no canto superior esquerdo da figura. Os grupos I1-IIS1, I1-IIS2 e I1-IA estão delimitados dentro das áreas assinaladas. Foi feita uma tentativa de delimitar subgrupos. Os sobreiros que integram o grupo I1-IIS1A no fenograma estão identificados.

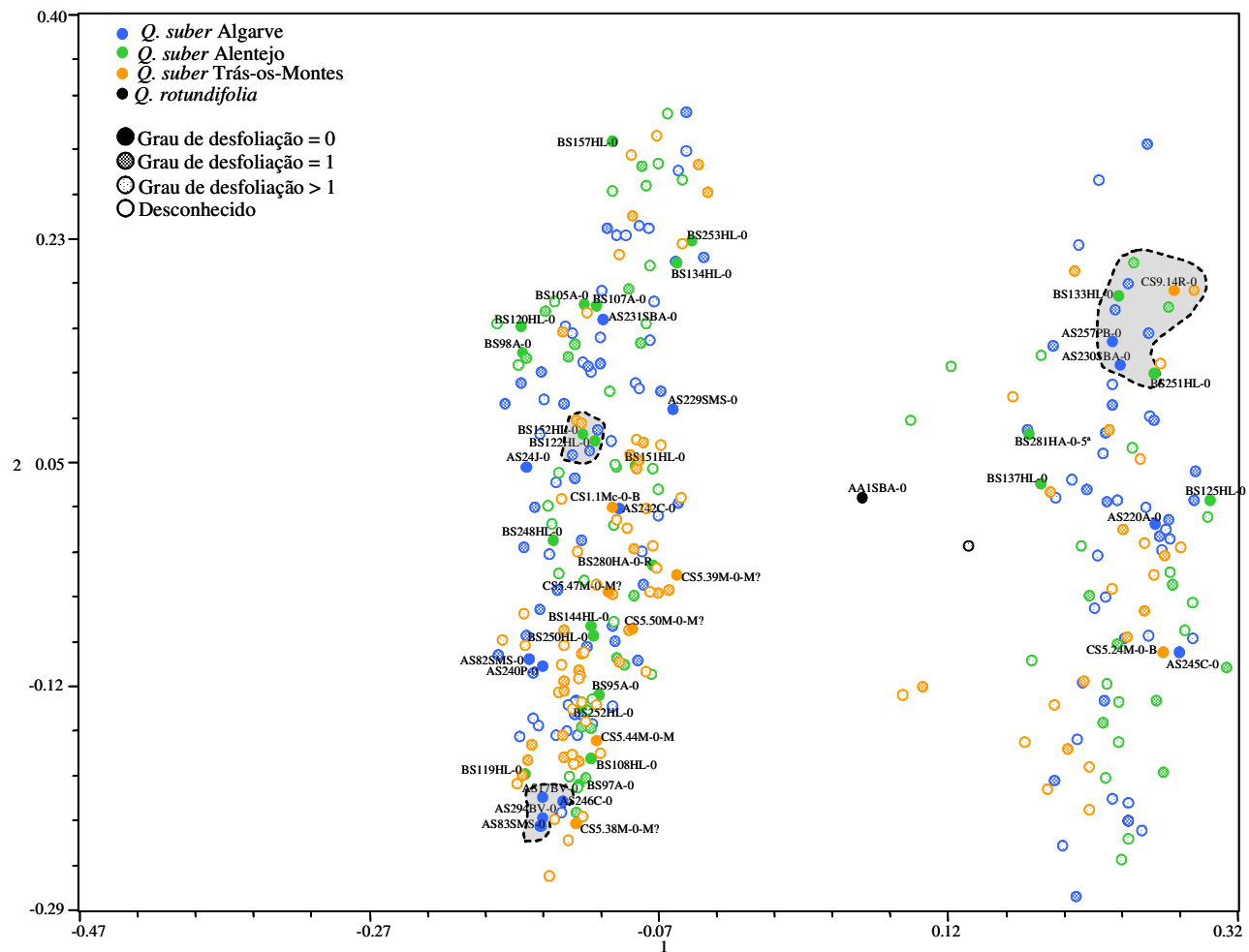


Figura 15. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais. A atribuição de padrões aos pontos para identificação do grau de desfoliação está indicada no canto superior esquerdo do gráfico. Os sobreiros com grau de desfoliação 0 estão identificados. Nas áreas a sombreado e delimitadas a tracejado predominam sobreiros com grau de desfoliação 0 ou 1.

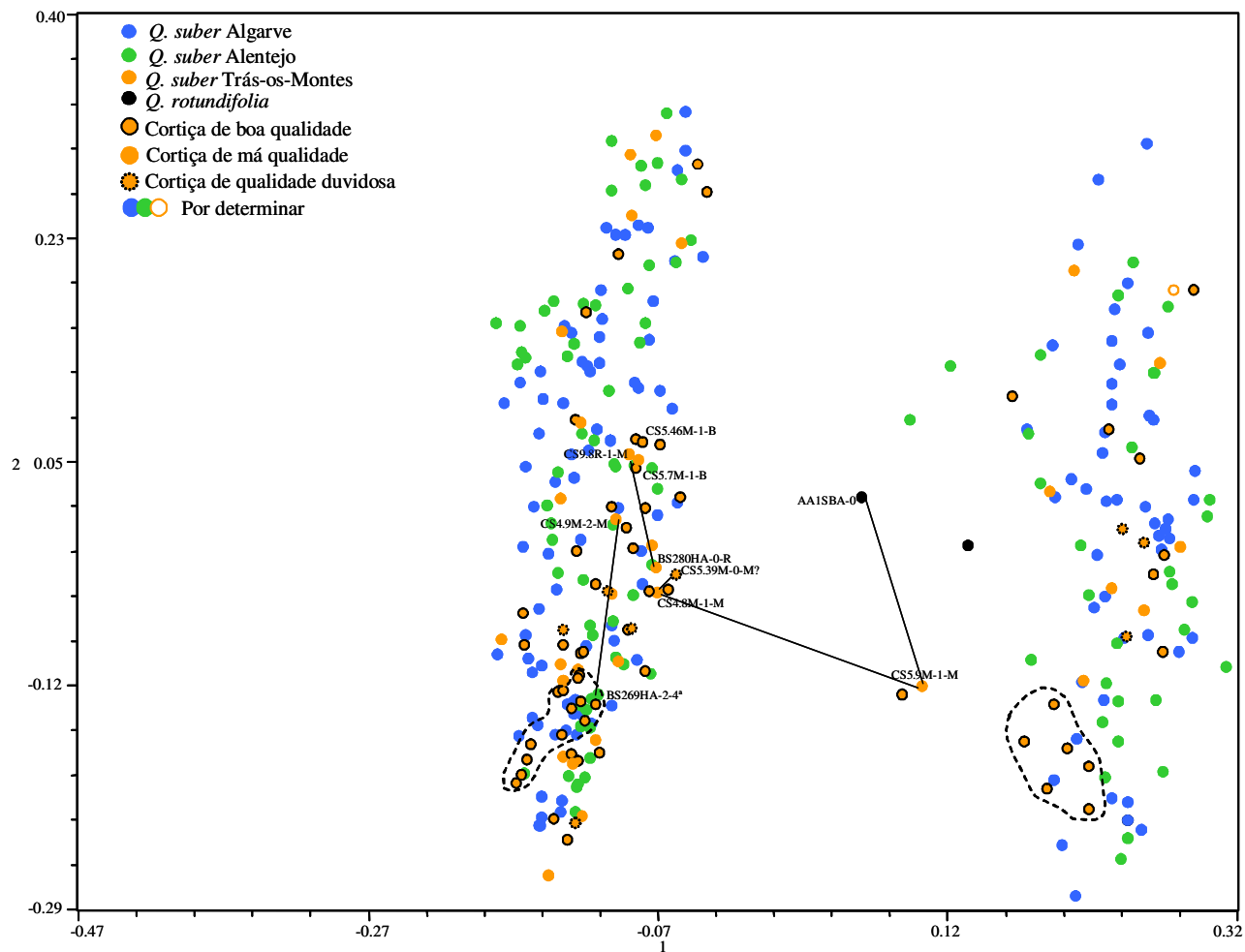


Figura 16. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais. A atribuição de padrões aos pontos, para identificação da qualidade da cortiça, está indicada no canto superior esquerdo do gráfico. Alguns dos sobreiros que integram os grupos I1-IIS2A e I1-IIS2B estão identificados. Nas áreas delimitadas a tracejado predominam sobreiros de Trás-os-Montes produtores de cortiça de boa qualidade. Mostra-se a ligação entre alguns sobreiros de acordo com a ordenação proposta pela árvore de expansão mínima.

I.4.1.1.2. AFLP-Amplificação I2.

A amplificação I2 foi realizada com o par de *primers* *EcoRI*-ACC/*MseI*-ACC. Após separação, por electroforese em gel de poliacrilamida, dos fragmentos amplificados foram seleccionados 55 fragmentos (K1-K55) para leitura e codificação nas 315 amostras. A figura 18 é a imagem autorradiográfica do gel de separação, com visualização dos fragmentos amplificados que incorporaram o *primer EcoRI*-ACC marcado radioactivamente e que foram seleccionados para integrar a matriz de dados I2. Dos fragmentos amplificados, 47 são polimórficos nas duas espécies e 41 são polimórficos em *Q. suber*, manifestando uma percentagem de polimorfismo de 85,5 % em *Q. suber* e *Q. rotundifolia* e de 74,5 % em *Q. suber* (Tabela 4). Os fragmentos K19 a K55 têm tamanho entre 90 e 330 pb, ao passo que os fragmentos K1 a K18 são mais longos que 330 pb. Nesta combinação observam-se dois marcadores (K20 e K42) que predominam no Algarve, com percentagens de presença, nos sobreiros desta região, mais de duas vezes superiores às de Trás-os-Montes. Só um destes fragmentos (K20) está presente nas duas azinheiras AA1SBA-0 e AA2A-2. O marcador K20 tem 274 pb e a sequência nucleotídica é 57,2 % semelhante à do gene do inibidor I da proteinase de *Solanum tuberosum*, na região em que se sobrepõem. O marcador K11 está ausente na população de sobreiros de Trás-os-Montes e presente na população de sobreiros do Algarve e do Alentejo nas percentagens 12,9 e 14,3, respectivamente. Este marcador específico de sobreiros do Sul de Portugal, está ausente nas duas azinheiras. Em oposição, os fragmentos K3, K18 e K39 predominam nos genomas dos sobreiros de Trás-os-Montes. Relativamente aos restantes marcadores, verifica-se que a frequência com que estão distribuídos pelas três regiões é semelhante (Tabela 4).

A matriz de semelhança baseada no coeficiente de *Jaccard* e criada a partir da matriz de dados I2 (55 marcadores AFLP x 315 OTUs) informa-nos sobre a semelhança genética existente entre cada par de OTUs. Nos sobreiros, o valor do coeficiente de semelhança varia entre 0,39 obtido para o par CS9.10R-2-M e CS5.30M-1-M e 0,94 obtido para os génotipos BS108HL-0 e AS88SBA-1. Os dois sobreiros mais semelhantes de Trás-os-Montes são o par CS5.6M-1-M e CS4.9M-2-M da população de Morais e os sobreiros CS9.29R-2-M e CS9.7R-2-M de Romeu, enquanto que no Algarve os sobreiros mais semelhantes correspondem ao par AS58PL-3 e AS243C-2 e ao par AS288SBA-1 e AS61PB-3 e no Alentejo ao par BS247HL-4 e BS282 HA-1-3^a.

O menor coeficiente de semelhança (0,22) foi encontrado entre duas árvores de espécies diferentes, a azinheira AA1SBA-0 de S. Brás de Alportel (Algarve) e o sobreiro CS9.8R-1-M de Morais (Trás-os-Montes).

Na análise em coordenadas principais, as 315 OTUs foram projectadas no plano definido pelos eixos 1 e 2, observando-se uma tendência para uma separação dos sobreiros em quatro grupos. Foram delimitadas, a sombreado, as áreas do gráfico com maior concentração de pontos representativos das árvores, não pretendendo designá-las como grupos. As áreas referidas foram identificadas como I2-IISA, I2-IISB, I2-IISC e I2-IISD na figura 19. A definição de grupos, com identificação dos sobreiros que pertencem a cada grupo, foi dificultada pela existência de pontos projectados entre as áreas mais povoadas.

A separação dos pontos projectados nestas áreas não parece estar relacionada com a localização geográfica porque existem, distribuídos pelas quatro áreas, sobreiros de Trás-os-Montes, Algarve e Alentejo (Figura 19). Também não é evidente que a sua separação esteja relacionada com o vigor vegetativo indicado pelo grau de desfoliação de cada uma das árvores localizadas na mesma região. Nas áreas I2-IISA, I2-IISB, I2-IISC, e I2-IISD existem sobreiros saudáveis oriundos das três regiões geográficas estudadas, assim como sobreiros doentes (Figura 20). A projecção dos pontos correspondentes aos sobreiros de Trás-os-Montes produtores de cortiça de boa qualidade ocorreu nas quatro áreas, não podendo relacionar-se a sua formação com a qualidade da cortiça (Figura 21).

De acordo com a projecção dos pontos representativos dos 55 marcadores AFLP no plano definido pelos eixos principais 1 e 2 (Figura 22), os marcadores AFLP que contribuíram para a projecção dos pontos nas quatro áreas foram:

- área I2-IISA: K7, K31, K11, K39, K52, K47 e K46;
- área I2-IISB: K14, K12, K15, K18, K45, K8 e K23;
- área I2-IISC: K43, K44, K21, K26, K38, K5, K3 e K37;
- área I2-IISD: K49, K50, K42, K16, K28, K32, K22, K10, K20 e K19.

O fenograma que resultou da análise de grupos pelo método UPGMA possui dois ramos distintos, um que agrupa as duas azinheiras e outro que agrupa os sobreiros. O sobreiro BS155HL-1 está num ramo isolado, ligado à base de separação dos dois grupos principais e os restantes sobreiros formam um grande grupo subdividido em

vários grupos mais pequenos. No fenograma (Figura 23) identificaram-se os grupos formados pelos sobreiros projectados nas áreas I2-IISA, I2-IISB, I2-IISC e I2-IISD, definidas nos gráficos resultantes da projecção da análise em coordenadas principais. Os grupos do fenograma aos quais não foram atribuídas letras incluem sobreiros que foram projectados em áreas diferentes, uns na área A e outros na área B, por exemplo.

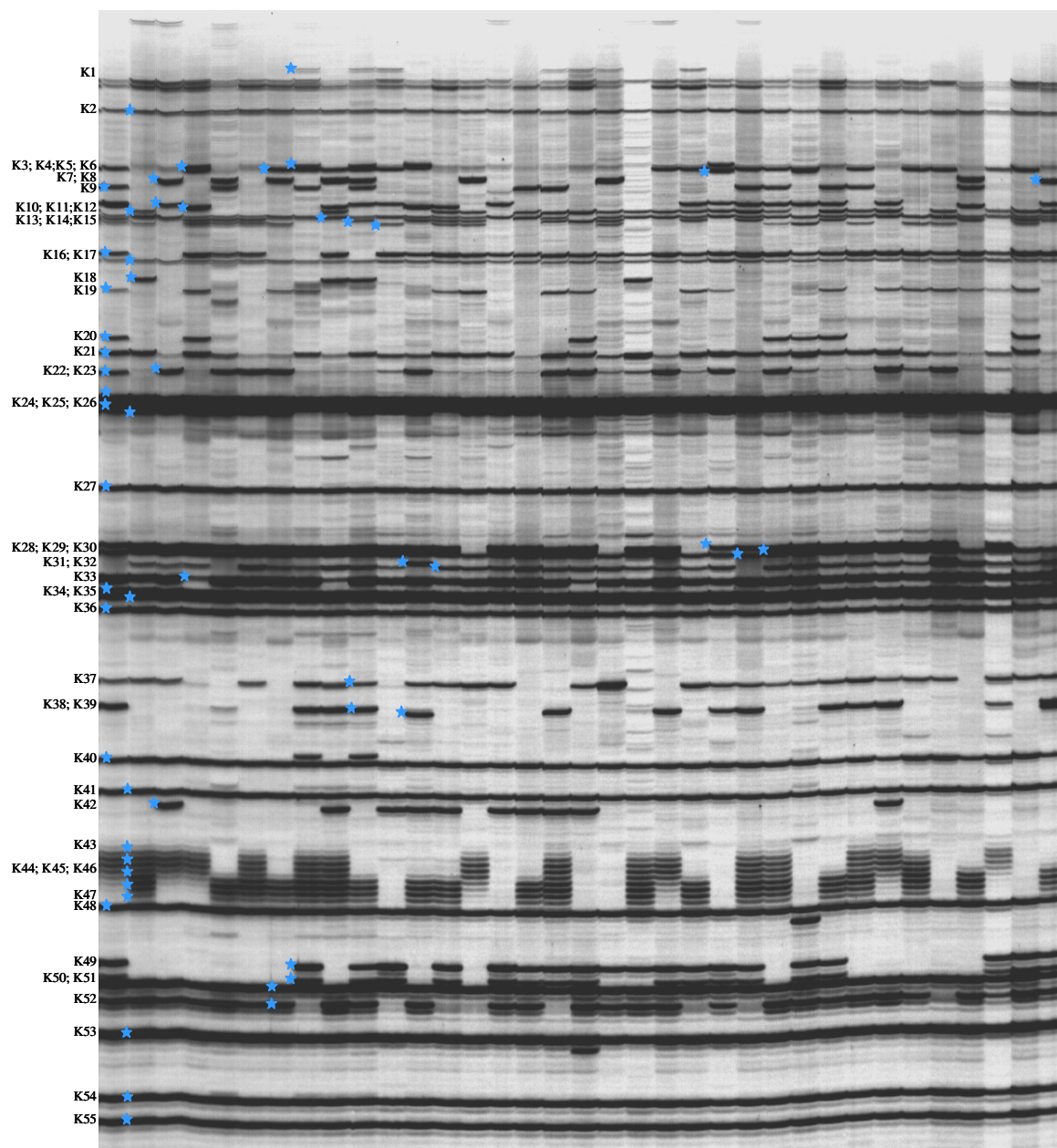


Figura 18. Separação por electroforese em gel de poliacrilamida dos fragmentos amplificados com os *primers* *EcoRI*-ACC/*MseI*-ACC (combinação I2) na análise por AFLP, realizada em 35 sobreiros (colunas). Os fragmentos que foram codificados e que integraram a matriz de dados I2 [55 fragmentos AFLP (K1-K55) x 315 OTUs] estão identificados com um asterisco azul.

Tabela 4. Dados relativos aos fragmentos AFLP que foram obtidos por amplificação com a combinação de *primers* I2 e que foram seleccionados para a matriz original de dados I2. Coluna 1: código atribuído aos marcadores. Coluna 2: definição dos fragmentos AFLP como monomórficos (M) ou polimórficos (P). Coluna 3: determinação da presença, em percentagem, de cada um dos marcadores nos sobreiros das regiões do Algarve (A), Alentejo (B) e Trás-os-Montes (C). Coluna 4: identificação das azinheiras que possuem os fragmentos seleccionados. Coluna 5: valor do tamanho dos fragmentos indicado por ordem decrescente em pares de bases (pb), determinado por comparação com o marcador de massa molecular 30-330 pb ou por sequenciação (K20, K22, K27 e K31).

Fragmentos AFLP	M/P	Presença nos sobreiros (%)			Azinheiras	Tamanho (pb)		Fragmentos AFLP	M/P	Presença nos sobreiros (%)			Azinheiras	Tamanho (pb)
		A	B	C						A	B	C		
K1	P	18,5	12,1	13,3	-	>330	K29	P	59,7	40,7	31,6	AA1SBA	>201	
K2	M	100	100	100	-	>330	K30	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	>201	
K3	P	12,9	8,8	28,6	AA2A	>330	K31	P	10,5	11,0	6,1	-	201	
K4	P	4,8	2,2	1,0	-	>330	K32	P	87,1	64,8	90,8	AA1SBA;AA2A	200	
K5	P	47,6	59,3	54,1	-	>330	K33	P	86,3	87,9	77,6	AA1SBA;AA2A	>190	
K6	P	4,0	5,5	6,1	AA1SBA	>330	K34	M	100	100	100	-	>190	
K7	P	15,3	16,5	9,2	-	>330	K35	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	>190	
K8	P	12,1	19,8	17,3	-	>330	K36	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	>180	
K9	P	22,6	28,6	21,4	-	>330	K37	P	73,4	72,5	76,5	-	170	
K10	P	29,0	25,3	33,7	-	>330	K38	P	33,1	29,7	34,7	-	>160	
K11	P	12,9	14,3	0,0	-	>330	K39	P	10,5	13,2	20,4	-	>160	
K12	P	53,2	52,7	58,2	-	>330	K40	P	99,2	100	96,9	-	>150	
K13	P	92,7	94,5	76,5	AA1SBA;AA2A	>330	K41	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	>140	
K14	P	41,9	36,3	68,4	-	>330	K42	P	19,4	12,1	7,1	-	>140	
K15	P	60,5	54,9	52,0	-	>330	K43	P	29,8	30,8	42,9	?	>130	
K16	P	83,1	80,2	78,6	AA2A	>330	K44	P	36,3	37,4	49,0	?	>130	
K17	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	>330	K45	P	62,1	68,1	71,4	?	130	
K18	P	9,7	11,0	24,5	-	>330	K46	P	52,4	47,3	39,8	AA2A	>120	
K19	P	42,7	46,2	44,9	-	330	K47	P	54,8	49,5	43,9	AA1SBA;AA2A	>120	
K20	P	18,5	12,1	8,2	AA1SBA;AA2A	298	K48	M	100	100	100	-	>120	
K21	P	58,1	58,2	76,5	-	290	K49	P	60,5	62,6	46,9	AA1SBA;AA2A	>110	
K22	P	25,0	42,9	38,8	-	279	K50	P	52,4	56,0	32,7	AA1A	>110	
K23	P	0,0	7,7	5,1	-	>270	K51	P	99,2	100	100	-	>110	
K24	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	>260	K52	P	59,7	72,5	45,9	-	>110	
K25	M	100	100	100	-	260	K53	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	>100	
K26	P	58,1	69,2	75,5	-	>250	K54	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	100	
K27	M	100	100	100	-	225	K55	M	100	100	100	-	>90	
K28	P	72,6	64,8	64,3	-	>201								

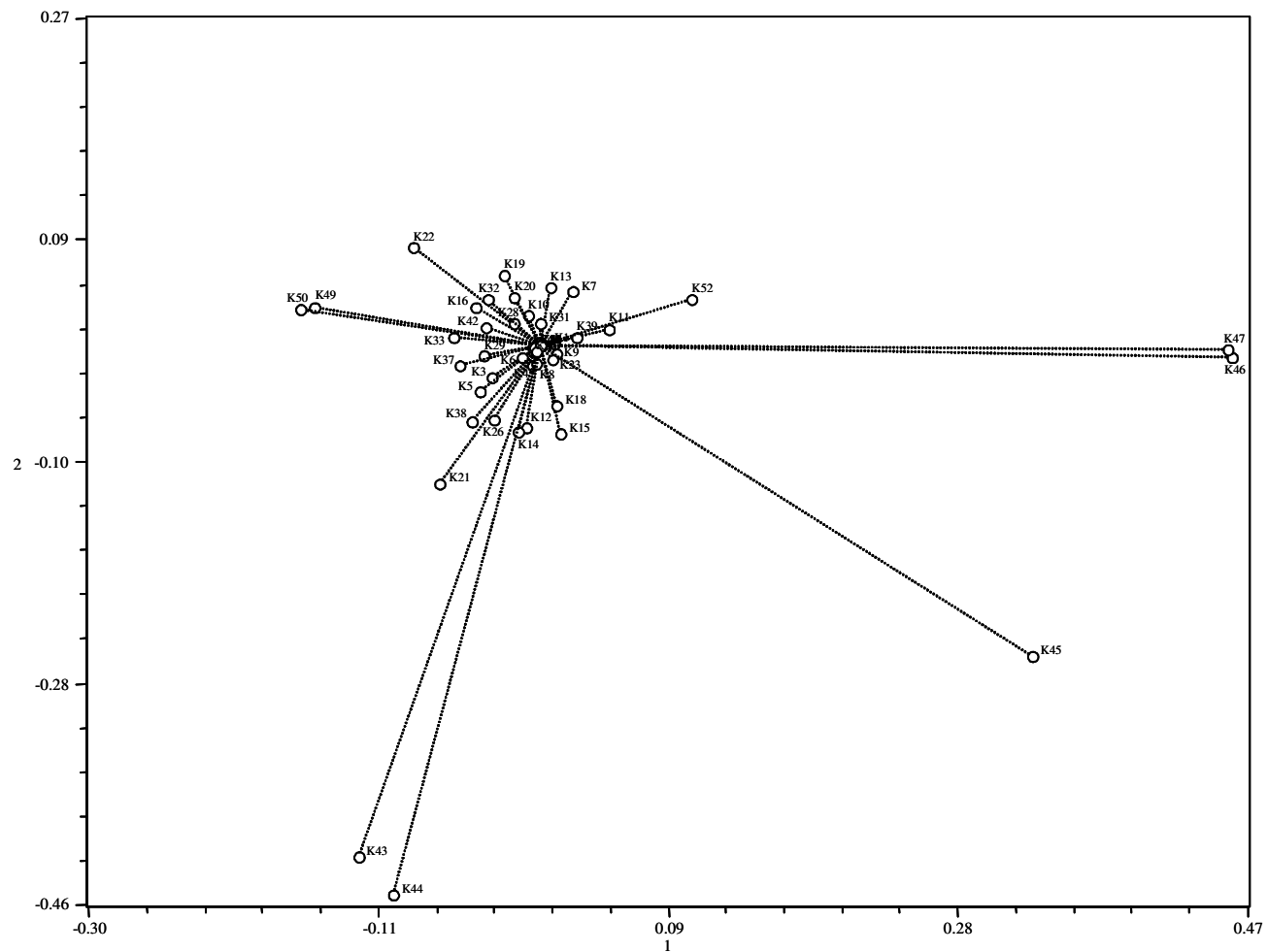


Figura 22. Projecção dos pontos representativos dos 55 marcadores AFLP (K1 a K55) nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2.

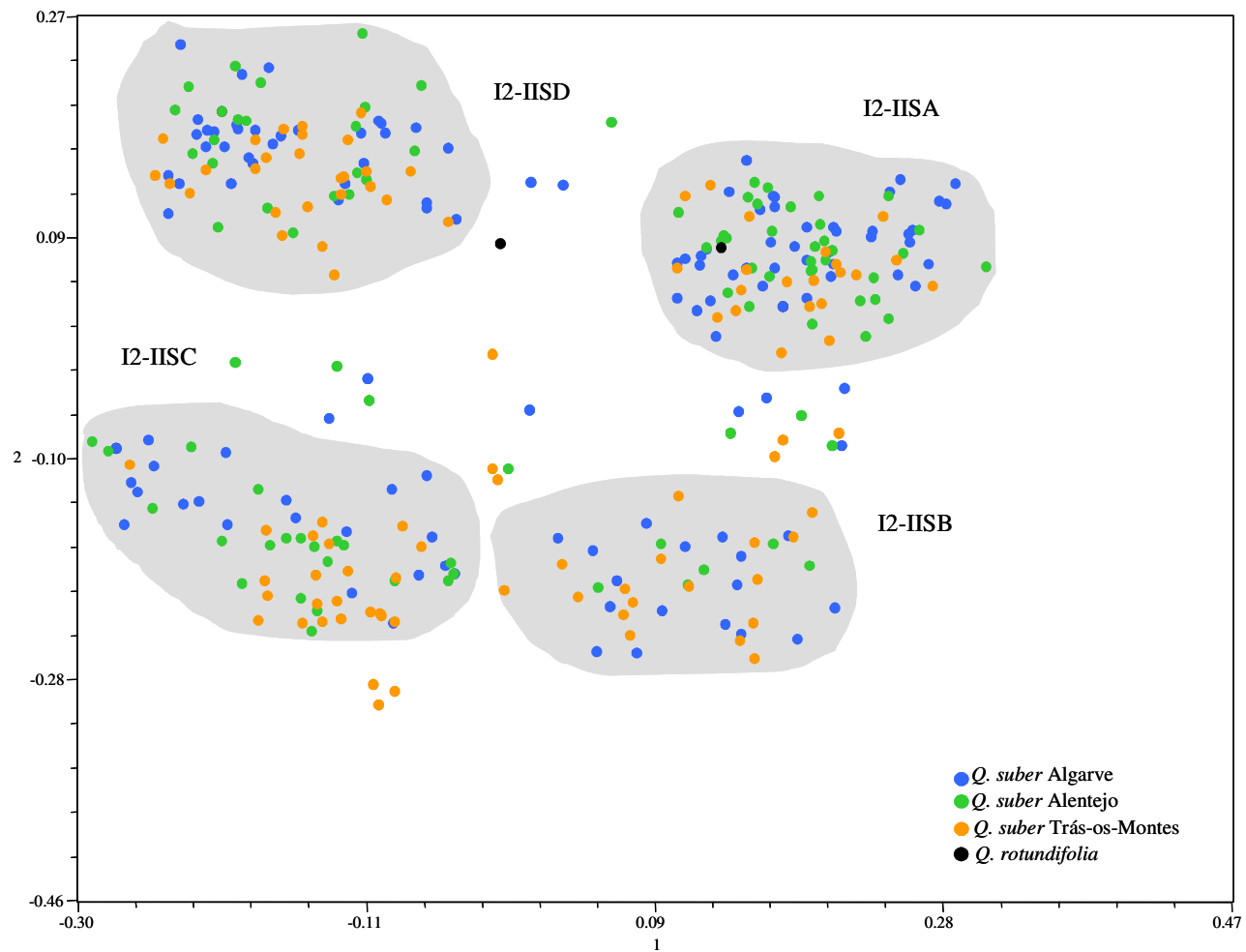


Figura 19. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais, baseada no coeficiente de *Jaccard*. A atribuição de cores consoante a origem geográfica das árvores está indicada no canto inferior direito da figura. As áreas com maior concentração de pontos estão sombreadas e identificadas como I2-IISA, I2-IISB, I2-IISC e I2-IISD.

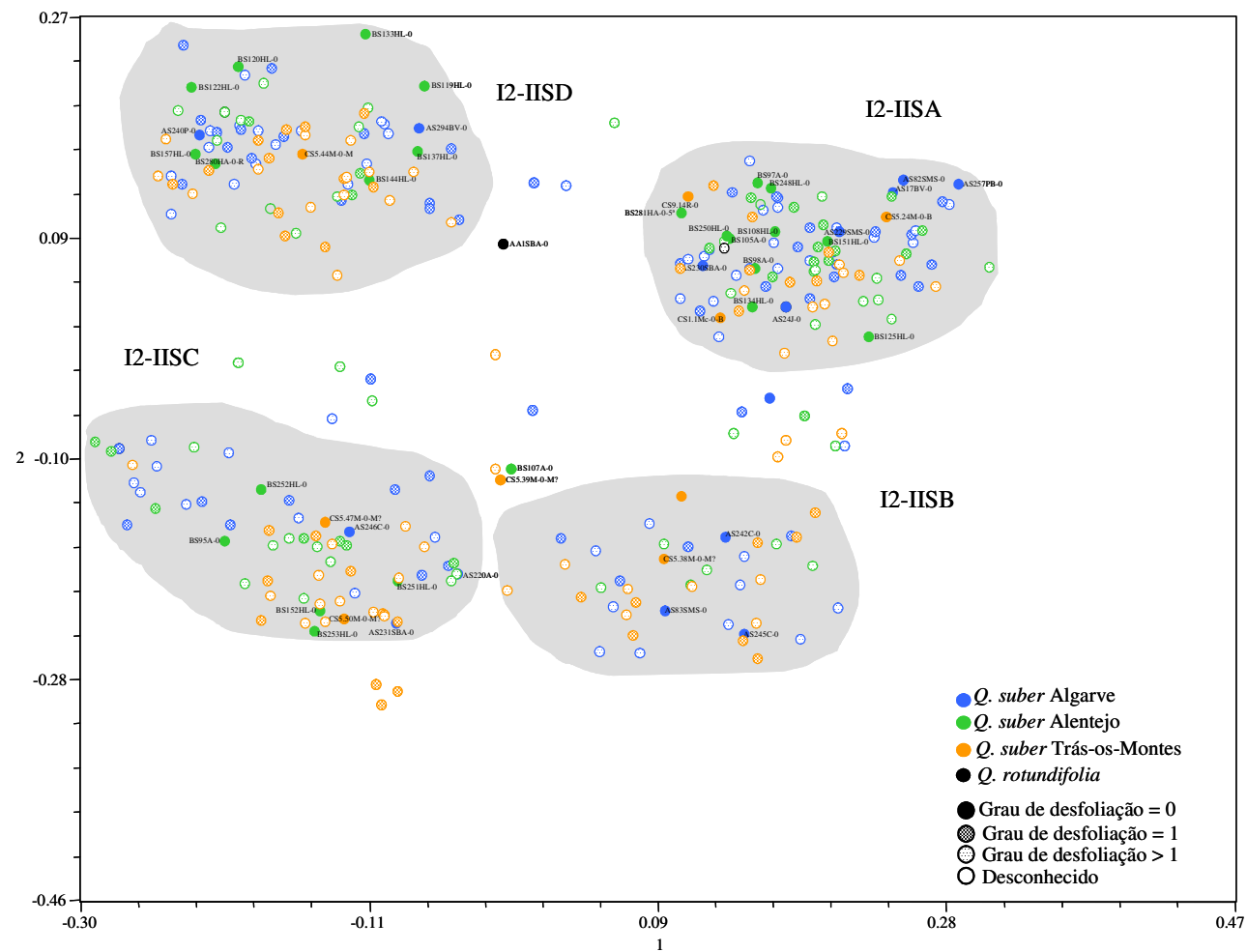


Figura 20. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais. A atribuição de padrões aos pontos para identificação do grau de desfoliação está indicada no canto inferior direito. As áreas com maior concentração de pontos estão sombreadas e identificadas como I2-IISA, I2-IISB, I2-IISC e I2-IISD. Os sobreiros com grau de desfoliação 0 estão identificados.

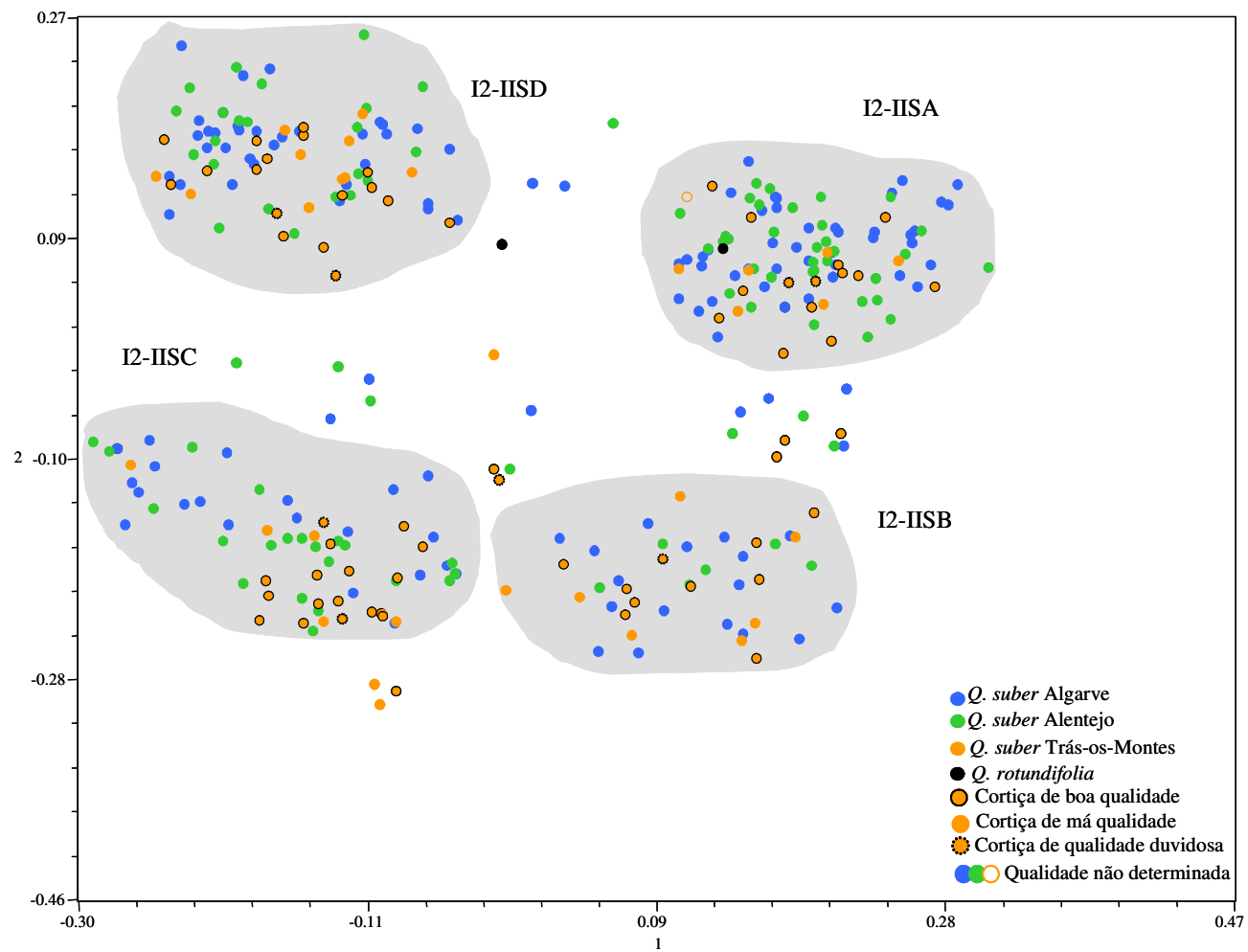


Figura 21. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais. A atribuição de padrões aos pontos para identificação da qualidade da cortiça dos sobreiros de Trás-os-Montes está indicada no canto inferior direito. As áreas com maior concentração de pontos estão sombreadas e identificadas como I2-IISA, I2-IISB, I2-IISC e I2-IISD.

I.4.1.1.3. AFLP-Amplificações I3 e I10.

As amplificações I3 e I10 deram origem a matrizes de dados de 315 OTUs x 72 marcadores AFLP e 315 OTUs x 51 marcadores AFLP, respectivamente. Os *primers* usados na amplificação I3 foram *EcoRI*-ACG/*MseI*-ACC e os fragmentos seleccionados para leitura, denominados L1 a L72 são apresentados na figura 24, com excepção de L10 e L14, fragmentos que não foram amplificados em nenhuma das árvores representadas na imagem. A figura 25 mostra o resultado da análise I10 realizada com os *primers* *EcoRI*-ACC/*MseI*-TTG em DNA de vinte e três sobreiros. Nesta figura estão identificados os fragmentos que foram seleccionados (N1 a N50) com excepção do fragmento N7 que não foi amplificado nos sobreiros da imagem do perfil da análise AFLP. Estes fragmentos integram a matriz de dados original I10 assim como, o fragmento N51, seleccionado a partir da análise de outras árvores.

Tal como foi referido para as amplificações I1 e I2, calcularam-se matrizes de semelhança a partir das matrizes originais I3 e I10, com base no coeficiente de *Jaccard*, para quantificação do grau de parecença existente entre as 315 árvores e procedeu-se à análise de grupos e à análise em coordenadas principais.

A ordenação das 315 árvores no espaço definido pelos eixos principais 1 e 2, resultante da análise em coordenadas principais para a combinação I3 e I10, revela que não há formação de grupos (Figura 26 e 27). Na projecção resultante desta análise num espaço bidimensional, os sobreiros estão dispersos por todo o plano, contrariamente aos resultados obtidos para as análises por AFLP das combinações I1 e I2, em que foi observada uma tendência para a formação de dois e quatro grupos, respectivamente.

As relações fenéticas existentes entre as árvores foram visualizadas nos fenogramas que resultaram da análise de grupos aplicada às matrizes de semelhança originais I3 e I10. Nos fenogramas das combinações AFLP I3 e I10, as 315 árvores estão separadas em dois grupos, o das azinheiras e o dos sobreiros, estando por sua vez, o grupo dos sobreiros, subdividido em vários subgrupos (Figuras 28 e 29). Na combinação I3 o grupo dos sobreiros designa-se I3-IIS e o das azinheiras I3-IA; na combinação I10 o grupo dos sobreiros designa-se I10-IIS e o das azinheiras I10-IA. Os grupos apresentados no fenograma resultantes do agrupamento pelo método UPGMA sofreram distorção, tal como indicam os valores obtidos para os coeficientes de

correlação cofenética (r): 0,81465 para a combinação AFLP I3 e 0,75234 para a combinação I10.

Nos sobreiros, o valor do coeficiente de semelhança varia entre 0,94 (genótipos BS267HA-2-2^a e BS100A-2) e 0,55 (pares de OTUs CS5.7M-1-B/AS289PB-3, CS5.7M-1-B/BS116HL-2 e CS5.31M-1-B/AS44C-1) na combinação I3. Na combinação I10 o coeficiente de *Jaccard* varia entre 1,00 (pares de sobreiros AS83SMS-0/AS26BV-1, BS142HL-1/BS114HL-1 e CS5.31M-1-B/BS136HL-2) e 0,60 (genótipos BS99A-2/AS60PB-2, BS100A-2/AS67PB-1, BS101A-2/AS8SBA-2, BS266HA-2-5^a/AS231SBA-0 e CS9.27R-2-M/CS5.16M-2-B). De acordo com o valor máximo do coeficiente de *Jaccard* obtido para 3 pares de sobreiros na combinação I10, constata-se que os 51 marcadores AFLP obtidos nesta combinação não foram suficientes para diferenciar os genótipos destes sobreiros. Os genótipos menos semelhantes são os de espécies diferentes ou seja, o par AA2A-2/AS72SMS-1 na combinação I3 e o par AA1SBA-0/BS117HL-1 na combinação I10.

Apesar da distorção associada aos grupos presentes no fenograma, seleccionaram-se seis grupos na combinação I3 e dois na combinação I10, que possuem sobreiros potencialmente interessantes em relação à tolerância à doença do declínio ou à qualidade da cortiça ou que estão agrupados de acordo com a origem geográfica. Os agrupamentos relacionados com a origem geográfica têm interesse porque podem ter por base marcadores AFLP específicos de determinada região e que tenham relação com a adaptação ao meio. Os grupos I3-IISA, I3-IISB, I3-IISC, I3-IISD e I3-IISE caracterizam-se por agruparem sobreiros com a mesma origem geográfica (Algarve, Alentejo ou Trás-os-Montes) (Figura 28). A produção de cortiça de boa qualidade caracteriza os sobreiros do grupo I3-IISF. O grupo I10-IISB inclui três sobreiros saudáveis (G.D.= 0) e um sobreiro com G.D.= 1, localizados no Algarve e em oposição, o grupo I10-IISA é constituído por três sobreiros oriundos, também do Algarve, mas que apresentam valores de desfoliação entre 61 % e 90 % (Figura 29).

A tabela 5 apresenta os dados relativos aos marcadores L1 a L72 e a tabela 6 apresenta os dados dos marcadores N1 a N51. Na sua composição é feita referência aos tamanhos dos fragmentos em pares de bases, à percentagem da frequência destes marcadores nos sobreiros das populações do Algarve, Alentejo e Trás-os-Montes, à classificação dos marcadores como monomórficos ou polimórficos e à presença dos marcadores nas azinheiras. A percentagem de polimorfismo observada em *Q. suber* na combinação I3 é de 72,2 % relativa à razão de 52 bandas polimórficas por 72 bandas

amplificadas e seleccionadas. Na combinação I10 a percentagem de polimorfismo observada nos sobreiros é de 58,8 %. Os marcadores L57 e N7 possuem percentagens de presença na amostragem inferiores a 10 %, são específicos das populações do Algarve e Alentejo e estão ausentes na população de Trás-os-Montes e nas azinheiras. O marcador N15 também está ausente na população de Trás-os-Montes, existe em 10 % dos sobreiros do Algarve e nas duas azinheiras e foi encontrado apenas num sobreiro do Alentejo. Existem vários marcadores que não são específicos, mas que predominam nos sobreiros de determinada região tais como o L17, L19, L21, L22, L24, L31, L41, L53, L69, N4, N6, N11, N33 e N51.

O fragmento polimórfico N33 predomina nos sobreiros do Alentejo e a sua sequência nucleotídica foi determinada. Este marcador tem 188 pb e apresenta uma homologia de 80 % com um gene duma potencial permease (ID:AF275345) do tomate (*Lycopersicon esculentum*), nos 71 nucleótidos em que se sobrepõem. A sequência nucleotídica do fragmento L23, monomórfico nos sobreiros, também foi determinada. Possui 309 pb e tem uma homologia de 57 % com a sequência do microssatélite MRG4222 de *Oryza sativa* que contém 41 repetições do par TA (ID: AY021897), em 239 nucleótidos (Tabela 8).

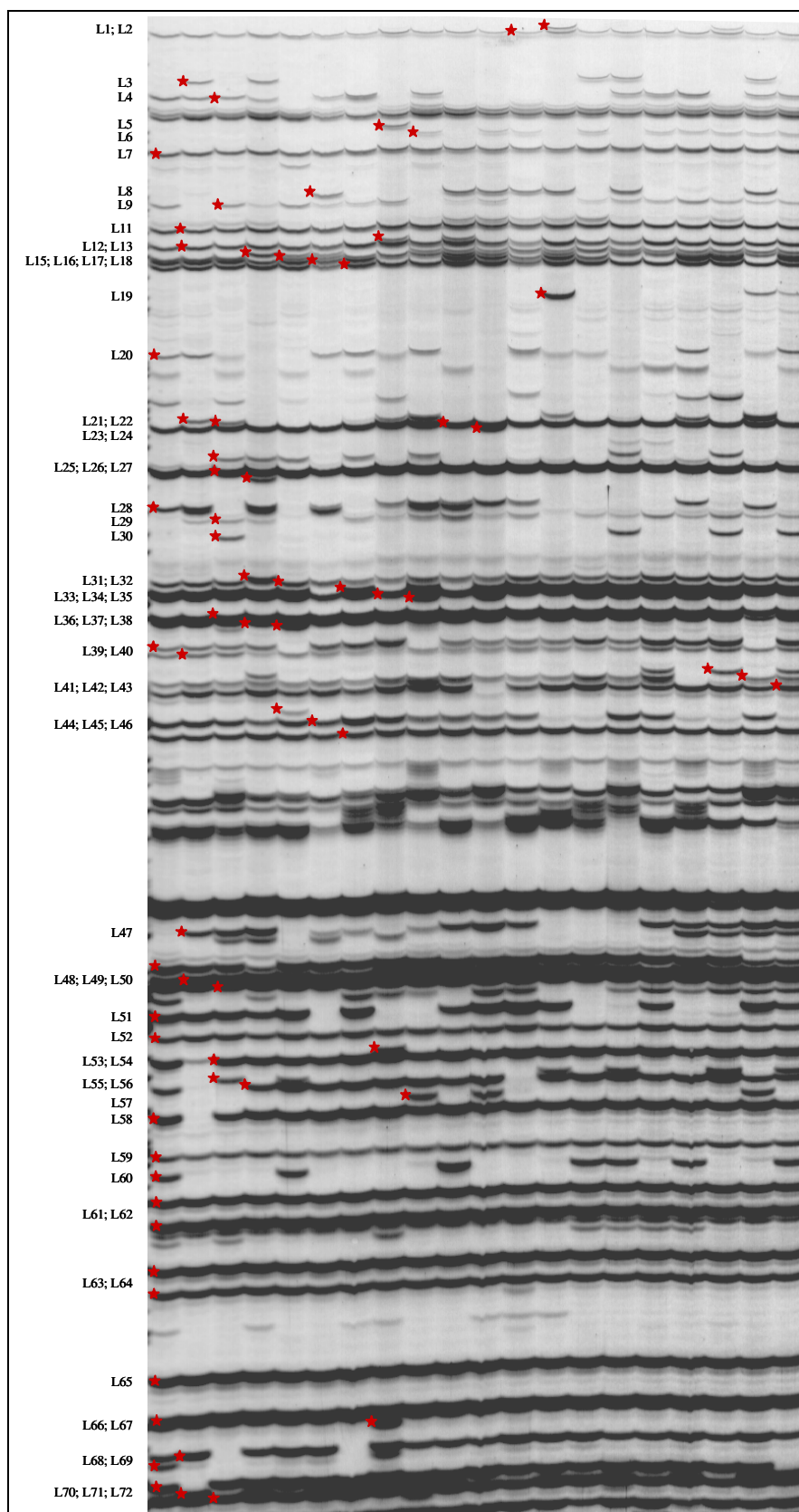


Figura 24. Separação por electroforese em gel de poliacrilamida dos fragmentos amplificados com os *primers* *Eco*RI-ACG/*Mse*I-ACC (combinação I3) na análise por AFLP, realizada em 20 sobreiros (colunas). Identificação (* vermelho) dos fragmentos L1-L72, com excepção do L10 e L14, que foram seleccionados e que integraram a matriz de dados I3 [72 fragmentos AFLP (L1-L72) x 315 OTUs].

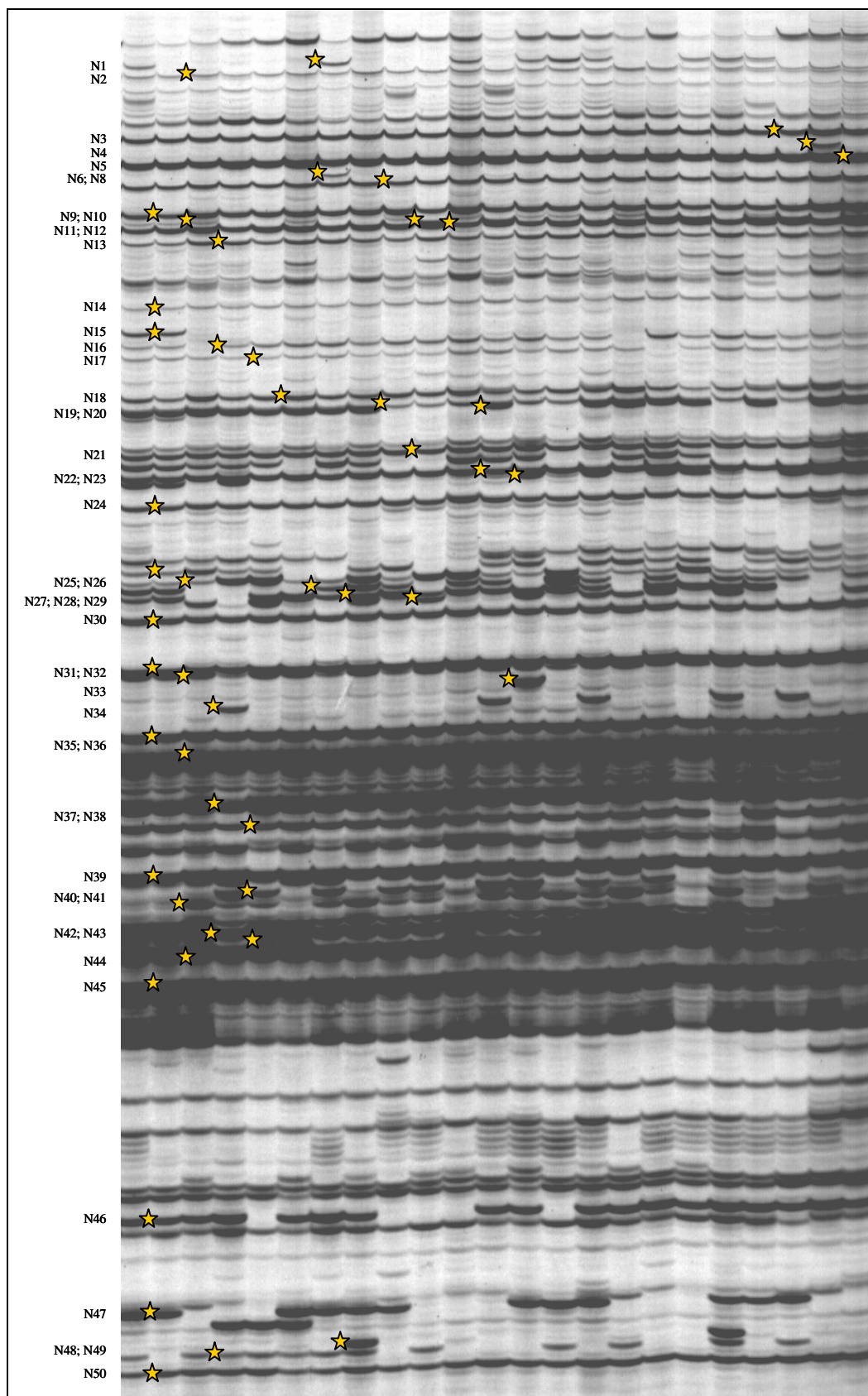


Figura 25. Separação por electroforese em gel de poliacrilamida dos fragmentos amplificados com os *primers* *EcoRI*-ACC/*MseI*-TTG (combinação I10), na análise por AFLP, realizada em 23 sobreiros (colunas). Identificação (* amarelo) dos fragmentos N1-N50; com excepção do N7, que foram codificados e que integraram a matriz de dados I10 [51 fragmentos AFLP (N1-N51) x 315 OTUs]. O fragmento N51, seleccionado a partir da análise doutras árvores, também integra esta matriz.

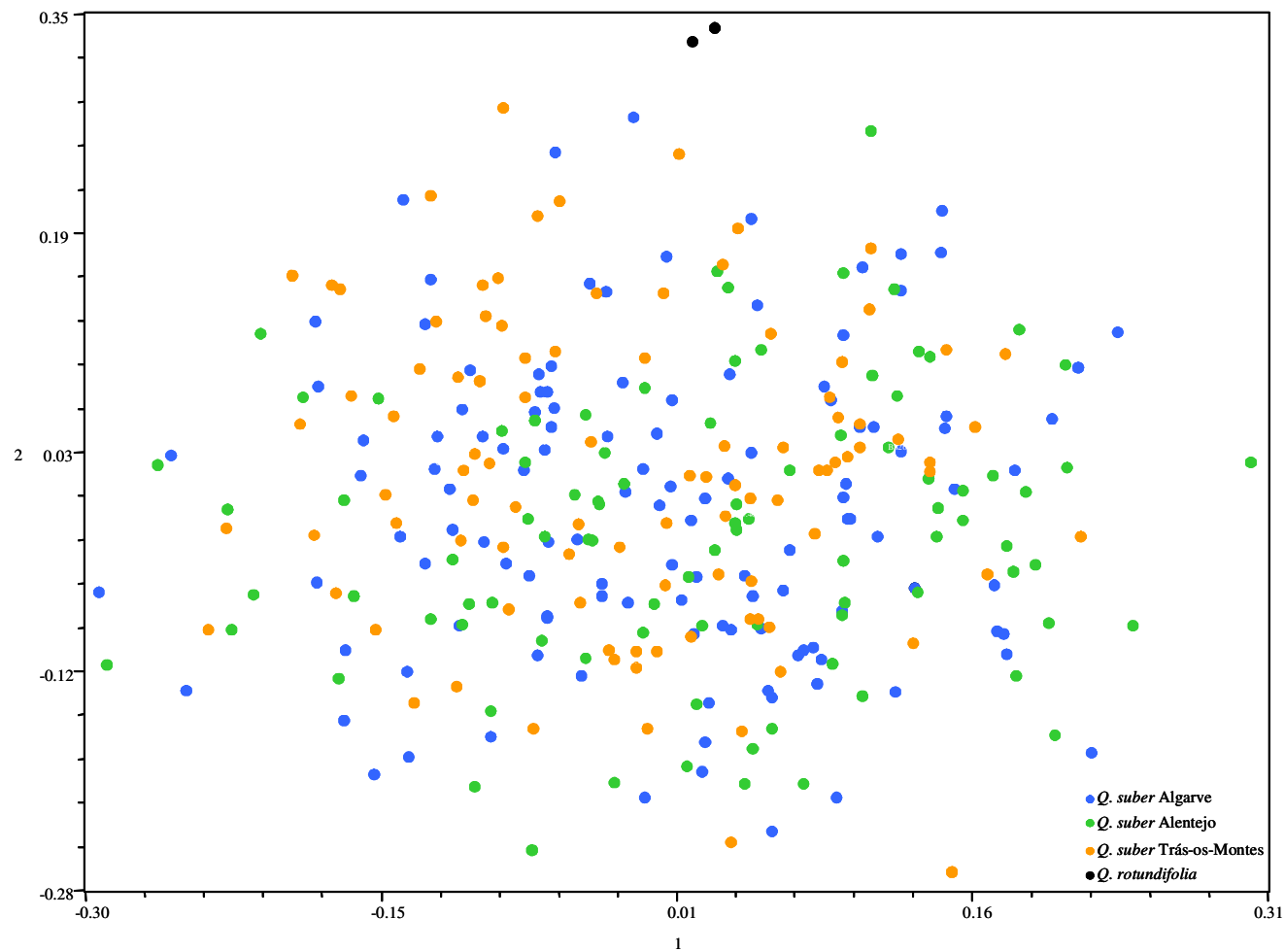


Figura 26. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais da combinação I3, baseada no coeficiente de *Jaccard*. A atribuição de cores consoante a origem geográfica das árvores está indicada no canto inferior direito da figura. Não se observa formação de grupos, estando os pontos representativos dos sobreiros dispersos por todo o plano. Os pontos que representam as azinheiras, assinalados a negro, destacam-se dos pontos dos sobreiros.

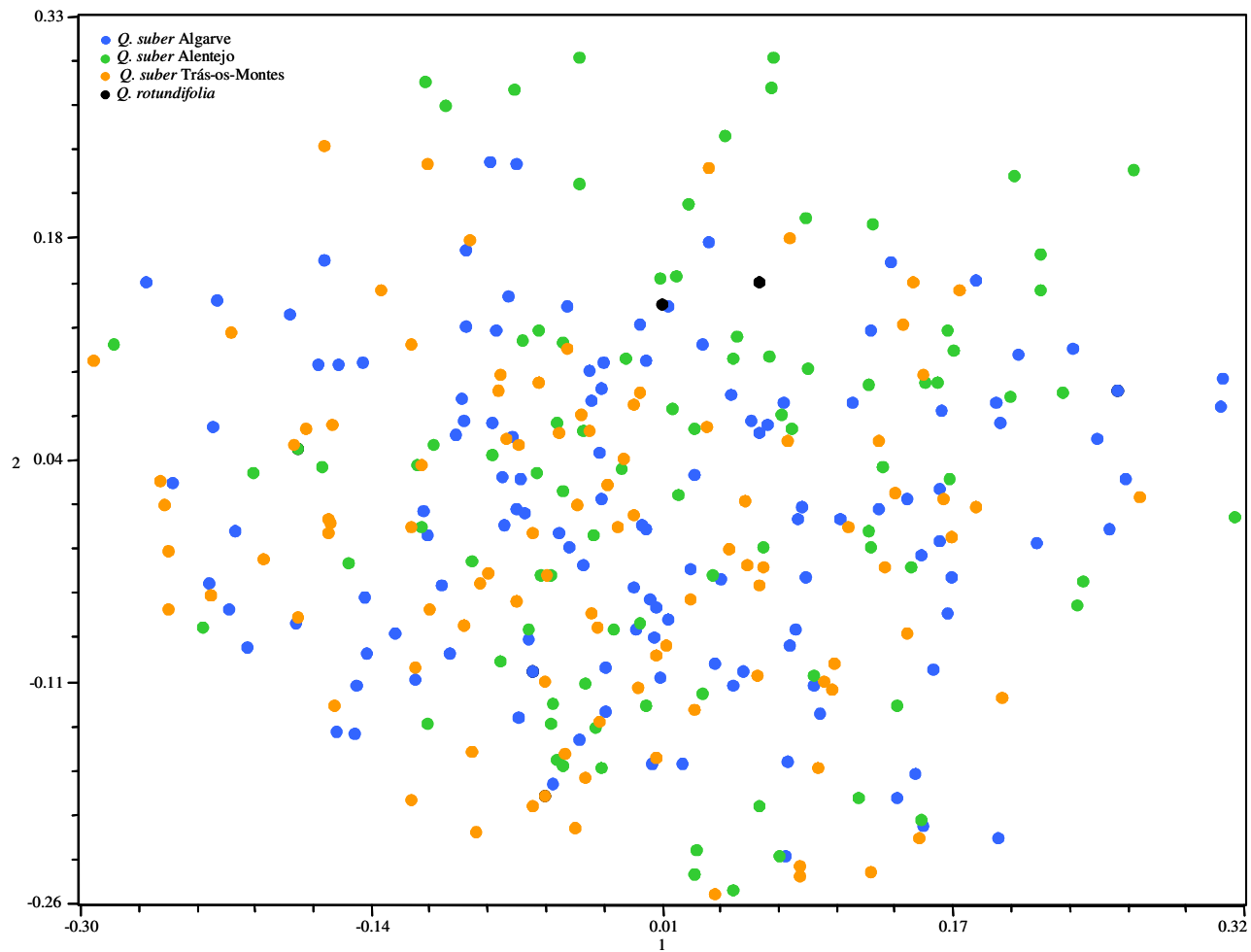


Figura 27. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais da combinação I10, baseada no coeficiente de *Jaccard*. A atribuição de cores consoante a origem geográfica das árvores está indicada no canto superior esquerdo da figura. Não se observa formação de grupos, estando os pontos representativos dos sobreiros dispersos por todo o plano. Os pontos que representam as azinheiras, assinalados a negro, não se destacam dos pontos dos sobreiros na projecção no espaço bidimensional.

Tabela 5. Dados relativos aos fragmentos AFLP que foram obtidos por amplificação com a combinação de *primers* I3 e que foram seleccionados para a matriz original de dados I3. Coluna 1: código atribuído aos marcadores. Coluna 2: definição dos fragmentos AFLP como monomórficos (M) ou polimórficos (P). Coluna 3: determinação da presença, em percentagem, de cada um dos marcadores nos sobreiros das regiões do Algarve (A), Alentejo (B) e Trás-os-Montes (C). Coluna 4: identificação das azinheiras que possuem os fragmentos seleccionados. Coluna 5: valor do tamanho dos fragmentos indicado por ordem decrescente em pares de bases (pb) determinado por comparação com o marcador de massa molecular 30-330 pb ou por sequenciação (L23).

Fragmentos AFLP	M/P	Presença nos sobreiros (%)			Azinheiras	Tamanho (pb)		Fragmentos AFLP	M/P	Presença nos sobreiros (%)			Azinheiras	Tamanho (pb)
		A	B	C						A	B	C		
L1	P	10,5	16,5	17,3	-	>330	L37	P	99,2	98,9	99,0	-	>230	
L2	M	100	100	100	-	>330	L38	P	5,6	7,7	7,1	-	>230	
L3	P	18,5	22,0	23,5	AA2A	>330	L39	P	83,1	86,8	82,7	-	>220	
L4	P	43,5	51,6	43,9	-	>330	L40	P	100	100	99	AA1SBA:AA2A	>220	
L5	P	5,6	7,7	13,3	AA2A	>330	L41	P	8,1	5,5	15,3	AA1SBA	>210	
L6	P	20,2	20,9	22,4	-	>330	L42	P	93,5	83,5	72,4	AA1SBA:AA2A	>210	
L7	M	100	100	100	AA1SBA:AA2A	>330	L43	P	92,7	93,4	85,7	-	>210	
L8	P	33,1	36,3	28,6	-	>330	L44	P	7,3	5,5	7,1	AA2A	210	
L9	P	88,7	80,2	93,9	-	>330	L45	P	75,8	83,5	77,6	AA1SBA:AA2A	>200	
L10	P	8,1	4,4	11,2	-	>330	L46	M	100	100	100	AA2A	>200	
L11	M	100	100	100	AA1SBA:AA2A	>330	L47	P	49,2	26,4	30,6	AA1SBA:AA2A	>160	
L12	P	8,1	3,3	3,1	AA1SBA	>330	L48	P	87,9	97,8	92,9	AA1SBA	>150	
L13	P	99,2	100	99,0	AA1SBA:AA2A	>330	L49	M	100	100	100	-	>150	
L14	P	0,0	0,0	1,0	AA2A	>330	L50	M	100	100	100	AA1SBA:AA2A	>150	
L15	P	81,5	89,0	89,8	AA1SBA:AA2A	>330	L51	P	77,4	68,1	66,3	AA1SBA:AA2A	>140	
L16	P	66,9	59,3	40,8	-	>330	L52	M	100	100	100	-	>140	
L17	P	70,2	75,8	42,9	-	>330	L53	P	4,0	2,2	28,6	AA1SBA:AA2A	>140	
L18	M	100	100	100	-	>330	L54	P	86,3	86,8	91,8	-	140	
L19	P	9,7	17,6	27,6	-	>330	L55	P	15,3	16,5	9,2	AA1SBA:AA2A	>130	
L20	P	41,1	33,0	50,0	-	>330	L56	P	91,1	91,2	93,9	-	>130	
L21	P	13,7	17,6	5,1	-	>309	L57	P	4,8	5,5	0,0	-	>130	
L22	P	37,1	46,2	11,2	-	>309	L58	P	98,4	98,9	99,0	-	>130	
L23	M	100	100	100	-	309	L59	M	100	100	100	-	>120	
L24	P	0,8	2,2	5,1	-	>300	L60	P	46,0	48,4	53,1	-	>120	
L25	P	62,1	70,3	65,3	-	>290	L61	M	100	100	100	AA1SBA:AA2A	>120	
L26	M	100	100	100	-	290	L62	M	100	100	100	-	>110	
L27	P	7,3	8,8	5,1	-	>280	L63	M	100	100	100	-	>110	
L28	P	45,2	49,5	45,9	-	>270	L64	M	100	100	100	-	>110	
L29	P	28,2	41,8	35,7	-	>270	L65	M	100	100	100	-	>100	
L30	P	5,6	4,4	7,1	AA1SBA	260	L66	M	100	100	100	-	>90	
L31	P	5,6	12,1	6,1	AA2A	>240	L67	P	6,5	6,6	6,1	AA1SBA:AA2A	>90	
L32	P	100	100	99	-	>240	L68	P	91,9	89,0	80,6	AA1SBA:AA2A	>90	
L33	P	82,3	82,4	83,7	AA1SBA	>240	L69	P	16,9	6,6	5,1	-	>90	
L34	M	100	100	100	-	>240	L70	P	71,0	56,0	69,4	-	>90	
L35	P	40,3	34,1	40,8	AA1SBA	240	L71	P	32,3	22,0	42,9	-	90	
L36	M	100	100	100	AA1SBA:AA2A	>230	L72	M	100	100	100	-	>80	

Tabela 6. Dados relativos aos fragmentos AFLP que foram obtidos por amplificação com a combinação de *primers* I10 e que foram seleccionados para a matriz original de dados I10. Coluna 1: código atribuído aos marcadores. Coluna 2: definição dos fragmentos AFLP como monomórficos (M) ou polimórficos (P). Coluna 3: determinação da presença, em percentagem, de cada um dos marcadores nos sobreiros das regiões do Algarve (A), Alentejo (B) e Trás-os-Montes (C). Coluna 4: identificação das azinheiras que possuem os fragmentos seleccionados. Coluna 5: valor do tamanho dos fragmentos indicado por ordem decrescente em pares de bases (pb), determinado por comparação com o marcador de massa molecular 30-330 pb ou por sequenciação (N27, N33, N35).

Fragmentos AFLP	M/P	Presença nos sobreiros (%)			Azinheiras	Tamanho (pb)		Fragmentos AFLP	M/P	Presença nos sobreiros (%)			Azinheiras	Tamanho (pb)
		A	B	C						A	B	C		
N1	P	37,9	37,4	43,9	-	>330	N27	P	74,2	65,9	66,3	-	215	
N2	M	100	100	100	AA2A	>330	N28	P	76,6	80,2	94,9	-	>210	
N3	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	>330	N29	P	33,9	28,6	24,5	-	>210	
N4	P	7,3	15,4	6,1	-	>330	N30	M	100	100	100	AA2A	>200	
N5	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	>330	N31	M	100	100	100	AA1SBA	>190	
N6	P	5,6	14,3	28,6	-	>330	N32	P	98,4	98,9	100	-	>190	
N7	P	1,6	4,4	0,0	-	>330	N33	P	8,1	16,5	4,1	-	188	
N8	M	100	100	100	AA1SBA	>330	N34	P	18,5	28,6	23,5	-	>181	
N9	M	100	100	100	AA2A	>330	N35	M	100	100	100	-	181	
N10	P	28,2	50,5	26,5	-	>330	N36	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	>170	
N11	P	32,3	26,4	12,2	-	>330	N37	P	99,2	100	100	-	>160	
N12	M	100	100	100	-	>330	N38	P	93,5	87,9	86,7	-	>160	
N13	P	91,1	94,5	79,6	AA2A	>330	N39	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	>150	
N14	M	100	100	100	-	>320	N40	P	41,9	29,7	22,4	-	>150	
N15	P	9,7	1,1	0,0	AA1SBA;AA2A	>310	N41	P	27,4	29,7	21,4	-	>140	
N16	P	86,3	93,4	91,8	-	>300	N42	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	>140	
N17	P	92,7	84,6	81,6	-	300	N43	P	13,7	3,3	9,2	-	>140	
N18	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	280	N44	M	100	100	100	-	>140	
N19	M	100	100	100	-	>270	N45	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	>130	
N20	P	68,5	83,5	67,3	AA2A	>270	N46	P	66,9	73,6	71,4	AA1SBA;AA2A	>100	
N21	M	100	100	100	-	>250	N47	P	62,9	49,5	54,1	-	>90	
N22	M	100	100	100	-	250	N48	P	8,1	13,2	11,2	AA2A	>90	
N23	P	35,5	40,7	21,4	AA1SBA;AA2A	>240	N49	P	44,4	47,3	34,7	-	>90	
N24	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	240	N50	M	100	100	100	AA1SBA;AA2A	>80	
N25	P	66,9	60,4	66,3	-	220	N51	P	1,6	2,2	11,2	-	>80	
N26	P	20,2	19,8	30,6	-	>215								

I.4.1.1.4. AFLP-Amplificação I9.

A análise AFLP I9 foi realizada com o par de *primers* *EcoRI-ACC/MseI-TGG* em 365 árvores, das quais 313 são da espécie *Q. suber* e 52 são da espécie *Q. rotundifolia*. Dos fragmentos amplificados seleccionaram-se 56 para integrarem a matriz de dados I9C (56 fragmentos AFLP x 365 OTUs) que foi analisada com recurso à taxonomia numérica. As duas azinheiras AA1SBA-0 e AA2A-2 analisadas nas combinações I1, I2, I3 e I10 fazem parte das 52 azinheiras analisadas na combinação I9. Os perfis AFLP dos genótipos de 26 sobreiros obtidos na amplificação I9 estão representados na figura 30. Na mesma figura estão assinalados os fragmentos seleccionados, codificados e que integraram a matriz de dados I9C. Dos 56 fragmentos AFLP escolhidos, 15 fragmentos são monomórficos nos sobreiros e 2 fragmentos, o M31 e o M50, são monomórficos nas duas espécies (Tabela 7). A percentagem de polimorfismo observada foi de 96 % nas duas espécies e de 70 % nos sobreiros. Os marcadores M1, M2, M5, M6, M9, M17, M25, M29 e M37 estão presentes nos 313 sobreiros em percentagens inferiores a 10 % e três destes fragmentos, designadamente M6, M29 e M37, predominam nas azinheiras (Tabela 7).

O fragmento amplificado M29 tem uma sequência nucleotídica com 273 pb, homóloga (59 %) da do gene *RHC18* (ID: X80930) de *Saccharomyces cerevisiae*, na região em que se sobrepõem (Tabela 8). O gene *RHC18* codifica uma proteína relacionada com a manutenção da estrutura dos cromossomas, que está envolvida em processos de reparação do DNA danificado por acção de radiação UV e que desempenha funções indispensáveis na replicação do DNA (Lehmann *et al.*, 1995). Este marcador AFLP está presente, exclusivamente, no genoma de 11 sobreiros do Algarve localizados em Javali e S. Marcos da Serra, denominados AS22J-2, AS23J-3, AS24J-0, AS26J-1, AS78SMS-1, AS79SMS-2, AS80SMS-1, AS82SMS-0, AS83SMS-0, AS226SMS-1, AS229SMS-0 e em 44 azinheiras. Estes sobreiros são provenientes de regiões com grande incidência da doença do declínio e estão localizados na proximidade de árvores mortas ou severamente afectadas. É interessante constatar que quatro destes sobreiros apresentam um fenótipo aparente de tolerância à doença, caracterizado pela atribuição de G.D. = 0. A única azinheira de S. Marcos da Serra incluída no estudo (AA5SMS), localizada próximo dos sobreiros da mesma região, possui o marcador M29.

Os marcadores M21, M23 e M39 predominam nos sobreiros da região de Trás-os-Montes, ao passo que o marcador M26 predomina nos sobreiros da região do Alentejo. A sequência nucleotídica do fragmento M39, com 186 pb, apresenta uma homologia de 58,6 % com o DNA genómico de *Oryza sativa* em 128 nucleótidos, numa região que codifica para uma proteína hipotética não definida (Tabela 8).

As relações genotípicas existentes entre as 365 árvores foram determinadas de acordo com o número de fragmentos AFLP polimórficos, partilhados entre elas, através do cálculo de uma matriz de semelhança, baseada no coeficiente de *Jaccard*. O fenograma (coeficiente de correlação cofenética, $r = 0,96854$), construído com base na matriz de semelhanças, divide os 365 genótipos analisados nos grupos I9C-I e I9C-II (Figura 31). O grupo I9C-II é subdividido no grupo I9C-IIA, constituído por árvores da espécie *Q. rotundifolia* e no grupo I9C-IIS, constituído por árvores da espécie *Q. suber*. O grupo dos sobreiros (I9C-IIS) está, por sua vez, subdividido em dois grandes grupos que foram designados por I9C-IIS1 e I9C-IIS2. A separação entre os sobreiros e as azinheiras está de acordo com a classificação sistemática destes *Quercus* nas espécies *Q. suber* e *Q. rotundifolia*. Inesperada foi a separação das azinheiras BA7A-3 e AA42BV-1, que formam um grupo à parte (I9C-I), sugerindo tratarem-se de membros de outra espécie, mais próxima de *Q. rotundifolia* do que de *Q. suber*.

A análise em coordenadas principais ordenou as árvores num plano definido pelas duas primeiras dimensões. A projecção dos pontos representativos das 365 árvores nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2 mostra as árvores divididas em quatro grupos (Figura 32). O grupo I9C-IIA composto pelas azinheiras, o grupo I9C-I composto por duas árvores duma espécie próxima de *Q. rotundifolia* e os grupos I9C-IIS1 e I9C-IIS2 compostos por sobreiros. Quando se sobrepõe a árvore de expansão mínima à projecção dos pontos representativos das 365 árvores, verifica-se que os sobreiros dos grupos I9C-IIS2 e I9C-IIS1 estão todos ligados entre si e que a ligação ao grupo das azinheiras I9C-IIA se faz através do sobreiro AS78SMS-1 do grupo I9C-IIS2 e da azinheira BA8A-2 do grupo I9C-IIA (Figura 32). A formação dos grupos representativos das espécies *Q. suber* e *Q. rotundifolia* está relacionada com o eixo principal 1. No lado direito do eixo principal 1 estão localizados os grupos I9C-IIS1 e I9C-IIS2 e do lado esquerdo os grupos I9C-IIA e I9C-I. O eixo principal 2 põe em contraste os grupos de sobreiros I9C-IIS1 e I9C-IIS2.

A figura 33 mostra a perspectiva de ordenação dos pontos representativos das 365 árvores no espaço das três primeiras dimensões, com a separação das árvores em quatro grupos.

Para identificar quais os caracteres ou fragmentos AFLP, que estão na base da formação destes grupos, projectaram-se os 56 marcadores AFLP no plano definido pelos eixos principais 1 e 2 (Figura 34) e sobrepôs-se este gráfico ao gráfico da projecção dos pontos representativos das 365 árvores. Os caracteres associados ao eixo 1, responsáveis pela formação do grupo das azinheiras I9C-IIA são o M6, M29, M37, M23, M9 e M25. A caracterização das azinheiras por estes marcadores é confirmada pelos dados referidos na tabela 7, em que se verifica que a percentagem de azinheiras em que houve amplificação destes fragmentos é superior à dos sobreiros. As sequências nucleotídicas dos fragmentos M29 e M37 foram determinadas, tendo já sido feita referência à sequência do marcador M29. O fragmento M37 tem 201 pb e a sequência nucleotídica apresenta uma homologia de 65 % com o DNA genómico (cromossoma 1) de *Oryza sativa*, numa região por caracterizar (Tabela 8). Os restantes marcadores AFLP associados ao eixo 1 com projecção no sentido oposto aos grupos I9C-1 e I9C-IIA estão na origem da formação do grupo de sobreiros I9C-IIS. Os marcadores AFLP M36 e M32 foram sequenciados e possuem 252 pb e 203 pb, respectivamente. A sequência nucleotídica do M36 é homóloga (61 %) da sequência do gene *ADH* (ID: X53242) de *Solanum tuberosum*, que codifica uma desidrogenase alcoólica (Matton *et al.*, 1990) (Tabela 8). O mRNA de ADH aumenta rapidamente nas células de tubérculo da batata, durante a resposta hipersensível induzida por eliciadores, tais como ácidos gordos, ácido salicílico, luz ultravioleta e anaerobiose. Nas folhas da batateira, a expressão de ADH também é induzida após tratamento com um extracto de micélio de *Phytophthora infestans* ou quando sujeita a anaerobiose (Matton *et al.*, 1990). A sequência do marcador M32 apresenta uma homologia de 57 % com o DNA do cromossoma 2 de *Arabidopsis thaliana* numa região com função indeterminada (Tabela 8).

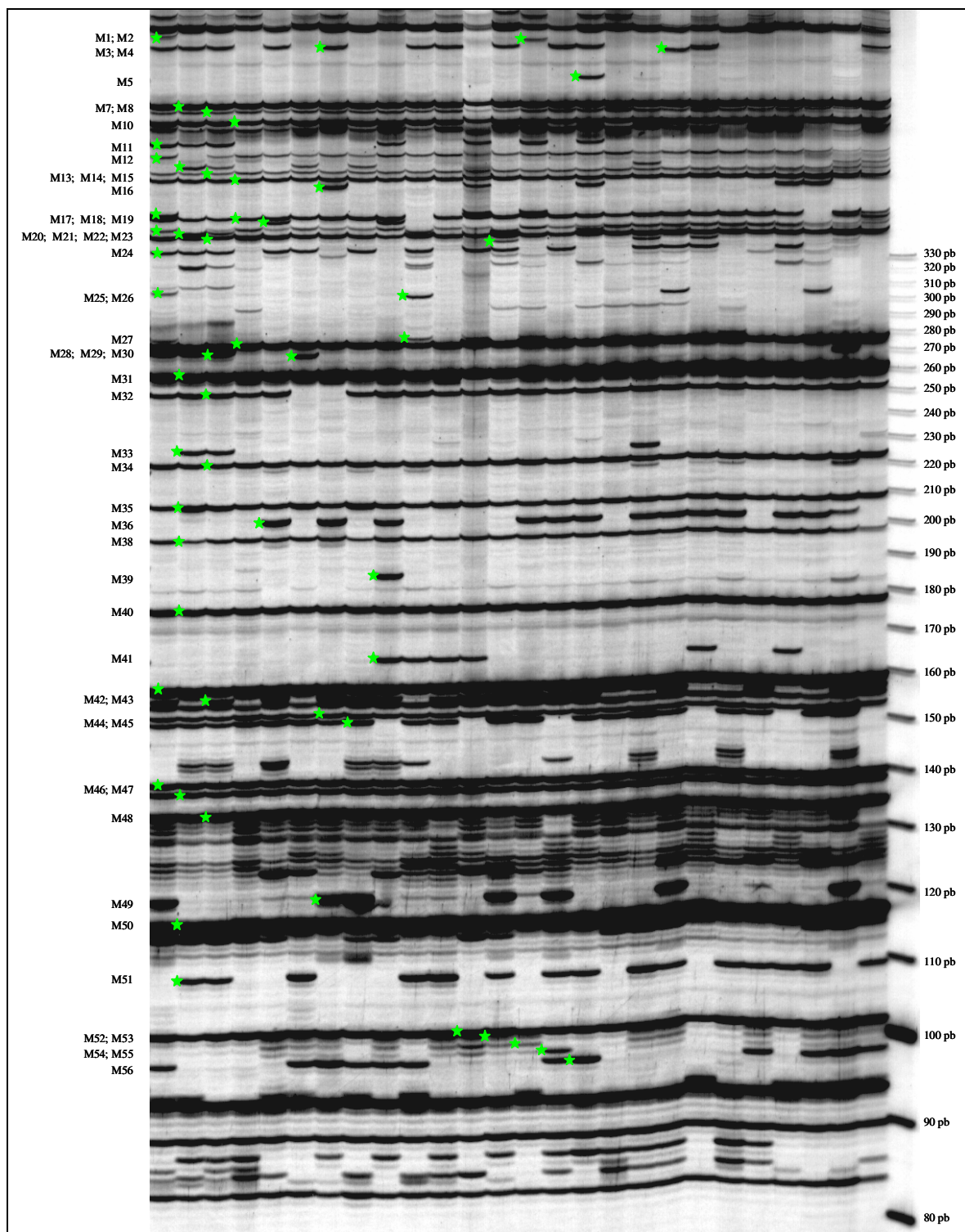


Figura 30. Separação por electroforese em gel de poli-acrilamida dos fragmentos amplificados com os *primers* *EcoRI*-ACC/*MseI*-TGG (combinação I9), na análise por AFLP, realizada em 26 sobreiros (colunas). Identificação dos fragmentos M1-M56, com excepção do M6, M9 e M37 que não foram amplificados nestes sobreiros. Última coluna: marcador de massa molecular 30-330 pb (Gibco).

Tabela 7. Dados relativos aos fragmentos AFLP que foram obtidos por amplificação com a combinação de *primers* I9 e que foram seleccionados para a matriz original de dados I9C. Coluna 1: código atribuído aos marcadores. Coluna 2: definição dos fragmentos AFLP como monomórficos (M) ou polimórficos (P). Coluna 3: determinação da presença, em percentagem, de cada um dos marcadores, nos sobreiros das regiões do Algarve (A), Alentejo (B) e Trás-os-Montes (C). Coluna 4: identificação das azinheiras que possuem os fragmentos seleccionados. Coluna 5: valor do tamanho dos fragmentos indicado por ordem decrescente em pares de bases (pb), determinado por comparação com o marcador de massa molecular 30-330 pb ou por sequenciação (M29, M30, M32, M36, M37, M39).

Fragmentos AFLP	M/P	Presença nos sobreiros (%)			Azinheiras	Tamanho (pb)		Fragmentos AFLP	M/P	Presença nos sobreiros (%)			Azinheiras	Tamanho (pb)
		A	B	C						A	B	C		
M1	P	2,4	0,0	0,0	3,8	>330	M29	P	8,9	0,0	0,0	84,6	273	
M2	P	0,8	3,3	3,1	1,9	>330	M30	P	5,6	4,4	10,2	0,0	271	
M3	P	37,1	37,4	71,4	1,9	>330	M31	M	100	100	100	100	>260	
M4	P	9,7	5,5	12,2	3,8	>330	M32	P	95,2	82,4	92,9	0,0	252	
M5	P	2,4	4,4	0,0	5,8	>330	M33	P	10,5	20,9	28,6	3,8	>220	
M6	P	0,0	1,1	0,0	92,3	>330	M34	M	100	100	100	94,2	>220	
M7	M	100	100	100	11,5	>330	M35	M	100	100	100	86,5	>203	
M8	M	100	100	100	0,0	>330	M36	P	45,2	50,5	64,3	3,8	203	
M9	P	0,0	2,2	0,0	44,2	>330	M37	P	1,6	2,2	0,0	90,4	201	
M10	M	100	100	100	98,1	>330	M38	P	98,4	100	99,0	1,9	>190	
M11	P	58,1	42,9	37,8	3,8	>330	M39	P	0,8	3,3	13,3	5,8	186	
M12	P	99,2	96,7	100	1,9	>330	M40	M	100	100	100	90,4	>170	
M13	P	12,9	17,6	3,1	1,9	>330	M41	P	26,6	30,8	10,2	0,0	>160	
M14	M	100	100	100	88,5	>330	M42	M	100	100	100	96,2	>150	
M15	M	100	100	100	3,8	>330	M43	P	71,8	86,8	79,6	0,0	>150	
M16	P	25,8	34,1	34,7	40,4	>330	M44	M	100	100	100	1,9	>150	
M17	P	8,1	9,9	5,1	0,0	>330	M45	P	80,6	72,5	81,6	1,9	>150	
M18	P	83,9	81,3	89,8	15,4	>330	M46	M	100	100	100	0,0	140	
M19	P	21,0	28,6	17,3	7,7	>330	M47	M	100	100	100	0,0	>130	
M20	P	87,1	92,3	88,8	0,0	>330	M48	M	100	100	100	94,2	>130	
M21	P	17,7	11,0	40,8	11,5	>330	M49	P	54,8	47,3	65,3	1,9	120	
M22	M	100	100	100	94,2	>330	M50	M	100	100	100	100	>110	
M23	P	8,9	3,3	21,4	75,0	>330	M51	P	58,9	54,9	50,0	21,2	>100	
M24	P	35,5	33,0	35,7	3,8	>330	M52	P	100	100	99,0	73,1	>100	
M25	P	3,2	4,4	8,2	23,1	>300	M53	P	53,2	57,1	63,3	5,8	>100	
M26	P	7,3	18,7	8,2	0,0	>300	M54	P	53,2	57,1	63,3	1,9	100	
M27	P	16,9	20,9	18,4	1,9	280	M55	P	55,6	57,1	63,3	48,1	>90	
M28	M	100	100	100	25,0	>273	M56	P	45,2	58,2	59,2	0,0	>90	

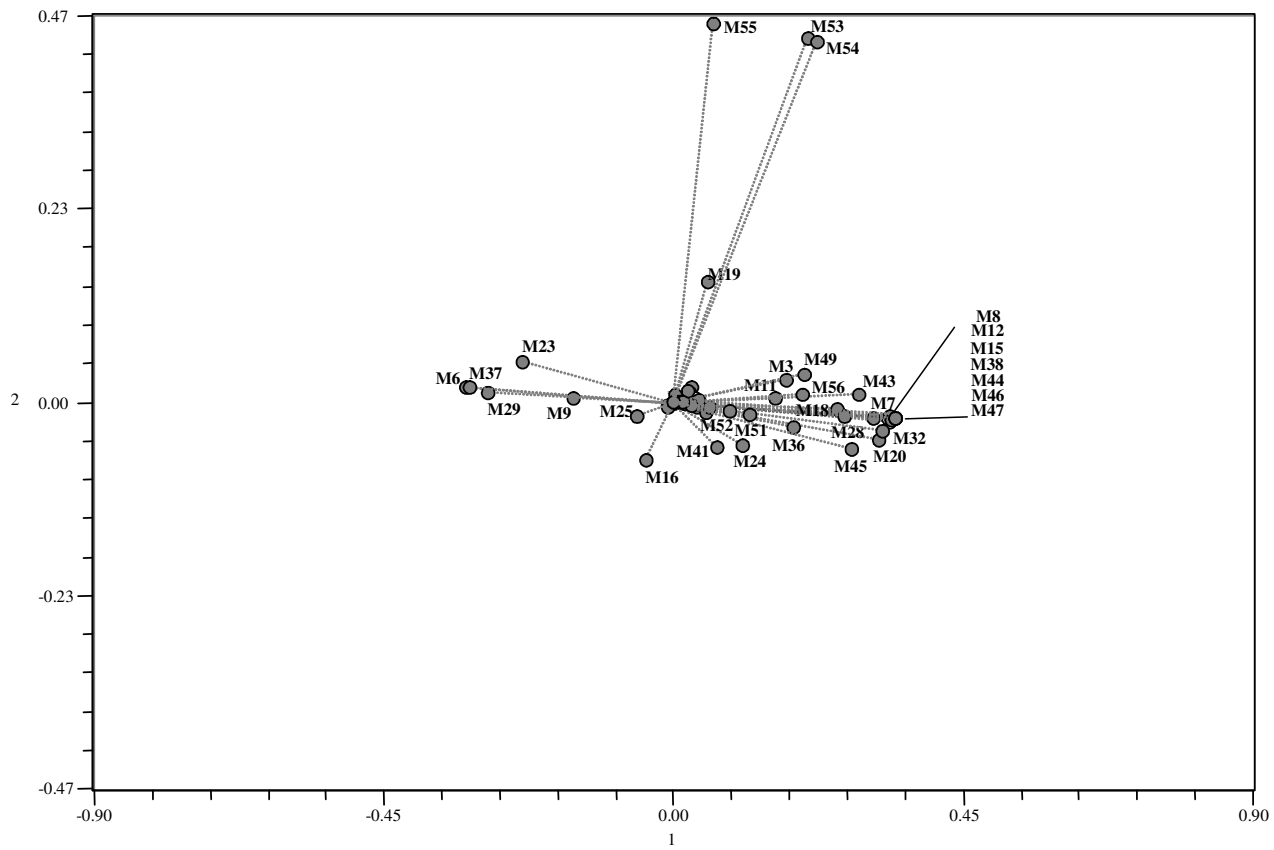


Figura 34. Projecção dos pontos representativos dos 56 fragmentos AFLP nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2.

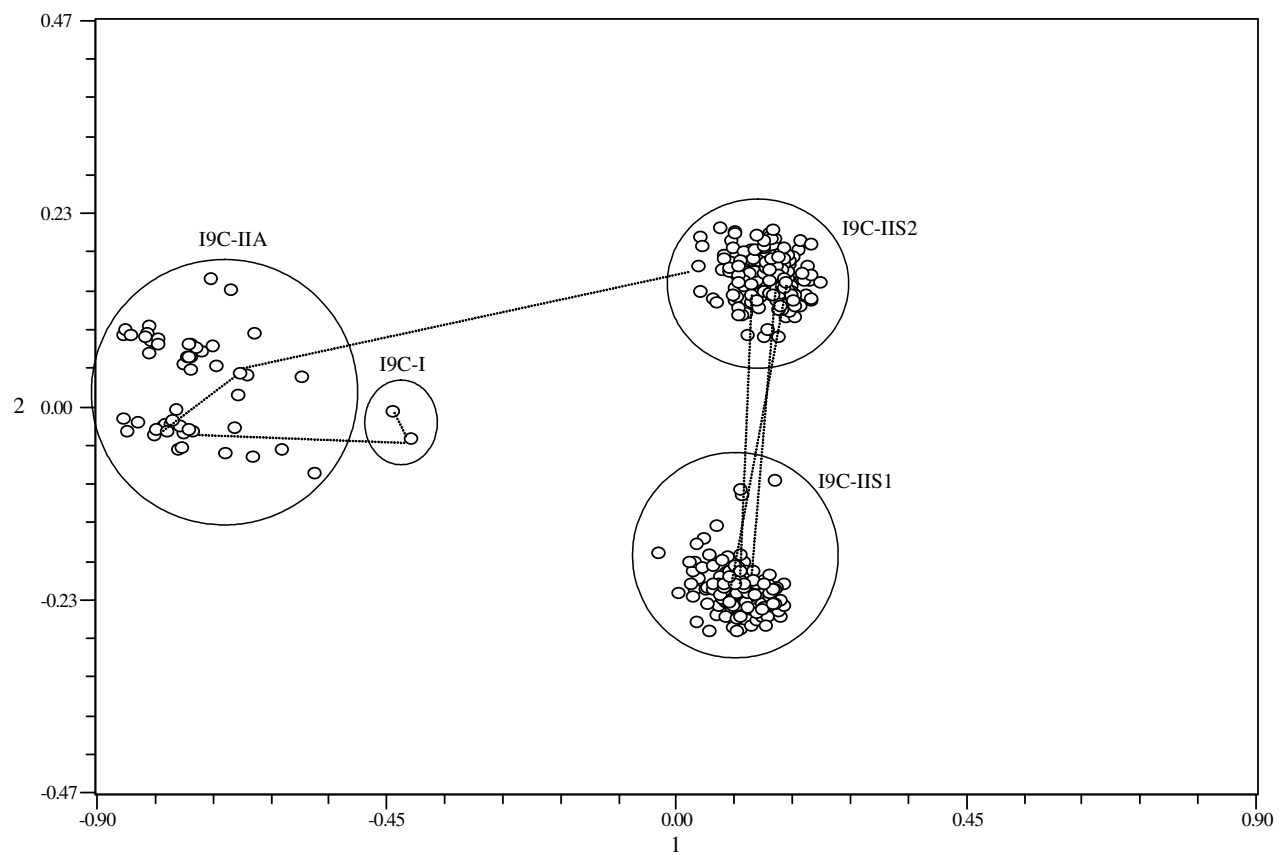


Figura 32. Projecção dos pontos representativos das 365 árvores, nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais dos dados AFLP da combinação I9. Identificação dos grupos I9C-I, I9C-IIA, I9C-IIS1 e I9C-IIS2. Mostra-se a ligação entre alguns indivíduos dos quatro grupos de acordo com a ordenação proposta pela árvore de expansão mínima.

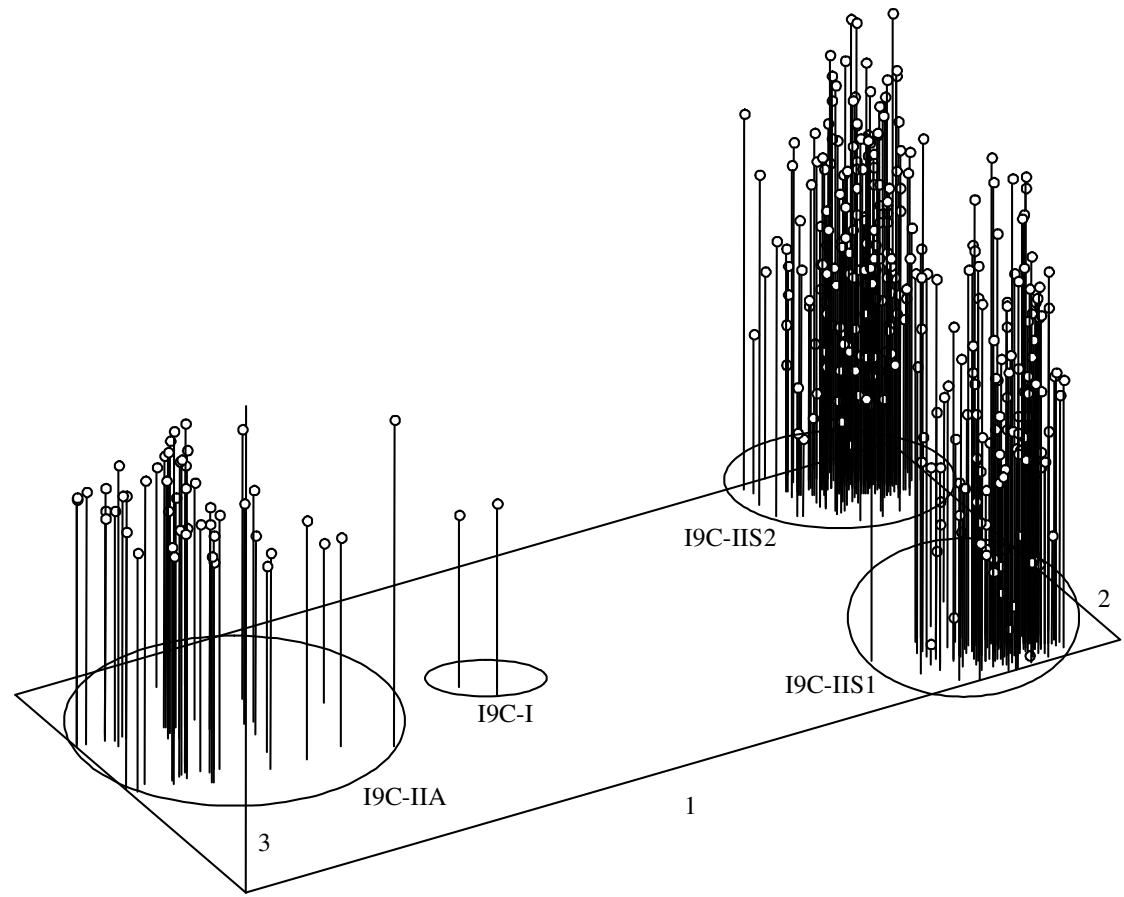


Figura 33. Perspectiva de ordenação dos pontos representativos das 365 árvores no espaço das três primeiras dimensões.

I.4.1.1.5. AFLP-Soma das amplificações I1, I2, I3, I9 e I10.

A análise por AFLP com cinco combinações de *primers* (I1, I2, I3, I9, I10) diferentes gerou um total de 291 fragmentos distinguíveis sem ambiguidade nos 313 sobreiros e nas duas azinheiras incluídas no estudo e comuns a todas as combinações. Trinta e cinco fragmentos AFLP estão presentes em todas as árvores e oitenta e quatro são monomórficos nos sobreiros. As amostras das duas espécies apresentam índices elevados de variabilidade, confirmados pela elevada percentagem de polimorfismo (88 %) obtida. Nos sobreiros, 71 % dos 291 fragmentos de DNA são polimórficos. Em média, foram analisados em cada uma das cinco amplificações, 41 *loci* polimórficos em *Q. suber* e 51 no conjunto das espécies *Q. suber* e *Q. rotundifolia*. Em cada gel de electroforese identificaram-se, em média, 58 fragmentos amplificados e a combinação de *primers* *EcoRI*-ATG/*MseI*-ACC foi aquela em que se conseguiu ler o maior número de fragmentos. A percentagem mais elevada de polimorfismo nos sobreiros (79 %) foi obtida na amplificação com o par de *primers* *EcoRI*-ACC/*MseI*-ATT, ao passo que a mais baixa (59 %) foi obtida com a combinação de *primers* I10.

O valor mais elevado de semelhança genética ocorreu entre dois sobreiros de Javali, no Algarve, AS26J-1 e AS24J-0, com um coeficiente de *Jaccard* de 0,88 e o valor mais baixo (0,20) foi encontrado entre a azinheira AA1SBA-0 e o sobreiro CS5.11M-2-M. Nos sobreiros de Trás-os-Montes os valores para os coeficientes de semelhança variaram entre 0,81 (CS5.10M-2-B/CS1.5Mc-2-B; CS5.34M-1-B e CS4.7M-1-B) e 0,62 (CS1.14Mc-2-B/CS1.12Mc-2-B; CS5.8M-1-B/CS1.12Mc-2-B), ao passo que nos sobreiros do Alentejo os genótipos mais semelhantes (0,87) são os do par BS254HL-2/BS253HL-0 e os menos semelhantes (0,61) são os do par BS129HL-2/BS105A-0. Em média, os sobreiros analisados têm de comum entre si 60 % do genótipo.

Não obstante a elevada variabilidade genética que caracteriza os sobreiros na sua globalidade, o fenograma construído com base na matriz de semelhança T5, resultante da soma das matrizes I1, I2, I3, I9 e I10, indica que alguns indivíduos desta espécie se organizam em grupos, de acordo com a localização geográfica, a qualidade da cortiça produzida ou o grau de desfoliação (Figura 35). O coeficiente de correlação cofenética (*r*) foi de 0,87980 para a soma de todas as matrizes. Valores de *r* superiores a 0,8 e inferiores a 0,9 sugerem uma boa correlação ou seja, que os grupos formados e

apresentados na forma de um fenograma são fiáveis e não sofreram uma grande distorção.

No fenograma, os 315 genótipos analisados estão divididos em dois grupos, o grupo T5-IA que inclui as azinheiras AA1SBA-0 e AA2A-2 e o grupo T5-IIS que compreende os 313 sobreiros. O grupo dos sobreiros está subdividido em muitos subgrupos. De entre os muitos subgrupos, seleccionaram-se cinco subgrupos formados por sobreiros que apresentam, como característica comum, a região geográfica onde estão localizados (T5-IIS1; T5-IIS2; T5-IIS3; T5-IIS4; T5-IIS5), um subgrupo formado por sobreiros produtores de cortiça de boa qualidade (T5-IIS6) e um subgrupo formado por sobreiros com grau de desfoliação 0 ou 1 (T5-IIS7) (Figura 35).

Os subgrupos T5-IIS2 e T5-IIS1 incluem 25 e 10 sobreiros de Trás-os-Montes, respectivamente. Sobreiros localizados na Herdade do Azinhal e na Herdade dos Leitões, no Alentejo, formam os subgrupos T5-IIS3 e T5-IIS4. O subgrupo T5-IIS5 é composto, maioritariamente, por sobreiros do Algarve. Estes subgrupos foram definidos com árvores que partilham entre si valores de semelhança genética superiores a 68 %. Na descrição dos resultados obtidos em cada uma das análises AFLP foram referidos marcadores moleculares que estavam presentes apenas nalgumas regiões ou em que a percentagem de presença era mais elevada em determinada região. Estes marcadores estão na origem da formação destes grupos no fenograma e estão, provavelmente, relacionados com um processo de evolução para adaptação ao meio. O fragmento M29, por exemplo, está presente em 11 sobreiros da região do Algarve e em 50 azinheiras e pertence a um gene homólogo de *RHC18*, que codifica uma proteína envolvida em processos de reparação de DNA danificado por radiação ultravioleta. Estes resultados sugerem que M29 pertence a uma região dum gene de *Q. suber*, cuja aquisição por hibridação com *Q. rotundifolia* determina alguma vantagem em termos duma potencial adaptação a regiões com maior número de horas de exposição à radiação solar. Podemos observar no mapa geográfico de Portugal Continental, apresentado no Material e Métodos do capítulo I (I.3.1), que as azinheiras predominam no Sul do País, em regiões do interior onde os valores de precipitação anual e humidade atmosférica são mais baixos e em que a exposição solar é elevada.

No subgrupo T5-IIS6 do fenograma estão incluídos 15 sobreiros de Trás-os-Montes, subdivididos em três grupos, A, B e C, caracterizados por produzirem cortiça de boa qualidade. Procuraram-se nos fragmentos AFLP produzidos em todas as combinações, aqueles que seriam comuns aos elementos destes três subgrupos e que poderiam estar,

eventualmente, correlacionados com a produção de cortiça de boa qualidade. Seleccionaram-se os marcadores J1, J54, K5, e M56 porque, para além de serem comuns aos elementos que integram estes subgrupos, existem em percentagens inferiores a 70 % na amostra dos 313 sobreiros e estão ausentes nas azinheiras. J1 é comum aos sobreiros CS7.1C-1-B, CS7.2C-2-B, CS1.3Mc-3-B, CS5.40M-2-B, CS9.25R-3-B, CS9.26R-2-B, CS5.22M-1-B, CS9.23R-2-B, CS1.11Mc-1-B e CS5.15M-2-B e J54 existe nos sobreiros CS5.41M-2-B, CS5.23M-2-B, CS5.52M-2-B, CS4.1M-2-B e CS5.42M-2-B. O marcador K5 faz parte do genoma dos sobreiros do subgrupo T5-IIS6-C enquanto que o marcador M56 faz parte do genoma dos sobreiros dos grupos T5-IIS6-A e T5-IIS6-B. A sequência nucleotídica destes fragmentos não foi determinada, não se podendo tecer mais considerações acerca da sua natureza. Considera-se, no entanto, que os sobreiros do grupo T5-IIS6 são candidatos potenciais a incluir em programas de selecção de semente para reflorestação, com o objectivo de produção de cortiça de boa qualidade. Será de todo o interesse verificar qual a qualidade da cortiça produzida pelos sobreiros do Algarve e Alentejo que também fazem parte deste subgrupo. Os marcadores J1, J54, K5 e M56 podem estar associados à produção de cortiça de boa qualidade e a determinação da sua sequência nucleotídica poderá fornecer informações interessantes em relação a esta potencial associação.

O subgrupo T5-IIS7 está ligado directamente ao ramo II do fenograma e é constituído pelas árvores AS33P-1, BS104A-1, BS105A-0 e BS248HL-0, às quais foram atribuídos graus de desfoliação 0 ou 1. Estes sobreiros são provenientes de duas populações do Alentejo, uma localizada em Almodôvar e outra em Montargil, e de uma população de sobreiros do Algarve. Partilham entre si 20 marcadores AFLP polimórficos do total dos 291 fragmentos relativos às cinco combinações de *primers*. Três dos fragmentos comuns aos quatro sobreiros, J17, K22 e N27, foram sequenciados e as suas sequências foram comparadas com sequências já identificadas noutras espécies de plantas. O fragmento J17 tem 334 pb e apresenta uma homologia de 55 % com uma região não definida do DNA do cromossoma 5 de *Arabidopsis thaliana*; K22 tem 255 pb e sobrepõe-se em 134 nucleótidos (homologia de 59,7 %) com o gene DFR (*dihydroflavonol 4-reductase*), numa região não codificante do gene; N27 tem 191 pb e apresenta uma homologia de 61 % com o DNA do cromossoma 5 de *Arabidopsis thaliana*, em região ainda por caracterizar. A sequência nucleotídica do marcador N27 possui, perto do local de restrição *EcoRI*, seis repetições consecutivas do par TA.

Variações no número de pares TA podem estar na origem do polimorfismo associado a este marcador.

Na projecção das 315 OTUs segundo os eixos principais 1 e 2 e segundo os eixos 1 e 3, resultante da análise em coordenadas principais, não se identificam os grupos formados no fenograma (Figura 36 e 37). Observa-se, na globalidade, uma tendência para a separação dos sobreiros em dois grandes grupos assinalada por uma linha a tracejado. Esta separação visualiza-se melhor na projecção segundo os eixos principais 1 e 3 (Figura 37). A figura 38, na forma de transparência, apresenta a projecção dos 291 marcadores AFLP segundo os eixos principais 1 e 3, para sobrepor à projecção das 315 OTUs segundo os mesmos eixos. Na sobreposição dos dois gráficos observa-se que os marcadores que influenciam esta disposição no espaço bidimensional estão associados ao eixo 1 e são o M41, J9, M45, M25, N17, K15, J39, J38, J40, J24, L5, M16, J25, J12, K37, K8, L16, J4, L35, J11, M19, K22, N20, K21, K43, M55, M53, M54, K1 e J8.

Apesar da dispersão no espaço dos sobreiros oriundos das várias regiões de Portugal, verifica-se que a área ocupada pelos sobreiros de Trás-os-Montes é mais restrita. Os marcadores que mais contribuíram para esta distribuição dos sobreiros de Trás-os-Montes foram o K47, K46, M3, K45, M33, L71, J14, K14, J34, J2, J27, M18, N26, M56, M23, J54, J29, L33, L20, L60, J37, L1. Na figura 39 da projecção das 315 árvores segundo os eixos principais 1 e 3, assinalaram-se as regiões em que predominam sobreiros de Trás-os-Montes produtores de cortiça de boa qualidade.

Na projecção segundo os eixos 1 e 3, resultante da análise em coordenadas principais, é possível observar regiões no espaço bidimensional em que predominam sobreiros com grau de desfoliação zero ou um (Figura 40). Esta proximidade no espaço a duas dimensões não é sinónimo, contudo, da existência de ligações entre eles, mas pode significar que possuem em comum fragmentos AFLP relacionados com a tolerância à doença do declínio. Deste modo, escolheram-se os sobreiros destas áreas do gráfico, formaram-se três grupos de acordo com a projecção em coordenadas principais (Figura 40) e procuraram-se os marcadores comuns aos elementos de cada um dos grupos. O grupo T5-1 integra os sobreiros: BS252HL-0, BS281HA-0, BS250HL-0, BS137HL-0, BS119HL-0, BS134HL-0, BS251HL-0, BS97HL-0, AS242C-0, AS246C-0. O grupo T5-2 é constituído pelos sobreiros AS82SMS-0, AS257PB-0, CS5.24M-0, CS5.50M-0, CS5.39M-0 e o grupo T5-3 pelos sobreiros AS83SMS-0, BS151HL-0, AS24J-0 e AS17BV-0. Três marcadores AFLP obtidos com a combinação de *primers*

I9, denominados M53, M54 e M55 são comuns a todos os sobreiros dos grupos T5-1 e T5-2. Os marcadores J35, K45, K52, L51, M3, N20, N25, N27 e N47 existem em todos os sobreiros do grupo T5-2 e os marcadores J1, J29, J38, J39, J40, K26, K45, K46 e K47 existem em todos os sobreiros do grupo T5-3. Com base nesta análise foi identificado um fragmento AFLP que é comum ao grupo T5-2, escolhido com base na análise em coordenadas principais e ao subgrupo T5-IIS7, presente no fenograma que foi construído a partir da matriz de semelhanças com base no coeficiente de *Jaccard*. O fragmento comum aos sobreiros com grau de desfoliação 0 dos grupos T5-2 e T5-IIS7 é o N27, já referido anteriormente. O motivo TA, que está repetido na sequência deste fragmento, pode ser explorado no sentido de pesquisar um polimorfismo com características de microssatélite potencialmente associado à tolerância à doença do declínio. Existem mais três fragmentos que são comuns aos grupos definidos pelos dois métodos mas que não foram sequenciados. São eles os fragmentos J38, J39 e J40, comuns aos grupos T5-3 e T5-IIS7.

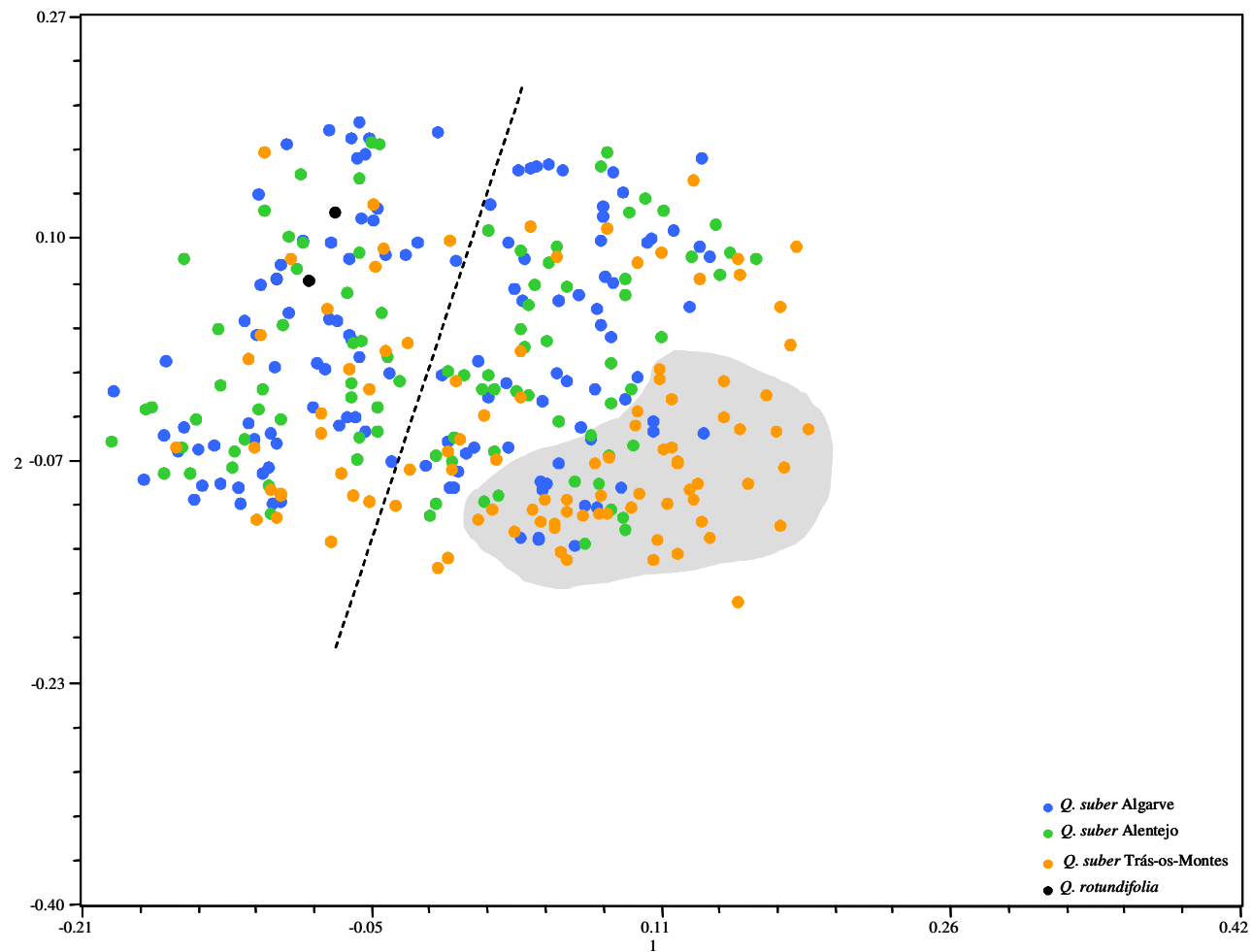


Figura 36. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores, nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais dos dados AFLP resultante da soma das matrizes das combinações I1, I2, I3, I9 e I10. A atribuição de cores consoante a origem geográfica está indicada no canto inferior direito da figura. Observa-se uma tendência para separação do grupo dos sobreiros em dois grandes grupos que foi assinalada pela colocação de uma linha a tracejado. Na área sombreada há uma acumulação de sobreiros com origem em Trás-os-Montes.

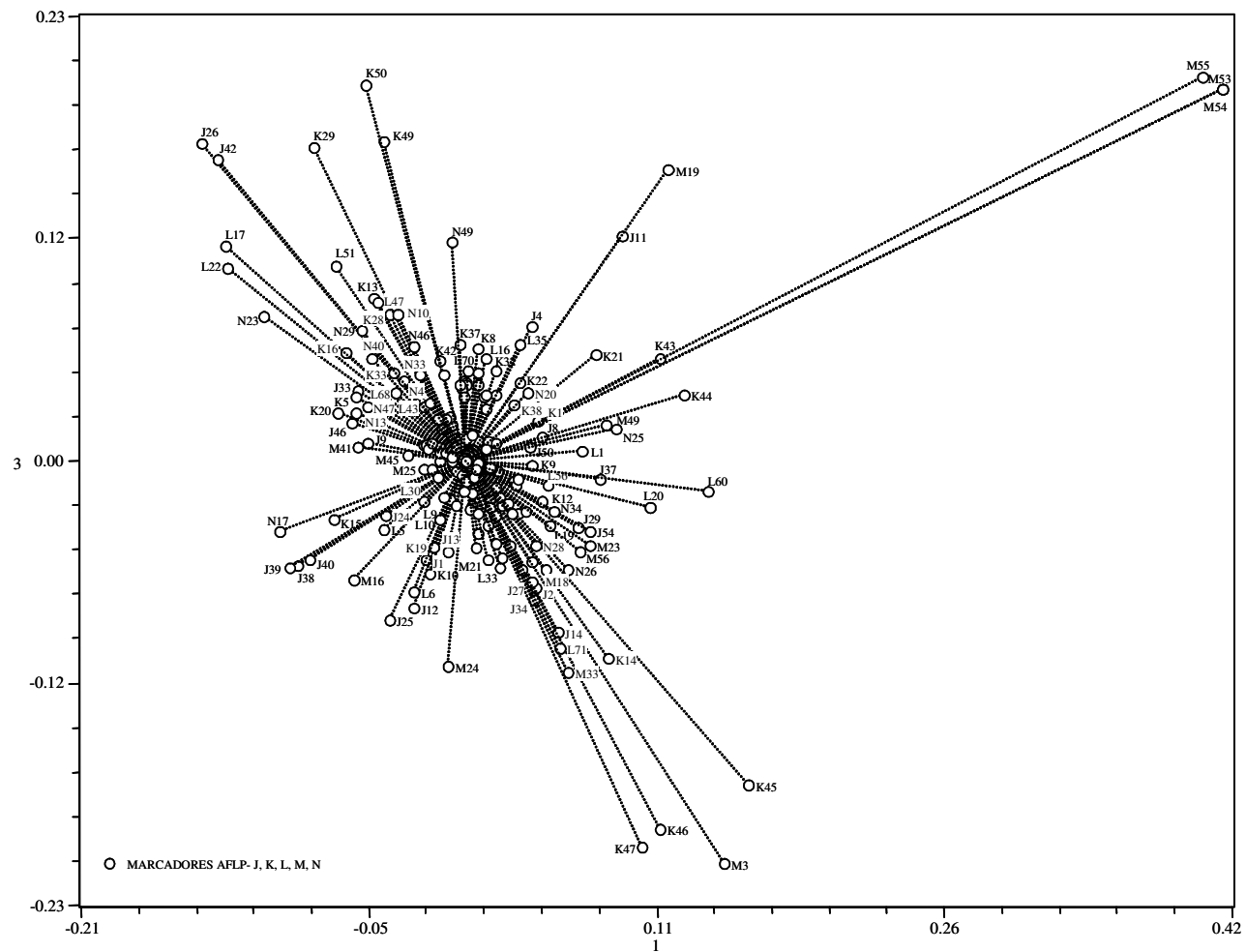


Figura 38. Projecção dos pontos representativos dos 291 fragmentos AFLP nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 3.

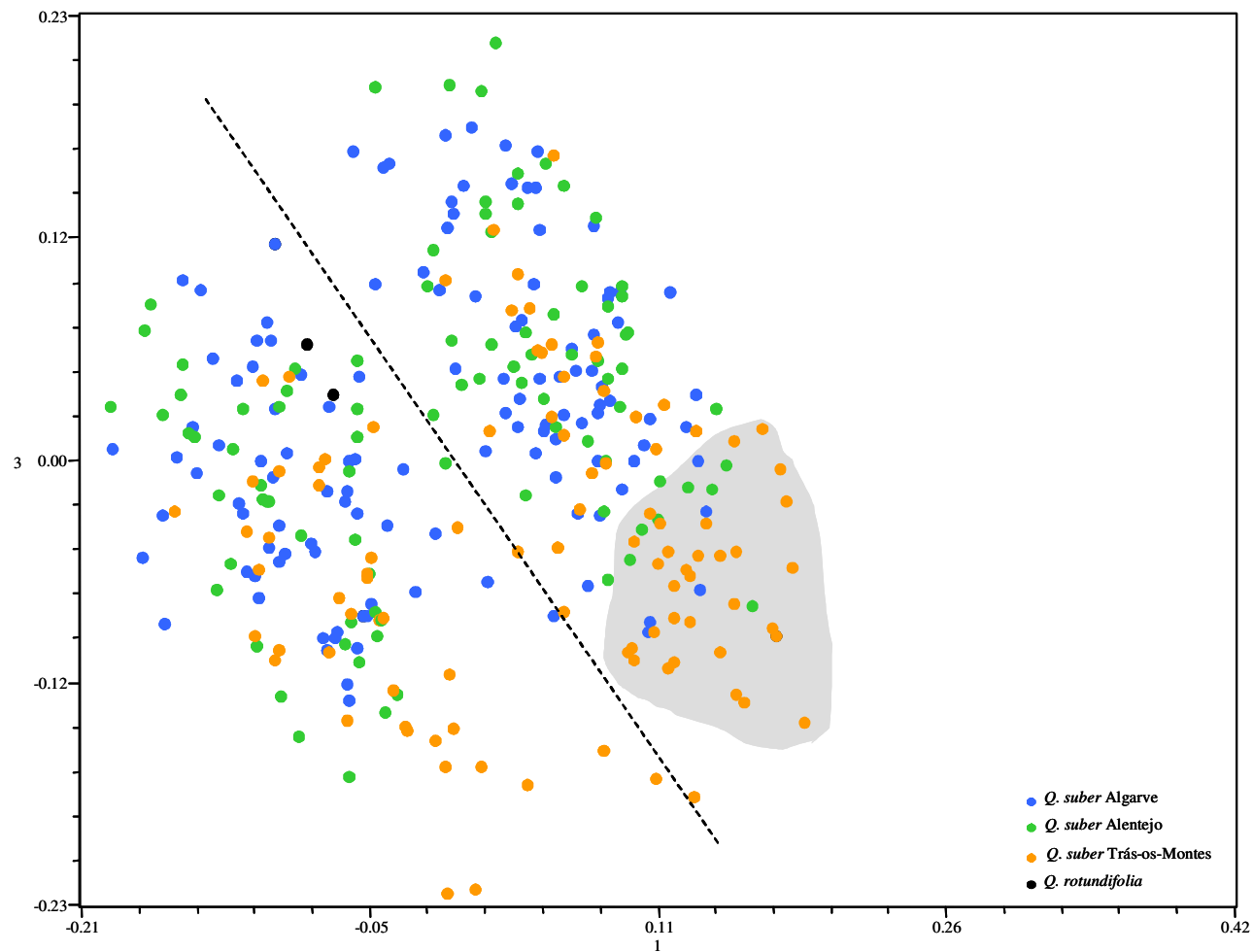


Figura 37. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores, nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 3, obtida pela análise em coordenadas principais dos dados AFLP resultante da soma das matrizes das combinações I1, I2, I3, I9 e I10. A atribuição de cores consoante a origem geográfica está indicada no canto inferior direito da figura. Observa-se uma tendência para separação do grupo dos sobreiros em dois grandes grupos que foi assinalada pela colocação de uma linha a tracejado. Na área sombreada há uma acumulação de sobreiros com origem em Trás-os-Montes.

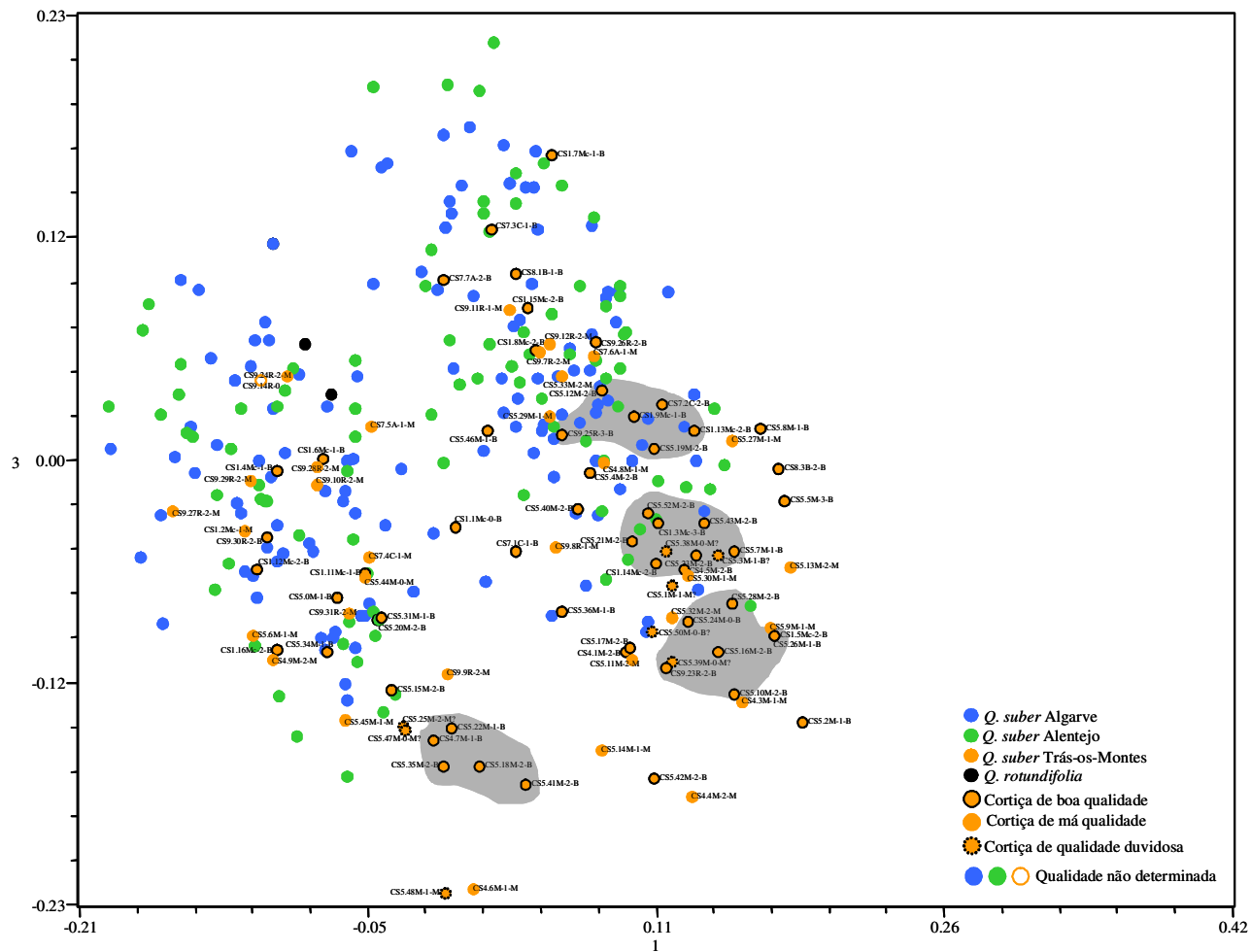


Figura 39. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores, nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 3, obtida pela análise em coordenadas principais dos dados AFLP resultante da soma das matrizes das combinações I1, I2, I3, I9 e I10. A atribuição de padrões aos pontos para identificação da qualidade da cortiça está indicada no canto inferior direito da figura. Nas áreas a sombreado predominam sobreiros de Trás-os-Montes produtores de cortiça de boa qualidade.

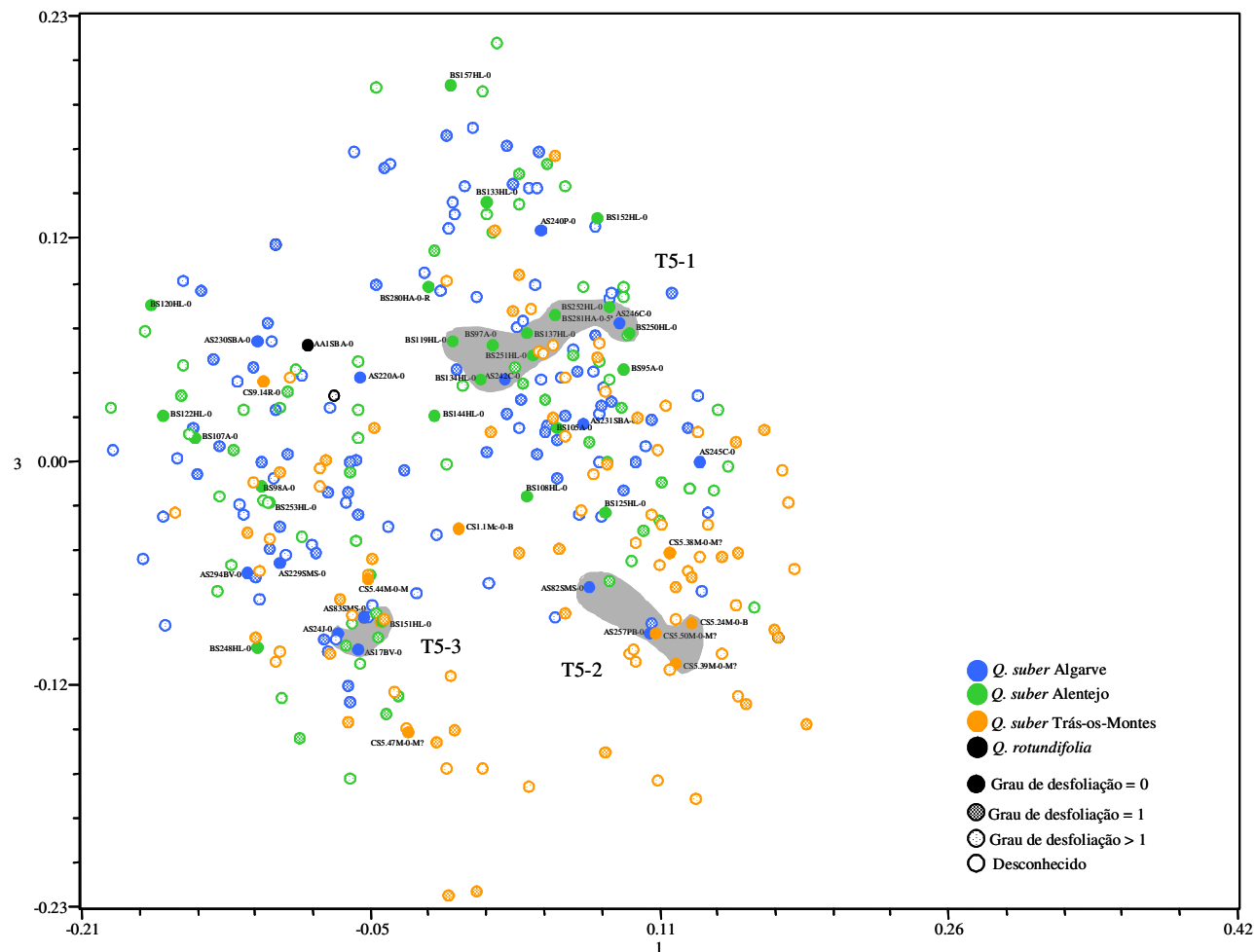


Figura 40. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores, nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 3, obtida pela análise em coordenadas principais dos dados AFLP resultante da soma das matrizes das combinações I1, I2, I3, I9 e I10. A atribuição de padrões aos pontos para identificação do grau de desfoliação está indicada no canto inferior direito da figura. Os sobreiros com grau de desfoliação zero estão identificados. As áreas a sombreado assinalam a posição dos sobreiros que integram os grupos T5-1, T5-2 e T5-3 discutidos no texto. Nestas áreas predominam sobreiros com grau de desfoliação 0.

I.4.1.2. Identificação e sequenciação de potenciais marcadores AFLP.

As sequências nucleotídicas de dezasseis fragmentos AFLP, obtidos com as combinações de *primers* I1, I2, I3, I9 e I10, foram determinadas. Os fragmentos sequenciados estão identificados nos perfis AFLP que se apresentam na figura 41. Na legenda estão indicados os seus tamanhos em pb. É necessário ter em consideração que estes tamanhos correspondem aos fragmentos de restrição de DNA genómico de *Q. suber* acrescidos de 24 pb da sequência dos *primers* que hibridam com os adaptadores.

Foram seleccionados, para sequenciação, treze fragmentos AFLP polimórficos e três fragmentos AFLP monomórficos, obtidos a partir do genoma de *Q. suber*, com o objectivo de:

1. caracterizar marcadores AFLP relacionados com a qualidade da cortiça, específicos da espécie *Q. suber*, através dos fragmentos monomórficos identificados;
2. caracterizar marcadores AFLP indicadores de ocorrência de hibridação entre as espécies *Q. suber* e *Q. rotundifolia*, através de fragmentos polimórficos presentes em percentagem superior nas azinheiras em relação aos sobreiros;
3. caracterizar marcadores AFLP indicadores da tolerância à doença do declínio, através de fragmentos polimórficos presentes em sobreiros que apresentam grau de desfoliação zero.

As sequências nucleotídicas dos fragmentos AFLP de *Q. suber* foram comparadas com as sequências doutros organismos, presentes nas bases de dados do *GenBank*, através do programa *fastA* incluído no software GCG (*Genetics Computer Group*). Na tabela 8 são apresentadas informações relativas às dezasseis sequências, que incluem: a combinação utilizada na análise que deu origem ao fragmento; o código do marcador AFLP; os tamanhos dos fragmentos AFLP em pares de bases, excluindo a sequência dos *primers*; a identificação do organismo e da região do DNA com a qual foi encontrada homologia de sequência com o melhor *fastA score*; a percentagem de homologia relativa à região em que as sequências se sobrepõem. As sequências nucleotídicas dos fragmentos AFLP figuram no anexo I.

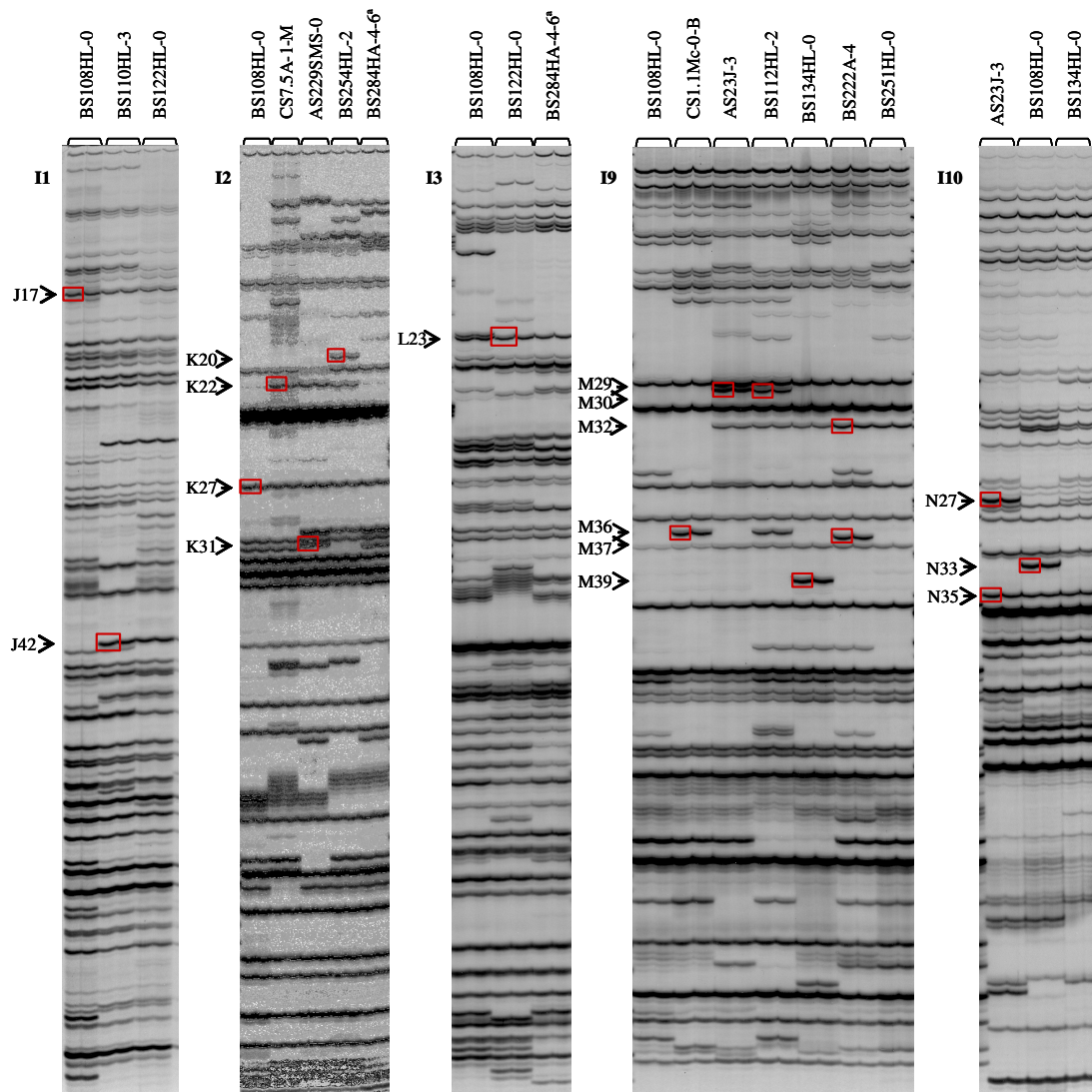


Figura 41. Separação eletroforética de fragmentos AFLP, presentes nos perfis obtidos com as combinações I1, I2, I3, I9 e I10. Os fragmentos cuja sequência nucleotídica foi determinada estão identificados. **I1**: fragmentos J17 (358 pb) e J42 (171 pb). **I2**: fragmentos K20 (298 pb), K22 (225 pb) e K31 (201 pb). **I3**: fragmento L23 (309 pb). **I9**: fragmentos M29 (273 pb), M30 (271 pb), M32 (252 pb), M36 (203 pb), M37 (201 pb) e M39 (186 pb). **I10**: fragmentos N27 (215 pb), N33 (188 pb) e N35 (181 pb). Os tamanhos referidos para os fragmentos incluem 24 pb dos *primers* que não têm origem em DNA genômico de *Q. suber*. O fragmento M29 pode ter sido adquirido por hibridação com *Q. rotundifolia* e deve estar relacionado com a adaptação a regiões com maior número de horas de exposição solar. O fragmento N27 é um potencial marcador de resistência/susceptibilidade à doença do declínio. Na sequência deste marcador estão seis repetições seguidas do par TA. As árvores estão identificadas pelo código definido no Material e Métodos do capítulo I (Tabela 2).

Tabela 8. Homologias existentes entre as sequências nucleotídicas dos fragmentos AFLP de *Q. suber* e as sequências doutros organismos presentes nas bases de dados do GenBank.

Origem	Fragmento AFLP	Tamanho (pb)	Homologia [organismo; número de identificação]	% Homologia	fastA score
Combinação I1 <i>EcoRI-ACC/MseI-ATT</i>	J17	334	<i>Arabidopsis thaliana</i> DNA genómico; cromossoma 5; AB008267.	55 % em 321 nt.	1,2e ⁻⁵
	J42	147	<i>Arabidopsis thaliana</i> DNA genómico, cromossoma 4; AL161556	68 % em 71 nt.	0,032
Combinação I2 <i>EcoRI-ACC/MseI-ACC</i>	K20	274	<i>Solanum tuberosum</i> ; <i>proteínase inhibitor I gene</i> ; Z14027;	57 % em 220 nt.	0,2
			<i>Malus domestica</i> ; MdACS-5A mRNA; <i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase</i> ; AB034992	61 % em 132 nt.	0,25
	K22	255	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; cromossoma VIII; gene NAM8; RNA binding proteins; U00060.	74 % em 50 nt.	1,1
			<i>Arabidopsis thaliana</i> ; gene DFR (dihydroflavonol 4-reductase); AB033294.	60 % em 134 nt.	1,1
K27	201	<i>Oryza sativa</i> ; DNA genómico, cromossoma 1; AP002746.	67 % em 118 nt.	0,07	
K31	177	<i>Arabidopsis thaliana</i> ; DNA, cromossoma 2; AC005171.	73 % em 52 nt.	0,23	
Combinação I3 <i>EcoRI-ACG/MseI-ACC</i>	L23	285	<i>Oryza sativa</i> microsatellite MRG422; (TA) _{x41} ; AY021897.	57 % em 239 nt.	0,094
Combinação I9 <i>EcoRI-ACC/MseI-TGG</i>	M29	249	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; gene RHC18; X80930.	59 % em 177 nt.	0,041
	M30	247	<i>Arabidopsis thaliana</i> ; DNA genómico; cromossoma 2; AC005169.	63 % em 104 nt.	0,33
	M32	228	<i>Arabidopsis thaliana</i> ; DNA genómico; cromossoma 2; AC007112	57 % em 203 nt.	1,2e ⁻⁶
	M36	179	<i>Solanum tuberosum</i> ; mRNA ADH-1 (<i>alcohol dehydrogenase 1</i>); M25154.	61 % em 179 nt.	0,034
	M37	177	<i>Oryza sativa</i> ; DNA genómico; cromossoma 1; AP002522.	65 % em 106 nt.	0,067
	M39	162	<i>Oryza sativa</i> ; DNA genómico; cromossoma 1; AP002913.	59 % em 128 nt.	0,0074
Combinação I10 <i>EcoRI-ACC/MseI-TTG</i>	N27	191	<i>Arabidopsis thaliana</i> ; DNA genómico; cromossoma 5; AB016886.	61 % em 127 nt.	0,66
	N33	164	<i>Lycopersicon esculentum</i> ; putative <i>permease gene</i> ; AF275345.	80 % em 71 nt.	8,9e ⁻⁶
	N35	157	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; DNA genómico; cromossoma XI; Z28100.	61 % em 131 nt.	0,32

I.5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.

I.5.1. *Variabilidade genética em Q. suber.*

A variabilidade genética em *Q. suber*, avaliada por AFLP com cinco combinações de *primers*, permitiu diferenciar 313 árvores, provenientes de três regiões de Portugal Continental, de acordo com o seu genótipo. O perfil genético individual de cada sobreiro resultou da análise de 291 *loci* aleatórios do genoma, presentes na forma de fragmentos monomórficos e polimórficos. Estes polimorfismos têm proveniência em inserções, eliminações e substituições de pares de bases. A matriz de dados que representa os fragmentos obtidos em cinco análises selectivas integra 90183 caracteres, codificados na forma de 1 ou 0, consoante a presença ou ausência do fragmento electroforético no perfil AFLP. A percentagem de polimorfismo detectado nos sobreiros é de 71 % e é indicadora de índices elevados de variabilidade nesta espécie. A diversidade genética é homogénea nas populações estudadas do Algarve, Alentejo e Trás-os-Montes. A elevada variação fenotípica que se observa em *Q. suber* ao nível da forma das folhas, da forma dos frutos, da qualidade da cortiça produzida e do vigor vegetativo, quantificado na forma de grau de desfoliação, é reflectida nos padrões AFLP. Os valores dos coeficientes de semelhança genética variam entre 0,88 e 0,61 o que significa que, apesar da elevada diversidade genética, os sobreiros partilham entre si 60 % do genoma. Este facto é concordante com o aspecto dos perfis AFLP dos sobreiros. Em cada uma das cinco análises efectuadas existem fragmentos comuns a todos os sobreiros que permitem identificar de imediato se uma árvore não classificada taxonomicamente pertence ou não à espécie *Q. suber*.

Até agora, os estudos de variabilidade genética em *Q. suber* foram realizados com recurso a isoenzimas (Nóbrega e Sousa, 1993; Toumi e Lumaret, 1998; Elena-Rossello e Cabrera, 1996; Jiménez *et al.*, 1999) e à morfologia dos frutos, folhas, tecido suberoso e órgãos reprodutores (Natividade, 1950). Toumi e Lumaret (1998) encontraram uma percentagem de polimorfismo de 76 % em 40 populações de *Q. suber*, um valor aproximado ao que foi obtido por AFLP. Em todos os trabalhos dos autores referidos é descrita a elevada heterozigocidade associada a cada *locus* e a ocorrência de gradações nos caracteres fenotípicos que caracterizam a espécie. Segundo Jiménez *et al.* (1999), a

diferenciação inter-populações corresponde a apenas 3 % da diversidade total. Em 13 *loci* de microssatélites de *Q. suber* foram também detectados níveis de variabilidade genética elevados relativamente ao número de alelos e à heterozigocidade (Hornero *et al.*, 2001).

A metodologia AFLP tem sido usada para avaliar a diversidade genética noutras espécies de plantas e os índices de polimorfismo encontrados são semelhantes aos observados em *Q. suber*, assim como o número de fragmentos gerado em cada análise com uma dada combinação de *primers*. Na análise por AFLP de 41 genótipos da árvore tropical *Azadirachta indica* da família Meliaceae, com sete combinações de *primers* diferentes, obtiveram-se 422 fragmentos no total, com uma média de 60 fragmentos por combinação e uma percentagem de polimorfismo de 69,8 % (Singh *et al.*, 1999). A análise de grupos aplicada à matriz de semelhanças dos 41 genótipos com base no coeficiente de *Jaccard* mostrou que existem dois grupos unidos por um coeficiente de semelhança de 0,47 e vários subgrupos com genótipos apresentando coeficientes de semelhança que variam entre 0,74 e 0,93.

A estrutura genética das populações naturais de *Juniperus communis* na Grã-Bretanha e País de Gales foi analisada por AFLP (van der Merwe *et al.*, 2000). Cento e cinco indivíduos, provenientes de oito populações naturais, foram estudados com três combinações de *primers* que produziram um total de 279 fragmentos, dos quais 83,5 %, são polimórficos. A maior parte dos indivíduos partilham 60 % do genótipo e a elevada diversidade genética assemelha-se à extrema diversidade morfológica observada na espécie, tal como em *Q. suber*. A análise de grupos mostra que os indivíduos da espécie *Juniperus communis* formam grupos que reflectem a sua origem geográfica, apesar da elevada variação intra-populacional. Em *Q. suber*, com base nos 291 marcadores AFLP, também se observam, no fenograma, grupos em que predominam sobreiros de determinada região geográfica. Na projecção dos pontos representativos dos 313 sobreiros nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 3 observa-se uma maior dispersão no espaço dos pontos representativos dos sobreiros do Algarve e do Alentejo do que dos sobreiros de Trás-os-Montes, o que sugere uma base genética mais restrita nos sobreiros desta última região.

O perfil genético obtido para cada um dos sobreiros é um código único baseado em muitos caracteres, que tem um carácter generalista, podendo ser útil para uma grande variedade de objectivos.

A ordenação dos sobreiros em grupos com base nas suas relações de parença cria hipóteses cuja verificação estimula novas investigações.

I.5.2. A utilização dos perfis AFLP para análise taxonómica.

A obtenção de perfis genéticos para indivíduos de espécies diferentes de *Quercus* consiste num instrumento poderoso para discriminar genótipos individuais e para determinar relações filogenéticas entre as espécies.

A diferenciação dos 313 indivíduos da espécie *Q. suber* dos 2 indivíduos da espécie *Q. rotundifolia* verificou-se na análise por AFLP, em todas as combinações de primers e está de acordo com a classificação sistemática destes *Quercus*. O coeficiente de semelhança entre indivíduos destas duas espécies é de 0,20 tendo em consideração os 291 marcadores AFLP.

Na combinação de primers I9, na qual se incluíram 52 azinheiras e 313 sobreiros, identificaram-se indivíduos que pertencem a três espécies diferentes, *Q. suber*, *Q. rotundifolia* e talvez, *Q. ilex*. No fenograma, o grupo formado pelos indivíduos BA7A-3 e AA24BV-1 está unido aos grupos formados pelos sobreiros e pelas azinheiras, por um coeficiente de semelhança de, aproximadamente, 0,10. Na projecção dos pontos representativos das 365 árvores, nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, constata-se que as árvores BA7A-3 e AA24BV-1 estão mais próximas do grupo das azinheiras do que dos grupos de sobreiros. Na análise em coordenadas principais, a dispersão, em cada um dos grupos, dos pontos representativos das árvores da espécie *Q. suber* é inferior à das árvores da espécie *Q. rotundifolia*, sugerindo que a diversidade genética em *Q. rotundifolia* é mais elevada do que em *Q. suber*. No grupo de *Q. rotundifolia* observa-se uma tendência para a formação de dois subgrupos. Cottrell *et al.* (2003), estudaram a estrutura genética de *Quercus robur* e *Q. petraea* por microsatélites e constataram, em consonância com os resultados doutros trabalhos, que *Q. petraea* exhibe uma diversidade genética superior a *Q. robur*. Estes autores postularam que a causa talvez estivesse na hibridação unidireccional que se verifica entre as duas espécies, que enriquece a diversidade de *Q. petraea*. Boavida *et al.* (2001), num trabalho sobre a reprodução de *Q. suber*, referem que o cruzamento entre esta espécie e *Q. ilex* só é possível num sentido ou seja, com *Q. suber* a funcionar como progenitor masculino e *Q. ilex* como progenitor feminino.

Os resultados obtidos por AFLP com a combinação I9 enquadram-se no que foi descrito por Lebreton *et al.* (2001) relativamente à caracterização sistemática das azinheiras. Segundo estes autores, é mais prudente considerar as azinheiras como um complexo específico *Quercus aggr. Ilex* L. que compreende duas espécies distintas *Q. ilex* e *Q. rotundifolia*. Esta última possui uma subespécie denominada maghrebiana [*Q.(ilex) rotundifolia* subsp. *maghrebiana*]. A aplicação da metodologia AFLP a árvores do complexo *Quercus aggr. Ilex* L. estudadas por Lebreton *et al.* tem potencialidades para confirmar o elevado índice de polimorfismo observado por estes autores e a definição de grupos ou subgrupos taxonómicos no complexo *Quercus aggr. Ilex* L.

Nos sobreiros ocorre uma separação em dois grupos na análise por AFLP com as combinações de *primers* I1 e I9. Nos resultados obtidos com os 291 marcadores AFLP observa-se uma tendência para a separação dos 313 sobreiros em dois grupos que incluem árvores das populações do Algarve, Alentejo e Trás-os-Montes. Estes resultados apontam no sentido da existência de subespécies em *Q. suber*, tal como é sugerido por Lebreton *et al.* (2001) para *Q. rotundifolia*. Uma caracterização morfológica rigorosa dos 313 sobreiros incluídos neste estudo é essencial para uma definição taxonómica clara de *Q. suber*.

A separação dos sobreiros em dois grupos não parece estar relacionada com fenómenos de hibridação entre *Q. suber* e *Q. rotundifolia*. Na análise por AFLP com a combinação de *primers* I9, quando se sobre põe a árvore de expansão mínima à projecção dos pontos representativos das 365 árvores, verifica-se que os sobreiros dos grupos I9C-IIS2 e I9C-IIS1 estão todos ligados entre si e que a ligação ao grupo das azinheiras I9C-IIA se faz através do sobreiro AS78SMS-1 do grupo I9C-IIS2 e da azinheira BA8A-2 do grupo I9C-IIA. No entanto, na combinação I9 foram identificados os fragmentos AFLP M9, M29 e M37 que estão presentes maioritariamente nas azinheiras e apenas em alguns sobreiros. A homologia da sequência nucleotídica de M29 com a do gene *RHC18* de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica uma proteína envolvida em processos de reparação do DNA danificado por acção de radiação UV sugere a possibilidade da sequência ter sido adquirida por hibridação com *Q. rotundifolia*, que conferiria uma melhor adaptação ao meio. Esta característica pode segregar independentemente das restantes e portanto, não afectar fenotipicamente os descendentes.

Em princípio, de acordo com os resultados deste estudo, sessenta por cento do genoma de *Q. suber* não é envolvido em fenómenos de recombinação, ao passo que

quarenta por cento podem estar sujeitos a fenômenos de introgressão, com troca de material genético com *Q. rotundifolia*. Os genótipos resultantes estarão sujeitos a seleção favorável ou desfavorável. De certa forma, os resultados obtidos vão ao encontro da teoria defendida por Zoldos *et al.* (1999), que defendem que as espécies de *Quercus* devem ser encaradas como grupos dominantes de indivíduos caracterizados por alelos resultantes de co-adaptação e correlacionados com aspectos fenotípicos. O modelo proposto por Whittmore e Schaal (1991) considera as espécies de *Quercus* como “picos” adaptativos, em que a tendência para as espécies se fundirem, devido ao fluxo de genes por introgressão, é equilibrada pela seleção de grupos de alelos co-adaptados.

A análise do DNA dos cloroplastos e das mitocôndrias realizada em populações de *Q. suber* e *Q. ilex*, por Belahbib *et al.* (2001), dá indicação da existência de um elevado nível de hibridação entre as duas espécies, funcionando *Q. ilex*, principalmente, como progenitor feminino. Estes autores referem que, apesar disso, os indivíduos da espécie *Q. suber* que possuem haplotipos dos genomas citoplasmáticos característicos de *Q. ilex*, apresentam morfologia típica de *Q. suber*, no que diz respeito à produção de cortiça. Estes resultados parecem, aparentemente, contraditórios com os observados por AFLP. Os genomas dos organelos citoplasmáticos podem corresponder aos 40 % do genoma potencialmente envolvidos em fenômenos de introgressão. A aplicação do método usado por Belahbib *et al.* (2001) aos genomas citoplasmáticos dos 313 sobreiros deste estudo, com determinação dos haplotipos respectivos, pode confirmar estas suposições.

Na literatura são várias as referências ao uso da metodologia AFLP para diferenciação de indivíduos de espécies diferentes. Mariette *et al.* (2002) compararam os níveis de diversidade genética em populações de *Q. petraea* e *Q. robur* em povoamentos isolados e povoamentos mistos. Concluíram que a diversidade genética nas populações e a diferenciação genética entre as populações são mais elevadas em *Q. petraea* do que em *Q. robur*. A relação entre as espécies da subdivisão *Datureae* foi avaliada por AFLP e, de acordo com os resultados obtidos, os autores propuseram uma nova classificação, com inclusão de três secções novas no género *Datura* (Mace *et al.*, 1999). Também foram usados marcadores AFLP para determinar as relações filogenéticas existentes entre várias espécies de *Lactuca* (Hill *et al.*, 1996) e várias espécies de *Populus* (Cervera *et al.*, 1996).

1.5.3. Estabelecimento de correlações entre genótipo e fenótipo através de marcadores moleculares.

Uma das abordagens mais usadas para estudar a relação genótipo/fenótipo é denominada “unmeasured genotype approach” (Crandall, 1996). Nesta abordagem, os *loci* que afectam o fenótipo são desconhecidos e o investigador tenta deduzir ou inferir ligações do genótipo com o fenótipo através duma correlação entre indivíduos relacionados entre si.

Esta aproximação foi seguida na análise por AFLP efectuada às 315 árvores com base nos 291 marcadores. Nos grupos de sobreiros formados após análise por taxonomia numérica procuraram-se fragmentos AFLP comuns aos sobreiros apresentando grau de desfoliação zero e aos sobreiros de Trás-os-Montes produtores de cortiça de boa qualidade, incluídos no mesmo grupo. Seleccionaram-se os marcadores J1, J54, K5 e M56 como fragmentos potencialmente relacionados com a produção de cortiça de boa qualidade e seleccionou-se o fragmento N27 como um marcador potencial da tolerância/susceptibilidade à doença do declínio. É de realçar que estes fragmentos AFLP não estão presentes apenas nos sobreiros produtores de cortiça de boa qualidade ou nos sobreiros que têm grau de desfoliação zero. Este facto não invalida que estes fragmentos estejam relacionados com os aspectos fenotípicos referidos, porque um fragmento de restrição produzido por AFLP a partir de vários sobreiros e que se identifica pela distância de migração num gel de electroforese, possui o mesmo número de bases mas não possui necessariamente a mesma sequência nucleotídica. A elevada heterozigocidade descrita em *Q. suber* e a existência de múltiplos alelos não identificados por esta metodologia devem ser tidos em consideração. Para confirmar a relação destes marcadores com a tolerância à doença do declínio e com a qualidade da cortiça é necessário conhecer a sequência nucleotídica dos fragmentos AFLP do mesmo tamanho presentes em todos os sobreiros e, caso se confirmem as suposições, transformá-los em marcadores específicos.

A projecção dos pontos representativos dos 313 sobreiros, nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, na análise com a combinação I2, aponta para a separação dos sobreiros em quatro grupos. A única característica fenotípica descrita que separa os sobreiros em quatro grupos diz respeito à produção de estruturas reprodutivas masculinas e femininas. Elena-Rossello *et al.* (1993) analisaram a variabilidade

fenológica em populações de *Q. suber* durante três anos e separaram as árvores de uma população em quatro grupos; árvores masculinas que produzem poucas flores femininas e nunca produzem glandes; árvores femininas que produzem poucas flores masculinas; árvores vegetativas que não têm inflorescências masculinas nem femininas e árvores que produzem os dois tipos de inflorescência. Seria interessante acompanhar durante três anos a produção de estruturas reprodutivas nas árvores analisadas por AFLP para verificar se existe alguma relação entre os perfis AFLP da combinação I2 e a produção de semente.

I.5.4. Vantagens e desvantagens da metodologia AFLP.

Na escolha do método a usar para analisar a diversidade genética em *Q. suber* foram ponderados vários aspectos. Pretendia-se um método em que não fosse necessário ter conhecimento prévio de sequências do genoma, que permitisse num único ensaio estudar vários *locus* em simultâneo, que fosse reprodutível, em que os marcadores produzidos não fossem dependentes de factores fisiológicos e ambientais e que já tivesse permitido, noutras espécies de plantas, identificar marcadores moleculares associados à resistência a agentes patogénicos.

A única metodologia que reunia todos estes requisitos era a AFLP, desenvolvida por Vos *et al.*, em 1995, da qual existiam vários trabalhos publicados que atestavam as suas potencialidades.

Em 1996, Cervera *et al.* identificam marcadores AFLP em árvores do género *Populus* associados a um *locus* que confere resistência a *Melampsora larici-populina*. O estudo foi desenvolvido num conjunto de descendentes híbridos resultantes do cruzamento entre a espécie resistente *Populus deltoides* (progenitor feminino) e *Populus nigra* (progenitor masculino). O rácio de segregação observado entre as plantas susceptíveis e as plantas tolerantes mostrou que a resistência ao fungo era definida por um *locus* dominante único que conferia resistência a três estirpes diferentes de *Melampsora larici-populina*.

Em *Prunus pérsica*, foi definido um marcador molecular de resistência/susceptibilidade aos nemátodos *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* com origem em dois fragmentos AFLP com tamanhos de 216 e 217 pb, que se mostraram potencialmente associados aos dois fenótipos (Lu *et al.*, 1999). Após sequenciação,

verificou-se que a diferença entre eles era de 4 pb; o conhecimento da sequência nucleotídica permitiu convertê-los em marcadores específicos de resistência/susceptibilidade.

A reprodutibilidade e a robustez do método AFLP foram testadas por Hansen *et al.* (1999) ao analisarem geneticamente várias espécies de *Beta*. Estes autores usaram sete combinações de *primers* diferentes, em análises repetidas que incluíram todos os passos da metodologia, desde a extração de DNA até à amplificação selectiva. Analisaram, em duplicado, 318 fragmentos AFLP presentes em 16 amostras ou seja, compararam 5088 caracteres. Encontraram três tipos de erros: digitalização dos fragmentos após codificação (0,3 %); atribuição das bandas electroforéticas a um ou dois fragmentos devido a resolução diferente no gel de electroforese (1,5 %); fragmentos ausentes num ensaio e presentes noutra, para a mesma amostra (0,5 %).

Hansen *et al.* (1999) analisaram, também, os erros associados à interpretação das bandas electroforéticas. A interpretação mais comum deriva do pressuposto de que num *locus* único existem dois alelos diferentes que se traduzem pela presença ou ausência de banda electroforética no gel. Mas, se dois ou mais *loci* estiverem representados por fragmentos com o mesmo tamanho aquele pressuposto dá origem a uma interpretação genética incorrecta. Para investigar estes tipos de erros Hansen *et al.*, pré-amplificaram dois genótipos usando um *primer EcoRI* com um nucleótido selectivo (E+1) e um *primer MseI* com dois nucleótidos selectivos (M+2). Nas amplificações selectivas usaram várias combinações de *primers* E+3, M+3 e M+4. No *primer* M+4 o quarto nucleótido era A, C, T ou G ou uma mistura dos quatro nucleótidos. Em todas as situações, quando um fragmento é amplificado com a combinação de *primers* E+3/M+3, também é amplificado por E+3/M+4 (4º nt = A, C, T e G) e por uma das combinações de *primers* E+3/M+4 (4º nt = A ou C ou G ou T). A amplificação de um fragmento por mais do que uma combinação de *primers* E+3/M+4 explica a ocorrência de fragmentos com tamanhos semelhantes pertencentes a diferentes *loci*. Estes autores observaram que dos 456 fragmentos resultantes da amplificação selectiva E+3/M+3, 396 estavam presentes na amplificação com os *primers* E+3/M+4 (4º nt = A, C, T e G) e numa das amplificações com os *primers* E+3/M+4 (4º nt = A ou C ou G ou T). Treze por cento dos fragmentos estavam presentes em mais do que uma das amplificações com os *primers* E+3/M+4 (4º nt = A ou C ou G ou T). Quanto aos erros derivados de hibridação não específica das bases selectivas adicionadas na extremidade dos *primers*, verificaram

que a situação em que ocorrem menos erros é quando se combina uma amplificação selectiva E+3/M+3 com uma pré-amplificação E+1/M+1.

Outros investigadores testaram o método e concluíram que ele é fiável devido à restringência das condições de amplificação, que produz resultados reprodutíveis e que é adequado para a diferenciação de génotipos (Zhang *et al.*, 1999). Os perfis AFLP obtidos a partir de DNA de folhas e flores de várias espécies de orquídeas e de híbridos apresentaram-se idênticos (Chen *et al.*, 1999).

No estudo da biodiversidade do sobreiro foram testadas, em duplicado, duas amostras e não se observaram alterações nos perfis genéticos.

A metodologia possui, no entanto, algumas limitações. Por exemplo, os marcadores AFLP são interpretados como dominantes e esta característica limita a sua utilidade na análise genética clássica de populações (Ceresini *et al.*, 2002).

II. ASPECTOS MOLECULARES DA INTERACÇÃO ENTRE *Q. suber* E *P. cinnamomi*.

II.1. INTRODUÇÃO

II.1.1. *Processo Infecioso.*

Alguns organismos vivem em contacto directo com organismos de outras espécies, retirando-lhes os nutrientes ou beneficiando do parasitismo de outras maneiras. De Bary, um micologista e fitopatologista do século XIX, descreveu esta associação como simbiose, em que o hospedeiro é referido como o organismo de maiores dimensões. Este investigador fez referência a dois tipos de relação simbiótica, uma em que as duas espécies beneficiam (mutualista) e outra em que apenas uma das espécies beneficia (parasítica). Um parasita que danifica de forma perceptível um hospedeiro é definido como agente patogénico (Carlile *et al.*, 2001). *Phytophthora cinnamomi* é um agente patogénico exótico e altamente destrutivo que parasita cerca de 900 plantas lenhosas vivas. O nome do género *Phytophthora* De Bary, deriva do grego “phyton” para planta e “phthora” para destruição. *P. cinnamomi* está associado à doença da tinta da nogueira e do castanheiro (Agrios, 1991; Gouveia, 1993), à presença de cancrios nos troncos de *Q. rubra* e de outras plantas ornamentais em França (Robin *et al.*, 1994), ao declínio que afecta três espécies de carvalhos no México (Tainter, 2000), à destruição das florestas de Jarrah (*Eucalyptus marginata*) no sudoeste da Austrália (Shearer and Tippett, 1989) e mais recentemente, comprovadamente associada ao declínio das manchas florestais de sobreiro (*Q. suber*) e azinheira (*Q. rotundifolia*; *Q. ilex*) na Península Ibérica (Brasier, 1992; Brasier *et al.*, 1993; Marcelino, 2001; Sánchez *et al.*, 2002).

A elevada destruição associada ao género *Phytophthora* e a incapacidade, por vezes, de compreender a forma diferente de actuar das várias espécies que compõem o género, assim como a rapidez e extensão das doenças que provocam, levou alguns investigadores a considerar que só será possível efectuar um controlo sustentável das doenças provocadas por *Phytophthora* quando se compreender a forma como o processo infeccioso decorre, quer a nível celular, quer a nível molecular. Os exemplos descritos

relativamente à biologia, patologia e estrutura dos fungos superiores nem sempre se adaptam aos oomicetas porque, filogeneticamente, estes fungos ocupam uma linha evolutiva única, não relacionada com os fungos superiores e próxima da das algas castanhas. Segundo Margulis (1992), o género *Phytophthora* pertence actualmente ao Super Reino Eucariota, Reino Protista, divisão IV e à classe Oomycota (fungos gelatinosos, parasitas de plantas e insectos). Ocupa nesta divisão a posição 35. Recentemente, dados obtidos a partir de sequências em aminoácidos de proteínas mitocondriais e de proteínas de genes cromossómicos reforçaram esta classificação (Lang *et al.*, 1999; Baldauf *et al.*, 2000). Segundo Kamoun (2001) e de acordo com estas análises, é evidente que os oomicetas desenvolveram a capacidade de infectar plantas de forma independente da dos outros agentes patogénicos e é provável que possuam mecanismos singulares para o fazer.

Todas as plantas são naturalmente resistentes ao ataque por parte dos microorganismos através da denominada incompatibilidade básica ou resistência por parte de plantas não hospedeiras (*non-host resistance*) e, por isso, ocorrer doença é mais uma excepção do que uma regra. A resistência por parte das plantas não hospedeiras advém da incapacidade do parasita para reconhecer a planta e infectá-la ou da capacidade da planta para activar de forma rápida os seus mecanismos de defesa que, ao actuarem com sucesso, lhe conferem protecção (Kombrink e Somssich, 1995).

Num processo infeccioso os mecanismos a utilizar pelos fungos vão depender, no início, da localização dos órgãos das plantas a colonizar. A colonização das superfícies das plantas que estão acima do solo (ramos, folhas, flores, frutos, tronco) e que estão em contacto com o ar e com a água das chuvas e orvalho, faz-se através de esporos. Deste processo fazem parte a produção de esporos, a sua libertação, a dispersão no ar e a colonização dos tecidos. Nas infecções dos órgãos subterrâneos das plantas os fungos utilizam quase sempre as hifas para atacar as raízes, sendo o crescimento destas estruturas suportado pelo solo envolvente. As raízes e o solo são locais ideais para o desenvolvimento microbiano porque os nutrientes e a água estão presentes próximo das raízes e o solo protege os microorganismos da luz solar, oferecendo condições de vida com temperatura e humidade mais constantes do que à superfície (Carlile *et al.*, 2001).

A maior parte dos fungos patogénicos que atacam a parte superior das plantas fá-lo em locais onde existe uma camada externa de células vivas (epiderme), tais como folhas, ramos, flores ou frutos. As superfícies lignificadas e suberizadas, como as do tronco, são praticamente inexpugnáveis aos fungos, a não ser que estejam danificadas.

O processo de infecção inicia-se logo que o fungo entra em contacto com a superfície da planta e da interacção fungo-patógeno fazem parte um conjunto de sinais que têm origem na superfície do tecido a colonizar. Quando a percepção do fungo é favorável relativamente ao hospedeiro, o fungo germina e desenvolve as estruturas necessárias à penetração da cutícula (Kolattukudy *et al.*, 1995). O processo de deposição dos esporos nas partes aéreas das plantas é feito de forma passiva, os propágulos transportados pelo ar ou pela água dependem do acaso para encontrarem o tecido apropriado de uma planta com um genótipo susceptível (Niks e Rubiales, 2002).

Os sinais que devem ser captados pelo fungo fazem parte dum conjunto de eventos denominado “sinalização por parte da superfície em patogénese” (*surface signaling in pathogenesis*). Em 1995, num colóquio sob o tema “A auto-defesa por parte das plantas: mecanismos de indução e sinalização”, Kolattukudy secundado por outros investigadores, apresentou vários exemplos do que pode funcionar como sinal, presente na superfície das plantas. De um modo geral, foram apontados como sinais que induziam no fungo, a diferenciação celular com produção de estruturas infecciosas, a topografia das plantas e a presença de químicos na superfície dos órgãos a colonizar (Kolattukudy *et al.*, 1995).

O fungo *Uromyces appendiculatus*, por exemplo, penetra nas folhas através dos estomas depois da formação do *appressorium* que é induzido por sinais topográficos. Em laboratório, foi obtido o mesmo resultado com redes de microfibras que se aproximavam no formato e relevo à superfície do estoma. Foi proposto que o processo de diferenciação seria desencadeado por substâncias químicas mecânico-sensitivas que são induzidas pela topografia das folhas e que provocam um aumento do fluxo de iões ao nível da membrana plasmática do fungo (Zhou *et al.*, 1991).

As ceras presentes na superfície das plantas também podem funcionar como sinais nas interacções fungo-planta. A germinação dos esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* com formação do *appressorium* é induzida, de forma selectiva, pelas ceras da superfície do fruto hospedeiro (neste estudo, o abacate) (Podila *et al.*, 1993). Ceras doutras plantas não são capazes de induzir a diferenciação em *C. gloeosporioides* e as ceras do abacate não são reconhecidas por outras espécies de *Colletotrichum*, comprovando a especificidade do sinal emitido pelo hospedeiro. Foi observado experimentalmente que a fracção das ceras constituída por álcoois de cadeia hidrocarbonada longa (>C₂₄) é mais activa na indução da formação de estruturas infecciosas em *C. gloeosporioides* e que a adição de ceras doutras plantas às ceras do

abacate inibiam a diferenciação no fungo. Considera-se que devem existir nas ceras substâncias indutoras e substâncias inibidoras da germinação dos esporos e da formação do *appressorium* e que a proporção destas substâncias nas ceras do hospedeiro é determinante para a especificidade observada entre o patógeno e o hospedeiro (Podila *et al.*, 1993).

O etileno, também denominado hormona do amadurecimento, é usado pelos fungos como sinal para fazerem coincidir a infecção com o amadurecimento dos frutos. Os propágulos dos fungos permanecem em estado de dormência na superfície dos frutos até ao início da produção de etileno gasoso, que ocorre durante o amadurecimento. Nesse momento, os fungos iniciam a germinação, com ramificação das hifas e formação de múltiplos *appressoria* a partir de um único esporo. Usando o etileno como sinal, o fungo coordena a infecção com o amadurecimento dos frutos e amplifica a patogenicidade, garantindo a entrada do fungo em mais do que um sítio, a partir de um único esporo (Flaishman e Kolattukudy, 1994).

O processo infeccioso nas raízes das plantas tem certamente alguns contornos diferentes do processo que ocorre nas folhas. Tal como os ramos, as raízes, nos primeiros estados de desenvolvimento estão cobertas por uma camada de células vivas: a epiderme. A epiderme das raízes está coberta de mucilagem e não está protegida por uma cutícula hidrofóbica como as folhas. Na região dos pêlos radiculares, normalmente alguns milímetros atrás da extremidade da raiz, crescem extensões das células epidérmicas e a extremidade da raiz é coberta pelo *cap*, que é composto por células que morrem e que são descartadas à medida que a raiz cresce. Estas células, em conjunto com a mucilagem e os exsudados celulares, fazem das raízes uma fonte rica em nutrientes para os microorganismos do solo, suportando a microflora da rizosfera que inclui fungos saprofíticos e parasitas assim como organismos que vivem em simbiose (Carlile *et al.*, 2001).

Para os agentes patogénicos do solo como *P. cinnamomi*, a forma de se aproximar do hospedeiro difere da usada pelos fungos que usam esporos transportados pelo ar. Os esporos não podem viajar para tão longe, nem tão depressa, no solo e portanto, a sua dispersão é mais limitada. Para a maior parte das espécies de *Phytophthora* o contacto inicial com uma planta que funciona como hospedeiro potencial é feito através de zoósporos móveis, biflagelados. Estes zoósporos nadam activamente na água e podem viajar 25-35 mm em solos alagados. O flagelo anterior projecta-se para a frente da célula e puxa-a e o flagelo posterior funciona como um leme

que orienta a direcção do zoósporo enquanto ele nada. Os zoósporos não possuem parede celular e a superfície externa é delimitada pela membrana plasmática. Tal como muitos protistas, fazem a regulação osmótica através de um vacúolo contráctil que retira água do citoplasma e que a bombeia ciclicamente para fora da célula (Hardham, 2001).

Os zoósporos reúnem-se nas superfícies das raízes, principalmente na região de alongação, imediatamente atrás da extremidade da raiz, evitando a região do *cap*. Foi demonstrado que são atraídos por substâncias que fazem parte dos exsudados radiculares como álcoois, aminoácidos, açúcares, ácidos gordos e aldeídos, mas não há evidências de que, neste tipo de atracção, exista especificidade para com o hospedeiro. Normalmente, os zoósporos são atraídos da mesma forma para raízes de plantas hospedeiras ou não-hospedeiras. Há, no entanto, evidências que o campo eléctrico que se cria em redor das raízes desempenha um papel importante na atracção dos zoósporos (Van West *et al.*, 2002).

Morris *and* Gow (1993; citado em Carlile *et al.*, 2001) mediram o potencial eléctrico nas extremidades das raízes de ervilhas e submeteram em laboratório suspensões de zoósporos de *Pythium aphanidermatum* e de *Phytophthora palmivora* a campos eléctricos de magnitude semelhante. Estes autores verificaram que os esporos de *Pythium* se moviam em direcção ao pólo negativo e que os esporos de *Phytophthora* se moviam em direcção ao pólo positivo. Observaram também que, ao danificarem uma raiz, o local do traumatismo ficava carregado negativamente. Quando colocaram os zoósporos de *Pythium* em contacto com a raiz danificada observaram que eles eram atraídos para a região do traumatismo. Ao fazerem a lavagem dos zoósporos de *Pythium* da superfície e a substituição por zoósporos de *Phytophthora* observaram que estes se acumulavam nas regiões não danificadas da superfície da raiz, carregadas positivamente (Figura 42).

Estas observações confirmam que, contrariamente ao que acontece com a maioria dos outros fungos patogénicos que habitam o solo, as espécies do género *Phytophthora*, só atacam os tecidos saudáveis.

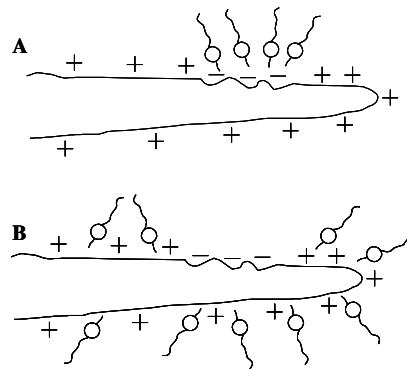


Figura 42. Fenómeno de atracção dos zoósporos de oomicetas para as raízes das plantas. Nas raízes das plantas criam-se correntes eléctricas e campos eléctricos resultantes do transporte de iões que ocorre na superfície. A direcção em que nadam os zoósporos quando são submetidos a um campo eléctrico varia de espécie para espécie. Os zoósporos de *Pythium aphanidermatum* movimentam-se em direcção ao cátodo, enquanto que os zoósporos de *Phytophthora palmivora* se dirigem em direcção ao ânodo. A superfície das raízes possui uma carga eléctrica positiva mas, quando é danificada, a carga eléctrica passa a negativa nos locais da lesão. **A:** os zoósporos de *Pythium* quando estão na presença de uma raiz danificada são atraídos para os locais da lesão. **B:** os zoósporos de *Phytophthora* quando estão na presença de uma raiz danificada agregam-se em torno dos locais da raiz sem lesões (Desenho da autoria de Morris e Gow, 1993, *Phytopathology* **83**, 877-882; referido por Carlile *et al.*, 2001).

Os zoósporos, uma vez em contacto com a superfície das raízes, enquistam e neste processo perdem os flagelos, excretam uma substância adesiva e formam uma parede celular. Antes de enquistar, os zoósporos orientam a superfície ventral, que é a região de onde emergem os flagelos, na direcção da raiz. A adesão dos esporos dos patógenos à superfície dos hospedeiros é um passo importante no processo de infecção, porque previne que eles sejam arrastados da raiz antes de a invadirem. Se os hospedeiros sintetizassem substâncias que inibissem a adesão dos esporos, provavelmente a taxa de sucesso nas infecções seria mais reduzida. O processo infeccioso continua com a germinação dos cistos e formação do tubo germinativo, que emerge da posição correspondente ao centro da região ventral dos zoósporos, antes de enquistarem. Os tubos germinativos penetram nas raízes entre as células da epiderme ou, então, atravessam a parede das células da epiderme e nesta situação, as hifas aumentam de tamanho e assumem uma morfologia que alguns autores têm apelidado de tipo-*appressorium*. Na progressão através da parede celular não há grande inibição do tamanho de crescimento das hifas porque *P. cinnamomi* produz e segrega enzimas que degradam a parede celular (Hardham, 2001).

Segundo Malajczuk *et al.* (1977), durante a colonização da planta, as hifas de *Phytophthora* podem crescer entre as células no córtex da raiz ou, observado com

menos frequência, junto à membrana plasmática. No crescimento “intracelular” o fungo penetra a parede celular das células do hospedeiro mas mantém-se rodeado pela membrana plasmática da célula. O termo intracelular é usado por muitos autores, por conveniência, para distinguir da colonização externa à parede celular. As hifas sofrem uma expansão do seu diâmetro quando se encontram no interior dos tecidos e originam a dissolução da lamela média das células vegetais por acção de pectinases.

Nos hospedeiros susceptíveis, os nutrientes obtidos a partir da planta permitem ao agente patogénico ramificar e invadir os tecidos. Passados dois a três dias do início da invasão, o fungo pode formar clamidósporos nas células corticais e esporângios na superfície das raízes, para produção de novos zoósporos (Hardham, 2001).

Em sobreiros e azinheiras, após 24 horas de contacto entre o fungo e as raízes, observaram-se hifas no parênquima cortical e no floema e passados três dias de infecção o fungo, para além de se encontrar no floema, também invade o xilema e o cilindro central, sendo evidente a colonização intercelular (Marcelino, 2001).

Resultados semelhantes foram obtidos em raízes de *Q. robur* inoculadas com *P. quercina*, tendo-se observado em secções de raízes, hifas em crescimento nas regiões inter e intra-celulares do parênquima cortical, passados cinco dias de inoculação. O plasmalema de algumas células apareceu separado da parede celular, ocorreu uma diminuição da espessura das paredes celulares e destruição da endoderme pelo patogénio. Algumas hifas foram encontradas nos vasos do xilema. A destruição da lamela média ocorreu, provavelmente, pela acção de enzimas extracelulares excretadas por *P. quercina* (Brummer *et al.*, 2002).

II.1.2. As defesas dos hospedeiros contra os fungos parasitas.

As plantas possuem sistemas de defesa naturais que permitem que se protejam de ameaças potenciais, causadas por uma enorme diversidade de inimigos, incluindo as infecções por microorganismos (fungos, oomicetas, bactérias e vírus), por nemátodos e insectos. São organismos desprovidos de um sistema imunitário baseado em anticorpos como os mamíferos e, em substituição, activam uma série de mecanismos de defesa que incluem um reforço das paredes celulares, a acumulação de proteínas anti-microorganismos patogénicos e a produção de substâncias químicas.

Nas plantas existem três classes de respostas de defesa: a imediata, em que está incluído o reconhecimento do patogénio e a emissão dos primeiros sinais; a intermédia, em que há activação dos mecanismos de defesa no local da infecção com síntese de proteínas relacionadas com a resistência e a lenta, em que há indução do sistema de defesa de forma sistémica. Esta classificação é de certa forma arbitrária. Pode haver variação nos padrões de expressão de uns sistemas patogénicos para outros, de acordo com o tipo de interacção e com as condições a que estão sujeitos (Kombrink e Somssich, 1995).

Muitas das proteínas que são produzidas pelas plantas têm características anti-fungos tais como chitinases, β -(1-3)-glucanases, proteínas da parede celular anti-toxinas (tioninas) e peptídeos inibidores de várias enzimas. Uma destas enzimas é a inibidora da poligalacturonase. Esta enzima evita que a poligalacturonase segregada pelos fungos degrade a pectina em monómeros e em substituição, faz com que sejam produzidos oligossacarídeos que actuam como moléculas mensageiras de sinais de activação do sistema de defesa (De Lorenzo e Ferrari, 2002). Para além de possuírem compostos de defesa, as plantas respondem à invasão dos patogénios pela denominada “resistência induzida”. Deste tipo de resistência fazem parte a produção das “proteínas relacionadas com a patogénese” (*pathogenesis-related ou PR proteins*), a formação de polímeros como a celulose, lignina e suberina e a acumulação de fitoalexinas. No local em que se inicia a infecção, as células podem morrer como resultado duma reacção de hipersensibilidade, normalmente indicada como HR de *Hypersensitive Response*, que é uma espécie de morte celular programada. As alterações celulares derivadas da activação do sistema de defesa podem incluir a explosão oxidativa (*oxidative burst*), devido à produção de poderosos agentes oxidantes, como o peróxido de hidrogénio e de espécies oxigenadas muito reactivas (O_2^-). A resistência induzida pode expressar-se de forma localizada e de forma sistémica, estimulada por sinais que circulam através da planta. Este tipo de resposta por parte da planta está associado, não só a factores bióticos, mas também a abióticos, tais como *stress* hídricos, mecânicos ou causados por agentes químicos tóxicos (Carlile *et al.*, 2001; Kombrink e Somssich, 1995).

Um dos tipos de defesa das plantas, que actua de forma eficiente, é mediado pelos genes de resistência ou genes R que detectam estirpes específicas de agentes patogénicos, através do reconhecimento dos factores de avirulência (Avr) que eles produzem. A resistência à doença mediada pelos genes R, também denominada resistência *gene-for-gene* é, normalmente, acompanhada por uma resposta hipersensível

(HR) rápida, no local da infecção. Nos últimos anos foram isolados muitos genes de resistência envolvidos em interacções do tipo *gene-for-gene*, pertencentes a sistemas patogénicos diferentes. Curiosamente, e apesar da especificidade das interacções que envolvem os genes R, as proteínas produzidas a partir desses genes de resistência específicos para determinados factores de avirulência possuem muitas características em comum. No entanto, em contraste com o progresso feito no sentido de compreender a resistência mediada pelos genes R, os mecanismos moleculares pelos quais os fungos evitam ou ultrapassam as defesas dos hospedeiros são ainda, em grande parte, desconhecidos (Toyoda *et al.*, 2002).

II.1.3. Factores de virulência e factores de avirulência produzidos pelos fungos patogénicos.

Inicialmente, um agente patogénico tem de superar as barreiras físicas que protegem as células das plantas do meio envolvente, nomeadamente a cutícula e a parede celular, antes de estabelecer a infecção. A cutícula é constituída por ácidos gordos hidroxilados e esterificados com compostos fenólicos (cutina) ou álcoois primários (ceras) e a parede celular é formada por polímeros de hidratos de carbono (celulose, hemicelulose e pectinas), aminoácidos (glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas, proteínas ricas em glicinas, enzimas) e compostos fenólicos (lignina e ésteres fenólicos). A cutina encontra-se nos órgãos aéreos das plantas, enquanto a suberina, uma matriz fenólica insolúvel à qual estão ligados ácidos gordos, está associada a locais danificados, aos troncos e aos órgãos subterrâneos das plantas. Durante a colonização dos hospedeiros, as bactérias e os fungos excretam uma enorme quantidade de enzimas hidrolíticas (celulases, pectinases, xilanases, proteases) capazes de digerir os polímeros das paredes celulares (Kombrink e Somssich, 1995). Os fragmentos das paredes celulares das plantas resultantes da actividade hidrolítica destas enzimas vão funcionar, para a planta, como factores endógenos de reconhecimento do agressor (Knogge, 1996).

Entre os fungos e as plantas podem ocorrer interacções genéticas compatíveis ou incompatíveis. Numa interacção incompatível a planta é resistente ao patogénio mas, em contrapartida, numa interacção compatível, a planta é susceptível ao ataque por parte do patogénio e ocorre doença. Os agentes patogénicos desenvolveram meios que

permitem parasitar uma planta com sucesso, quer danificando ou enfraquecendo a planta, por acção de toxinas, quer por inibição dos mecanismos envolvidos no sistema de defesa ou ainda, por fuga ao reconhecimento, evitando a activação do sistema de defesa (Hammond-Kosack e Jones, 1997).

As estratégias de defesa por parte das plantas foram divididas em duas classes, a resistência por parte de plantas não hospedeiras (*nonhost resistance*) e a resistência específica de plantas hospedeiras (*host-specific resistance*). A mais comum é a resistência não específica, que implica a existência de barreiras físicas e químicas pré-definidas e/ou a activação de sistemas de defesa gerais, accionados após o contacto com os patogénios e que ocorrem em plantas hospedeiras e não hospedeiras. Da resistência não específica fazem parte os mecanismos de produção de compostos fenólicos, a formação de papila contendo calose e sílica nas paredes celulares, a activação de proteínas relacionadas com a patogénese (PR), entre outros (Heath, 2000). As plantas podem reconhecer o agressor através de factores exógenos como, por exemplo, factores que estão presentes na superfície dos fungos ou proteínas que são segregadas pelos fungos durante a invasão, ou por factores endógenos que resultam da degradação da parede celular do hospedeiro. Este tipo de defesa está sob controlo poligénico, não é específico para patogénios de uma determinada espécie ou raça e é efectivo contra todos os invasores. Durante o processo evolutivo, alguns microorganismos adquiriram os factores de patogenicidade necessários para infectar uma ou mais espécies de plantas que, a partir desse momento, passaram a funcionar como hospedeiros desse agente patogénico. Estes hospedeiros, por sua vez, podem adquirir a capacidade de se protegerem contra os patogénios através do reconhecimento de factores de patogenicidade específicos. Este segundo tipo de resistência, a resistência específica, segue o conceito *gene-for-gene*, no qual o produto de um gene de avirulência (*Avr*) produzido pelo patogénio, interage, directa ou indirectamente, com o produto de um gene de resistência (*R*) da planta, de uma forma muito específica (Heath, 1981, citado por Colas *et al.*, 2001).

Em 1940, Flor estudou a interacção entre o linho (*Linum usitatissimum*) e o fungo do linho (*Melampsora lini*) causador da doença denominada ferrugem do linho e apresentou o modelo clássico do conceito de *gene-for-gene*. Este modelo determina que, para haver resistência, são necessários pares complementares de genes dominantes, um do hospedeiro e outro do patogénio. A perda ou alteração do gene de resistência (*R*) da

planta ou do gene de avirulência (*Avr*) do patógeno resulta numa interação compatível com ocorrência de doença (Figura 43; Hammond-Kosack *and* Jones, 1997).

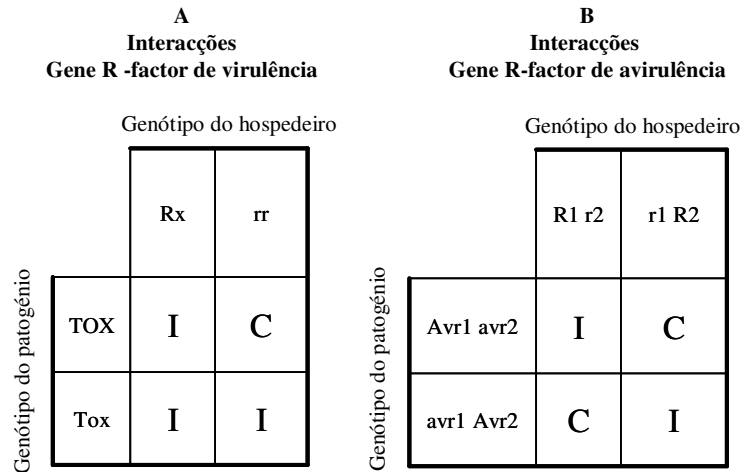


Figura 43. Tipos de interação genética que ocorrem entre plantas e agentes patogénicos. I indica uma interação incompatível, em que a planta é resistente ao patógeno e C indica uma interação compatível, em que a planta é susceptível ao patógeno e ocorre doença. **A:** Interações que envolvem genes de resistência e factores de virulência (toxinas). TOX é um gene de virulência dominante necessário para a síntese de uma toxina crucial para a patogénese e Tox é o alelo recessivo correspondente, não funcional. Só ocorre doença quando a planta não possui o gene R que permite desactivar a acção do gene TOX. **B:** Interações que envolvem genes de resistência e factores de avirulência. R1 e R2 são dois genes de resistência dominantes e r1 e r2 são os alelos recessivos (não funcionais) respectivos. R1 e R2 conferem resistência contra patógenos que possuem os genes de avirulência Avr1 e Avr2, respectivamente, mas não conferem resistência contra os patógenos que possuem os alelos recessivos avr1 e avr2. Ocorre doença (interacção compatível) nas situações em que o gene de resistência está ausente ou não funcional (r1, r2) ou falta no patógeno o gene de avirulência ou a sua forma está alterada (avr1, avr2) (adaptado de Hammond-Kosack e Jones, 1997).

Seria de certa forma curioso que os agentes patogénicos possuíssem genes de avirulência sem outra função que não fosse a de possibilitar o seu reconhecimento por parte dos hospedeiros que possuíssem os genes de resistência respectivos. Na realidade, a relação existente entre os factores de avirulência e os genes de resistência é dinâmica e depende, de forma estrita, dos genótipos do hospedeiro e do patógeno. Os genes *Avr* das bactérias patogénicas de plantas, *Xanthomonas campestris* e *Pseudomonas syringae*, produzem proteínas hidrofílicas que são libertadas no interior das células das plantas por um mecanismo especializado de secreção. Na ausência de reconhecimento por parte dos genes de resistência, alguns dos produtos destes genes *Avr* transformam-se em factores de virulência. O contrário também pode acontecer durante as interações de compatibilidade. Se os genes de resistência da planta adquirirem a capacidade de

reconhecer os factores de virulência produzidos pelo patogénio e forem capazes de desencadear uma resposta de defesa, então, qualquer factor de virulência pode transformar-se num factor de avirulência (Dixon *et al.*, 2000).

Laugé *et al.* (1998) procuraram um gene de resistência no tomate que fosse induzido por um factor de virulência produzido pelo agente patogénico do tomate *Cladosporium fulvum*. Este fungo segrega, durante a infecção, dois factores de virulência denominados ECP1 e ECP2, que são duas proteínas essenciais para a ocorrência de interacções de compatibilidade entre o patogénio e o hospedeiro. O trabalho de investigação traduziu-se na pesquisa de uma HR, por parte de uma colecção de génotipos de tomate, indicadora da indução de mecanismos de resistência no hospedeiro, contra o factor ECP2. Foram identificadas quatro estirpes de tomate que, na presença do factor de virulência ECP2, produziam uma HR. A capacidade destas estirpes para reconhecer o factor ECP2 e induzir uma HR é suficiente para conferir às estirpes resistência contra *C. fulvum*, excretor de ECP2. Esta resistência baseia-se num gene dominante, designado por gene de resistência *Cf-ECP2* contra *C. fulvum* e, deste modo, para estas estirpes, o factor de virulência ECP2 é afinal um factor de avirulência que confere resistência contra *C. fulvum*, excretor de ECP2. Estirpes de *C. fulvum* deficientes ao nível do gene ECP2 são patogénicas para as estirpes de tomate que possuem o gene *Cf-ECP2*, manifestando-se a doença de forma mais moderada (Laugé *et al.* 1998).

Os agentes patogénicos têm uma série de estratégias para ultrapassar as defesas do hospedeiro, algumas delas essenciais para o crescimento e sobrevivência nas reacções de compatibilidade. Os principais factores de compatibilidade ou virulência são: as toxinas, que destroem a capacidade do hospedeiro para se defender provocando a sua morte; os supressores, que são substâncias que suprimem actividades metabólicas no hospedeiro necessárias à sua defesa; as enzimas que desactivam substâncias anti-patogénios produzidas pelos hospedeiros (saponinas) (Toyoda *et al.*, 2002).

As toxinas são também denominadas HSTs (*Host-selective toxins*) porque provocam a morte celular em génotipos de plantas específicas. O fungo *Cochliobolus carbonum* (estirpe 1) é o agente causador de uma doença do milho e segrega uma toxina, conhecida por toxina HC, que actua sobre a histona desacetilase (HD) do hospedeiro. Esta toxina é sintetizada no primeiro estágio da infecção, durante a formação do *appressorium* e tem, nesse momento, capacidade para suprimir a secreção de compostos anti-fungos produzidos pelo hospedeiro, que seriam induzidos pela

degradação dos tecidos celulares produzidos durante a infecção. O modelo proposto para a actuação desta toxina considera que a inibição de HD pela toxina HC impede a resposta por parte do hospedeiro, por alterar a expressão dos genes envolvidos nessa resposta. A enzima HD actua ao nível das histonas da cromatina e, portanto, tem influência na expressão dos genes (Brosch *et al.*, 1995; Toyoda *et al.*, 2002). Tal como os agentes patogénicos são capazes de contornar as defesas dos seus hospedeiros, também estes evoluem no sentido de criarem resistências contra as doenças. Existem estirpes de milho que são resistentes ao *C. carbonum* porque possuem um gene de resistência dominante (*Hm1*) que codifica para uma enzima que converte a toxina-HC num derivado não tóxico para a planta (Toyoda *et al.*, 2002).

Muitos fungos patogénicos são conhecidos por produzirem substâncias que anulam as respostas de defesa dos hospedeiros sem danificarem de forma visível os seus tecidos. *P. infestans* inibe as enzimas dependentes de NADPH, relacionadas com alterações do estado de oxidação-redução das células e suprime a HR que se observa, normalmente, em plantas de batata susceptíveis, quando estas são expostas a um patogénio que segrega factores de avirulência (Doke, 1975 citado por Toyoda *et al.*, 2002).

De entre os muitos factores de avirulência indutores dos mecanismos de defesa das plantas destacam-se as elicinas, as transglutaminases, isoladas de várias espécies de *Phytophthora* (Sacks *et al.*, 1995) e as proteínas NPP1 recentemente identificadas (Felbrich *et al.*, 2002). Nürnberger *et al.* (1994) identificaram e isolaram de *Phytophthora megasperma*, uma transglutaminase de 42 kDa com aquele tipo de propriedades indutoras e pesquisaram a manutenção destas propriedades em peptídeos derivados da glicoproteína. Por proteólise foram obtidos vários peptídeos com propriedades indutoras tendo, o mais pequeno de todos, 13 aminoácidos (Pep-13) e a sequência H₂N-VWNQPVRGFKVYE-COOH. As reacções induzidas pelo Pep-13 nas células de salsa (*Petroselinum crispum*) são semelhantes às obtidas com a glicoproteína purificada e com um extracto celular de micélio de *P. megasperma*. O conjunto de respostas por parte da planta incluem acções de curta duração, tais como alterações da permeabilidade da membrana plasmática aos iões H⁺, Ca²⁺, K⁺ e Cl⁻ e produção de peróxido de hidrogénio e acções de longa duração que incluem a activação de genes relacionados com a patogénese, tais como a acumulação de fitoalexinas, a estimulação da biossíntese de etileno e o aumento da actividade de cutinases extracelulares. A sequência em aminoácidos do Pep-13 foi determinada por degradação de Edman e

confirmada pela sequência da glicoproteína deduzida do cDNA correspondente de *P. megasperma*. O gene que codifica para a glicoproteína é membro de uma família de multigenes presentes no genoma de *P. megasperma* e em mais oito espécies de *Phytophthora* (Sacks *et al.*, 1995). Pep-13 representa 3,5 % da glicoproteína madura, não está associado com o único local glicosilado da glicoproteína, não é particularmente hidrofóbico e é necessário e suficiente para funcionar como eliciador em interações de incompatibilidade, de maneira idêntica à glicoproteína completa. As membranas plasmáticas das células da salsa contêm locais de ligação para o Pep-13 e a ligação a estes receptores resulta na activação da transcrição de genes relacionados com a patogénese (Nürnberger *et al.*, 1994).

As elicinas constituem uma família de proteínas de pequeno peso molecular (98 resíduos; \pm 10 kDa) excretadas por todas as espécies de *Phytophthora* e por algumas espécies de *Pythium* (*Py. vexans*; *Py. oligandrum*), são capazes de ligar esteróis e induzem uma resposta hipersensível na planta do tabaco, nalgumas espécies de *Brassica* e em *Raphanus* (Ricci *et al.*, 1989; Keizer *et al.*, 1998; Roussel *et al.*, 1999). A composição das elicinas em aminoácidos denota a ausência de triptofano, arginina e histidina e a presença de seis cisteínas localizadas em posições conservadas e envolvidas na formação de três pontes dissulfureto. Os aminoácidos mais comuns são as treoninas e serinas (30 %), as alaninas (10 %) e as leucinas (10 %) (Ricci *et al.*, 1989; Yu, 1995).

Até ao momento já foram identificadas mais de 30 espécies de *Phytophthora* que produzem elicinas. As elicinas podem classificar-se como ácidas (α , pI < 5,0) ou básicas (β , pI > 7,5), de acordo com o seu ponto isoeléctrico (pI), calculado a partir das sequências em aminoácidos, obtidas das proteínas purificadas ou deduzidas do cDNA. Em *P. cryptogea* (Panabières *et al.*, 1995) e *P. cinnamomi* (Duclos *et al.*, 1998a) foram encontrados quatro genes que codificam as elicinas ácidas e básicas, organizados na forma de cluster e existem evidências experimentais que apontam no mesmo sentido relativamente a *P. cambivora* (Prévot, 2002; Pinto, 2001). A actividade necrótica das isoformas das elicinas α e β foi estudada nas folhas das plantas de tabaco, constatando-se que as elicinas- β produzem maiores necroses do que as elicinas- α , sendo a β -cinamomina (β -CIN) a elicina com a maior actividade necrótica (Pernollet *et al.*, 1993; Duclos *et al.*, 1998b; Aurélio, 1999). Esta diferença na capacidade de induzir necroses nas folhas do tabaco foi inicialmente atribuída ao resíduo 13 que corresponde, normalmente, a uma lisina nas β -elicinas e a uma valina nas α -elicinas (Pernollet *et*

al., 1993). Com base em estudos de mutagénese dirigida e pela comparação entre as sequências das elicinas ou ainda, por utilização de peptídeos sintéticos e plantas de tabaco transformadas com um gene indicador controlado por promotores de genes de defesa, foram identificados outros locais com propriedades eliciadoras e/ou necróticas potenciais, localizados nas posições 2, 22, 25, 28, 39, 61, 70, 72, 93, 94 e 96 (Perez *et al.*, 1999; Perez *et al.*, 1997). Ainda não está esclarecido se as elicinas contribuem directamente para a patogenicidade das espécies de *Phytophthora* (Ponchet *et al.*, 1999). Estas proteínas têm sido consideradas como os factores de avirulência responsáveis pela expressão de resistência por parte de plantas não hospedeiras de *Phytophthora*, como as espécies do género *Nicotiana* (Kamoun *et al.*, 2000).

A maior parte dos isolamentos de *P. parasitica*, muito virulentos para o tabaco, não produzem elicinas porque a transcrição dos genes que codificam estas proteínas é desactivada (Kamoun *et al.*, 1993). Contudo, a função a atribuir às elicinas nas interacções planta/patogénio apresentou-se como um problema mais complexo quando Bonnet *et al.*, em 1994, caracterizaram isolamentos de *P. parasitica* que produziam elicinas e que são virulentos para a planta do tabaco. Recentemente, ficou demonstrado que a elicina *parA1* é a principal elicina expressa *in vitro* e *in planta* por *P. parasitica* isolada a partir de várias espécies de plantas e que, nos isolamentos que produzem elicinas e que são patogénicos para o tabaco, estes oomicetas regulam negativamente a sua expressão durante as interacções compatíveis. Contudo, foi identificado um isolamento de *P. parasitica* que produz elicinas, que é patogénico para o tomate, mas que não é patogénico para o tabaco e que expressa *parA1* durante as interacções de compatibilidade. A diminuição da expressão de *parA1 in planta* pode constituir um mecanismo subtil usado por *P. parasitica* para infectar a planta do tabaco sem que haja consequências nocivas para o fungo (Colas *et al.*, 2001).

Por vezes é difícil definir se uma interacção é compatível ou incompatível. É o caso da interacção entre *Q. robur* L. e *P. quercina* e, provavelmente, entre *Q. suber* e *P. cinnamomi*. A ocorrência de HR por parte do hospedeiro, característica de uma reacção de defesa da planta, aponta no sentido de uma interacção incompatível; no entanto, a elevada destruição que se observa nos tecidos do hospedeiro está normalmente associada a interacções de compatibilidade.

Phytophthora quercina é um fungo associado ao declínio de *Quercus robur* (Jung *et al.*, 2000) que segrega a elicina quercinina em meios de cultura líquidos (Heiser *et al.*, 1999). Esta elicina apresenta grande homologia para com a criptogéina e

é reconhecida por anticorpos específicos dirigidos para a criptogeína. Brummer *et al.* (2002) investigaram a expressão desta elicítina durante a infecção de *P. quercina* em *Q. robur* e detectaram a quercinina nas paredes celulares das hifas invasoras, assim como a sua libertação para o espaço apoplástico e para o citoplasma das células invadidas. As hifas que invadem as células estão envolvidas por uma matriz gelatinosa e a quercinina está presente nesta matriz em grandes quantidades. Segundo estes autores, a secreção de quercinina por *P. quercina* é independente da presença do hospedeiro, observando-se que o padrão de indução desta elicítina durante o processo infeccioso acompanha o crescimento do patogénio nos primeiros cinco dias após a infecção.

Se a interacção entre *P. quercina* e *Q. robur* for incompatível, então a produção de quercinina poderá actuar como factor de avirulência mas, se a interacção for considerada compatível, então a sua secreção durante a infecção contradiz as observações relativas à produção de *parA1* por parte de *P. parasitica* (Brummer *et al.* 2002).

Na última década, os trabalhos de investigação que visavam a compreensão das bases moleculares da resistência de plantas não hospedeiras de fungos produtores de elicítinas, desenvolveram-se principalmente no sistema de interacção entre *P. infestans*/*Nicotiana*. O sistema de interacção criptogeína/células do tabaco foi usado para estudar a transdução de sinal associada à resistência celular desencadeada pelas elicítinas, durante as interacções de incompatibilidade.

II.1.4. Interacção *P. infestans*/*Nicotiana*.

P. infestans tem sido um dos fungos mais estudados porque causa as doenças da ferrugem da batateira e do tomateiro, consideradas doenças devastadoras com graves consequências económicas. O tabaco, assim como outras espécies do género *Nicotiana*, não são plantas hospedeiras e são resistentes a *P. infestans*. Neste fungo foi identificada uma família de elicítinas (INF) tal como noutras espécies de *Phytophthora*. Algumas evidências apontam no sentido de considerar que a produção destas proteínas extracelulares delimita a gama de hospedeiros deste fungo. As elicítinas INF induzem uma resposta HR num número restrito de plantas, em particular no género *Nicotiana*, e a interacção entre *P. infestans*/*Nicotiana* foi estudada para se observar até que ponto a

resistência de plantas não hospedeiras é mediada pelo reconhecimento das elicitinias, sendo estas consideradas como factores de avirulência (Kamoun *et al.*, 2000).

Análises citológicas efectuadas às folhas de cinco espécies de *Nicotiana* inoculadas com *P. infestans* mostraram que ocorreu penetração das células da epiderme por cistos germinados e que, a seguir a este processo, ocorreu necrose celular localizada, típica de uma resposta hipersensível por parte da planta. O tempo decorrido até à HR, a severidade da resposta e o número de células afectadas é variável entre as espécies de *Nicotiana* analisadas. Em *N. tabacum*, a progressão do fungo é bloqueada nos primeiros estágios de infecção após a penetração das células da epiderme, nunca tendo sido observada a formação de hifas intercelulares. No entanto, em *N. benthamiana* há formação de hifas secundárias e *haustoria* e colonização das células do mesofilo. A resposta por parte da planta atinge o ponto máximo três dias após a inoculação, observando-se conjuntos de células necrosadas a envolver as hifas invasoras impedindo a progressão do fungo. Estes resultados sugerem que a resistência por parte da planta ocorre por etapas e que os graus de sucesso variam de espécie para espécie de *Nicotiana* (Kamoun *et al.*, 1998, Kamoun *et al.*, 2000).

Na interacção compatível *P. infestans*/*S. tuberosum* o gene INF1, que codifica uma das principais elicitinias segregadas por *P. infestans*, é expresso em grandes quantidades em micélio cultivado em meios de cultura, mas não é expresso em esporângios, em zoósporos, cistos e cistos em germinação. Quando ocorre a infecção, o gene é reprimido durante os primeiros estágios da interacção mas é expresso em grandes quantidades nos estágios finais, quando há formação de esporos e necrose celular (Kamoun *et al.*, 1997). Para determinar se INF1 funciona como eliciador na interacção com plantas da família Solanaceae, o cDNA de INF1 foi expresso em *E. coli* e foram feitas infiltrações da proteína purificada em nove espécies desta família e em tabaco. Verificou-se que INF1 apenas induzia uma resposta hipersensível quando era aplicada em folhas do tabaco (cv. *Xanthi*), não se observando qualquer resposta por parte das plantas das outras espécies testadas. Por isso, nas plantas das espécies do género *Solanum*, a resistência a *P. infestans* não parece ser mediada por uma resposta de defesa induzida por INF1 devendo, portanto, envolver outros mecanismos moleculares que não passam pelo reconhecimento da elicitina (Kamoun *et al.*, 1997). No entanto, na interacção *P. infestans*-*N. benthamiana* ficou provado que INF1 funcionava como factor de avirulência. Kamoun *et al.* (1998) silenciaram o gene que codifica a INF1 de modo a inibir a sua produção e testaram a patogenicidade dos transformantes em plantas

hospedeiras susceptíveis (*S. tuberosum*; *S. esculentum*) e em plantas não hospedeiras resistentes (*N. benthamiana*; *N. rústica*; *N. tabacum*). Observaram que as estirpes de *P. infestans* deficientes em INF1 mantinham a mesma capacidade para infectar as plantas de batata e tomate; induziam doença em *N. benthamiana* e eram incapazes de infectar as outras espécies de tabaco. A resistência de *N. benthamiana* a *P. infestans* é mediada pelo reconhecimento de INF1, enquanto que a HR observada nas outras espécies de tabaco é provavelmente proveniente de uma resposta a outros eliciadores específicos para cada espécie e que não são detectados por *N. benthamiana* (Kamoun *et al.*, 1998).

II.1.5. Interacção criptogeína/células do tabaco.

A criptogeína é uma β -elicitina com 10 kDa produzida pelo oomiceta *Phytophthora cryptogea*, capaz de provocar uma resposta de hipersensibilidade com formação de necroses, quando aplicada nas folhas do tabaco. A proteína pode migrar através da planta e estimular as defesas naturais do tabaco contra novas infecções promovidas por outros agentes patogénicos (Keller *et al.* 1996). A principal função desta proteína parece ser a de angariador de esteróis no hospedeiro transportando-os para o fungo, de forma a suprir a sua incapacidade de sintetizar estes compostos (Mikes *et al.* 1997, 1998; Vauthrin *et al.* 1999). Estudos recentes sugerem que a capacidade de transportar esteróis está relacionada com a capacidade de actuar como eliciador em interacções de incompatibilidade. Com efeito, a formação do complexo criptogeína/esterol é um pré-requisito que antecede a sua ligação aos potenciais receptores, de forma a induzir respostas de defesa por parte do hospedeiro (Osman *et al.* 2001a).

As alterações detectadas na composição dos lípidos quando as células do tabaco (*Nicotiana tabacum* var. *Xanthi*) foram tratadas com criptogeína traduziram-se num aumento do nível de esteril glicosídeos acetilados e de esteróis esterificados, resultantes da glicosilação e/ou esterificação de esteróis na forma livre. Em simultâneo, ocorre um aumento do nível de fosfatidiletanolamina (PE) e uma diminuição dos esteróis livres. A glicosilação e/ou esterificação dos esteróis (pré-existentes ou sintetizados de novo) é um dos primeiros acontecimentos envolvidos na resposta por parte das células a agentes patogénicos e surge associada à HR. Este fenómeno não é específico da HR e parece estar envolvido nos mecanismos de resposta por parte das plantas quando estão sob

stress ambiental ou fisiológico. É sabido que os esteróis na forma livre actuam como reguladores internos da fluidez das membranas mas as funções dos conjugados de esteróis não são conhecidas. O aumento do nível de PE, que é um fosfolípido que não forma estruturas em camada dupla (*bilayer*), em conjunto com o decréscimo do nível de esteróis no estado livre, pode afectar de forma significativa a fluidez e permeabilidade das membranas plasmáticas. As alterações da composição lipídica, acompanhadas da produção de espécies oxigenadas muito reactivas (AOS) como, por exemplo, radicais livres de oxigénio, devem contribuir para a morte celular localizada que se observa na HR, por causarem a saída massiva de iões e por destruírem o gradiente de protões associado às membranas plasmáticas das células vegetais (Tavernier *et al.*, 1995).

As estruturas tridimensionais (3D) da β -criptogeína (CRY) e do complexo criptogeína-colesterol foram determinadas por difracção de raios X da proteína cristalizada (Boissy *et al.*, 1996; Lascombe *et al.*, 2002). CRY é uma proteína globular com as dimensões 39x26x25Å. Na estrutura secundária os enrolamentos são principalmente do tipo α -hélice, compreendendo 6 hélices α que estão concentradas numa das faces da molécula, fortalecendo a estrutura terciária da proteína por funcionarem como um “cinto”. A outra face da molécula apresenta uma forma pouco comum, caracterizada por duas folhas β de pequeno tamanho e por dois ganchos (Ω -loop; β -sheet hairpin loop), associadas numa estrutura em forma de concha, mantida por três pontes dissulfureto formadas entre os pares de resíduos Cys3-Cys71, Cys27-Cys56 e Cys51-Cys95. A geometria destes elementos dá origem a uma grande cavidade hidrofóbica com a forma de um tubo alongado em que predominam as leucinas, isoleucinas e outros aminoácidos com características físico-químicas semelhantes como a valina, alanina e fenilalanina. Uma das extremidades da cavidade aponta para a superfície da proteína e a outra extremidade tem na sua base um resíduo polar, a tirosina 47 (Tyr47). O grupo hidroxílico fenólico da Tyr47 forma uma ponte de hidrogénio com o grupo 3 β -hidroxílico do esterol. Quando a Tyr47 é mutada em fenilalanina ou glicina, a proteína perde uma grande parte da capacidade de capturar esteróis (Osman *et al.*, 2001a). Lascombe *et al.* (2002) observaram que o tamanho da cavidade da criptogeína não sofre alteração após ligação ao colesterol e também que não há formação do complexo esterol-criptogeína quando se acetila o grupo 3 β -hidroxílico do esterol.

A estrutura terciária da β -cinamomina, uma elicítina excretada por *P. cinnamomi*, também foi determinada e é globalmente muito semelhante à da

criptogeína, com exceção da distribuição do potencial electrostático na superfície da molécula (Rodrigues *et al.*, 2002).

A criptogeína tem capacidade para ligar ácidos gordos para além de esteróis. O ácido linoleico compete com o desidroergosterol pela ligação ao mesmo local da criptogeína numa estequiometria de 1:1 (complexo ácido gordo-criptogeína). No entanto, a afinidade da elicítina é 27 vezes inferior para o ácido gordo do que para o esterol. Os melhores ligandos são os ácidos gordos saturados com sete ou doze carbonos e os insaturados em C16 e C22, verificando-se que a presença de duplas ligações faz aumentar a afinidade da criptogeína para com estes compostos (Osman *et al.*, 2001b). A estrutura da criptogeína não está relacionada com a estrutura das proteínas transportadoras de esteróis conhecidas nem existe homologia entre as suas sequências em aminoácidos. No entanto, estas duas classes de proteínas são semelhantes em termos de tamanho, forma e hidrofobicidade das suas cavidades (Lascombe *et al.* 2002).

As respostas induzidas nas células do tabaco pela criptogeína vão depender do reconhecimento da elicítina por receptores específicos. A identificação dos locais de ligação das elicítinas, responsáveis pelo reconhecimento destes factores de avirulência e pela transmissão do sinal intracelular que desencadeia uma resposta por parte da planta, é importante se considerarmos que todas as espécies de *Phytophthora* produzem elicítinas e que, portanto, a presença do receptor destas moléculas deve conferir uma espécie de resistência de largo espectro ao fungo. Bourque *et al.* (1999) caracterizaram bioquimicamente os locais de ligação da criptogeína em células do tabaco, identificados como glicoproteínas localizados na membrana plasmática destas células. Segundo estes autores, a criptogeína deve ligar-se a uma N-glicoproteína de 162 kDa que pode estar associada a outra N-glicoproteína de 50 kDa, estando o hidrato de carbono da proteína de maior peso molecular envolvido no reconhecimento da elicítina ou, possivelmente, relacionado com a conformação do local de ligação. Foram também identificados locais de ligação da criptogeína nas membranas plasmáticas de *Arabidopsis thaliana* e *Acer pseudoplatanus*. Porém, nas suspensões celulares destas espécies a criptogeína não induziu uma resposta celular. Estes resultados sugerem que a criptogeína se liga a receptores não funcionais, homólogos dos receptores que estão presentes nas membranas plasmáticas do tabaco ou então que a proteína envolvida na transmissão do sinal depois da ligação da criptogeína está ausente ou inactiva em *A. thaliana* ou *A. pseudoplatanus* (Bourque *et al.*, 1999). A afinidade pelos receptores membranares não parece estar relacionada com as características biofísicas das elicítinas, sendo

semelhante para elicitinas acídicas (capsiceína e parasiticeína) e para básicas (criptogeína e cinamomina). Estas elicitinas competem entre si pelos locais de ligação, o que sugere que interagem com o mesmo tipo de receptores membranares. As quatro elicitinas induzem influxo de cálcio, alcalinização do meio extracelular e produção de espécies oxigenadas activas nas suspensões das células do tabaco, verificando-se que a intensidade dos efeitos produzidos e a relação da quantidade necessária em função do tempo para induzir esses efeitos, varia de elicitina para elicitina (Bourque *et al.* 1998).

Foi recentemente sugerido um modelo para a entrada das elicitinas nas células do tabaco via endocitose mediada por um receptor (Tyler, 2002). Neste modelo existem dois receptores para as elicitinas, um posicionado na membrana plasmática que é responsável pela entrada da elicitina na célula e outro posicionado no interior da célula, responsável pela criação do sinal que faz activar o sistema de defesa (Figura 44). Esta hipótese baseia-se num estudo de mutagénese dirigida para os resíduos mais conservados, posicionados na superfície da parasiticeína, em que foram identificadas duas leucinas (L15 e L41) importantes para a actividade desta proteína como eliciador de uma resposta celular, que não afectam a ligação aos esteróis. As mutações provocadas na região da L15 ou L41 reflectem-se na não activação do sistema de defesa celular, sendo a resposta celular recuperada se a proteína mutada em L15 for expressa no interior da célula. Por isso, aparentemente, a região da elicitina centrada na L15 é necessária para a entrada nas células com ligação a um receptor existente na membrana plasmática, ao passo que a região centrada na L41 está envolvida na ligação a um receptor localizado no interior da célula responsável pela activação dos mecanismos de defesa (Doyle, 2000; Tyler, 2002).

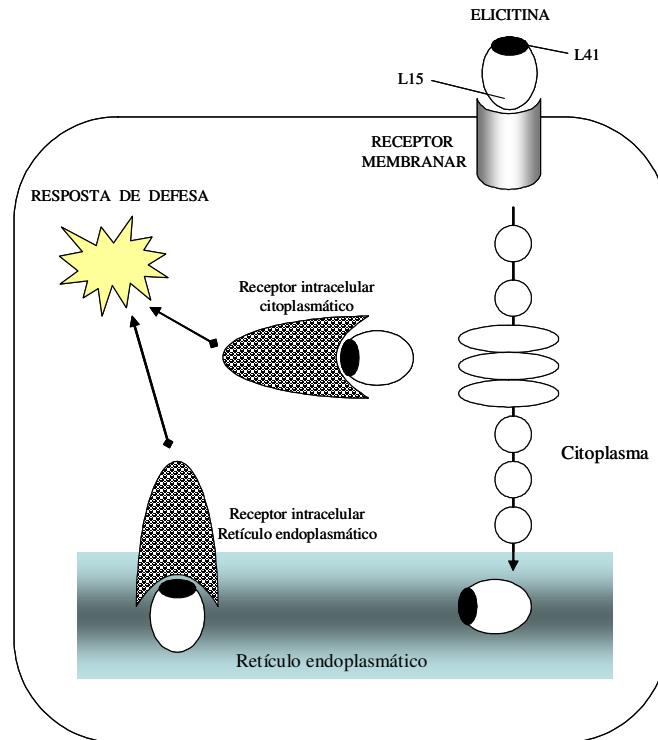


Figura 44. Modelo para entrada das elicinas nas células do tabaco via endocitose, mediada por um receptor e interação com um receptor intracelular. O receptor intracelular pode estar no retículo endoplasmático ou então, a elicina pode entrar para o citoplasma por translocação retrógrada e aí interagir com um receptor. L15 (Leucina 15) e L41 (Leucina 41) indicam duas regiões na superfície da elicina que são importantes para a sua função como eliciador. L15 é necessária para a entrada das elicinas nas células e L41 está envolvida na ligação ao receptor intracelular envolvido na emissão de sinais para activar o sistema de defesa (Tyler, 2002).

Nos primeiros minutos, após a ligação da criptogéina a uma N-glicoproteína localizada na membrana plasmática das células do tabaco, ocorre um grande influxo de íons de cálcio (Ca^{2+}), dependente da fosforilação de proteínas (artigos de revisão, Blein, 2002; Lebrun-Garcia *et al.*, 1999). A entrada de Ca^{2+} dá início a uma série de acontecimentos que incluem a fosforilação de polipeptídeos (Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000), a activação de canais aniónicos e catiónicos com despolarização da membrana plasmática (Wendehenne *et al.*, 2002), a activação de proteínas MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) e SIP (*salicylic acid-induced protein kinase*) (Zhang *et al.*, 1998), a activação de uma oxidase dependente de NADPH com a produção de espécies oxigenadas muito reactivas (Lebrun-Garcia *et al.*, 1999), a activação da transcrição do gene PAL (fenilalanina amónia liase) que integra o sistema de defesa (Zhang *et al.*, 1998; Dorey *et al.*, 1999), a acidificação do conteúdo citoplasmático, a inibição da entrada de glicose (Bourque *et al.*, 2002) e a agregação das células do tabaco em suspensão devido a alterações na parede celular (Kiefer *et al.*, 2000) (Figura 45).

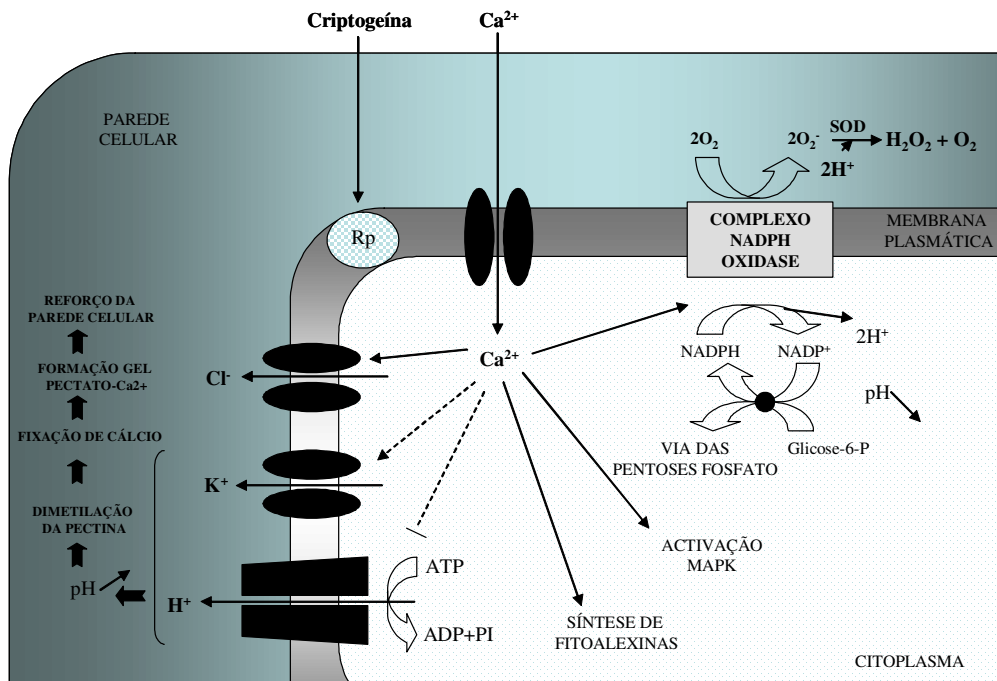


Figura 45. Modelo hipotético que integra os acontecimentos observados nas células do tabaco por ação da criptogéina. A interação da criptogéina com um potencial receptor (Rp) desencadeia nos primeiros momentos a fosforilação de proteínas e o influxo de cálcio. As proteínas fosforiladas podem ser, entre outras, o próprio receptor e o canal de cálcio. O influxo de cálcio vai, por sua vez, desencadear a activação de várias proteínas associadas à membrana plasmática (canal do ião cloreto; NADPH oxidase) e pode contribuir para a activação do canal de potássio e para a inibição dum H^+ -ATPase (linha a tracejado). O influxo de cálcio faz activar MAPKs em série e aumentar a síntese de fitoalexinas *a posteriori*. A activação de uma NADPH-oxidase gera transitoriamente a produção de compostos oxigenados muito reactivos, a alcalinização do meio extracelular e a acidificação do citoplasma. Através da via das pentoses fosfato, o NADPH é regenerado e usado como fonte de electrões pela oxidase. Nas células tratadas com criptogéina, o influxo de cálcio e o efluxo de cloreto são os responsáveis pela despolarização da membrana plasmática (MP). A despolarização da MP e a acidificação do citoplasma deviam activar a H^+ -ATPase; contudo, não foi observado um aumento do consumo de ATP, o que sugere que a H^+ -ATPase é inactivada. A criptogéina induz a produção extracelular de $O_2^{\cdot-}$ o qual, por sua vez, é dismutado em H_2O_2 por superóxido dismutases (SOD) extracelulares. Os segundos mensageiros, designadamente o ião cálcio, a acidificação do citoplasma e as espécies oxigenadas muito reactivas, devem amplificar o primeiro sinal que resulta da interacção entre a criptogéina e o seu receptor (Lebrun-Garcia *et al.*, 1999; Blein *et al.*, 2002).

Para estudar o envolvimento das fosfatases proteicas (PPs) e das cinases proteicas (PKs) nos processos de fosforilação/desfosforilação de proteínas associadas à transdução de sinais intracelulares induzidos pela criptogéina, foram comparados os efeitos causados por esta elicítina com os efeitos causados por inibidores de PKs e PPs. Foi observado que a staurosporina, um inibidor de PKs, inibe os efeitos causados pela criptogéina tais como o influxo de cálcio, a produção de AOS e a alcalinização do meio extracelular, ao passo que a caliculina A, um potente inibidor da Ser/Thr fosfatase tipo 1 (PP 1) e Ser/Thr fosfatase tipo 2A (PP 2A), induz os mesmos efeitos que a elicítina. Por

electroforese 2-D foram identificados 19 polipeptídeos cuja fosforilação foi induzida pela criptogeína e nestes estão incluídos dezoito que foram induzidos por acção da caliculina A. A fosforilação de 12 destes polipeptídeos está dependente do influxo de cálcio, indicando que a sua acção se desenvolve após o aumento da concentração de cálcio intracelular, ao passo que os restantes polipeptídeos devem actuar em acontecimentos anteriores. Os polipeptídeos cuja fosforilação depende de Ca^{2+} podem ser alvos directos ou indirectos da CDPK (*Ca²⁺-dependent protein kinase*) ou da PKC (*Ca²⁺-calmodulin-dependent PK*). A fosforilação independente do influxo de cálcio pode corresponder ao próprio receptor da criptogeína porque muitos receptores de plantas são semelhantes aos receptores proteicos tipo cinase (RPKs) existentes nas células animais. Estes resultados são indicadores de que a resposta por parte da planta à acção dos eliciadores implica um aumento do nível de polipeptídeos fosforilados por acção da activação de PKs e/ou inibição da acção de PPs (Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000).

Recentemente, Wendehenne *et al.* (2002) estudaram o efluxo aniónico desencadeado pela criptogeína nas células do tabaco, verificando que pode ser mediado por canais aniónicos e que desempenha um papel fundamental na produção de AOS, na activação de uma PK de 40 kDa, na indução de genes relacionados com a patogénese e na morte celular característica da resposta hipersensível. A saída rápida de iões nitrato (NO_3^-) das células é sensível à acção de bloqueadores dos canais aniónicos e é regulada por reacções de fosforilação e pelo influxo de Ca^{2+} . A activação prolongada de uma ou várias cinases é necessária para manter o efluxo deste anião e a produção de AOS é completamente suprimida pela acção de inibidores dos canais aniónicos, o que sugere que a activação de uma oxidase dependente de NADPH resulta da combinação de vários acontecimentos em que está incluída a activação dos canais aniónicos (Wendehenne *et al.*, 2002). Não foram ainda esclarecidos os efeitos antimicrobianos ou antifúngicos derivados da produção de AOS nas plantas em resposta aos eliciadores. Constata-se, contudo, que os AOSs estão envolvidos na linhificação das paredes celulares, em reacções de oxidação de proteínas da parede celular para formação de polímeros, na oxidação de lípidos mediada pelo peróxido de hidrogénio e na produção de fitoalexinas. No entanto, nas células de tabaco, a produção de AOSs induzida pela criptogeína não é responsável pela activação de enzimas envolvidas na síntese de fitoalexinas (Lebrum-Garcia *et al.*, 1999). Um factor que actua como último mensageiro na cascata de sinais induzidos nas células do tabaco, após tratamento com criptogeína e que está relacionado

com a síntese de fitoalexinas, foi identificado e isolado por Chappell *et al.* em 1997. Depois de purificado, este factor é capaz de actuar de forma isolada, activando mais rapidamente do que a criptogéina as enzimas relacionadas com a síntese de fitoalexinas e desencadeia a acumulação de transcriptos que codificam a ciclase sesquiterpénica, quitinases ácidas e básicas e o gene *hsr203*, um gene potencialmente relacionado com a resposta hipersensível.

Globalmente, as respostas iniciais por parte das células do tabaco à criptogéina implicam várias proteínas associadas à membrana plasmática de forma permanente ou transitória, nas quais se inclui um receptor da elicítina e várias PKs e PPs, canais iónicos de cálcio, cloreto e potássio, H⁺-ATPases, a NADPH oxidase e, provavelmente, muitas outras proteínas ainda não identificadas. O reconhecimento por parte das células do factor de avirulência resulta na criação de um conjunto de segundos mensageiros que incluem o catião cálcio na forma livre, alterações do pH do citoplasma e do potencial transmembranar, a produção de AOSs, que provocam alterações no estado de oxidação-redução celular e no estado de fosforilação das proteínas e alterações no nível de metabolitos envolvidos nas vias metabólicas.

II.1.6. Genes de plantas mediadores da resistência a doenças (Genes R).

A resistência das plantas a doenças provocadas por estirpes específicas de patogénios enquadra-se normalmente num tipo de interacção *gene-for-gene* que pressupõe que a resistência a um patogénio é dependente da existência de um gene de avirulência (*Avr*) no patogénio e de um gene de resistência (*R*) na planta (Hammond-Kosack e Jones, 1997). Segundo esta hipótese, os mecanismos de defesa das plantas são activados pelo produto dum gene de resistência (*R*) do hospedeiro, após reconhecimento do produto do gene de avirulência (*AVR*) do agente patogénico que lhe corresponde. O modelo molecular em que se baseia a interacção específica do tipo *gene-for-gene* define a existência de um ligando e de um receptor, em que o produto do gene *R* actua como um receptor que reconhece um ligando, ou eliciador, produzido directa ou indirectamente pelo gene *AVR* do patogénio ou reconhece o factor *AVR* de forma indirecta através de um co-receptor (Hammond-Kosack e Jones, 1997; Dixon *et al.*, 2000). A interacção directa entre uma proteína *R* e um factor *AVR* foi demonstrada para o sistema de proteínas *Pto* do tomateiro e *AvrPto* existente nalgumas estirpes de

bactérias *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, entre a proteína do arroz Pi-ta e o produto do gene *AVR-Pita*, expresso pelo fungo do arroz, *Magnaphorthe grisea* e entre o produto do gene *RPS2* de *Arabidopsis thaliana* e as estirpes de bactérias *P. syringae*, possuidoras do gene de avirulência *avrRpt2* (Tang *et al.*, 1996; Jia *et al.*, 2000; Leister e Katagiri, 2000). O gene *Pto*, do tomateiro confere resistência a estirpes de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* que possuem o gene *AvrPto*, com ocorrência de uma resposta hipersensível por parte da planta, característica de uma interacção de incompatibilidade. A bactéria *Pseudomonas* introduz nas células do tomateiro o produto do gene *AvrPto*, que codifica uma proteína hidrofílica de 18,3 kDa, através de um sistema de secreção tipo III, que vai interagir directamente com o produto do gene *Pto* que codifica uma proteína citoplasmática de 321 aminoácidos, com características de serina/treonina quinase, capaz de autofosforilação (Hammond-Kosack e Jones, 1997; Bogdanove e Martin, 2000). A especificidade quanto ao reconhecimento de *AvrPto* é determinada por um único resíduo em *Pto*, a treonina 204 (Frederick *et al.*, 1998). A resposta de defesa é desencadeada pela interacção *AvrPto*-*Pto*, com activação do próprio receptor, a quinase (*Pto*) e, subsequentemente, responsável pela fosforilação doutras quinases em reacções em cadeia, tais como os factores de transcrição *Pti4/5/6* e a serina/treonina quinase *Pti1*. *Pti4*, *Pti5* e *Pti6* são potenciais factores de transcrição envolvidos na activação de genes relacionados com a patogénese e *Pti1* está associada à resposta hipersensível (van der Biezen e Jones, 1998). A interacção incompatível entre a planta do arroz (*Oryza sativa*), que expressa o gene *Pi-ta* e algumas estirpes do fungo patogénico *Magnaporthe grisea*, que expressam o gene *AVR-Pita*, é outro exemplo de interacção do tipo *gene-for-gene* que segue o formato receptor-ligando. Jia *et al.* (2000) mostraram que a expressão transitória da metaloprotease *AVR-Pita*₁₇₆, correspondente à forma activa da proteína *AVR-Pita*, no interior das células vegetais, resulta numa resposta hipersensível dependente da proteína *Pi-ta*. Em experiências de interacção proteína-proteína, tipo *far-western* realizadas *in vitro*, observaram que o factor de avirulência se liga especificamente ao domínio rico em leucinas *LRD* (*leucine-rich domain-LRD*) da proteína *Pi-ta*, em ensaios realizados no *yeast two-hybrid system*. A resposta de defesa mediada pelo gene *Pi-ta* não ocorre quando são feitas substituições pontuais de aminoácidos no *LRD* da proteína *Pi-ta* ou na sequência com o motivo associado à função de protease em *AVR-Pita*₁₇₆, tanto no sistema da levedura como nos ensaios *in vitro*, porque estas substituições destroem a possibilidade de interacção física entre o ligando e o receptor (Jia *et al.*, 2000). Em *A. thaliana* foi observado, *in vivo*, a formação de um complexo

entre as proteínas RPS2 (produto do gene R-receptor) e AvrRpt2A (produto do factor de avirulência-ligando) através de co-immunoprecipitação das proteínas, após expressão dos genes em protoplastos (Leister e Katagiri, 2000).

Alguns autores apresentam alternativas ao modelo receptor/ligando para ilustrar a interacção *gene-for-gene*, propondo o modelo do “gene guardião” (Dixon *et al.*, 2000). Neste sistema, os factores de avirulência codificados pelo patógeno interagem com proteínas do hospedeiro, modificando as suas funções, de forma a aceder aos nutrientes ou suprimindo os mecanismos de defesa. A associação entre o factor Avr e as proteínas celulares é especificamente reconhecida pelas proteínas R que activam, em seguida, os mecanismos de defesa. As proteínas R funcionam como “guardiões” das proteínas celulares do hospedeiro. A existência de um co-receptor foi observada na interacção incompatível relativa ao sistema patogénico planta do tomate/fungo *Cladosporium fulvum*, em que intervêm a proteína R codificada pelo gene *Cf-2* e o factor de avirulência Avr2. Neste sistema foi identificada a proteína Rcr3, que parece ser o alvo de Avr2 e que é indispensável para que ocorra uma resposta de defesa mediada por *Cf-2* (Dixon *et al.*, 2000). As respostas de defesa por parte dos hospedeiros, mediadas pelos genes de resistência, reflectem-se no mesmo tipo de eventos descritos para a interacção criptogéina-células do tabaco (Toyoda *et al.*, 2002).

No decurso dos últimos anos, a clonagem de vários genes de resistência e a caracterização dos produtos deduzidos a partir da sequência nucleotídica respectiva, contribuíram de forma significativa para o conhecimento das bases moleculares da resistência específica nas plantas. Os genes *R* foram isolados de várias espécies vegetais (tomate, linho, arroz, tabaco, beterraba, milho) e conferem resistência a fungos, bactérias, vírus e nemátodos (Tabela 9). A comparação das sequências das proteínas R revela uma grande homologia entre elas e a existência de motivos estruturais conservados independentemente do organismo para o qual conferem resistência. Quase todos os produtos dos genes *R* combinam um domínio receptor e um domínio transmissor e asseguram duas funções principais: o reconhecimento das moléculas eliciadoras através de mecanismos de interacção proteína-proteína e a activação directa ou indirecta de sinais de transdução (Noir e Lashermes, 2000).

A classe de genes *R* mais representada é a que codifica proteínas citoplasmáticas que possuem três regiões distintas: LRR localizada na extremidade carboxílica e implicada em interacções proteína-proteína; local de ligação de nucleotídeos (*Nucleotide-Binding Site-NBS*), localizada no centro e que corresponde ao local de

fixação e de hidrólise dos nucleótidos trifosfato ATP e GTP; TIR (*Toll/Interleukin-1 Resistance*) e LZ (*Leucine Zipper*), localizadas na extremidade NH₂. A região TIR foi definida por homologia com os domínios intracelulares da proteína Toll da *Drosophila* e com o receptor interleuquina-1 dos mamíferos. A região LZ é, por vezes, denominada enrolamento helicoidal (*CC-Coiled-Coil*), por se considerar que a sequência do motivo LZ facilita a formação de estruturas do tipo CC que promovem a formação de dímeros ou a formação de interacções específicas com outras proteínas. Os domínios LRR correspondem à repetição de um motivo de tamanho variável constituído por leucinas e/ou por outros resíduos hidrofóbicos e pode, nalguns casos, ter associado um domínio serina/treonina quinase que, normalmente, está implicado nas reacções de fosforilação associadas às reacções em cadeia para transmissão de sinais (Hammond-Kosack e Jones, 1997; Toyoda *et al.*, 2002).

No domínio NBS estão presentes os motivos quinase 1a (*P-loop; phosphate-binding loop*), quinase 2 e quinase 3a, que apresentam uma homologia de aproximadamente 50 % com a região compreendida entre os aminoácidos 92 e 412 das proteínas APAF-1 e CED-4 reguladoras da actividade das proteases envolvidas na morte celular (apoptose) nos animais (van der Biezen e Jones, 1998a; Zou *et al.*, 1999). A descoberta da existência de homologia entre o domínio NBS das proteínas R e as proteínas ligadas à morte celular programada nos animais é muito interessante porque os mecanismos de defesa das plantas incluem a resposta hipersensível que é um tipo de apoptose. A relação encontrada levou à redefinição da designação do domínio NBS, passando actualmente a designar-se NB-ARC, que significa local de ligação de nucleótidos (*Nucleotide Binding site*) partilhado por APAF-1, alguns produtos dos genes R e CED-4 (Figura 46) (Van der Biezen e Jones, 1998a).

A classe NBS-LRR de proteínas R é abundante nas plantas. Em *Arabidopsis*, por exemplo, estima-se que existam pelo menos 200 genes NBS-LRR diferentes, o que corresponde a 1 % do genoma. Alguns destes genes já foram identificados, tais como *RPS2* e *RPM1*, com a estrutura LZ-NBS-LRR e os genes *RPP5* e *RPP1*, com a estrutura TIR-NBS-LRR (Mindrinos *et al.*, 1994; Grant *et al.*, 1995; Parker *et al.*, 1997; Botella *et al.*, 1998). Os genes de resistência estão normalmente organizados na forma de *cluster* e os genes que integram estes agrupamentos podem apresentar diferentes graus de recombinação. *RPP5* faz parte de uma família de genes agrupados num *locus* e codificam proteínas de resistência contra *Peronospora parasitica*. Recentemente, foram completamente sequenciados e analisados os haplotipos (conjunto de genes que

integram um *locus* complexo) em *Arabidopsis* ecotipo *Landsberg erecta* (*Ler*) e *Columbia* (*Col-0*) (Nöel *et al.*, 1999). Numa sequência de DNA de 95 kb do haplotipo de *RPP5*, em *Ler*, foram encontrados dez genes homólogos a *RPP5* [La-A (*RPP5*) a La-J], todos orientados no mesmo sentido, com exceção do La-J e em 90 kb do haplotipo de *RPP5*, em *Col-0*, foram encontrados oito genes homólogos, orientados no mesmo sentido. A localização relativa dos genes, o número de homólogos, a posição de cada gene no interior do *cluster* e as sequências das regiões intergênicas divergem muito entre os dois haplotipos. Em *Arabidopsis* o polimorfismo intra-específico é extraordinariamente elevado no *locus RPP5*. Os membros da família *RPP5* têm entre 13 a 23 motivos *LRR* adquiridos por duplicações ou eliminações. Prevê-se que tenham evoluído de um ancestral comum possuidor de oito motivos *LRR*. Teoricamente, um gene em *Ler* (La-A; *RPP5*) e dois em *Col-0* (*Col-B* e *Col-F*) codificam proteínas completas do tipo *TIR-NBS-LRR*, responsáveis por conferir resistência ao fungo. Os restantes genes possuem nas suas sequências codões de terminação ou inserções por retrotransposição (Nöel *et al.*, 1999).

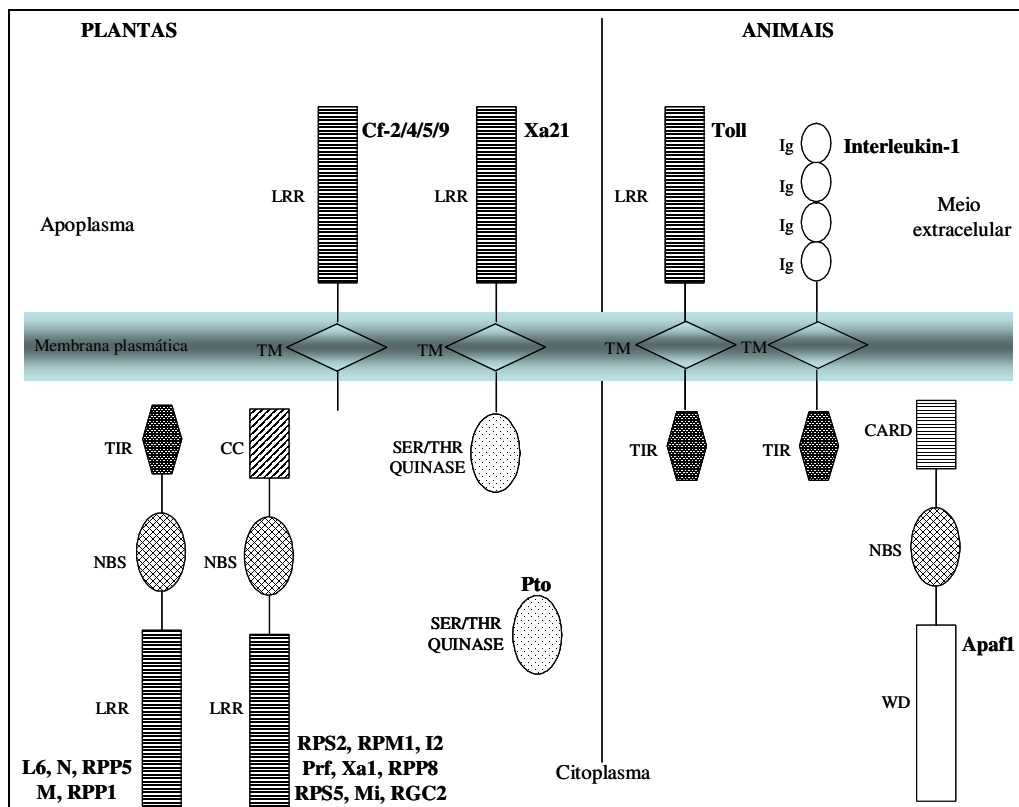


Figura 46. Representação esquemática dos domínios conservados dos produtos dos genes de resistência a doenças, nas plantas e de proteínas do sistema imunológico, nos animais. As proteínas de resistência L6, N, *RPP5*, M, *RPP1* pertencem à classe *TIR-NBS-LRR*; *RPS2*, *RPM1*, *I2*, *Prf*, *Xa1*, *RPP8*, *RPS5*, *Mi* e *RGC2* pertencem à classe *CC-NBS-LRR*; *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5* e *Cf-9* pertencem à classe II, *Pto* pertence à classe III e *Xa21* pertence à classe IV (Tabela 9). *Apaf1* é um regulador da morte celular, nos

mamíferos, com três domínios funcionais: CARD, *caspase recruitment domain*; WD, *WD-40 repeat*; NBS, *nucleotide binding site*. NBS por vezes denomina-se NB-ARC. Os receptores Toll existentes em humanos e em *Drosophila* e o receptor Interleukin-1, existente em mamíferos, possuem domínios intracelulares TIR e possuem uma homologia de 20 % com as proteínas de resistência das plantas. LRR: *leucine-rich repeat*; NBS: *nucleotide binding site*; CC: *coiled-coil*; TM: domínio transmembranar; TIR: *toll/interleukin-1 resistance*; Ig: imunoglobulina (Pan *et al.*, 2000; Toyoda *et al.*, 2002; Van der Biezen e Jones, 1998).

A resistência por parte da planta do tomate ao fungo do solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*F. o. Lycopersici*), ilustra bem a complexidade associada aos genes NBS-LRR. O *locus I2* na planta do tomate é responsável por conferir resistência à estirpe 2 de *F. o. Lycopersici* e compreende uma família múltipla de genes, designada por complexo *I2C*. Os genes desta família estão distribuídos por 3 cromossomas diferentes, estando 2 grupos de vários genes localizados no cromossoma 11 (Ori *et al.*, 1997). A família *I2C* do cromossoma 11 é composta por sete membros, dos quais apenas *I2* é um gene funcional que confere resistência completa à estirpe 2 de *F. o. Lycopersici* (Simons *et al.*, 1998). Recentemente, Sela-Buurlage *et al.* (2001) realizaram testes de patogenicidade com várias estirpes de *F. o. Lycopersici* em 53 estirpes de *L. esculentum* que possuíam, por introgressão, regiões do genoma de *L. pennellii* e identificaram seis *loci* de genes que conferem resistência, de forma independente, às estirpes 1, 2 e 3 de *F. o. Lycopersici*. Um dos *locus* identificado foi o *I2* anteriormente caracterizado, observando-se que, neste *locus*, genes individuais, pertencentes a uma mesma família, podem conferir níveis de resistência diferentes a *F. o. Lycopersici*, estirpe 2. A complexidade é criada pela existência de muitos genes funcionais num único *locus* dum complexo de resistência e, também, pela presença de muitos *loci* independentes.

No entanto, as proteínas R pertencentes à classe NBS-LRR também podem ser codificadas por um único gene que possui vários alelos. O *locus L* que codifica proteínas da classe TIR-NBS-LRR, na planta do linho, possui 13 alelos (*L*, *L1* a *L11* e *LH*). A comparação das sequências nucleotídicas de 11 destes alelos, revela que possuem entre si uma identidade superior a 90 % (Ellis *et al.*, 1999). A especificidade destes alelos em interações do tipo *gene-for-gene* está relacionada com as regiões TIR e LRR. Esta dedução resulta da análise comparativa efectuada com as sequências em aminoácidos das proteínas deduzidas dos alelos *L6*, *L7* e *L11* e por análises realizadas com plantas transgênicas em que foram introduzidos genes L híbridos, resultantes de trocas de sequências entre alelos, realizadas *in vitro*. Os alelos *L6* e *L11* diferem apenas na região LRR, ao passo que os alelos *L6* e *L7* diferem na região TIR, indicando que os

polimorfismos nestas regiões podem afectar a especificidade da resistência (Ellis *et al.*, 1999). Em *Arabidopsis*, o locus *RPP13* possui um gene com dois alelos que, curiosamente, codificam proteínas do tipo LZ-NBS-LRR com características funcionais distintas (Bittner-Eddy *et al.*, 2000). O alelo *RPP13-Nd* confere resistência a cinco isolamentos diferentes de *Peronospora parasitica* e o alelo *RPP13-Rld* confere resistência a mais um isolamento não reconhecido pelo outro alelo.

Alguns trabalhos muito recentes têm posto em evidência a complexidade implicada na transmissão de sinais para activação dos mecanismos de defesa nas plantas mediados por genes de resistência da classe NBS-LRR. Em *Arabidopsis Col-0* foi identificado o gene *RPP4*, que é ortólogo (genes que pertencem a espécies diferentes, mas asseguram a mesma função e ocupam uma posição correspondente nos cromossomas) de *RPP5* em *Ler* que, para além de estar envolvido na resistência a *P. parasitica* Noco2, também confere resistência às estirpes Emoy2 e Emwa1 (van der Biezen *et al.*, 2002). Por comparação entre as sequências em aminoácidos das proteínas RPP4 e RPP5 foram identificados resíduos importantes para a especificidade de reconhecimento das estirpes, localizados nas regiões TIR e LRR. A resistência mediada por RPP4 envolve vários componentes associados à transmissão de sinal nas reacções de defesa, tais como: DTH9; EDS1; PAD4; PBS2 e PBS3; SID1 e SID2. Para além destes factores foi também observado que a acção de RPP4 diminui quando é inibida a fenilalanina-amónia-liase (PAL), um gene associado à síntese de ácido salicílico. A dependência de RPP4 em EDS1 confirma estudos efectuados em *Arabidopsis*, que puseram em evidência que as proteínas de resistência do tipo TIR-NB-LRR (RPP1; RPP5; RPS4) empregam vias diferentes para transmissão de sinais das proteínas R do tipo LZ-NB-LRR (RPS2; RPS5; RPM1) durante as respostas de defesa. As primeiras funcionariam através da proteína lipídica EDS1 e as segundas através da proteína NDR1, uma proteína associada à membrana plasmática (Aarts *et al.*, 1998; Van der Biezen *et al.*, 2002).

A classificação dos genes de resistência compreende, para além da classe NB-LRR anteriormente referida, mais três classes. A segunda classe é representada principalmente pelos genes *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5* e *Cf-9* da planta do tomate, que codificam proteínas possuidoras dum domínio LRR extracelular, dum domínio transmembranar e dum pequena região citoplasmática e que conferem resistência contra o fungo patogénico *Cladosporium fulvum*. A terceira classe possui apenas o gene *Pto*, também da planta do tomate, que codifica uma proteína quinase do tipo serina/treonina. A quarta

classe é representada pela proteína codificada pelo gene *Xa21* da planta do arroz, que possui um domínio extracelular, uma região transmembranar e um domínio citoplasmático do tipo serina/treonina quinase e que confere resistência contra a bactéria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Figura 5). Pto é o único produto dum gene *R* que não possui domínio LRR e que, para activar o sistema de defesa, requer a presença do factor Prf (*Pseudomonas resistance and fenthion sensitivity*), uma proteína do tipo NBS-LRR (Hammond-Kosack e Jones, 1997; Noir e Lashermes, 2000).

Em vários *locus* dos genes de resistência tem-se constatado que genes homólogos pertencentes a um mesmo *cluster* conferem resistência a organismos de origem diferente. É o caso dos genes *Gpa2* e *Rx1*, na planta da batata, que pertencem ao *locus Gpa2* e que conferem resistência contra o nemátodo *Globodera pallida* e contra o vírus X da batata, respectivamente. Estes genes codificam duas proteínas do tipo LZ-NBS-LRR, com uma homologia de 88 % entre si (Van der Vossen *et al.*, 2000).

A estrutura e a organização dos genes *R* e dos factores de avirulência mostram que são genes sujeitos a pressão selectiva recíproca e que, como consequência, evoluem em paralelo. Os agentes patogénicos apresentam algumas vantagens que derivam da frequência do ciclo generativo e também, do tamanho das populações. Os mecanismos moleculares que parecem estar na origem da evolução dos genes *R* e no aparecimento de novas especificidades, mediante a pressão exercida pelos agentes patogénicos, são as mutações pontuais sinónimas ou não sinónimas, combinadas com mecanismos de recombinação, eliminação, duplicação e transposição dos genes, no interior de um mesmo *cluster*. Michelmore e Meyers (1998) consideram que a evolução das especificidades dos genes *R*, em particular da classe NBS-LRR, é assegurada, principalmente, por mecanismos de recombinação inter-alélicos e de conversões de genes que não se expressam ou são inactivos, como os pseudogenes.

Tabela 9. Genes de resistência a doenças nas plantas e factores de avirulência respectivos.

Planta	Gene de resistência	Agente patogénico	Factores de avirulência	Referência bibliográfica
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>RPM1</i> <i>RPS2</i> <i>RPS5</i> <i>RPS4</i> <i>RPP5</i> <i>RPP1</i> ; <i>RPP10</i> ; <i>RPP14</i> <i>RPP8</i> <i>RRS1</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>maculicola</i> <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> <i>Peronospora parasitica</i> <i>Peronospora parasitica</i> <i>Peronospora parasitica</i> <i>Ralstonia solanacearum</i>	AvrRpm1, avrB AvrRpt2 AvrPph3, AvrPphB AvrRps4 ? ? ? ?	Grant <i>et al.</i> , 1995 Mindrinos <i>et al.</i> , 1994 Warren <i>et al.</i> , 1998 Gassmann <i>et al.</i> , 1999 Parker <i>et al.</i> , 1997 Botella <i>et al.</i> , 1998 McDowell <i>et al.</i> , 1998 Deslandes <i>et al.</i> , 2002
<i>Linum usitatissimum</i> (Linho)	<i>M</i> <i>L6</i>	<i>Melampsora lini</i> <i>Melampsora lini</i>	? ?	Anderson <i>et al.</i> , 1997 Lawrence <i>et al.</i> , 1995
<i>Lactuca sativa</i> (Alface)	<i>RGC2</i>	<i>Bremia lactucae</i>	?	Meyers <i>et al.</i> , 1998
<i>Oryza sativa</i> L. (arroz)	<i>Xa1</i> <i>Xa21</i> <i>Pib</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> estirpe 1 <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> estirpe 6 <i>Magnaporthe grisea</i>	? ? ?	Yoshimura <i>et al.</i> , 1998 Song <i>et al.</i> , 1995 Wang <i>et al.</i> , 1999
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	<i>Pto</i> ; <i>Prf</i> <i>Mi</i> <i>I2</i> <i>Cf2</i> <i>Cf9</i> <i>Cf4</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> <i>Meloidogyne</i> spp <i>Fusarium oxysporum</i> f sp. <i>lycopersici</i> estirpe 2 <i>Cladosporium fulvum</i> <i>Cladosporium fulvum</i> <i>Cladosporium fulvum</i>	AvrPto ? ? Avr2 Avr9 Avr4	Salmeron <i>et al.</i> , 1996 Milligan <i>et al.</i> , 1998 Simons <i>et al.</i> , 1998 Dixon <i>et al.</i> , 1996 Jones <i>et al.</i> , 1994 Thomas <i>et al.</i> , 1997
<i>Nicotiana</i> spp (tabaco)	<i>N</i>	TMV (tobacco mosaic virus)	Replicase	Whitham <i>et al.</i> , 1994
<i>Zea mays</i> L. (Milho)	<i>Rp1</i>	<i>Puccinia sorghi</i>	?	Collins <i>et al.</i> , 1999
<i>Solanum tuberosum</i> L. (Batata)	<i>Rx</i> <i>Gpa2</i>	PVX (Potato virus X) <i>Globodera pallida</i>	Proteína do capsídeo ?	Bendahmane <i>et al.</i> , 1999 van der Vossen <i>et al.</i> , 2000

II.2. OBJECTIVOS

Q. suber é um hospedeiro do fungo fitopatogénico *P. cinnamomi* o qual exerce a sua acção invadindo, colonizando e destruindo os tecidos radiculares das raízes mais finas. O processo infeccioso é denunciado pela presença de necroses no local da infecção que reflectem uma resposta hipersensível por parte do hospedeiro e/ou a acção de toxinas libertadas pelo fungo. Os aspectos moleculares da interacção entre o sobreiro e *P. cinnamomi* são desconhecidos.

Pretendeu-se com este trabalho, identificar e caracterizar genes de *Q. suber* relacionados com o processo infeccioso. A comparação das estruturas das proteínas codificadas por estes genes com as de proteínas homólogas, já caracterizadas noutras espécies de plantas, teve como objectivo elucidar as suas funções relacionadas com a resposta de *Q. suber* à infecção por *P. cinnamomi*.

O conhecimento dos genes de *Q. suber* envolvidos na resposta de defesa pode ajudar a compreender a doença do declínio, sendo essencial para a definição de uma estratégia visando o objectivo fundamental e mais longínquo do seu controlo.

II.3. MATERIAL E MÉTODOS.

II.3.1. Análise do mRNA de *Q. suber* e *Q. rotundifolia* por cDNA-AFLP¹.

II.3.1.1. Identificação e preparação das amostras.

II.3.1.1.1. *Folhas jovens de sobreiros cultivados em solos infestados, artificialmente, com P. cinnamomi.*

O solo de sobreiros com 1 ano de idade, resultantes da germinação de sementes com origem em Alcacer do Sal, fornecidos pelos Viveiros Florestais Sto. Isidro, Pegões, foi artificialmente infestado com micélio do isolamento PA20 de *P. cinnamomi* (Figura 47).

O processo de infestação consistiu em regar o solo com uma mistura de micélio e água (250 ml), homogeneizada com a ajuda de um batedor eléctrico. O micélio foi obtido pelo cultivo do fungo em 600 ml de meio líquido de cenoura, durante 3-4 dias, no escuro e a uma temperatura de 25 °C. Após esse período, o micélio foi separado do meio de cultura e foi lavado com água destilada.

Recolheram-se folhas dos sobreiros cultivados em solo artificialmente infestado, antes da infestação (amostra T6A) e em quatro momentos após a infestação, durante 1 ano. As recolhas das folhas efectuaram-se 8 dias (T6I₁), 22 dias (T6I₂), 40 dias (T6I₃) e 210 dias (T6I₄) após a infestação do solo. Com excepção para a primeira amostra, todas as outras estiveram dependentes da rebentação natural dos sobreiros. A experiência decorreu numa estufa com temperaturas médias de 18 °C. Após a última recolha de folhas, o fungo foi isolado a partir do solo com recurso a armadilhas (folhas jovens de sobreiro) e crescimento em meios selectivos. *P. cinnamomi* foi identificado por PCR, a



Figura 47. Sobreiros com 1 ano de idade em solo infestado artificialmente.

¹ cDNA-Amplified fragment length polymorphism.

partir do micélio, com *primers* específicos dirigidos para o gene da β -cinamomina, como descrito anteriormente (Coelho, 1996; Coelho *et al.*, 1997).

II.3.1.1.2. Raízes de sobreiros e azinheiras infectadas com *P. cinnamomi*.

Sobreiros e azinheiras com 1 ano de idade foram transferidos para vasos especialmente concebidos e construídos e colocados numa mistura de *leka*, perlite e terra. Os vasos possuem numa das faces uma porta transparente amovível que permite visualizar o crescimento de raízes novas e aceder às raízes sem que seja necessário fazer o desenraizamento da planta.

No momento da transferência para os novos vasos e antes da inoculação com *P. cinnamomi*, cortaram-se as raízes jovens (RS-raiz de sobreiro; RA-raiz de azinheira) (Figura 48). Em seguida, aguardou-se o crescimento de novas raízes e procedeu-se à infecção com o fungo. Para infectar as raízes colocaram-se tiras de ágar com micélio de *P. cinnamomi*, cultivado em meio PDA (extracto de polpa de batata, dextrose e ágar), durante 3-4 dias, a 24 °C, em contacto directo com as raízes. O conjunto foi envolvido em papel de alumínio, para proteger o fungo da luz e as raízes foram separadas do ágar com o fungo, após 48 h. Foram imediatamente cortadas e conservadas a -80 °C (RSI-raiz de sobreiro infectada; RS-raiz de azinheira infectada) (Figura 48). A infecção decorreu à temperatura ambiente. Após 48 h de contacto com o fungo são visíveis as necroses (N) nas raízes e a adesão do micélio aos tecidos da planta.

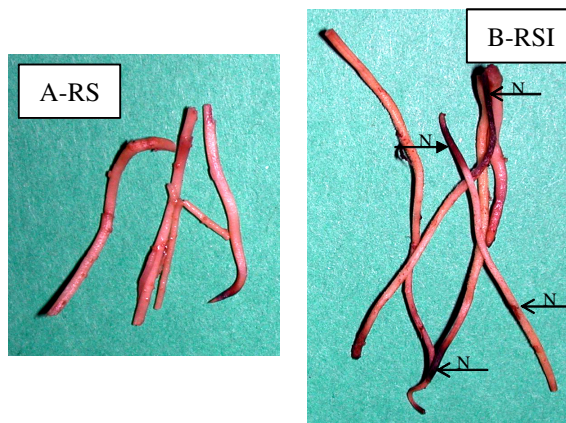


Figura 48. A: raízes de sobreiro (RS). B: raízes de sobreiro infectadas com *P. cinnamomi* (RSI) com indicação das necroses (N).

II.3.1.1.3. Folhas jovens de sobreiros e azinheiras localizados em locais de declínio.

Colheram-se folhas jovens dos sobreiros BS222A (G.D. = 4) de Almodôvar, BS250HL (G.D. = 0) e BS110HL (G.D. = 3) da Herdade dos Leitões no Alentejo, AS17BV (G.D. = 0) e AS21BV (G.D. = 3) do Algarve (Barranco do Velho), localizados em locais de declínio (Tabela 2). No estudo também se integraram duas azinheiras da região de Almodôvar, BA6A (G.D. = 1) e BA7A (G.D. = 3) (Tabela 2). Estes locais estão naturalmente infestados e *P. cinnamomi* já foi isolada a partir de raízes de sobreiro e do solo envolvente (Marcelino, 2001). As folhas foram colhidas durante a época de rebentação (Abril, Maio e Junho) e foram armazenadas a -80 °C, até utilização. As figuras 49 e 50 são fotografias de sobreiros da Herdade dos Leitões, localizados em locais de declínio, aos quais foram atribuídos graus de desfoliação de 0 e 3.

II.3.1.1.4. Micélio de *Phytophthora cinnamomi*.

O isolamento PA20 de *P. cinnamomi* foi cultivado em meio sólido de ágar V8, durante 4-5 dias, numa estufa a 25 °C. O meio de cultura foi preparado pela dissolução de 5 g de CaCO₃ em 354 ml de sumo V8 (Campbell Soup Company), sob agitação. A solução foi centrifugada durante 20 min a 10550 x g e o sobrenadante foi recuperado e diluído com água, 4 vezes. O meio sólido preparou-se pela adição de 15 g de ágar por cada litro de meio líquido V8 (Ribeiro, 1978).



Figura 49. Sobreiro com G.D. = 0, localizado num local de declínio na Herdade dos Leitões, em Montargil.



Figura 50. Sobreiros com G.D. = 3, localizados num local de declínio na Herdade dos Leitões, em Montargil.

II.3.1.2. Extracção e purificação de RNA total.

O RNA total foi extraído a partir de 50 mg de tecido vegetal (raízes e folhas) e de micélio do isolamento PA20 de *P. cinnamomi*, com o *kit* RNeasy da Qiagen (Dudareva *et al.*, 1996). As raízes, folhas e micélio foram macerados num almofariz, na presença de azoto líquido, até redução do material vegetal e do micélio a um pó muito fino. Em seguida, foi adicionado o tampão de lise RLC a cada uma das amostras. O tampão possui na sua composição hidróclorato de guanidina (GuHCL) e β -mercaptoetanol, que promovem a lise celular e inactivam as RNases. Os sais de GuHCL são também agentes desnaturantes que destroem a estrutura terciária das proteínas (Sambrook e Russell, 2001). O restante procedimento de extracção foi seguido de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. No método usado, as substâncias insolúveis presentes na mistura de lise e os resíduos celulares ficam retidos numa coluna (QIAshredder). No passo seguinte, o RNA total é selectivamente ligado a uma membrana de sílica-gel e é recuperado por arrastamento com 80 μ l de água, após lavagem da membrana, para remoção de substâncias contaminantes. A água usada em todos os procedimentos com RNA foi previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) (Sambrook e Russell, 2001).

A partir de 50 mg de tecido vegetal extraíram-se em média 10-15 μ g de RNA total.

As amostras de RNA total foram digeridas com 2 μ l DNase I (1 U/ μ l; Gibco), na presença de 2 μ l de RNaseout (40 U/ μ l; Gibco) e 10 μ l de tampão da DNase (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 20 mM MgCl₂; 500 mM KCl; Gibco), para eliminar vestígios de DNA. A reacção decorreu num volume total de 100 μ l, durante 30 min, a 37 °C (Sambrook e Russell, 2001). Após a reacção enzimática, o RNA total foi purificado com o *kit* RNeasy (Qiagen), tendo-se omitido os passos de lise e remoção dos resíduos celulares, tal como vem descrito no protocolo fornecido com o *kit*. O RNA total ligado à membrana de sílica-gel foi separado com 60 μ l de água; foram recuperados 5-7 μ g de RNA total, após a digestão. As amostras de RNA total foram desidratadas por centrifugação sob vácuo, ressuspendidas em 10 μ l de água e guardadas -80 °C.

A concentração e a pureza do RNA total extraído foram determinadas por medição da absorvência a 260 nm e a 280 nm, num espectrofotómetro. A razão entre os valores das absorvências a 260 e 280 nm situou-se entre 1,9 e 2,0.

A qualidade do RNA total purificado foi verificada por electroforese em gel de agarose desnaturante, corado com brometo de etídio. O gel de agarose desnaturante é designado, vulgarmente, por gel 1,2 % FA e foi preparado por adição de 1,2 g de agarose a 10 ml de tampão 10 vezes FA {200 mM MOPS [ácido 3-(N-morpholino) propanosulfónico]; 50 mM acetato de sódio; 10 mM EDTA, pH ajustado a 7 com NaOH} e a 90 ml de água. A agarose foi fundida num aparelho de microondas e colocada num banho de água, até atingir a temperatura de 65 °C. Mantendo a temperatura, adicionaram-se 1,8 ml de formaldeído 37 % e 1 µl de brometo de etídio (10 mg/ml) e em seguida, colocou-se a solução a polimerizar no suporte do sistema de electroforese. Após solidificação da agarose, o gel foi equilibrado, durante 30 min, no tampão de corrida FA (Sambrook e Russell, 2001).

As amostras a colocar no gel, foram preparadas por adição de 1 v de RNA total (1 µg) a ¼ v de tampão de aplicação 5 vezes (16 µl de solução saturada de bromofenol azul, 80 µl de 500 mM EDTA, pH 8; 720 µl de formaldeído 37 %; 2 ml de glicerol 100 %; 3084 µl de formamida; 4 ml Tampão FA 10 vezes; 100 µl água). O marcador de massa molecular foi preparado por adição de 3 µl do marcador de RNA (0,24-9,5 Kb; Gibco) a 0,75 µl de tampão de aplicação. As amostras, antes de serem aplicadas no gel, foram desnaturadas 3-5 min a 65 °C e colocadas em gelo. A electroforese decorreu a 5-7 V/cm em tampão FA (Sambrook e Russell, 2001).

II.3.1.3. Síntese de cDNA.

A síntese de cDNA bicatenário foi realizada com o *cDNA Synthesis System* (Roche), com introdução de algumas modificações ao protocolo original que acompanhava o produto. A primeira cadeia de cDNA foi iniciada com o *primer* COE [5' AGTGAATTCT₁₂V (V=A;C;G)], composto por uma mistura equimolar dos três oligonucleótidos (Money *et al.*, 1996). A síntese de cDNA foi realizada a partir de RNA total extraído de material com as seguintes origens: folhas jovens de sobreiro, colhidas antes e após a infestação artificial dos solos com *P. cinnamomi*; raízes de sobreiros e azinheiras retiradas antes e após a inoculação com o fungo; folhas jovens de sobreiros e azinheiras localizados em solos naturalmente infestados; micélio de *P. cinnamomi*.

A síntese do cDNA tem início no primeiro nucleótido que antecede a cadeia de poli adeninas (poli-A) na extremidade 3' do RNA mensageiro (mRNA), devido à presença da base A, C ou G na extremidade 3' do *primer* COE, adjacente ao conjunto das 12 timinas (Money *et al.*, 1996). O *primer* COE (400 pmol) foi adicionado a 2 µg de RNA total e a mistura foi incubada a 70 °C durante 10 min. A mistura foi colocada imediatamente em gelo. Depois, adicionaram-se 2 µl de AMV (Transcriptase reversa; 25 U/ µl), 4 µl de DTT (ditiotreitól; 0,1 M), 1 µl de inibidor de RNase (25 U/ µl), 4 µl de dNTPs (mistura de desoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 10 mM cada), 8 µl de RT-*buffer* (tampão de reacção 5x concentrado que acompanha a transcriptase reversa), água até perfazer 42 µl. A reacção decorreu a 42 °C, durante 60 min

Para sintetizar a segunda cadeia de cDNA, adicionaram-se 6,5 µl de *2nd strand enzyme blend* (mistura de DNA polimerase I, ligase de *E. coli*, RNase H), 1,5 µl de dNTPs (10 mM), 30 µl de *2nd strand buffer* (tampão 5 vezes concentrado que acompanha a mistura de enzimas) e 72 µl água à mistura de reacção da síntese da primeira cadeia de cDNA, e ajustou-se o volume de reacção a 150 µl. A mistura foi incubada a 16 °C durante 2 h. A segunda cadeia de cDNA é sintetizada pela DNA polimerase I e tem início nos segmentos da cadeia de mRNA dos complexos híbridos DNA/RNA, que possuem extremidades 3'-OH livres. Estes segmentos servem de *primers* para a polimerase e são criados pela RNase H, que introduz cortes nas cadeias do mRNA. A DNA polimerase I utiliza a sua actividade de exonuclease 5'-3' para remover o *primer* na direcção da síntese e ao mesmo tempo, a sua actividade de polimerase para o substituir por novos nucleótidos. A ligase elimina as descontinuidades na nova cadeia de cDNA complementar à sintetizada pela transcriptase reversa. O último passo da síntese corresponde à adição de 20 U de T4 DNA polimerase com incubação de 5 min, a 16 °C, para deixar as extremidades do cDNA bicatenário sem saliências (*rombas*). A reacção termina com a adição de 17 µl de EDTA (0,2 M pH 8,0) (Gubler e Hoffmann, 1983; Gubler, 1988). Depois da síntese do cDNA bicatenário, o RNA residual é digerido pela adição de 15 U de RNase I, com incubação de 30 min, a 37 °C. Em seguida, é adicionada proteinase K (3U) e a mistura é incubada, 30 min, a 37 °C.

O cDNA sintetizado foi purificado com o kit *Qiaquick PCR purification*, de acordo com as instruções do fabricante. Neste processo, o cDNA é retido numa coluna e as proteínas e as substâncias resultantes das digestões e da síntese são eliminadas por

lavagens. O cDNA foi retirado da coluna com 50 µl de Tris-HCl (10 mM, pH 8,5) e a solução foi desidratada, por centrifugação sob vácuo, com redução do volume para 20 µl.

II.3.1.4. Digestão do cDNA e ligação de adaptadores sintéticos.

O cDNA bicatenário sintetizado (20 µl) foi digerido, em simultâneo, com duas enzimas de restrição *EcoRI/MseI* (2,5 U cada; AFLP Core Reagent Kit; Gibco) na presença de tampão de reacção 5 vezes concentrado (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50 mM AcMg; 250 mM AcK). A reacção decorreu num volume total de 25 µl, a 37 °C, durante 2 h. As enzimas foram, em seguida, desnaturadas durante 15 min, a 70 °C.

Após inactivação das endonucleases, os fragmentos de cDNA foram ligados a adaptadores complementares dos locais de restrição *EcoRI* e *MseI*. A ligação decorreu na presença de 5 pmol de adaptador *EcoR I* (5' AATTGGTACGCAGTCTAC 3'; 5' CTCGTAGACTGCGTACC 3') e 50 pmol do adaptador *Mse I* (5' TACTCAGGACTCAT 3'; 5' GACGATGAGTCCTGAG 3'), presentes em 24 µl de uma solução composta por ATP (0,4 mM), Tris-HCl pH 7,5, AcMg (10 mM) e AcNa (50 mM), a 37 °C, durante 2 h e foi catalisada pela T4 DNA ligase (1 U) (AFLP Core Reagent Kit; Gibco) (Bachem *et al.*, 1998).

Os oligonucleótidos sintéticos de sequência conhecida flanqueiam os vários fragmentos de cDNA criados pela digestão com as enzimas de restrição e servem de locais de hibridação dos *primers* nas reacções de amplificação.

II.3.1.5. Reacções de pré-amplificação e de amplificação.

Os fragmentos digeridos e ligados aos adaptadores são usados como DNA alvo em reacções de pré-amplificação, com *primers* que se hibridam na sequência do adaptador e que não têm na extremidade 3' nenhum nucleótido selectivo. Estes *primers* designam-se *EcoRI+0* e *MseI+0* (Bachem *et al.*, 1998).

A reacção de pré-amplificação foi realizada num volume total de 50 µl, com 5 µl de tampão 10 vezes concentrado [Tris-HCl (100 mM, pH 8,3), MgCl₂ (15 mM), KCl (500 mM)], 0,2 µl da enzima Taq DNA polimerase (5 U/µl; Boehringer Mannheim), 15 pmol

de *primer EcoRI*+0 (5'GACTGCGTACCAATTC3'), 15 pmol de *primer MseI*+0 (5' GATGAGTCCTGAGTAA 3') e 10 µl da solução de cDNA digerido e ligado aos adaptadores. Na reacção de amplificação realizaram-se 28 ciclos compostos por 30 s a 94 °C; 60 s a 60 °C; 60 s a 72 °C (Zabeau e Vos, 1993). Em seguida, os produtos das reacções de pré-amplificação foram diluídos 10 vezes e utilizaram-se 5 µl, como cDNA alvo, em cada uma das reacções de amplificação selectiva. Nas reacções de amplificação selectiva foram utilizados 20 pares de *primers*, que possuíam na extremidade 3', três, dois ou nenhum nucleótido, para além da sequência de bases que reconhece a sequência dos adaptadores. As combinações de pares de *primers* denominaram-se:

- I1 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTCACC 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAAATT 3');
- I2 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTCACC 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAAACC 3');
- I3 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTCATG 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAAACC 3');
- I9 (*EcoRI* 5'-GACTGCGTACCAATTCACC 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAATGG 3')
- I10 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTCACC 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAATTG 3')
- I11 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTCACC 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAACTC 3')
- I12 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTCATG 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAACAC 3')
- I13 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTCATG 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAACAT 3')
- I14 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTCATG 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAACTC 3')
- I15 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTCATG 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAACTG 3')
- I16 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTCATG 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAACTT 3')
- I17 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTC 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAAATT 3')
- I18 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTC 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAAACC 3')
- I19 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTC 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAATGG 3')
- I20 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTCA 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAATTG 3')
- I21 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTCA 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAACTC 3')
- I22 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTCA 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAACAT 3')
- I23 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTCAG 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAAATT 3')
- I24 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTCAG 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAAACC 3')
- I25 (*EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTCAG 3'; *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAATGG 3').

O *primer EcoR I-XXX* foi marcado radioactivamente com [$\gamma^{33}\text{P}$] ATP (Redivue, Amersham Pharmacia), na extremidade 5', em todas as reacções de amplificação. A

reação de marcação foi catalisada pela T4 quinase polinucleotídica e foi realizada num volume de 0,5 µl com 0,1 µl de *primer* (50 ng/µl), 0,02 µl de enzima (10 U/µl; T4 PNK; Gibco BRL), 0,1 µl do tampão de quinação [*Forward Reaction Buffer*: Tris-HCl (350 mM, pH 7,6), MgCl₂ (50 mM), KCl (50 mM), β-mercaptoetanol (5 mM); Gibco BRL] e 0,1 µl [$\gamma^{33}\text{P}$] ATP (2500 Ci/mmol). A reação decorreu a 37 °C, durante 40 min e em seguida, a enzima foi desactivada por incubação, a 80 °C, durante 15 min (Zabeau e Vos, 1993; Bachem *et al.*, 1998).

O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com o marcador de massa molecular 30-330 pb (AFLP DNA ladder, Gibco BRL), que foi marcado com [$\gamma^{33}\text{P}$] ATP, numa reação de substituição do grupo fosfato da extremidade 5' do DNA. A reação foi catalisada pela T4 quinase polinucleotídica e foi realizada num volume de 11 µl, com 5 µl de marcador 30-330 pb, 2 µl de enzima (10 U/µl; T4 PNK; Gibco BRL), 2 µl do tampão de quinação [*Exchange Reaction Buffer*: imidazole-HCl (250 mM, pH 6,4), MgCl₂ (60 mM), β-mercaptoetanol (5 mM); ADP (350 µM); Gibco BRL] e 2 µl de [$\gamma^{33}\text{P}$] ATP (2500 Ci/mmol). A reação de quinação decorreu a 37 °C, durante 10 min e a enzima foi desnaturada posteriormente, por incubação a 80 °C, durante 15 min. Por fim, adicionaram-se 10 µl de TE [Tris-HCL (10 mM), pH 8,0, EDTA (0,1 mM)], 50 µl da solução corante desnaturante de formamida [10 ml formamida, xileno cianol (10 mg), bromofenol azul (10 mg), 200 µl EDTA (0,5 M)], aos 11 µl da mistura de reação e guardou-se a -20 °C.

A reação de amplificação selectiva foi realizada num volume de 20 µl com 2 µl de tampão 10 vezes concentrado da enzima Taq DNA polimerase (5 U/µl; Boehringer Mannheim), 0,1 µl da enzima, 25 ng do *primer EcoRI-XXX*, marcado com ³³P, 30 ng do *primer MseI-XXX*, 0,4 µl de dNTPs [mistura de desoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP e dTTP (5 mM); Boehringer Mannheim] e 5 µl do produto da pré-amplificação. O programa de amplificação foi o seguinte: 13 ciclos com desnaturação 30 s a 94 °C; hibridação dos *primers* 30 s a 65 °C (com decréscimo de 0,7 °C em cada ciclo até atingir a temperatura de 56 °C), polimerização 60 s a 72 °C, seguido de 18 ciclos com 30 s a 94 °C, 30 s a 56 °C e 60 s a 72 °C (Zabeau e Vos, 1993; Bachem *et al.*, 1998).

II.3.1.6. Separação dos fragmentos amplificados em gel de poliacrilamida.

Os produtos das reacções de amplificação foram separados por electroforese em gel desnaturante de poliacrilamida [Gel-Mix 6 *Sequencing System*: 5,7 % acrilamida, 0,3 % bisacrilamida, Ureia (7 M), Tris-Borato (100 mM), EDTA (1 mM), TEMED (3 mM), pH 8,3, APS (solução persulfato de amónia 10 %) Gibco BRL], após adição de 20 µl da solução corante de formamida e manutenção a -20 °C, durante 24 h (Maxam e Gilbert, 1980). Na electroforese, usou-se o sistema de sequenciação da BioRad, com vidros de dimensões 38 x 50 cm, pentes de 48 ou 96 poços, tampão de corrida TBE 0,5 [Tris-Borato (45 mM), EDTA (1 mM), pH 8,3]. Antes de se aplicarem as amostras foi realizada uma pré-electroforese a 90 W, durante 1 h. As amostras e o marcador foram desnaturados a 95 °C, durante 5 min e mantidos em gelo até à sua aplicação. Aplicaram-se no gel, entre 3 a 5 µl dos produtos da amplificação. A electroforese decorreu a uma potência constante de 90 W e foi interrompida depois do corante xileno cianol ter percorrido 35 cm. O gel de poliacrialmida foi transferido para papel *Whatman* 3MM e foi seco num secador de géis, sob vácuo (BioRad). Com um palito embebido em solução radioactiva, fizeram-se marcações no papel, em posições exteriores ao gel, necessárias para orientação do gel com a película autorradiográfica. O gel foi posto em contacto com a película, durante 40 h e a revelação da película foi efectuada manualmente, numa câmara escura. A película foi colocada 2 min em solução de revelação (Kodak LX-24 *X-ray developer*), 1 min em água e 4 min na solução de fixação (Kodak AL-4 *X-ray fixer*), com agitação suave. O processo terminou com a colocação da película em água corrente, durante 15 min (Sambrook e Russell, 2001).

II.3.1.7. Recuperação, clonagem e sequenciação dos fragmentos cDNA-AFLP.

Depois de revelada a película, fizeram-se coincidir as marcas radioactivas do gel com as da película e recortaram-se as bandas correspondentes aos fragmentos amplificados. Escolheram-se os fragmentos correspondentes a amplificações de genes que se expressaram de forma diferencial, ou seja, aqueles fragmentos presentes nas raízes unicamente, após infecção com *P. cinnamomi* e aqueles em que houve um aumento da expressão. Foi seguido o mesmo critério para as amostras de folhas de

sobreiros cujo solo tinha sido infestado. Nas amostras de folhas dos sobreiros e azinheiras localizados em locais de declínio, escolheram-se fragmentos polimórficos presentes em sobreiros com graus de desfoliação diferentes.

Isolaram-se 8 fragmentos da combinação I2 (C1-RAI; C2-RAI; C3-RAI; C4-RAI; C8-BS222A-4; C9- BS222A-4; C13-BS110HL-3; C14-BS110HL-3), 11 fragmentos da combinação I11 (C36-T6I₁; C39-T6I₃; C42-RAI; C44-RAI; C46-RAI; C47-RAI; C48- BS222A-4; C49- BS222A-4; C53- BS110HL-3; C54- BS110HL-3), 4 da combinação I18 (C72-RAI; C73-RAI; C77-AS21BV-3; C78-AS21BV-3); 3 da combinação I19 (C83-RAI; C84-RAI; C85-RAI) e 4 da combinação I23 (C95-T6I₃; C96-RAI; C98-RAI; C103-AS21BV-3).

Os rectângulos de papel *Whatman* com o gel foram colocados em 40 µl de água e mantidos em gelo durante 10 min. Após hidratação, os tubos foram colocados a 95 °C durante 15 min e transferidos, logo em seguida, para gelo. A mistura foi centrifugada alguns segundos, o sobrenadante foi guardado e 5 µl desta solução foram utilizados como DNA alvo, em reacções de reamplificação (Habu e Iida, 1998). As reacções de reamplificação decorreram nas mesmas condições das reacções de amplificação. Os produtos da reamplificação foram separados por electroforese em gel de agarose 2 %, corado com brometo de etídio. Os fragmentos reamplificados com o tamanho esperado, foram recortados do gel de agarose e purificados com o *kit Qiaquick PCR Purification* (Qiagen). Após purificação, os fragmentos foram clonados no vector pCRII Topo do *kit Topo TA Cloning* (Invitrogen; Shuman, 1994; Ausubel *et al.*, 1994) e sequenciados num sequenciador automático Perkin Elmer/Applied Biosystems Model ABI PRISM 377. As reacções de sequenciação foram preparadas com o *kit* ABI PRISM *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*, e foram iniciadas com os *primers* universais M13 directo (5' GTAAAACGACGGCCAG 3') e M13 reverso (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3').

II.3.1.8. Análise das sequências nucleotídicas dos fragmentos cDNA-AFLP.

As sequências nucleotídicas dos 29 fragmentos cDNA-AFLP foram analisadas com recurso aos programas *fastA*, integrado no *software* de bioinformática GCG (*Genetics Computer Group*, University of Wisconsin, Madison, 1981) e ao *Blastn* disponível no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (Altschul *et al.*,

1997). Com estes programas compararam-se as sequências nucleotídicas dos fragmentos cDNA-AFLP com sequências de genes já identificados noutras espécies de plantas, presentes no GenBank.

II.3.2. Amplificação com primers de sequência heterogénea.

II.3.2.1. Extracção de DNA genómico de *Q. suber*.

O DNA genómico foi extraído a partir de folhas muito jovens (50 mg) do sobreiro BS108HL com o *kit* DNeasy (Qiagen). As folhas foram esmagadas num tubo *eppendorf* (1,5 ml) até serem reduzidas a pó, na presença de azoto líquido, com a ajuda de uma ponta de plástico com extremidade cónica, accionada por num *berbequim*. Em seguida, foram adicionados 100 µl de tampão AP1 incluído no *kit* e as folhas foram maceradas na presença do tampão durante alguns segundos. O restante procedimento decorreu de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. A qualidade do DNA foi analisada por electroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio (Sambrook e Russell, 2001). A concentração foi determinada por medição da absorvência a 260 nm, num espectrofotómetro.

II.3.2.2. Selecção de *primers* de sequência heterogénea.

As sequências conhecidas dos quadros de leitura aberta de genes que codificam fenilalaninas amónia liases (PAL), cinamil álcool desidrogenases (CAD) e peroxidases (POX), pertencentes a seis espécies de plantas, foram comparadas pelo programa CLUSTAL W 1.8 (*Multiple sequence analysis*, GCG; Thompson *et al.*, 1994). A origem das sequências e o seu tamanho são apresentados na tabela 10).

Nas regiões mais conservadas dos genes, definiram-se oligonucleótidos que diferem em uma ou mais bases conforme a sequência de cada gene. Cada um dos *primers* corresponde, portanto, a uma mistura de oligonucleótidos com sequências diferentes, que traduzem todas as combinações possíveis para as bases escolhidas. Nalguns artigos estes *primers* vêm designados como degenerados (Gion *et al.*, 2000).

Neste trabalho, optou-se por uma designação diferente (*primers* heterogêneos) porque as sequências de origem são de cDNA ou DNA e não de proteínas. A definição de *primer* degenerado deriva da conversão de sequências de proteínas em sequências nucleotídicas e na selecção de oligonucleótidos tendo em consideração a degenerescência do código genético (Edwards *et al.*, 1995).

Tabela 10. Identificação das sequências nucleotídicas usadas para selecção dos *primers*.

Género	Origem das sequências Número de identificação (NCBI); tipo de sequência; tamanho (pb)		
	POX Peroxidase	PAL Fenilalanina amónia liase	CAD Cinamil álcool desidrogenase
<i>Arabidopsis</i>	X99952; mRNA; 1008	-	Z31715; DNA; 1098
<i>Lycopersicon</i>	X15853; DNA; 1095 X15854; DNA; 1092	M83314; DNA; 2115	-
<i>Solanum</i>	M21334; mRNA; 1058	-	-
<i>Pinus</i>	-	-	AF060491; DNA; 1074
<i>Populus</i>	D11102; DNA; 957	D43802; DNA; 2133 L11747; mRNA; 2148	AJ295837; DNA; 1074 AF217957; mRNA; 1074 Z19568; mRNA; 1074
<i>Eucalyptus</i>	-	AF167487; DNA; 1193	AF294793; DNA; 1071 X75480; DNA; 1065 AF038561; mRNA; 1071

Foram escolhidos 16 *primers* heterogêneos para os três genes candidatos, POX, CAD e PAL. A designação atribuída a cada *primer* e a sequência nucleotídica escolhida foram:

- gene POX

PAP1 (5'ATTCGYCTYCACTTYCATGA3'); PAP2 (5'TGTGATGGAKSTATTYTGCT3');
PAP3 (5'ATRICWGCACARGAKAC3'); PAP4 (5'GTGCRCACACRKTWGG3'); PAP5 (5'TYYCCCATYTTKATCAT3');

- gene PAL

PPAL1 (5'AGGMAGCCAYYTRGATGA3'); PPAL2 (5'GATAGTTATGGYGTACT3');
PPAL3 (5'CTWATAAGYTCYTTYTGAAG3'); PPAL4 (5'CAACACYCTSCYCAAGG3');
PPAL5 (5'CCATCYAAAATRTGYTCCAT3'); PPAL6 (5'TCYCTCACMARCYTGTACA3');

- gene CAD

PCAD1 (5'GGWTGGGCWGAASRGA3'); PCAD2 (5'AYTAYCCWATGGTYCCTGG3');
PCAD3 (5'GTTTGTGGTGARAATYCC3'); PCAD4 (5'GGRATTYTCACCACAAAC3');
PCAD5 (5'ATGCTCCCTATRAARCTCCC3').

Designação das letras R, Y, K, M, S, W, B, D, H, V e N, de acordo com o código genético universal: R (G/A); Y (T/C); K (G/T); M (A/C); S (G/C); W (A/T); B (G/C/T); D (A/G/T); H (A/C/T); V (A/C/G) e N (A/C/G/T).

A localização dos *primers* nas sequências que foram usadas como referência é apresentada nas figuras 51, 52 e 53. As figuras são compostas por excertos dos alinhamentos efectuados com as sequências de referência onde os *primers* foram definidos. A numeração das sequências de referência está de acordo com a numeração original da região codificante.

II.3.2.3. Condições das reacções de amplificação.

A amplificação de fragmentos dos genes de POX, PAL e CAD de *Q. suber* foi realizada num volume total de 25 µl, com 120 ng de DNA genómico (amostra BS108HL), 2 µl de cada um dos *primers* de sequência heterogénea (10 µM) e 12,5 µl da mistura de reacção *PCR Master Mix* [Taq DNA polimerase (50 U/ml); dNTPs (400 µM); MgCl₂ (3 mM); Promega] (Mullis *et al.*, 1994). Efectuaram-se todas as combinações possíveis entre os *primers* escolhidos no sentido directo e reverso, em cada um dos genes candidatos.

As reacções de amplificação decorreram durante: 1 min a 94 °C; (30 s a 94 °C; 30 s a 46 °C; 1 min a 72 °C) x 30; 5 min a 72 °C.

Para a combinação de *primers* PAP4/PAP5, relativa ao gene POX, foi efectuada uma reamplificação, nas mesmas condições da reacção de amplificação, usando como DNA alvo, o produto resultante da reacção de amplificação (5 µl), com os mesmos *primers*.

Os produtos das amplificações (10 µl) e reamplificações (10 µl) foram analisados por electroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio (Sambrook e Russell, 2001).

II.3.2.4. Clonagem e sequenciação dos fragmentos amplificados.

Os fragmentos amplificados dos genes *CAD*, *POX* e *PAL* de *Q. suber* foram clonados no vector pCRII Topo do *kit Topo TA Cloning* (Invitrogen) e a sua sequência nucleotídica foi determinada. As reacções de sequenciação foram realizadas com o *kit* ABI PRISM *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*, iniciadas com os *primers* universais M13 directo (5' GTAAAACGACGGCCAG 3') e M13 reverso (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3') e efectuadas num sequenciador automático Perkin Elmer/Applied Biosystems Model ABI PRISM 377.

As sequências nucleotídicas foram analisadas com recurso ao conjunto de programas de bioinformática incluído no GCG (*Genetics Computer Group*, University of Wisconsin, Madison, 1981).

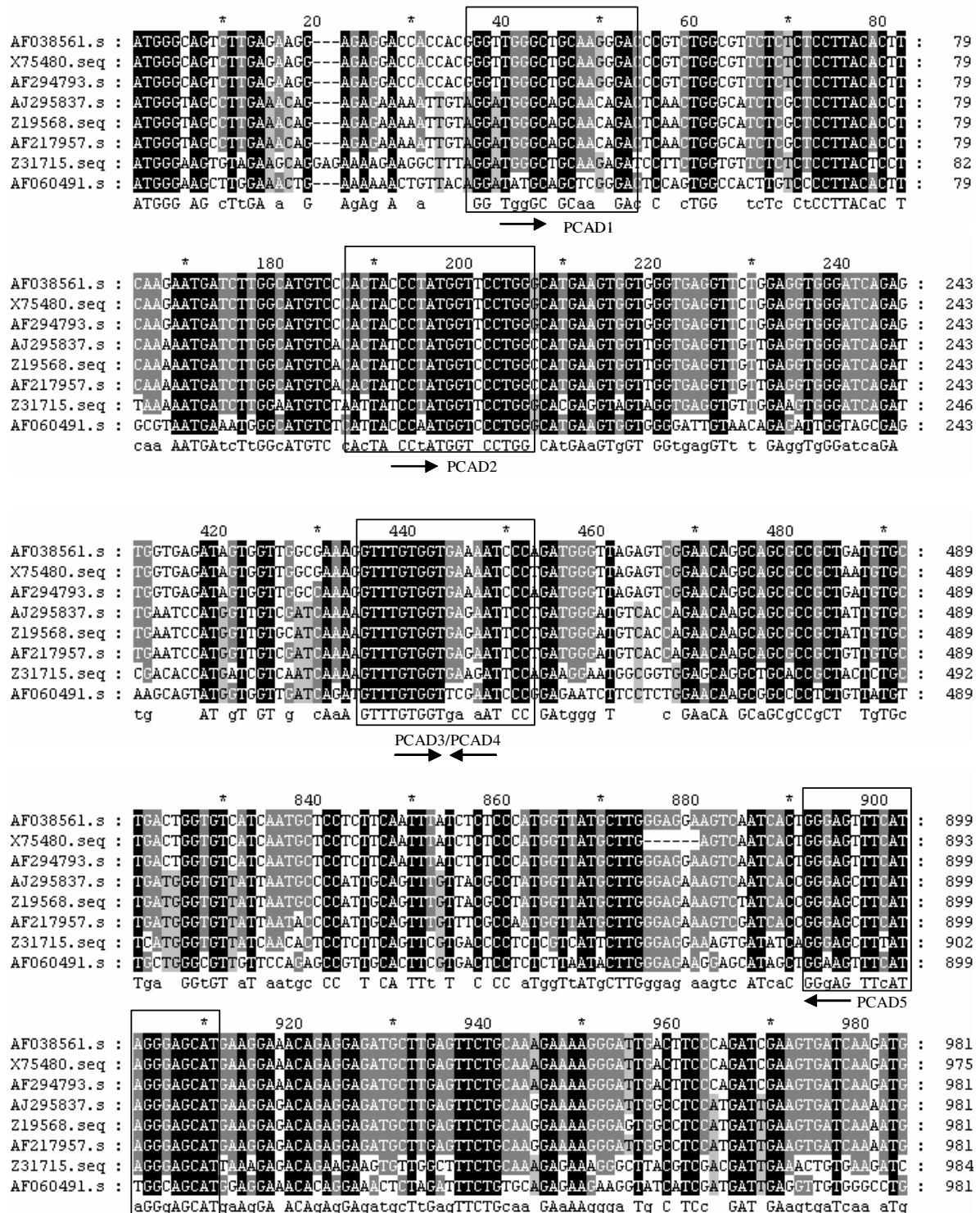


Figura 51. Alinhamento das regiões codificantes das sequências nucleotídicas dos genes *CAD* das espécies: *Arabidopsis thaliana* (Z31715), *Populus balsamifera* s. sp. *trichocarpa* (AJ295837), *Populus tremuloides* (AF217957), *Populus deltoides* (Z19568), *Eucalyptus saligna* (AF294793), *Eucalyptus globulus* (AF038561), *Eucalyptus gunnii* (X75480) e *Pinus radiata* (AF060491). Está assinalada a localização dos primers PCAD1 a PCAD5, com indicação do sentido em que ocorre a reacção de polimerização em cadeia, iniciada por cada um dos primers.

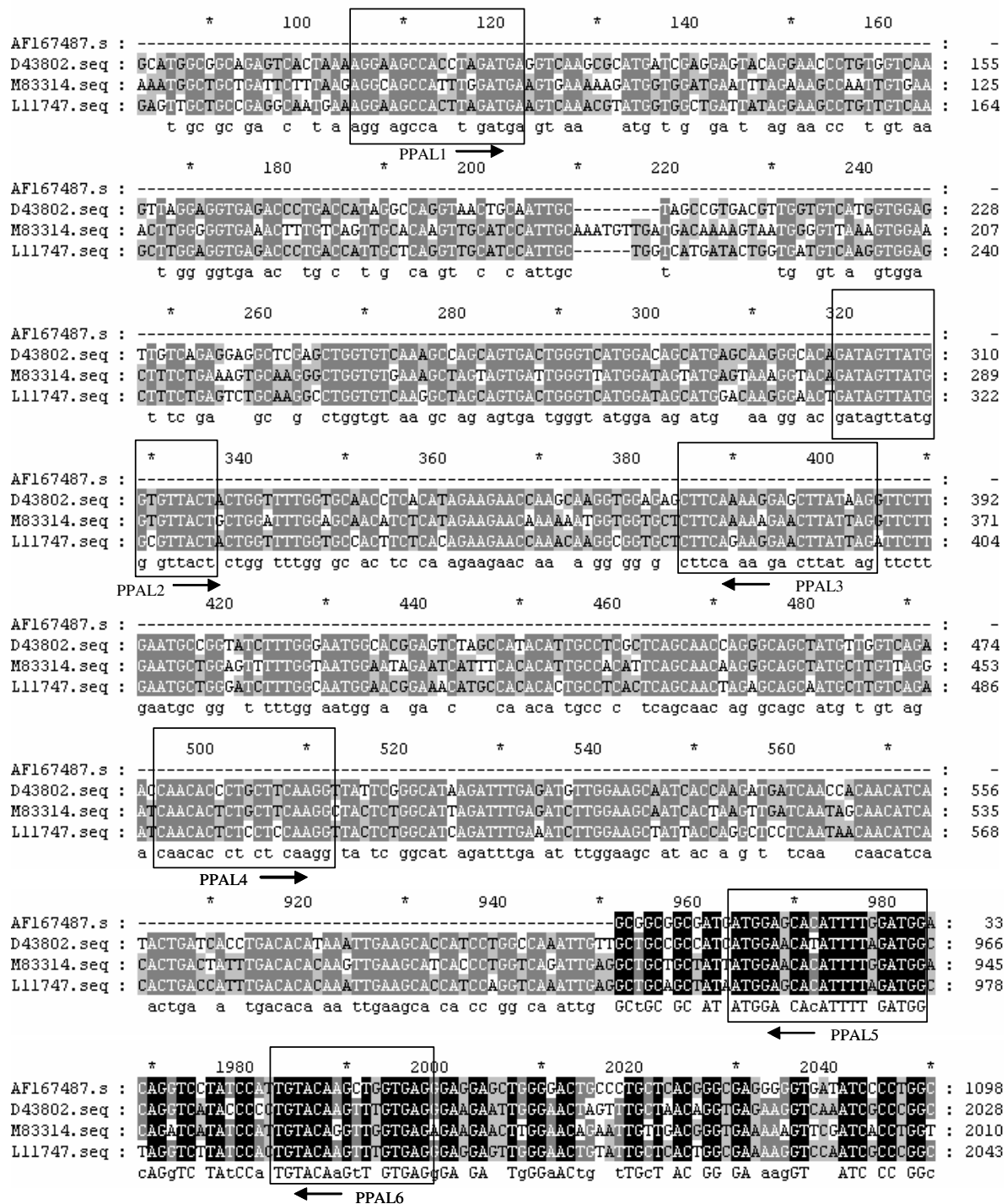


Figura 52. Alinhamento das regiões codificantes das sequências nucleotídicas dos genes *PAL* das espécies: *Populus x generosa* (L11747), *Populus kitakamiensis* (D43802), *Eucalyptus globulus* (AF167487) e *Lycopersicon esculentum* (M83314). Está assinalada a localização dos primers PPAL1 a PPAL6, com indicação do sentido em que ocorre a reacção de polimerização em cadeia, iniciada por cada um dos primers.

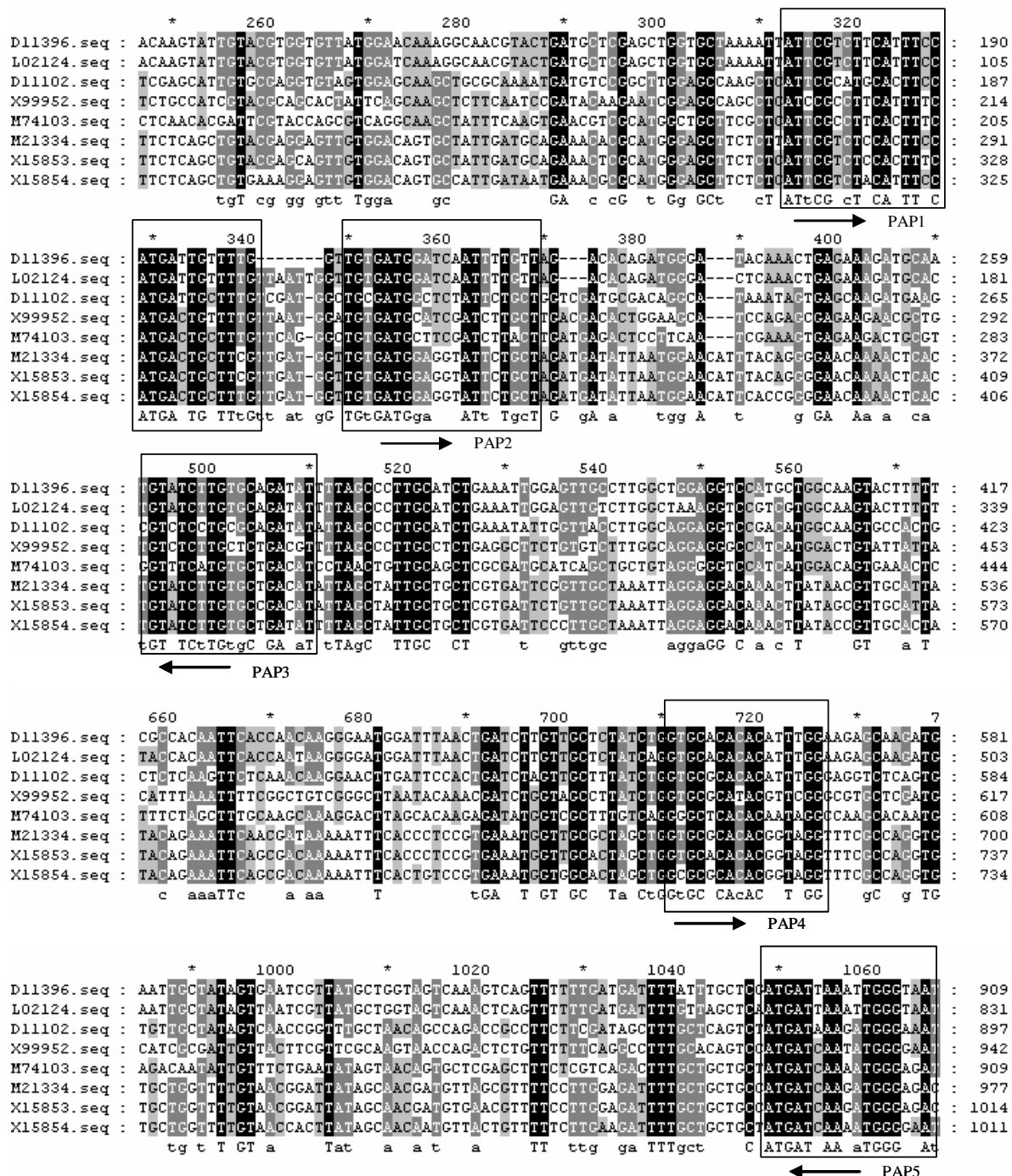


Figura 53. Alinhamento das regiões codificantes das sequências nucleotídicas dos genes *POX* das espécies: *Arabidopsis thaliana* (X99952), *Populus kitakamiensis* (D11102), *Nicotiana tabacum* (D11396; L02124; M74103), *Lycopersicon esculentum* (X15853; X15853), *Solanum tuberosum* (M21334). Está assinalada a localização dos primers PAP1 a PAP5, com indicação do sentido em que ocorre a reacção de polimerização em cadeia, iniciada por cada um dos primers.

II.3.3. Determinação de sequências complementares das extremidades de mRNAs por RACE-PCR 5'/3'².

II.3.3.1. Material vegetal.

Durante os meses de Outubro e Novembro, colheram-se landes de sobreiro e bolotas de azinheira. As sementes foram desinfectadas, por imersão numa solução aquosa de lixívia (5 %) e detergente (1 gota/L). Em seguida, foram colocadas a germinar numa mistura de vermiculite, areão e leka, à temperatura ambiente, no laboratório. Quando a raiz principal atingiu 8-10 cm, separaram-se as bolotas ou landes do meio de suporte, lavaram-se com água e colocaram-se em placas de *petri*. Para infectar as raízes com *P. cinnamomi*, colocaram-se tiras de ágar com micélio do fungo, directamente em contacto com as raízes. A região da raiz em contacto com o fungo foi protegida com papel de alumínio e o conjunto foi colocado numa estufa a 25 °C, durante 24 h. Após esse período, retiraram-se as tiras de ágar e cortaram-se as raízes junto da lande ou da bolota. As raízes foram, então, armazenadas a -80 °C, até utilização.

II.3.3.2. Extracção e purificação de RNA total.

O RNA total foi extraído a partir de 50 mg de raízes infectadas com *P. cinnamomi* com o *kit* RNeasy (Qiagen), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Dudareva *et al.*, 1996). O RNA total foi tratado com 2 µl de DNase I (1 U/µl; Gibco), na presença de 2 µl de RNaseOUT (40 U/µl; Gibco) e 10 µl de tampão da DNase (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 20 mM MgCl₂; 500 mM KCl; Gibco) (Sambrook e Russell, 2001). A reacção decorreu num volume total de 100 µl, durante 30 min, a 37 °C. O RNA total foi purificado com o *kit* RNeasy (Qiagen), após a reacção enzimática. Na purificação do RNA total omitiram-se os passos de lise e remoção dos resíduos celulares, tal como vem descrito no protocolo fornecido com o *kit*. Recuperaram-se, em

² Rapid amplification of complementary cDNA ends-polimerase chain reaction.

média, 5 a 7 µg de RNA total a partir de 50 mg de raízes infectadas. As amostras de RNA total foram armazenadas a -80 °C, até utilização.

II.3.3.3. Amplificação das extremidades 3' e 5' de mRNAs após a síntese de cDNA *in vitro*.

A determinação das extremidades complementares do cDNA, a partir de mRNA, dos genes que codificam uma isomerase dissulfídica proteica (PDI), uma cinamil álcool desidrogenase 1 (CAD1), uma cinamil álcool desidrogenase 2 (CAD2), uma fenilalanina amónia liase (PAL), uma peroxidase (POX), uma proteína de resistência (R) e uma proteína do tipo RelA/SpoT (RSH), em *Q. suber*, foi realizada por RACE-PCR. As sequências alvo, nas reacções de amplificação, foram os cDNAs transcritos *in vitro* dos genes referidos. Para identificar a extremidade 3' dos genes foram usados os kits 5'/3' RACE (Roche) e *GeneRacer* (Invitrogen). Para a extremidade 5' foi utilizado apenas, o kit *GeneRacer* (Invitrogen).

II.3.3.3.1. Amplificação da extremidade 3' de mRNAs pelo método do kit RACE.

A síntese de cDNA foi iniciada com um oligonucleótido possuidor de 16 timidinas e uma sequência de bases conhecida (oligo-dT *anchor primer*; 5' GACCACGCGTATCGATGTCGACT₁₆V 3', V= A, C, G), a partir da cadeia de poli-(A) do mRNA, presente em 1 µg de RNA total, extraído das raízes de sobreiro e azinheira, infectadas com *P. cinnamomi* (Frohman, 1993). A reacção de síntese do cDNA, *in vitro*, decorreu num volume total de 20 µl, na presença de 1 µg de RNA total, 1 µl de oligo-dT *anchor primer* (37,5 µM), 4 µl de tampão de síntese 5 vezes concentrado [Tris-HCl (250 mM), MgCl₂ (40 mM), KCl (150 mM), ditiotrietol (5 mM), pH 8,5], 2 µl de dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP, 10 mM cada), 1 µl de RNase *Inhibitor* (25 U/ µl) e 1 µl de Transcriptase Reversa (AMV, 20 U/ µl). O primeiro passo do procedimento consistiu em adicionar ao RNA total, o oligo-dT e em incubar a mistura de reacção a 70 °C, durante 10 min, colocando-a, em seguida, imediatamente,

em gelo. No segundo passo, foram adicionados os restantes reagentes e a mistura foi incubada a 55 °C, durante 60 min e a seguir a 65 °C, durante 10 min (Frohman, 1993).

O cDNA foi amplificado na presença dum *primer* que hibrida com o oligo-dT *anchor primer*, denominado *anchor primer*, e com um *primer* que hibrida com a sequência do fragmento conhecido de cada um dos genes (*primer* específico). A reacção foi realizada num volume total de 25 µl, com 1 µl da solução de cDNA, 1 µl do *anchor primer* (10 µM, 5' GACCACGCGTATCGATGTCGAC 3'), 1 µl do *primer* específico (10 µM) e 12,5 µl da mistura de reacção *PCR Master Mix* [Taq DNA polimerase (50 U/ml); dNTPs (400 µM); MgCl₂ (3 mM); Promega].

Os *primers* específicos denominaram-se C1SP4 (5'GAGAAGCTTGCTGAGCTTGC3'), C3SP4 (5'CTTACCAAGGAGGGACTGCC3'), C9SP4 (5'CAAAGCAAATCTACTGGAAG3'), C36SP4 (5'GCCACACTGTGCCAGGATGG3'), PAP-1R (5'GGCAAGCAAGGTGTACAG3'), PAL-1R (5'CAAGGTTACTCAGGCATCAG3'), CINAMIL-1 (5'TACACTGATGGCAAACCCACCCAAGG3') e foram dirigidos para os fragmentos dos genes PDI, R, CAD1, RSH, POX, PAL e CAD2, respectivamente.

A amplificação decorreu durante 1 min a 94 °C; (30 s a 94 °C; 30 s a 54 °C, 1 min a 72 °C) 30 vezes; 5 min a 72 °C.

Nas reacções de amplificação foi utilizado mais do que um método. Por vezes, foram realizadas num volume total de 50 µl, na presença de 5 µl de tampão 10 vezes concentrado (Tris-HCl 200 mM, pH 7,5; KCl 1 M; MgCl₂ 15 mM; DTT 10 mM; EDTA 1 mM; Tween 20, 1 % v/v; Nonidet P40 1 % v/v), 5 µl de uma mistura de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 2 mM cada), 2 µl de cada um dos *primers* (10 µM), 1 µl da solução de cDNA e 0,75 µl da enzima *Expand High Fidelity* (3,5 U/ µl). A reacção de amplificação decorreu durante 2 min a 95 °C; (30 s a 95 °C, 30 s a 50 °C, 1 min a 72 °C) 29 vezes; 7 min a 72 °C.

Os produtos da amplificação (10 µl) foram separados por electroforese em gel de agarose (2 %) e visualizados por coloração com brometo de etídio.

II.3.3.3.2. Amplificação da extremidade 3' de mRNAs pelo método do kit *GeneRacer*.

O cDNA foi sintetizado pela *Superscript*TM II RNase H⁻ transcriptase reversa (Gibco), a partir de 1 µg de RNA total, na presença de um oligonucleótido (oligo-dT) com 18 timidinas e uma sequência de bases conhecida (5'GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGT₁₈3') (Schaefer, 1995). Ao RNA total adicionaram-se, inicialmente, 1 µl de oligo-dT (37,5 µM), 2 µl de dNTPs (10 mM) e água, até perfazer um volume de 31 µl. A mistura foi incubada a 65 °C, durante 5 min, e em gelo, durante 2 min. Em seguida, adicionaram-se 4 µl de tampão 5 vezes concentrado [*First Strand Buffer*: Tris-HCl (250 mM, pH 8,3), KCl (375 mM), MgCl₂ (15 mM)], 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNaseOUT (40 U/µl), 2 µl de *Superscript* (200 U/µl) e a reacção decorreu durante 1 h a 42 °C. No final, a enzima foi desnaturada, por incubação a 70 °C, durante 15 min. Após a síntese de cDNA, adicionou-se 1 µl de RNase H. Esta ribonuclease degrada a cadeia de RNA dos híbridos RNA x DNA que se formam depois da síntese. A reacção decorreu a 37 °C, durante 20 min.

O cDNA sintetizado foi utilizado em reacções de amplificação com o *primer* *GeneRacer* 3' (GR3'; 5'GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG3') que se hibrida com o oligo-dT e com os *primers* específicos utilizados no método do *kit* RACE. Quando não havia amplificação com estes *primers*, efectuava-se uma reamplificação a partir de 5 µl do produto PCR da primeira reacção e utilizavam-se os mesmos *primers* específicos e o *primer* *GeneRacer* 3' Nested (GRN3'; 5' CGCTACGTAACGGCATGACAGTG). Este *primer* hibrida com o oligo-dT numa região mais a montante daquela que é reconhecida pelo *primer* GR3'.

As condições de amplificação foram idênticas às descritas para o método do *kit* RACE.

II.3.3.3. Amplificação da extremidade 5' de mRNAs pelo método do kit *GeneRacer*.

No método seguido pelo *kit GeneRacer*, o RNA total é tratado com duas enzimas, CIP (*calf intestinal phosphatase*), usada para remover os fosfatos das extremidades 5' dos mRNAs incompletos e TAP (*tobacco acid pyrophosphatase*), usada para retirar a estrutura *cap* (metil₇G-p-p-p-A-p-N-p...) aos RNAs mensageiros. Em seguida, liga-se à extremidade 5' do mRNA, um oligoribonucleótido sintético (*GeneRacer RNA Oligo*). A síntese de cDNA é iniciada com um oligonucleótido sintético, constituído por uma sequência de bases conhecida e por 18 timinas (*GeneRacer Oligo-dT*). As extremidades 5' dos mRNAs são amplificadas com um *primer* que hibrida com a sequência do oligoribonucleótido sintético que foi transcrita para cDNA e com um *primer* específico a cada um dos genes cuja sequência se pretende conhecer (Maruyama e Sugano, 1994; Schaefer, 1995; Volloch *et al.*, 1994).

A reacção de desfosforilação foi realizada num volume total de 15 µl com 1 µl de CIP (10 U/ µl), 1 µg de RNA total, 1 µl de *RNase Inhibitor* (10 U/ µl) e 1 µl de tampão CIP 10 vezes concentrado [Tris-HCl (0,5 M, pH 8,5), 1 mM EDTA]. A reacção decorreu durante 1 h a 50 °C. Em seguida, o RNA total foi purificado e precipitado. Aos 15 µl da solução de desfosforilação adicionaram-se 85 µl de água DEPC, 100 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), a solução foi misturada com agitação forte (aparelho *vortex*) e foi centrifugada à velocidade máxima numa microcentrifugadora, durante 5 min, à temperatura ambiente. A fase aquosa foi recuperada. O RNA total foi precipitado por centrifugação à velocidade máxima, numa microcentrifugadora, durante 20 min, a 4 °C, após a adição de 2 µl glicogénio (10 mg/ml), 10 µl de AcNa (3 M, pH 5,2) e 220 µl de etanol 95 % e incubação a -80 °C, durante 30 min. Em seguida, o RNA total precipitado foi lavado com 500 µl de etanol 75 %, centrifugado nas mesmas condições, durante 2 min e seco a frio, por centrifugação sob vácuo. Depois de purificado, o RNA total foi dissolvido em 6 µl de água DEPC.

A remoção da estrutura *cap* da extremidade 5' do mRNA decorreu a 37 °C, durante 1 h, num volume de 10 µl e foi catalisada pela TAP (1 µl; 0,5 U/ µl), na presença de 1 µl de tampão TAP 10 vezes concentrado [AcNa (0,5 M, pH 6,0), EDTA

(10 mM), β -mercaptoetanol (1 %), Triton X-100 (0,1 %)], 1 μ l de *RNase Inhibitor* (10 U/ μ l) e 6 μ l do RNA total desfosforilado. O RNA total foi purificado e precipitado, como descrito anteriormente e ressuspensionado em 6 μ l de água DEPC. O oligoribonucleótido sintético (5'CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA3', *GeneRacer Oligo*) foi ligado ao mRNA desfosforilado e desprovido de estrutura *cap*, numa reacção catalisada pela T4 RNA ligase (5 U/ μ l) que decorreu durante 1 h a 37 °C. Os 6 μ l da solução de RNA total, provenientes da reacção catalisada pela TAP, foram adicionados a 0,25 μ g de *GeneRacer Oligo* liofilizado, a mistura foi incubada 5 min a 70 °C e 2 min em gelo. Em seguida, foi adicionado 1 μ l de *RNase Inhibitor* (10 U/ μ l), 1 μ l de tampão da ligase 10 vezes concentrado [Tris-Acetato (330 mM, pH 7,8), AcK (660 mM), AcMg (100 mM), DTT (5 mM)], 1 μ l de ATP (10 mM), 1 μ l da T4 RNA ligase e a solução foi incubada a 37 °C durante 1 h. O RNA total foi purificado e precipitado, como descrito anteriormente e dissolvido em 13 μ l de água DEPC.

A síntese do cDNA foi catalisada pela AMV (*Avian Myeloblastosis Vírus Reverse Transcriptase*) e teve início no GeneRacer Oligo dT (5' GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGT₁₈ 3'). Aos 13 μ l da solução de RNA foi adicionado 1 μ l de *GeneRacer Oligo* dT (24,1 μ M). A solução foi incubada a 70 °C durante 5 min para desfazer a estrutura secundária do mRNA e em seguida, foi colocada em gelo durante 2 min. Adicionaram-se, de imediato, 1 μ l de solução de dNTPs (25 mM cada), 2 μ l de *RNase Inhibitor* (10 U/ μ l), 2 μ l de tampão da AMV 10 vezes concentrado [Tris-HCl (250 mM, pH 8,3), MgCl₂ (50 mM), KCl (500 mM), DTT (20 mM)], 1 μ l de AMV (5 U/ μ l) e a mistura foi incubada durante 1 h a 42 °C. A reacção terminou com a desnaturação da enzima a 85 °C, durante 15 min. O cDNA sintetizado foi usado em reacções de amplificação com o *primer* GeneRacer 5' (5' CGACTGGAGCACGAGGACACTGA 3') e com *primers* dirigidos para as sequências dos genes referidos no ponto II.3.3.3.1.. Realizaram-se reacções de reamplificação sempre que falhou a amplificação com estes primers. Para as reacções de reamplificação foram usados os *primers* específicos e o *primer* GeneRacer 5' Nested (5' GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA 3'). Nestas reacções, utilizou-se como cDNA, o produto da amplificação (5 μ l).

Os *primers* específicos denominaram-se C1SP3 (5'GCAGGAATGCGCGACATGG3'), C3SP1 (5'ATGTGAGCTATCTTGGACCA3'), C9SP2 (5'TCACAGCCCTCAACAGCAGA3'),

C36SP1 (5'CACATCCCCCATTTTCAACTT3'), PAP-1F (5'GAGTTTTGCATATCCATATC3'), PAL-C1 (5'GCTGCCTCAATTTGGCCAGG3'), CINAMIL-2 (5'CCTTGGGTGGGTTTGCCATCAGTGTAA3') e foram dirigidos para os fragmentos dos genes PDI, R, CAD1, RSH, POX, PAL e CAD2, respectivamente.

As reacções de amplificação e reamplificação foram realizadas nas mesmas condições das descritas no ponto II.3.3.3.1..

II.3.3.4. Clonagem dos produtos PCR no vector pCRII e determinação da sequência nucleotídica.

Os produtos das amplificações e reamplificações foram clonados no vector *PCRII* Topo do *kit Topo TA Cloning* (Invitrogen), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. A extracção rápida de plasmídeos dos clones das bactérias *Escherichia coli* (One Shot® TOP 10) transformadas foi realizada pelo método descrito por Zhou *et al.*, 1990. Escolheram-se 12 colónias de bactérias transformadas, inocularam-se 5 ml de meio Luria-Bertani [LB, triptona (10 g/L), extracto de levedura (5 g/L), NaCl (10 g/L)] com ampicilina (10 µg/ml) e incubaram-se a 37 °C, com agitação, durante 14 h. As células foram precipitadas a partir de 2 ml de inóculo, por centrifugação à velocidade máxima, numa microcentrifugadora, durante 30 s. O sobrenadante foi eliminado, mas conservaram-se 50-100 µl para ressuspender as células por agitação forte (*vortex*). Em seguida, adicionaram-se 300 µl de TENS [Tris-HCl (10 mM, pH 7,6), 1 mM EDTA, NaOH (0,1 M), SDS (0,5 %)] e agitou-se violentamente (*vortex*) durante alguns segundos. Após a lise celular, adicionaram-se 150 µl de AcNa (3,0 M; pH 5,2), agitou-se (*vortex*) e precipitaram-se os resíduos celulares e o DNA cromossómico das bactérias, por centrifugação à velocidade máxima, numa microcentrifugadora, durante 15 min. O sobrenadante foi recuperado e foram adicionados 900 µl de etanol absoluto gelado (-20 °C). O DNA plasmídico e o RNA foram precipitados por centrifugação à velocidade máxima, numa microcentrifugadora, durante 5 min. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol (70 %), seco por centrifugação sob vácuo e dissolvido em 50 µl de água. A digestão do RNA foi realizada pela adição de 1 µl de solução RNase (10 mg/ml) aos 50 µl da solução contendo os plasmídeos e a mistura foi incubada a 37 °C durante 30 min. A confirmação

da presença de cDNA exógeno nos plasmídeos foi obtida por digestão com *EcoRI*. Os plasmídeos (5 µl) foram digeridos com *EcoRI* (10 U), na presença de 1 µl de tampão da enzima 10 vezes concentrado e 3 µl de água. A reacção decorreu a 37 °C, durante 1 h (Miller, 1992).

Os insertos foram sequenciados e a sequência nucleotídica, determinada. As sequenciações de alguns fragmentos foram realizadas num sequenciador automático Perkin Elmer/Applied Biosystems Model ABI PRISM 377. As reacções de sequenciação foram preparadas com o *kit* ABI PRISM *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* e iniciadas com os *primers* universais M13 directo (5'GTAAAACGACGGCCAG3') e M13 reverso (5'CAGGAAACAGCTATGAC3'). Alguns fragmentos foram sequenciados pela firma Sistemas Genómicos com sede em Paterna, Valência (www.sistemasgenomicos.com).

As sequências nucleotídicas foram analisadas com o conjunto de programas de bioinformática incluído no GCG (*Genetics Computer Group*, University of Wisconsin, Madison, 1981), no EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) disponível através da Internet (www.ebi.ac.uk) e no Vector NTI 6 da InforMax, Inc. As sequências em aminoácidos, deduzidas das sequências de cDNA ou de DNA foram comparadas, através do programa pBLAST (Altschul *et al.*, 1997), com as sequências em aminoácidos presentes nas bases de dados Genpept, PIR e Swissprot. Os alinhamentos entre sequências em aminoácidos e entre sequências nucleotídicas, foram realizadas pelo programa CLUSTAL (Thompson *et al.*, 1994).

II.3.4. Construção de um banco genómico de *Q. suber*.

II.3.4.1. Introdução ao método.

O banco genómico de *Q. suber* foi construído no bacteriófago *Lambda*, possuidor do vector *Lambda FIX II* (λ -FIX II), que combina a possibilidade de inserção no vector, de fragmentos de DNA de grande tamanho (9-23 kb), por substituição, com a capacidade dos fagos recombinantes poderem crescer em estirpes lisogénicas *E. coli* spi^- (*Sensitive to P2 interference*). Neste sistema, a selecção dos fagos recombinantes é determinada pela ausência dos genes *red* e *gam*, que se encontram na porção de vector que foi substituído pelo fragmento de DNA genómico de *Q. suber*. O fenótipo $\text{red}^-/\text{gam}^-$ permite ao bacteriófago infectar as células *E. coli* e dar início ao ciclo lítico. A estirpe de células hospedeiras (XL1-Blue MRA (P2)) não possui os sistemas *mcr* e *mrr*, prevenindo o corte de DNA exógeno com bases metiladas (Sambrook e Russel, 2001).

As etapas envolvidas neste processo foram as seguintes:

- extracção de DNA genómico;
- digestão parcial com *Sau3AI* e preenchimento parcial das extremidades 3' dos fragmentos resultantes, com dATP e dGTP;
- separação dos fragmentos, por centrifugação, num gradiente de sacarose;
- ligação dos fragmentos de DNA ao vector λ -FIX II e encapsulamento;
- determinação do título do banco genómico;
- amplificação do banco genómico.

II.3.4.2. Extracção de DNA genómico.

Folhas jovens do sobreiro AS82SMS (1,0 g) foram maceradas num almofariz, na presença de azoto líquido, até serem reduzidas a um pó muito fino. O tecido celular macerado foi imediatamente transferido para um tubo de 15 ml. Adicionaram-se, em seguida, 10 ml do tampão de lise AP1 (*DNeasy Plant Maxi Kit*; Qiagen), pré-aquecido a

65 °C e 10 µl de solução de RNase (100 mg/ml). A mistura foi homogeneizada no agitador (*vortex*), durante alguns segundos e incubada a 65 °C, durante 20 min. No período de incubação os tubos foram agitados, por inversão, 3 vezes. Em seguida, foram adicionados 3,6 ml de tampão AP2 (DNeasy Plant Maxi Kit; Qiagen), a mistura foi agitada e incubada em gelo durante 10 min. O procedimento descrito permitiu romper e desorganizar, por meios mecânicos, o tecido celular, promoveu a lise celular e a digestão do RNA. As proteínas, os polissacarídeos e os restos de tecido celular foram precipitados por centrifugação a 2000 x g (centrifugadora Beckman GS-6R, rotor GH-3.8) durante 5 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado através duma coluna (*QIAshredder*, Qiagen), por centrifugação a 2000 x g (centrifugadora Beckman GS-6R, rotor GH-3.8), durante 5 min. A solução filtrada foi centrifugada a 3000 x g (Sorvall RC 26 Plus, rotor SS-34) durante 10 min. O DNA foi precipitado do sobrenadante por adição de 10 ml de isopropanol (100 %) e centrifugação a 3000 x g (Sorvall RC 26 Plus, rotor SS-34) durante 5 min. O sobrenadante foi rejeitado e os tubos foram invertidos em cima de papel absorvente. Ao precipitado foram adicionados 10 ml de uma solução de etanol 70 %, para lavagem do DNA, seguida de centrifugação nas condições descritas para a precipitação. Após a centrifugação, o sobrenadante foi rejeitado e o tubo com o precipitado foi deixado aberto à temperatura ambiente, durante 30 min. O DNA foi ressuspenso em 500 µl duma solução de hidratação fornecida com o *kit AquaPure Genomic DNA Isolation* (BIO-RAD) e os tubos foram agitados lentamente, durante 24 h, a 4 °C.

A partir de 1000 mg de tecido vegetal extraíram-se, em média, 2 mg de DNA que apresentaram valores de 1,8-1,9 para a razão das absorvências, medidas a 260 nm e a 280 nm, num espectrofotómetro. O DNA analisado por electroforese em gel de agarose 1 %, corado com brometo de etídio, na presença do marcador de massa molecular λ-E-H (Fermentas), apresenta tamanho superior a 22 kb.

II.3.4.3. Digestão parcial do DNA genómico com *Sau3AI*.

Na construção do banco genómico pretendeu-se inserir no vector de clonagem, um conjunto de fragmentos de DNA representativo de todo o genoma de *Q. suber*, que estivessem equitativamente representados. O DNA genómico foi digerido com *Sau3AI*

(4 U/ μ l, Biolabs) que reconhece a sequência GATC. Em média, uma sequência com quatro pares de bases repete-se em cada 265 pares de bases, num DNA com uma composição de 50 % G+C (Elgar, 1997). A probabilidade deste local de restrição não estar presente em segmentos de 20 kb é reduzida. A estratégia é fazer digestões parciais diferentes, representativas de todo o genoma e reunir as fracções antes da ligação ao vector.

Duas amostras de DNA genómico (60 μ g) foram digeridas, uma com 1 U e outra com 0,5 U de *Sau3AI*, num volume total de 400 μ l, na presença de 40 μ l de tampão 10 vezes concentrado (NaCl 1 M, Bis Tris Propane-HCl 100 mM, MgCl₂ 100 mM, ditiotretol 1 mM; pH 7), 4 μ l BSA (albumina de soro bovino, 100 μ g/ml), durante 30 min e 15 min, respectivamente. Em seguida, a enzima foi desnaturada, por incubação a 65 °C, durante 15 min (Elgar, 1997). O produto da digestão parcial foi analisado por electroforese em gel de agarose 0,5 % corado com brometo de etídio, na presença dos marcadores moleculares 1 kb (Gibco) e λ -E-H (Fermentas).

O DNA das amostras digeridas foi purificado e precipitado. Foi adicionado 1 v de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) às amostras, a mistura foi agitada e em seguida, centrifugada durante 5 min a 13000 rpm, numa microcentrifugadora de bancada. A fase aquosa foi recuperada para um novo tubo, ao qual se adicionou 1 v de éter dietílico. Após agitação da amostra, esta foi brevemente centrifugada para separação das fases. A fase superior foi rejeitada e o procedimento foi repetido mais duas vezes. Depois da última lavagem, os tubos foram deixados abertos na câmara de fluxo laminar, durante 15 min. O DNA foi precipitado por adição de 0,1 v AcNa (3M), 2,5 v de etanol (100 %), incubação a -80 °C durante 30 min e centrifugação a 13000 rpm numa microcentrifugadora, durante 15 min. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado foi lavado com 2 v de etanol 70 %. O DNA precipitado foi seco numa câmara de fluxo laminar, durante 10 min (Ausubel *et al.*, 1990).

II.3.4.4. Preenchimento parcial das extremidades 3' dos fragmentos digeridos.

O DNA genómico digerido e purificado foi ressuspendido em 50 μ l do tampão EcoPol 10 vezes concentrado (Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, ditiotretol 7,5 mM, pH 7,5) da enzima DNA polimerase I (fragmento *Klenow*, 5 U/ μ l, Biolabs). As

extremidades protuberantes que resultaram da digestão foram preenchidas com dATP (desoxiadenosina trifosfato) e dGTP (desoxiguanosina trifosfato). A adição destes nucleótidos impede a ligação entre os fragmentos de DNA que possuem extremidades complementares e cria extremidades compatíveis com as do vector λ -FIX II. A reacção foi catalisada pela DNA polimerase I (fragmento *Klenow*) (30 U), na presença de 1 μ l de dATP (100 mM), 1 μ l de dGTP (100 mM) e 50 μ l da solução do tampão EcoPol contendo o DNA digerido. A reacção decorreu num volume total de 500 μ l, durante 30 min a 25 °C. Para parar a reacção, adicionaram-se 40 μ l de uma solução de EDTA 250 mM. Os fragmentos de restrição foram separados dos desoxiribonucleótidos não incorporados, pelo método descrito para a purificação e precipitação do DNA, após a restrição enzimática com *Sau3AI*. O DNA precipitado foi ressuscitado em 25 μ l de tampão TE 0,1 vez concentrado (Sambrook e Russell, 2001).

II.3.4.5. Separação dos fragmentos de DNA por centrifugação num gradiente de sacarose.

O gradiente de sacarose permitiu separar os fragmentos de DNA que resultaram da digestão parcial em função do seu tamanho. Para criar o gradiente de sacarose foram preparadas duas soluções de sacarose, uma a 10 % e outra a 40 %, no tampão composto por NaCl 1 M, Tris-HCl 20 mM pH 8 e EDTA 5 mM. As soluções foram filtradas através de uma membrana de acetato de celulose (30 mm, 0,2 μ m; *Orange Scientific*) e foram colocadas, em seguida, num sistema de vasos comunicantes com ligação a uma bomba peristáltica. Após a colocação de um agitador magnético na solução mais concentrada, foi aberta a válvula de comunicação entre os dois recipientes para permitir que as soluções se misturassem suavemente. A bomba peristáltica funcionou a um débito de 30 μ l/s e permitiu o enchimento lento de tubos de ultracentrifugação (Beckman, *ultra-clear centrifuge tubes*, 14 x 89 mm, #344059), com o gradiente de sacarose (10-40 % wt/v) (Ausubel *et al.*, 1990).

Adicionaram-se 50 μ l de solução de sacarose 10 % a cada uma das amostras de DNA digerido e tratado com a DNA polimerase I, e colocaram-se as amostras, cuidadosamente, na superfície do gradiente de sacarose. As amostras foram

centrifugadas a 22000 rpm, a 15 °C, numa ultracentrifugadora Beckman Óptima XL-100 K, rotor SW 41 TI, durante 22 h.

Após a ultracentrifugação, recolheram-se 60 fracções de 200 µl de cada uma das amostras para uma placa multipos (Microtest U-Botton, polystyrene, #351177), através dum tubo capilar (Blaubrand, #708733) que foi adaptado ao tubo da bomba peristáltica. De cada uma das fracções foi retirada uma alíquota (10 µl) para analisar por electroforese em gel de agarose 0,5 %, corado com brometo de etídio. Cinco fracções da amostra 1 e quatro fracções da amostra 2 foram escolhidas, misturadas e purificadas. Adicionaram-se 0,06 v de AcNa (5 M) e 0,6 v isopropanol à amostra que foi colocada a -20 °C, durante 16 h. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 4 °C, a 13000 rpm, durante 15 min, numa microcentrifugadora. O sobrenadante foi rejeitado e o precipitado foi lavado com 2 v etanol 70 % e seco durante 15 min numa câmara de fluxo laminar.

II.3.4.6. Ligação dos fragmentos de DNA ao vector *Lambda* FIX II e encapsulamento.

O vector Lambda FIX II (Stratagene) é fornecido com estrutura linear e com extremidades protuberantes em 5' (TCGA), preenchidas com dTTP (desoxitimidina trifosfato) e dCTP (desoxicitosina trifosfato), que resultam da digestão com *Xho* I. As extremidades do vector são, portanto, complementares das extremidades dos fragmentos de DNA digeridos com *Sau*3AI e preenchidos com dATP e dGTP.

O DNA precipitado na etapa anterior foi ressuscitado em 1 µl (1 µg) de vector, 0,5 µl de tampão de ligação 10 vezes concentrado (Tris-HCl 500 mM, MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM, ATP 10 mM, BSA 250 µg/ml, pH 7,5), 1 µl de T4 DNA ligase (200 U/µl, Biolabs) e 2,5 µl de água. A reacção de ligação decorreu a 4 °C, durante 24 h.

O encapsulamento do DNA dos fagos recombinantes foi efectuado com *Gigapack III XL Packaging Extract* (Stratagene). Adicionaram-se 3 µl da reacção de ligação ao extracto de encapsulamento e a solução foi incubada a 25 °C, durante 2 h. Em seguida, adicionaram-se 500 µl de tampão SM [(5,8 g de NaCl, 2 g de MgSO₄.7H₂O, 50 ml de Tris-HCl (1 M, pH 7,5), 5 ml de solução de gelatina 2 % (w/v))/1 L] e 20 µl de clorofórmio. A solução foi invertida várias vezes e depois, centrifugada durante alguns

segundos para sedimentação dos resíduos celulares. O sobrenadante com o banco de fagos recombinantes foi recuperado e guardado a 4 °C, até determinação do título.

II.3.4.7. Determinação do título do banco genómico de *Q. suber*.

Prepararam-se culturas bacterianas (5 ml) da estirpe (XL1-Blue MRA (P2)), a partir de colónias singulares, cultivadas em meio de ágar NZY [(5 g NaCl, 2 g de MgSO₄.7H₂O, 5 g de extracto de levedura, 10 g de hidrolisado de caseína, 15 g de ágar)/L; pH ajustado a 7,5 com NaOH].

Meio LB [(10 g de NaCl, 10 g de triptona, 5 g extracto de levedura)/L; pH ajustado a 7 com NaOH] com suplemento de maltose (0,2 %, w/v) e MgSO₄ (10 mM) foi inoculado com uma colónia da estirpe XL1-Blue MRA (P2) e o crescimento decorreu durante 5 h a 37 °C, com agitação, não atingindo as soluções do inóculo, valores superiores a 1, para a densidade óptica a 600 nm (D.O.₆₀₀). Após o período de incubação, as bactérias foram precipitadas a 500 x g, durante 10 min, numa centrifugadora Beckman GS-6R, rotor GH-3,8. Em seguida, foram ressuspensas em 5 ml de uma solução MgSO₄ (10 mM) e a D.O.₆₀₀ foi ajustada a 0,5 com a mesma solução (Sambrook e Russell, 2001).

Aliquotas do banco de fagos recombinantes, de 0,1-1 µl, foram adicionadas a 200 µl da solução de células e a mistura foi incubada a 37 °C, durante 15 min, para permitir que os fagos aderissem às células. Após a incubação, adicionaram-se às células 3 ml de NZY Top ágar (meio NZY líquido com agarose 0,7 %) previamente aquecido a 48 °C. Agitou-se a mistura e fez-se escorrer pela superfície de placas com meio sólido LB, previamente aquecidas a 37 °C.

As placas foram incubadas a 37 °C durante 10 h e o número de placas formado por ml (pfu/ml) foi determinado. O título do banco genómico de *Q. suber* foi de 9,5 x 10⁵ fagos recombinantes, antes de ser amplificado (Sambrook e Russell, 2001).

O número de clones que seria necessário produzir para permitir que todo o genoma de *Q. suber* estivesse representado no banco genómico, foi determinado com recurso à fórmula $N = \ln(1-p) / \ln(1-x/y)$ em que N é o número de clones, p representa a probabilidade de uma determinada sequência estar representada no banco genómico, inserida num fragmento com um tamanho médio x, e y corresponde ao tamanho do

genoma (Clarke e Carbon, 1976). Se os clones tiverem fragmentos com um tamanho médio de 15 kb e estimando que o tamanho do genoma de *Q. suber* é de 8×10^8 pb, necessitamos de 245000 clones independentes para encontrar uma sequência qualquer representada no banco genómico, com uma probabilidade de 99 % (Zoldos *et al.*, 1998; Liu, 1997).

Com recurso à mesma fórmula, utilizando o valor do título determinado, verificámos que a probabilidade de encontrar uma sequência qualquer no banco genómico de *Q. suber* é de 83 % (Clarke e Carbon, 1976).

II.3.4.8. Amplificação do banco genómico de *Q. suber*.

Para amplificar o banco genómico de *Q. suber*, repartiram-se os 500 µl da solução de fagos recombinantes em 9 fracções e prepararam-se inóculos bacterianos de *E. coli* da estirpe XL1-Blue MRA (P2), tal como foi descrito para a determinação do título. Cada uma das fracções foi adicionada a 600 µl da solução de células e a mistura foi incubada a 37 °C, durante 15 min. Em seguida, adicionaram-se 6,5 ml de meio NZY Top ágar (48 °C) e a mistura foi colocada em placas (Ø 150 mm) com meio LB sólido. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 7 h. Após o período de incubação cobriu-se a superfície das placas com 10 ml de tampão SM e colocaram-se as placas a 4 °C, durante toda a noite, com agitação muito suave. A suspensão de bacteriófagos de cada uma das placas foi recuperada e guardada. Para evitar infecções bacterianas adicionou-se clorofórmio (5 % v/v) à suspensão dos fagos, agitou-se a solução e centrifugou-se 10 min a 500 x g. Recuperou-se o sobrenadante, adicionou-se clorofórmio (0,3 % v/v) e depois armazenou-se a 4 °C (Sambrook e Russell, 2001).

O título do banco genómico de *Q. suber* amplificado foi determinado seguindo o procedimento descrito anteriormente. O banco genómico, depois de amplificado, possuía 3×10^8 fagos recombinantes/ml.

II.3.4.9. Pesquisa de sequências nucleotídicas no banco genómico de *Q. suber*.

Pesquisaram-se no banco genómico, as sequências nucleotídicas completas dos genes PDI, R, CAD1, CAD2, PAL, POX e CAD2.

Para pesquisar as sequências pretendidas no banco genómico foram utilizados métodos de hibridação não radioactivos que envolveram as etapas seguintes:

- plaqueamento de fracções representativas do banco genómico e transferência para membrana;
- marcação das sondas com digoxigenina;
- hibridação do DNA dos bacteriófagos com as sondas marcadas;
- detecção e isolamento de clones de fagos recombinantes que hibridam com as sondas (clones positivos);
- síntese da sonda por amplificação a partir do DNA dos clones dos fagos recombinantes positivos.

II.3.4.9.1. *Plaqueamento de fracções representativas do banco genómico e transferência para membrana.*

Prepararam-se fracções representativas do banco genómico por diluição da suspensão de fagos em tampão SM de modo a obter, após infecção das bactérias e plaqueamento, 50 000 ou 10000 placas de lise por placa de crescimento, de acordo com o título calculado para o banco genómico, após amplificação. A infecção e o plaqueamento foram efectuados pelo procedimento descrito na amplificação do banco genómico. Após 8 h de incubação a 37 °C, as placas de crescimento foram colocadas a 4 °C, durante 16 h (Elgar, 1997).

Os bacteriófagos das placas de lise foram transferidos para membranas de *nylon* carregadas positivamente em ambas as faces (Hybond™-N+, Amersham). As membranas foram recortadas em círculos com a mesma área das placas de crescimento e foram colocadas directamente em contacto com a superfície das placas de lise durante 2 min. A transferência foi efectuada em duplicado, mantendo-se a segunda membrana 4 min em contacto com a superfície da placa. Para orientação das membranas com as placas de

crescimento e posterior identificação das placas de lise, as membranas foram perfuradas assimetricamente com a ajuda de uma agulha esterilizada e a localização dos furos foi assinalada nas placas. A face das membranas em contacto com as placas de lise foi assinalada a lápis. As membranas, com o DNA voltado para cima, foram transferidas para a superfície de uma folha de papel de cromatografia (Whatman 3-MM) embebido em solução desnaturante (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M) durante 7 min. Em seguida, as membranas foram transferidas para papel *Whatman* embebido numa solução de neutralização (NaCl 1,5 M; Tris-HCl 0,5 M, pH 7,2; EDTA 0,001 M) durante 3 min. Este procedimento repetiu-se uma vez com solução nova de neutralização. As membranas foram lavadas durante 30 s numa solução duas vezes concentrada de SSC (NaCl 3 M; Na₃citrato 0,3 M) ou SSPE (NaCl 3,6 M; fosfato de sódio 0,2 M; EDTA 0,02 M, pH 7,7) e foram colocadas a secar na superfície de papel *Whatman* (Reed e Mann 1985).

A fixação do DNA dos bacteriófagos à membrana foi efectuada por colocação das membranas num *UV Stratalinker* (Bio-Rad) durante 30 s a 120 mJ.

II.3.4.9.2. Marcação das sondas com digoxigenina.

As sequências nucleotídicas das sondas foram definidas a partir das sequências dos fragmentos de cDNA obtidos por cDNA-AFLP, denominados C1-RAI, C3-RAI, e C36-T6I₁ (II.3.1) e também, das sequências obtidas por amplificação com os *primers* de sequência heterogénea relativas aos genes *PAL*, *CAD* e *POX* (II.3.2). A marcação das sondas foi realizada com o *kit* PCR DIG Probe Synthesis (Roche; Roche, 2000) (Dennis *et al.*, 1990; Emanuel, 1991). O DNA alvo nas reacções de amplificação foi o DNA genómico da amostra AS82SMS ou o DNA dos plasmídeos recombinantes que possuíam os insertos das sequências identificadas por cDNA-AFLP. Nos casos em que a região abrangida pela sonda não é interrompida por intrões as reacções de marcação foram efectuada a partir do DNA dos plasmídeos que possuíam a sequência de cDNA clonada.

As reacções de amplificação para marcação com digoxigenina foram realizadas num volume total de 50 µl, na presença de 5 µl de tampão 10 vezes concentrado (Tris-HCl 200 mM, pH 7,5; KCl 1 M; MgCl₂ 15 mM DTT 10 mM; EDTA 1 mM; Tween 20,

1 % v/v; Nonidet P40 1 % v/v), 2,5 µl de *PCR Dig probe synthesis mix* 10 vezes concentrado (dATP, dCTP e dGTP 2 mM cada; dTTP 1,3 mM; DIG-11-dUTP 0,7 mM), 2,5 µl de uma mistura de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 2 mM cada), 2 µl de cada um dos *primers* específicos (10 mM), 2 µl de DNA genómico (30 ng/ µl) ou 1 µl de DNA plasmídico (1 ng/ µl) e 0,75 µl da enzima *Expand High Fidelity* (3,5 U/ µl). A reacção de amplificação decorreu durante 2 min a 95 °C; (30 s a 95 °C; 30 s a 50 °C; 40 s a 72 °C) 29 vezes; 7 min a 72 °C. Os controlos positivos das reacções de marcação foram realizados com os mesmos reagentes e nas mesmas condições, com excepção para a adição de 2,5 µl de *PCR Dig probe synthesis mix* que foi substituída pela adição de 2,5 µl da mistura de dNTPs. Na tabela 11 estão referidos alguns aspectos relacionados com as sondas tais como, o gene a que são dirigidas, a sequência dos *primers* usados na amplificação para marcação com digoxigenina e o tamanho em pares de bases.

Os produtos de amplificação das reacções de marcação (10 µl) foram analisados por electroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio. A migração em gel de agarose permitiu confirmar o tamanho dos fragmentos amplificados, assim como a incorporação de DIG-11-dUTP. Os fragmentos que incorporam digoxigenina, normalmente 1 molécula em cada 25 nucleótidos, adquirem uma massa molecular superior à dos fragmentos que incorporam a timidina não modificada (Seibl *et al.*, 1990).

Tabela 11. Aspectos relacionados com as sondas usadas para escrutinar o banco genómico.

Gene alvo	Sequências dos <i>primers</i> (5' → 3') usados na amplificação das sondas	Tamanho da sonda (pb)
<i>PDI</i>	C1SP4: GAGAAGCTTGCTGAGCTTGC C1SP1: GTCACCTGAGATGAATATGAT	417
<i>R</i>	C3SP4: CTTACCAAGGAGGGACTGCC C3SP1: ATGTGAGCTATCTTGGACCA	116
<i>RSH</i>	C36SP4: GCCACACTGTGCCAGGATGG C36SP1: CACATCCCCCATTTTCAACTT	669
<i>PAL</i>	PAL-1R: CAAGGTTACTCAGGCATCAG PAL-1F: CCATTATAGCTGCTGCCTC	460
<i>CAD2</i>	PCAD-1R: CATGCAACTAAAACACACC PCAD-1F: GAGTTTTGCATATCCATATC	630
<i>POX</i>	PAP-1R: GGCAAGCAAGGTGTACAG PAP-1F: CGTTGACAAAGTCAGAATAG	290

II.3.4.9.3. Hibridação do DNA dos bacteriófagos com as sondas marcadas.

As membranas com o DNA fixado foram incubadas com as sondas desnaturadas, em condições que permitissem a hibridação específica da sonda com o DNA dos clones do banco genómico de *Q. suber*.

A temperatura de hibridação (T_{hib}) foi determinada através da fórmula $T_{hib} = T_m - (20\text{ }^{\circ}\text{C a } 25\text{ }^{\circ}\text{C})$, na qual T_m é a temperatura de dissociação do híbrido. Esta temperatura (T_m) foi calculada pela fórmula $T_m = 49,82 + 0,41 [\%(\text{G+C})] - (600/L)$ na qual, a percentagem de GC corresponde ao conteúdo de guanosinas e citosinas da sonda e L é o tamanho da sonda em pares de bases. Estes cálculos pressupõem que a solução de hibridação a usar seja o *DIG Easy Hybridization buffer* (Roche) e determinam que possam ocorrer desajustes até 18 % nos valores calculados para T_{hib} (Roche, 2000).

As membranas foram, inicialmente, colocadas a pré-hibridar em caixas de *Petri* com tampão de hibridação *DIG Easy Hybridization buffer* (Roche), pré-aquecido a 42 °C. A pré-hibridação decorreu a 42 °C, com agitação suave, durante 30 min. Durante a pré-hibridação, a sonda foi preparada por adição de 6 µl de produto da amplificação a 50 µl de água e incubação a 100 °C, durante 5 min. Depois de desnaturada, a sonda foi conservada em gelo até utilização. Após a pré-hibridação, a solução de hibridação foi substituída por uma nova, composta pelo *DIG Easy Hybridization buffer* (15 ml/membrana) e pela sonda desnaturada (6 µl de produto da amplificação/15 ml de tampão; 25 ng/ml). As membranas foram incubadas durante 16 h com agitação suave, a 42 °C (Roche, 2000).

O folheto fornecido pela Roche não refere a constituição do *DIG Easy Hybridization buffer*. Em alternativa, poderá ser usada a solução de hibridação composta por 5xSSC, SDS (0,5 %), *N-lauroylsarcosine* (0,1 %), *blocking reagent* (1 %) (Roche) e *denatured herring sperm DNA* (200 µg/ml) (Leroy, P. *et al.*, 1997).

II.3.4.9.4. *Deteccção e isolamento de clones de fagos recombinantes que hibridaram com as sondas (clones positivos).*

A deteção dos clones de fagos recombinantes que hibridaram com a sonda foi feita com o kit *Dig Luminescent Detection* (Roche) (Holtke *et al.*, 1995). Neste sistema, as sondas que hibridam são detectadas com recurso a anticorpos anti-digoxigenina (fragmentos Fab) que estão conjugados com uma fosfatase alcalina. O substrato quimioluminescente CSPD (5-cloro-adamantil-1,2- dioxetano fosfato), ao ser desfosforilado pela fosfatase alcalina, emite luz de 477 nm a 466 nm, que impressiona as películas autorradiográficas.

Após a hibridação, as membranas foram lavadas com tampões que preservam os híbridos de ácidos nucleicos e que promovem a dissociação das sondas hibridadas de forma não específica. As membranas foram colocadas no tampão *Low Stringency* [SSC 2 vezes concentrado (NaCl 3 M; Na₃citrato 0,3 M); SDS (0,1 %); Roche] durante 5 min, com agitação, a 25 °C. Este procedimento foi repetido com substituição do tampão. Em seguida, as membranas foram transferidas para o tampão *High Stringency* [(SSC 0,5 vezes concentrado, SDS (0,1 %); Roche], pré-aquecido a 60 °C, e foram aquecidas durante 15 min, com agitação, a 60 °C (Roche, 2000).

A deteção dos híbridos de ácidos nucleicos iniciou-se com a colocação das membranas no tampão de lavagem [(*Washing buffer*³: ácido maleico (0,1 M), NaCl (0,15 M), Tween 20 (0,3 % V/V), pH 7,5], durante 2 min, com agitação, a 25 °C. Em seguida, as membranas foram transferidas, durante 30 min com agitação, para a *Blocking Solution*³ (150 ml/membrana) [*Blocking Solution: blocking reagent* (1 %) dissolvida em tampão de ácido maleico (ácido maleico 0,01 M; NaCl 0,15 M; pH 7,5, ajustado com NaOH)]. A ligação ao anticorpo foi efectuada pela colocação das membranas na solução de anticorpo (30 ml/membrana) (solução de anticorpo: 25 µl anti-dig-AP/250 ml *Blocking Solution*), durante 30 min, com agitação. O excesso de anticorpo foi retirado colocando as membranas em tampão de lavagem (*Washing buffer*) durante 15 min, com agitação. O procedimento repetiu-se novamente, com substituição do tampão de lavagem. Depois das lavagens, as membranas foram equilibradas durante 3 min, em tampão de deteção³ (20 ml/membrana) (*Detection buffer: Tris-HCl* 0,01 M,

³ Estes tampões estão incluídos no *Dig Wash and Block Buffer Set* comercializado pela Roche.

NaCl 0,01 M, pH 9,5). Em seguida, as membranas foram transferidas para sacos de plástico transparentes e o substrato quimioluminescente CSPD (1,5 ml/membrana) (300 µl CSPD/30 ml tampão detecção) foi aplicado directamente em cima das membranas. O excesso de líquido foi removido por compressão das faces das pastas sobre as membranas, evitando a formação de bolhas de ar. As pastas foram seladas e foram colocadas a 37 °C, durante 5 min, para activação do CSPD. Passado esse período, as membranas foram colocadas em contacto com películas autorradiográficas e a revelação das películas foi efectuada após 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 1 h 30 m de exposição (Roche, 2000).

II.3.4.9.5. *Síntese da sonda por amplificação a partir do DNA dos clones dos fagos recombinantes positivos.*

As películas autorradiográficas foram alinhadas com as placas originais e no local do clone positivo, recortou-se o ágar e colocou-se em 1 ml de tampão SM. A mistura foi agitada suavemente, durante 16 h, a 4 °C, para permitir a difusão dos bacteriófagos do ágar para o tampão. Em seguida, a mistura foi brevemente centrifugada, o sobrenadante foi recuperado, foi adicionada uma gota de clorofórmio e a mistura colocada a 4 °C. Retiraram-se 10 µl da suspensão dos bacteriófagos dos clones positivos, adicionaram-se 90 µl de água e incubou-se a solução a 100 °C, durante 10 min, para libertação do DNA do bacteriófago. Dez microlitros desta solução foram utilizados em reacções de amplificação com os *primers* usados na preparação das sondas. As condições de amplificação foram idênticas às usadas na marcação das sondas. Os produtos das amplificações foram separados por electroforese em gel de agarose, e visualizados com brometo de etídio. Os clones foram considerados positivos sempre que o produto amplificado possuía o mesmo tamanho da sonda usada.

Para isolar os clones positivos de bacteriófagos recombinantes, foi necessário fazer 4 ciclos de infecção, transferência para membrana, hibridação e detecção. Em cada novo ciclo utilizaram-se, como bacteriófagos para infectar as células, as suspensões (1 µl) obtidas por difusão do ágar da porção que continha o clone positivo.

II.3.4.10. Extração do DNA do bacteriófago λ .

O DNA do bacteriófago λ foi extraído de culturas líquidas (10 ml) de *E. coli* infectadas com os bacteriófagos dos clones positivos. Prepararam-se culturas líquidas de *E. coli* da estirpe XL1-Blue MRA (P2) por inoculação de meio LB (5 ml) com uma colónia da bactéria e incubação, durante 16 h, com agitação forte (300 ciclos/min). Com um palito de madeira esterilizado retirou-se da placa de crescimento, a placa de lise correspondente ao clone positivo do bacteriófago recombinante e colocou-se em 400 μ l de tampão SM. A mistura foi agitada durante 2 h, a 4 °C, para permitir a difusão dos bacteriófagos e em seguida, retiraram-se 100 μ l da suspensão de bacteriófagos e adicionaram-se a 100 μ l da cultura de bactérias hospedeiras, cultivadas até à saturação. A cultura infectada foi colocada a 37 °C, durante 15 min e depois foi transferida para 10 ml de meio LB, previamente aquecido a 37 °C. O crescimento das bactérias decorreu durante 8-12 h com agitação forte. Após a lise celular adicionaram-se 100 μ l de cloróformio e manteve-se a incubação durante 15 min, a 37 °C. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 4000 x g (Sorvall RC 26 plus, rotor SS-34) durante 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado, foram adicionados 50 μ l de cloróformio e a reserva de bacteriófagos foi armazenada a 4 °C (Sambrook e Russel, 2001).

O DNA dos bacteriófagos dos clones positivos identificados por hibridação foi extraído com recurso ao *kit* Lambda (Qiagen), com algumas alterações ao protocolo fornecido pelo fabricante (Elgar e Brenner, 1992). Adicionaram-se 30 μ l de tampão L1 [NaCl (300 mM), Tris-HCl (100 mM, pH 7,5), EDTA (10 mM), BSA (0,2 mg/ml), RNase A (20 mg/ml), DNase I (6 mg/ml); Qiagen] a 10 ml de solução de bacteriófagos e a solução foi incubada a 37 °C, durante 30 min. Em seguida, foram adicionados 2 ml de tampão L2 [polietileno glicol PEG 6000 (30 %), NaCl (3 M)], a mistura foi agitada e incubada em gelo, durante 30 min, à qual se seguiu uma centrifugação a 10 000 x g durante 10 min. O precipitado foi recuperado e dissolvido em 1 ml de tampão L3 [NaCl (100 mM), Tris-HCl (100 mM, pH 7,5), EDTA (25 mM)]. Adicionou-se 1 ml de tampão L4 [SDS (4%)] e incubou-se a 70 °C, durante 10 min. O tampão L4 promove a desnaturação das proteínas dos bacteriófagos e liberta o DNA. A precipitação dos complexos proteínas-SDS formados foi realizada pela adição de 1 ml do tampão L5 [AcK (3 M, pH 5.5), seguida de centrifugação durante 30 min, a 15 000 x g, a 4°C. O

sobrenadante foi recuperado e submetido a nova centrifugação durante 10 min, a 15 000 x g, a 4 °C. O DNA foi precipitado pela adição de 1 ml de isopropanol, ao que se seguiu uma centrifugação durante 30 min, a 15 000 x g, a 4°C. Por último, o DNA foi lavado com 1 ml de etanol 70 % e centrifugado durante 10 min, nas mesmas condições da precipitação. O precipitado foi seco durante 10 min numa câmara de fluxo laminar e em seguida, foi dissolvido em 100 µl de TE 0,1 vez concentrado. O DNA do bacteriófago λ, depois de extraído, foi analisado por electroforese em gel de agarose 1 %, corado com brometo de etídio e também por espectrofotometria a 260/280 nm.

II.3.4.11. Digestão do DNA do bacteriófago λ com *Not* I.

O vector *Lambda FIX II* original é constituído, numa das extremidades, por um fragmento nucleotídico com 9 kb (*right arm*), por um fragmento central, que pode ser substituído por DNA exógeno, com 14 kb (*stuffer fragment*) e por um fragmento com 20 kb (*left arm*) na extremidade oposta. As regiões que enquadram o DNA exógeno possuem as sequências dos promotores T3 e T7 e locais de restrição para inúmeras enzimas (Mcs: *multiple cloning site*). A digestão com *Not* I permite isolar, em bloco, o fragmento de DNA exógeno (9-23 kb), acompanhado das regiões dos promotores T3 e T7 do vector λ *FIX II*, a não ser que a sequência reconhecida pela *Not* I (GC/GGCC) exista no interior do DNA exógeno (Sambrook e Russel, 2001).

O DNA (2 µg) dos clones positivos reconhecidos pelas sondas dirigidas para POX, PDI e RSH foi digerido com *Not* I (10 U), num volume total de 40 µl, na presença de 4 µl de tampão 10 vezes concentrado [NaCl (1 M), Tris-HCl (500 mM), MgCl₂ (100 mM), DTT (1 mM), pH 7,9] e 0,5 µl de BSA (10 mg/ml). A digestão decorreu a 37 °C, durante 3 h. O produto da digestão foi analisado por electroforese em gel de agarose 1 %, corado com brometo de etídio. Foram utilizados os marcadores de massa molecular 1 kb (Gibco) e λ-E-H (Fermentas).

II.3.4.12. Amplificação com *primers* específicos e *primers* T3 ou T7.

Os produtos das digestões com *Not* I foram usados como DNA alvo, em reacções de amplificação com os *primers* T3 e T7, que hibridam com as regiões que flanqueiam o fragmento de DNA de *Q. suber*, e com *primers* que hibridam no interior do fragmento. O tamanho dos fragmentos produzidos nestas reacções permite saber a que distância das extremidades se encontra a sequência reconhecida pela sonda. Desta forma é possível prever se o gene reconhecido pela sonda está completo ou se é uma sequência parcial, para além da orientação do DNA exógeno, no vector.

As reacções de amplificação de fragmentos entre 3 kb e 10 000 kb decorreram num volume total de 50 µl, na presença de 8 µl de dNTPs (2 mM), 1 µl do *primer* T3 (10 µM; 5' ATTAACCCTCACTAAAGGGA 3') ou 1 µl do *primer* T7 (10 µM; 5'TAATACGACTCACTATAGGG 3'), 5 µl de tampão 10 vezes concentrado [Tris-HCl (200 mM, pH 7,5), KCl (1 M), DTT (10 mM), EDTA (1 M), Tween 20 (5 % V/V), Nonidet P40 (5 % V/V), MgCl₂ (17,5 mM)], 1 µl do *primer* específico (10 µM; PAP-1R ou PAP-1F; C1SP4 ou C1SP1; C36SP4 ou C36SP1; Tabela 11), 2 µl de DNA dos bacteriófagos digeridos com *Not* I (50 ng/ µl) e 0,75 µl de *Expand Long Template* (3,5 U/ µl, Roche). O programa usado consistiu em: 1 ciclo (2 min a 94 °C); 9 ciclos (10 s a 94 °C, 30 s a 50 °C, 15 min a 68 °C); 14 ciclos [(10 s a 94 °C; 30 s a 50 °C; 15 min a 68 °C (com alongação de 20 s em cada ciclo)]; 1 ciclo (7 min a 68 °C).

Contudo, nem todos os clones que hibridaram com as sondas, foram isolados, como por exemplo, o clone reconhecido pela sonda dirigida ao gene de resistência (*R*). Para recuperar o fragmento desse clone realizaram-se reacções de amplificação em que o DNA alvo era constituído por suspensões de bacteriófagos de vários clones diferentes. Retiraram-se 10 µl das suspensões de bacteriófagos, adicionaram-se 50 µl de água e incubou-se a solução a 100 °C, durante 10 min. Cinco microlitros (5 µl) desta solução foram usados como DNA alvo em reacções de amplificação que decorreram nas condições descritas para o DNA dos bacteriófagos digeridos. Usaram-se os *primers* específicos C3SP1 e C3SP4 e os *primers* T3 e T7.

II.3.4.13. Sequenciação e análise das sequências nucleotídicas dos clones positivos.

Todos os produtos amplificados foram clonados no vector pCRII *Topo* (Invitrogen) e sequenciados pela firma Sistemas Genómicos, com sede em Paterna, Valência (www.sistemasgenomicos.com). A sequenciação iniciou-se nos *primers* específicos que tinham sido usados para a produção das sondas e foi dirigida nos dois sentidos, com determinação da sequência nucleotídica da sonda e das regiões a jusante e a montante.

As sequências nucleotídicas foram analisadas com o conjunto de programas de bioinformática incluído no GCG (*Genetics Computer Group*, University of Wisconsin, Madison, 1981), no EMBL-EBI (*European Bioinformatics Institute*), disponível através da Internet (www.ebi.ac.uk) e no Vector NTI 6 da InforMax, Inc.

II.3.5. Análise semi-quantitativa por RT-PCR e hibridação.

II.3.5.1. Amostras de raízes de *Q. suber*.

Sementes de sobreiro (landes), colhidas durante os meses de Outubro e Novembro, foram desinfectadas por imersão numa solução com lixívia (5 %) e detergente (1 gota/1 L água). Em seguida, foram colocadas a germinar em copos com uma mistura de vermiculite, areão e *leka*. Após 4 a 5 semanas, a raiz principal media, em média, 8-10 cm. As landes germinadas foram separadas da mistura de suporte, foram lavadas com água destilada e separadas em dois grupos (I e II).

As raízes das landes do grupo I foram cortadas e congeladas a – 80 °C.

As landes do grupo II foram transferidas para caixas de *Petri* e as raízes foram colocadas em contacto com tiras de ágar contendo micélio de *P. cinnamomi*. O conjunto foi coberto com papel de alumínio para evitar a evaporação e foi colocado numa estufa a 25 °C, durante 24 h. Em seguida, retiraram-se as tiras de ágar, cortaram-se as raízes e congelaram-se a – 80 °C.

II.3.5.2. Extracção de RNA total e síntese de cDNA *in vitro*.

O RNA total foi extraído a partir de 50 mg de tecido vegetal (raízes) com o *kit* RNeasy (Qiagen). O RNA total foi tratado com 2 µl DNase I (1 U/µl; Gibco) na presença de 2 µl de RNaseOUT (40 U/µl; Gibco) e 10 µl de tampão da DNase (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 20 mM MgCl₂; 500 mM KCl; Gibco). A reacção decorreu num volume total de 100 µl, durante 30 min, a 37 °C. Depois da digestão do DNA, o RNA total foi purificado com o *kit* RNeasy (Qiagen).

O cDNA foi sintetizado pela *Superscript*TM II RNase H⁻ transcriptase reversa (Gibco), a partir de 2 µg de RNA total na presença de um oligonucleótido (Oligo-dT) com 18 timidinas e uma sequência de bases conhecida (5'GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGT₁₈3'). Ao RNA total adicionaram-se inicialmente 1 µl de oligo-dT (37,5 µM), 2 µl de dNTPs (10 mM) e água, até perfazer um volume de 31 µl. A mistura foi aquecida a 65 °C, durante 5 min, e arrefecida em gelo, durante 2 min. Em seguida, adicionaram-se 4 µl de tampão 5 vezes concentrado [*First Strand Buffer*: Tris-HCl (250 mM, pH 8.3), KCl (375 mM), MgCl₂ (15 mM)], 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNaseOUT (40 U/µl), 2 µl de *Superscript* (200 U/µl) e a reacção decorreu durante 1 h a 42 °C. Por fim, a enzima foi desnaturada por aquecimento a 70 °C, durante 15 min. Depois do cDNA sintetizado, adicionou-se 1 µl de RNase H, a ribonuclease que degrada a cadeia de RNA dos híbridos RNA x DNA que se formam depois da síntese. A reacção decorreu a 37 °C, durante 20 min.

II.3.5.3. Amplificação do cDNA sintetizado *in vitro*.

Retiraram-se 2 µl da solução cDNA sintetizado a partir de RNA total de raízes de sobreiro infectadas (Grupo II) e não infectadas (Grupo I) com *P. cinnamomi* e fizeram-se diluições de 1:50, 1:100 e 1:200.

Realizaram-se reacções de amplificação, para cada uma das diluições, com o *primer* GR3' (GR3'; 5'GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG3') que se hibrida com a região de bases de sequência conhecida do oligo-dT e com um *primer* que reconhece o cDNA dos genes que codificam uma PDI (*protein disulphide isomerase*), uma proteína

de resistência (R), uma cinamil álcool desidrogenase 1 (CAD1), uma cinamil álcool desidrogenase 2 (CAD2), uma peroxidase (POX), uma fenilalanina amónia liase (PAL) e uma RSH (proteína tipo RelA/SpoT). Os *primers* C1SP4 (5'GAGAAGCTTGCTGAGCTTGC3'), C9SP4 (5'CAAAGCAAATCTACTGGAAG3'), C36SP4 (5'GCCACACTGTGCCAGGATGG3'), C3SP4 (5'CTTACCAAGGAGGGACTGCC3'), Cinamil1 (5'ACACTGATGGCAAACCCACCCAAG3'), PAL-1R (5'CAAGGTTACTCAGGCATCAG3') e PAP-1R (5'GGCAAGCAAGGTGTACAG3') são dirigidos para os genes de *PDI*, *CAD1*, *RSH*, *R*, *CAD2*, *PAL* e *POX*, respectivamente. Foi amplificado, também, um fragmento dum gene da actina, com tamanho superior a 500 pb, com os *primers* ACT1 (5'GCCGGTGACGACGCCCGCG3'; directo) e ACT2 (5'CCACGCTCCGTCAGGTACTTC3'; reverso), dirigidos para regiões conservadas deste gene, em várias espécies de fungos e plantas. Pretendeu-se, com esta amplificação, avaliar a qualidade do cDNA sintetizado. Neste estudo, o gene da actina não foi usado como referência para estimar quantidades de mRNA. Na análise por RT-PCR e hibridação, pretende-se comparar a quantidade de cDNA de cada um dos genes alvo, disponível para ser amplificada nas amostras de raízes não infectadas e nas amostras de raízes infectadas (Köhler *et al.*, 1995). Os *primers* dirigidos para o gene da actina não são específicos de *Q. suber*, mas amplificaram um fragmento com tamanho semelhante ao previsto para o gene *actin 2/7* de *Arabidopsis thaliana* (AY063980).

As reacções de amplificação decorreram num volume total de 50 µl, na presença de 2,5 µl de dNTPs (5 mM), 5 µl de tampão 10 vezes concentrado [Tris-HCl (100 mM, pH 8,3), MgCl₂ (15 mM), KCl (500 mM)], 0,2 µl da enzima Taq DNA polimerase (5 U/µl; Boehringer Mannheim), 1 µl de *primer* específico (10 µM), 1 µl de *primer* GR3' (10 µM) e 5 µl das soluções de cDNA diluídas 1:50, 1:100 e 1:200. O programa de amplificação compreendeu: 1 ciclo (2 min a 94 °C); 34 ciclos (30 s a 94 °C; 30 s a 52 °C; 2 min a 68 °C); 1 ciclo (7 min a 68 °C).

Os produtos das reacções de amplificação do cDNA foram separados por electroforese em gel de agarose 1 %, corado com brometo de etídio.

II.3.5.4. Hibridação dos produtos PCR com sondas marcadas com digoxigenina.

Os produtos PCR (15 µl) resultantes das amplificações efectuadas com cDNA das amostras de raízes de sobreiro infectadas e das amostras de raízes não infectadas foram separados por electroforese em gel de agarose 1 % em TBE concentrado 1x [Tris Base (89 mM), ácido bórico (89 mM), EDTA (2 mM; pH 8)]. A electroforese decorreu durante 2 h a 100 V e 400 mA. Como marcadores de massa molecular, foram usados o 1 kb (Gibco) marcado pelo sistema *Dig-Chem-Link* (Roche) e o *II-Dig labeled* (Roche). O marcador 1 kb foi preparado num volume total de 20 µl, na presença de 10 µl de marcador (10 µg) e 2 µl de *Dig-Chem-Link* (Roche). A solução foi aquecida 30 min a 85 °C. Em seguida, a solução foi centrifugada durante alguns segundos e a reacção terminou com a adição de 5 µl de *Stop Solution*(Roche). O marcador de massa molecular foi diluído para uma concentração final de 50 ng/ µl e foi guardado a -20 °C.

Após a electroforese, o gel foi colocado em TBE (0,5 vezes concentrado) contendo brometo de etídio (0,1 µg/ml), durante 30 min, com agitação suave. Os produtos PCR foram visualizados sob radiação ultra violeta. Em seguida, o gel foi transferido para uma solução de TBE (0,5 vezes concentrado) durante mais 30 min, com agitação. A transferência para membrana foi efectuada num *Trans-Blot SD* (BIO-RAD) por aplicação de um campo eléctrico (Bio-Rad, 1988; Southern, 1975). Preparou-se uma *sandwich* com uma folha de *Extra Thick Blot Paper* (BIO-RAD) embebida em tampão TBE (0,5 vezes concentrado), uma membrana carregada positivamente (Hybond-N+), o gel de agarose e, no topo, nova folha de *Extra Thick Blot Paper* embebida em tampão TBE. A membrana foi previamente equilibrada em tampão TBE (0,5 vezes concentrado), durante 10 min. A transferência decorreu a 3,55 mA/cm² de área do gel, durante 20 min. A voltagem situou-se entre 18 e 23 V. No final da transferência a membrana foi colocada em papel *Whatman 3-MM* embebido em solução SSC (2 vezes concentrada) e o DNA foi fixado sob acção da radiação ultravioleta (U.V. 300 nm), durante 2 min. Depois da fixação, a membrana foi lavada com água e foi colocada na superfície de papel *Whatman 3-MM*.

Na detecção dos produtos PCR, por hibridação, as sondas foram preparadas por amplificação com os *primers* que figuram na tabela 12. Nesta tabela é feita referência a alguns aspectos relacionados com as sondas, tais como o gene a que são dirigidas, a

sequência dos *primers* usados na amplificação e o tamanho. A marcação das sondas foi realizada com o *kit* PCR DIG Probe Synthesis (Roche). O DNA dos plasmídeos, que contêm como insertos, os fragmentos de cDNA, relativos a cada um dos genes, foi usado como DNA alvo nas reacções de amplificação. Os *primers* escolhidos amplificam regiões codificantes dos genes e as sondas têm tamanho inferior ao dos produtos PCR com os quais se hibridam.

Tabela 12. Parâmetros relacionados com as sondas usadas na análise por RT-PCR e hibridação.

Gene alvo	Sequências dos <i>primers</i> (5' → 3') usados na amplificação das sondas	Tamanho da sonda (pb)
PDI	C1SP4: GAGAAGCTTGCTGAGCTTGC C1SP1: GTCACCTTGAGATGAATATGAT	270
R	C3SP4: CTTACCAAGGAGGGACTGCC C3SP1: ATGTGAGCTATCTTGGACCA	116
RSH	C36SP4: GCCACACTGTGCCAGGATGG C36SP1: CACATCCCCCATTTCAACTT	230
CAD1	C9SP4: CAAAGCAAATCTACTGGAAG C9SP1: ATGATGAAGGGAGATGCAGT	75
PAL	PAL-1R: CAAGGTTACTCAGGCATCAG PAL-1F: CCATTATAGCTGCTGCCTC	460
CAD2	PCAD-1R: CATGCAACTAAAACACACC PCAD-1F: GAGTTTTGCATATCCATATC	630
POX	PAP-1R: GGCAAGCAAGGTGTACAG PAP1F: CGTTGACAAAGTCAGAATAG	290

As condições da reacção de marcação das sondas com digoxigenina estão descritas no ponto II.3.4.9.2..

Os procedimentos seguidos na hibridação das sondas com os produtos PCR transferidos para a membrana e na detecção dos fragmentos que hibridaram estão descritos no ponto II.3.4.9.3. e II.3.4.9.4., respectivamente.

A intensidade do sinal emitido em consequência da detecção foi medida num densitómetro (*Imaging Densitometer* GS-700, Bio-Rad) e os valores da integração das áreas delimitadas pelos picos de absorvência foi determinada com o *Molecular Analyst Software*.

II.3.6. Pesquisa de polimorfismos por PCR-RFLP⁴ nos genes que codificam uma PDI (protein disulfide isomerase) e uma proteína de resistência (R) de *Q. suber*.

II.3.6.1. Identificação das árvores.

Pesquisaram-se polimorfismos genéticos, por PCR-RFLP, em 144 sobreiros e em 24 azinheiras. Cento e vinte e quatro sobreiros são da região do Algarve (Tabela 2), 19 são da Herdade do Azinhal (Grândola) e um é de Almodôvar (BS222A-0). As azinheiras são da região do Algarve (Tabela 2).

II.3.6.2. Amplificação de fragmentos dos genes duma PDI (*protein disulfide isomerase*) e duma proteína de resistência (R) de *Q. suber*.

Em 168 árvores das espécies *Q. suber* e *Q. rotundifolia*, foi amplificado um fragmento com 1095 pb do gene que codifica uma PDI, com os *primers* TIO (5'CTAACCTTATCTTTCTTGATG3', directo) e C1SP1 (5'GTCACCTTGAGATGAATATGAT3', reverso). A partir de DNA genómico das mesmas árvores foi amplificado, também, um fragmento com 1081 pb, dum gene que codifica uma proteína de resistência, com os *primers* PR3 (5'CCCAGTTGGAAGTCTTAAC3'; directo) e PR2 (5'GATGGACATGATTTGATGTC3'; reverso).

As reacções de amplificação decorreram num volume total de 50 µl, na presença de 2,5 µl de dNTPs (5 mM), 5 µl de tampão 10 vezes concentrado [Tris-HCl (100 mM, pH 8,3), MgCl₂ (15 mM), KCl (500 mM)], 0,2 µl da enzima Taq DNA polimerase (5 U/µl; Boehringer Mannheim), 1 µl de cada um dos *primers* específicos (10 µM) e 5 µl de DNA genómico (20 ng/µl). O programa de amplificação compreendeu: 1 ciclo (2 min a 94 °C); 34 ciclos (30 s a 94 °C; 30 s a 52 °C; 2 min a 68 °C); 1 ciclo (7 min a 68 °C).

⁴ PCR-RFLP: Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism.

Os produtos resultantes das reacções de amplificação (10 µl) foram separados por electroforese em gel de agarose (1 %), corado com brometo de etídio, na presença do marcador de massa molecular 1 kb (Gibco).

II.3.6.3. Digestão dos fragmentos amplificados com *MseI*, *HindIII* e *EcoRI*.

Os fragmentos amplificados em 20 sobreiros da região do Alentejo foram digeridos com *Mse I*, *HindIII* e *EcoRI*. A digestão dos produtos *PCR* foi realizada num volume final de 20 µl, na presença de 1 µl de *Mse I* (4 U/µl, BioLabs) ou de 0,5 µl de *HindIII* (10 U/µl, Roche) ou de 0,5 µl de *EcoRI* (10 U/µl, Roche), 2 µl de tampão da enzima 10 vezes concentrado [NaCl (500 mM), Tris-HCl (100 mM), MgCl₂ (100 mM), DTT (10 mM), pH 7,9], 0,2 µl de BSA (10 mg/ml), no caso da *MseI* e 15 µl de produto *PCR*. A reacção decorreu a 37 °C durante 1 h. A enzima foi inactivada por aquecimento a 65 °C durante 15 min.

Os produtos resultantes das reacções de digestão (20 µl) foram separados por electroforese em gel de agarose 2 %, corado com brometo de etídio (1 mg/ml) e visualizados sob acção da radiação ultra-violeta.

A análise por PCR-RFLP com a enzima *MseI* foi alargada às 168 árvores.

II.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.4.1. Identificação e caracterização de genes de *Q. suber* envolvidos na resposta à infecção por *P. cinnamomi*.

II.4.1.1. Análise do mRNA de *Q. suber* e *Q. rotundifolia* por cDNA-AFLP.

Para identificar genes de *Q. suber* que se expressam de forma diferencial, durante a infecção por *P. cinnamomi*, foi utilizado o método cDNA-AFLP (Bachem *et al.*, 1996; Money *et al.*, 1996; Habu e Iida, 1998). Este método tem origem na técnica de análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism-AFLP*), descrito por Vos *et al.* (1995), para analisar DNA genómico e ultrapassa alguns dos problemas encontrados noutras técnicas desenvolvidas com o mesmo objectivo. A detecção das alterações que ocorrem na expressão dos genes durante as interações entre o patogénio e hospedeiro tem sido realizada por vários métodos, tais como: o escrutínio em bancos de cDNA, de clones representados de forma diferencial entre amostras (Duguid *et al.*, 1988); a hibridação subtractiva entre bancos de cDNA (Lee *et al.*, 1991); a obtenção de perfis de mRNA por amplificação de cDNA com *primers* arbitrários (Welsh *et al.*, 1992) e a técnica de *Differential Display* (Liang e Pardee, 1992). Apesar de todas estas técnicas terem sido aplicadas com sucesso elas apresentam limitações. Os métodos baseados nos escrutínios ou hibridações diferenciais são muito laboriosos, difíceis de colocar em prática, requerem grandes quantidades de RNA total (100 µg) e identificam clones em que o cDNA deriva de genes que se expressam de forma abundante (Kuhn, 2001). As técnicas que dependem de reacções de amplificação do cDNA em condições de restringência baixa têm tendência para fornecer falsos positivos e a não serem reprodutíveis (Matz e Lukyanov, 1998). Jones e Harrower (1998) compararam a eficiência das técnicas de *Differential Display* e de cDNA-AFLP no isolamento de genes de nemátodos (*Globodera rostochiensis* e *G. pallida*) que se expressam de forma diferencial na batateira durante os vários estados de desenvolvimento. Segundo estes autores, todos os fragmentos obtidos por cDNA-AFLP, ao serem usados como sondas, hibridam positivamente, por *Northern Blot*, com o mRNA do parasita e 50 %

reconhecem genes que se expressam de forma diferencial. Em oposição, nenhuma das sondas obtida por *Differential Display* reconheceu, por *Northern Blot*, genes que se expressassem de forma diferencial ou constitutiva.

Recentemente, várias publicações fazem referência ao uso de cDNA-AFLP para identificar genes dos parasitas ou dos hospedeiros envolvidos em interações compatíveis ou incompatíveis. São exemplo os seguintes trabalhos: isolamento de genes de *Peronospora parasitica* expressos durante a infecção em *Arabidopsis thaliana* (van der Biezen *et al.*, 2000); identificação de genes de plantas envolvidos na resposta à infecção por *Agrobacterium tumefaciens* (Ditt *et al.*, 2001); isolamento de genes relacionados com o sistema de defesa do milho contra a infecção por *Bipolaris maydis* (Zhihuan *et al.*, 2001); determinação de genes regulados positivamente em *Chenopodium amaranticolor* durante a infecção com vírus (Cooper, 2001); isolamento e expressão de cDNA de genes relacionados com a patogênese de folhas de pimenteira infectadas com *Xanthomonas campestris* (Jung e Hwang, 2000).

Em *Q. suber* são escassas as sequências nucleotídicas identificadas e os genes caracterizados. No GenBank, estavam presentes, em 10 de Dezembro de 2003, 38 sequências de mRNA correspondentes a regiões codificantes parciais de genes e no início deste trabalho estavam presentes três. Estudar os aspectos moleculares da interação entre *P. cinnamomi* e *Q. suber* requeria a escolha de um método em que não fosse necessário conhecer antecipadamente a sequência nucleotídica de genes ou a sequência em aminoácidos de proteínas, que estivessem envolvidos na patogênese. Em princípio, a determinação de sequências novas num organismo, a partir da análise dos padrões dos mRNA transcritos, deve ser útil para estimar a sua função. A semelhança existente nos padrões de expressão de genes, cuja função se desconhece, com as de outros genes conhecidos deve ser um indicador de homologia funcional.

O mRNA foi analisado por cDNA-AFLP em:

1. folhas jovens de sobreiros colhidas antes (T6A) e após a infestação artificial dos solos com *P. cinnamomi* (T6I₁; T6I₂; T6I₃; T6I₄) (Mat. e Mét. II.3.1.1.1);
2. raízes novas de sobreiros (RS) e azinheiras (RA) com 1 ano de idade, retiradas antes da inoculação com *P. cinnamomi* e após 48 horas de contacto com o micélio do fungo (RSI-raíz de sobreiro infectada; RAI-raíz de azinheira infectada) (Mat. e Mét. II.3.1.1.2);

3. folhas jovens dos sobreiros BS222A-4, BS250HL-0, BS110HL-3, AS17BV-0, AS21BV-3 e azinheiras BA6A-1 BA7A-3 com graus de desfoliação diferentes e localizados em locais de declínio onde o fungo já tinha sido isolado, anteriormente, a partir dos solos (Marcelino, 2001) (Mat.e Mét. II.3.1.1.3.).

O procedimento clássico para realizar cDNA-AFLP utiliza o protocolo padrão do AFLP aplicado ao cDNA. A técnica envolve quatro passos: (1) síntese de cDNA bicatenário a partir de RNA total extraído das folhas, raízes e fungo; (2) digestão do cDNA com as enzimas de restrição *EcoRI* (reconhece sequência de restrição com 6 pb) e *MseI* (reconhece sequência de restrição com 4 pb), seguida da ligação de adaptadores às extremidades dos fragmentos digeridos; (3) pré-amplificação com *primers* não selectivos que se hibridam aos adaptadores; (4) amplificação selectiva de subconjuntos de fragmentos de restrição com *primers* que se hibridam aos adaptadores e que possuem extensões de um, dois ou três nucleotídeos selectivos, na extremidade 3'; (5) separação dos produtos amplificados por electroforese em gel de poliacrilamida e visualização por autorradiografia (Bachem *et al.*, 1998). Para visualização do padrão de amplificação, um dos *primers* da amplificação selectiva é marcado radioactivamente. Na figura 54 apresenta-se de forma esquemática, o método seguido para a identificação de genes de *Q. suber* que se expressam de forma diferencial durante a interacção com *P. cinnamomi*, por aplicação da técnica de cDNA-AFLP.

De acordo com o método descrito, foi possível criar padrões reprodutíveis de bandas que diferem entre as amostras de raízes infectadas e não infectadas e entre as amostras de folhas colhidas antes e depois da infestação dos solos (Figura 55). Os perfis de mRNA obtidos para os sobreiros localizados em locais de declínio puseram em evidência polimorfismos presentes nos genes que são transcritos, em sobreiros com graus de desfoliação diferentes (Figura 55).

Nas amplificações realizadas com 20 combinações de *primers* observaram-se 90 fragmentos que se expressam diferencialmente nas raízes de *Q. rotundifolia* infectadas e não infectadas; só aparecem após infecção com *P. cinnamomi* ou correspondem a genes cuja expressão aumenta após a infecção. As amostras de raízes de sobreiro não infectadas não puderam ser comparadas com as amostras de raízes de sobreiro infectadas por só ter havido amplificação nas primeiras. Ao longo das experiências constatámos que, nas raízes em que as necroses eram maiores, havia inibição da transcrição reversa e, conseqüentemente, diminuição do número de fragmentos

amplificados por PCR. Nas amostras de folhas dos sobreiros em que o solo foi artificialmente infestado, o número de fragmentos observado (70) que se expressa de forma diferencial é inferior ao obtido nas raízes (90) e o tamanho da maioria dos fragmentos é inferior a 200 pb. Nas folhas dos sobreiros localizados em locais de declínio, que apresentavam graus de desfoliação diferentes, observou-se uma elevada heterogeneidade nos perfis de mRNA produzidos.

Os perfis das ampliações obtidos com a combinação de *primers* II1 podem visualizar-se na figura 55. Na imagem foram assinalados alguns fragmentos de cDNA-AFLP que correspondem a transcritos cuja expressão se detecta nas raízes após infecção (por exemplo: C42; C44) e nas folhas dos sobreiros após infestação artificial do solo (por exemplo: C36; C39). Também se assinalaram alguns fragmentos polimórficos presentes nos perfis de mRNA dos sobreiros (C48; C49) e azinheiras (C53; C54) com proveniência em solos naturalmente infestados. De acordo com o marcador de massa molecular 30-330 pb foram amplificados fragmentos com tamanhos entre 100 e 330 pb e alguns de tamanho superior. Ao utilizar uma enzima que corta com pouca frequência (*EcoRI*) e uma enzima que corta frequentemente (*MseI*), pretende-se produzir fragmentos entre 50 e 1000 pb que possam ser separados por electroforese em géis de poliacrilamida a 6 % (Bachem *et al.*, 1998). Devemos ter em consideração que a mistura de fragmentos de cDNA que se visualiza no gel é mais complexa do que o conjunto de RNA mensageiros que lhe deu origem, porque cada mRNA pode estar representado por mais do que um fragmento de restrição independente.

Globalmente, seleccionaram-se nos três ensaios, 122 fragmentos amplificados por cDNA-AFLP, cuja expressão aumentou após a infecção ou só apareceram após a infecção, para purificação e reamplificação. Dos fragmentos reamplificados, clonaram-se 27, no vector pCRII, cuja sequência nucleotídica foi determinada (Anexo II). As sequências nucleotídicas dos fragmentos cDNA-AFLP foram comparadas com as sequências presentes nas bases de dados de plantas do GenBank, através do programa *fastA* incluído no *software* GCG (Genetics Computer Group) e do *Blastn*, disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Altschul *et al.*, 1997).

Na tabela 13 apresentam-se informações relativas às 27 sequências, tais como o código atribuído ao fragmento cDNA-AFLP; a origem dos fragmentos; o tamanho dos fragmentos em pares de bases; a sequência do Genbank com a qual apresentam a homologia com o melhor *fastA score* ou *Blast score*; a percentagem de homologia

relativa à região em que as sequências se sobrepõem, com a designação do número de nucleótidos da sequência do fragmento cDNA-AFLP abrangidos.

Das sequências com as quais foram encontradas homologias destacam-se uma *protein disulfide isomerase* (PDI-like) de *Zea mays* pertencente à superfamília das tioredoxinas; uma proteína de resistência do tipo NBS-LRR; uma cinamil álcool desidrogenase; uma proteína osmótica (ODE2); uma leucoantocianidina dioxigenase e uma proteína de *Arabidopsis thaliana*, denominada RSH2, semelhante às proteínas RelA/SpotT das bactérias. Para alguns fragmentos, a semelhança encontrada com outras sequências foi considerada sem significado, por resultar da sobreposição de 15 a 20 nucleótidos apenas. A causa pode estar no facto de alguns fragmentos de cDNA-AFLP poderem estar localizados nas regiões que antecedem o ATG ou que estão a jusante do codão de terminação nas sequências dos mRNAs.

As sequências dos fragmentos C36 e C53 de *Q. suber* são, ambas, semelhantes a RSH2. C36 foi isolado das amostras de folhas de sobreiro que cresceu em solo artificialmente infestado e só está presente após oito dias de infestação (T6I₁) e no segundo momento de rebentação natural (T6I₃). C53 corresponde a um fragmento polimórfico dum mRNA presente nas folhas do sobreiro BS110HL-3 afectado pela doença do declínio.

Seleccionaram-se os fragmentos C1, C3, C9 e C36 (Tabela 13) para definir *primers* específicos nas sequências nucleotídicas correspondentes, de modo a amplificar por RACE-PCR, o cDNA relativo ao mRNA completo dos genes respectivos. A partir dos mesmos fragmentos de cDNA-AFLP foram preparadas sondas para escrutinar num banco genómico de *Q. suber* os genes completos com as regiões promotoras e reguladoras integradas. Estes fragmentos foram escolhidos, por apresentarem homologia com genes descritos noutras espécies, que estão potencialmente relacionados com o sistema de defesa, nas plantas.

A caracterização dos genes de *Q. suber* correspondentes aos fragmentos C1, C3, C9 e C36 que codificam uma cinamil álcool desidrogenase, uma proteína de resistência, uma isomerase de pontes dissulfureto de proteína e uma proteína do tipo RelA/SpotT, respectivamente, é feita nos subcapítulos que se seguem.

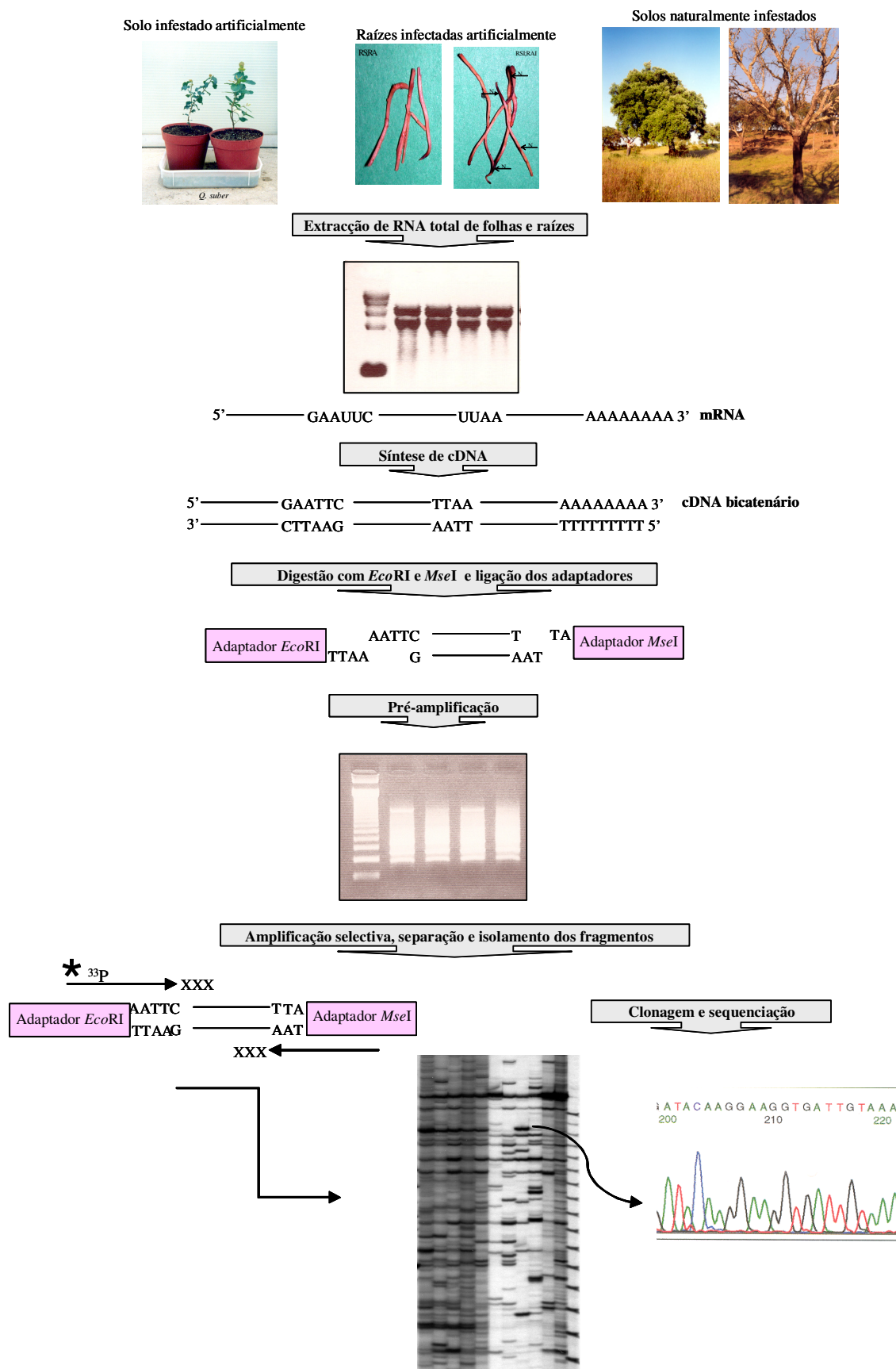


Figura 54. Esquema que ilustra o procedimento seguido na análise do mRNA de *Q. suber* e *Q. rotundifolia* por cDNA-AFLP.

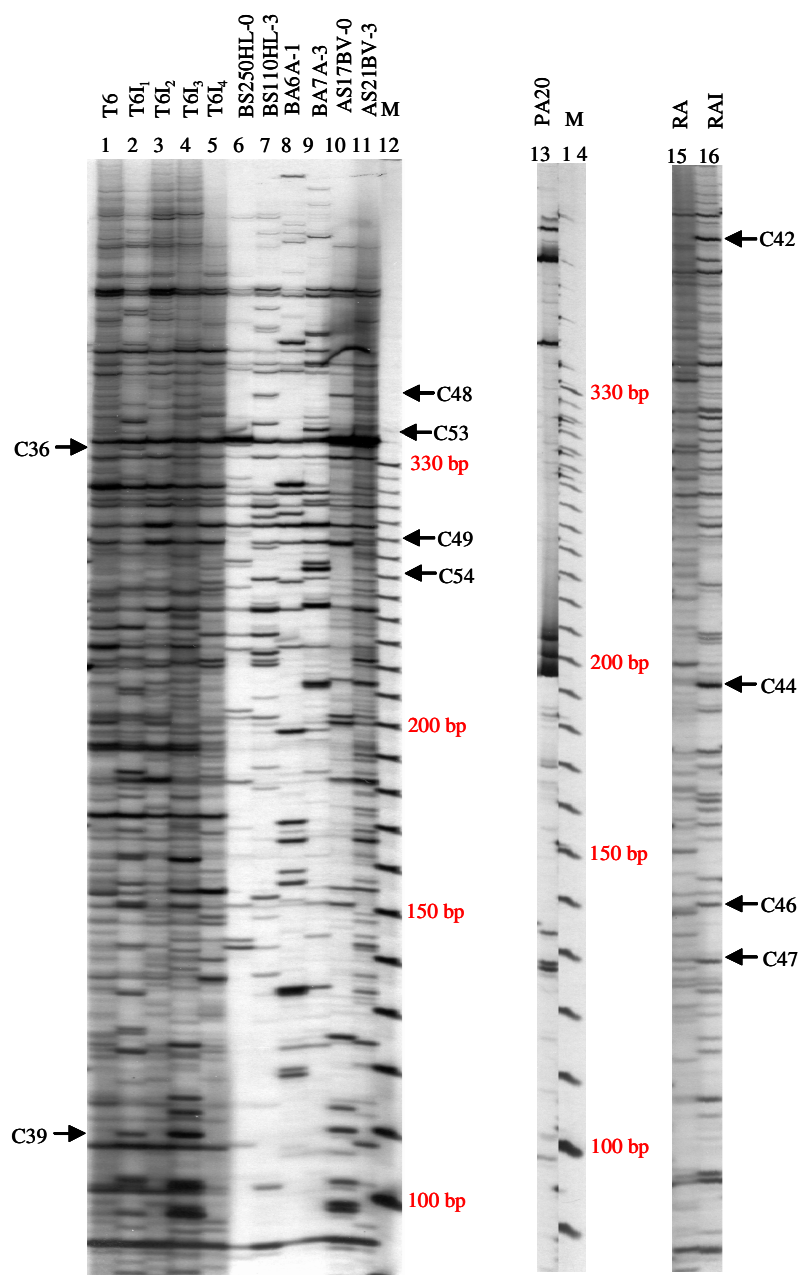


Figura 55. Exemplo do perfil de mRNA, obtido por cDNA-AFLP, com a combinação de *primers* I11 (Eco-ACC; Mse-CTC). Canais 1 a 5: amostras de folhas de sobreiro colhidas antes (T6A) e após 8 (T6I₁), 22 (T6I₂), 40 (T6I₃) e 210 (T6I₄) dias da infestação artificial dos solos. Canais 6 a 11: amostras de folhas de sobreiros e de azinheiras presentes em locais naturalmente infestados; BS250HL-0 (sobreiro n° 250 da Herdade dos Leitões, Montargil, G.D. = 0), BS110HL-3 (sobreiro n° 110 da Herdade dos Leitões, Montargil, G.D. = 3); AS17BV-0 (sobreiro n°17 de Barranco do Velho, Algarve, G.D. = 0); AS21BV-3 (sobreiro n° 21 de Barranco do Velho, Algarve, G.D. = 3); BA6A-1 (azinheira de Almodôvar, Alentejo, G.D. = 1); BA7A-3 (azinheira de Almodôvar, Alentejo, G.D. = 3). Canal 13: isolamento PA20 de *P. cinnamomi*. Canais 15 e 16: amostras de raízes de *Q. rotundifolia* antes da infecção (RA) com *P. cinnamomi* e após infecção (RAI). Canais 12 e 14: marcador de massa molecular.

Tabela 13. Homologias existentes entre os fragmentos cDNA-AFLP que se expressam diferencialmente e as sequências presentes nas bases de dados de plantas.

Código do fragmento cDNA-AFLP	Origem	Tamanho (pb)	Homologia [Organismo; número de identificação]	% Homologia (2)	fastA score
C1 (Clone 1.1)	RAI; I2	351	Proteína PDI-Like de <i>Zea mays</i> (RNAm; U90944)	66 % em 329 nt.	3,3e ⁻²³
C2 (Clone 2.1)	RAI; I2	310	Cromossoma 1, BAC clone F1003 de <i>Arabidopsis thaliana</i> (AC006550), região correspondente a família de proteínas não caracterizadas com 7 domínios transmembranares.	61 % em 94 nt.	0,6
C3 (Clone 3.1)	RAI; I2	263	Pseudogene <i>NBS-LRR-like</i> (CO-2) de <i>Phaseolus vulgaris</i> (DNA; AF098969); Proteína I2C-4 do complexo de resistência de <i>Lycopersicon esculentum</i> (pseudo RNAm; AF004881).	68 % em 155 nt. 66 % em 93 nt.	1,5e ⁻¹⁰ 0,012
C4 (Clone 4.2)	RAI; I2	178	Cromossoma 3 BAC OSJNBa0091J1 de <i>Oryza sativa</i> (AC084320)	67 % em 90 nt.	0,061
C8 (Clone 8.1)	BS222A-4; I2	294	Sequência dum Banco de cDNA de <i>Botrytis cinerea</i> estirpe T4, construído em condições de privação de azoto (RNA; AL116108)	62 % em 116 nt.	0,61
C9 (Clone 9.2)	BS222A-4; I2	200	Cinamil álcool desidrogenase (CAD) de <i>Malus x domestica</i> (RNAm; AF053084); Cinamil álcool desidrogenase (CAD1) de <i>Eucalyptus gunnii</i> (RNAm; X88797)	85 % em 123 nt. 77 % em 123 nt.	2,9e ⁻¹⁷ 9,1e ⁻¹³
C13 (Clone 13.2)	BS110HL-3; I2	254	Gene rRNA His (GUG) genoma cloroplasto de <i>Spinacia oleracea</i> (AJ400848)	96 % em 245 nt.	4,4e ⁻³⁶
C14 (Clone 14.1)	BS110HL-3; I2	244	Proteína osmótica (ODE2) expressa diferencialmente em <i>Capsicum annuum</i> (RNAm; AF169204); Factor de transcrição 4 em resposta a auxinas (ARF4) de <i>Arabidopsis thaliana</i> (RNAm; AF013466)	75 % em 149 nt. 74 % em 101 nt.	3,4e ⁻¹³ 4,1e ⁻⁰⁷
C36 (Clone 36.1)	T61; I11	313	RSH2 de <i>Arabidopsis thaliana</i> (RNAm; AF225703)	69 % em 313 nt.	7,6e ⁻³⁰
C39 (Clone 39.2)	T61; I11	76	Semelhança sem significado (1)	-	-
C42 (Clone 42.1)	RAI; I11	>362	Citocromo o ubiquitoin oxidase B de <i>Pseudomonas putida</i> (DNA; AB016787)	95 % em 346 n.	e ⁻¹⁶⁶ (3)
C44 (Clone 44.1)	RAI; I11	158	Semelhança sem significado (1)	-	-
C46 (Clone 46.1)	RAI; I11	105	Gene rRNA subunidade grande 26S de <i>Sphagnum ehyalinum</i> (AF231053)	97 % em 45 nt.	2e ⁻¹³ (3)
C47 (Clone 47.1)	RAI; I11	95	Semelhança sem significado (1)	-	-
C53 (Clone 53.1)	BS110HL-3; I11	313	RSH2 de <i>Arabidopsis thaliana</i> (RNAm; AF225703)	69 % em 313 nt.	4e ⁻³⁰
C54 (Clone 54.1)	BS110HL-3; I11	225	Gene rRNA subunidade grande 26S de <i>Ephedra distachya</i> (AF036489)	85 % em 144 nt.	1,2e ⁻²³
C72 (Clone 72.1)	RAI; I18	275	Gene rRNA subunidade pequena 16S de <i>Nicotiana bigelovii</i> (X72962)	80 % em 274 nt.	3,9e ⁻²¹
C73 (Clone 73.1)	RAI; I18	206	Gene rRNA subunidade pequena 16S de <i>Nicotiana bigelovii</i> (X72962)	81 % em 160 nt.	1,6e ⁻¹⁰
C77 (Clone 77.1)	AS21BV-3; I18	207	Gene rRNA His (GUG), genoma cloroplasto de <i>Spinacia oleracea</i> (AJ400848)	71 % em 207 nt.	9,1e ⁻¹⁷
C78 (Clone 78.1)	AS21BV-3; I18	186	Gene rRNA His (GUG), genoma cloroplasto de <i>Spinacia oleracea</i> (AJ400848)	82 % em 130 nt.	2,1e ⁻¹⁸
C83 (Clone 83.1)	RAI; I19	295	Cromossoma 3, BAC clone F25L23 <i>Arabidopsis thaliana</i> (AL356014); Gene <i>PKA</i> , subunidade catalítica da proteína cinase dependente de cAMP de <i>Metarhizium anisopliae</i> (DNA; AF116597)	57 % em 198 nt. 63 % em 104 nt.	0,2 1,6
C84 (Clone 84.1)	RAI; I19	159	Cromossoma 3, BAC clone F24M12 <i>Arabidopsis thaliana</i> (AL132980)	77 % em 78 nt.	2,9e ⁻⁶
C85 (Clone 85.1)	RAI; I19	136	Leucoanthocianidina dioxygenase de <i>Arabidopsis thaliana</i> (RNAm; AJ298225)	68 % em 121 nt.	4e ⁻⁹
C95 (Clone 95.1)	T61; I23	177	Cromossoma 2, clone F15011 <i>Arabidopsis thaliana</i> (AC006446)	66 % em 95 nt.	0,19
C96 (Clone 96.3)	RAI; I23	376	Gene rRNA subunidade 26S de <i>Saccharomyces fermentans</i> (U73600); Ferulolil esterase A de <i>Orpinomyces sp.</i> (RNAm; AF164351)	59 % em 158 nt. 61 % em 139 nt.	0,19 0,44
C98 (Clone 98.1)	RAI; I23	177	Semelhança sem significado (1)	-	-
C103 (Clone 103.1)	AS21BV-3; I23	323	Subunidade beta II RNA polymerase do genoma cloroplasto de <i>Atropa belladonna</i> (DNA; AJ316582)	84 % em 147	2e ⁻³⁴ (3)

(1): Nos fragmentos cDNA-AFLP as homologias foram consideradas sem significado sempre que a sobreposição com sequências semelhantes se restringia a 15-20 nucleótidos. (2): A percentagem de homologia refere-se à região de sobreposição entre as sequências, indicada pelo número de nucleótidos. (3): Homologia determinada com o programa *Blastn*, disponível no NCBI (Altschul *et al.*, 1997).

Coluna 1: designação dos fragmentos cDNA-AFLP com indicação do clone que foi sequenciado. Coluna 2: designação da origem do fragmento e da combinação de *primers* usada (I2, I11, I18, I19, I23); RAI (raiz de azinheira infectada), BS222A-4 (sobreiro nº 222 de Almodôvar com G.D. = 4, BS110HL-3 (sobreiro nº 110 da Herdade dos Leitões, Montargil com G.D. = 3), AS21BV-3 (sobreiro nº 21 do Algarve com G.D. = 3), T61 e T61₃ (folhas de sobreiros que cresceram em solo artificialmente infestado).

II.4.1.2. Gene que codifica uma cinamil álcool desidrogenase 1 de *Q. suber* (*QsCAD1*).

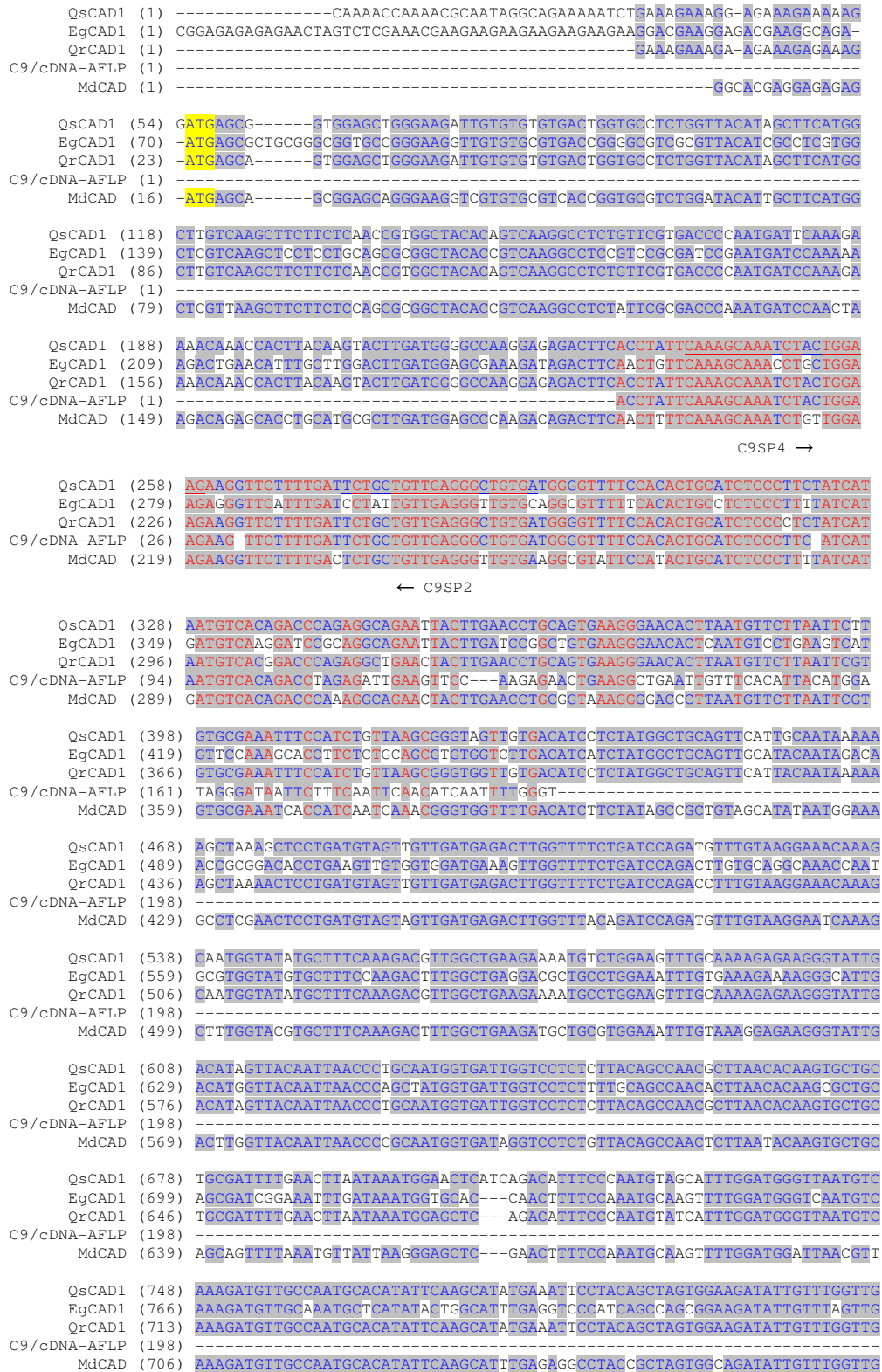
II.4.1.2.1. *Clonagem do mRNA transcrito do gene QsCAD1 de Q. suber.*

Na análise por cDNA-AFLP, foi identificado o fragmento C9, a partir de folhas do sobreiro BS222A, localizado num local de declínio, em Almodôvar e que apresentava um grau de desfoliação 4 (II.4.1.1.). Este fragmento está ausente nos outros quatro sobreiros e duas azinheiras integrados neste estudo e que apresentavam graus de desfoliação 0 ou 3. O mRNA foi extraído a partir de folhas de rebentos epicórmicos do tronco do sobreiro, porque a árvore apresentava sintomas de ter sofrido morte súbita. No momento da recolha das folhas, o sobreiro ainda possuía folhas secas de cor amarela agarradas aos ramos e exsudações no tronco. Tratava-se de uma árvore jovem, com 40 a 50 anos, à qual já tinha sido tirada a cortiça do tronco.

O fragmento C9 tem 200 pb e apresenta homologies de 85 % e 77% com as sequências dos genes que codificam cinamil álcool desidrogenases (CAD) em *Malus x domestica* (AF053084) e em *Eucalyptus gunnii* (X88797), respectivamente, nos 123 nucleótidos em que se sobrepõem. Nas regiões mais conservadas destas sequências, definiram-se os *primers* C9SP2 e C9SP4, para tentar determinar, por RACE-PCR, a sequência completa do cDNA do gene correspondente ao fragmento C9, a partir de RNA total extraído de raízes de *Q. suber* infectadas com *P. cinnamomi*. Amplificaram-se dois fragmentos, um na direcção da extremidade 3' do cDNA do gene e outro, na direcção da extremidade 5', que se sobrepõem com total identidade em 54 nucleótidos. O cDNA resultante tem 1399 pb e denomina-se *QsCAD1* (AY362455). A comparação com as sequências deduzidas dos mRNAs das CADs de *M. x domestica* e *E. gunnii* mostra que possui um quadro completo de leitura aberto, que codifica uma proteína homóloga das CADs identificadas no eucalipto e na macieira (Figura 56). *QsCAD1* diverge num nucleótido da sequência do fragmento C9, no segmento delimitado pelos *primers* C9SP2 e C9SP4 e a partir do nucleótido 111 do fragmento C9, as sequências começam a divergir uma da outra de forma significativa (Figura 56).

Com os mesmos *primers* e pelo mesmo método, foi amplificado um fragmento com uma sequência semelhante à de *QsCAD1*, a partir de mRNA de raízes de *Q. rotundifolia*, infectadas com *P. cinnamomi*. O mRNA transcrito possui 1238 pb,

denomina-se *QrCAD1* e tem 84,3 % de homologia com *QsCAD1*. Esta sequência foi comparada com as sequências identificadas no sobreiro, no eucalipto e na macieira e o resultado do alinhamento está apresentado na figura 56.



QsCAD1 (818)	AGAGCGTTATACACCAATCTGAAGTTGTGAGGTTTTACGAAACCTTTATCCCTCTGTACAACCTCCAGA
EgCAD1 (836)	AGAGAAATGACACACTACTCCGAACTCGTGAGGATCTTACGTGAGCTTTACCCCTCTGCCAGCTCCAGA
QrCAD1 (783)	AGAGTGTATACACCAATCTGAAGTTGTGAGGTTTTACGAAACCTTTATCCCTCTGTACAACCTCCAGA
C9/cDNA-AFLP (198)	-----
MdCAD (776)	AGAGAGTTGCCACATCTCGAAGTTGTGAGAAATTTTACGTGAGCTGTACCCTACTTTGCAACTCCAGA
QsCAD1 (888)	GAAGTGTGCAGATGTAAGCCATTTGCCCAACATATCAGGTGTCCAAAGAAAGGACAAAGAGCTTGGGT
EgCAD1 (906)	AAAGTCCCGGACGCAAGCCCTTCGTGCCGATCTATCAGGTGTCCAAAGGAAAGTGAAGAGCTTGGG
QrCAD1 (853)	GAAGTGTGCAGATGTAAGCCATTTGCCCAACATATCAGGTGTCCAAAGAAAGGACAAAGAGCTTGGGT
C9/cDNA-AFLP (198)	-----
MdCAD (846)	GAAGTGTGCAGACGCAAGCCCTTTGTGCCCAACATATCAGGTGTCCAAAGGAAAGCGAGAGCTTGGGT
QsCAD1 (958)	ATTGAATACATTCCTTTGAGGTGAGCCTCAAGGAAACTGTTGAAAGCTTGAAGGAAAAGAGTTTATCA
EgCAD1 (976)	ATCAACTACATTCCTCTGGAGCAGAAATTTGAAGGAGACTGTTGAAAGCTGAAGGAAAGGGATTTGTTA
QrCAD1 (923)	ATTGAATACATTCCTTTGAGGTGAGCCTCAAGGAAACTGTTGAAAGCTTGAAGGAAAAGAGTTTGTCA
C9/cDNA-AFLP (198)	-----
MdCAD (916)	GTTCGAATTTATCCACTAGATGTTAGCCTCAAGGAAAGAGTTGAAAGCTTGAAGGAAAAGGGTTTGTCA
QsCAD1 (1028)	GTTTAAAGTGT---TGGTAGCACCTGAAGTTCCTGCCAAGTAA--TAAACAATGGTGAAGCATGTTG
EgCAD1 (1046)	AGTTCTGATAGAAAAGTTTCCCAATTCAGAA-ATG-TAATAGGAGGCTTA-TCACCCCTACTGCCGTGTC
QrCAD1 (993)	GTTTAAAGTGT---TGGTAGCACCTGAAGTTCCTGCCAAGTAA--TAAACAATGGTGAAGCATGTTG
C9/cDNA-AFLP (198)	-----
MdCAD (986)	ATTTCTGAGTCA---TTTCAGTAGGGTGAAGATG-TTGAAGTAAATTCAGTCGGGGTAAACATATTA
QsCAD1 (1092)	-CTAGAACCATGCTTTGGTTGGTGTGTTGGTTTAGTAGTCTTCAGCTTGTATGGTGTATTTCTCTTGT
EgCAD1 (1113)	GTTTTCATGAAGT--GTGTTGCACAT--GAACATTTGGTGAAGGCAGGAACACAGATTTTCTGCTTCC
QrCAD1 (1057)	-CTACAACCATTTTGGTTGGTGTGTTGGTTTAGGAGTCTTCAGCTTGTATGGTGTATTTCTCTATAT
C9/cDNA-AFLP (198)	-----
MdCAD (1051)	-TCTGCTTCCAGTTTGTGTTCCGGTT--GGTGACT--TAAACTCCGGTTTCCC--TTTTTGGTTTAA
QsCAD1 (1161)	ATCTATGTAAGCACTACGTTGCTTAGTAAGTTCAGTCCAGACTTTTTCCTATCCATATAAAGGAAATGC
EgCAD1 (1179)	TCCGTACTCGTTCCTATAATAAAGCGAGGAG-TGCCGTGCTGTGTTT
QrCAD1 (1126)	ATCTATGTAAGCACTATGTCGTTAGTAAGTTCAGTCCAGACTTTTTCCTATCCATATAAAGGAAATGC
C9/cDNA-AFLP (198)	-----
MdCAD (1113)	GACTTGCCTTCCAGCTGTTGATTCCATAGATCACCAATTGTGTGTCAGAAATAAAGAAATGAAACCT
QsCAD1 (1231)	TATGCATTTCTTTCTGTTAGATTAAGTAATTACCACCTTAAAAATTATAAGAGCTGTGTGATGGTTAT
EgCAD1 (1226)	-----
QrCAD1 (1196)	TATGCATTTCTTTCTGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-----
C9/cDNA-AFLP (198)	-----
MdCAD (1183)	TTGAATAAAAATCTTGAATTCGTCTGAGTAAAGTGCAGCTCATGCAACTTATCCCATGATAAAAAAAA
QsCAD1 (1301)	TTTGATGTGAATTGGAGAATGATTATGAGAAAGACTATGTACTACTTAATAATAGTCGCTGATGCCGTGA
EgCAD1 (1226)	-----
QrCAD1 (1219)	-----
C9/cDNA-AFLP (198)	-----
MdCAD (1253)	AAAAAAAAAA
QsCAD1 (1371)	TGGTAATTAATAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAA
EgCAD1 (1226)	-----
QrCAD1 (1219)	-----
C9/cDNA-AFLP (198)	-----
MdCAD (1263)	-----

Figura 56. Alinhamento das seqüências de cDNA dos genes *QsCAD1*/AY362455 de *Q. suber*, *QrCAD1* de *Q. rotundifolia*, *MdCAD*/AF053084 de *Malus x domestica*, *EgCAD1*/X88797 de *Eucalyptus gunnii* e do cDNA do fragmento C9 (cDNA-AFLP). Está identificada a seqüência e a localização dos primers C9SP2 e C9SP4, usados para iniciar as amplificações nas direções 3' e 5' do cDNA do gene, por RACE-PCR. As primeiras adeninas da cadeia de poli (A) aparecem inseridas numa moldura. O codão de iniciação ATG e o de terminação TAA ou TGA estão assinalados a amarelo.

II.4.1.2.2. Seqüência de aminoácidos deduzida do cDNA de *QsCAD1*.

O cDNA do gene *QsCAD1* tem 1399 pb e uma região ininterrupta de leitura aberta de 978 pb. Na região não codificante da extremidade 3', de comprimento de 361 pb, está presente, 30 pb a montante da cadeia de poli-adeninas, a seqüência incompleta dum sinal de poliadenilação (AATAA), típico de eucariotas. Na mesma região estão presentes mais dois locais potenciais de poliadenilação com a seqüência completa (AATAAA) (Figura 57). A proteína deduzida desta seqüência tem 326 aminoácidos, foi

denominada cinamil álcool desidrogenase 1 de *Q. suber* (QsCAD1) e pertence à superfamília das 3- β -hidroxiesteroide-desidrogenase/dihidroflavonol-4-redutases (Figura 57).

```

1          M S G G A
1 CAAAACCAAAACGCAATAGGCAGAAAAATCTGAAAGAAAGGAGAAAGAAAAAGGATGAGCGGTGGAGCTG
6 G K I V C V T G A S G Y I A S W L V K L L L N R
71 GGAAGATTGTGTGTGACTGGTGCCTCTGGTTACATAGCTTCATGGCTTGTCAAGCTTCTTCTCAACCG
30 · G Y T V K A S V R D P N D S K K T N H L Q V L
141 TGGTACACAGTCAAGGCCCTGTTCGTGACCCCAATGATTCAAAGAAAAACAACCACTTACAAGTACTT
53 D G A K E R L H L F K A N L L E E G S F D S A
211 GATGGGGCCAAGGAGAGACTTCACCTATTCAAAGCAAATCTACTGGAAGAAGTTCTTTTATTCTGCTG
76 V E G C D G V F H T A S P F Y H N V T D P E A E
281 TTGAGGGCTGTGATGGGGTTTTCCACACTGCATCTCCCTTCTATCATAATGTCACAGACCCAGAGGCAGA
100 · L L E P A V K G T L N V L N S C A K F P S V K
351 ATTACTTGAACCTGCAGTGAAGGGAACACTTAATGTTCTTAATTCCTGTGCGAAATTTCCATCTGTTAAG
123 R V V V T S S M A A V H C N K K A K A P D V V
421 CGGGTAGTTGTGACATCCTCTATGGCTGCAGTTCATGCAATAAAAAAGCTAAAGCTCCTGATGTAGTTG
146 V D E T W F S D P D V C K E T K Q W Y M L S K T
491 TTGATGAGACTTGGTTTTCTGATCCAGATGTTGTAAGGAAACAAAGCAATGGTATATGCTTCAAAGAC
170 · L A E E N V W K F A K E K G I D I V T I N P A
561 GTTGGCTGAAGAAAATGCTGGAAGTTTGCAAAAGAGAAGGGTATTGACATAGTTACAATTAACCTGCA
193 M V I G P L L Q P T L N T S A A A I L N L I N
631 ATGGTGATTGGTCCCTCTCTTACAGCCAACGCTTAACACAAGTGTCTGCGATTTTGAACCTAATAAATG
216 G T H Q T F P N V A F G W V N V K D V A N A H I
701 GAACTCATCAGACATTTCCCAATGTAGCATTGGATGGGTTAATGTCAAAGATGTTGCCAATGCACATAT
240 · Q A Y E I P T A S G R Y C L V E S V I H H S E
771 TCAAGCATATGAAATTCCTACAGCTAGTGAAGATATTGTTGGTTGAGAGCGTTATACACCATTCTGAA
263 V V R V L R K L Y P S V Q L P E K C A D D K P
841 GTTGTGAGGGTTTTACGAAAACCTTATCCCTCTGTACAACCTCCAGAGAAGTGTGCAGATGATAAGCCAT
286 F A P T Y Q V S K E R T R S L G I E Y I P F E V
911 TTGCGCCAACATATCAGGTGTCCAAAGAAAGGACAAGAAGCTTGGGTATTGAATACATTCCTTTTGAGGT
310 · S L K E T V E S L K E K K F I S F *
981 GAGCCTCAAGGAACTGTTGAAAGCTTGAAGGAAAGAAGTTTATCAGTTTTTAAAGTGTGGTAGCACCC
1051 TGAAGTTCCTGCCAAGTAAATAACAATGGTGAGGCATGTTGCCTAGAACCATGCTTGGTTGGTGTGTTG
1121 GTTTTAGTAGTCTTCAGCTTGTATGTTCTCTTTGTATCTATGTATGCACTACGTTGGTTAGTAAC
1191 TTCAGTCCCAGACTTTTTCCTATCCAAATAAAGGAAATGCTATGCATTTCTTTCTGTTTAGATTAAGTA
1261 ATTACCATTAAAAATTATAAGAGCTGTGTGATGGTTATTTTGATGTGAATGGAGAATGATTATGAGA
1331 AAGACTATGTACTACTTAATAATAGTCGCTGATGCCGTGATGGTAATAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 57. Sequência do cDNA de gene *QsCAD1* e sequência em aminoácidos deduzida do cDNA duma potencial cinamil álcool desidrogenase de *Quercus suber* (QsCAD1). O codão de iniciação (ATG) e o de terminação (TAA) estão assinalados a amarelo e os sinais dos locais de poliadenilação (AATAAA e AATAA) estão sublinhados.

QsCAD1 tem uma massa molecular de 35922 Da e um ponto isoelétrico de 7,72, determinados teoricamente. Uma pesquisa realizada nas bases de dados de proteínas revelou que QsCAD1 apresenta uma homologia elevada (> 68 %) com uma cinamil álcool desidrogenase atípica de *Eucalyptus gunnii* (EgCAD1; Goffner *et al.*, 1998) e com uma eutipina-redutase de *Vigna radiata* (VR-ERE; Guillén *et al.*, 1998), duas proteínas deduzidas de cDNA, caracterizadas recentemente. QsCAD1 é muito homóloga também (> 80 % de homologia) à proteína deduzida do gene *MdCAD1*. A sequência do cDNA que codifica *MdCAD1* está presente no GenBank, mas a proteína não foi caracterizada até ao momento, nem existe, qualquer publicação a respeito deste

gene. A homologia em aminoácidos das proteínas deduzidas dos cDNAs de *Q. suber* (QsCAD1) e de *Q. rotundifolia* (QrCAD1) é de 97,2 %.

A proteína EgCAD1 homóloga de QsCAD1 foi isolada de células do xilema de *E. gunnii* e digerida com tripsina (Goffner *et al.*, 1998). A sequência em aminoácidos dos peptídeos resultantes foi determinada e utilizada para definir oligonucleótidos degenerados que foram usados como sondas para pesquisar o cDNA do gene correspondente num banco de cDNA. O transcrito isolado possui 1225 pb e codifica uma proteína de 327 aminoácidos, com uma massa molecular de 35790 Da e um ponto isoelétrico de 8,1. A proteína recombinante expressa em *E. coli* exibe, tal como a proteína nativa, elevada afinidade para com alguns substratos precursores da lenhina nos quais estão incluídos o 4-coumaraldeído e o coniferaldeído. A presença do anel aromático nos compostos não é um requisito estrito para EgCAD1, que pode utilizar como substratos o crotonaldeído e o acetaldeído. A EgCAD1 recombinante é capaz de reduzir, eficazmente, o 3-metoxibenzaldeído, o hidroxicinamalaldeído, o 4-metoxibenzaldeído, o benzaldeído e o cinamaldeído, convertendo-os de forma eficiente nos álcoois respectivos (Goffner *et al.*, 1998). A preferência por aldeídos aromáticos e a incapacidade de reduzir sinapaldeído, um composto precursor da lenhina, são aspectos partilhados por EgCAD1 e ELI3, uma cinamil álcool desidrogenase identificada em *Petroselinum crispum* (Logemann *et al.*, 1997). ELI3 foi considerada uma CAD aromática, relacionada com a defesa das plantas a agentes patogénicos. Na presença de substâncias eliciadoras ocorre indução rápida da expressão do gene *ELI3* em células de *P. crispum*, observada através da acumulação de mRNA.

A estrutura primária de EgCAD1 não apresenta os motivos que caracterizam os domínios conservados das CADs que estão associadas ao metabolismo de fenilpropanoides, verificando-se ausência de homologia no que diz respeito, também, à estrutura secundária. O gene *EgCAD1* expressa-se em tecidos de órgãos onde ocorre lenhificação, por exemplo, nos ramos e em tecidos com conteúdos muito baixos de lenhina, como as folhas (Goffner *et al.*, 1998). Tendo em consideração a actividade catalítica de EgCAD1 *in vitro* e o local onde é expressa a proteína, estes autores consideraram que EgCAD1 talvez pudesse funcionar como uma enzima alternativa da via biossintética da lenhina. Recentemente, estes autores reconsideraram as suas suposições ao verificarem que, nas plantas em que havia inibição parcial da expressão de EgCAD1, não havia alterações nos perfis de lenhina e que ocorriam modificações significativas na morfologia como, por exemplo, redução do tamanho. Consideram,

então, que EgCAD1 possa estar envolvida na produção de substâncias aromáticas relacionadas com a morfogênese (Boudet, 2000).

A outra proteína com a qual QsCAD1 apresenta grande homologia é a VR-ERE, uma enzima redutora da eutipina [4-hidroxi-3-(3-metil-3-buten-1-inil) benzilaldeído], uma toxina produzida por *Eutypa lata*, o agente patogénico causador do declínio da vinha (*Vitis vinifera*) (Tey-Rulh *et al.*, 1991). Teoricamente, durante o período de crescimento da vinha, o micélio do fungo sintetiza a eutipina, que é transportada através do tronco até às regiões herbáceas, onde induz sintomas que incluem ananismo e murchidão dos rebentos, necrose nas margens das folhas, secagem das inflorescências e por fim, morte dos ramos. A eutipina desactiva a fosforilação oxidativa mitocondrial, por aumentar a saída de prótons através de um mecanismo protonóforo cíclico (Deswarte *et al.*, 1996). O nível de sensibilidade, por parte dos hospedeiros, à doença do declínio causado por *Eutypa lata*, depende do genótipo do hospedeiro, tendo-se observado que a tolerância de algumas estirpes estava relacionada com a capacidade que possuíam em converter a eutipina no álcool correspondente, o eutipinol.

Em 1998, Guillén *et al.*, purificaram uma proteína de *Vigna radiata*, uma espécie não hospedeira de *E. lata*, capaz de reduzir a eutipina e sintetizaram o cDNA correspondente. A sequência da proteína deduzida do cDNA corresponde a uma redutase dependente de NADPH, denominada VR-ERE (*Vigna radiata eutypine-reducing enzyme*), com 325 aminoácidos, uma massa molecular de 35,9 kDa e um ponto isoeléctrico de 6,34. A pesquisa de proteínas homólogas a VR-ERE presentes noutras espécies mostrou que a sequência em aminoácidos desta enzima tinha uma homologia de 86,8 % com a da proteína deduzida do cDNA do gene *CPRD14* de *Vigna unguiculata* e de 71,7 % com a sequência de EgCAD1 de *E. gunnii*. A proteína CPRD14 ainda está por caracterizar, desconhecendo-se a função a que está associada, tal como EgCAD1, sabendo-se apenas, que o gene é induzido em situações de desidratação. Tal como EgCAD1, a enzima VR-ERE recombinante foi expressa em *E. coli* e a sua actividade foi testada em vários substratos orgânicos com função aldeído em cadeia linear ou com grupos aromáticos, tais como, decilaldeído, 4-piridina carbaldeído, benzaldeído, salicilaldeído, coniferaldeído, cinamalaldeído. De forma semelhante à EgCAD1, a VR-ERE reduz de forma mais eficiente, os benzaldeídos do que os derivados de cinamilaldeído. A eficiência catalítica da VR-ERE é quatro vezes superior para com a eutipina do que para com o coniferaldeído, que é o segundo substrato com os parâmetros cinéticos mais elevados (Guillén *et al.*, 1998; Colrat *et al.*, 1999).

O alinhamento das sequências em aminoácidos de EgCAD1, VR-ERE, CPRD14, MdCAD1, QsCAD1 e QrCAD1 revela a presença de domínios comuns a todas as enzimas, tais como o bloco de aminoácidos que corresponde ao local de ligação potencial de NAD/NADP(H) (Figura 58)(Perham *et al.*, 1991). A elevada homologia que existe entre as estruturas primárias destas proteínas sugere uma actividade catalítica comum e também, uma função similar. Para além da homologia das estruturas primárias das seis proteínas referidas, elas possuem, também, um número de aminoácidos e uma massa molecular semelhantes e o valor do ponto isoeléctrico varia entre 6,36 (VR-ERE) e 8,19 (EgCAD1). Pressupõe-se, portanto, que QsCAD1 e QrCAD1 catalisam preferencialmente a redução de substratos aromáticos com função aldeído e que são enzimas dependentes de NAD/NADP(H).

Com o auxílio do programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997) pesquisaram-se outras proteínas que tivessem domínios semelhantes a QsCAD1 e QrCAD1, para além das referidas anteriormente, tendo-se observado homologias superiores a 40 % com diidroflavonol-4-redutases (DFR) e cinamoil-CoA redutases (CCR) doutras espécies de plantas. As DFRs foram classificadas como proteínas pertencentes à superfamília das 3- β -hidroxiesteroide-desidrogenase/diidroflavonol-4-redutases que incluem: a 3- β -hidroxiesteroide-desidrogenase que converte, no homem, a pregnenolona em progesterona, uma reacção da via biossintética de hormonas esteróides; as diidroflavonol redutases que estão envolvidas na síntese de pigmentos em plantas; a colesterol-desidrogenase isolada a partir da bactéria *Nocardia* e envolvida em reacções de oxidação-redução de esteróides e, ainda, a UDP-galactose-4-epimerase isolada de *E. coli* e que é responsável pela inversão da configuração do carbono anomérico da galactose (Baker e Blasco, 1992).

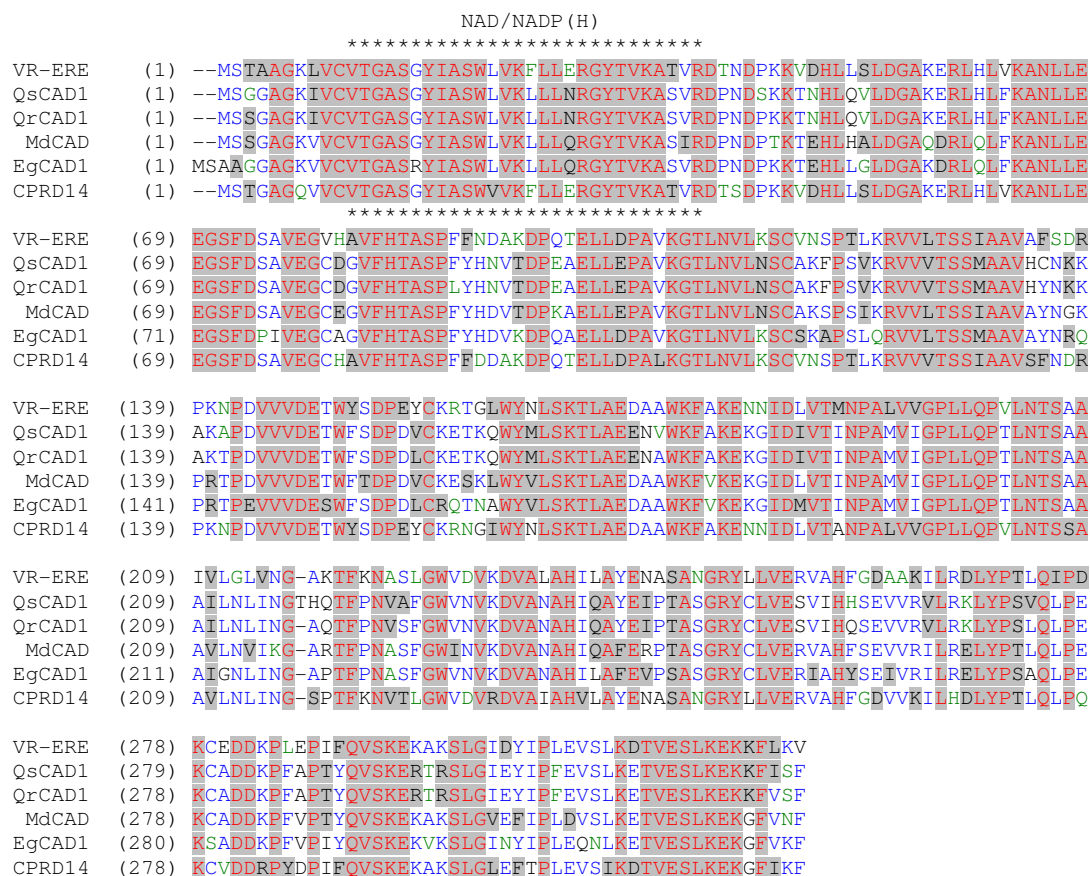


Figura 58. Alinhamento e comparação das seqüências em aminoácidos de VE-ERE (*Vigna radiata*; ID: AAD53967), QsCAD1 (*Quercus suber*; ID: AY362455), QrCAD1 (*Quercus rotundifolia*), MdCAD (*Malus domestica*; ID: AAC06319), EgCAD1 (*Eucalyptus gunnii*; ID: CAA61275), CPRD14 (*Vigna unguiculata*; ID: BAA12161). Os blocos de cor cinzenta indicam as regiões em que os resíduos são idênticos. Na região da extremidade amínica, está assinalado com * o local de ligação potencial do cofactor NAD/NADP(H), entre os aminoácidos 11 e 38 em todas as proteínas, com exceção para EgCAD1.

II.4.1.2.3. Análise filogenética.

A comparação entre as seqüências em aminoácidos das proteínas VR-ERE, QsCAD1, QrCAD1, MdCAD1, EgCAD1 e CPRD14 com as proteínas pertencentes à superfamília das 3- β -hidroxiesteroide-desidrogenase/diidroflavonol-4-redutases revela que estas seis proteínas de plantas formam um novo grupo dentro desta superfamília. A árvore filogenética construída com seqüências de proteínas membros desta superfamília pertencentes a espécies diferentes mostra uma clara distinção entre as seis proteínas com características catalíticas de cinamil álcool desidrogenase e as diidroflavonol-4-redutases (Figura 59). Guillén *et al.* (1998) observaram experimentalmente que a diidroquercitina e a diidromiricetina, dois diidroflavonóides presentes em *Vigna radiata*, não são

substratos de VR-ERE, confirmando a separação desta proteína das enzimas envolvidas nas vias biossintéticas de flavonóides.

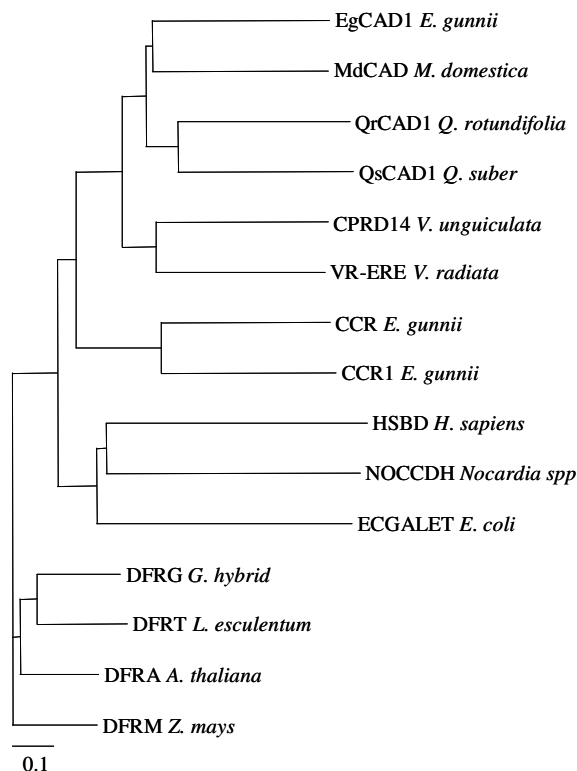


Figura 59. Árvore filogenética construída segundo o algoritmo NJ (*Neighbor Joining*; Saitou e Nei, 1987) que ilustra as relações genéticas que existem entre os membros da superfamília das 3-β-hidroxiesteroide-desidrogenase/diidroflavonol-4-redutases. As sequências usadas e os números de identificação do GenBank/EMBL foram: CCR/*Eucalyptus gunnii*/CAA56103; CCR1/*Eucalyptus gunnii*/CAA66063; CPRD14/*Vigna unguiculata*/BAA12161; VR-ERE/*Vigna radiata*/AAD53967; EgCAD1/*Eucalyptus gunnii*/CAA61275; MdCAD/*Malus domestica*/AAC06319; QrCAD1/*Quercus rotundifolia*; QsCAD1/*Quercus suber*/AY362455; ECGALET/*Escherichia coli*/CAA29573; HSBD/*Homo sapiens*/AAA36015; NOCCDH/*Nocardia sp.*/BAA14290; DFRA/*Arabidopsis thaliana*/AAA32783; DFRG/*Gerbera hybrid*/CAA78930; DFRT/*Lycopersicon esculentum*/CAA79154; DFRM/*Zea mays*/CAA28734.

Uma homologia menos significativa (30 %) foi encontrada entre as seis proteínas do grupo CAD e a vestitona redutase, uma enzima relacionada com a síntese de fitoalexinas e com proteínas redutoras de toxinas codificadas pelos genes de resistência *Hm1* do milho, envolvidos na inativação da toxina HC produzida por *Cochliobolus carbonum* e pelo gene da HC-toxina redutase da cevada, que é um gene homólogo de *Hm1*. A toxina HC actua sobre a histona desacetilase (HD) do hospedeiro. A inibição da enzima HD pela toxina tem influência na expressão dos genes envolvidos na resposta de defesa por parte do hospedeiro (Brosch *et al.*, 1995).

Considerando o alinhamento das sequências de todas as proteínas dos genes mencionados, verifica-se que a região da extremidade amínica é a mais conservada e que é nos primeiros 50 aminoácidos que se localiza o domínio do local de ligação potencial de NAD/NADP(H) (Figura 60).

		22	42
CCR	<i>E. gunnii</i>	(15)	VTGAGGFIASWTVKLLLERGY
CCR1	<i>E. gunnii</i>	(15)	VTGAGGFIASWTVKLLLERGY
CPRD14	<i>V. unguiculata</i>	(11)	VTGASGYIASWTVKFLLERGY
DFRA	<i>A. thaliana</i>	(10)	VTGASGFVGSWLVMRLLERGY
DFRG	<i>G. hybrid</i>	(11)	VTGAAGFVGSWLVMRLLERGY
DFRM	<i>Z. mays</i>	(15)	VTGASGFVGSWLVMKLLQAGY
DFRT	<i>L. esculentum</i>	(22)	VTGGAGFVGSWLVMRLLERGY
ECGALET	<i>E. coli</i>	(5)	VTGGSGYVGSHTCVQLLQNGH
EgCAD1	<i>E. gunnii</i>	(13)	VTGASRYIASWLVKLLLQRGY
HCTR	<i>H. vulgare</i>	(20)	VTGGAGFVGSWLVKLLLEAGY
HM1	<i>Z. mays</i>	(13)	VTGGAGFVGSWLVKLLLEKGY
HSBD	<i>H. sapiens</i>	(8)	VTGAGGFLGQRIIRLLVKEKE
MdCAD	<i>M. domestica</i>	(11)	VTGASGYIASWLVKLLLQRGY
MZETOXR	<i>Z. mays</i>	(13)	VTGGAGFVGSWLVKLLLEKGY
NOCCDH	<i>Nocardia sp.</i>	(15)	VTGGSGFVGANLVTELLDRGY
QrCAD1	<i>Q. rotundifolia</i>	(11)	VTGASGYIASWLVKLLLNRY
QsCAD1	<i>Q. suber</i>	(11)	VTGASGYIASWLVKLLLNRY
VESRED	<i>M. sativa</i>	(10)	VTGGTGFVGSWLVKLLLENGY
VR-ERE	<i>V. radiata</i>	(11)	VTGASGYIASWLVKFLLERGY
Consensus		(22)	VTGASGFVGSWLVK LLERGY

Figura 60. Alinhamento múltiplo das sequências em aminoácidos do domínio do local de ligação potencial de NAD/NADP(H) localizado nos primeiros 50 aminoácidos da extremidade amínica. Incluíram-se no alinhamento todas as sequências referenciadas na legenda da figura da árvore filogenética e também, as sequências dos genes da vestítone redutase (VESRED/*Medicago sativa*/AAB41550), HC-toxina redutase (HCTR/*Hordeum vulgare*/AAC49674), HC-toxina redutase (HM1/*Zea mays*/T01434) e NADH-HC toxina redutase (MZETOXR/*Zea mays*/AAA33517).

A questão mais relevante e, também, a mais intrigante, é saber qual a função das novas cinco CAD identificadas para além de VR-ERE, que foi caracterizada como uma proteína do sistema de defesa de *Vigna radiata*, capaz de destoxificar toxinas do tipo da eutipina.

Até ao momento, as substâncias como a eutipina ou a toxina-HC têm sido descritas como toxinas específicas, por só serem activas nas plantas que servem de hospedeiros para os fungos que as produzem. São normalmente moléculas de pequena massa molecular, tais como metabolitos ou proteínas produzidas por fungos. São essenciais para a patogenicidade, não ocorrendo doença na ausência da toxina, que tem, por norma, como alvo, uma proteína codificada por um gene dominante único (Wolpert *et al.*, 2002).

A resistência ou insensibilidade às toxinas está relacionada com determinados génotipos dos hospedeiros que possuem genes de resistência dominantes que codificam

para enzimas capazes de converter as toxinas em produtos não tóxicos para as células. *Cochliobolus carbonum* é um fungo que infecta especificamente a planta do milho (*Zea mays*) e é a única espécie de fungo conhecida que produz a toxina HC. As estirpes de milho resistentes possuem o gene *Hm1* que codifica para uma HC-toxina redutase dependente de NADPH, capaz de inactivar a toxina. Actualmente, a especificidade atribuída às reacções de compatibilidade com origem na produção de toxinas por parte dos fungos está a ser posta em causa. Recentemente, foram identificados genes do tipo-*Hm1*, em espécies não hospedeiras de *C. carbonum*, como na cevada (*Hordeum vulgare*), que codificam proteínas do tipo HC-toxina redutases e a expressão dos mRNAs destes genes foi detectada nas folhas, inflorescências e embriões não maduros das plantas (Han *et al.*, 1997). Também, no que diz respeito à eutipina se verificou que a conversão da eutipina em eutipinol não é restrita a algumas variedades de vinha e que existem outras espécies de plantas não hospedeiras de *Eutypa lata*, tais como *Vigna radiata*, *Daucus carota* e *Eucalyptus gunnii* que são capazes de metabolizar a toxina (Guillén, *et al.* 1998).

É possível que genes do tipo-*Hm1* ou do tipo-*VR-ERE*, presentes noutras espécies de plantas, tenham como função biológica a inactivação de toxinas produzidas por fungos que infectem essas plantas, de maneira análoga à observada até agora com *C. carbonum* e *E. lata*. Do mesmo modo, a transferência de genes do tipo-*Hm1* ou tipo-*VR-ERE* para plantas hospedeiras de *C. carbonum* ou *E. lata* pode torná-las resistentes a infecções provocadas por estes agentes patogénicos. Esta hipótese foi confirmada em *Vitis vinifera* relativamente ao gene *VR-ERE* isolado a partir de *Vigna radiata*, uma espécie não hospedeira de *E. lata*. O cDNA de *VR-ERE*, identificado em *V. radiata*, foi inserido no genoma de células Gamay de *Vitis vinifera*, uma espécie susceptível a *E. lata*, através de transformação mediada por *Agrobacterium* e a proteína foi expressa nas plantas transgénicas, em grande quantidade (Guillén *et al.*, 1998). A sobreexpressão de *VR-ERE* nas células da espécie susceptível a *E. lata* conferiu-lhe um fenótipo de resistência. Anticorpos policlonais contra *VR-ERE* detectaram uma proteína homóloga nos extractos de células não transformadas de *V. vinifera*, que parecia expressar-se de forma constitutiva e que apresentava uma actividade redutora de eutipina muito inferior à determinada nas células transformadas, incapaz de conferir resistência ao fungo (Guillén *et al.*, 1998).

Parece, portanto, evidente que as cinco proteínas (CPRD14, EgCAD1, MdCAD, QrCAD1, QsCAD1) agrupadas com *VR-ERE* tenham como função biológica comum a desactivação de toxinas do tipo da eutipina, produzidas por fungos patogénicos. Deste

modo, postula-se que, na interacção que ocorre entre *Q. suber* e *P. cinnamomi*, haja produção de toxinas do tipo-eutipina por parte do patogénio, que podem ser desactivadas pela enzima QsCAD1 produzida pelo hospedeiro.

Aspectos relacionados com a forma como a doença do declínio se manifesta confirmam a possibilidade de *P. cinnamomi* produzir toxinas ou factores de patogenicidade durante a sua interacção com o sobreiro. A ocorrência de morte súbita nos sobreiros é acompanhada de sintomas aparentes de seca repentina, numa ou duas estações, que incluem, amarelecimento das folhas, secagem dos ramos, desfolha parcial e necrose nas raízes mais grossas (Brasier *et al.*, 1993). Por vezes, os ramos já secos ainda mantêm as folhas secas agarradas. Sugere-se que a causa deste tipo de declínio seja determinada por dois factores: primeiro, pela produção de toxinas pelo fungo durante a infecção, que migram através da seiva para a copa das árvores, actuando longe do local de infecção e, segundo, pela incapacidade do hospedeiro para desactivar a toxina. A incapacidade de transformar a toxina num produto não tóxico para a planta pode estar relacionada com a ausência do gene *QsCAD1*, com uma regulação ou processamento deficientes do mRNA ou ser devida a mutações que resultem em isoformas não funcionais para a função de destoxificação. O apoio a esta última hipótese surge dos resultados da análise efectuada por cDNA-AFLP às folhas de sobreiros localizados em locais infestados, que apresentavam vários graus de desfoliação. O fragmento polimórfico C9 do gene *QsCAD1*, identificado por cDNA-AFLP, foi isolado do sobreiro BS222A-4 que sofreu morte súbita e está ausente nos sobreiros de grau de desfoliação 0 (ausência de doença) e 3 (declínio lento). Tal como já foi referido no ponto II.4.1.2.1., a comparação da sequência nucleotídica do fragmento C9 com a do cDNA do gene *QsCAD1*, obtido, posteriormente, a partir de raízes infectadas doutros sobreiros, mostra que só existe homologia elevada entre as duas sequências até ao nucleótido 111 do fragmento polimórfico (Figura 61).

Os cDNAs foram obtidos a partir de mRNAs isolados de órgãos diferentes, o que levanta a questão da possível especificidade na produção da enzima nas folhas ou raízes. No entanto, os genes envolvidos na desactivação de toxinas, que podem migrar através dos diferentes órgãos das plantas, podem ser activados nos vários órgãos constituintes da planta. Em *E. gunnii*, por exemplo, a proteína EgCAD1 foi identificada em folhas e em ramos (Goffner *et al.*, 1998).

QsCAD1	(211)	GATGGGGCCAAGGAGAGACTTCACCTATTCAAAGCAAATCTACTGGAAGAAGGTTCTTTTGATTCTGCTG
C9/cDNA-AFLP	(1)	-----ACCTATTCAAAGCAAATCTACTGGAAGAAG-TTCTTTTGATTCTGCTG
QsCAD1	(281)	TTGAGGGCTGTGATGGGGTTTTCCACACTGCATCTCCCTTCATCATAATGTCACAGACCAGAGGCAGA
C9/cDNA-AFLP	(48)	TTGAGGGCTGTGATGGGGTTTTCCACACTGCATCTCCCTTC-ATCATAATGTCACAGACCAGAGATTGA*
QsCAD1	(351)	ATTACTTGAAACCTCCAGTGAAGGGAACCTTAAAGTTCATTCTGTCCGAAATTTCCATCTGTAAAG
C9/cDNA-AFLP	(117)	A---GTTCCAGAGAACGTAAGGCTGAAATGTTTACATTAATGGATAGGATATTCTTCAATTCAA
QsCAD1	(421)	GGGTAGTTGTGACATCCTCTATGGCTGCAGTTTCATTGCAATAAAAAAGCTAAAGCTCCTGATGTAGTTG
C9/cDNA-AFLP	(184)	CATCAATTTGGGT-----

Figura 61. Alinhamento das sequências de cDNA do gene *QsCAD1* e do fragmento C9 obtido na análise do mRNA por cDNA-AFLP. As duas sequências apresentam homologia elevada até ao nucleótido 111 do fragmento C9, assinalado com um *.

II.4.1.2.4. Expressão de *QsCAD1* em raízes de *Q. suber*.

A relação do gene *QsCAD1* com a patogenicidade e, em particular, com a interacção com *P. cinnamomi*, foi confirmada pela análise do padrão de expressão do gene por RT-PCR e hibridação. A partir de 2 µg de RNA total extraído de raízes de *Q. suber* não infectadas e de raízes que estiveram em contacto directo com o micélio do fungo durante 24 horas, foi sintetizado cDNA com início na cadeia de poli-A por um oligonucleótido composto por 18 timinas e uma sequência de 36 bases conhecida (ver II.3.3.). A solução de cDNA foi diluída de 1:50, 1:100 e de 1:200 e foi usada em reacções de amplificação com o *primer* específico C9SP4 e com um *primer* que se hibrida na região complementar à do oligonucleótido usado para iniciar a síntese de cDNA. Foi também amplificado um fragmento do gene da actina com cerca de 500 pb, que serviu de controlo negativo nas reacções de hibridação. Os produtos da amplificação foram separados por electroforese em gel de agarose, transferidos para uma membrana e detectados por hibridação com uma sonda marcada com digoxigenina, específica e interna ao fragmento amplificado (ver II.3.3.).

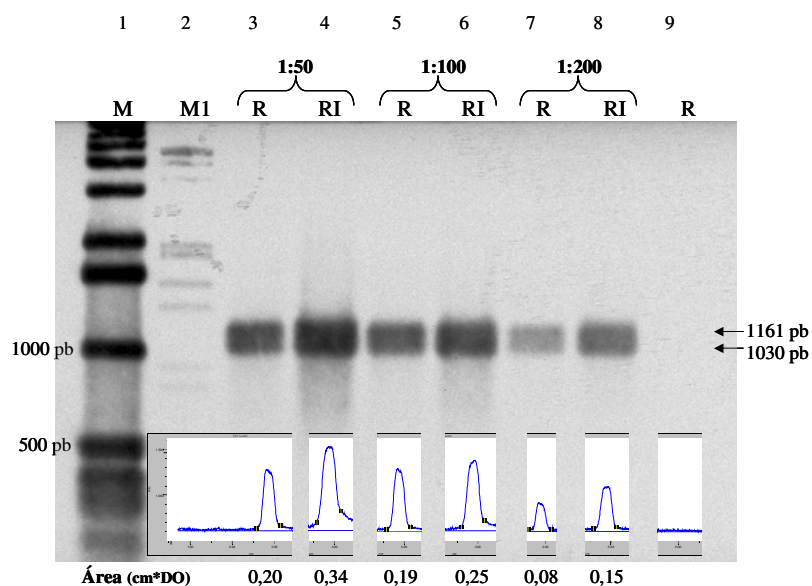
A intensidade do sinal de hibridação emitido foi medida por densitometria; as diferenças registadas entre as absorvências obtidas a partir do produto RT-PCR proveniente, por um lado, de raízes infectadas, e por outro lado de raízes não infectadas, estão directamente relacionadas com a quantidade de mRNA de *QsCAD1* acumulado nas raízes (Figura 62A e B). Este tipo de análise semi-quantitativa combina a síntese de cDNA a partir de mRNA e a amplificação de fragmentos de cDNA específicos dos genes cuja expressão se pretende analisar. A elevada sensibilidade associada aos dois processos enzimáticos realizados em cadeia permite a detecção de mRNAs pouco representados, mRNAs extraídos a partir de um número pequeno de células ou pequenas

quantidades de tecidos ou mRNAs que se expressam em misturas de células com proveniências distintas (Köhler *et al.*, 1995; Menke e Mueller-Roeber, 2001; Baugh *et al.*, 2001). O método parece ser o mais adequado para estudar a expressão de genes em raízes de plantas lenhosas, porque a quantidade de mRNA extraído a partir das raízes é sempre muito pequena e insuficiente para análise por *Northern blot*. A análise por RT-PCR e hibridação permite utilizar extractos de mRNA fortemente diluído, de forma que a diluição concomitante de ácidos e fenóis presentes nas raízes com necroses, impede que interfiram com as reacções enzimáticas. A especificidade da amplificação foi testada por hibridação com sondas dirigidas para o cDNA correspondente ao gene cuja expressão se estava a analisar, verificando-se ausência de hibridação com o fragmento amplificado do gene da actina, o que comprova a ausência de contaminações. A realização da reacção com várias diluições do cDNA permitiu confirmar, de forma semi-quantitativa, a eficácia e sensibilidade do método e apresenta-se como um pré-requisito para a quantificação do número absoluto de moléculas de mRNA.

A figura 62A mostra que foram amplificados e detectados por hibridação dois fragmentos do cDNA de *QsCAD1* com tamanhos superiores a 1000 pb. No início da caracterização do cDNA do gene *QsCAD1* fez-se referência à presença de mais de um sinal de poliadenilação na região 3' não transcrita (Figura 57). Dos dois fragmentos amplificados, um deles corresponde ao tamanho previsto pela sequência do cDNA de *QsCAD1* com o sinal de poliadenilação AATAA (Figura 57) e o outro fragmento pode corresponder a outro alelo ou a outro gene *QsCAD1* que termine num dos outros sinais de poliadenilação identificados. Em *E. gunnii*, após pesquisa realizada num banco genómico com sondas específicas para EgCAD1, só foram identificadas duas cópias do gene homólogo a *QsCAD1*, que diferem ligeiramente nas regiões codificantes (Goffner *et al.*, 1998).

Na leitura, por densitometria, da intensidade do sinal, foram consideradas as duas bandas de hibridação em conjunto. A intensidade do sinal, determinada pela integração da área, definida pelo pico de absorvência, é superior nas raízes infectadas em todas as diluições, havendo, como era de esperar, um decréscimo de sinal com o aumento da diluição (Figura 62B). O aumento da intensidade do sinal observado nas raízes infectadas, relativamente às não infectadas, reflecte a presença de um maior número de transcritos de *QsCAD1* disponíveis para serem amplificados, nas raízes infectadas e mostra, portanto, que a expressão de *QsCAD1* aumentou nas primeiras 24 horas de interacção entre *Q. suber* e *P. cinnamomi*.

A



B

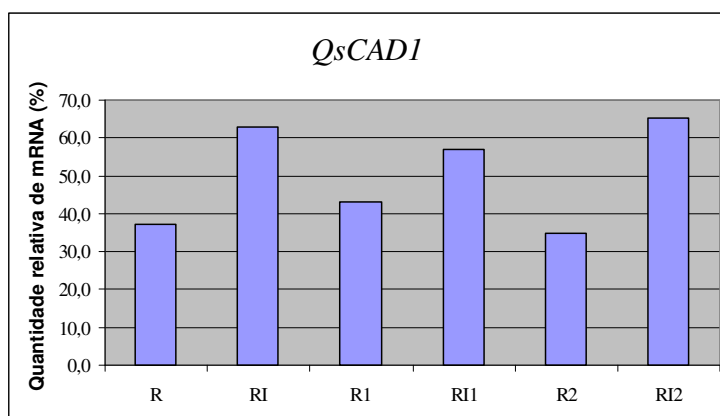


Figura 62. Análise do padrão de expressão do gene *QsCAD1* em raízes de *Q. suber*, antes e após 24 h de contacto com *P. cinnamomi*, realizada por RT-PCR e hibridação com uma sonda específica, marcada com digoxigenina.

A: Os fragmentos amplificados e detectados pela sonda têm tamanho superior a 1000 pb, por comparação com os marcadores de massa molecular M e M1. De acordo com a sequência nucleotídica do cDNA do gene *QsCAD1* poderão ter 1161 pb e 1030 pb. Nos canais 3 e 4 figuram os resultados das amplificações realizadas a partir de uma solução de cDNA de raízes não infectadas (R) e de raízes infectadas (RI), diluída 50 vezes. Canais 5 e 6 referem os resultados das diluições 1:100 e 7 e 8 das diluições 1:200. O canal 9 mostra que a sonda dirigida a *QsCAD1* não reconheceu o fragmento amplificado da actina. A intensidade do sinal emitido após hibridação foi medido por densitometria e os valores da integração das áreas, delimitadas pelos picos de absorvência, figuram na base das imagens dos respectivos picos de absorvência.

B: Gráfico de barras com as quantidades relativas, em percentagem, de mRNA de *QsCAD1*, deduzidas dos valores das absorvências, obtidos para o cDNA. R e RI: diluição de cDNA 1:50; R1 e RI1: diluição de 1:100; R2 e RI2: diluição de 1:200.

De acordo com o exposto relativamente ao gene *QsCAD1*, tendo em consideração os resultados obtidos neste trabalho e a comparação efectuada com genes homólogos a *QsCAD1* presentes noutras espécies de plantas, avançam-se as hipóteses seguintes:

- *QsCAD1* é o gene do sobreiro que codifica uma cinamil álcool desidrogenase dependente de NAD/NADP(H) que catalisa preferencialmente substratos aromáticos com função aldeído;
- a enzima é potencialmente responsável pela redução de toxinas do tipo-eutipina produzidas, eventualmente, por *P. cinnamomi*;
- a expressão do gene que codifica a enzima *QsCAD1* aumenta nas raízes de *Q. suber* nas primeiras 24 horas de contacto com o fungo;
- a morte súbita dos sobreiros infectados por *P. cinnamomi* está potencialmente associada à incapacidade da árvore para reduzir a toxina;
- o fragmento polimórfico C9 do gene *QsCAD1* é um potencial marcador de susceptibilidade do sobreiro ao declínio por morte súbita.

Nos casos de declínio lento, os sobreiros possuiriam o gene *QsCAD1* que codifica para uma enzima capaz de desactivar uma toxina e a manifestação dos sintomas estaria relacionada com o reconhecimento do fungo por parte do hospedeiro e com a rapidez com que se processa a activação do gene *QsCAD1*. Para além de toxinas, *P. cinnamomi* deve produzir factores de avirulência, que podem ser, por exemplo, as elicinas, que ao serem reconhecidas pelo hospedeiro, desencadeiam uma resposta de defesa num mecanismo em série, com produção de factores de transcrição responsáveis pela activação de genes relacionados com a patogénese. Uma deficiência nos receptores ou nas moléculas que detectam os factores de avirulência vai certamente influenciar a velocidade de resposta por parte do hospedeiro. A presença de mutações nos promotores dos genes de *QsCAD1* pode impedir o reconhecimento dos factores envolvidos na activação da transcrição destes genes, mantendo, conseqüentemente, a produção da enzima ao nível detectado nas raízes não infectadas. Esta hipótese relativamente à doença do declínio será retomada mais adiante, depois de caracterizados todos os genes que foram identificados neste trabalho e que estão relacionados com os aspectos moleculares da interacção entre *Q. suber* e *P. cinnamomi*.

II.4.1.3. Gene que codifica uma proteína de resistência de *Q. suber* (*QsRPs*).

II.4.1.3.1. Sequências de quatro alelos do gene *QsRPs* de *Q. suber*.

Na análise por cDNA-AFLP foi identificado o fragmento C3, com 263 pb, em raízes de *Q. rotundifolia* infectadas com *P. cinnamomi*. A expressão do gene correspondente a este fragmento aumenta durante as primeiras 24 horas de interacção entre o hospedeiro e *P. cinnamomi*. A sequência nucleotídica de C3 apresenta uma semelhança de 68 %, em 155 nucleótidos, com um pseudogene do tipo NBS-LRR (*nucleotide binding site-leucine rich repeat*) de *Phaseolus vulgaris* (AF098969) e uma semelhança menor (66 % em 93 nucleótidos) com o *locus I2C-4* do complexo de resistência de *Lycopersicon esculentum* (AF004881).

Os genes do tipo NBS-LRR estão envolvidos no reconhecimento de agentes patogénicos e na activação dos mecanismos de defesa. Podem funcionar como receptores que interagem directa ou indirectamente com os produtos dos genes de avirulência, providenciando uma detecção precoce da infecção. Normalmente, a interacção que ocorre entre os produtos dos genes de resistência e os factores de avirulência segue a regra *gene-for-gene*. Cada gene de resistência controla a resposta de defesa contra uma espécie de agentes patogénicos e, com alguma frequência, contra estirpes específicas desses agentes (Hammond-Kosack e Jones, 1997). Tendo em consideração que o gene relativo a C3 podia corresponder a um gene de resistência específico da interacção com *P. cinnamomi*, definiram-se dois *primers* nesta sequência para amplificar, por RACE-PCR, o cDNA do gene homólogo em *Q. suber*. Com os mesmos *primers* (C3SP1; C3SP4) preparou-se uma sonda com 116 pb, que foi usada para escrutinar o gene num banco genómico de *Q. suber*, preparado no bacteriófago λ .

A primeira sequência parcial dum gene que codifica uma proteína de resistência do tipo NBS-LRR, em *Q. suber*, foi obtida a partir do banco genómico. O clone recombinante possuidor do fragmento de DNA correspondente foi identificado por hibridação com a sonda de 116 pb e o gene de resistência ao qual pertence a sequência foi denominado *QsRPs* (gene de resistência de *Q. suber* a *P. cinnamomi*). O clone positivo não foi isolado e a sequência parcial do gene foi obtida a partir dum fragmento amplificado. A reacção foi iniciada com os *primers* T7 e C3SP1 dirigidos para uma região do vector e do inserto, respectivamente. O DNA utilizado era constituído por

uma mistura de DNAs provenientes de vários clones, incluindo o portador do inserto pretendido. O fragmento amplificado foi clonado no vector PCRII-Topo e a sequência foi determinada.

A sequência nucleotídica parcial do gene *QsR_{Pc}* tem 2221 pb e é delimitada em 5' pela sequência do local de restrição da enzima *Sau3AI* e em 3' pela sequência do *primer* C3SP1 (Figura 63). O gene está interrompido no local de restrição da enzima *Sau3AI*, usada na construção do banco genómico. Não foram observados intrões na sequência parcial do DNA genómico de *QsR_{Pc}*.

```

1 GATCAAATTTACTGGAAGGAATGCCICTAAGCATAGGTAATTTGACTTGTCTCCAACATTGTCCAACCTTGTGTGGGC
  Sau3AI
81 AAAGCAGATAGTTTGTGTGTAATAAGAGAGCTAGGGCCCTTGGTGCATCTTCGAGGGACGCTCTGCATCTCAAATTTGGA
161 GAATGTAACATAAGCTCAGGAGCAAGAGACAGTTATTTATATGGCAAGCAAGACCTTAATGAGGTTGTGATGGAATGGA
241 GTAGCAACCTTAATGAATCAGAAGATGAAGAAACCCAGTTGGAAGTACTTAACATGCTACAGCCTAATGTGAAGTTGAAG
  PR3
321 GAGCTTACTGTGAAGTGTATGGTGGAAACCAAATCCCAACTGGATAGGAGATCCTTCATTTTCTAATTTAGTGTCTCT
401 AAGGTTTAAAAATTTGTGATAAATGCAATTCCTTGCCACCAGTTGGGCAACTACCCCTTCTCAAAGATCTTCTCATTAAG
481 GAATGGCTGGAGTGAAGAGTGTGGCCGGGAGTTTTATGGGGAAAGTTGCTCGAGACCTTTTCAATCCTTGGAGACTTTA
  PR1
561 CATTTTGAGAATATGCCAAGATGGGAAAAATGGATTCTCTTGGAGTTAGTGAAGCATTGCTTGGTTCGTAAGCTTTTC
641 AATCATAAGATGCCATAATCTGGTGAGAAAAATGCCAGACCATCTTCCTTCATTAATAAAGCTTGTGATTCATGGATGTT
721 GGAATTTGGTAGTTTCAGTTTCAAACCTACCAATGCTGTGTGTATTAGCAATTGAGGGATACAAAAGAGTGGAGTGTGAA
801 AGTTCAGTTGGCTTTGGCTCACCATACTCCATGGTTTTTTCAAAAATTTAGAGTTTGGACATGTAACAGCAGGGTTAAT
881 GCATGGAGTAAGTAAAGTAGAATATTTGAAGATTGTTGATTCTGAAAACTCAAACTTTGTGGGAGAAGATACCTGAAG
961 GGTGACAGACTCAAATTCCTACGAGAGCTTCTATTGAAGACTGCCAACACTAGTTTCTTCCAGCATCTGGTTTTT
1041 CCATCCATGCTGAAAGTAATTCAAATAAAAAGCTGCAGTGGTCTGAAATCCTTACTACCAGAGGGAACGTTGCACAGCAG
1121 AGAAAAATGCATGCTTTGTGCGGTTGTGTGTTGTTGTTGTTGATTCTATGAAGTCCATTGCCAGAGGACAGCTACCAACAA
1201 CTCTAAAAGGTTGGAGATATCTCATTGTATGAATTTGCAGTGTGCGCTAGACGAGGGAGGGTTCTTCTTCTTCTTCA
1281 GTGATGCATGATGAGGATATCAACAACAGAAGCAAACATCATCTTCACTACTTAGACATCAAATCATGTCATCTCTCAC
  PR2
1361 AACCTTAACTTCAAGTGGCAAGTTACCCGCCACGCTTACACACCTCCTTCTGAGGGAATGCCAAAAGCTCATGTGTTTTGT
1441 CATCAACAGGTAATTTGCCAGCAGCACTTCAATACCTTGAGATTCAATCAATCCAAAGCTGCAGAAAAATAGCAGAGAGG
1521 TTGCACCAGAACACATTCCCTTGAATGCATTAAGATTTGGAATTGCCATGGCCTTAAATCTTTGCCGGAGGATCTACACAA
1601 CCTCAGCAAACCTCGCCAGTTTCAAATGTTTGGTGTACAAGTTTTTCTTCTCCAGCAGCAGGGTTACCTTCAAACC
1681 CGAGAGTTCTCGGGATCAAAAACCTGTAAGAATCTCAAGGCCTTACCTAACGGTATGCGCAACCTCACTTCTTCAA AAAA
1761 TTGGATATATCTAACCGTCTAGACAGTCTGCCCTCTCCACAAGAGGGTTTACCTACCAACCTAATAGA ACTTAAATGAT
1841 TGACCTGAAGTTCTACAACCAATGTTTGAAGTGGGGTTGCAACAACCTCACTTCTTATAAAA ACTCTCCATTGATGGTG
1921 AATGTCTAGATGTTGATTCCTTTCCAGGTGAGAGGGAGAATGGGGCCATGATGCTGCTGCCAAACTCTCTCTCCATCCTA
2001 TGCATTTCAATTTTCAAACCTGGAATGCTCTCCCAAGGGGTTTCAAACCTCACATCTTAAACCAACTAAAGAT
2081 CTATAATTGCCTAAAGCTCACATCCTTACCAAGGAGGCGCTGCCCTCCCTCACTTACACA ACTTGAATCCGTAATTGTC
  C3SP4
2161 CTCTGCTAAGTCAACATTGCAATAATGAGAAAGGACAAGAGTGGTCCAAGATAGCTCACAT
  C3SP1

```

Figura 63. Sequência nucleotídica parcial do gene de resistência de *Q. suber* isolado a partir de um banco genómico. A sonda usada para escrutinar o gene foi preparada com os *primers* C3SP1 (reverso) e C3SP4 (directo). Na figura, estão identificadas as sequências de vários *primers* que foram escolhidos neste fragmento e usados em reacções de amplificação a partir de cDNA e DNA genómico; PR1 (directo), PR2 (reverso), PR3 (directo), PR5 (directo); PR6 (reverso). O local de restrição da enzima *Sau3AI* está assinalado.

Em *Q. suber*, para além desta sequência, foram identificadas mais três sequências que correspondem a alelos do mesmo gene. O conhecimento de que existiam, pelo menos, quatro alelos do gene *QsR_{Pc}* provém dos perfis de restrição obtidos em 144 sobreiros, resultantes da análise por PCR-RFLP que será discutida mais

adiante. Na figura 64 estão alinhadas as sequências das regiões comuns aos quatro alelos (*a*, *b*, *c* e *d*), determinadas neste estudo. Os fragmentos dos alelos *b*, *c* e *d* sequenciados estão delimitados pelos *primers* PR2 e PR3 e têm 1078, 1079, 1078 pb, respectivamente. O alelo *a* corresponde à sequência obtida a partir do banco genômico e o comprimento do fragmento entre os *primers* PR2 e PR3 é de 1081 pb.

Até ao momento, já foram identificados mais de 30 genes de resistência em plantas, pertencentes, quase todos, a famílias multigênicas organizadas em grupos complexos, mas nenhum no gênero *Quercus* (Jones, 2000). As sequências de DNA dos genes do tipo NBS-LRR apresentam-se desprovidas de intrões na região codificante. Tem-se observado que as sequências intrônicas estão localizadas, em alguns genes de resistência, nas regiões 5' e 3' que antecedem o ATG de iniciação e que precedem o codão de terminação TAA. Recentemente foram analisadas as sequências de quatro genes de resistência potenciais de *Phaseolus vulgaris*, pertencentes a duas subfamílias com origem num *locus* ancestral denominado *cluster B4* (Ferrier-Cana *et al.*, 2003). A comparação das quatro sequências do cDNA com as sequências correspondentes do DNA genômico revelou a existência de sequências intrônicas na região 3' não traduzida de todos os genes. Os intrões apresentam homologias de 97,4 % em três dos genes e de 36,8 % entre estes e o quarto gene. O mesmo tipo de organização foi observado na família de genes do *locus I2* do tomate, que confere resistência à estirpe 2 do fungo patogênico do solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Simons *et al.*, 1998). Neste *locus* foram identificados sete genes homólogos, dos quais, segundo estes autores, apenas um (*I2*) confere resistência ao agente patogênico. No gene *I2*, estão presentes um intrão na região 5' UTR (5' *untranslated region*) e dois intrões na região 3' UTR.

		1	70
QsRPC-alelo a	(1)	CCCAGTTGGAAGTACTTAACATGCTACAGCCTAATGTGAAGTTGAAGGAGCTTACTGTGAAGTGCATGG	
QsRPC-alelo b	(1)	CCCAGTTGGAAGTCTTAACATGCTACAGCCTAATGTGAAGTTGAAGGAGCTTACTGTGAAGTGCATGG	
QsRPC-alelo c	(1)	CCCAGTTGGAAGTCTTAACATGCTACAGCCTAATGTGAAGTTGAAGGAGCTTACTGTGAAGTGCATGG	
QsRPC-alelo d	(1)	CCCAGTTGGAAGTCTTAACATGCTACAGCCTAATGTGAAGTTGAAGGAGCTTACTGTGAAGTGCATGG	
		71	140
QsRPC-alelo a	(71)	TGGAACCAAATCCCAACTGGATAGGAGATCCTTCATTTTCTAATTTAGTGCTCCTAAGGTTGAAAAAT	
QsRPC-alelo b	(70)	TGGAACCAAATCCCAACTGGATAGGAGATCCTTCATTTTCTAATTTAGTGCTCCTAAGGTTGAAAAAT	
QsRPC-alelo c	(70)	TGGAACCAAATCCCAACTGGATAGGAGATCCTTCATTTTCTAATTTAGTGCTCCTAAGGTTGAAAAAT	
QsRPC-alelo d	(70)	TGGAACCAAATCCCAACTGGATAGGAGATCCTTCATTTTCTAATTTAGTGCTCCTAAGGTTGAAAAAT	
		141	210
QsRPC-alelo a	(141)	TGTGATAAATGCAATTCCTTGCCACCAGTTGGGCAACTACCCTTTCTCAAAGATCTTCTCATTAAGGAA	
QsRPC-alelo b	(140)	TGTGATAAATGCAATTCCTTGCCACCAGTTGGGCAACTACCCTTTCTCAAAGATCTTCTCATTAAGGAA	
QsRPC-alelo c	(140)	TGTGATAAATGCAATTCCTTGCCACCAGTTGGGCAACTACCCTTTCTCAAAGATCTTCTCATTAAGGAA	
QsRPC-alelo d	(140)	TGTGATAAATGCAATTCCTTGCCACCAGTTGGGCAACTACCCTTTCTCAAAGATCTTCTCATTAAGGAA	
		211	280
QsRPC-alelo a	(211)	TGGCTGGAGTGAAGAGTGTGGCCGGAGTTTTATGGGGAAAGTTGCTCGAGACCTTTTCAATCCTTGGA	
QsRPC-alelo b	(210)	TGGCTGGAGTGAAGAGTGTGGCCGGAGTTTTATGGGGAAAGTTGCTCGAGACCTTTTCAATCCTTGGA	
QsRPC-alelo c	(210)	TGGCTGGAGTGAAGAGTGTGGCCGGAGTTTTATGGGGAAAGTTGCTCGAGACCTTTTCAATCCTTGGA	
QsRPC-alelo d	(210)	TGGCTGGAGTGAAGAGTGTGGCCGGAGTTTTATGGGGAAAGTTGCTCGAGACCTTTTCAATCCTTGGA	
		281	350
QsRPC-alelo a	(281)	GACTTTACATTTTGAGAAATATGCCAAGATGGGAAAAATGGATTTCCTTTGGAGTTATGAAGCATTGTCT	
QsRPC-alelo b	(280)	GACTTTACATTTTGAGAAATATGCCAAGATGGGAAAAATGGATTTCCTTTGGAGTTATGAAGCATTGTCT	
QsRPC-alelo c	(280)	GACTTTACATTTTGAGAAATATGCCAAGATGGGAAAAATGGATTTCCTTTGGAGTTATGAAGCATTGTCT	
QsRPC-alelo d	(280)	GACTTTACATTTTGAGAAATATGCCAAGATGGGAAAAATGGATTTCCTTTGGAGTTATGAAGCATTGTCT	
		351	420
QsRPC-alelo a	(351)	TGCTTGCGTAAGCTTTCAATCATAAAGATGCCATAATCTGGTGAGAAAATGGCCAGACCATCTTCCTTCAT	
QsRPC-alelo b	(350)	TGCTTGCGTAAGCTTTCAATCATAAAGATGCCATAATCTGGTGAGAAAATGGCCAGACCATCTTCCTTCAT	
QsRPC-alelo c	(350)	TGCTTGCGTAAGCTTTCAATCATAAAGATGCCATAATCTGGTGAGAAAATGGCCAGACCATCTTCCTTCAT	
QsRPC-alelo d	(350)	TGCTTGCGTAAGCTTTCAATCATAAAGATGCCATAATCTGGTGAGAAAATGGCCAGACCATCTTCCTTCAT	
		421	490
QsRPC-alelo a	(421)	TAAAAAAGCTTGTGATTCATGGATGTGGAATTTGGTAGTTTCAGTTTCAAACCTACCATGCTGTGTGT	
QsRPC-alelo b	(420)	TAAAAAAGCTTGTGATTCATGGATGTGGAATTTGGTAGTTTCAGTTTCAAACCTACCATGCTGTGTGT	
QsRPC-alelo c	(420)	TAAAAAAGCTTGTGATTCATGGATGTGGAATTTGGTAGTTTCAGTTTCAAACCTACCATGCTGTGTGT	
QsRPC-alelo d	(420)	TAAAAAAGCTTGTGATTCATGGATGTGGAATTTGGTAGTTTCAGTTTCAAACCTACCATGCTGTGTGT	
		491	560
QsRPC-alelo a	(491)	ATTAGCAATTGAGGGATACAAAAGAGTGGAGTGTGAAAGTTTTCAGTTGGCTTTGGCTCACCATACTCCATG	
QsRPC-alelo b	(490)	ATTAGCAATTGAGGGATACAAAAGAGTGGAGTGTGAAAGTTTTCAGTTGGCTTTGGCTCACCATACTCCATG	
QsRPC-alelo c	(490)	ATTAGCAATTGAGGGATACAAAAGAGTGGAGTGTGAAAGTTTTCAGTTGGCTTTGGCTCACCATACTCCATG	
QsRPC-alelo d	(490)	ATTAGTAATTGAGGGATGCAAAGAGTGGAGTGTGAAAGTTCAGTTGGCTTTGGCTCACCATACTCCATG	
		561	630
QsRPC-alelo a	(561)	GTTTTTTCAAAAATTTTCAGAGTTTGGACATGTAACAGCAGGGTTAATGCATGGAGTAAGTAAAGTAAAT	
QsRPC-alelo b	(560)	GTTTTTTCAAAAATTTTCAGAGTTTGGACATGTAACAGCAGGGTTAATGCATGGAGTAAGTAAAGTAAAT	
QsRPC-alelo c	(560)	GTTTTTTCAAAAATTTTCAGAGTTTGGACATGTAACAGCAGGGTTAATGCATGGAGTAAGTAAAGTAAAT	
QsRPC-alelo d	(559)	GTTTTTTCAAAAATTTTCAGAGTTTGGACATGTAACAGCAGGGTTAATGCATGGAGTAAGTAAAGTAAAT	
		631	700
QsRPC-alelo a	(631)	ATTTGAAGATTTGATTCTGAAAAGCTCACAACCTTTGTGGGAGAAATACCTGAAGGGTTGCACAGACT	
QsRPC-alelo b	(628)	ATTTGAAGATTTGATTCTGAAAAGCTCACAACCTTTGTGGGAGAAATACCTGAAGGGTTGCACAGACT	
QsRPC-alelo c	(629)	ATTTGAAGATTTGATTCTGAAAAGCTCACAACCTTTGTGGGAGAAATACCTGAAGGGTTGCACAGACT	
QsRPC-alelo d	(628)	ATTTGAAGATTTGATTCTGAAAAGCTCACAACCTTTGTGGGAGAAATACCTGAAGGGTTGCACAGACT	
		701	770
QsRPC-alelo a	(701)	CAAATTCCTACGAGAGCTTCTATTGAAGACTGCCAACACTAGTTTCCTTTCCAGCATCTGGTTTTTCCA	
QsRPC-alelo b	(698)	CAAATTCCTACGAGAGCTTCTATTGAAGACTGCCAACACTAGTTTCCTTTCCAGCATCTGGTTTTTCCA	
QsRPC-alelo c	(699)	CAAATTCCTACGAGAGCTTCTATTGAAGACTGCCAACACTAGTTTCCTTTCCAGCATCTGGTTTTTCCA	
QsRPC-alelo d	(698)	CAAATTCCTACGAGAGCTTCTATTGAAGACTGCCAACACTAGTTTCCTTTCCAGCATCTGGTTTTTCCA	
		771	840
QsRPC-alelo a	(771)	TCCATGCTGAAAGTAATTCGAATAAAAAGCTGCAGTGGTCTGAAATCCTTACTACCAGAGGGAACGTTGC	
QsRPC-alelo b	(768)	TCCATGCTGAAAGTAATTCGAATAAAAAGCTGCAGTGGTCTGAAATCCTTACTACCAGAGGGAACGTTGC	
QsRPC-alelo c	(769)	TCCATGCTGAAAGTAATTCGAATAAAAAGCTGCAGTGGTCTGAAATCCTTACTACCAGAGGGAACGTTGC	
QsRPC-alelo d	(768)	TCCATGCTGAAAGTAATTCGAATAAAAAGCTGCAGTGGTCTGAAATCCTTACTACCAGAGGGAACGTTGC	
		841	910
QsRPC-alelo a	(841)	ACAGCAGAGAAAATGCATGCTTGTGCAGGTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGATTCTATGAAGTCCATTGCCAG	
QsRPC-alelo b	(838)	ACAGCAGAGAAAATGCATGCTTGTGCAGGTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGATTCTATGAAGTCCATTGCCAG	
QsRPC-alelo c	(839)	ACAGCAGAGAAAATGCATGCTTGTGCAGGTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGATTCTATGAAGTCCATTGCCAG	
QsRPC-alelo d	(838)	ACAGCAGAGAAAATGCATGCTTGTGCAGGTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGATTCTATGAAGTCCATTGCCAG	
		911	980
QsRPC-alelo a	(911)	AGGACAGCTACCAACAACCTCTAAAAAGTTGGAGATATCTCATTGTATGAATTTGAGTGTGCGGTAGAC	
QsRPC-alelo b	(908)	AGGACAGCTACCAACAACCTCTAAAAAGTTGGAGATATCTCATTGTATGAATTTGAGTGTGCGGTAGAC	
QsRPC-alelo c	(909)	AGGACAGCTACCAACAACCTCTAAAAAGTTGGAGATATCTCATTGTATGAATTTGAGTGTGCGGTAGAC	
QsRPC-alelo d	(908)	AGGACAGCTACCAACAACCTCTAAAAAGTTGGAGATATCTCATTGTATGAATTTGAGTGTGCGGTAGAC	
		981	1050
QsRPC-alelo a	(981)	GAGGGAGAGGGTTCTTCTTCTTTCAGTGATGCATGATGAGGATATCAACAACAGAAGCAAACACTCATC	
QsRPC-alelo b	(978)	GAGGGAGAGGGTTCTTCTTCTTTCAGTGATGCATGATGAGGATATCAACAACAGAAGCAAACACTCATC	
QsRPC-alelo c	(979)	GAGGGAGAGGGTTCTTCTTCTTTCAGTGATGCATGATGAGGATATCAACAACAGAAGCAAACACTCATC	
QsRPC-alelo d	(978)	GAGGGAGAGGGTTCTTCTTCTTTCAGTGATGCATGATGAGGATATCAACAACAGAAGCAAACACTCATC	
		1051	1081
QsRPC-alelo a	(1051)	TTCAGTACTTAGACATCAAATCATGTCCATC	
QsRPC-alelo b	(1048)	TTCAGTACTTAGACATCAAATCATGTCCATC	
QsRPC-alelo c	(1049)	TTCAGTACTTAGACATCAAATCATGTCCATC	
QsRPC-alelo d	(1048)	TTCAGTACTTAGACATCAAATCATGTCCATC	

Figura 64. Alinhamento das sequências nucleotídicas dos alelos *a*, *b*, *c* e *d* do gene de resistência *QsRPC*. As sequências foram obtidas por amplificação com os *primers* PR2 e PR3, a partir de DNA genómico e os alelos *a*, *b*, *c* e *d* foram identificadas por análise de restrição com *Mse*I.

II.4.1.3.2. Clonagem de mRNAs transcritos do gene *QsR_{Pc}*.

Em *Q. suber* foram amplificados 2 fragmentos do gene *QsR_{Pc}*, por RACE-PCR. O cDNA foi sintetizado *in vitro* a partir do RNA total extraído das raízes de *Q. suber*, infectadas com *P. cinnamomi*. Um fragmento, com 614 pb, foi amplificado na direção 3' do cDNA do gene com os *primers* C3SP4 e GR3' (GR3' hibrida-se com o adaptador ligado à extremidade 3' do cDNA pela cadeia de poli-T) (Figura 65A e B). O outro fragmento, com um tamanho de 2188 pb, foi amplificado na direção 5' do cDNA do gene com os *primers* PR6 e GR5' (GR5' hibrida-se com o adaptador ligado à extremidade 5' do cDNA) (Figura 65A e B). Para além destas sequências de cDNA, foram obtidas outras duas, com os pares de *primers* específicos PR5/PR2 e PR1/PR7 (Figura 65A e B), definidos com base nas sequências de DNA e cDNA já determinadas. Estas sequências sobrepõem-se em mais de 500 pb com total identidade. A sequência total resultante entre PR5 e PR7 tem 2343 pb (Figura 65A e B).

Para obter a sequência completa do cDNA do gene *QsR_{Pc}* sobrepusemos a sequência de cDNA delimitada pelos *primers* PR5 e PR7 com a sequência do fragmento de cDNA com 2188 pb que foi amplificado na direção 5' do cDNA do gene. Comparámos, ainda, esta sequência do cDNA com a sequência do DNA genómico e com a sequência do fragmento de 614 pb amplificada na região 3'. A sequência PR5-PR7 do cDNA sobrepõe-se em 219 pb à sequência da extremidade 3' do cDNA, iniciada com o *primer* C3SP4 (estas sequências divergem num nucleótido; Figura 66) e em 19 pb à sequência PR6-GR5' da extremidade 5' do cDNA. A extremidade 5' do fragmento genómico de 2221 pb sobrepõe-se à sequência GR5'-PR6 do cDNA em 31 pb. O local de restrição de *Sau3A1* identificado na sequência de DNA genómico está presente na sequência de cDNA (Figura 66).

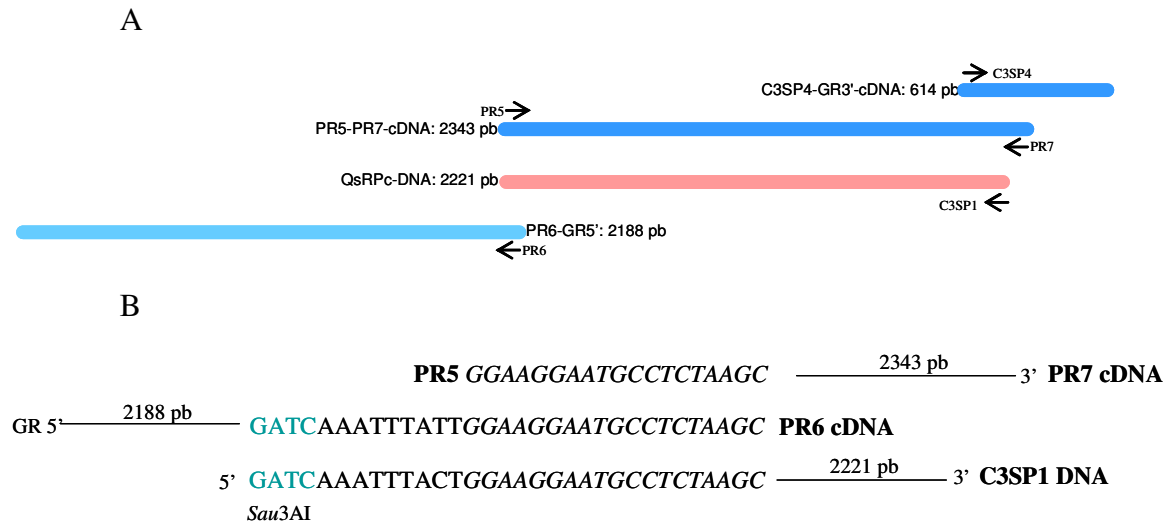


Figura 65. **A:** Esquema representativo dos fragmentos amplificados e sequenciados de cDNA e de DNA do gene *QsRPa* de *Q. suber*.

B: Indicação das sequências comuns aos fragmentos de cDNA obtidos por ampliações iniciadas com os primers PR5 e PR7, por um lado e PR6 e GR5', por outro (GR5' é o primer que se hibrida no adaptador que foi introduzido na extremidade 5' do cDNA). A sequência dos primers está em itálico. Sobreposição das sequências de cDNA com a sequência de DNA genômico que tem início no local de restrição da enzima *Sau3AI* e que termina no primer C3SP1.

```

1  GACCATTCTCTATCCGCCAGCCTTTTGGAGTATACATTGCAAGTTCTAAACCATAACCAAATTGCAAACCTGCACAACAAG
81  CTATCAAAGCAGCAAGCCATTTTAAATCCTTTCCCTTTCCCTTTCTTTCCATCATAAATCAGAACCAGATTCCCTT
      M L A E V F L G A V L Q V L F D R L A P
161  CTTTGTCTTATAACTGAGACCATGTTGGCAGAGGTTCTTGGAGCAGTTCTCAAGTGCTGTTTGTATAGTTGGCACC
      R E L M S L V F R E S V K K K L E K W R Q T L S A I Q
241  CCGTGAGTTGATGAGCTTGGTGTTCAGGGAAAGTGTCAAGAAGAAGCTGGAGAAATGGAGGCCAAACCTGTCGGCAATCC
      M V L K D A E E K Q L T D A D V K Q W L E A I R D L
321  AGATGGTCTTAAAGATGCTGAGGAGAAGCAACTGACAGATGCGGATGTGAAGCAATGGCTGGAAGCTATCAGAGATTG
      A Y D L E D L F D D F A I E A M Q R K W K A E P E S S
401  GCTTATGATCTTGAAGACTTATTGATGATTTTGCATTGAGGCTATGCAGCGCAAGTGAAGGCAGAACCTGAGTCTAG
      S P A S M V G S L V P T R F T P S A V K F N L K M K F
481  TAGCCAGCAAGTATGGTGGAAAGCTTAGTCCCTACTCGTTTTACTCCTAGTGCTGTTAAATCAACCTTAAGATGAAGT
      E I E K I S K R L K E I T E Q K D R L G L K D G G M
561  TTGAGATTGAAAAAATCAGTAAACGGTTAAAAGAAATAACTGAACAAAAGACAGACTTGGGTGAAAGATGGTGGTATG
      S V K I W K R P S S T S V P Y G P V I G R D E D R K K
641  TCTGTAAAGATATGGAAAAGCCATCCAGCACAAAGTGTGCCATATGGACCTGTGATAGGCAGAGATGAAGATAGAAAAG
      I I E L I L K D E Q T D D A N F H V I S I V G M A G V
721  GATTATAGAATCATTTTAAAAGATGAGCAAATGATGATGCTAATTTTTCATGTCATCTCTATTGTTGGTATGGCTGGGG
      G K T T L A R L V Y N D E E V N H F N P R A W I C V
801  TTGGTAAGACAACACTTGTAGGCTTGTGTACAATGATGAAGAAGTTAATCATTTCATCCAAAGCCCTGGATCTGTGTA
      S D D F D V M M V T K A L L E S V T S Q P C H L K E L
881  TCTGATGACTTTGATGATGATGGTAACAAAAGCTCTTCTTGAATCAGTTACTTCCAAACCTGCCATCTCAAAGAGTT
      N E V Q V K L A S E L E G K K F L L V L D D L W N E N
961  GAATGAAGTTCAGGTGAAGCTGGCAAGTGAATTAGAGGGTAAAAAGTCTTCTGCTTGTGTTTAGATGATCTTTGGAATG
      Y G L W E A L L P P F R A G A A G S R I I V T T R N
1041 ATTATGGCCTGTGGGAAGCACTGCTACCTCCTTTCAGGGCCGAGCAGGAGTCAATAATCGTGACAACACGAAAT
      A S V G K V M G A V Q S Y N L E F I S D N D C W A I F
1121 GCAAGTGTGGAAAGGTGATGGGAGCAGTTTCAGTCTTATAAATCTGGAGTTCATATCCGACAATGATTGCTGGGCAATATT
      V Q H S F L M N E N V G R P G N S G L I R E R I L E R C
1201 TGTCAGCATTCTTGTGATGAATGAAAATGTTGGTAGACCTGGGAATTCAGGCCTAATTCGTGAGAGAATCTTGAAAGGT
      R G L P L A A R T L G G L F R G K E L D E W E D I M
1281 GCAGGGGATTCGCTTGGCAGCAAGGACTCTTGGTGCCCTTTCCGTGGTAAAGAGCTAGATGAGTGGGAGGATATAATG
      N S K L N G S N M G S D I F H I L R L S Y H H L P H
1361 AATAGCAAATTTGGGGTTCATCAAACATGGGAAGTGACATATCCACATATTAAGATTGAGCTACCACCATCTCCCTCA
      H L K R C F A Y C S L F P R D Y E F E E K Q L I L L W
1441 TCATCTAAAGAGTGCTTTGCTTATTGTTTCAATTTCCCAAGGACTATGAATTTGAAGAGAAGCAACTGATCCTGCTTT
      M A E G L I Y Q A E G D K P M E D L G G E Y F R D L
1521 GGATGGCAGAAAGTTTGTATTTCAAGCAGAAGGTGATAAGCCAATGGAAGATTTAGGTGGCCGAGTACTTTTCGTGATCA
      L S R S F Q Q S S N K S R F V M H D L I S D L A Q
1601 CTGTCGAGGTCATTTTTTCAGCAGTCAAGCAGTAATAAATCACGATTTGTGATGCATGATCTCATCAGTGATTTAGCTCA
      W V A G A I S Y F R L E T K L E G N E R S K V S S K A R
1681 ATGGTTGACGAATAAGCTACTTTCAGGTTGGAGACTAAGCTGGAGGGCAACGAGCAAGCAAGATTTCCAGTAAAGCTC
      H L S F V G S R Y D G A K K F E A I S E F K H L R T
1761 GCCATTTATCTTTTGGTAGCAGATATGATGGAGCTAAGAAGTTTGGAGCAATTTCTGAATTCAGCATTTGCGGGAC
      F L P L M A P Y V G Y S Y L S Y H I I N Q L L P K L Q
1841 TTCCTACCACTAATGGCACCATATGTTGGTACTCTATCTGTCTTATACATTATTAATCAATTTGCTGCCTAAATTACA

```

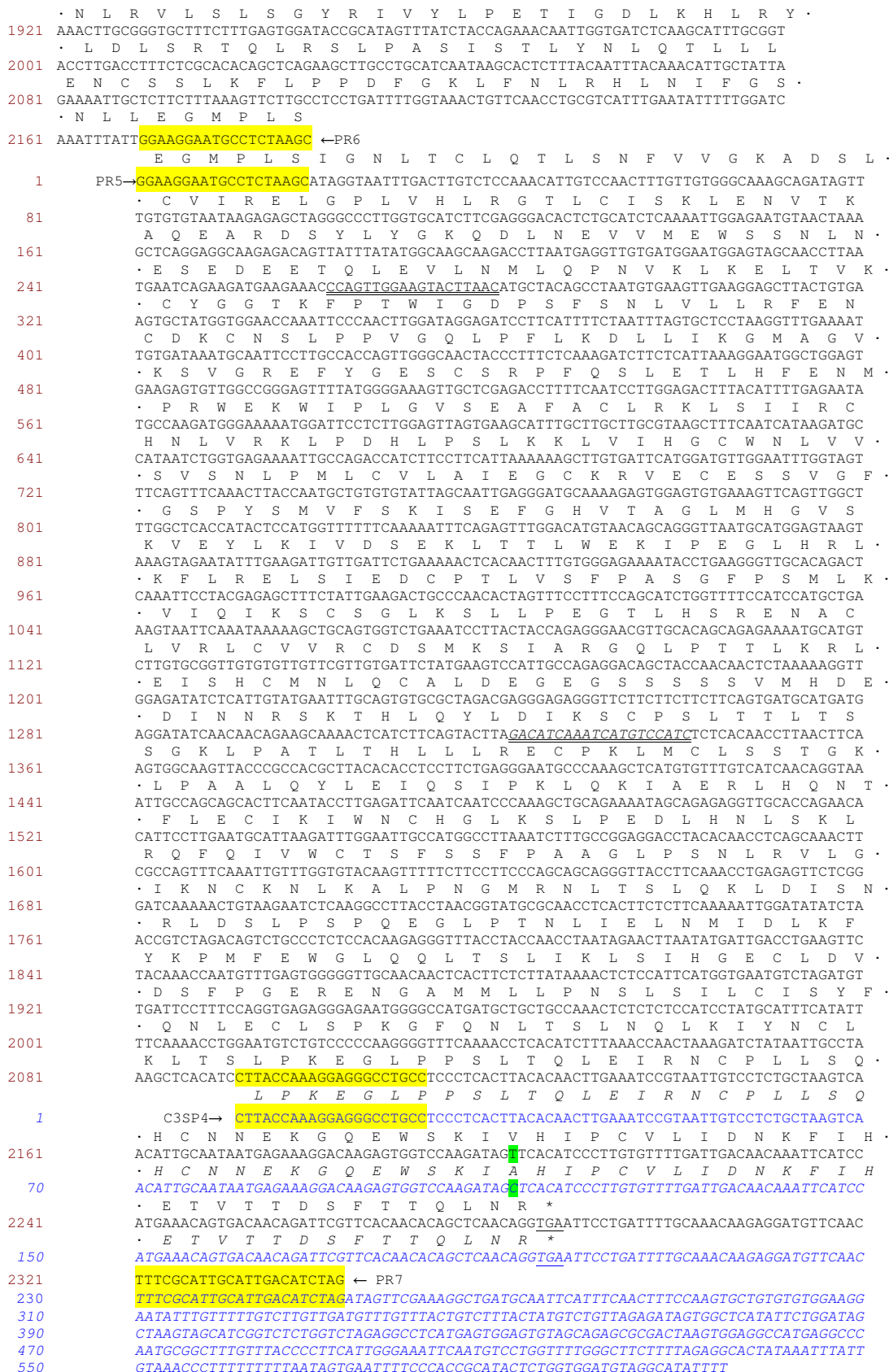


Figura 66. Sobreposição das sequências de cDNA do gene *QsRPs*, dos fragmentos amplificados a partir de cDNA nas direcções 5' e 3' do gene. A localização dos *primers* PR5 (directo), PR6 (reverso), C3SP4 (directo) e PR7 (reverso) usados nas reacções de amplificação está assinalada a amarelo. As regiões codificantes estão indicadas em cada um dos fragmentos, assim como a tradução das sequências de cDNA em aminoácidos. O fragmento GR5'-PR6 sobrepõe-se ao fragmento PR5-PR7 na região do

primer PR5/PR6 e o fragmento PR5-PR7 sobrepõe-se ao fragmento C3SP4-GR3' (a azul) em 219 pb. O nucleótido assinalado a verde é uma citosina na sequência C3SP4-GR3' e corresponde ao nucleótido que diverge entre esta sequência e a sequência amplificada com os *primers* PR5 e PR7, discutidas no texto. A mudança de um T para um C altera o aminoácido deduzido de uma valina para uma alanina. Para melhor visualização a sequência nucleotídica do fragmento C3SP4-GR3' está em itálico. Os *primers* PR2 (directo) e PR3 (reverso) que delimitam as sequências dos alelos estão assinalados. PR2 está duplamente sublinhado e em itálico e PR3 está com sublinhado duplo.

Quando se compara a sequência do fragmento de cDNA delimitado pelos *primers* PR5 e PR7 com as sequências de DNA dos quatro alelos de *QsR_{Pc}*, verifica-se que aquela sequência diverge em dois nucleótidos da sequência do alelo *a*. A sequência do alelo *a* possui 1081 nucleótidos e é a única em que não é necessário introduzir espaços para otimizar o alinhamento. Consta-se, também, que a divergência de dois nucleótidos entre o cDNA e o alelo *a* é comum a todos os alelos. Tendo em consideração que as sequências dos diferentes alelos têm proveniência em indivíduos diferentes e que a biodiversidade genética associada à espécie *Q. suber* é elevada, pode formular-se a hipótese de que a sequência de cDNA delimitada pelos *primers* PR5 e PR7 corresponde ao alelo *a* do gene *QsR_{Pc}*.

O fragmento de cDNA resultante da sobreposição dos fragmentos GR5'-PR6 e PR5-PR7 integra uma região ininterrupta de leitura que codifica uma proteína de resistência do tipo NBS-LRR com 1425 aminoácidos (figura 66). Tendo em consideração que este fragmento resulta da sobreposição de dois fragmentos que têm em comum apenas 19 bases, considerou-se que existia a possibilidade de poderem pertencer a alelos diferentes do mesmo gene. Para dissipar as dúvidas definiram-se dois *primers*, que delimitam a região codificante do gene no fragmento de cDNA de 4275 pb e tentou-se amplificar o gene *QsR_{Pc}* a partir de DNA genómico. Foi amplificado um fragmento do tamanho esperado, mas de forma pouco eficiente (figura 67). Em simultâneo, tentou-se a amplificação com um *primer* que se hibrida no início da região codificante do gene e com o *primer* PR2 (Figura 67). Neste caso, foi amplificado, com sucesso, um fragmento de tamanho superior a 3000 pb que veio confirmar que os fragmentos de cDNA pertencem ao mesmo gene e, provavelmente, ao mesmo alelo. Mesmo assim, considera-se que só a sequenciação destes fragmentos pode confirmar se as duas sequências de cDNA pertencem ao mesmo alelo ou não.

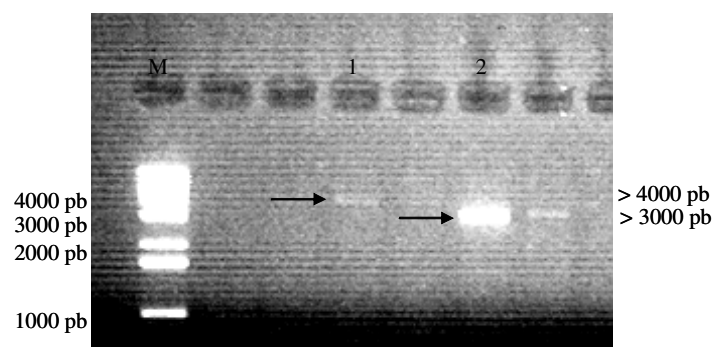


Figura 67. Separação por electroforese em gel de agarose 1 % de fragmentos amplificados do gene *QsRPs*. M: marcador de massa molecular; 1: amplificação com *primers* que delimitam a região codificante; 2: amplificação com o *primer* PR2 e com um *primer* que se hibrida no início da região codificante do gene.

II.4.1.3.3. Estrutura da proteína deduzida do gene *QsRPs*.

A proteína deduzida da sequência de cDNA de 4275 pb deve ser observada como uma proteína hipotética, que serve de modelo para exemplificar o tipo de proteínas que são codificadas pelos quatro alelos do gene *QsRPs*, até haver confirmação, por sequenciação, que os dois fragmentos de cDNA pertencem ao mesmo alelo do gene de resistência. As sequências até agora conhecidas das proteínas de resistência do tipo NBS-LRR, deduzidas das sequências de alelos pertencentes ao mesmo *locus* ou de repetições de genes em cadeia, pertencentes a *loci* complexos, possuem os mesmos domínios estruturais. Em *Phaseolus vulgaris* as sequências das proteínas do tipo NBS-LRR, deduzidas das regiões codificantes dos genes *BA8*, *BA11*, *JA78* e *JA71* que pertencem ao *cluster B4*, têm 83,8 % a 89,6 % de homologia entre si (Ferrier-Cana *et al.*, 2003). No gene *RPP13* de *Arabidopsis*, os alelos *RPP13-Nd* e *RPP13-Rld* codificam para proteínas que partilham 89 % dos aminoácidos (Bittner-Eddy *et al.*, 2000). No tomate, a família de genes do *locus I2*, localizada no cromossoma 11, inclui sete genes homólogos que codificam para proteínas com sequências em aminoácidos que possuem os mesmos domínios estruturais (Simons *et al.*, 1998).

A sequência em aminoácidos da proteína deduzida de *QsRPs* tem 1425 aminoácidos e foi comparada com as sequências de proteínas presentes nas bases de

dados, através do programa BlastP acessível no NCBI. QsRPc apresenta uma homologia de 35 % com as sequências das proteínas deduzidas dos genes *I2* e *JA78*.

A análise teórica de QsRPc com recurso aos programas do GCG e do EMBL-EBI revela a presença de sete regiões diferentes designadas de A a G (Figura 68). Os motivos estruturais que caracterizam cada uma das regiões serão discutidos em detalhe nos próximos parágrafos e a identificação destes motivos na sequência em aminoácidos é apresentada na figura 69.

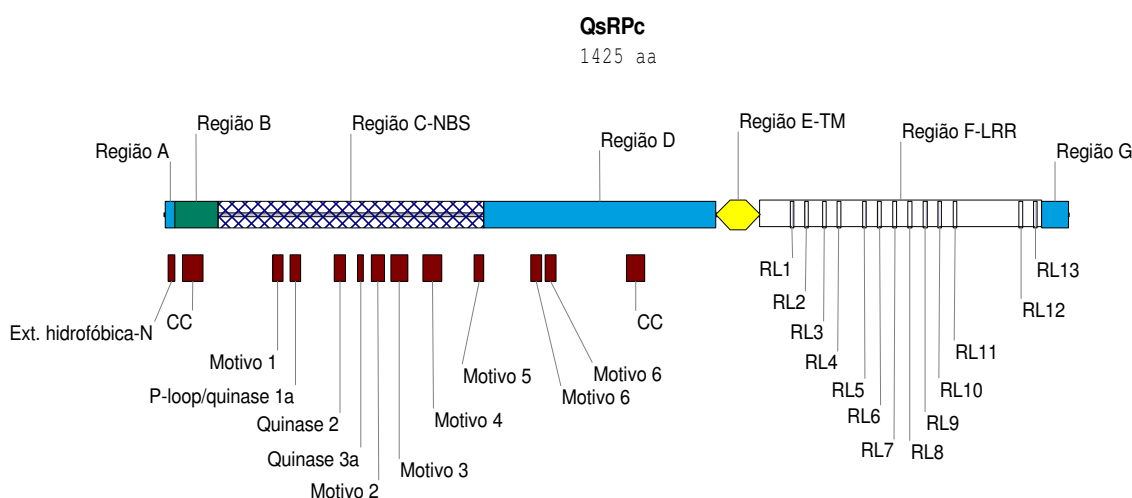


Figura 68. Representação esquemática dos domínios estruturais e funcionais da proteína de resistência, deduzida do gene *QsRPc*. Os motivos foram definidos com recurso aos programas do GCG e do EMBL-EBI. Domínios CC: *coiled coil*; NBS: *nucleotide binding site*; TM: *transmembranar*; LRR: *leucine rich repeat*.

A região A corresponde aos 15 primeiros aminoácidos e integra um segmento com 12 aminoácidos hidrofóbicos seguidos. Este motivo hidrofóbico também está presente na extremidade NH₂ do gene de resistência *RPS2* de *Arabidopsis*, que confere resistência às estirpes de *Pseudomonas syringae* que expressam o gene de avirulência *avrRpt2* (Mindrinos *et al.*, 1994).

Na região B está presente um segmento de 32 aminoácidos que foi identificado pelo programa *Coilscan* do GCG com a probabilidade máxima (1) de fazer uma estrutura em enrolamento helicoidal (*coiled coil*). Neste segmento está presente o padrão (hxxhxxx)n (h=A, F, I, L, M, V, W ou C; x=qualquer aminoácido; n=número de vezes) repetido três vezes (n=3) em continuidade, que é consistente com a formação de

domínios anfipáticos em hélice alfa, capazes de formar estruturas helicoidais enroladas (CC), envolvidas na homo ou hetero-oligomerização de proteínas (Jones, 2000). Na QsR_{Pc} foi identificado outro segmento na região D, entre os aminoácidos 728 e 756, com probabilidade 0,8 de possuir estruturas CC.

	*Região A	*Região B			
1	MLAEVFLGAV	LQVLFDR LAP	RELMSLVFRE	SVKKKLEKWR	<u>QTLSAIQMVL</u>
	N-terminal hidrofóbico			Coiled coil	
				*Região C	
51	<u>KDAEEKQLTD</u>	ADVQWLEAI	RDLAYDLEDL	FDDFAIEAMQ	RKWKAEPESS
101	SPASMVGSLV	PTRFTPSAVK	FNLKMKFEIE	KISKRLKEIT	EQKDRGLGLKD
151	GGMSVKIWKR	PSSTSVPYGP	VIGRDEDRKK	IIELILKDEQ	TDDANFHVIS
			Motivo 1		
201	<u>IVGMAGVGKT</u>	TLARLVYNDE	EVNHFNPRAW	ICVSDDFDVM	MVTKALLESV
	P-loop/quinase 1a				
251	TSQPCHLKEL	NEVQVKLASE	LEGKKFLLVL	DDLWNEYGL	WEALLPPFRA
			quinase 2		
301	GAAGSRIIVT	TRNASVGKVM	GAVQSYNLEF	ISDNDCAIF	VQHSLMNENV
	quinase 3a		Motivo 2		
351	GRPGNSGLIR	ERILERCRGL	PLAARTLGGL	FRGKELDEWE	DIMNSKLWGS
			Motivo 3		
401	SNMGSDIFHI	LRLSYHHLPH	HLKRCFAYCS	LFPRDYEFEE	KQLILLWMAE
			Motivo 4		
451	GLIYQAE GDK	PMEDLGGEYF	RDLLSRFFQ	QSSSNKSRFV	<u>MHDLISDLAQ</u>
					Motivo 5
	*Região D				
501	WVAGISYFRL	ETKLEGNERS	KVSSKARHLS	FVGSRYDGAK	KFEAISEFKH
551	LRTFLPLMAP	YVGYSYLSYH	IINQLLPKLO	NLRVLSLSGY	RIVYLPETIG
		Fosf. Tyr		Motivo 6	
601	<u>DLKHLRYLDL</u>	SRTQLRSLPA	SISTLYNLQT	LLLENCSSLK	FLPPDFGKLF
	Motivo 6				
651	<u>NLRHLNIFGS</u>	NLLEGMPLSI	GNLITCLQTLS	NFVVGKADSL	CVIRELGPLV
701	HLRGTLCISK	LENTKAQEA	RDSYLYGKQD	LNEVVMWESS	NLNESEDEET
			Fosf. Tyr	Coiled Coil	
751	<u>QLEVLNMLQP</u>	NVKLKELTVK	CYGGTKFPTW	IGDPSFSNLV	LLRFENCDCK
801	NSLPPVGQLP	FLKDLLIKGM	AGVKS V GREF	YGESCSRPFQ	SLETLHFENM
			*Região E		
851	PRWEKWIPLG	VSEAFACLRK	LSIIRCHNLV	RKLPDHLPSL	<u>KKLVIHGCWN</u>
					*Região F
901	<u>LVVSVSNLPM</u>	<u>LCVLAIEGCK</u>	RVECESSVGF	GSPYSMVFSK	ISEFGHV TAG
951	LMHGVSKVEY	LKIVDSEKLT	TLWEKIPEGL	HLRKLFLRELS	IEDCPTLVSF
	Fosf. Tyr				
1001	PASGFPSMLK	VIQIKSCSGL	KSLLEPGTLH	SRENACL VRL	CVVRCDSMKS
1051	IARGQLPTTL	KRLEISHCMN	LQCALDEGEG	SSSSVMHDE	DINNRSKTHL
1101	<u>QYLDIKSCPS</u>	LTTLTSSGKL	PATLTHLLLR	ECPKLMCLSS	TGKLPAALQY
1151	<u>LEIQSIPKLQ</u>	KIAERLHQNT	FLECIKIWNC	HGLKSLPEDL	HNLSKLRQFQ
1201	<u>IVWCTSFSSF</u>	PAAGLPSNLR	VLGIKNCKNL	KALPNGMRNL	TSLQKLDISN
1251	RLDSLPS PQE	GLPTNLIE LN	MIDLKFKYKPM	FEWGLQQLTS	<u>L IKLSIHGEC</u>
1301	LDVDSFPGER	ENGAMLLPN	SLSILCISYF	QNLECLSPKG	<u>FQNLTSLNQL</u>
					*Região G
1351	<u>KIYNCLKLTS</u>	LPKEGLPPSL	TQLEIRNCPL	LSQHCNNEKG	QEWSKIVHIP
1401	CVLIDNKFIH	ETVTDSFTT	QLNR*		

Figura 69. Sequência em aminoácidos da proteína deduzida do cDNA do gene *QsR_{Pc}*. As sete regiões (A-G) definidas na proteína estão identificadas e têm início no aminoácido assinalado com uma estrela. Os motivos que caracterizam os domínios presentes em cada uma das regiões estão assinalados e identificados, com exceção, para os motivos ricos em leucinas que estão assinalados com sublinhado duplo. A descrição dos motivos é feita no texto.

Actualmente, as proteínas de resistência do tipo NBS-LRR podem ser divididas em três classes diferentes, em função dos domínios presentes na extremidade amínica. As proteínas da classe TIR-NBS-LRR possuem o domínio TIR (*Toll/Interleukin-1 Resistance*) relacionado com as proteínas Toll e IL-1 dos animais, que funcionam como receptores transmembranares. Quando os domínios extracelulares de Toll e IL-1 se ligam a outras proteínas, activam os domínios intracelulares, que interagem, por sua vez, com componentes das vias de transdução de sinal, de modo a induzir a expressão de genes relacionados com a defesa anti microbiana. As outras duas classes de proteínas de resistência são do tipo CC-NBS-LRR ou LZ-NBS-LRR em que CC denomina estrutura em *coiled coil* e LZ em *leucine zipper*. Os domínios TIR, CC ou LZ estão potencialmente envolvidos na transdução de sinais intracelulares para activação dos mecanismos de defesa, podendo actuar ou não através das mesmas vias (Dodds *et al.*, 2000).

A região C de QsRPc integra um domínio (NBS), com capacidade para ligar e hidrolisar a adenosina trifosfato (ATP) ou a guanosina trifosfato (GTP) e que é caracterizado por oito domínios que são comuns às proteínas de resistência do tipo NBS-LRR das plantas e às proteínas Apaf-1 e CED-4 reguladoras da morte celular programada nos animais (Van der Biezen e Jones, 1998a; Jones, 2000). Destes domínios fazem parte os motivos quinase 1a ou P-loop, quinase 2 e quinase 3a, assim como os motivos 1 a 5, conservados entre estas proteínas. Apaf-1 contém um domínio central NBS, enquadrado pelos domínios CARD (extremidade NH₂) e WD-40, repetido 12 vezes (extremidade COOH). A proteína interage e activa a procaspase 9, que por sua vez induz a activação de mais caspases em cadeia que resultam na morte celular. Esta proteína também pode interagir com proteínas que inibem a sua função, mantendo-se na forma de complexos inactivos que, para serem activados, requerem a ligação de ATP e hidrólise em ADP (Zou *et al.*, 1999). Os produtos dos genes de resistência nas plantas são estruturalmente semelhantes às proteínas Apaf-1, porque possuem um domínio NBS central ligado a um domínio TIR, CC ou LZ, envolvido na transdução de sinal, e a uma extremidade carboxílica rica em sequências repetidas que estão potencialmente relacionadas com interacções entre proteínas. Estas semelhanças estruturais, em conjunto com a reacção hipersensível que se observa durante as interacções de incompatibilidade, levou alguns autores a especularem sobre uma possível analogia funcional existente entre os genes de resistência das plantas e os genes envolvidos na

morte celular programada. Nesse caso, o domínio NBS estaria envolvido na regulação da resposta de resistência das plantas de maneira semelhante à que se observa na apoptose e não funcionaria, apenas, como um domínio de ligação e hidrólise de nucleótidos (Jones, 2000).

A sobreexpressão do gene de resistência *RPS2* em protoplastos de *A. thaliana* induz uma resposta de defesa, mesmo na ausência dum factor de avirulência. Mutações provocadas no motivo *P-loop* do domínio NBS anulam a resposta de defesa, confirmando que a principal função deste domínio é a de transdução de sinal para activação dos mecanismos de defesa (Leister e Katagiri, 2000).

A região D é muito rica em leucinas, possui o motivo 6 que tem como sequência padrão IKLKLLRFLDLSETSIT e um segmento com possibilidade de fazer uma estrutura em CC. Esta região é bastante semelhante à das proteínas I2 e JA71 e tal como em I2, também estão presentes dois locais potenciais de fosforilação de tirosinas (Simons *et al.*, 1998; Ferrier-Cana *et al.*, 2003).

A região E possui um domínio transmembranar com 21 aminoácidos, associado à membrana plasmática, que foi identificado pelo programa PSORT com uma probabilidade de 0,44 (Klein *et al.*, 1985). De acordo com os resultados da análise, a região citoplasmática de QsR_{Pc} vai do aminoácido 1 ao 898 e portanto, a região F, que possui um domínio com sequências repetidas de leucinas (LRR), estará na face externa da membrana plasmática. A presença deste motivo destaca esta proteína de resistência das proteínas I2 e JA78, com as quais apresenta maior homologia e aponta para a existência duma classe nova de proteínas de resistência. As proteínas do tipo NBS-LRR são normalmente citoplasmáticas e só se conhecem algumas proteínas de resistência com domínios transmembranares como, por exemplo, os produtos dos genes *Cf-2* e *Cf-9* do tomate que possuem um domínio LRR extracelular, um domínio transmembranar e uma curta região citoplasmática ou a proteína do gene *Xa21* do arroz, que possui um domínio LRR extracelular, uma região transmembranar e um domínio citoplasmático do tipo serina/treonina quinase (Dixon *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1994; Song *et al.*, 1995). Até ao momento não foi descrito nenhum gene de resistência possuindo uma região citoplasmática com um domínio CC e NBS, uma região transmembranar e uma região exoplasmática do tipo LRR.

A probabilidade da existência deste domínio transmembranar na QsR_{Pc} não é elevada, mas existem aspectos na sequência que parecem corroborar a previsão feita pelo programa PSORT. Quando se alinham as sequências dos produtos dos genes I2 e

JA78 com a sequência QsRPc verifica-se que o segmento que o programa propõe como transmembranar faz parte duma sequência de 69 aminoácidos que não existe em nenhuma das outras duas sequências e está localizado entre duas regiões muito conservadas dos genes (NBS e LRR), às quais foram atribuídas funções diferentes (Figura 70). Ao domínio LRR está associada a função de reconhecimento dos factores de avirulência produzidos pelos agentes patogénicos, ao passo que o domínio NBS está relacionado com a transdução de sinal para activação dos mecanismos de defesa intracelulares (Toyoda *et al.*, 2002). Dodds *et al.* (2000) referem que a estrutura das proteínas de resistência tem alguma relação com a forma como as bactérias, vírus ou fungos infectam as células. Segundo estes autores, as proteínas de resistência citoplasmáticas estão envolvidas no reconhecimento de agentes patogénicos que se replicam no interior das células vegetais ou que têm mecanismos para segregar directamente proteínas para o seu interior. Nas primeiras 24 horas de infecção de *Q. suber* e *Q. rotundifolia* por *P. cinnamomi*, observa-se invasão dos tecidos com colonização intercelular em primeiro lugar (Marcelino, 2001). Por isso, é provável que uma proteína de resistência envolvida na detecção dos factores de avirulência produzidos por este fungo, tenha o domínio LRR na face externa da membrana plasmática.

```

I2      (1) MEIGLAVGGAFSSALNVLFDRLAPNGDLLNMFRRKHKDHVKLLKCLKMTLRGIQIVLSDAENKQASNPSSV
QsRPc  (1) -----MLAEVFLGAVLQVLFDRLLAPREIMSLVFRS--VKKLEKWRQLLSAIQMVLKDAEEKQLTDADV
JA78   (1) -MAAALVGGALLSAFLQVAFDRLLASP-QLLDFFRRRKLDLKLALNLMHSINALADDAELKQLTDPHV

I2      (71) RDWLNELRDAVDSAENLIEEVNVEALRLKVEGOHQNF----SETSNQQ-----VSDDFLNIKDKLEDIT
QsRPc  (64) KQWLEAIRDLAYDLEDLFDFAIEAMQRKWKAEPESSSPASMVGSLVPTRFPTSAVKFNLKMKFEIEKIS
JA78   (69) KAWLVAVKEAVFDAEDLLEIDYELTRCQVEAQSQPQ----TFTSKVSNFFNSTFSSFNKKIESGMKEVL

I2      (132) ETIKDLQEQIGLLGLKEYFDSTKLETR--R-----PSTSVDDDESDFGRQSEIEDLIDRLLSEGASGKK-
QsRPc  (134) KRLEKITEQKDRGLGLKDGMSVKIWKR-----PSSISVPYGPVIGRDEDKRIITELLLKDEQTDAN
JA78   (135) RRIEYLANQKDALGLKKGTYSDNDRSGSRVRSQKLPSSSLVVESVIYGRDADKDIITNWLITSEIDNSNH-
*****

P-Loop/Quinase 1a
I2      (194) LITVVPVIVGMGGQKTTLAKAVYNDERVKN-HFDLKAWYCVSEGF DALRITKELIQEIGKFDKSDVHNNIN
QsRPc  (196) FHVVISIVGMAGVGKTTLARLVYNDEEVNH--FNPRAWICVSDDFDVMMVTKALLESVT-SQPCHLKEIN
JA78   (204) PSIFSIVGMGGLGKTTLAQHVNYPKIEDVKFDIKAWVCVSDHFHVLTVIRTILEAIT-DKTDDSGNLE
*****

Quinase 2
I2      (263) QIQVKLKESSLKGGKFLVLDDVWNERNYEWNDLRNIFAQGDIGSKTIIVTTRKDSVALMNGNEQ-IRMGNL
QsRPc  (262) EVQVKLASELEGGKFLVLDDVWNERNYGLWEALLPPFRAGAGSRIIVTTRNASVGKVMGAVQSYNLEFI
JA78   (272) MVHKKLKEKLSGGKFLVLDDVWNERPAEWEAQTPLSYGAPGSRILVTRSEKVASMRSEV-HLLKQL
*****

Quinase 3a
I2      (332) STEASWSLQRFHAFENMDPMGHPLEEVGRQIAAKCKGLPLALKTLAGMLRSKSEVEEWKRILRSEIWEL
QsRPc  (332) SDNDCAIFVQHSIMNENVGRPGNSGLTRERITLRCRGLPLAARTLGGFLRGK-ELDEWEDIMNSKLWGS
JA78   (341) GEDECRKVFENHALKGDITELNDFMVKVGRRIVEKCKGLPLALKTIGCLLSTNSISDWKNILESEIWEL
*****

Motivo 2
I2      (402) P--HNDILPALMSYNDLPAHLKRCFSFCAIFPKDYPFRKEQVHILWIANGLVPVKDEIN--QDLGNQYF
QsRPc  (401) SNMGSDIFHILRLSYHHLPHHLKRCFAYCSLFPDYEFEEKQLTLWMAEGLIYQAEQDKPMDLGGEEYF
JA78   (411) PKEHSEIIPALFLSYHHLPHHLKRCFAYCALFEKDYEFVKEELTLWMAQNFLLSTQHIRHPKQIGEEYF
*****

Motivo 4
I2      (402) P--HNDILPALMSYNDLPAHLKRCFSFCAIFPKDYPFRKEQVHILWIANGLVPVKDEIN--QDLGNQYF
QsRPc  (401) SNMGSDIFHILRLSYHHLPHHLKRCFAYCSLFPDYEFEEKQLTLWMAEGLIYQAEQDKPMDLGGEEYF
JA78   (411) PKEHSEIIPALFLSYHHLPHHLKRCFAYCALFEKDYEFVKEELTLWMAQNFLLSTQHIRHPKQIGEEYF
*****

```

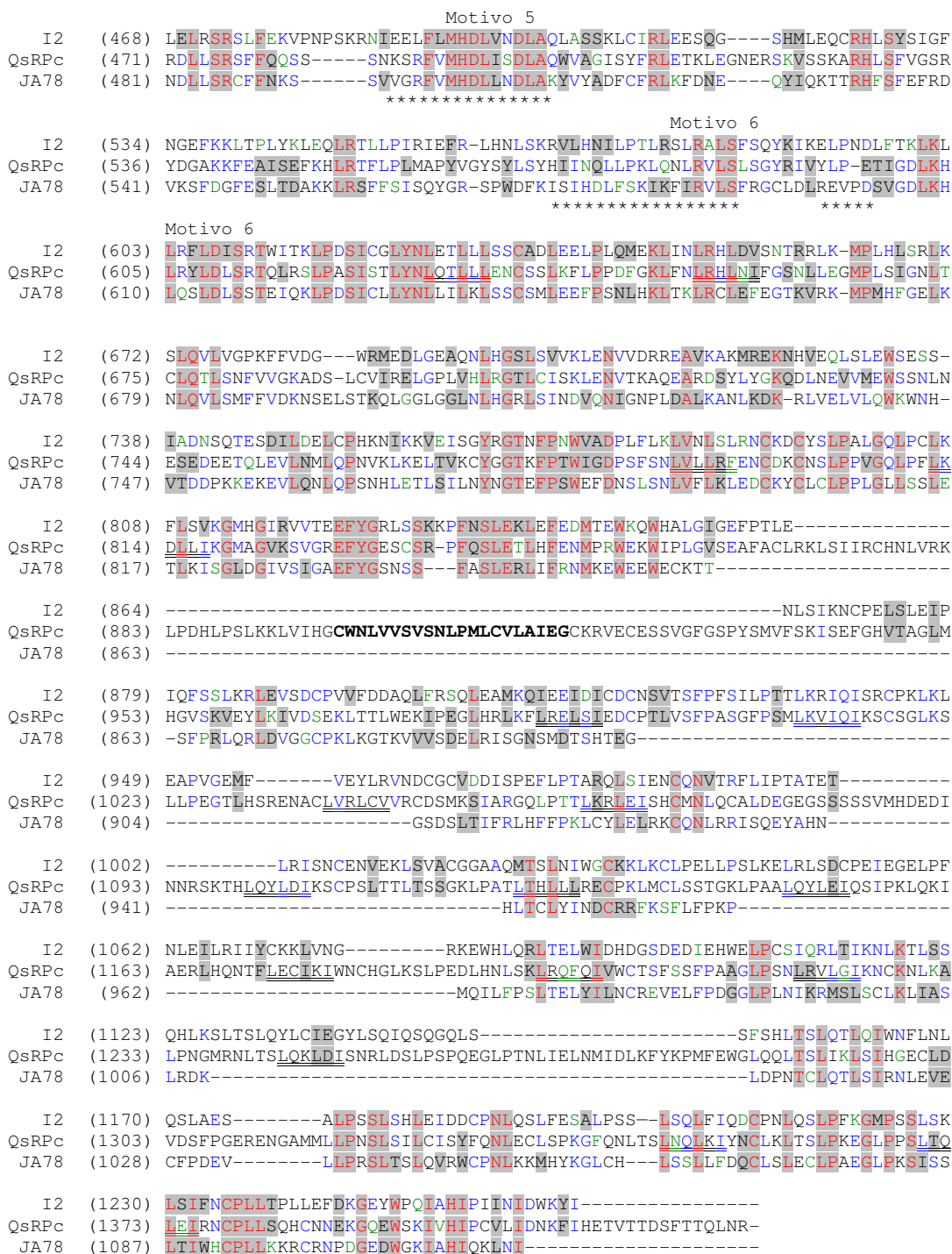


Figura 70. Alinhamento das seqüências em aminoácidos das proteínas de resistência deduzidas dos genes de resistência *I2* do tomateiro, *JA78* do feijoeiro e *QsRpc* do sobreiro. Os motivos comuns a estas proteínas, no domínio NBS, estão assinalados com um * (motivo 1; P-loop/quinase 1a; quinase 2; quinase 3a; motivo 2; motivo 3; motivo 4; motivo 5). A seqüência intramembranar na *QsRpc*, identificada pelo programa PSORT, está a negrito. Os motivos ricos em leucinas, presentes nas regiões D e F estão identificados com sublinhado duplo.

Com o auxílio do programa RADAR procuraram-se sequências com motivos repetidos na QsR_{Pc} e foram identificados 11 segmentos com motivos repetidos ricos em leucinas (Figura 71).

```

587-635  L.....SGY.RivYL.PE.....TIGD..LKH..LRYLDLSR..TQLRSLPA.SiS.TLYN..LqtLLEN
636-667  C.....SSL.K..FL.PP.....DFGK..LFN..LRHLNI.....FGSNLL.E.G.MP.....
771-819  C.....YGG.T..KF.PT.....WIGDpsFSN..LVLLRFENC.DKCNLPPvG.Q.LPF...LkdLLIKG
876-918  C.....HNLvR..KL.PD.....H...LPS..LKKLVIHGC.WNLV.VSV.S.N.LP.M..LcvLAIEG
975-1016 .....KI.PE.....GLHR..LKF..LRELSIEDC.PTLVSFPA.S.G.FPSM..LkvIQIKS
1017-1067 C.....SGL.K..SLlPE.....gTLHS..RENacLVRLCVVRC.DSMKSIAR.G.Q.LPTT..LkrLEISH
1068-1131 C.....MNL.Q.cAL.DEgegssssvmhdeDINN..RSKthLQYLDIKSC.PSLTTLTS.S.GkLPAT..LthLLRE
1132-1179 CpklmclSST.G..KL.PA.....A.....LQYLEIQSI.PKLQKI.A.E.R.LHQntfLecIKIWN
1180-1226 C.....HGL.K..SL.PE.....DLHN..LSK..LRQFQIVWC.TSFSSFPA.A.G.LPSN..LrvLGIKN
1227-1270 C.....KNL.K..AL.PN.....GMRN..LTS..LQKLDISNRIDSLPS.PQ.E.G.LPTN..LieL...N
1335-1377 C.....LS.....PK.....GFQN..LTS..LNQLKIYNC.LKLTSLPK.E.G.LPPS..LtgLEIRN

```

Figura 71. Alinhamento dos segmentos da QsR_{Pc} que apresentam motivos ricos em leucinas. Segmentos 1: 587-635; 2: 636-667; 3: 771-819; 4: 876-918; 5: 975-1016; 6: 1017-1067; 7: 1068-1131; 8: 1132-1179; 9: 1180-1226; 10: 1227-1270; 11: 1335-1377. Os 13 motivos do tipo LXXLX α presentes na região F estão sublinhados.

Sete destes segmentos pertencem à região F da proteína QsR_{Pc}. A sequência consenso dos motivos ricos em leucinas característica dos genes NBS-LRR é LXXLX α XX(C/N/X)X(X) α , em que L designa leucina, α designa um aminoácido de cadeia alifática, C uma cisteína, N uma asparagina e X designa um aminoácido qualquer. A esta sequência pode seguir-se uma região de tamanho variável rica em ácido glutâmico (P) e em leucinas (Ori *et al.*, 1997). Nos sete segmentos da região F podemos identificar 13 motivos do tipo LXXLX α que estão identificados na figura 71. Supõe-se que as regiões LRR estejam envolvidas no reconhecimento dos factores de avirulência produzidos pelos agentes patogénicos e em interações com proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinal. Estes domínios estão presentes em muitas proteínas de eucariotas e estão envolvidas (ou participam) nas interações do tipo proteína-proteína (Kobe e Deisenhofer, 1995).

Nas proteínas de resistência que possuem domínios LRR foram previstas estruturas em folha β paralelas umas às outras, que devem funcionar como superfície de reconhecimento/ligação dos factores de avirulência. Comparações entre proteínas do tipo NBS-LRR mostram que os resíduos das folhas β que estão expostos ao solvente são hipervariáveis e estão sujeitos a diversificação por pressão selectiva. A especificidade no reconhecimento dos factores de avirulência reside nos motivos LRR e as novas especificidades são adquiridas através de duplicações, eliminações, trocas de sequências e mutações pontuais que ocorrem nas regiões dos genes que codificam os motivos ricos

em leucinas (Van der Biezen e Jones, 1998). Em *Arabidopsis* o gene *RPP5* faz parte de uma família de genes do tipo NBS-LRR que conferem resistência a *Peronospora parasitica*. A comparação das sequências nucleotídicas do *locus* a que pertence este gene entre dois ecotipos de *Arabidopsis* mostrou que existe um elevado nível de polimorfismo intraespecífico. A maior parte dos genes, membros deste *locus*, apresenta configurações variáveis na região LRR, que codificam números diferentes de domínios LRR (Nöel *et al.*, 1999).

A região LRR também pode interagir com outras proteínas diferentes dos factores de avirulência. Uma mutação no terceiro motivo LRR do gene *RPS5* de *Arabidopsis* causa a substituição de um ácido glutâmico por uma lisina e compromete parcialmente a função de vários genes de resistência envolvidos no reconhecimento de avrPphB segregado por *Pseudomonas syringae* e de factores de avirulência produzidos por *Peronospora parasitica* (Warren *et al.*, 1998). A reacção observada denota que o terceiro motivo LRR de *RPS5* pode estar envolvido na interação com proteínas implicadas nas vias de transdução de sinal, que são partilhadas por mais do que um gene de resistência.

A região G corresponde à extremidade carboxílica da proteína.

II.4.1.3.4. Expressão do gene *QsRPs* em raízes de *Q. suber*.

A expressão do gene *QsRPs* foi analisada por RT-PCR e hibridação, com uma sonda específica marcada com digoxigenina, a partir de RNA total extraído de raízes de *Q. suber* não infectadas e de raízes que estiveram em contacto com o micélio de *P. cinnamomi*, durante 24 horas. A sonda, com 116 pb, foi preparada por PCR com os *primers* C3SP1 e C3SP4 a partir de DNA genómico; reconhece um fragmento do gene *QsRPs*, com 651 pb, obtido por amplificação com o *primer* C3SP4 e com um *primer* que hibrida com o oligonucleotido usado para iniciar a síntese de cDNA. O tamanho do fragmento identificado está de acordo com a sequência nucleotídica do gene. A intensidade dos sinais de hibridação é mais elevada nas amostras de raízes infectadas, nos três ensaios realizados com soluções de cDNA diluídas de 1:50, 1:100 e 1:200 (figura 72A e B).

A expressão do gene *QsRPs* aumenta durante as primeiras 24 horas de interacção entre *Q. suber* e *P. cinnamomi*. Os resultados obtidos por RT-PCR e

hibridação em *Q. suber* são semelhantes aos que foram obtidos por cDNA-AFLP em raízes de *Q. rotundifolia*, confirmando que este gene está envolvido na resposta de defesa destas espécies de plantas a *P. cinnamomi*. A quantidade relativa (%) de mRNA disponível para ser transcrito *in vitro* e amplificada é superior nas raízes infectadas em relação às raízes não infectadas (Figura 72B).

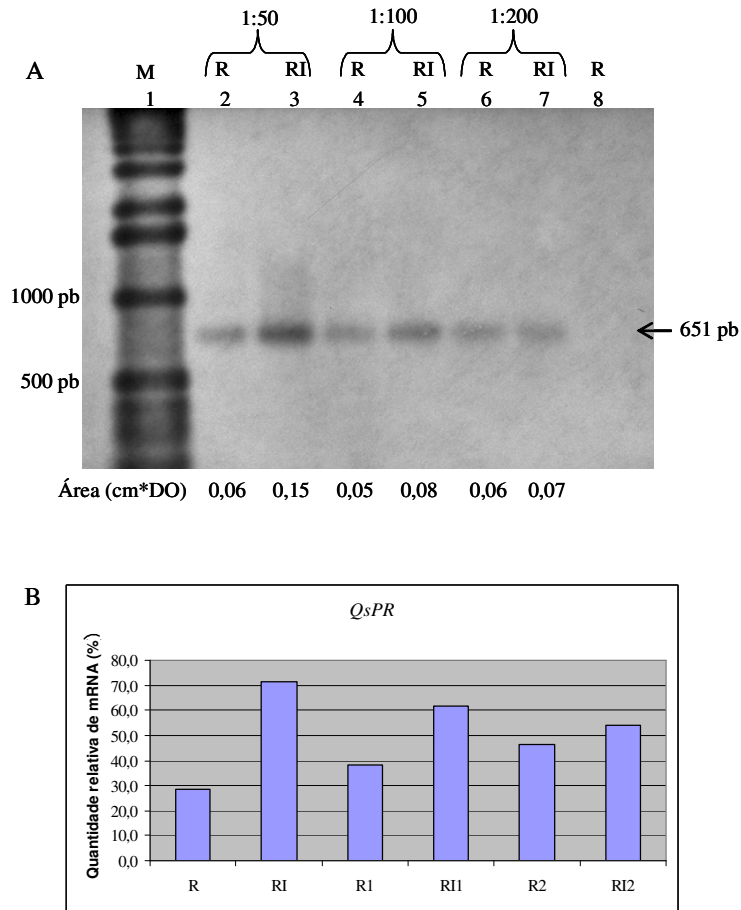


Figura 72. A. Padrão de expressão do gene *QsRPC*, analisada por RT-PCR e hibridação, com uma sonda específica marcada com digoxigenina, a partir de RNA total extraído de raízes de *Q. suber* não infectadas (R) e de raízes infectadas com *P. cinnamomi* (RI). O tamanho do fragmento detectado pela sonda tem 651 pb e está assinalado com uma seta. A reacção de amplificação foi realizada em soluções de cDNA diluídas de 1:50, 1:100 e 1:200. A intensidade do sinal de hibridação emitido foi medida por densitometria e os valores das áreas delimitadas pelos picos de absorvência estão referidos na base da imagem A. M e M1: marcadores de massa molecular. O canal 8: ausência de hibridação entre a sonda e o fragmento amplificado do gene da actina.

B. Gráfico de barras representando as quantidades relativas, em percentagem, de mRNA de *QsRPC* presente nas amostras de raízes de *Q. suber* não infectadas (R) e infectadas (RI) com *P. cinnamomi*, disponível para ser transcrito *in vitro* e amplificado. R e RI: diluição do cDNA 1:50; R1 e RI1: diluição de 1:100; R2 e RI2: diluição de 1:200.

É com base numa interacção do tipo *gene-to-gene* que as proteínas de resistência do tipo NBS-LRR, exerceriam a sua função como receptores específicos dos produtos dos genes de avirulência. No entanto, a dificuldade que tem existido em isolar complexos de proteínas que provem esta teoria, levou alguns autores a sugerir que as proteínas de resistência devem reconhecer complexos formados pelos factores de avirulência e outras proteínas (Cheng *et al.* 1998). Recentemente, começaram a surgir trabalhos em que foram identificados complexos formados entre factores de avirulência e produtos de genes de resistência. Leister e Katagiri (2000) demonstraram em protoplastos de células vegetais, que o factor de avirulência AvrRpt2 de *Pseudomonas syringae* forma um complexo com a proteína RPS2 codificada por um gene do tipo *NBS-LRR* de *Arabidopsis thaliana*. Os genes de resistência *RPS2* e *RPM1* de *A. thaliana* conferem resistência às estirpes de bactérias *P. syringae* que segregam os factores de avirulência *avrRpt2* e *avrB*, respectivamente. O gene de resistência *RPS2* e o gene de avirulência que lhe corresponde foram expressos, em simultâneo, em protoplastos de células vegetais e um complexo formado pelos produtos dos genes *RPS2* e *avrRpt2*, acompanhado por uma proteína de 75 kDa foi identificado por co-imunoprecipitação. A expressão do gene de resistência e do gene de avirulência desencadeia, nestas células, uma resposta de defesa. Estes autores verificaram que *RPS2* também forma um complexo com *avrB*, que é um factor de avirulência reconhecido por outro gene e postularam que os dois factores de avirulência competem pela ligação a *RPS2*, mas que só o complexo *RPS2-avrRpt2* deve ser capaz de desencadear uma resposta de defesa. Consideram que a formação do complexo não é suficiente para conferir especificidade de resposta e que deve existir outro componente que faz a distinção entre a formação de um complexo produtivo e de um complexo não produtivo (Todd e Katagiri, 2000).

Jia *et al.*, em 2000, mostraram que as plantas do arroz que expressam o gene *Pi-ta* são resistentes às estirpes do fungo *Magnaporthe grisea* que expressam o factor de avirulência AVR-Pita, numa interacção do tipo *gene-to gene*. *Pi-ta* codifica um receptor citoplasmático com um domínio NBS e um domínio rico em leucinas (LRD) e AVR-Pita codifica uma potencial metaloprotease, na forma de pro-proteína com um peptídeo sinal. A expressão intracelular do gene AVR-Pita com produção da proteína AVR-Pita176 (proteína madura sem peptídeo sinal) resulta na ligação específica desta proteína à região LRD da proteína Pi-ta e ao desencadeamento duma resposta de defesa. Substituições pontuais de aminoácidos na região LRD destroem a interacção física entre Pi-ta e AVR-Pita.

O aumento de expressão do gene *QsR_{Pc}* durante a interação com *P. cinnamomi* mostra que este gene está implicado na resposta de defesa e é possível que funcione como receptor dos factores de avirulência produzidos pelo fungo. A proteína deduzida da sequência nucleotídica de *QsR_{Pc}* possui os domínios característicos dos genes de resistência do tipo CC-NBS-LRR e a região LRR pode interagir fisicamente, por exemplo, com as elicinas produzidas por *P. cinnamomi*.

II.4.1.3.5. Pesquisa de polimorfismos no gene *QsR_{Pc}*, por PCR-RFLP.

O DNA extraído de 144 árvores da espécie *Q. suber* e 24 da espécie *Q. rotundifolia* das regiões do Algarve e Alentejo, foi usado como alvo em reacções de amplificação com os *primers* PR2 e PR3, específicos para o gene *QsR_{Pc}*. Foi amplificado um fragmento com um tamanho entre 1078 e 1081 pb, de acordo com as sequências nucleotídicas dos quatro alelos, identificados para este gene, em *Q. suber*. O fragmento amplificado corre em electroforese em gel de agarose como uma banda do tamanho esperado, comum a todas as árvores analisadas das duas espécies (Figura 73A).

Com o objectivo de identificar os alelos do gene *QsR_{Pc}* presentes em cada indivíduo, digeriram-se os fragmentos amplificados, com a enzima de restrição *MseI* e separaram-se os fragmentos de restrição por electroforese em gel de agarose. Os padrões de restrição dos fragmentos foram comparados com os padrões de restrição conhecidos para cada um dos alelos e foi atribuído um genótipo a cada indivíduo, relativo a *QsR_{Pc}*.

De acordo com as sequências nucleotídicas dos quatro alelos, os perfis de restrição previstos, incluem fragmentos com tamanhos de 16, 53, 86, 132, 181, 182, 183, 186, 218, 318, 424 e 477 pb (figura 74). Em gel de agarose 2 % só foi possível visualizar os fragmentos com tamanho igual ou superior a 86 pb; o conjunto de fragmentos com tamanhos entre 181 e 186 pb apresentaram-se na forma de uma banda mais larga e mais intensa (Figura 73B). Três alelos possuem fragmentos de restrição únicos, que os caracterizam: o alelo *a* possui um fragmento de restrição com 218 pb, o alelo *b* possui um com 424 pb e o alelo *d* possui um com 318 pb. O alelo *c* é o único que possui em simultâneo os fragmentos de restrição com 477 pb e 132 pb (Figura 75).

Os padrões de restrição obtidos para as 168 árvores confirmam a existência dos alelos *a*, *b*, *c* e *d* e permitem identificar 4 genótipos: AC, CC, CD e ABCD ou ABDD (Figura 73B). Quando o perfil de restrição engloba fragmentos provenientes dos alelos *a*, *b* e *d* o genótipo poderá ser ABCD ou ABDD. É provável que seja ABCD, porque o alelo *c* foi identificado em todas as árvores das duas espécies, com exceção para quatro sobreiros que mostram possuir mais do que dois alelos e nos quais não foi possível determinar se o alelo *c* está presente ou ausente. No fragmento analisado não foi identificado nenhum local de restrição característico das azinheiras.

O alelo *a* está presente em 34,7 % dos sobreiros e em apenas uma das azinheiras (de 24) e o alelo *b* só está presente em 4 sobreiros. O alelo *d* está presente em 9 % dos sobreiros e em duas azinheiras. O alelo *c* está presente em todas as árvores. Oitenta e cinco sobreiros possuem o genótipo CC (59 %), quarenta e seis o genótipo AC (32 %), nove o genótipo CD (6,25 %) e quatro o genótipo ABCD (2,7 %). O genótipo AC só está presente numa azinheira e o CD em duas.

Os genótipos determinados para os sobreiros foram confrontados com os graus de desfoliação atribuídos a cada uma das árvores, para verificar se algum dos alelos estaria relacionado com um perfil de resistência ou tolerância, mas não foi observada nenhuma relação. Os genótipos aparecem em simultâneo associados a sobreiros com grau de desfoliação 0, 2 ou 3.

O fragmento do gene *QsR_{Pc}* analisado por PCR-RFLP inclui parte da região definida como transmembranar na proteína e parte da região LRR. No segmento da região LRR estão incluídos os cinco primeiros motivos do tipo LxxLxα.

Em *I2*, um dos genes com os quais *QsR_{Pc}* apresenta homologia, foi identificado, na mesma região, um segmento com 28 aminoácidos potencialmente implicado na resistência total conferida por este gene à estirpe 2 do *F. oxysporum*. Este segmento corresponde a uma inserção que faz aumentar numa unidade e em duas unidades, o número de motivos LRR, em relação aos genes *I2C-1* e *I2C-2*, respectivamente, pertencentes ao mesmo *locus* e que apenas conferem resistência parcial ao fungo (Simons *et al.*, 1998). Entre os vários alelos de *Q. suber* só foram observadas mutações pontuais na região sequenciada.

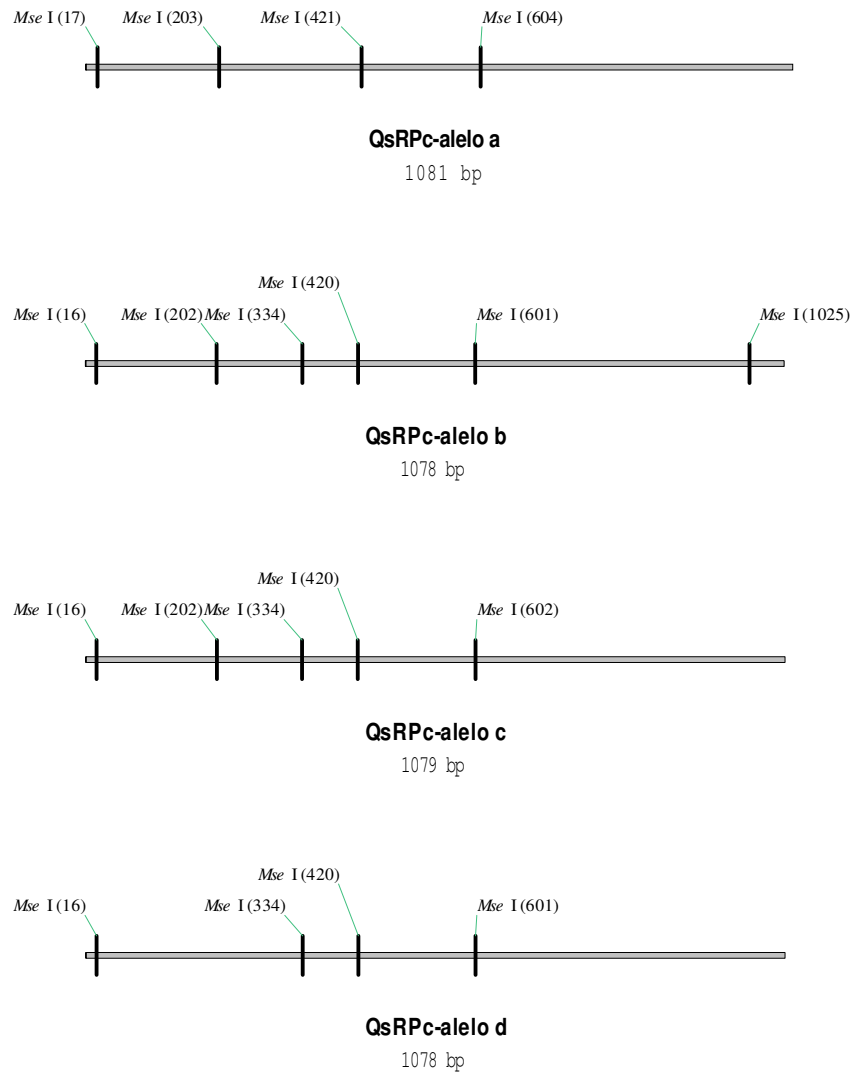


Figura 74. Representação esquemática das sequências dos alelos *a*, *b*, *c* e *d* do gene *QsRPC*, delimitadas pelos *primers* PR2 e PR3, com indicação dos locais de restrição de *Mse* I.

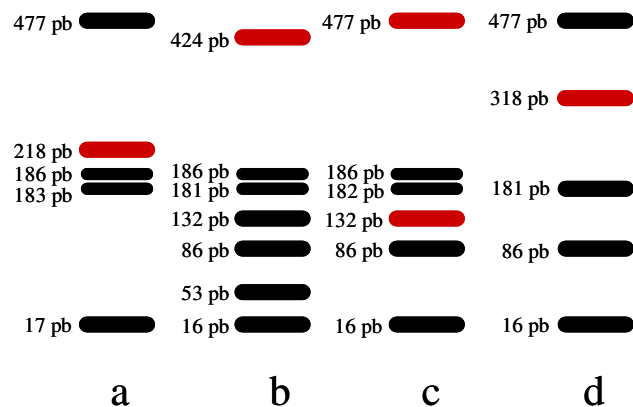


Figura 75. Padrões de restrição criados por *Mse* I, previstos para os alelos *a*, *b*, *c* e *d* do gene *QsRPC*. Os fragmentos assinalados a vermelho são específicos para cada um dos alelos e permitem identificá-los por electroforese em gel de agarose 2 %.

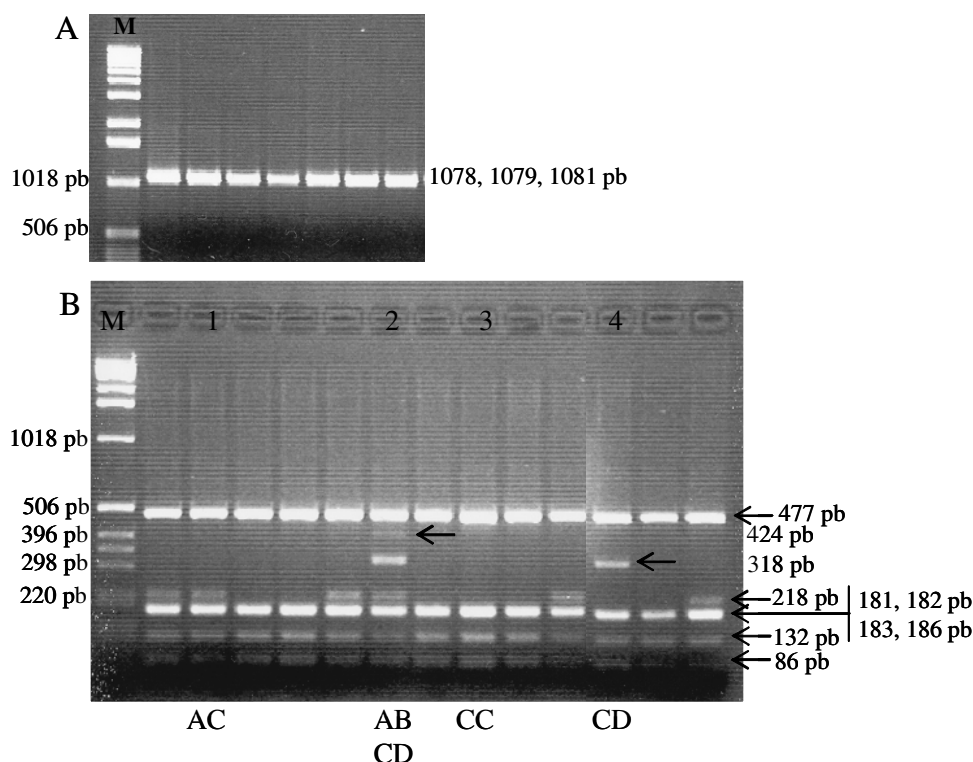


Figura 73. A: Separação electroforética dos fragmentos amplificados com os *primers* PR2 e PR3 a partir de DNA genómico de sete sobreiros diferentes (Canais 2 a 8). Canal 1: M-marcador de massa molecular.

B: Perfis de restrição obtidos por digestão com *Mse* I dos fragmentos acima amplificados. Identificação dos génotipos AC (1), CC (3), CD (4) e ABCD (2).

No tomate, a expressão de segmentos da região LRR, orientados em anti-sentido ou em sentido, em relação aos transcritos de genes *I2C-1* e *I2C-3* pertencentes ao *locus* *I2* de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, estirpes 1 e 2, anulou a resistência à estirpe 2 em plantas transgênicas. A expressão de *I2C-1* nestas plantas repôs a resistência parcial à estirpe 2 do agente patogénico (Ori *et al.*, 1997). Os autores deste trabalho consideram que, provavelmente, nenhum dos genes membros da família é suficiente para, individualmente, conferir resistência à estirpe 2 do *F. oxysporum* e que a resistência ao agente patogénico depende da expressão concertada de vários genes de uma mesma família que pode ter um efeito de dosagem ou promover um leque mais alargado de interações. O *locus* *I2C* foi apresentado, recentemente, como um *locus* complexo que integra pelo menos três genes com funções sobrepostas. Estes genes podem conferir vários níveis de resistência à estirpe 2 de *F. oxysporum*. A comparação entre as sequências nucleotídicas de quatro genes de resistência, revela que a razão entre as mutações não sinónimas e as mutações sinónimas é três vezes mais elevada nas

regiões LRR expostas ao meio exterior do que nas regiões NBS ou da extremidade amínica, indicando pressão selectiva por parte do agente patogénico (Sela-Buurlage *et al.*, 2001).

É possível que os vários graus de desfoliação que se observam nos sobreiros submetidos a factores abióticos idênticos, resultem de resistência parcial ao fungo, e que seja necessária a acção concertada de vários genes ou alelos que sejam cópias activas, para conferir resistência total a *P. cinnamomi*.

Existem algumas teorias acerca da importância de manter níveis elevados de polimorfismo nos genes que integram *locus* complexos, como os genes de resistência, que codificam múltiplas proteínas com a capacidade para reconhecer múltiplos factores de avirulência (Hughes e Yeager, 1998). Em princípio, o heterozigotismo nas populações apresenta vantagens e a existência de níveis elevados de polimorfismo é essencial para garantir que a maior parte dos indivíduos sejam heterozigóticos. Esta observação está relacionada com a facilidade com que os agentes patogénicos podem ultrapassar a resistência mediada pelos genes de resistência, por perda ou mutação dos factores de avirulência, ao passo que, os genes de resistência nas plantas dependem de mutações raras para adquirir novas funções. Tendo em consideração a frequência alélica é possível fazer uma outra interpretação. A pressão selectiva exercida sobre o agente patogénico por um alelo muito frequente numa população é superior à pressão exercida por um alelo raro. Deste modo, supõe-se que a tendência que o agente patogénico apresenta para ultrapassar o reconhecimento dos genes de resistência seja superior em relação aos alelos muito frequentes. De acordo com estas teorias, pode-se especular que a presença de quatro alelos nalguns sobreiros e de alelos pouco frequentes como os alelos *b* e *d*, possa ser a estratégia usada pelo hospedeiro para tentar ultrapassar a pressão exercida pelo agente patogénico.

Os alelos *a*, *b*, *c* e *d* podem ser alelos funcionais distintos, que conferem resistência a factores de avirulência diferentes, segregados por *P. cinnamomi*. O *locus RPP13* de *Arabidopsis* é constituído por apenas um gene de resistência do tipo LZ-NBS-LRR com dois alelos designados *RPP13-Nd* e *RPP13-Rld* de acordo com a linhagem de origem, Nd-1 e Rld-2 (Bittner-Eddy *et al.*, 2000). O alelo *RPP13-Nd* confere resistência a cinco isolamentos diferentes de *Peronospora parasitica* (*Pe. parasitica*), ao passo que, o alelo *RPP13-Rld* confere resistência a um isolamento de *Pe. parasitica* diferente dos que são reconhecidos por *RPP13-Nd*. As sequências de aminoácidos deduzidas das sequências nucleotídicas dos dois alelos apresentam uma homologia de 89 %,

verificando-se que a maior divergência ocorre na região LRR resultante de mutações pontuais. Nas regiões LZ e NBS as sequências possuem uma homologia de 95 % entre os dois alelos.

Se *P. cinnamomi* segregar as elicinas básicas e ácidas *in vivo* durante a interação com *Q. suber*, estas proteínas podem funcionar como factores de avirulência com características diferentes que são reconhecidas por alelos diferentes do gene *QsRPC*. Nesta situação, os indivíduos homozigóticos relativamente ao gene *QsRPC* estarão em desvantagem e a resistência conferida será apenas parcial, o que pode justificar a existência de árvores com vários graus de desfoliação, em condições abióticas idênticas.

II.4.1.4. Gene de *Q. suber* (*QsPDI*) que codifica uma proteína do tipo PDI (*protein disulphide isomerase*).

II.4.1.4.1. *Sequência e estrutura do gene QsPDI.*

Na análise efectuada por cDNA-AFLP, ao mRNA isolado a partir de raízes de *Q. rotundifolia*, foi identificado o fragmento C1, com 351 pb, correspondente a um gene cuja expressão aumenta durante a interacção entre *P. cinnamomi* e o hospedeiro, não tendo sido possível amplificar em *Q. suber* (II.4.1.1). A sequência nucleotídica do fragmento C1 de *Q. rotundifolia* apresenta uma homologia de 66 % com a sequência do cDNA do gene da nucleorredoxina (NRX) que codifica uma proteína do tipo PDI (*protein disulphide isomerase*), isolada de *Zea mays* (Laughner *et al.*, 1998).

Para determinar em *Q. suber* a sequência do cDNA do gene homólogo ao do fragmento C1 de *Q. rotundifolia*, definiram-se os *primers* C1SP1 e C1SP4 nas regiões de maior homologia entre C1 e NRX, para iniciarem a amplificação por RACE-PCR. Em simultâneo, escrutinou-se o gene num banco genómico de *Q. suber*, construído no bacteriófago *Lambda*, possuidor do vector *Lambda FIX II* (λ -FIX II), com uma sonda de 417 pb, preparada por amplificação do DNA genómico com os mesmos *primers*.

A partir do RNA total extraído de raízes de *Q. suber* infectadas com *P. cinnamomi* foi amplificado o cDNA dum gene que codifica uma isomerase de ligações dissulfureto de proteínas (PDI) que foi denominado *QsPDI* (AY316614). A sequência do cDNA de *QsPDI* tem 1851 pb, que incluem 88 pb na região 5' não traduzida (5' UTR), 1521 pb na região codificante e 242 pb na região 3' não traduzida (3' UTR) (Figuras 76 e 77).

No banco genómico de *Q. suber* foi identificado e isolado um clone recombinante possuidor da sequência dum gene que codifica uma PDI. O inserto foi retirado do vector por digestão com *NotI* e serviu de DNA alvo em duas reacções de amplificação. Numa, a reacção foi iniciada com os *primers* PDI-1 e PDI-2 (Figura 77), dirigidos para a sequência do gene *QsPDI*, na região do inserto. Na outra, a reacção foi iniciada com os *primers* T7 e PDI-1r (Figura 77), dirigidos para uma região do vector e do inserto, respectivamente. Os *primers* PDI-1, PDI-2 e PDI-1r foram escolhidos na sequência do cDNA de *QsPDI* obtida por RACE-PCR (Figura 77). Da primeira amplificação resultou um fragmento de 2636 pb e da segunda, um fragmento de,

aproximadamente, 10000 pb, que foram clonados no vector PCRII e dos quais foram sequenciadas 3098 pb.

A sequenciação do DNA genómico do gene *QsPDI* revela que o gene está organizado, de 5' para 3', da seguinte forma: região do promotor, nucleótido 1 a 462; exão 1, nucleótido 463 a 558 (96 pb); intrão 1, nucleótido 559 a 1420 (862 pb); exão 2, nucleótido 1421 a 1900 (480 pb); intrão 2, nucleótido 1901 a 2006 (106 pb); exão 3, nucleótido 2007 a 2480 (474), intrão 3, nucleótido 2481 a 2627 (147pb) e exão 4, nucleótido 2628 a 3098 (471 pb) (Figura 76). A proteína deduzida do transcrito processado possui 507 aminoácidos.

Na figura 77 estão alinhadas as sequências nucleotídicas do DNA e do cDNA do gene *QsPDI*. As duas sequências divergem em 3 nucleótidos na região codificante e devem pertencer a alelos diferentes (1 e 2) do mesmo gene e não a genes diferentes. A sequência de DNA passa, daqui em diante, a ser designada por *QsPDI-1* e a sequência de cDNA por *QsPDI-2*, assim como, as proteínas correspondentes. Mais adiante, neste trabalho, serão apresentados os resultados da análise de *QsPDI* por PCR-RFLP, na qual foram identificados dois perfis de restrição. Um dos perfis corresponde ao alelo 1 e o outro pode pertencer ao alelo 2.

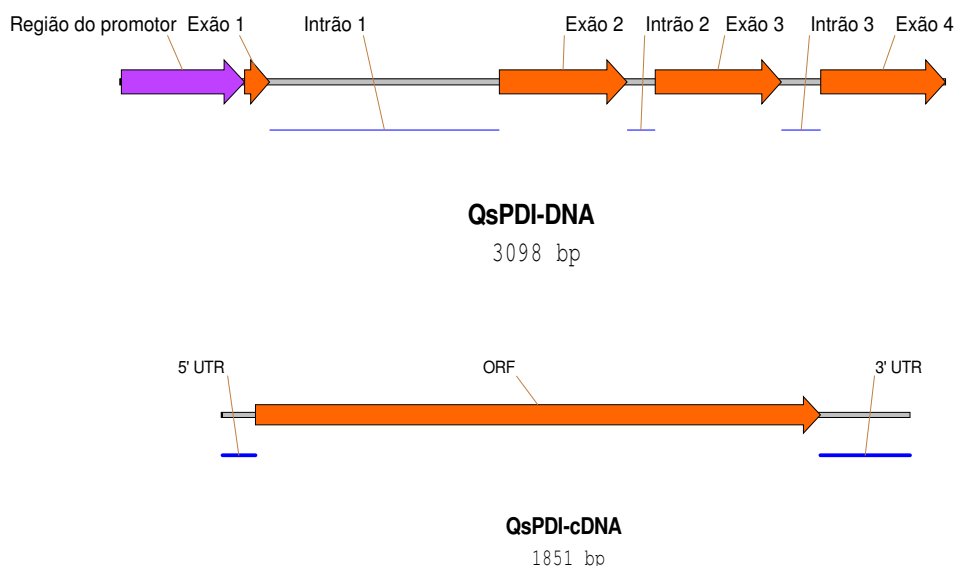


Figura 76. Representação do DNA e do cDNA do gene *QsPDI*. O gene é constituído pelos exões 1, 2, 3 e 4 com 96, 480, 474 e 471 pb, respectivamente, interrompidos pelos intrões 1 (862 pb), 2 (106 pb) e 3 (147 pb). A região que antecede o ATG, incluindo o promotor, tem 462 pb. O cDNA possui um quadro de leitura aberto (ORF) com 1521 pb, uma região 5' não traduzida (5' UTR), compreendendo 88 pb, e uma região 3' não traduzida (3' UTR), compreendendo 242 pb.

```

1    GTAAGAGAACCATAAATTGTTGCGAAATTTTTTGTATATAGAATTTTTTATAAATATATATATATATATAGTAATGC
81   TTCTTCCTTTTTTAAGAATATGAATAATGTTAATAGTAATTACACATAAAATTTGCTATTTATCTATGCAGCAATCATA
161  TTATACCACATCAAGCGATGTACACACAGAACTGCCATTAAATCCACATATGCACCAATCACATTTAACAGCATCAACA
241  ACTTGCCTGCACAGACTTATCAAAAAAAAAACAACCTTGACCTGCACAGACTTAGCGAAATAAGAAATGATTTTTCAACCC
321  TCATGACTCAGACTCAGAGTAAAAATAAAAGACAAAAATCAAAGCAGAAGTGCAGAGACAAGCAGAAAAACAAGGC
1    GCAGAGACAAGCAGAAAAACAAGGC
401  ACAGACACAGACTATATTTCGAGACATAAAGAGAGTGAGTGGAGCCAGAAAAACACAAGACATGGCAAACCGGCACGTT
27   ACAGACACAGACTATATTTCGAGACATAAAGAGAGTGAGTGGAGCCAGAAAAACACAAGACATGGCAAACCGGCACGTT
                                       PDI-1/PDI-1R
481  GACAACGTTTCTCATGATCTAATTTCACTTCTCTCGTCCGAGGAGAGGGATTATCTAGTCCGCAACACCGCGATCAGGt
107  GACAACGTTTCTCATGATCTAATTTCACTTCTCTCGTCCGAGGAGAGGGATTATCTAGTCCGCAACACCGCGATCAG
561  tttatttactatataatagtagtaacaacacagtagtttccctgtgtgaacaacaataatgatgtttgtttttattttattt
641  tatttaaacggtaaaattagaccattattgtgttaatataggatcatcatttttttcttgaataaaacacataacta
721  gagaaatagaatcataaatttaaaccttttttttagggatggtcttttcaaatcaacaattttaaggactaatttctt
801  acctaagtcgtcaaatatgatgggaacaacggtattttcacaggaatttccactactatattataaaaaactatgac
881  cataatattttatacaaaattttaagatttaggtgacagtggtttatgttgggataaaaaagtaactctcggtgatc
961  atttattttttgttcttcagtggtattttatttattttagtgcattcaacaatttgacatattggtgtgtttgtaga
1041 ctgtgttttctcaactagatatttagtcggttccatatttctataaagaacctagtcatttaaatatttgcaagtacc
1121 tacttcaatatttctgaatatttaagatttgcaagaagattgactttgatccttataatgctgagctagatcaaaa
1201 tgaattttgcttttcttaatacatatattgaccattaaaaagggcttggatttaagatctcctatggttaaaaatgtaaa
1281 tatttattttatcatttctctccttttaaaactgtgaaggaatagtagtaatttatcattgctgcatgactcctttaa
1361 cttactaattttcggggaaaaagagaagaatcatattttatcctttatgtttttcatagGTTAAAAATCAGTAATTTGAT
185  GTTAAAAATCAGTAATTTGAT
1441 AGGAAAGACAGTGGGGTTGTATTCTCTGGCTCATGGTGGCGTCCATGTTGTCATTTCACTCCAAACTTGGTGGAAAGTTT
205  AGGAAAGACAGTGGGGTTGTATTCTCTGGCTCATGGTGGCGTCCATGTTGTCATTTCACTCCAAACTTGGTGGAAAGTTT
1521 ATGAAAGAGCTCTTGCCTAAAAGTGACTTTGAAGTGGTCTTCATCTCTCTCTGATAGGAATGATGATCAATTCAGCTTAC
285  ATGAAAGAGCTCTTGCCTAAAAGTGACTTTGAAGTGGTCTTCATCTCTCTGATAGGAATGATGAGTCAATTCAGCTTAC
1601 TTGGCCAAGATGCTCTGGCTTGCATTTCCATTTTCAGATTCAGAGACCCGAAACGCCTCAAGGAATTTGTTCAAAGTGAG
365  TTGGCCAAGATGCTCTGGCTTGCATTTCCATTTTCAGATTCAGAGACCCGAAACGCCTCAAGGAATTTGTTCAAAGTGAG
1681 GGGCATCCCATAACCTTATCTTTCTTGATGCCACTGGGAAGGTTGTGACTAATCAAGGGGTGAGAAATCATTGGTGAATACG
445  GGGCATCCCATAACCTTATCTTTCTTGATGCCACTGGGAAGGTTGTGACTAATCAAGGGGTGAGAAATCATTGGTGAATACG
1761 GAGTGGATGGTTATCCATTTACTACAGAAGAATCAATTTCTGAAAGAGGAAGAAGAGAATGCCAAGAAGAACCAGTCT
525  GAGTGGATGGTTATCCATTTACTACAGAAGAATAAATTTCTGAAAGAGGAAGAAGAGAATGCCAAGAAGAACCAGTCT
1841 TTGAGTACTATTTGGTTCATGGCTCCCGCAGTCATTTAGTTTCCAATGATGAAATGAGGtataacttttggctaaagtac
605  TTGAGTACTATTTGGTTCATGGCTCCCGCAGTCATTTAGTTTCCAATGATGAAATGAG
1921 actgatagctctgctctggtccggtcctgttcttcaaatatgtgaatgacataaataactagttgttaaatgttatttgt
2001 tggcagGTTCCCTAACCCTGAGCTTGAAGGCAAAACAGTTGGCTTGTATTTTCAATAAAAAGGCTATGCCCTTGATTTTAC
665  GTTCCCTAACCCTGAGCTTGAAGGCAAAACAGTTGGCTTGTATTTTCAATAAAAAGGCTATGCCCTTGATTTTAC
2081 TCCAAAACCTGTGGAGGTTTATAAAGAACTCAAGGAGAGAGGAGAAAAGTTTGGAGATTGTGTGATATCTCTGGACGATG
739  TCCAAAACCTGTGGAGGTTTATAAAGAACTCAAGGAGAGAGGAGAAAAGTTTGGAGATTGTGTGATATCTCTGGACGATG
2161 AAGAAAATGATTTCAAAGAAGGGTTCAATACAATGCCGTGGTTGGCAGTGCCATTTAAGGACAAGTCTGCGAAAAGCTT
819  AAGAAAATGATTTCAAAGAAGGGTTCAATACAATGCCGTGGTTGGCAGTGCCATTTAAGGACAAGTCTGCGAAAAGCTT
2241 GCTCGTACTTTGACCTTGAACCTCTTCTACTGTAGTTGTAATTGGGCCAGATGGGAAGACATTAACCCAAATGTGGC
899  GCTCGTACTTTGACCTTGAACCTCTTCTACTGTAGTTGTAATTGGGCCAGATGGGAAGACATTAACCCAAATGTGGC
2321 TGAACCTATTGAGGAGCATGGTATTGAAGCTTACCCTTTTACTCCAGAGAAGCTTGCTGAGCTTGCTGAGATTGAGAAGG
979  TGAACCTATTGAGGAGCATGGTATTGAAGCTTACCCTTTTACTCCAAGGAAAGCTTGCTGAGCTTGCTGAGATTGAGAAGG
                                       C1SP4
2401 CTAGACTTGAAGCACAGACGCTAGAAAACAATTTTAGTTTCTGAGGAAAGTGATTTTGATAGACAAAAGTGGTTCCAAG
1059 CTAGACTTGAAGCACAGACGCTAGAAAACAATTTTAGTTTCTGAGGAAAGTGATTTTGATAGACAAAAGTGGTTCCAAG
2481 gtacaattctgttgattggttaaaaaatttaactcctgttgctatcaattgaaattctaacttagaagtttgatgaa
2561 attgatatttgaatagtaccaataatggaattgctataaattaattttgaattatgtatcgtgtagGTCCTGGTGTCTG
1139 GTCTGGTGTCTG
2641 AACTAGTGGAAAAGACATTCTGCTTTATTTTTCAGCTCACTGGTGCCTCCCATGTCGGCCATTCCTGCCCTAAGCTTGTA
1152 AACTAGTGGAAAAGACATTCTGCTTTATTTTTCAGCTCACTGGTGCCTCCCATGTCGGCCATTCCTGCCCTAAGCTTGTA
2721 AAAGCATACAATGAGATCAAAGAAAAGGACAACGCATTTGAAATCATATTTCATCTCAAGTGACCGTATCAATCCTCGTT
1232 AAAGCATACAATGAGATCAAAGAAAAGGACAACGCATTTGAAATCATATTTCATCTCAAGTGACCGTATCAATCCTCGTT
                                       C1SP1
2801 CGATGAATTTTTCAGGCATGCCTTGGTTAGCCCTCCCATTGGTGATAAAGAGGAAGTCAATTTTGGCACGCAAGTTCA
1312 CGATGAATTTTTCAGGCATGCCTTGGTTAGCCCTCCCATTGGTGATAAAGAGGAAGTCAATTTTGGCACGCAAGTTCA
2881 AAATTCAGGCATTCTGACAGTGTAGCTATCGGCCCCAGTGGCAGGACAGTCACTAAGGAAGCCCAGCTCATAACA
1392 AAATTCAGGCATTCTGACAGTGTAGCTATCGGCCCCAGTGGCAGGACAGTCACTAAGGAAGCCCAGCTCATAACA
2961 GCTCATGGGGCAGATGCTTATCCATTACCAGAACCATCTGAAGCGTTTGGTGAAAAGGCTGAGGAAGTGGCAAAAGA
1472 GCTCATGGGGCAGATGCTTATCCATTACCAGAACCATCTGAAGCGTTTGGTGAAAAGGCTGAGGAAGTGGCAAAAGA
3041 AGATGAGAAGAAAAGCAGAGGGATCTGCTTGGCATGGAGGTCAGTCCGTAAGGCTTGA
1552 AGATGAGAAGAAAAGCAGAGGGATCTGCTTGGCATGGAGGTCAGTCCGTAAGGCTTGAAGGAGCATTCAATGATAAATATG
                                       PDI-2
1632 TGTATGGTTACATACTGTTGGTATTACTTAGTACTACGTTATTGTAATTTTTGTCTTTTGTAGTGTCTTGTGT
1712 GTAATTAAGTGTGCTAAGTGAAATATGAGTGCATGACTTCAAAGTACTAGTATAAATATGGTGTGATAAGCTGAAGC
1792 TGCAATGTTAGTGTCTTGTCTATGTGATAAATAAAATCACTGGTGTAAAGTTTTGT

```

Figura 77. Alinhamento das seqüências nucleotídicas do DNA (negro) e do cDNA (azul) do gene *QsPDI*. Os primers C1SP1 (reverso) e C1SP4 (directo), iniciadores da amplificação da sonda e do cDNA, por RACE-PCR, estão

assinalados. Estes *primers* delimitam o fragmento da sonda de 417 pb cuja sequência está evidenciada em *bold* na sequência do DNA. Os *primers* PDI-1 (directo), PDI-1R (reverso) e PDI-2 (reverso), iniciadores das amplificações de fragmentos do inserto do clone isolado do banco genómico, estão assinalados. As sequências das regiões intrónicas estão em minúsculas e as bases GT e AG que iniciam e terminam os 3 intrões estão assinaladas a cinzento. O codão de iniciação (ATG) e o de terminação (TGA) da tradução estão duplamente sublinhados. O sinal de poliadenilação está em itálico e sublinhado na sequência do cDNA. As 3 bases que divergem entre as duas sequências estão pintadas de amarelo.

A região codificante do gene *QsPDI* tem uma homologia de sequência de 56 % com a do gene NRX de *Zea mays* que pertence à superfamília das tiorredoxinas (TRX). As TRXs são proteínas de baixa massa molecular (12 kDa), que participam em reacções de oxidação-redução na célula, através da oxidação reversível dos dois grupos tiol, presentes no centro activo (Nakamura *et al.*, 1997). Nos eucariotas foram identificadas proteínas PDI, que têm como função potencial o rearranjo das pontes dissulfureto e que possuem vários domínios relacionados, em termos evolutivos, com as tiorredoxinas (Kanai *et al.*, 1998).

II.4.1.4.2. Região do promotor do gene *QsPDI*.

Na região do promotor de *QsPDI* foram identificados vários elementos estruturais na cadeia positiva do DNA, com o auxílio do programa PLACE (Higo *et al.*, 1999). Estes elementos são potencialmente responsáveis pela transcrição, expressão diferencial e regulação do gene. A localização, na região do promotor, dos elementos que actuam em *cis* (*cis-acting elements*) e a identificação de cada elemento é apresentada na figura 78.

Entre a posição -212 e -220 sobrepõem-se sequências identificadas como: ACGTC-Box, ASF1, HEX, PALINDROMA e W-Box. Os elementos com a sequência nuclear ACGT foram identificados em muitos genes de plantas que são regulados em resposta a alterações do meio ambiente ou durante o desenvolvimento da planta. Os factores de transcrição que reconhecem estes elementos e que interagem directamente com eles pertencem à classe das proteínas bZIP (Foster *et al.*, 1994). Na análise da região promotora do gene *QsPOXI* (II.4.2.2.1), apresentada mais adiante neste trabalho, é feita referência a vários factores de transcrição com estas características. ASF1 (*activation sequence factor 1*) é um factor de transcrição que reconhece motivos com a sequência TGACG, presentes na região -75 do promotor CaMV (*cauliflower mosaic*

vírus) (Lam *et al.*, 1989). A inserção de sequências com este motivo, nos promotores de genes de plantas que se expressam especificamente em tecidos fotossintéticos, induz a expressão destes genes em níveis elevados, nas raízes (Katagiri *et al.*, 1989). O motivo HEX é uma sequência hexamérica (ACGTCA), muito conservada nas plantas e nos animais, que está presente nos promotores dos genes das histonas (Mikami *et al.*, 1987). A sequência é reconhecida especificamente pelos factores de transcrição nucleares HBP-1 (*histone DNA binding protein 1*) no trigo (Tabata *et al.*, 1989). A sequência TGACGTCA é um palíndromo reconhecido, na soja, pelos factores de transcrição STF-1 que possuem um domínio bZIP e um motivo *Zinc-finger*. Estes factores estão potencialmente envolvidos na alongação dos hipocótilos (Cheong *et al.*, 1998).

A W-Box é um dos elementos deste promotor que tem uma importância acrescida no presente trabalho. A sequência da W-Box (TTGAC) está presente nos promotores de genes relacionados com a resistência/tolerância e é reconhecida por proteínas que possuem o domínio WRKY. A expressão destas proteínas é induzida durante as infecções provocadas pelos agentes patogénicos e também, pelo ácido salicílico. *NRPI* é um gene de *Arabidopsis* que funciona como regulador positivo da resistência a doenças. A expressão de *NRPI* é induzida durante a infecção por agentes patogénicos e pelo tratamento com compostos relacionados com o sistema de defesa, tais como, o ácido salicílico. Plantas transgénicas que sobreexpressam o gene apresentam uma resistência reforçada a um espectro alargado de agentes patogénicos, enquanto que as plantas que subexpressam o gene, se tornam mais susceptíveis. No promotor deste gene está presente a sequência TTGAC (W-Box) que é reconhecida pelas proteínas WRKY. Mutações nestas W-Box impedem o reconhecimento pelas proteínas WRKY e tornam o promotor de *NRPI* incapaz de activar um gene indicador de funcionalidade. A ausência do produto deste gene reflete-se, negativamente, na activação dos genes relacionados com o sistema de defesa (Yu *et al.*, 2001).

Os elementos actuantes em cis Myc, E-Box ou motivo ABRE estão relacionados com genes de resposta à desidratação (Abe *et al.*, 2003). Os motivos Dof e GT1 também estão presentes no promotor de *QsPOX1* e serão discutidos em pormenor no ponto II.4.2.2.1, deste trabalho.

-462 GTAAGAG**AAACCCA**TAAATTTGTTGCGAAATTTTTTGTAT**ATAGAA**TTTTTT**TATAAAT**TATATATATATATATAGTAATGC
SEF3 Box II TATA-Box2

-382 TTCTTCTTTTTTAAGAATATGAATAATGTTAATTAGTAAT**TACACAT**AAAATTTGCTATTTTCTATGCAG**CAATCATA**
NAPIN CAAT-Box1

-302 **TTATACCACATCAAGCGATGTACACACAGA**ACTTGCCATTAATTCCA**CATATGCA****CCAAT**CACATTTAACAGCAT**CAACA**
TAPOX1 E-Box/SAUR/MYC CAAT-Box1 RAV1

-222 AC**TTGACGTC**CAAGACTTATCAAAAAAAAAACAAC**TTGACGTC**CAAGACTTAGCGAATAAGAATGTATTTTTCAACCC
ACGTC-Box/ASF1/HEX/PALINDROMA/W-Box HEX/PALINDROMA/W-Box

-142 TCATGACTCAGACTCAGGAGTAAAATAAAAAGACCAAAAATC**AAAG**CAGAAGTGACAGACAAAGC**AGAAAAACAAG**GC
DOF POLLEN/GT1 DOF

-62 ACAGACACAGACT**ATATT**TGCAGACAT**AAAG**AG**GTGAGTGA**GCCCC**GAAAAA**CAC**AAAG**ACATG
TAPOX1 DOF GTGA GT1 DOF

Figura 78. Sequência da região do promotor do gene *QsPDI*. O nucleótido +1 corresponde à adenina do codão de iniciação ATG. As sequências dos elementos que actuam em cis (*cis-acting elements*) estão em itálico e a negrito. Os motivos discutidos no texto estão em caixas amarelas. A designação dos elementos, localização, sequência e referência no PubMed ou bibliográfica são as seguintes: **SEF3**, -455, AACCCA, 2535514; **BOXII**, -423, ATAGAA, 1048824; **NAPIN**, -341, TACACAT, 2029903; **CAAT-Box1**, -246, -310, CAAT, 2710102; **TAPOX1**, -305, -49, ATATT, 7581519; **E-Box/MYC**, -255, CANNTG, 8818291; **SAUR**, -255, CATATG, Xu *et al.*, 1997; **RAV1**, -227, CAACA, 9862967; **ACGTC-Box**, -217, GACGTC, 8119490; **ASF1**, -219, TGACG, 2813365, 2528037; **HEX**, -217, -183, ACGTCA, 2822486; **PALINDROMA**, -219, -185, TGACGTCA, 9721678; **W-Box**, -220, -184, TTGAC, 11449049; **DOF**, -99, -68, -35, -6, AAAG, Yanagisawa e Schmidt, 1999, Yanagisawa, 2000; **GT1**, -75, -15, GRWAAW, 10417717; **POLLEN**, -76, AGAAA, 9678581; **TATA-Box**, -412, TATAAAT, 2710102; **GTGA**, -28, -24, 11414616.

II.4.1.4.3. Proteínas do gene QsPDI.

Os alelos 1 e 2 de *QsPDI* codificam para potenciais proteínas com 507 aminoácidos que divergem uma da outra no aminoácido da posição 192. Em QsPDI-1 está presente um ácido glutâmico e em QsPDI-2 está presente uma glicina (Figura 79). Dada a elevada homologia que apresentam as duas sequências (99,8 %) será feita referência a apenas uma delas (QsPDI-1) na análise que se segue.

		1		70
QsPDI-1	(1)	MANGDVDNVSHDLISLLSSEERDYLVRNNGDQVKISNLIGKTVGLYFSGSWCGPCCHFTPNLVEVYEELL		
QsPDI-2	(1)	MANGDVDNVSHDLISLLSSEERDYLVRNNGDQVKISNLIGKTVGLYFSGSWCGPCCHFTPNLVEVYEELL		
		71		140
QsPDI-1	(71)	PKGDFEVVFISDRNDESFNGYLAKMPWLAIPFSDSETRKRLKELFKVIRGIPNLIFLDATGKVVTNQGV		
QsPDI-2	(71)	PKGDFEVVFISDRNDESFNGYLAKMPWLAIPFSDSETRKRLKELFKVIRGIPNLIFLDATGKVVTNQGV		
		141		210
QsPDI-1	(141)	IIGEYGVDPGYPFTTERINFLKEEEENAKKNQSLSTILVHGSRSHLVSNDGNVPIPELEGKTVGLYFSIK		
QsPDI-2	(141)	IIGEYGVDPGYPFTTERINFLKEEEENAKKNQSLSTILVHGSRSHLVSNDGNVPIPELEGKTVGLYFSIK		
		211		280
QsPDI-1	(211)	RLCLDFTPKLVEVYKCLKKERGSEFEIVLISLDDEENDFKEGFNTMPWLAVPFKDKCCEKLARYFDLETLP		
QsPDI-2	(211)	RLCLDFTPKLVEVYKCLKKERGSEFEIVLISLDDEENDFKEGFNTMPWLAVPFKDKCCEKLARYFDLETLP		
		281		350
QsPDI-1	(281)	TVVVGPDGKTLNPNVAELIEEHGIEAYPFTPEKLAELAEIEKARLEAQTLETILVSEESDFVIDKSGSK		
QsPDI-2	(281)	TVVVGPDGKTLNPNVAELIEEHGIEAYPFTPEKLAELAEIEKARLEAQTLETILVSEESDFVIDKSGSK		
		351		420
QsPDI-1	(351)	VLVSELVGKNILLYFSAHWCPPCRAFLPKLVKAYNEIKEKDNAFEIIFISSDRDQSSFDEFFAGMPWLAL		
QsPDI-2	(351)	VLVSELVGKNILLYFSAHWCPPCRAFLPKLVKAYNEIKEKDNAFEIIFISSDRDQSSFDEFFAGMPWLAL		
		421		490
QsPDI-1	(421)	PFGDKRKSFLARKFKIQGIPAAVAIGPSGRTVTKEARQLITAHGADAYPFTEDHLKRLVEKAEVAKEDE		
QsPDI-2	(421)	PFGDKRKSFLARKFKIQGIPAAVAIGPSGRTVTKEARQLITAHGADAYPFTEDHLKRLVEKAEVAKEDE		
		491	507	
QsPDI-1	(491)	KKAEGSACDGGHCRKA*		
QsPDI-2	(491)	KKAEGSACDGGHCRKA*		

Figura 79. Alinhamento das sequências das proteínas deduzidas das regiões codificantes de QsPDI-1 e QsPDI-2. O único aminoácido que diverge entre as duas sequências está assinalado a amarelo.

A proteína deduzida de QsPDI é constituída por três módulos repetidos, que foram identificados por comparação da sequência da proteína contra si própria ou seja, tendo-se a si própria como referência. A detecção das sequências repetidas foi feita através do programa RADAR (*rapid automatic detection and alignment of repeats in protein sequence*), disponível no EMBL-EBI (*European Bioinformatics Institute*; <http://WWW.ebi.ac.uk/radar>).

Os três módulos repetidos, com 154 aminoácidos cada, estão organizados em sequência e foram designados por *a*, *b* e *a'* de acordo com a nomenclatura usada para a designação dos módulos repetidos nas PDIs (Figura 80A e B). O módulo *a* estende-se do aminoácido 13 ao 166, o *b* do 171-324 e o *a'* do 329 ao 482. A sequência do primeiro e do terceiro módulos contêm os motivos WCGPC e WCPPC, característicos

dos locais activos das tiorredoxinas (Rivera-Madrid *et al.*, 1995; Kurooka *et al.*, 1997). Este motivo está ausente no módulo b.

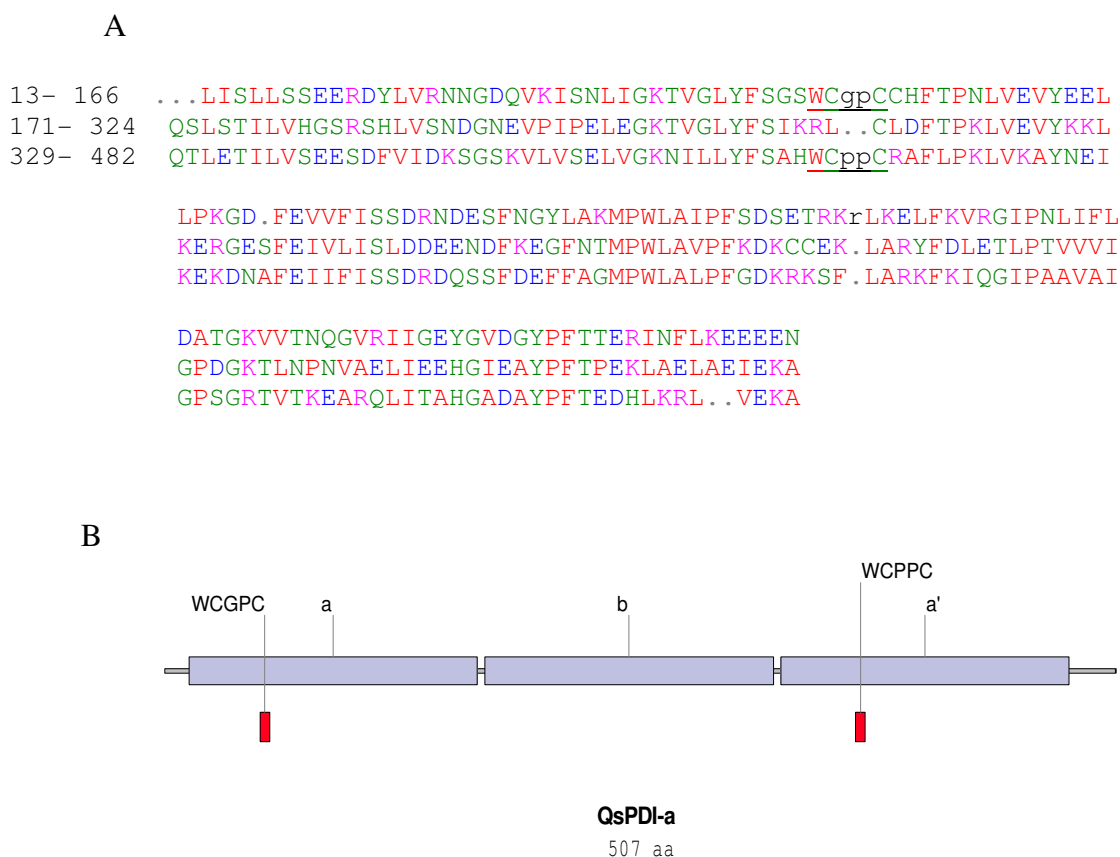


Figura 80. **A.** Representação das seqüências dos três módulos repetidos, identificados na seqüência de aminoácidos da proteína deduzida da seqüência nucleotídica de *QsPDI*. Módulo *a*: aminoácidos 13-166; Módulo *b*: aminoácidos 171-324; Módulo *a'*: aminoácidos 329-482. A posição do motivo WC(G/P)PC, nos módulos *a* e *a'*, está assinalada a sublinhado.

B. Representação esquemática da proteína *QsPDI* com as regiões correspondentes aos módulos e aos motivos WC(G/P)PC.

A organização de *QsPDI* é muito semelhante à observada na nucleorredoxina (NRX) isolada de *Zea mays*, com excepção da extremidade carboxílica em que existe um motivo *Zinc Finger* na NRX, que está ausente na proteína deduzida de *Q. suber* (Laughner *et al.*, 1998). Na NRX estão presentes 3 módulos (*a*, *a**, *a'*) do tipo-TRX tal como em *QsPDI*. Para visualizar melhor a homologia existente entre os dois genes, nos domínios do tipo-TRX que possuem actividade catalítica de tiorredoxina (*a* e *a'*), foi efectuado o alinhamento destes domínios, com a seqüência em aminoácidos da TRX-h de *Arabidopsis thaliana* (Z35474) (Figura 81). O alinhamento mostra as regiões mais conservadas e as regiões em que houve inserção de segmentos nos módulos do tipo-TRX de *QsPDI* e NRX, comparativamente à seqüência de referência das tiorredoxinas, representada pela TRX-h de *A. thaliana*. NRX é uma proteína do tipo-PDI, localizada

no núcleo e tem proveniência num gene único, segundo análise de restrição e hibridação efectuada ao DNA genómico do milho. Segundo os autores, a tiorredoxina estará potencialmente envolvida na alteração do estado de oxidação-redução de factores de transcrição envolvidos na indução ou inibição da transcrição de genes (Laughner *et al.*, 1998).

As PDIs constituem uma família de proteínas que possuem na estrutura primária dois ou mais domínios de tiorredoxina, comportando um local activo com o motivo WC(G/P)PC. Com base no número de domínios e na sua posição relativa, as PDIs foram divididas em 4 classes. A classe 1 compreende proteínas com cerca de 500 aminoácidos, que possuem dois domínios TRX separados por uma região de aproximadamente 230 aminoácidos. Já foram identificadas PDIs pertencentes a esta classe em animais, plantas e fungos. As PDIs da classe 2 possuem cerca de 400 aminoácidos e têm dois domínios TRX separados por 14 a 37 resíduos. As classes 3 e 4 integram as PDIs com três domínios de TRX. QsPDI pertence à classe 4 porque possui os três domínios de tiorredoxina, uns a seguir aos outros, separados por apenas 5 aminoácidos. Para além de QsPDI, só existe registo de mais duas PDIs pertencentes à classe 4, que são a PDIR de *Homo sapiens* (ID: Q14554) e NRX de *Z. mays* (ID: U90944) (Kanai *et al.*, 1998).

Segundo Kanai *et al.* (1998), a família das PDIs descende duma proteína que possuía na sua estrutura primária dois domínios de tiorredoxina. As várias estruturas observadas nos membros actuais de todas as classes terão sido criadas por fenómenos de duplicação e eliminação de domínios.

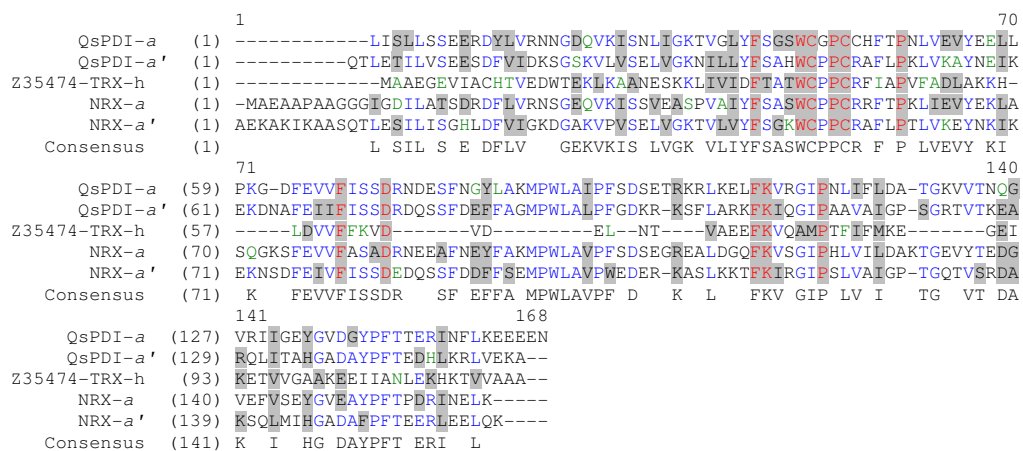


Figura 81 Alinhamento das sequências de aminoácidos dos módulos *a* e *a'* de QsPDI com os módulos *a* e *a'* da NRX de *Z. mays* (U90944) e com a TRX-h de *A. thaliana* (Z35474).

II.4.1.4.4. Expressão do gene *QsPDI* em raízes de *Q. suber*.

A expressão do gene *QsPDI* foi analisada por RT-PCR e hibridação, com uma sonda específica marcada com digoxigenina, a partir de RNA total extraído de raízes de *Q. suber* não infectadas e de raízes que estiveram em contacto com o micélio de *P. cinnamomi*, durante 24 horas. A sonda, com 270 pb, foi preparada por PCR com os primers C1SP1e C1SP4, a partir de cDNA, e reconhece um fragmento de cDNA do gene *QsPDI*, com 881 pb. A intensidade dos sinais de hibridação, obtidos após detecção do produto amplificado, foi medida por densitometria. A absorvência registada nas raízes não infectadas e nas raízes infectadas foi comparada em três ensaios diferentes realizados com soluções do cDNA diluídas de 1:50, 1:100 e 1:200.

O fragmento de *QsPDI* transcrito *in vitro*, amplificado e identificado pela sonda, tem o tamanho esperado de acordo com a sequência nucleotídica do cDNA do gene. A absorvência registada nas raízes infectadas é superior à registada nas raízes não infectadas, para os três ensaios, verificando-se um decréscimo dos valores obtidos com o aumento da diluição do cDNA (Figura 82A e B). Após 24 horas de interação entre *Q. suber* e *P. cinnamomi*, a quantidade de mRNA (%) presente nas raízes infectadas, disponível para ser transcrito *in vitro* e amplificado, é mais elevada nas raízes infectadas do que nas raízes não infectadas (Figura 82B). *QsPDI* é, portanto, um gene relacionado com a patogénese, cuja expressão aumenta, nas primeiras horas de infecção. Esta conclusão é confirmada pela presença da W-Box na região do promotor do gene. A sequência da W-Box (TTGAC) está presente nos promotores de genes relacionados com a resistência/tolerância e é reconhecida por proteínas que possuem o domínio WRKY.

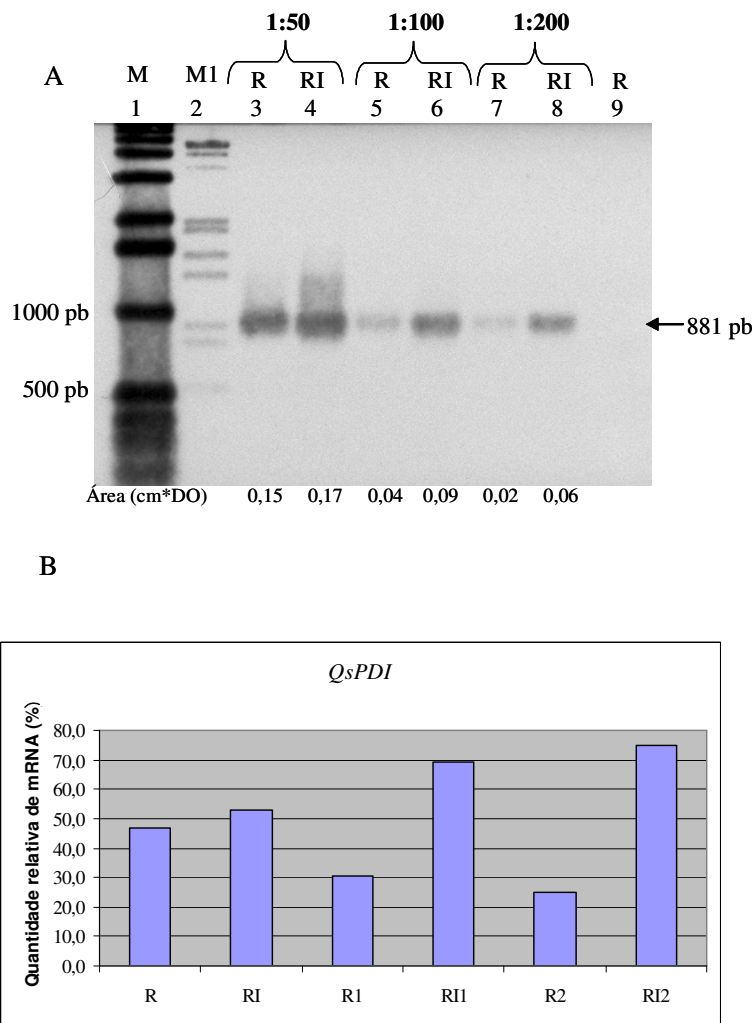


Figura 82. A. Padrão de expressão do gene *QsPDI*, analisada por RT-PCR e hibridação, com uma sonda específica marcada com digoxigenina, a partir de RNA total extraído de raízes de *Q. suber* não infectadas (R) e de raízes infectadas com *P. cinnamomi* (RI). O tamanho do fragmento detectado pela sonda, com 270 pb, tem 881 pb e está assinalado com uma seta. A reacção de amplificação foi realizada em soluções de cDNA diluídas de 1:50, 1:100 e 1:200. A intensidade do sinal de hibridação emitido foi medida por densitometria, considerando a área delimitada pela banda, e os valores das áreas delimitadas pelos picos de absorvência estão referidos na base da imagem A. M e M1 são marcadores de massa molecular. O canal 9 corresponde ao fragmento amplificado do gene da actina não reconhecido pela sonda.

B. Gráfico de barras representando as quantidades relativas, em percentagem, de mRNA de *QsPDI* presente nas amostras de raízes de *Q. suber* não infectadas (R) e infectadas (RI) com *P. cinnamomi*, disponível para ser transcrito *in vitro* e amplificado. R e RI: diluição do cDNA 1:50; R1 e RI1: diluição de 1:100; R2 e RI2: diluição de 1:200.

A função clássica atribuída às proteínas do tipo-PDI é a de catálise enzimática da formação, redução e isomerização de ligações dissulfureto, que ocorre durante o enrolamento das proteínas, no retículo endoplasmático (RE) dos eucariotas (Figura 83) (Ferrari e Söling, 1999). Na figura 83 apresenta-se um esquema dos mecanismos das reacções catalisadas pelas PDIs.

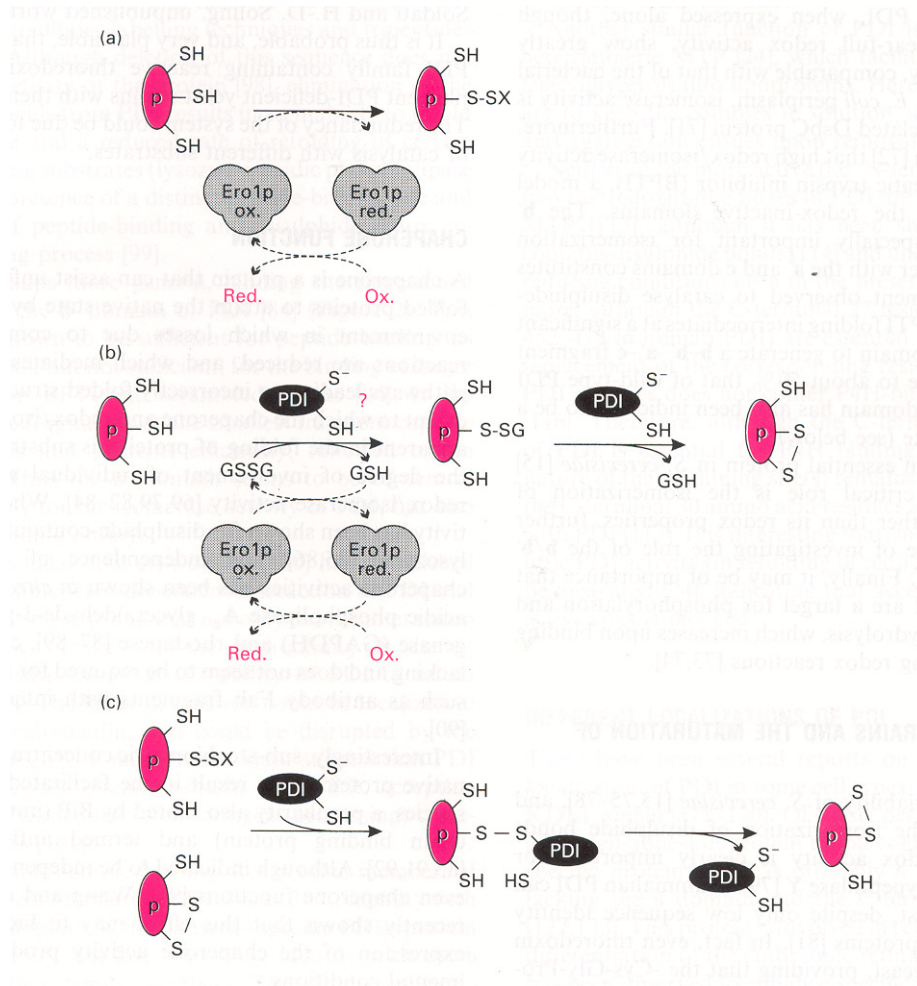


Figura 83. Mecanismos possíveis para a formação, redução e isomerização de ligações dissulfureto. A formação de ligações dissulfureto em proteínas pode ser catalisada directamente (a) ou indirectamente (b) por Ero1P. Uma PDI também pode catalisar o passo (b). A Ero1p é uma proteína associada à membrana do retículo endoplasmático das leveduras, possuidora de 4 resíduos de cisteína. A isomerização de ligações dissulfureto é catalisada pela PDI utilizando glutatona na forma oxidada (b) ou qualquer outro substrato (proteína) possuidor de ligações dissulfureto intra ou inter moleculares. S- indica o resíduo de cisteína do local activo colocado mais próximo da extremidade amínica e considerado o mais reactivo. A associação da oxidação directa do substrato, através do passo (a), com a isomerização proposta no passo (c) evita a utilização de glutatona. O mecanismo pelo qual Ero1p-red passa a Ero1p-ox é desconhecido (Adaptado de Ferrari e Söling, 1999).

No entanto, nos últimos anos têm surgido vários trabalhos que descrevem a participação destas proteínas noutras actividades celulares, tais como, a adesão celular (Pariser *et al.*, 2000), a assistência a proteínas em acções de desenrolamento ou enrolamento incorrectos (*chaperone*) (Tsai *et al.*, 2001) e a intervenção na associação de subunidades de proteínas (Jonh *et al.*, 1993). Como as PDIs possuem um ou mais domínios, com locais activos característicos das tioredoxinas, pode-se acrescentar a esta multiplicidade de funções, a activação de factores de transcrição (Hirota *et al.*, 1997) e a resposta ao stresse oxidativo, que fazem parte das funções descritas para as TRXs (Aslund e Beckwith, 1999; Ritz *et al.*, 2000). Em sintonia com o alargamento das funções, está a localização das proteínas PDI, que também não é restrita ao RE, havendo registo de segregação para o meio extracelular em determinados tipos de tecidos, tal como acontece com a proteína *R-cognin* da retina, que promove a agregação específica das células neste órgão e com uma PDI isolada de hepatócitos de rato (Terada *et al.*, 1995; Pariser *et al.*, 2000). No interior da célula, os membros da família das PDI já foram encontrados nos cloroplastos, na membrana externa das mitocôndrias (Kim e Mayfield, 1997; Rigobello *et al.*, 2001) e no núcleo (Laughner *et al.*, 1998).

Nas plantas, não existem referências que relacionem directamente as PDIs com a patogénese e *QsPDI* parece ser o primeiro gene a ser referenciado com essa função. A presença dos motivos WCGPC e WCPPC, neste gene, potencia uma acção relacionada com a manutenção do estado de oxidação-redução celular, tal como tem sido referenciado para as tioredoxinas. Estas proteínas podem funcionar como dadores de energia a algumas enzimas, tais como, a ribonucleótido redutase, peróxido de hidrogénio redutase e metionina sulfóxido redutase, através da transferência de protões entre cisteínas (Schürmann e Jacquot, 2000). Nalguns casos, as TRXs regulam a acção de factores de transcrição nos mamíferos, através da modificação da conformação das ligações dissulfureto, presentes nestas proteínas (Schenk *et al.*, 1994; Hirota *et al.*, 1997).

Actualmente, o conceito de regulação do estado de oxidação-redução das células, atribuído às catalases, superóxido dismutases e tioredoxinas, está a emergir como um novo mecanismo de resposta celular dos animais, nas interacções relacionadas com a patogénese, com origem em infecções virais, imunodeficiência, transformação maligna e doença degenerativa. Nas células que sofrem alterações decorrentes das infecções por vírus (vírus da leucemia, HTLV-1; hepatite B) detectaram-se níveis elevados de tioredoxinas (Nakamura *et al.*, 1997). As alterações na expressão da TRX

parecem estar associadas ao mau funcionamento do sistema imunitário, nos humanos, porque em tecidos de indivíduos infectados com o vírus HIV observa-se supressão da expressão de TRX. A tiorredoxina nos humanos foi identificada inicialmente como ADF (*adult T cell leukemia-derived factor*), uma proteína presente nas células T de indivíduos com leucemia. Observou-se que as TRX/ADF exercem funções no meio intracelular e extracelular. No interior das células, a TRX/ADF está envolvida na regulação das interacções entre proteínas e entre proteínas e ácidos nucleicos, através da alteração do estado de oxidação-redução dos resíduos de cisteínas. No meio extracelular, actua como um protector celular contra o stresse oxidativo com origem em infecções virais, raios-X, radiação ultravioleta e H₂O₂. A acção de protecção é promovida pela transdução de sinais intracelulares, que resultavam na resposta por parte das células aos vários tipos de stresses. Um dos mecanismos de activação dos genes consiste na alteração do estado de oxidação-redução dos factores de transcrição que são responsáveis pela regulação da expressão de genes envolvidos na resposta de defesa (Nakamura *et al.*, 1997).

Nas plantas superiores ocorre produção de peróxido de hidrogénio e de radicais livres hidroxilo em resposta a traumatismos e na sequência de interacções com agentes patogénicos. A produção destas espécies químicas muito reactivas (AOS) precede, normalmente, a resposta hipersensível, caracterizada pela morte das células no local de infecção. Não existem, contudo, evidências experimentais, nas plantas, que permitam relacionar a produção de AOS com a indução de genes envolvidos na morte celular. A resposta hipersensível parece funcionar, antes, como um sinal de alerta para as células circundantes e para o resto da planta, do que como um mecanismo de defesa directo (Heath, 2000).

Verdoucq *et al.* (1999) identificaram alvos da acção das tiorredoxinas h de *Arabidopsis thaliana* em *Saccharomyces*. Estes autores isolaram uma tiorredoxina h complexada com a proteína peroxissomal YLR109, uma proteína muito abundante em leveduras. YLR109 tem função de peroxidase dependente da tiorredoxina h. Os peroxissomas são as principais fontes de H₂O₂ endógeno, proveniente da degradação de ácidos gordos nos eucariotas e da fotorrespiração nas plantas. A peroxidase YLR109 pode ajudar à eliminação de H₂O₂ nos peroxissomas, evitando a sua difusão para fora deste organelo. Como o H₂O₂ presente fora dos peroxissomas, funciona como um sinal celular para activação do sistema de defesa nas plantas, as tiorredoxinas presentes no

citoplasma podem, através das peroxidases, regular a transdução de sinais, em resposta à infecção por agentes patogénicos.

Recentemente, foi sugerido que a tiorredoxina h presente nas plantas, pode actuar como um segundo mensageiro. Esta tiorredoxina tem capacidade de passar de uma célula para outra através do *plasmodesmata* e tem capacidade de regular a actividade dos receptores do tipo quinases, que estão associados à membrana celular (Schürmann e Jacquot, 2000; Bower *et al.*, 1996).

Os dois domínios do tipo-tiorredoxina presentes em QsPDI indiciam que esta proteína pode desempenhar funções semelhantes às descritas para as tiorredoxinas h e TRX/ADF, não parecendo, portanto, estranho, o seu envolvimento na resposta de defesa de *Q. suber* à infecção por *P. cinnamomi*.

II.4.1.4.5. Pesquisa de polimorfismos no gene QsPDI, por PCR-RFLP.

Um fragmento do gene de *QsPDI* com 1095 pb foi amplificado com os *primers* TIO (directo) e o C1SP1 (reverso) a partir de DNA genómico extraído de 20 árvores da espécie *Q. suber* e foi submetido a análise de restrição com *EcoRI*, *HindIII* e *MseI*. O fragmento abrange parte de 2º exão, o 2º intrão, o 3º exão, o 3º intrão e 156 bases do 4º exão. Das três enzimas testadas em *Q. suber* foi seleccionada a *MseI*, que reconhece a sequência TTAA e a análise foi alargada a 144 árvores da espécie *Q. suber* e 24 árvores da espécie *Q. rotundifolia*. *MseI* foi a enzima seleccionada porque os fragmentos de restrição produzidos podem ser separados em gel de agarose.

O fragmento amplificado nos sobreiros é de tamanho idêntico ao amplificado nas azinheiras e o padrão de restrição obtido, também. Nas 168 amostras, só se observaram dois padrões de restrição, existindo um deles, em apenas uma das árvores (Figura 84). O número de bandas (6) que se observam por electroforese em gel de agarose, no perfil comum a 167 árvores, está em concordância com os locais de restrição previstos na sequência do gene *QsPDI-1* (Figura 85A e B). A sequência do cDNA pressupõe a existência dum outro alelo que possui, em relação à sequência do alelo *I*, mais um local de restrição *MseI* na região codificante do gene (Figura 85A e B). Não podemos, no entanto, saber, com certeza, quantos fragmentos se deveriam produzir, porque não conhecemos a sequência dos intrões deste alelo. O perfil menos frequente

parece resultar do conjunto dos fragmentos obtidos na análise de restrição com *MseI* para os dois alelos.

A análise por PCR-RFLP evidenciou que o gene *QsPDI* é muito conservado em *Q. suber* e em *Q. rotundifolia*, duas espécies de *Quercus* que se caracterizam pela elevada heteroziguidade e polimorfismo genético.

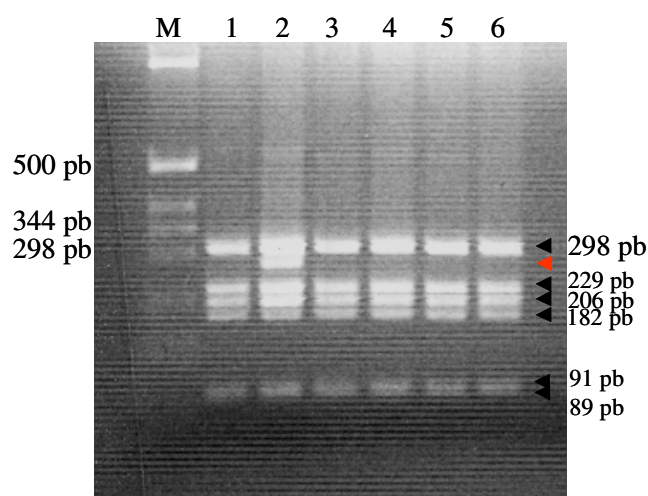


Figura 84. Análise do gene *QsPDI* por PCR-RFLP efectuada em seis sobreiros. Separação dos fragmentos de restrição por electroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. Os dois padrões de restrição obtidos com a enzima *MseI* estão presentes nos canais 1 e 2. O padrão de todos os canais, com excepção do 2, integra os fragmentos com 298, 229, 206, 182, 91 e 89 pb previstos na sequência do gene *QsPDI-1*. Os fragmentos com 91 e 89 pb aparecem como uma banda só. O fragmento suplementar que aparece no canal 2 e que está ausente nos restantes canais está assinalado a vermelho. M: marcador de massa molecular.

A

```

1   CTAACCTTATCTTTCTTGATGCCACTGGGAAGGTTGTGACTAATCAAGGGGTCAGAATCATTGGTGAATACGGAGTGGAT
1   CTAACCTTATCTTTCTTGATGCCACTGGGAAGGTTGTGACTAATCAAGGGGTCAGAATCATTGGTGAATACGGAGTGGAT
   TIO
81  GGTATCCATTTACTACAGAAAGAATCAATTTCTTCAAAGAGGAAGAAGAGAATGCCAAGAAGAACCAGTCTTTGAGTAC
81  GGTATCCATTTACTACAGAAAGAATTAAATTTCTTCAAAGAGGAAGAAGAGAATGCCAAGAAGAACCAGTCTTTGAGTAC
   MseI
161 TATTTGGTTCATGGCTCCCGCAGTCATTTAGTTTCCAATGATGGAAATGAGgtatacttttggttaagtaactgatag
161 TATTTGGTTCATGGCTCCCGCAGTCATTTAGTTTCCAATGATGGAAATGGG
241 ctctgctctggtcggctcctggttcttctaataatgtgaatgacataaataactagttgttaaagtgttattgttggcagGT
213                                     MseI
321 TCCTATACCTGAGCTTGAAGGCAAAACAGTTGGCTTGTATTTTCAATAAAAAGGCTATGCCTTGATTTTACTCCAAAAC
216 TCCTATACCTGAGCTTGAAGGCAAAACAGTTGGCTTGTATTTTCAATAAAAAGGCTATGCCTTGATTTTACTCCAAAAC
401 TTGTGGAGGTTTATAAGAACTCAAGGAGAGAGGAGAAAGTTTTGAGATTGTGTTGATATCTCTGGACGATGAAGAAAAAT
296 TTGTGGAGGTTTATAAGAACTCAAGGAGAGAGGAGAAAGTTTTGAGATTGTGTTGATATCTCTGGACGATGAAGAAAAAT
481 GATTTCAAAGAAGGGTTCATACAAATGCCGTGGTTGGCAGTGCCATTTAAGGACAAGTGCTGCGAAAAGCTTGCTCGTTA
376 GATTTCAAAGAAGGGTTCATACAAATGCCGTGGTTGGCAGTGCCATTTAAGGACAAGTGCTGCGAAAAGCTTGCTCGTTA
   MseI
561 CTTTGACCTTGAACCTTCTCTACTGTAGTTGTAATTGGGCCAGATGGGAAGACATTAACCCAAATGTGGCTGAACTCA
456 CTTTGACCTTGAACCTTCTCTACTGTAGTTGTAATTGGGCCAGATGGGAAGACATTAACCCAAATGTGGCTGAACTCA
   MseI
641 TTGAGGAGCATGGTATTGAAGCTTACCCTTTTACTCCAGAGAAGCTTGCTGAGCTTGCTGAGATTGAGAAGGCTAGACTT
536 TTGAGGAGCATGGTATTGAAGCTTACCCTTTTACTCCAGAGAAGCTTGCTGAGCTTGCTGAGATTGAGAAGGCTAGACTT
721 GAAGCACAGACGCTAGAAACAATTTAGTTTCTGAGGAAAGTGATTTTGTGATAGACAAAAGTGGTTCCAAGgtacaatt
616 GAAGCACAGACGCTAGAAACAATTTAGTTTCTGAGGAAAGTGATTTTGTGATAGACAAAAGTGGTTCCAAG
801 cttgttgattggtaaaaaaattaatccttggtgctatcaattgaaattctaatacctagaagtttgatgaacattgatat
788                                     MseI
881 ttgaatagtaccaataaattgaattgtcataaattaattttgaattatgtatctggttagGTCCTGGTGTCTGAACTAGTT
788                                     MseI
961 GGAAAGAACATTCTGCTTTATTTTTCAGCTCACTGGTGCCCCCATGTGCGCATTCTGCCTAAGCTTGTAAGCATA
809 GGAAAGAACATTCTGCTTTATTTTTCAGCTCACTGGTGCCCCCATGTGCGCATTCTGCCTAAGCTTGTAAGCATA
1041 CAATGAGATCAAAGAAAAGGACAACGCATTGAAATCATATTCATCTCAAGTGAC
889 CAATGAGATCAAAGAAAAGGACAACGCATTGAAATCATATTCATCTCAAGTGAC
   CISP1

```

B

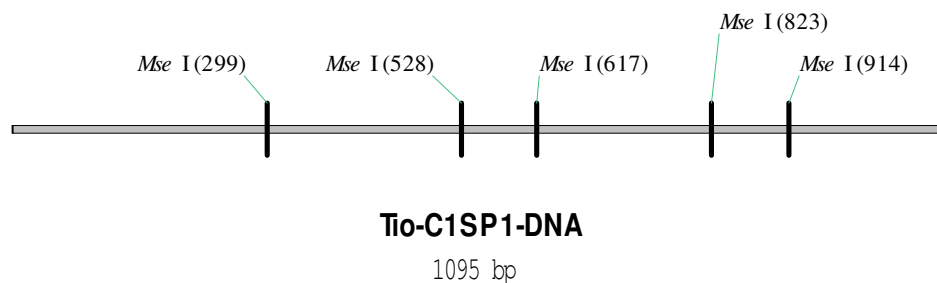


Figura 85. **A:** Sequências do fragmento de DNA genómico amplificado com os *primers* TIO e CISP1 que foi submetido a análise de restrição com *MseI* (a negro) e do cDNA do gene *QsPDI* (a azul). Os locais de restrição *MseI* estão assinalados. Na posição 107 um polimorfismo de um nucleótido cria um local *MseI* suplementar no cDNA.

B: Representação esquemática dos locais de restrição previstos na sequência de *QsPDI-1*.

II.4.1.5. Gene que codifica uma proteína do tipo RelA/SpoT de *Q. suber* (*QsRSH*).

II.4.1.5.1. Clonagem e caracterização de sequências parciais do gene *QsRSH*.

Na análise por cDNA-AFLP foram identificados os fragmentos C36 e C53, com 313 pb, que possuem a mesma sequência nucleotídica (II.4.1.1). C36 foi isolado a partir de RNA total extraído de folhas de sobreiro cultivado em solo artificialmente infestado, após oito dias de infestação. C53 foi amplificado a partir de cDNA de folhas do sobreiro BS110HL, localizado num local de declínio, na Herdade dos Leitões e que apresentava um grau de desfoliação 3. A sequência nucleotídica destes fragmentos apresenta, na região em que se sobrepõem, uma homologia de 69 % com a do gene *RSH2* de *A. thaliana* (AF225703) que codifica uma proteína do tipo RelA/SpoT.

Na referida sequência seleccionaram-se os *primers* C36SP1 e C36SP4 para determinar por RACE-PCR a sequência completa do cDNA do gene correspondente aos fragmentos C36 e C53, a partir de RNA total extraído das raízes de *Q. suber* infectadas com *P. cinnamomi*. Com os mesmos *primers* preparou-se uma sonda com 670 pb, a partir de DNA genómico, para escrutinar o gene num banco genómico de *Q. suber*, preparado no bacteriófago λ .

A primeira sequência parcial do cDNA dum gene que codifica uma proteína do tipo RelA/SpoT em *Q. suber* foi obtida, por RACE-PCR, numa reacção iniciada com os *primers* C36SP4 e GR3' (GR3' hibrida-se com o adaptador ligado à extremidade 3' do cDNA pela cadeia de poli-T). O fragmento de cDNA com 555 pb corresponde à região 3' dum gene de *Q. suber* que foi designado por *QsRSH*. Pelo mesmo método, mas iniciadas por outros *primers*, foram amplificadas outras sequências de cDNA divergentes da primeira em vários nucleótidos que podem corresponder a sequências de isoformas do mesmo gene.

No banco genómico foi identificado um bacteriófago recombinante que hibridou com a sonda de 670 pb. O clone positivo foi isolado e o inserto foi retirado do vector por digestão com *NotI*. Deste inserto foram amplificados dois fragmentos com 3678 pb e 803 pb, iniciados pelos pares de *primers* T7/C36SP1 e C36SP4/RSH2, respectivamente (Figura 86). O *primer* T7 foi dirigido para uma região do vector e os outros *primers* foram dirigidos para regiões do gene *QsRSH* conhecidas através das

sequências de cDNA. Os fragmentos amplificados foram clonados no vector PCRII e foi determinada uma sequência de DNA com 3784 pb que corresponde à sequência parcial dum gene que codifica uma proteína do tipo RelA/SpoT em *Q. suber*. O gene está interrompido no local de restrição da enzima *Sau3AI*, usada na preparação do banco genómico.

A sequência de DNA de *QsRSH* foi comparada com as sequências presentes nos bancos de dados e apresenta homologia com genes que codificam RSHs de *A. thaliana* (*AtRSH1*, AF225702; *AtRSH2*, AF225703; *AtRSH3*, NM_104291), *Suaeda japonica* (*SjRSH*, AB079577) e *Nicotiana tabacum* (*NtRSH*, AY046898) com valores que variam entre os 31 e os 55 %.

Com o auxílio do programa GeneMark (Borodovsky e McIninch, 1993) e com base nas sequências de DNA e de cDNA do gene *AtRSH2* de *A. thaliana*, determinaram-se, teoricamente, as regiões dos exões e dos intrões na sequência de DNA do gene *QsRSH* (Figura 86). O gene *AtRSH2* é formado por seis exões interrompidos por cinco intrões de pequeno tamanho (número de pares de bases inferior a 100) (Figura 87). O gene *QsRSH* apresenta a mesma estrutura que *AtRSH2* relativamente aos exões 2, 3, 4, 5 e 6 e aos intrões 1, 2, 3, 4 e 5 (Figura 88). O fragmento de *QsRSH* que foi sequenciado, está interrompido no exão 1 e, portanto, não podemos excluir a existência de outros intrões a interromper este exão. Parece, contudo, pouco provável, porque as regiões dos restantes exões em *QsRSH* correspondem precisamente, às regiões codificantes em *AtRSH2*. Os intrões previstos em *QsRSH* estão delimitados pelos motivos GT-AG e são de tamanho muito superior aos observados em *Arabidopsis* (Figura 88). Tem-se verificado, aliás, que o tamanho dos intrões dos genes que foram identificados neste trabalho é sempre muito superior ao tamanho dos intrões presentes em genes homólogos doutras espécies de plantas.

Nos intrões 2 e 3 observam-se repetições dos motivos (TC)₈ e (CT)₁₁, respectivamente (Figura 86).

1	GATCTTCTGT	GAGGATTTTG	TGGTTAAGGC	TTTTTATGAG	GCTGAGAAAAG	CTCATAGAGG
61	GCAGGTAAG	ATTTGAATTT	TTTATTGATT	TTATTGTGTT	TGTGTGGGGT	TTTTGTGATT
121	TGGGTTTGG	AGTCTTTTTG	CTGTTTTCTG	TTGTAGATGC	GTGCTAGTGG	AGATCCTTAT
181	TTGCAGCATT	GTGTGGAGAC	TGCAGTTGATG	CTGGCTTTGA	TTGGAGCTAA	TTCCAGCTGTG
241	GTTGCTGCAG	GGCTTTTGCA	TGACACTCTG	GATGATTCTT	TTATGAATTA	TGACTATGTT
301	TTTGGGACTT	TTGGTGCTGG	GGTTGCTGAT	TTGGTTGAAG	GGTGTAGAGT	TTGAATTTTT
361	ATAACTAAAT	GTTTTATTTG	ATACCGTTAA	GTAGAAAATA	GTAAGTTTGG	TTCAATGCTT
421	GAAATTGTTT	CTATTGTTTG	TACATGAAAA	CATGTATGAT	GAAGTGTTA	TAATTTACTA
481	TTTGAATAAT	CTAGCTGAAG	AAGAAGAAAAG	TTTTAATGGG	CTAAATTGAA	TATCTACAAG
541	CAATGGTTTT	GTAGATTGCT	TATTGTTTCT	TAAATGCTGT	GTTGGACCAT	GAGCTGGCAG
601	AATTCTAGAT	GACGTATTCA	ATTAAGAAG	ATCTAATTGT	GAATCAGATA	AAGAAGAAAT
661	TATTGATGCG	ACACTTGATT	AGATTCTGAT	ACAGCAGGGC	ATATAATTCT	GTGTGATCAA
721	TGTTTGTGTT	ATGTGAAGGG	ATTGTAGTTG	TTTCTATCAT	ATGTAATATG	TTCACCTTTT
781	TAAATGCTGC	TTTTGAATGA	ATTTTTTCC	CTTGAGCATC	ATGTTATTGG	GTGTTCTGCC
841	TCGTAGTTGT	AAGTAAAACC	CCAGCTTTTA	AGATTGATAA	TATACTACTT	TGTTGTTTTG
901	TAAAAGGTTT	TGGGATTCTT	GATGTGAAGT	GTGGATCTCT	ATGGTGTGA	AGTATGGATG
961	TTGTAGTCAA	TTGCATGTT	GATTATATGT	CATTTTCTTT	GGAGTAGCCA	CAGATAGATG
1021	AGATAGATAT	GGTGTATCTT	CATGACACTG	TCTCAGTTGC	CACCCCACCT	TTTCTATTTA
1081	TGAAGATTCT	ATGTTTTTTC	ACACTTGTTT	TGGTTGTAAT	TCCATTTTCT	ATTGCTTTTT
1141	TTAGAATACA	TATTCCAGAT	TTAAGGTATC	TGGCATATTG	TCGCAACTTT	AGGTGACTAA
1201	GCTTTCGTTT	ATATGAATTG	TTAAGTGCGT	AGTATTTTCT	AAAGCATCTG	TGTGATAGAT
1261	TAGAAGTTTG	AACTTTGATT	CTCATTAAACA	CCCCCCCCC	CCCTTCTCTC	TCCCCCTCTC
1321	TCTCAGTTT	TAAAGTAAAA	TCTTATGCAG	TATAGAATTT	ATCATTGGGC	TTTACTGAGA
1381	TGCATTATCT	TGACATTTTG	ACCTTATGAG	CCTCTACTTC	TTTATGGCAT	CTGTTTGTGT
1441	CTCCAAGCTA	AGTCACTTGA	GTAAGCTTGC	ACGTGACAAC	AATACAGCTA	ATAAAACAGT
1501	TGAGGCTGAT	CGCTTGATA	CCATGTTTCC	TGCGATGGCT	GATGCAAGGG	CTGCTCCAT
1561	TAAATTGGCA	GATCGATTGC	ATAATATGAT	GACACTAGAT	GCATTGCCCT	CAGCTAAGCA
1621	ACAAAGGTTT	GCGAAGGAGA	CCTTGGAGAT	TTTTGCACCC	TTGGCTAATC	GTTTTAGGAA
1681	CTCTAGTTTG	AAGGATCAGC	TAGAAAATG	GTGTTTTAAG	CATCTCCACC	CAGACCAGCA
1741	TGAAGAAATG	TCCTCTAAGC	TTGTTAGTCT	GTTTGTGAG	GCGATGATCA	CTTCTGCCAC
1801	AGAAAAATTA	AAGCAGGCTC	TTAAGGCTAA	ATCCGTTTCT	TATCAGGACT	TATCTGGGCG
1861	GCATAAGAGC	TTGTATAGCA	TATACTCCAA	AATGTTGAA	TATGCACTCT	CTCTCTCTCT
1921	CTCTCTCTAA	ACATCCATGC	CCACTGCTAA	TTAACTTTC	GAATCTGGAG	AAGGTTGTCC
1981	ATGTAGTTTT	TTAGGACTAA	TCTTCAATTT	TGCATCTAGA	ATTAATGAAA	AGGTGACTCG
2041	GGCGAATGAG	CTCTAGCTCA	ACTAGCACCT	CATCCCCTTG	CATGTACTAG	GTGGAGGGCG
2101	AGGTATGTGG	GTTCAAGATA	CACTAGGTGC	CTGTGTTACT	TGCCAAAAAA	AAAAAAAATA
2161	AAAAGTCCACC	TAATTAACTA	TTGTTTTTGA	GTCTTACCTG	GAAACTTCAT	TAATCAATGA
2221	TGATTTATGC	GACCATATTG	GATATCGGGT	ATCGGGTGTG	TGAAACTATG	GTTTAATTTT
2281	GTTAGATATT	TTTTGTATGA	ATAAAGTGAA	TCTCAGGGCT	TCTAAAATCA	CTTCTTAGTC
2341	TGAGCTGTGA	AATGTATTTG	AGAAAATTGT	TCTTATAGTA	TCATTCAAT	AGTTATGGTG
2401	TATTTTATTT	GATTATTACA	TTAATTATGT	GATATTGTTT	TCTTGTGTTG	CAGAAAGGAG
2461	CTAACTATGG	ATGAAATTCA	TGACATTTCA	GGGTTACGTT	TGATTGTTGA	CAATGAGGAG
2521	GATTGCTATA	AAGCATTGAG	AGTTGTTTCC	CAGCTATGGC	CTGAAGTACC	TGGAAAGCTC
2581	AAGGACTACA	TAAGTCATCC	CAAGTTTAAT	GGTCTGTAG	TAGCTTAAA	GTGGTTCTCA
2641	GCACTTGATT	ACTTCAATCT	TTTCCTTTTT	AACTTAGATT	TTATAATTAT	AGGTATCGAT
2701	CTCTACACAC	AGTAGTGATG	GATGAAGGAA	TGGTTCCCTCT	TGAAGTTCAA	ATCCGGACAA
2761	GGGAGATGCA	TTTGCAGGCG	GAGTTTGGAT	TTGCGGCTCA	TTGGAGATAC	AAGGAAGGTG
2821	ATTGTAAACA	TCCTTCATTT	GTTCTTCAGA	TGGTTGAGTG	GGCTCGATGG	GTTGTTACCT
2881	GCCAAATGTA	GACAATGAAT	TCATCCATTG	CCTATGCTGA	TTCGATTAGG	CCACCCTGCA
2941	CATTCCCTTC	GCATTCTGAG	GATTGTCCGT	ATTCATATAA	GCCACACTGT	GGCCAGGATG
3001	GGCCTGTGTT	TGTGATCATG	ATTGAGAATG	ATAAGTTTG	TGATTGAATT	TGTATTAGTT
3061	CAATGCTCCT	TTATTTGATT	GCTGTTTCCC	TATTATAGAT	GGTATGAACT	AGGATGAGCG
3121	TAATAGTAAT	CTTGTGACTA	GGTGCTGCTC	CAAGTCTTAT	TCAAGGGCCC	AATTTGATTA
3181	ATTTAGTAGC	TTGTAGCTTA	TTTGGATGAG	CTTATCTCTT	AAGTATAGGT	TTTGAAAGCT
3241	TCACATTTTT	CTAGGTACAA	CTGTACTTTA	CACAATAAAC	AAAATAAGCT	GATGGTCCAT
3301	CTAAATGTCT	ATTCATCAT	TGTGCTACCT	TGTTTAAAGT	CGATCTAGTA	AACGGAGAAA
3361	TAAATAGAAC	TATGTTGTGT	TCTAACTACC	CTTTAGCAAT	GCCTTTTGTG	ATGTATGAGG
3421	TTTTGAATTT	ATTCAGTGAA	GAGACCTTGA	CATGCTTCTT	GTGGGGATAT	TGCTAGATGC
3481	AGTACAGGAG	TTTCTGCTA	ACTCGACGAT	AATGGATTTG	TTGGAAAGAT	CTGGACGAGG
3541	AAGCTCAAGA	TGGACACCGT	ATGGTTTCCC	TTTGAAGGAA	GAATTGAGGC	CAAGGCTGAA
3601	CCATCAGCCA	GTGAATGACC	CCATGTGCAA	GTTGAAAATG	GGGGATGTGT	TGGAGTTAAC
3661	TCCAGCCATA	TCTGACAAGT	CTTTGACAGA	GTACAGGGAA	GAGATTCAGC	GAATGTATGA
3721	TCGCGGGCTG	ACTGTATCTA	GCAGTGGCCC	TGCTGCTAGC	AGTATAGTTG	GATGGAGAAG
3781	TGTA					

Figura 86. Sequência nucleotídica parcial do gene *QsRSH* de *Q. suber*. Os segmentos correspondentes aos exões, previstos teoricamente, estão a cinzento. As sequências GT-AG que delimitam os intrões estão a vermelho. A sequência tem início no local de restrição da enzima *Sau3AI* (GATC) e termina no TGA. Os motivos repetidos (CT)₈ e (TC)₁₀, presentes nos intrões 2 e 3 estão sublinhados.

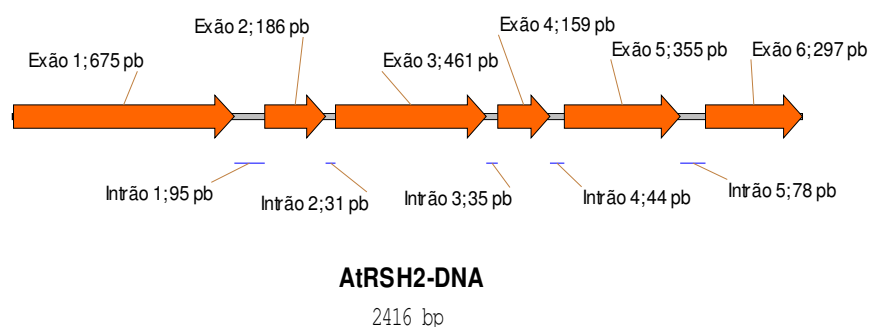


Figura 87. Estrutura do gene *AtRSH2* de *A. thaliana*.

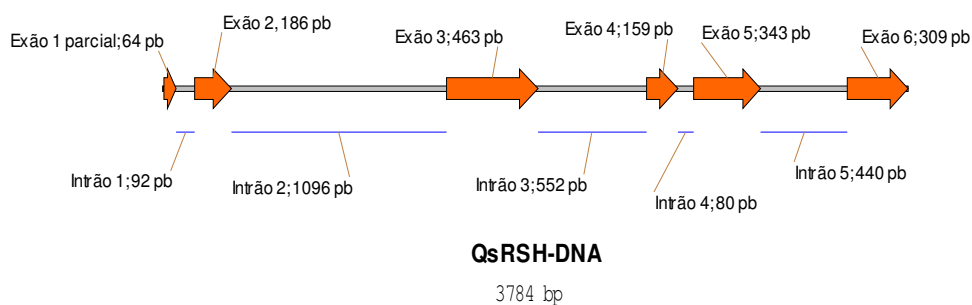


Figura 88. Estrutura prevista para o gene *QsRSH* de *Q. suber*.

Na figura 89A e B estão alinhadas todas as sequências obtidas a partir de cDNA e a sequência do DNA genómico do gene *QsRSH*. Na extremidade 3' não traduzida, após o codão de terminação, está presente um motivo repetido TA, polimórfico entre os vários fragmentos de cDNA. No fragmento *QsRSH-rsh3d-3'p1* o motivo está repetido 5 vezes e nas sequências *QsRSH-c36sp4-3'* e *QsRSH-rsh3d-3'p2* está repetido 7 vezes.

A

C36-1	(1)	-----
QsRSH-c36sp2-5'	(1)	-----
QsRSH-c36sp4-3'	(1)	-----
QsRSH-cds	(771)	AAAATGTTGAAAAAGAAGCTAACTATGGATGAAATTCATGACATTCATGGGTACGTTTGATTGTTGACA
QsRSH-qrsh2-f	(1)	-----GCTAACTATGGATGAAATTCATGACATTCATGGGTACGTTTGATTGTTGACA
QsRSH-rsh3d-3'p1	(1)	-----
QsRSH-rsh3d-3'p2	(1)	-----
		→ QRSH-2
C36-1	(1)	-----
QsRSH-c36sp2-5'	(1)	-----TGGCCTGAAGTACCTGGAAAGCTCAA
QsRSH-c36sp4-3'	(1)	-----
QsRSH-cds	(771)	ATGAGGAGGATTGCTATAAAGCATTGAGAGTTGTTCCACAGCTATGGCCTGAAGTACCTGGAAAGCTCAA
QsRSH-qrsh2-f	(54)	ATGAGGAGGATTGCTATAAAGCATTGAGAGTTGTTCCACAGCTATGGCCTGAAGTACCTGGAAAGCTCAA
QsRSH-rsh3d-3'p1	(1)	-----
QsRSH-rsh3d-3'p2	(1)	-----
C36-1	(1)	-----
QsRSH-c36sp2-5'	(27)	GGACTACATAAGTCATC CCAAGTTTAATGGGTATCGATCTCTACACACAGTAGTGATGGATGAAGGAATG
QsRSH-c36sp4-3'	(1)	-----
QsRSH-cds	(841)	GGACTACATAAGTCATC CCAAGTTTAATGGGTATCGATCTCTACACACAGTAGTGATGGATGAAGGAATG
QsRSH-qrsh2-f	(124)	GGACTACATAAGTCATC CCAAGTTTAATGGGTATCGATCTCTACACACAGTAGTGATGGATGAAGGAATG
QsRSH-rsh3d-3'p1	(1)	----- CCAAGTTTAATGGGTATCGATCTCTACACACAGTAGTGATGGATGAAGGAATG
QsRSH-rsh3d-3'p2	(1)	----- CCAAGTTTAATGGGTATCGATCTCTACACACAGTAGTGATGGATGAAGGAATG
		→ RSH-3d
C36-1	(1)	-----
QsRSH-c36sp2-5'	(97)	GTTCCCTTGAAGTTCAAATCCGGACAAGGGAGATGCATTTGCAGGCGGAGTTTGATTGCGGCTCATT
QsRSH-c36sp4-3'	(1)	-----
QsRSH-cds	(911)	GTTCCCTTGAAGTTCAAATCCGGACAAGGGAGATGCATTTGCAGGCGGAGTTTGATTGCGGCTCATT
QsRSH-qrsh2-f	(194)	GTTCCCTTGAAGTTCAAATCCGGACAAGGGAGATGCATTTGCAGGCGGAGTTTGATTGCGGCTCATT
QsRSH-rsh3d-3'p1	(54)	GTTCCCTTGAAGTTCAAATCCGGACAAGGGAGATGCATTTGCAGGCGGAGTTTGATTGCGGCTCATT
QsRSH-rsh3d-3'p2	(54)	GTTCCCTTGAAGTTCAAATCCGGACAAGGGAGATGCATTTGCAGGCGGAGTTTGATTGCGGCTCATT
C36-1	(1)	-----
QsRSH-c36sp2-5'	(167)	GGAGATACAAGGAAGGTGATTGTA AACATCCTTCATTGTTCTTCAGATGGTTGAGTGGGCTCGATGGGT
QsRSH-c36sp4-3'	(1)	-----
QsRSH-cds	(981)	GGAGATACAAGGAAGGTGATTGTA AACATCCTTCATTGTTCTTCAGATGGTTGAGTGGGCTCGATGGGT
QsRSH-qrsh2-f	(264)	GGAGATACAAGGAAGGTGATTGTA AACATCCTTCATTGTTCTTCAGATGGTTGAGTGGGCTCGATGGGT
QsRSH-rsh3d-3'p1	(124)	GGAGATACAAGGAAGGTGATTGTA AACATCCTTCATTGTTCTTCAGATGGTTGAGTGGGCTCGATGGGT
QsRSH-rsh3d-3'p2	(124)	GGAGATACAAGGAAGGTGATTGTA AACATCCTTCATTGTTCTTCAGATGGTTGAGTGGGCTCGATGGGT
C36-1	(1)	----- A CCATTGCCTATGCTGATTAGGCCACCCTCGACA
QsRSH-c36sp2-5'	(237)	TGTTACCTGGCAATGAGACAAATGAATTCATCCATTGCCTATGCTGATTAGGCCACCCTCGACA
QsRSH-c36sp4-3'	(1)	-----
QsRSH-cds	(1051)	TGTTACCTGCAATGTGAGACAAATGAATTCATCCATTGCCTATGCTGATTAGGCCACCCTCGACA
QsRSH-qrsh2-f	(334)	TGTTACCTGGCAATGAGACAAATGAATTCATCCATTGCCTATGATTAGGCCACCCTCGACA
QsRSH-rsh3d-3'p1	(194)	TGTTACCTGGCAATGAGACAAATGAATTCATCCATTGCCTATGATTAGGCCACCCTCGACA
QsRSH-rsh3d-3'p2	(194)	TGTTACCTGGCAATGAGACAAATGAATTCATCCATTGCCTATGCTGATTAGGCCACCCTCGACA
C36-1	(41)	TTCCCTTCGCATTCTGAGGATTGTCGGTATTCATATAAGCCACACTGTGGCCAGGATGGGCTGTGTTTG
QsRSH-c36sp2-5'	(307)	TTCCCTTCGCATTCTGAGGATTGTCGGTATTCATATAAGCCACACTGTGGCCAGGATGGGCTGTGTTTG
QsRSH-c36sp4-3'	(1)	----- GCCACACTGTG-ECAGGATGGGCTGTGTTTG
QsRSH-cds	(1121)	TTCCCTTCGCATTCTGAGGATTGTCGGTATTCATATAAGCCACACTGTGGCCAGGATGGGCTGTGTTTG
QsRSH-qrsh2-f	(404)	TTCCCTTCGCATTCTGAGGATTGTCGGTATTCATATAAGCCACACTGTGGCCAGGATGGGCTGTGTTTG
QsRSH-rsh3d-3'p1	(264)	TTCCCTTCGCATTCTGAGGATTGTCGGTATTCATATAAGCCACACTGTGGCCAGGATGGGCTGTGTTTG
QsRSH-rsh3d-3'p2	(264)	TTCCCTTCGCATTCTGAGGATTGTCGGTATTCATATAAGCCACACTGTGGCCAGGATGGGCTGTGTTTG
		→ C36SP4
C36-1	(111)	TGATCATGATTGAGAATGATAAGATGTCAGTACAGGAGTTTCCCTGCTAACTCGACGATAATGGATTGTT
QsRSH-c36sp2-5'	(377)	TGATCATGATTGAGAATGATAAGATGTCAGTACAGGAGTTTCCCTGCTAACTCGACGATAATGGATTGTT
QsRSH-c36sp4-3'	(32)	TGATCATGATTGAGAATGATAAGATGTCAGTACAGGAGTTTCCCTGCTAACTCGACGATAATGGATTGTT
QsRSH-cds	(1191)	TGATCATGATTGAGAATGATAAGATGTCAGTACAGGAGTTTCCCTGCTAACTCGACGATAATGGATTGTT
QsRSH-qrsh2-f	(474)	TGATCATGATTGAGAATGATAAGATGTCAGTACAGGAGTTTCCCTGCTAACTCGACGATAATGGATTGTT
QsRSH-rsh3d-3'p1	(334)	TGATCATGATTGAGAATGATAAGATGTCAGTACAGGAGTTTCCCTGCTAACTCGACGATAATGGATTGTT
QsRSH-rsh3d-3'p2	(334)	TGATCATGATTGAGAATGATAAGATGTCAGTACAGGAGTTTCCCTGCTAACTCGACGATAATGGATTGTT
C36-1	(181)	GGAAAGATCTGGACGAGGAAGCTCAAGATGGACACCGTATGGTTCCCTTGAAGGAAGAATTGAGGCCA
QsRSH-c36sp2-5'	(447)	GGAAAGATCTGGACGAGGAAGCTCAAGATGGACACCGTATGGTTCCCTTGAAGGAAGAATTGAGGCCA
QsRSH-c36sp4-3'	(102)	GGAAAGATCTGGACGAGGAAGCTCAAGATGGACACCGTATGGTTCCCTTGAAGGAAGAATTGAGGCCA
QsRSH-cds	(1261)	GGAAAGATCTGGACGAGGAAGCTCAAGATGGACACCGTATGGTTCCCTTGAAGGAAGAATTGAGGCCA
QsRSH-qrsh2-f	(544)	GGAAAGATCTGGACGAGGAAGCTCAAGATGGACACCGTATGGTTCCCTTGAAGGAAGAATTGAGGCCA
QsRSH-rsh3d-3'p1	(404)	GGAAAGATCTGGACGAGGAAGCTCAAGATGGACACCGTATGGTTCCCTTGAAGGAAGAATTGAGGCCA
QsRSH-rsh3d-3'p2	(404)	GGAAAGATCTGGACGAGGAAGCTCAAGATGGACACCGTATGGTTCCCTTGAAGGAAGAATTGAGGCCA
		← C36SP2

C36-1	(251)	AGGCTGAACCATCAGCCAGTGAATGACCCCATGTGCAAGTTGAAAATGGGGGATGTTGGAG-----
QsRSH-c36sp2-5'	(517)	AGGCTG-----
QsRSH-c36sp4-3'	(172)	AGGCTGAACCATCAGCCAGTGAATGACCCCATGTGCAAGTTGAAAATGGGGGATGTTGGAGTTAACTC
QsRSH-cds	(1331)	AGGCTGAACCATCAGCCAGTGAATGACCCCATGTGCAAGTTGAAAATGGGGGATGTTGGAGTTAACTC
QsRSH-qrsh2-f	(614)	AGGCTGAACCATCAGCCAGTGAATGACCCCATGTGCAAGTTGAAAATGGGGGATGTTGGAGTTAACTC
QsRSH-rsh3d-3'p1	(474)	AGGCTGAACCATCAGCCAGTGAATGACCCCATGTGCAAGTTGAAAATGGGGGATGTTGGAGTTAACTC
QsRSH-rsh3d-3'p2	(474)	AGGCTGAACCATCAGCCAGTGAATGACCCCATGTGCAAGTTGAAAATGGGGGATGTTGGAGTTAACTC
		← C36SP1
C36-1	(314)	-----
QsRSH-c36sp2-5'	(523)	-----
QsRSH-c36sp4-3'	(242)	CAGCCATATCTGACAAGTCTTTGACAGAGTACAGGGAAGAGATTGATGATCGCGGGCTGAC
QsRSH-cds	(1401)	CAGCCATATCTGACAAGTCTTTGACAGAGTACAGGGAAGAGATTGATGATCGCGGGCTGAC
QsRSH-qrsh2-f	(684)	CAGCCATATCTGACAAGTCTTTGACAGAGTACAGGGAAGAGATTGATGATCGCGGGCTGAC
QsRSH-rsh3d-3'p1	(544)	CAGCCATATCTGACAAGTCTTTGACAGAGTACAGGGAAGAGATTGATGATCGCGGGCTGAC
QsRSH-rsh3d-3'p2	(544)	CAGCCATATCTGACAAGTCTTTGACAGAGTACAGGGAAGAGATTGATGATCGCGGGCTGAC
C36-1	(314)	-----
QsRSH-c36sp2-5'	(523)	-----
QsRSH-c36sp4-3'	(312)	TGTATCTAGCAGTGGCCCTGCTGCTAGCAGTATAGTTGGATCGAGAAGTTGACCCATTGATGGCCCTT
QsRSH-cds	(1471)	TGTATCTAGCAGTGGCCCTGCTGCTAGCAGTATAGTTGGATCGAGAAGTTGACCCATTGATGGCCCTT
QsRSH-qrsh2-f	(754)	TGTATCTAGCAGTGGCCCTGCTGCTAGCAGTATAGTTGGATCGAGAAGTTGACCCATTGATGGCCCTT
QsRSH-rsh3d-3'p1	(614)	TGTATCTAGCAGTGGCCCTGCTGCTAGCAGTATAGTTGGATCGAGAAGTTGACCCATTGATGGCCCTT
QsRSH-rsh3d-3'p2	(614)	TGTATCTAGCAGTGGCCCTGCTGCTAGCAGTATAGTTGGATCGAGAAGTTGACCCATTGATGGCCCTT
		← RSH2
C36-1	(314)	-----
QsRSH-c36sp2-5'	(523)	-----
QsRSH-c36sp4-3'	(382)	TTCTTAGTTATATATATATATACATTTTCAGTGACAATCAACCATTCTTGATCATATAAAATCATTATATA
QsRSH-cds	(1523)	TTCTTAGTTATATATATATATACATTTTCAGTGACAATCAACCATTCTTGATCATATAAAATCATTATATA
QsRSH-qrsh2-f	(824)	TTCTTAGT-----
QsRSH-rsh3d-3'p1	(684)	TTCTTAGTTATATATATATATACATTTTCAGTGACAATCAACCATTCTTGATCATATAAAATCATTATATA
QsRSH-rsh3d-3'p2	(684)	TTCTTAGTTATATATATATATACATTTTCAGTGACAATCAACCATTCTTGATCATATAAAATCATTATATA
		← RSH-f
C36-1	(314)	-----
QsRSH-c36sp2-5'	(523)	-----
QsRSH-c36sp4-3'	(452)	TTGTACAGAACATATGTATCGTTCTGTAATGAAGAAATGACAACCTAACCAGGATTCACAAAAGTGATGAA
QsRSH-cds	(1523)	TTGTACAGAACATATGTATCGTTCTGTAATGAAGAAATGACAACCTAACCAGGATTCACAAAAGTGATGAA
QsRSH-qrsh2-f	(832)	TTGTACAGAACATATGTATCGTTCTGTAATGAAG-----
QsRSH-rsh3d-3'p1	(752)	TTGTACAGAACATATGTATCGTTCTGTAATGAAG-----
QsRSH-rsh3d-3'p2	(754)	TTGTACAGAACATATGTATCGTTCTGTAATGAAG-----
C36-1	(314)	-----
QsRSH-c36sp2-5'	(523)	-----
QsRSH-c36sp4-3'	(522)	TGATTGATATTCTAAAGTCACTTTGATTCTCTG
QsRSH-cds	(1523)	TGATTGATATTCTAAAGTCACTTTGATTCTCTG
QsRSH-qrsh2-f	(832)	-----
QsRSH-rsh3d-3'p1	(787)	-----
QsRSH-rsh3d-3'p2	(789)	-----

B

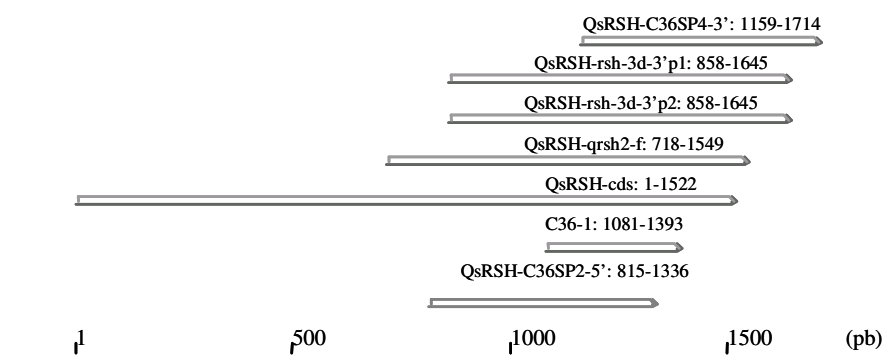


Figura 89. A. Alinhamento das sequências de cDNA e de DNA do gene *QsRSH*. Na sequência de DNA, designada *QsRSH-cds*, só foram usados os segmentos correspondentes à região codificante. As sequências de cDNA estão designadas da seguinte forma: C36-1 (clone obtido na análise por cDNA-AFLP); *QsRSH-C36SP2-5'*, *QsRSH-C36SP4-3'*, *QsRSH-rsh3d-3'p1* e *QsRSH-rsh3d-3'p2* (fragmentos amplificados pelo método RACE-PCR); *QsRSH-qrsh2-f* (fragmento amplificado com dois *primers* específicos). A localização dos *primers* específicos, usados nas amplificações, está assinalada. Na extremidade 3' do gene, após o codão de terminação da tradução, está presente um motivo repetido TA, assinalado a sublinhado duplo.

B. Esquema com o alinhamento dos fragmentos de cDNA e de DNA do gene *QsRSH*.

II.4.1.5.2. Sequência de aminoácidos deduzida da sequência de DNA do gene QsRSH.

O fragmento proteico, traduzido a partir das sequências dos exões, previstos no fragmento de DNA do gene *QsRSH*, tem 506 resíduos (Figura 90). Este fragmento corresponde à sequência parcial da proteína codificada pelo gene *QsRSH* e será designada por QsRSH.

```

1   IFCEDFVVKA FYEAEKAHRG QMRASGDPYL QHCVETAVML ALIGANSTVV
51  AAGLLHDTLD DSFMNYDYVF GTFGAGVADL VEGVSKLSHL SKLARDNNTA
101 NKTVEADRLH TMFLAMADAR AVLIKLADRL HNMMLDALP PAKQQRFKAE
151 TLEIFAPLAN RLGISSWKDQ LENLCFKHLH PDQHEELSSK LVESFDEAMI
201 TSATEKCLKQA LKAKSVSYQD LSGRHKSLSY IYSKMLKKKL TMDEIHDIHG
251 LRLIVDNEED CYKALRVVHQ LWPEVPGKLK DYISHPKFNG YRSLHTVVMD
301 EGMVPLEVQI RTREMLQAE FGFAAHWRYK EGDCKHPSFV LQMVEWARWV
351 VTCQCETMNS SIAYADSIRP PCTFPPSHSED CPYSYKPHCG QDGPVFMIMI
401 ENDKMSVQEF PANSTIMDLL ERSGRGSSRW TPYGFPLKEE LRPRLNHQPV
451 NDPMCKLKMKG DVLELTPAIS DKSLTEYREE IQRMYDRGLT VSSSGPAASS
501 IVGWRS*

```

Figura 90. Sequência em aminoácidos, traduzida das sequências nucleotídicas das regiões codificantes, do fragmento de gene *QsRSH*.

A sequência QsRSH é 60 % homóloga das sequências das proteínas deduzidas do cDNA dos genes *SjRSH* (*Suaeda japonica*), *AtRSH2* (*A. thaliana*) e *AtRSH3* (*A. thaliana*), tal como se tinha verificado com a sequência nucleotídica.

As proteínas RSH foram identificadas pela primeira vez em *Arabidopsis* em 2000 e foram designadas como proteínas homólogas de RelA e SpoT (Van der Biezen *et al.*, 2000). RelA e SpoT são proteínas que possuem sequências homólogas de aminoácidos e que desempenham um papel fundamental, nas bactérias, em resposta às situações de *stress*. A função de RelA consiste na síntese de (p)ppGpp por transferência de grupos pirofosfato do ATP para o GDP e GTP, resultando na acumulação de ppGpp e pppGpp. RelA é, portanto, uma ATP/GTP 3'-pirofosfotransferase. SpoT é uma 3'-pirofosfohidrolase e tem como função a degradação de (p)ppGpp, podendo, no entanto, promover a sua síntese em condições especiais de limitação de energia. Estes nucleótidos especiais são produzidos em condições de *stress* ocasionado por privação de compostos essenciais ao metabolismo ou condições de salinidade elevada, entre outras,

e têm capacidade para induzir ou reprimir a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas na adaptação às novas condições (Cashel *et al.*, 1996).

Yamada *et al.* (2003) analisaram o mecanismo envolvido na tolerância a quantidades elevadas de sal em *Suaeda japonica*. Num milhão de transformantes de *E. coli* que expressavam cDNAs de *S. japonica* identificaram um clone que crescia normalmente na presença de NaCl 450 mM. Este clone possuía a sequência de um cDNA completo dum gene *RSH* que codifica uma proteína do tipo RelA/SpoT com 709 aminoácidos. Para verificar se a função de SjRSH era semelhante à função desempenhada por RelA nas bactérias, estes investigadores expressaram o gene *RSH* numa estirpe de bactérias de *E. coli* RelA⁻ e cultivaram a estirpe em meio de agár SMG ou seja, meio elementar (mínimo) suplementado com os aminoácidos serina, metionina e glicina. Verificaram que os transformantes das estirpes *E. coli* RelA⁻ e RelA⁺ cresciam em meio LB e que o crescimento das estirpes RelA⁻ era inibido no meio SMG. No entanto, as estirpes *E. coli* RelA⁻ que expressavam SjRSH eram capazes de crescer em meio SMG, demonstrando que este gene codifica uma proteína capaz de catalisar a síntese de (p)ppGpp. O efeito fisiológico provocado pela expressão do gene *SjRSH* em *S. cerevisiae* também foi investigado, em condições de *stress* osmótico e salino. Nas duas situações não foram observadas diferenças na forma ou no tamanho das células dos transformantes cultivados em condições normais e em condições de *stress*. A expressão de genes induzidos em condições de *stress* salino foi analisada por *Northern Blot*, verificando-se que a síntese de (p)ppGpp regula a expressão de muitos destes genes em *S. cerevisiae* (Yamada *et al.* 2003).

A proteína AtRSH1 de *Arabidopsis* foi identificada num ensaio do tipo *Two-Hybrid* realizado em leveduras por interagir com o domínio NB-ARC ou NBS do produto do gene de resistência *RPP5*, responsável pela resposta de defesa a *Peronospora parasitica* (Van der Biezen *et al.*, 2000a). A expressão dum segmento de *AtRSH1* correspondente ao domínio da síntese de (p)ppGpp em *E. coli* confere dois fenótipos distintos: restabelecimento do crescimento do mutante *E. coli* RelA⁻ em meio SMG quando expresso em níveis baixos; inibição do crescimento do mutante *E. coli* RelA⁻ SpoT⁻ em meio LB quando sobreexpresso. A expressão de *AtRSH1* em *S. coelicolor* também induziu dois fenótipos associados com a síntese de (p)ppGpp que foram a produção precoce de antibiótico e de hifas aéreas. Segundo os autores deste trabalho, é possível que (p)ppGpp funcione nas plantas como um cofactor de transcrição que é activado rapidamente. A resposta das células das plantas em situações de *stress*

provocado pela infecção por patogénios ou em condições de desidratação ou encharcamento têm de ser rápidas e a repressão ao nível da transcrição de genes envolvidos nos processos metabólicos, mediada por (p)ppGpp, pode prevenir a perda de energia e privar nutricionalmente os invasores. Por outro lado, (p)ppGpp pode activar a transcrição de genes relacionados com a patogénese (Van der Biezen *et al.*, 2000a).

A sequência de aminoácidos de QsRSH, na região do domínio de sintetase de (p)ppGpp, foi comparada com as cinco sequências de proteínas RSH presentes nas bases de dados e com RelA e SpoT de *E. coli*. Dada a elevada homologia que se observa no domínio mais conservado destas proteínas é possível prever que QsRSH esteja envolvida na síntese de (p)ppGpp em *Q. suber* (Figura 91).

A expressão do gene *QsRSH* foi analisada por RT-PCR e hibridação, com uma sonda específica marcada com digoxigenina, a partir de RNA total extraído de raízes de *Q. suber* não infectadas e infectadas com *P. cinnamomi*. Não se observou variação da quantidade de mRNA presente nas raízes de *Q. suber* antes da infecção e após infecção com *P. cinnamomi*, disponível para ser transcrito *in vitro* e amplificado. *QsRSH* deve ser um gene que se expressa de forma constitutiva em *Q. suber* tal como acontece nas bactérias ou como foi observado em *S. japonica*.

Van der Biezen *et al.* (2000a) postularam que as três RSHs identificadas em *Arabidopsis* funcionavam como proteínas guardiãs das proteínas de resistência. Seriam as RSHs que interagiriam directamente com os factores de avirulência e o complexo formado seria reconhecido pelas proteínas de resistência que activariam por sua vez, o sistema de defesa.

Na interacção entre *Q. suber* e *P. cinnamomi* parece mais provável que a região exoplasmática da proteína de resistência QsPRc (II.4.1.3.) interaja directamente com os factores de avirulência e que a alteração da conformação provocada por essa interacção seja o primeiro sinal que é reconhecido pelo domínio NBS da mesma proteína. As proteínas RSH poderão estar associadas e este domínio, tal como foi observado em *Arabidopsis*, e a hidrólise de ATP no domínio NBS pode ser o sinal reconhecido por QsRSH para iniciar a síntese de (p)ppGpp. Estes nucleótidos devem ser, então, responsáveis pela regulação directa ou indirecta, através doutros factores de transcrição, da regulação da expressão de genes relacionados com a patogénese.

AtRSH1	(129)	ETLWEDLFPSISYLPKRELEFVQKGLKLAFAEHHGCKRRSGEPFIHPVAVARIGELELDWESIVAGLL
AtRSH2	(190)	PYARDLLRRAQLRHKIFNDESVIKAFYEAEKAHRGOMRASRDOPYLQHCVETAMLANIGANSTVVAGLL
AtRSH3	(194)	PYARDLLRRAQLRHKIFEDSVIKAFYEAEKAHRGOMRATGDPYLQHCVETAMLADIGANSTVVAGLL
EcRelA	(12)	AGEFDPEKWIASLGITSQKSCCELAETWAYCLQOTQGHDPDASLLLWRGVEMVETLSTLMSMDITLRAALL
EcsptoT	(2)	YLFESLNQLIQTYLPEQIKRLRQAYLVARDAAHEGQTRSSGEPTHTPVAVACILAEMLKDYETLMAALL
NtRSH2	(198)	PYAKDLLNAQSRHKIFCDDFVIKAFYEAEKAHRGQVRAFGDPYLQHCVETAVLAMIGANSTVVAAGLL
QsRSH-cds	(1)	-----IFCEDFVVKAFYEAEKAHRGOMRASGDPYLQHCVETAVMLALIGANSTVVAAGLL
SjRSH2	(183)	DAVEELLASAQIRHKIFYDQFVIKAFYEAEKAHRGQVRAFGHPYLHHCMTAVLALASIGANSTVVAAGLL

AtRSH1	(199)	HDTVEDNFITFEKIEEEFGATVRHIVEGEEKVSKLGLKLCETESETIQDVKADDLROKFLAMTIDVETVVI
AtRSH2	(260)	HDTVDDSD-FMSYDYILRNFGAGVADLVEGVSKLSQL-SKLARENNTACTVEADRLHPFLAMA-DARAV
AtRSH3	(264)	HDTVDDSD-FMSYDYILRFTGSGVADLVEG---LSQL-SKLARENNTACTVEADRLHTMFLAMA-DARAV
EcRelA	(82)	FPLADAN-VVSEDLVRESVGVKVVNLIHGVRDMAAI-RQLKATHDSVSEQVDNVRMLLAMVDDFRVCV
EcsptoT	(72)	HDVIEDT-PATYQDMEQLFQKSVAVLVEG---V---SKLDKLFKFRDKKEAQANFRKIMAMVQDIRVVI
NtRSH2	(268)	HDTLDDT-FMTYDYIFRITLQAGVADLVEGVSKLSQL-SKLARDFNATSKTVEADRLHTMFLAMA-DARAV
QsRSH-cds	(56)	HDTVDDSD-FMNYDYVFGTFFGAGVADLVEGVSKLSHL-SKLARDNNTANKTVEADRLHTMFLAMA-DARAV
SjRSH2	(253)	HDTVDDSD-FVTYDYILNIFGSGVADLVNKGSKLSHL-SKLARENNTASKTEADRLHTMFLAMA-DARAV

AtRSH1	(269)	IVKLADRLHNMRTLCHMPPHKQSSIAGETLOVFAPLAKLGMYSIKSELENLSFMYVSAEDYDRVTSRIA
AtRSH2	(327)	LIKLABRLHNMKTYALSPVQQRFAKETLEIFAPLANCLGISTWKVQLENLCPKHLHPDQHEHSDMLE
AtRSH3	(328)	LIKLABRLHNMMTLYALPPVQRQRFKETLEIFAPLANRLGISSWKVQLENLCPKHLHPDQHEHSDMLE
EcRelA	(150)	VIKLAERTAHIREVKDAPEDERVLAAKCTNIYAPLANRLGIGQLKWELEDYCFRYLHPTEYKRIAKLLH
EcsptoT	(134)	LIKLABRLHNMRTLGSLRDPKRRRIARETLEIYSPLAHRGLIHHIKTELELGFALFNPNRVRVKEVVK
NtRSH2	(335)	LIKLABRLHNMMTLDALPLAKQRFAKETLEIFAPLANRLGISSWKVQLENLCPKHLHPDQHEHSSKLV
QsRSH-cds	(123)	LIKLABRLHNMMTLDALPPAKQRFAKETLEIFAPLANRLGISSWKVQLENLCPKHLHPDQHEHSSKLV
SjRSH2	(320)	LIKLABRLHNMMTLDALPSHKQRFAKETLEIFAPLANRLGISSWKVQLENLCPKHLHPDQHEHSSKLV

AtRSH1	(339)	NLYKEHEKELTEANRILVKKTEDDQFLDLVTVNTDVRSVCKETYSIYKAALKSKGSINDYNOIAQLRIVV
AtRSH2	(397)	DS--FDEAMITSAIEKLDQALKKAGISYHVLG---GRHKSLSYISYKMLKKKLTVDIHDHIGLRLIV
AtRSH3	(398)	DS--FDEAMITSAIEKLDQALKKAGISYHVLG---GRHKSLSYISYKMLKKKLTVDIHDHIGLRLIV
EcRelA	(220)	ERRLDREHYIEFVGHLEAEKAEVKAEVY---GRPKHISYIWRKMKKNLAFDELDFRVARVIVA
EcsptoT	(204)	AARGNRKEMIQKILSEIEGRLEQAGIPCRVSS---GREKHLYSYICMVKLEQRFRHSIMDIYAFRVIV
NtRSH2	(405)	KS--FDEAMITSSVQKLEQALKDDSVSYHVLG---GRHKSLSYISYKMLKKKLNMDVHDHIGLRLIV
QsRSH-cds	(193)	ES--FDEAMITSAIEKLDQALKKAGISYHVLG---GRHKSLSYISYKMLKKKLTVDIHDHIGLRLIV
SjRSH2	(390)	KS--FDQARIQSAIDKLEIEGLKDEDLSYHDLG---GRHKSLSYISYKMLKKKLTVDIHDHIGLRLIV

AtRSH1	(409)	KPKPSVGVGPLCSPOQIYHVILGLVHEIWKPIPTVTKDYIATPKPNQYQSLHTTVIPFLYESMFRLEVOI
AtRSH2	(460)	DNE-----GDCYKALGVVHSLWSEVPGKLDYIHPKFNQYQSLHTTVVMD---NGTVPLEVOI
AtRSH3	(461)	DNE-----KDCYKALGVVHSLWSEVPGKLDYIHPKFNQYQSLHTTVVMD---DGTIPLEVOI
EcRelA	(284)	ERL-----QDCYAAALGVHTHYRHLPEDEKDYVANPKPNQYQSLHTTVVLD---PGKTVLEVOI
EcsptoT	(268)	NDS-----DTCYRVLGQMSLYKPRPGRVVDYIATPKANGYQSLHTSMIG---PHGVPEVOI
NtRSH2	(468)	ENK-----EDCYKALRVVHQLWSEVPGRYKDYIANPKFNQYQSLHTTVVLD---EGMVPLEVOI
QsRSH-cds	(256)	DNE-----EDCYKALRVVHQLWSEVPGKLDYIHPKFNQYQSLHTTVVMD---EGMVPLEVOI
SjRSH2	(453)	ENE-----DDCFRALKVVHQLWSEVPGKLDYIHPKFNQYQSLHTTVVLD---EGMVPLEVOI

AtRSH1	(479)	RTEEMDLIAERGIAVVYNGKSLSTGLVGNVAVPLGRNSRGTGCLNNAFALRVGLNLAIRENQEEFVGNM
AtRSH2	(515)	RTQEMHLQAEFGFAHWRYK-----EGGCK--YSSFVLMQVMEARWVVTWHCEAMSKD
AtRSH3	(516)	RTKEMHLQAEFGFAHWRYK-----EGDCK--HSSFVLMQVMEARWVVTWHFETMSKD
EcRelA	(339)	RTKQMHEDAELGVAAHWRYK-----EGAAAGGARSGHEDRIANRLKLIARWQEEEMADSG
EcsptoT	(323)	RTEDMDQMAEMGVAAHWRYK-----EHGET--STTAQIRARVMQSLLELQQSAGSSF
NtRSH2	(523)	RTKEMHLQAEYGFAAHWRYK-----EGACK--HSSFVLMQVMEARWVVTWQCEATMNSD
QsRSH-cds	(311)	RTREMHLQAEFGFAHWRYK-----EGDCK--HPSFVLMQVMEARWVVTWQCEATMNSD
SjRSH2	(508)	RTKEMHLQAEYGFAAHWRYK-----EGESK--HSSFVLMQVMEARWVVTWQCEATMNSD

AtRSH1	(549)	SSREFVDITRDLLGSRVVFVTPKGEIKNLPKGAIVVDYAYLIHTEIGNKMAAKVNGNLSVPTHVLENA
AtRSH2	(566)	---RSSISSSDSIK-----PPLQVFRILTLEDPCASYKPNSSQDGPVVIIVIENDKMSVQEFPPASS
AtRSH3	(567)	---GSSICSSS-----PLCSFPPSHAEPCFPYSKPNSSQDGPVVIIVIENDKMTVQEFPPANS
EcRelA	(392)	---EMLDEVRSQVDFDRVYVFTPKGVDVLDLPAAGTPLDFAYHHSDDVGHRCIGAKIGGRIVFPFTYQLQMG
EcsptoT	(374)	---EFIESVKSDFPDEIYVFTPEGRIVLPAAGTPVDFAYAVHIDIGHACVGAVDRQPPYLSQPLTSG
NtRSH2	(574)	---QSSVGHTESS-I-----QPPCKFPAHSEDCPFSCKPNCCTDGPVVIIMINDNKIVCARIP---
QsRSH-cds	(362)	---IAYADSIR-----PPCTFSSHEDCPYSYKPHCGDGPVVIIMINDNKIVCARIP---
SjRSH2	(559)	---RSSPGYVDS-L-----KSPCKFPFTHSEGCPSYNPQPNHDGPVVIIVIENDKMSVKEFPPLNS

AtRSH1	(619)	EVVEIVTYNALSSSAFQRHKQWLQHAKTRSAHKKI
AtRSH2	(623)	TVSDLLRRAGP-----GSSRWSMYGITPAKEELRP
AtRSH3	(620)	TVSDLLRRAGP-----GSSRWSMYGITPAKEELRP
EcRelA	(459)	DQTEIITQKQPN-----PSRDWLNPNLGYVTTSRG
EcsptoT	(441)	QTEIITAPGAR-----PNAAWLNFWVSSKARAKI
NtRSH2	(627)	-CK---LNCQGS-----FGSRSRQF-----
QsRSH-cds	(415)	TIMDLLERSGR-----GSSRWTPYGFPLKEELRP
SjRSH2	(615)	TMMDLLEATGH-----GSPRWTIHGFVVKEDLRP

Figura 91. Comparação entre as seqüências de AtRSH1 (AAF37281), AtRSH2 (AAF37282), AtRSH3 (NP_564652), NtRSH2 (AAL03950), SjRSH (BAC56909), EcSptoT (AAB00160), EcRelA (AAA03237) e QsRSH, na região que contém o domínio de sintetase de (p)ppGpp, indicado com *. As seqüências não estão completas mas a numeração dos aminoácidos está de acordo com a seqüência original.

II.4.2. Determinação e caracterização de genes do metabolismo de fenilpropanóides, relacionados com a defesa de *Q. suber* contra *P. cinnamomi*.

II.4.2.1. Amplificação de fragmentos de genes do metabolismo de fenilpropanóides com *primers* de sequência heterogénea.

O sistema de defesa nas plantas é complexo e multifacetado. Na resposta celular localizada, as células adjacentes àquelas que estão em contacto directo com o agente patogénico e em que ocorre uma resposta de hipersensibilidade, respondem à invasão através da activação de vários genes. Estes genes estão na origem da síntese de proteínas, cuja actividade catalítica permite restringir de forma directa ou indirecta o crescimento e desenvolvimento dos invasores (Kombrink e Somssich, 1995). Nestas proteínas, estão incluídas as enzimas do metabolismo dos fenilpropanóides, tais como, a fenilalanina amónia liase (PAL), cinamil álcool desidrogenase (CAD) e peroxidases (POX) (Mitchell *et al.*, 1994). Derivam das várias vias metabólicas do metabolismo de fenilpropanóides, a produção de pigmentos, fitoalexinas, componentes estruturais como a lenhina, suberina e de outros componentes celulares (Figura 92, Anterola e Lewis, 2002). A incorporação de compostos fenólicos nas paredes celulares das células ocorre rapidamente durante as reacções de defesa e torna-as menos permeáveis à invasão pelos agentes patogénicos. Os monolenhóis são os precursores monoméricos do domínio aromático da suberina e da estrutura polimérica da lenhina. A identificação das enzimas que catalisam a polimerização oxidativa destes precursores ainda é motivo de controvérsia. Até muito recentemente, as peroxidases aniónicas foram consideradas, a única classe de enzimas envolvidas na fase final da lenhificação das paredes celulares devido à sua elevada afinidade para com o coniferol, a sua localização na parede celular e a sua expressão nos tecidos em lenhificação (Boudet, 2000). Recentemente, alguns autores sugeriram o envolvimento de lacases e outras oxidases, para além das peroxidases. Esta hipótese é apoiada pelos resultados obtidos com plantas transgénicas do tabaco, em que não foi observada alteração no teor de lenhina produzido, quando a expressão dum gene dum das peroxidases mais representadas, foi regulado negativamente (Lagrimini *et al.*, 1997).

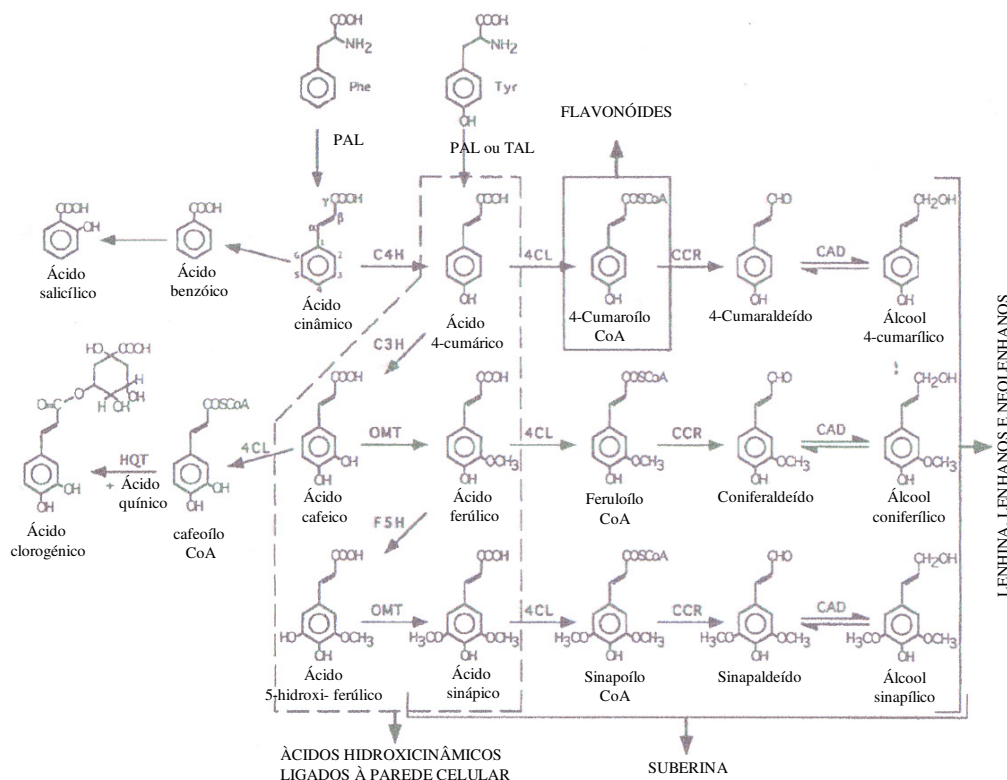


Figura 92. Vias metabólicas da síntese de monolenhóis, ácidos fenólicos (ácidos hidroxicinâmicos) e seus derivados, que constituem os segmentos principais do metabolismo de fenilpropanóides. CAD: cinamil álcool desidrogenase; CCR: cinamoilo-CoA redutase; C3H: 4-cumarato-3-hidroxilase; C4H: cinamato-4-hidroxilase; 4CL: 4-cumaroilo-CoA ligase; F5H: ferulato-5-hidroxilase; HQT: hidroxicinamoilo-CoA quinato transferase; OMT: *O*-metiltransferase; PAL: fenilalanina amónia liase; TAL: tirosina amónia liase. (Adaptado de Tamagnone *et al.*, 1998).

Para estudar o envolvimento das enzimas associadas ao metabolismo de fenilpropanóides na resposta de defesa de *Q. suber* contra *P. cinnamomi*, determinaram-se sequências nucleotídicas dos genes *PAL*, *CAD* e *POX* do hospedeiro e estudou-se a variação da expressão destes genes nas primeiras 24 horas de interação.

As primeiras sequências nucleotídicas dos genes *CAD*, *POX* e *PAL* de *Q. suber*, foram identificadas por amplificação com *primers* constituídos por uma mistura de sequências, que foram definidas nas regiões codificantes mais conservadas destes genes, presentes noutras espécies de plantas.

Com os *primers* de sequência heterogénea PCAD2 e PCAD4, dirigidos para o gene *CAD*, foi amplificado um fragmento de DNA genómico de *Q. suber*, com 699 pb. Por comparação com o gene *CAD* de *Populus balsamifera* (AJ295837), um dos genes usados como referência, o referido fragmento corresponde à sequência parcial dum gene

que codifica uma CAD em *Q. suber* e foi denominado *QsCAD2*. De acordo com o alinhamento entre estas duas sequências, ilustrado na figura 93, e tendo como referência a estrutura do gene *CAD* de *P. balsamífera*, o fragmento de 699 pb tem início no final do exão 2 e termina no início do exão 4, compreendendo dois intrões completos (2 e 3) e o exão 3.

A primeira sequência de DNA genómico de *Q. suber* pertencente a um gene duma peroxidase foi obtida por sequenciação dum fragmento amplificado e reamplificado com os *primers* de sequência heterogénea PAP4 e PAP5, após terem sido testados os cinco *primers* escolhidos nas regiões conservadas dos genes de referência de peroxidases. O fragmento tem 334 pb e corresponde a parte do 4^o exão do gene duma peroxidase, admitindo que a organização deste gene, em *Q. suber*, é semelhante à observada nos genes de peroxidases de *Populus kitakamiensis* e de *Nicotiana tabacum* (Figura 94). O gene que codifica a peroxidase em *Q. suber* correspondente a este fragmento denominou-se *QsPOX1*.

Um fragmento, com 489 pb, dum gene que codifica uma potencial fenilalanina amónia liase (PAL) em *Q. suber*, foi obtido por amplificação com os *primers* de sequência heterogénea PPAL4 e PPAL5, a partir de DNA genómico. O alinhamento desta sequência nucleotídica com a sequência do gene de referência de *Populus kitakamiensis* (D43802) mostra que o fragmento amplificado em *Q. suber* é homólogo do gene de referência, na região do exão 2. O gene completo de *P. kitakamiensis* que codifica uma PAL é constituído pela região do promotor com 1291 pb e por dois exões com 386 pb e 1747 pb, interrompidos por um intrão com 820 pb (Figura 95). O gene que codifica a PAL em *Q. suber* correspondente a este fragmento denominou-se *QsPAL*.

Com base nas sequências destes fragmentos seleccionaram-se *primers* específicos dirigidos aos genes *QsPOX1*, *QsCAD* e *QsPAL* para obter o cDNA correspondente, por RACE-PCR, a partir de RNA total extraído das raízes de *Q. suber* infectadas por *P. cinnamomi*. Os mesmos *primers* foram usados na preparação de sondas para escrutinar um banco genómico de *Q. suber* com o objectivo de isolar clones positivos possuidores da sequência completa dos genes. As sequências do cDNA e/ou do DNA de *QsPOX1*, *QsCAD* e *QsPAL*, obtidas pelos dois métodos, são apresentadas e caracterizadas individualmente nos capítulos que se seguem. A relação dos genes do metabolismo de fenilpropanóides com a defesa de *Q. suber* contra *P. cinnamomi* é discutida durante a caracterização.

CAD/ <i>P. balsamifera</i>	1	ATGGGTA	GCCTTGA AAC	AGAGAGAAA	ATTGTAGGAT	GGGCAGCAAC
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	48	AGACTCAACT	GGGCATCTCG	CTCCTTACAC	CTATAGTCTC	AGAGATACAG
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	98	GGCCAGAAGA	TGTTTTTATC	AAGGTTATCA	GCTGTGGAGT	TTGCCATACC
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	148	GATATCCACC	AAATCAAAAA	TGATCTTGGC	ATGTCACACT	ATCCTATGGT
PCAD2/PCAD4	1	-----	-----	-----	-----	<u>ATT</u> <u>ATCCTATGGT</u>
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	198	CCCTGG	-----	-----	-----	-----
PCAD2/PCAD4	14	<u>TCTGG</u> gtac	atgcaactaa	aacacacccc	ccactttctt	ttttcttact
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	205	-----	-----	-----	-----	-----
PCAD2/PCAD4	64	tatttttttg	tagttccggt	taatgccoct	ctattttaga	aaagttttta
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	205	-----	-----	-----	-----	-----
PCAD2/PCAD4	114	taagaaatta	aaaatattgt	cgaaataact	aattatattt	tcgctttttc
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	205	-----	-----	-----	-----	-----
PCAD2/PCAD4	164	ataaaaaaaa	acttttctaaa	agcacgcggt	aatgaattcc	tgttttttat
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	205	-----	-----	-----	-----	-----
PCAD2/PCAD4	214	agccatctcc	tgattctagt	catgattggg	tttcttattt	tttttgtctc
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	205	-----	-----	-----	-----	-----
PCAD2/PCAD4	264	agtctctttt	tccccattt	tgtgcttgct	ttattaactt	ttattattat
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	205	-----	-----	---CCATGAA	GTGGTTGGTG	AGGTTGTGGA
PCAD2/PCAD4	314	ttaattgttg	aaaactgaaa	cagG <u>CATGAA</u>	<u>GTGGTGGTG</u>	<u>AGGTAGTGA</u>
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	231	GGTGGGATCA	GATGTGACAA	AGTTCAAAGT	TGGAGATGTT	GTCGGTGTG
PCAD2/PCAD4	364	<u>GGTGGGT</u> TCA	<u>GATGTGAGTA</u>	<u>AGTTCAGAGC</u>	<u>AGGAGACATA</u>	<u>GTGGGAGTGG</u>
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	281	GAGTCATCGT	TGGAAGCTGC	AAGAATGTGC	ATCCATGCAA	ATCAGAGATT
PCAD2/PCAD4	414	<u>GAGCCAT</u> TGT	<u>TGGATGCTGC</u>	<u>AGAAA</u> CTGCC	<u>ATCCATGCAA</u>	<u>AAGGACATA</u>
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	331	GAGCAATACT	GCAACAAGAA	AATCTGGTCT	TACAATGATG	TCTACACTGA
PCAD2/PCAD4	464	<u>GAGCAATACT</u>	<u>GCAACAAGAA</u>	<u>AATTTGGTCC</u>	<u>TATAACGATG</u>	<u>TTTACACTGA</u>
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	381	TGGCAAACCC	ACCCAAGGAG	GCTTTGCTGA	ATCCATGGTT	GTCGATCAAA
PCAD2/PCAD4	514	<u>TGGCAAACCC</u>	<u>ACCCAAGGAG</u>	<u>GCTTTGCTAG</u>	<u>CTCCATGGTT</u>	<u>GTAGACC</u> AAA
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	431	A-----	-----	-----	-----	-----
PCAD2/PCAD4	564	<u>A</u> gtaattcat	actcaaaacc	aaaaccctt	cacatcatat	caaaaaattg
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	434	-----	-----	-----	-----	-----
PCAD2/PCAD4	614	atctttcttg	caattaaaga	aagatatgga	tatgcaaac	tctaaaatct
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	434	-----	-----	GT TTGTGGTGAG	AATTCCTGAT	GGGATGTCAC
PCAD2/PCAD4	664	atctttcttg	atttatag	<u>GT</u> <u>TTGTGGTGAA</u>	<u>AATCCC</u>	-----
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	464	CAGAACAAGC	AGC GCCGCTA	TTGTGCGCTG	GATTGACAGT	TTACAGCCCA
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	514	CTTAAACACT	TTGGACTGAA	ACAGAGTGGG	CTAAGAGGAG	GGATTTTAGG
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	564	ACTTGGAGGA	GTAGGGCACA	TGGGGGTGAA	GATAGCAAAG	GCAATGGGAC
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	614	ACCATGTAAC	TGTGATTAGT	TCTTCTGACA	AGAAGCGGGA	GGAGGCTATG
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	664	GAACATCTTG	GTGCTGATGA	ATACTTGGTC	AGCTCGGATG	TGGAAAGCAT
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	714	GCAAAAAGCT	GCTGATCAAC	TTGATTATAT	CATCGATACT	GTGCCTGTGG
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	764	TTACCCCTCT	CGAGCCTTAC	CTTCTCTAT	TGAAGCTTGA	TGGCAAGCTG
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	814	ATCTTGATGG	GTGTTATTAA	TGCCCCATTG	CAGTTTGTTA	CGCCTATGGT
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	864	<u>TATGCTTGGG</u>	AGAAAGTCAA	TCACCGGAG	CTTCATAGGG	AGCATGAAGG
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	914	AGACAGAGGA	GATGCTTGAG	TTCTGCAAGG	AAAAGGGATT	GGCCTCCATG
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	964	ATTGAAGTGA	TCAAAATGGA	TTATATCAAC	ACAGCATTCTG	AGAGGCTTGA
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	1014	GAAAAATGAT	GTGAGATATA	GATTCGTTGT	CGATGTTGCT	GGTAGCAAGC
CAD/ <i>P. balsamifera</i>	1064	TTATCCCTG	A-----	-----	-----	-----

Figura 93. Comparação entre a sequência amplificada com os primers PCAD2/PCAD4 e a sequência da região codificante do gene duma cinamil álcool desidrogenase de *Populus balsamifera* (AF295837), usada como referência. Na sequência de *P. balsamifera* as regiões correspondentes aos cinco exões estão identificadas pela alternância de coloração (cor cinzenta/ausência de cor). Os resíduos idênticos entre as duas sequências estão assinalados a amarelo. O fragmento amplificado em *Q. suber* tem início no final do exão 2 e termina no início do exão 4 compreendendo dois intrões completos (2 e 3) e o exão 3. Na sequência PCAD2/PCAD4 a sequência correspondente aos exões está em maiúsculas e a correspondente aos intrões está em minúsculas. A sequência dos primers PCAD2 (directo) e PCAD4 (reverso) está sublinhada.

POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(1)	TCTAGAGGTTTACAAATCTTGAACCTCGCAGTGTAGCCGGATACGACACTTGATCAGTCTAACTCTAACT
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(71)	GAAGAAAATCTGGAATGATTTTGTGTTCTTCTCAGCAGCCGAGAAATCCACGTTGTTCTGAAAGTTGCTTC
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(141)	CTTCGCATGTGCAACAGTCAAGTGAAAAATCCCAAGCTGCAAGTAAAATTAGACAGCAATCTCGTACC
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(211)	ATGAAAATTTATTAATTAATCGAGATATTTATTTAAACTTCAAATTTAAGTTGGAACCGAACAAAACTA
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(281)	TTTAATGGAAGTTATTAATTTATTTAGGTTATAATATAGTTAATAATTAAGCCGAAATGATTAGCTTGGC
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(351)	ACTCTATGGATTCCTGGACTCCGAACTGTGACAAACCGTTCAGAGAGAAAAGCTTACTCATTGGCCCTT
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(421)	GGAATGACAATGGCACCATGTGTTAATTTGACAATGATTAACCTTGCAAGATTAATATTTCAAACAT
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(491)	CTTTCAACAGTAGAAGTAGTATCTACATACGGTTTGAAAATAGTTAACGGTGGCGAGCCAGGTCACAA
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(561)	TCTTTGATATTTCCGCTTGGTCCCAATTTCTTAGTATGCAAGTACTCTCAACCTCTACTCTGATCCCTT
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(631)	CCTCCTCTTTTTTGTAGGAGGGGTGTACATTTCAAGCTCTTACTACTCTTTTTTTTTCTCTATT
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(701)	TATAGGGTCAATATCAACAACAGCTCAACCTCAATTCAAAACATCTAGCATTTCTTCTGTAAGAAAA
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(771)	ATGCTCTCTGTTCTAGCTACACTTATCTGTGTAGTAAGTTGTTTTGGGGAGTTCTGATGCTCAGTTAA
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(841)	GCCCCACGTTTTACGCTAGCACTTGCCCGAACGTTGCGAGCATTGTGCGAGGTTGATGAGGAGCAAGCTGC
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(911)	GCAAAATGATGTCGGGCTTGGAGCCAAAGCTCATTTCGCATGCACCTTCCATGATTGCTTTGTCGATGTGATT
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(981)	ATCTTCCATACATAGTTTCTTAACGACTCACCTAGCAGAAAAGATTTTCTTTATGATGAAGTCCCTAATGC
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(1051)	ACTTATCTTCTTTTCGATTTTTTTTGGCAGGGCTCGGATGGCTCTATTCTGCTGGTCGATGCGCAGGCA
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(1121)	TAAATAGTGAGCAAGATGAAGCCCTAATACATCCGTAGAAAGTTATGGTGTGTTGATGACATTA AAC
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(1191)	AGCAGTGGGAAATGTTTGGCCCTGGCATCGTCTCCTGCGCAGATATATTAGCCCTTGCATCTGAAATATTG
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(1261)	GTTACCTTGTATAGTATTATCAGCCTTCTCAATGACCTTTCTTAATGTTAGCCAGCTCTCGTAGC
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(1331)	ACGTCATAGGCTAGTTGGTCAAGTAATGAGCTCATAAGCTGACAGATTTCTGGTTAATGACTAAGGAAAT
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(1401)	AACAAACATGGGTTGAAAACCTGAAGATGACCTGTGCTAGCAAGCTTCGATGAGTTACTTACTTGAGTTGAT
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(1471)	TACGAATTTTGGGCTTAAACAAGTAAATGATATGTTGCAGGAGGAGGTCGACATGGCAAGTGCCACT
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(1541)	GGGAAGACGGGATAGTACGACTGCAAAACGCAAGAACTTCTGACATTCCTAGTCCCTTCGAAACCTTT
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(1611)	GAAAATCTCTCTCAAGTTCTCAACAAGGAACCTGATTCCTAGTCTAGTTGCTTTATCTGGTAATT
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(1681)	AATTAGAAACCTTCCAAATCTCCACACAAAATACAGTACTATTGTTTTATGCTTCAAAAAGATAAAA
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(1751)	TGTTATTTTCAGTGGCGCACACATTTGGGAGGTCTCAGTGCCAAATCTTCAGCCAGAGACTCAAT--GAT
PAP4-PAP5/ <i>Q. suber</i>	(1)	-----GTGGCGCACAGTTTGGGCAAGCAAGGTGTACAGTTTTAGAGATCCATATATAAAGAT
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(1818)	ACAAAACCCGATCCAACTTAAACCCAACATACTTGCAGACACTTCGCAAGCATGCCCAAGGG--GGA
PAP4-PAP5/ <i>Q. suber</i>	(60)	AAAAATATTGATAGTTCAATTGCCAAGACTAGGCAAAATAAATGTC--AAAGACTACTGGCTTCCAGGA
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(1887)	AATCCAAGTAGATTGAACAATCTTGATCTCAAACTCCAGATGATTTTGACAAATACTACTTCACAAATC
PAP4-PAP5/ <i>Q. suber</i>	(129)	GAT--AACAGATTGCAC--TCTAGATCTCCAACCTGTACAGCTTTTGACAACTATTACTATAGAAC
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(1957)	TTCAGAACAAATAGTGGCTTCTCGCACTGACCCAGATGCTTTTCTACTAGCGGGCTGATAGTGTTC
PAP4-PAP5/ <i>Q. suber</i>	(196)	TTATCAAGGAAAGGGCCTTCTCGCTCTGATCAACAATGTTCAATGGCGATCCAATGACTCTATTTG
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(2027)	TATAGTCAACCGGTTTGTAAACGCCAGACCGCCTTCTTCGATAGCTTTGCTCAGTCTATGATAAAGATG
PAP4-PAP5/ <i>Q. suber</i>	(266)	TAAAAAATAGAGCCAGGATACTA--AGACC--TCTATTTCAGCTTTGTCACCGCAATGATCAAATG
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(2097)	GGAAATTTAAGCTTTTGACAGGAAGCAATGGAGAAATCAGAGCCGACTGTAAGGGGTCAATTAGGGTC
PAP4-PAP5/ <i>Q. suber</i>	(330)	GGAAA-----
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(2167)	TTCGGAAGTTCTATGTTATGAGATGGAAAACATGCAATTTCTTCTCCTTTTCAGCTTTTTTCCCTCAA
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(2237)	TTCAATGTGTGCTAGAACAAATAAAGAAGGGCGGGATTTTTCTGGGCTGAGCAGAACTCAGAAC
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(2307)	TGAACCTTGAATCCTCCTCTACGTTGATGATTAGGAGTGTACCAAAATTTGTGTTAAACACATAATTTGA
POPPRXA1/ <i>P. kitakamiensis</i>	(2377)	ATGGAAAGAAATTTTAAATTTACATATTGTTATTAGGAATGAAATATAGTTCAATAAA

Figura 94. Alinhamento da sequência nucleotídica duma peroxidase de *P. kitakamiensis* (POPPRXA1/ID: D11102) com a sequência amplificada com os primers PAP4 e PAP5 em *Q. suber*. Na sequência de referência estão identificadas a azul as regiões codificantes. Fazem parte do gene POPPRXA1, 4 exões e 3 intrões. A sequência dos primers PAP4 (directo) e PAP5 (reverso) está sublinhada e em itálico.


```

D43802 (1) ATGGAATTTTGTCAAGATTACGCAATGGCAATGGTTCACCAGGATTTAACACTAATGACCCTTTGAACT
D43802 (71) GGGGCATGGCGGCAGAGTCACTAAAAGGAAGCCACCTAGATGAGGTCAAGCGCATGATCGAGGAGTACAG
D43802 (141) GAACCCCTGGTCAAGTTAGGAGGTGAGACCCCTGACCATAGGCCAGGTAACCTGCAATTGCTAGCCGTGAC
D43802 (211) GTTGGTGTGATGGTGGAGTTGTGAGAGGAGGCTCGAGCTGGTGTCAAAGCCAGCAGTACTGGGTCAATGG
D43802 (281) ACAGCATGAGCAAGGGCACAGATAGTTATGGTGTACTACTGGTTTTGGTGCACCCACATAGAAGAAC
D43802 (351) CAAGCAAGGTGGAGAGCTTCAAAGGAGCTTATAAGaaatcaaaactcatgacaaatcccaaaatatact
D43802 (421) ttacttgtatcttaactgcccagtaaggtagctttttatatactgtatatacaagcagtttttttttt
D43802 (491) tttccatgatattgttaatttgttactttaaataggggatgttggcttgttagtattgatatttcccaa
D43802 (561) ggaaaaaacaactaatgtattgttagagacagaaaaaacgagaggagttttggtagggaggaagatac
D43802 (631) catgtgagccttaacttatgctcctcaactatcctggaaaatgcoctgaaattagcacgcacacggttcat
D43802 (701) cagaagtcttgttaacttgttattgttaggttggtaggttgaagtgaagtccagcaaggacaaaaaa
D43802 (771) ataatagagagagagatggaaccggcctaattatatttaaattacgtatacaagatcatttaggtgctg
D43802 (841) caatttcaaaaaaatgttttacttgggtatatttccaagttgacttgactgctatttgggtatttaac
D43802 (911) catcaataaaaaaatattcaaaagaaaaagtcaagtgtcccggacggtaaacatcatttaacttacttgt
D43802 (981) aatttacttgcgttaatttgggttggcaatgtgaagaaagagtgcagaactatcctagctgctagttaa
D43802 (1051) caatttttgggtacaattgtcaactacacttgcgtgagtttctgcaagaataaactaatcaaaatctc
D43802 (1121) attaccaataatcctctcaactaatttttttttccaattaggttttggctaatgtggtttatggga
D43802 (1191) ttttatttcaactGGTCTTGAATGCCGGTATCTTTGGGAATGGCAGGAGTCTAGCCATACATTGCCCT

D43802 (1261) GCTCAGCAACCAGGGCAGCTATGTTGGTCAGAACAACACCTGCTTCAAGGTTATCGGGCATAGATT
PPAL4/PPAL5 (1) -----CAACAGTCTGCTTCAAGGTTACTCAGGCATCAGATT-----

PPAL4 →
D43802 (1331) TGAATGTGGAAGCAATCACCAAGATGATCAACCACAACATCACCCATGTTGGCCATGAGAGGAACA
PPAL4/PPAL5 (37) TGAATCAATGGAAGCCATCACCAAGTTTCATCAACCACAACATTACTCCATGCTTGGCCATCCCGGTAGC

D43802 (1401) ATCACTGCCTCTGGTACCTTGTCCATGTCCTACATTGCTGGGCTCTTACAGGCAGGCTTAATTCAA
PPAL4/PPAL5 (107) ATCACTGCATCGGCACCTGTTCTCTATCTACATTGCTGGACTTTACAGGCAGACCAATTCAA

D43802 (1471) AGGCAATGGACCCAATGGAGAGCCCTGACCCCTGTGAGCCCTTACCAAGCTGGGATTGATGGCGG
PPAL4/PPAL5 (177) AGGCTGTTGGGCCCAATGGAGAGTCTTAGACCCCAAGCCCTTGAATTAGCAGGATTGATGGTGG

D43802 (1541) CTTTTTGAATTACAGCCGAAGGAAAGGTCTAGCACTAGTGAATGGTACTGCAGTGGGTTCCGGTCTAGCT
PPAL4/PPAL5 (247) GTTTTTGAATTACAGCCGAAGGAAAGGTCTAGCACTAGTGAATGGCAGTGCAGTGGGTTCCGGTCTAGCT

D43802 (1611) TCAATGGTCTTTTTGAGGCTAATGTTGTTGGCAATCCATAGAAAGTTTGTGAGCAATTTTGCCTGAAG
PPAL4/PPAL5 (317) TCAATGGTCTTTTTGAGGCTAATGTTGTTGGCAATCCATAGAAAGTTTGTGAGCAATTTTGCCTGAAG

D43802 (1681) TCAATGCAAGGAAACCTGAGTTTACTGATCACCTGACACATAAATGAAGCACCATCCTGGCCAAATTTG
PPAL4/PPAL5 (387) TCAATGCAAGGAAACCTGAGTTTACTGATCACCTGACACATAAATGAAGCACCATCCTGGCCAAATTTG

D43802 (1751) TGTGCGCCATCATGGAACATATTTTATGATGGCAGCGCCTATGTTAAAGAAGCTCAGAAGTTACATGAG
PPAL4/PPAL5 (457) TGTGCGCCATCATGGAACATATTTTATGATGGCAGCGCCTATGTTAAAGAAGCTCAGAAGTTACATGAG

← PPAL5
D43802 (1821) ATCGATCCTTTACAGAAACCTAAACAAGACCGACACGCTCTTCAACATCTCCACAATGGCTAGGCCCTC
D43802 (1891) TGATCGAAGTGATTAGAACATCAACGAAATGATCGAACGAGAAATCAACTCTGTCAATGACAACTCCTT
D43802 (1961) GATTGACGTGTCGAGGAATAAGGCTCTACATGGAGGGAATTTCCAGGGGACCCCAATAGGTGTTTCAATG
D43802 (2031) GACAACACTCGTTTGGCCATTGCTTCAATTGGCAAACCTCATGTTTGCACAATTTCTGAACTTGTAAACG
D43802 (2101) ACTTGTACAACAATGGATTGCCCTTCAAACTCACTGGTGGCCGCAATCCAAGCTTGGATTACGGGTTCAA
D43802 (2171) AGGTGCCGAAATGGCATGGCATCTTACTGCTCGGAGCTCCAATTCCTTGACCAATCCTGCACCAATCAT
D43802 (2241) GTCCAGAGTGTGAGCAACACAAACCAAGATGTCAACTCCCTGGGATTGATTTCTTCAAGAAAACCTGCTG
D43802 (2311) AAGCTATTGATATATAAAGCTCATGTCCACCCTTCTTGGTGGTCTATGCCATCCGTTGACTTGAG
D43802 (2381) GCACATAGAGGAGAACCCTGAAGAACACAGTGAAGATCTCTGTGAGCCAGTGCACAGGCTTGGACAATG
D43802 (2451) GGCTTCAATGGCGAGCTTCAACCTTCAAGATTCTGTGAAAAAGACTTGTCAAGGTTGTTGACAGAGAGC
D43802 (2521) ATGCTTTTCCCTATATTGACGATCCTTGTAGTCAACCTATCCATTAATGCAAAAGCTCAGGCAAGTACT
D43802 (2591) AGTTGAGCATGCCTTGGTGAATGGCGAAAAGGTAAGGAATTCACCACTTCGATTTTCCAAAAGATCGGA
D43802 (2661) TCTTTTGGAGGAAGACTGAAGACCCTTTTGCCTAAAGAAGTGGAGAGTGTAGACTTGAAGTTGAGAATG
D43802 (2731) GAAATCCAGCTATTTCAAACAGGATCAAGGAATGCAGGTCATACCCCTGTACAAGTTTGTGAGGGAAGA
D43802 (2801) ATTGGAACTAGTTTGTAAACAGGTGAGAAGGTCAAATCGCCCGGGGAGGAATTCGACAAGGTTTTCACA
D43802 (2871) GCTATTTGTGAGGGAAGTTGATCGATCCCTTGTGGAAATGCTTGAAGGAATGGGATGGTGTCTCTCTC
D43802 (2941) CTATTTGCTAA

```

Figura 95. Alinhamento da sequência do gene de referência D43802, entre o códon de iniciação ATG e o de terminação TAA, com a sequência amplificada em *Q. suber* com os primers PPAL4 e PPAL5. A sequência D43802 pertence a *P. Kitakamiensis* e codifica uma PAL. A sequência do intrão que interrompe os dois exões está em minúsculas. Estão assinaladas a vermelho as bases que fazem fronteira entre as sequências dos exões e do intrão. Os primers PPAL4 e PPAL5 estão indicados em itálico e sublinhados na sequência de *Q. suber*.

II.4.2.2. Genes de peroxidases catiónicas de *Q. suber* (*QsPOX1* e *QsPOX2*).

II.4.2.2.1. Sequência e estrutura do gene *QsPOX1*.

Um gene que codifica uma peroxidase catiónica foi isolado a partir dum banco genómico de *Q. suber*, construído no bacteriófago λ . Foram escrutinados 50000 fagos recombinantes, plaqueados em *E. coli* (XL2-Blue MRA P2). Um clone positivo foi identificado com uma sonda de 290 pb, preparada por amplificação do DNA genómico com os *primers* PAP-1R e PAP-1F, definidos na sequência do fragmento de 334 pb obtida por amplificação com os *primers* de sequência heterogénea PAP4 e PAP5 (II.4.2.1.).

O fragmento de DNA de *Q. suber*, flanqueado pelas regiões dos promotores T3 e T7 do vector, com aproximadamente, 20000 pb, foi excisado do vector por digestão com *NotI*. A partir deste fragmento foram sequenciadas 210 pb da extremidade 3' do gene, utilizando o *primer* PAP-1R como iniciador. A sequenciação na direcção da extremidade 5', utilizando como iniciador o *primer* PAP-1F, não foi bem sucedida. Foi então, amplificado um fragmento de 6000 pb, utilizando os *primers* T3 e PAP-1F dirigidos para a região do vector e do inserto respectivamente.

O fragmento foi clonado no vector PCRII, a sua orientação foi determinada por PCR, em reacções com os *primers* PAP-1F e M13 directo ou reverso e a sequenciação foi iniciada com o *primer* M13 reverso.

Do clone com 6000 pb sequenciaram-se 4126 pb que se sobrepuseram à sequência obtida com o *primer* PAP-1R. O fragmento sequenciado tem um tamanho de 4221 pb e integra um gene duma peroxidase catiónica de *Q. suber*, denominado *QsPOX1* (AY443342). O gene *QsPOX1* é constituído por uma região promotora com 1229 pb e por 4 exões com 234, 192, 169 e 399 pb interrompidos por 3 intrões com 926, 389 e 636 pb (Figura 96 e 97). As regiões do gene que correspondem aos intrões foram identificadas pelo programa GeneMark, versão 2.2a e seguem a regra GT-AG (Borodovsky e McIninch, 1993; Lewin, B., 2000). No intrão 3 está presente um microsatélite, com o motivo CT repetido 45 vezes (Figura 96). A região promotora do gene foi analisada com recurso à Base de Dados do programa PLACE (Higo *et al.*, 1999), através da qual foram identificados uma série de elementos estruturais na cadeia positiva do DNA, potencialmente responsáveis pela transcrição, expressão diferencial e

regulação do gene *QsPOX1*. Estes elementos estruturais são normalmente designados por *cis-acting elements* e interagem com factores de transcrição ou transactivação (*trans-acting factors*).

```

1   TTCCTCACAA GAACCACTCC TCTGCTTCT TCAAGTGTT GCTTCTTCT CTCTATATTC TTCCCAGAAT
71  TGCCGACCCC CTTTCCTCAT TCTCATCTTT TATTATAGC TTGAGGTTAG TGATAGAGTT ATGATTACTT
141 TTGTGTTGAG TGGGAAAGAA GGTCCAATGT TATTATCCTT AAGTGGGTGT TTAGTTGGGA GTGAGAGGCA
211 GTAAGAGTGG CATTGAAATT GGTCTCCACA TTAGAAGATC TATCTGGCAA CGATACTCCC CAGGCAATTC
281 CGAGCATCTT AGGGCTCACG TTCCCAGAAA ATTGCATTCC CCGACCAAGC AAGGTCTCAC CTTCACTGTT
351 CATGCCATAA TGGCTTCATT ACGGTTTTTG GGCCTAAGAT GGGCATCAAG GCTTGGCTGA GCCAAGTTCG
421 TAGGCCAGT AGTACACACA ATCACACAGG ATGTCCCAAG GCCCGAGGCC CAACAAGTCC AAGGCCTTAT
491 ACACGTGGCA TGATTGTGAT AAATTTTATG AACAAATGGGC TTGAGGGGAA GTAGCACCCC GTACACAAA
561 GAATACTAAC ACTCATGAGA TAGCTGTTGA AAACCTAAAA CTAAGTGAAA GTAATATCTT TCTATGAACA
631 AGTACCACGG TACATGAAAT TCCTACATAA TTAATTAGAC GCGTTTATGC TGAAAATGTC ATACCTTGCT
701 CGCCCTTTCG CTTTAAAGATC AAGGTGTGTA TGTGAAATG TCAACCAATT GTTTTAGTAA TAGTAGTCTT
771 TTGGCTTGCA ACTTTTGAAT TGTCAACTAA CCGTCAACCC TTGAGGTGGT CATATCTGAT ATTTGCTGGC
841 CCGTAAAAAT CACCAAACTT AAGATTTATA GATATTTAG CAGACACCAC AAAATTTTGT CTAAGGCTTA
911 GTAGCATGCC ACAGCAACTG TTCAACTTGT TCAGTTCAAG TTAACCTCTG GCTCTGAAAC TTTCACCTTA
981 TGTCAAAATAT GTCAATCAAT CAAATTCATT GCAGTTGCCT ACTTTTCTT TAATTTCTAG CCGTTGAAAT
1051 TAATGTTATG CTTGCCCATG CAAATAGCCA AATACTAGTC TTAAGATTT GGTATTACGT ACCTGCCCTT
1121 CTGCGGAAC TTTCTAGTTA GACTTCTATA TATAACCCAA ATACCCTACA AAGTCTTGG CAAACACTTA
1191 ACACACGCTT CCTTCTAAGT TTGATTATA AGCAAGAAA TGGCTGCTCA TTCTACTTCT CATTCGCTT
1261 CTTCTTTCTT ACTCATAGTT TCATTAGCAG TTCTCGTGAT TTTCACTGGG AACCTCCTCG CTAACTCTC
1331 AAACAAATTT TACTCTAAAA GCTGTCCAAA GGTGTTAGC ACCGTTCAAT CAGTTGTTC TTCTGCCGTT
1401 TCGAAACAAC CCCGCCAGGG TGCTTCTCTG CTTCGCCCTC ACTTTCAATG CTGTTTTTGC AAT AAAAAT
1471 CCTCATCCCC TCTATCTACT GGGTTGCTCG TAGGCCTCCA CTTTTTTTCA TTTTTTTTTT AAGCAACAGC
1541 ATGCAACAAA TATAATAGTG TTTATATGTG GAGTCCCTTC TTTCTCCCTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT
1611 TTTTACCCAA ATTAATGGCA AACATATTTT TCATGATAAA TGAAGGTGAT AAGTTAGAAT TGATGCAACA
1681 ATATTTTTAT ATAAGGAAAT TAATGTTAAA AGTATTACAA ATTTTATTAC TAAAAGTTTA TAAATGTATA
1751 TTACTTTAAT AAGATAATAA TATAAATGAG TGTTTGGTAA GAGAATGTAG TTAAGTGTGT GTGTTAACA
1821 ATTAATTTGT TTCTCATAAA AAAAGTGTCT GAATTTTTTT TGACTTGTA TGAACACAT CAATTTGTAA
1891 AACCTCATAG ATAAAATTTA TAATATCTCT ATTATTGCC CTTTTGTACA CACCAACACT AATTTTATA
1961 GTAACCATC AAAATATGCC ATTTGGTATT TGGTGTCTAG TCTTGTGCT ATTCAAGAAT CAAGAAAAAT
2031 ATAAAGTAGT TTGGAGATAA GTTACGTAAAT GAATAAAACA AGATTCAAAA TATTATATT TAAAAAAT
2101 AAAAAAATAA AAATGAACCA ATATAACCAA GATAAGATGG GACATGAAAT GGCGTGATA ATAGACTTTG
2171 ACAAGAAGCA AGTCCACATG CATGGCATGC AGAAGTAGTC AAGTCAGTTG ATAAGGAAAG TCCTAACACG
2241 CGTCATTAAT TTGGAGTGGG CTAAGCCCAT CTGACGCACT TAGTAAAATC AATAATTTCTA CTAGAGTCT
2311 AAGAAGTATG TGAACGGTGA AGTACACATA ATAATATGGT AAACAGAGAT TTTTCCAGT TTTTCCAGT
2381 ACGGTCAAAT TATTCAAAGC TTCGTTGTAT TTTGCTTCTT GAC GTTG TGATGGGTCG ATACTCTTGG
2451 ATGACACTCC AACCTTCACA GGCGAGAAGA CAGCAGCTCC CAACAATGGA TCAATTAGGG CATTCGAGGT
2521 TGTTGATGAA ATAAAGTCCA AGGTCGAGAA AGAATGCCCT GGAGTGGTCT CATCGCTGTA TATCTTAGCC
2591 ATTGCTGCTC GGGACTCTGT TAAAAAT AGT AGTTACTTAT TAATATGCTC CTTAGAAAA AAAATTAAC
2661 TTTTAAAAAA TAGAATTAGT TTTTACACTG TAGATTGATA TGCTCGTTCG TTTTTTTTTT TTTTTTTTCT
2731 GAATGACATG CTTGTTGCTT TATCATGTGA TATGACACCT CTCTAATGAA TTGATATTTT TAAAATTTAA
2801 TATGAAACAT ATTATATTCG ATTTGACAGT ATATATGTGT GTGTTTTATT GTAATAGAAA ATTTAATAG
2871 GATTTTTAGT AATATTTATT ATAAATGAT AATAATTTTC TAGATAATC ATTTTGTCC TGTTTGATG
2941 CGTCTATTAT ATACTGGAAA CACGTTGAAC ATTATGCAGC TTGGAGGGCC CAAAATGGAT GTC CTTG
3011 GAGGGCCCAA ATGGGATGTC AAGCTTGAAA GAAGAGATTC CAAAACAGCA AGCTTTTCTG CTGCCAACAG
3081 TGGGGTCATC CCTCCCCCCA CTTCTACCTT TGGCAATCTC ATTAATAGAT TTAAAGCAAA AGGTCTCTCT
3151 ACGAAAGACA TGGTTGCCCT GTCAAG ATG CCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC
3221 TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TGAGACTAAA AAATGGTGAT
3291 TAGTTTTCTT TTCCCTTTTT TGTGTTTACT CTTTTTCATA ATCAAAATAGG GTTCAAAAAT AAGTTGAATT
3361 TAAGTTACAC TGGATATAAT ATTCATAAAT GTTATAATCT TCAATAACTT TCTAAATAAA CATATTTTAT
3431 TATAATCCCTA TCATTAGACA ATATTGCTTT TTTAACTCTA AACTCTCTAG GTTTACAAAA TATCATCTAG
3501 AGAATGTTTA AACTTTACGT TTTATTTTCT TTTTCACATG TTATGAAAAA AAAGCATGAG TTAATGGAAT
3571 GGATAATAAA TGACAACCTA CACGTATAAA ATTTGACAAG CATAAATAAT AAGAACACAT AGAACCTATA
3641 ATCAAACAGC ATAAGTTTCA AAATTTCAAT TAATTTGTGT AATATTGACA AATAGTTATA TTCTAAATAC
3711 ATAAATATCT AATATGCATT TTTCCCCCTT CTTTTTAAG ATAAATTTGA TGCATTATGA TGCTCCTCAT
3781 CTTTTTTTTT TTTTTTTATA CATGATGGC GAGCCACA CAGTTG GGCA AGCAAGGTGT ACAG TTTTTA
3851 GAGATCGCAT ATATAAAGAT AAAAATATTG ATAGTTCATT TGCCAAGACT AGGCAGAATA AATGCCCAAA
3921 GACTACTGGC CTTCCAGGAG ATAACAAGAT TGCACCTCTA GATCTCCAAA CTCCTACAGC TTTTGACAAC
3991 TATTACTATA AGAACCTTAT CAAGGAAAAG GGCCTTCTTC GCTCTGATCA ACAATTTGTC AATGCGGAT
4061 CCACTGACTC ATTGGTTAAA AAATACAGCC AGGATACTAA GACCTT CTAT TCTGACTTTG TCAACGCAAT
4131 GATCAAAATG GGAGACATAC AGCCCCTCAC TGGATCAAGT GGCGAAATTA GGAAGACTG CAGGAAGGTG
4201 AATAATTAAT GAGGGTAAT T

```

Figura 96. Sequência do DNA do gene *QsPOX1* constituída por 4221 pb. Deste gene fazem parte a região do promotor (1-1229 pb), 4 exões assinalados a cinzento e 3 intrões delimitados pelos motivos GT-AG, assinalados a vermelho. No intrão 3 está presente um microsátélite com o motivo CT repetido 45 vezes (sublinhado). A sequência do *primer* PAP-1R (directo) está a **bold** e com sublinhado duplo e a do *primer* PAP-1F (reverso) está a **bold** e em *italico*.

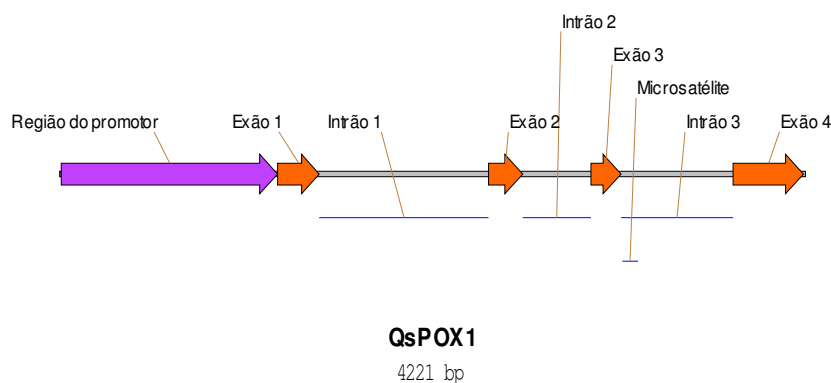


Figura 97. Organização dos elementos constituintes do gene *QsPOX1*.

II.4.2.2.2. Análise da região do promotor de *QsPOX1*.

Na região que antecede o ATG em *QsPOX1* foram identificados, no total, 41 motivos que correspondem a sequências de *cis-acting elements* estudados noutras espécies de plantas. A localização no referido promotor e a designação dos elementos está referida na figura 98.

Uma potencial TATA-box está localizada na posição -78 considerando que o nucleotídeo +1 corresponde à adenina do codão de iniciação (ATG) do exão 1. O motivo TATTCT, na posição -1169, corresponde a um “-10 promoter element” presente no promotor do gene *psbD* dos cloroplastos que codifica D2, uma proteína que liga clorofila e que pertence ao complexo fotossistema II da cevada (*Hordeum vulgare* L.). A transcrição do gene é activada pela luz azul, branca ou UV-A (Thum *et al.*, 2001). A sequência CAAACAC, localizada em -43, está presente com frequência nos promotores das proteínas que constituem os tecidos de reserva das sementes. O nível de actividade do promotor da proteína de reserva napin, presente nas sementes de *Brassica napus* L., é influenciado por esta sequência (Stalberg *et al.*, 1996).

Na região -729 a -743 sobrepõem-se motivos de *cis-acting elements* com a sequência nuclear ACGTG tais como: ABRE (*ABA-Responsive-Elements*); BoxII/G-Box; DPBF (*Dc3 promoter-binding factor*). A fitohormona ABA (ácido abscísico) é importante durante o crescimento vegetativo das plantas superiores porque regula, entre outras funções, a expressão de vários genes implicados na resposta ao *stress* ambiental. A activação destes genes está dependente da presença nos promotores dos elementos

ABREs (C/TACGTGGC) e já foram determinados vários factores de transcrição que reconhecem estas sequências (Choi *et al.*, 2000). Em plantas de *Arabidopsis thaliana* sujeitas a condições de *stress* hídrico, foram isolados os factores de transcrição ABF3 e ABF4 que são induzidos por ABA e que reconhecem as sequências dos elementos ABREs. As plantas transgênicas que expressam quantidades de ABF3 e ABF4 superiores aos valores relativos à expressão constitutiva exibem um aumento da tolerância à *secura* e uma redução da transpiração (Kang *et al.*, 2002). Estes factores de transcrição pertencem à classe de proteínas bZIP (*basic leucine zipper*), que formam dímeros através da região de hélice- α rica em leucinas e que interagem com sequências específicas que reconhecem no DNA helicoidal de cadeia dupla (Gatehouse, 1997). Os factores do tipo DPBF 1 e 2 correspondem a uma nova classe de proteínas bZIP porque reconhecem sequências que têm por base ACACNNG (Kim *et al.*, 1997).

Por vezes existe interação entre *cis-acting elements* que estão presentes no mesmo promotor. A expressão do gene *rd29A* de *A. thaliana* é induzida por desidratação, salinidade elevada, temperatura baixa e tratamento com ABA e possui na região promotora os elementos ABRE e DRE/CRT (*dehydration-responsive element/C-repeat*) que são interdependentes na expressão do gene como resposta a ABA (Narusaka *et al.*, 2003).

No promotor de *QsPOX1* está presente, na posição -1153, um elemento DRE/CRT com a sequência GCCGAC, semelhante aos elementos *cis* encontrados em vários genes de *A. thaliana* e *Oryza sativa*. Os factores de transcrição AtDREB1A e OsDREB1A identificados em *A. thaliana* e *Oryza sativa*, respectivamente, interagem especificamente com estes elementos para controlar a expressão de genes envolvidos na resposta à desidratação, radiação, frio e salinidade elevada. No arroz foram isolados cinco cDNAs de genes homólogos que codificam para os factores de transcrição OsDREB (1A, 1B, 1C, 1D, 2A), verificando-se que a expressão de OsDREB1A e OsDREB1B é induzida pelo frio e que a proteína se liga ao motivo GCCGAC. A expressão de OsDREB1A em *A. thaliana* induziu a expressão dos genes alvo dos factores AtDREB1A, resultando num aumento da tolerância à desidratação, ao frio e à salinidade elevada, por parte das plantas transgênicas, mostrando que os factores de transcrição funcionam de forma semelhante nas duas espécies (Dubouzet *et al.*, 2003).

-1229	TTCCTCACAA GAACCACTCC TCTGCTTTCT CAAGT GTTT GCTTTCTTCT CTCTA TATTC T ICCCAGAAT Ebox -10PEHVPsBD
-1159	T GCCGAC CCC CTTTC CTCAT TCT CATCTTT TATTATAGC TTGAGGTTAG T GATA GAGTT ATGATTACTT DRE/CRT/LTRE INR GATAbox
-1089	TTGTGTTGAG TGGG AAAG CAA GGT CCAAT GT TATTATCCTT AAGTGGGTGT TTAGTTGGGA GTGAGAGGCA DOFcore CAATbox1/CCAATbox1
-1019	GTAAGAGTGG CATTGAAATT GGTCTCCACA TTAGAAGATC TATCTGGCAA CATA CTCCC CAGG CAAT TC GATAbox CAATbox1
-949	CGAGCATCTT GGGGCTCACC TTCC AGAAA AT T GCATTCC CCGAC CAAGC AAGGTCTCAC CTTCACTGTT POLLEN1/GT1box LTRE
-879	CATGCCATAA TGGCTTCATT AC GTTTTT G GCCTAAGAT GGCATCAAG GCTTGCCTGA GCCAAGTTCCG SEF4
-809	TAGGCCAGT AGTACACACA ATCACACAGG ATGTCCCAAG GCCCGAGGCC CAACA AGTCC AAGCC TTAT CAATbox1 DPBFcore RAV1
-739	ACACGTGGCA TCATTGT GAT AAA TTTTATG AAC CAAT GGGC TTGAGGGGAA GTAGCACCCC GTACAC AAAG ABRE/Gbox/DPBF/Ebox GATAbox/Ibox/GT1box CAATbox1 DOFcore
-669	GAATA CTAAC ACT CATGA GA TAGCTGTGA AACT TAAAA CTAAGT AAA G TAATATCTT TCTATGAACA 2SSEEDPROTBNAPA GATAbox MYBcore/CEREGLUbox2 DOFcore
-599	AGTACCACGG TACATGAAAT TCCTACATAA TTAATTAGAC GCGTTTATGC T GAAAA TGTC ATACCTTGCT GT1box
-529	CGGCCTTTCG GCTTAAGATC AAGGTGTGTA TGTTGAAATG TCAACCAATT G TTTTAGTAA TAGTAGTGCT CAATbox1/CCAATbox1/Ebox/REalpha
-459	TTGGCTTGCA ACTTTTGAAT TGTCAC TAA CGG TCTAAC TTGAGGTGGT CATATCT GAT A TTTCGTGGC MYB2 GATAbox
-389	C GGTAAA ATT CACCAAAC TT AAGATTTATA GATA TTTTAG CAGACACCAC AAAATTTTG T CTAAGGCTTA GT1box PALbox GATAbox C8GCARGAT
-319	GTAGCATGCC ACAG CAACTG TTCAACTTGT TCAGTTC ACG TTAACCTCTGT GCTCTGAAAC TTTA TCATTA Ebox/MYB2 INR NtBBF1
-249	TGTCAAATAT GT CAATCAAT CAAATTCATT GCA TTGCCT ACTTTTTCTT TAATTTCTAG CCGTTG AAAT CAATbox1 MYBcore MYBcore
-179	TAATGTTATG C CTGCC ATG CAA ATAGCCA AATACTAGTC T TAAAG ATT GGTAT TACGT AC CTGCCTCT RY DOFcore/TAAAGmot Abox
-109	CTGCGGAAC TTCT CAGTTA GACTTCTA TA TA TAAACCAA ATACCCTAC A AAG GTCTTGG CAAACACT TA MYBcore TATABox4 SEF3 DOFcore 2SSEEDPROTBNAPA
-39	ACACAGCCTT CTTCTAAGT TTGATTATTA AGCA AGAAA ATG POLLEN1 +1

Figura 98. Sequência do nucleotídica da região do promotor de gene *QsPOX1* de *Q. suber*. A numeração +1 foi atribuída ao primeiro nucleotídeo do códon de iniciação da tradução, identificado teoricamente. O códon ATG está assinalado a azul, a potencial TATA-Box está indicada a negrito e com sublinhado duplo. Os *cis-acting elements* identificados através da base de dados PLACE (Higo *et al.*, 1999) estão destacados a negrito e em itálico. As sequências de DNA dos *cis-acting elements* discutidos no texto estão em caixas coloridas. A designação dos *cis-acting elements*, localização, sequência e referência no PubMed ou bibliográfica são as seguintes: **-10PEHVPsBD**, -1169, TATTCT, 11587507; **2SSEEDPROTBNAPA**, -43, -658, CAAACAC ou CNAACAC, 8818291, 9002600; **ABREATCONSENSUS**, -731, YACGTGGC, 10636868, 11884679, 11828032, 12694590; **BoxII/Gbox**, -731, CACGTGGC, Block *et al.*, 1990, Terzaghi and Cashmore, 1995, Donald and Cashmore, 1990; **ACGTAbox** ou **Abox**, -119, TACGTA, Foster *et al.*, 1994; **C8GCARGAT**, -331, CWWWWWWWWG, 12743119; **CAATbox1**, -234, -230, -481, -704, -788, -952, -1062, CAAT, 2710102; **CCAATbox1**, -1062, -481, CCAAT, 1736093, 12114568; **CEREGLUbox2**, -635, TGAAAAC, 2710102; **DOFcoreZM**, -1072, -670, -619, -134, -57, AAAG, Yanagisawa and Schmidt, 1999, Yanagisawa, 2000; **DPBFcore**, -733, -780, ACACNNG, Kim *et al.*, 1997; **DRE/CRT**, -1153, RCGAC, Dubouzet *et al.*, 2003; **Ebox**, -300, -479, -733, -1193, CANNTG, 8818291; **GATAbox**, -356, -399, -648, -719, -1065, -1105, GATA, Teakle *et al.*, 2002; **GT1box**, -383, -543, -717, -918, GRWAAW, 10417717; **Ibox**, -718, GATAA, Gilmartin *et al.*, 1990; **INR**, -283, -1137, YTCANTYY, Nakamura *et al.*, 2002; **LTRE**, -905, -1153, CCGAC, Jiang *et al.*, 1996; **MYB2**, -300, -427, YAACKG, Abe *et al.*, 2003; **MYBcore**, -90, -184, -214, -641, CNGTTR, Abe *et al.*, 2003; **PALbox/MYBplant**, -372, MACCWAMC, Tamagnone *et al.*, 1998, Kawaoka *et al.*, 2000; **NtBBF1**, -256, ACTTTA, Baumann *et al.*, 1999; **POLLEN1**, -1, -920, AGAAA, 9678581; **RAV1**, -755, CAACA, Kagaya *et al.*, 1999; **REalpha**, -482, AACCAA, 8597658; **RY**-repeat, -158, CATGCA, Ezcurra *et al.*, 1999; **SEF3**, -71, AACCCA, Allen *et al.*, 1989; **SEF4**, -850, RTTTTTT, Allen *et al.*, 1989; **TAAAG**-motif, -134, TAAAG, 11737782; **TATABox4**, -78, TATATAA, Hattori and Nakamura, 1988. R (A/G); W (A/T); Y (C/T); K (G/T); M (A/C).

De entre todos os motivos identificados na região do promotor de *QsPOX1* destacam-se a G-box (-733; CACGTG), a PAL-Box/MYBPLANT (-372; A/CACCA/TAA/CC), a I-Box (-718; GATAA), as seis GATA-box (-1105, -1065, -719, -648, -399, -356), as quatro GT-1-Box (-918, -717, -543, -383; GA/GA/TAAA/T) e as regiões reconhecidas pelos factores de transcrição MYB (-90, -184, -213, -650; CNGTTA/G) e MYB2 (-301, -427; C/TAACG/TG).

Alguns destes elementos (G-Box, PAL-Box/MYBPLANT) encontram-se nos promotores de genes que codificam proteínas envolvidas na via da biossíntese de fenilpropanóides tais como, a fenilalanina amónia liase (PAL), a cinamil álcool desidrogenase (CAD) e a cinamoil-CoA redutase (CCR) que estão na origem da produção de lenhina, do domínio poliaromático da suberina, de ácidos hidroxicinâmicos integrados na parede celular e de flavonóides (Kawaoka *et al.*, 2000; Tamagnone *et al.*, 1998). Por vezes, a activação destes genes e de genes de peroxidases, é induzida por eliciadores produzidos por fungos em interacções incompatíveis ou como resposta a traumatismos físicos (Moyle *et al.*, 2002; Kaothien *et al.*, 2002).

No promotor do gene *prxC2* (peroxidase do rábano) está presente um motivo semelhante à PAL-Box, que foi designado por POP-Box, e uma G-box (Kaothien *et al.*, 2002). A organização destes dois elementos em *prxC2* é semelhante à observada no promotor do gene *QsPOX1*, com a POP-Box colocada numa posição mais próxima do local de iniciação da transcrição do que a G-Box. Para analisar o funcionamento do promotor da peroxidase *prxC2*, Kaothien *et al.* construíram vários vectores com o promotor associado a um gene indicador e, nalguns vectores, eliminaram as regiões relativas aos elementos da PAL-Box e da G-Box. O vector foi introduzido na planta do tabaco e a indução da expressão foi analisada em folhas saudáveis e em folhas das plantas transformadas sujeitas a *stress* traumático. Não foi observada expressão do gene indicador nas folhas das plantas de tabaco saudáveis nem nas folhas de tabaco sob *stress* transformadas com o vector sem a região da G-Box ou da PAL-Box. Estes dois *cis-acting elements* são, em conjunto, os responsáveis pela actividade do promotor *prxC2* e pela expressão basal e/ou induzida do gene indicador.

Tamagnone *et al.* referiram, em 1998, a existência de duas proteínas MYB (AmMYB308 e AmMYB330), em *Antirrhinum majus*, que actuavam como factores de transcrição que reconheciam a PAL-Box e que regulavam a biossíntese de fenilpropanóides e de lenhina em plantas transgénicas de tabaco. Segundo estes autores, um aumento da expressão dos genes *MYB* de *Antirrhinum* suprime o metabolismo dos

ácidos fenólicos e a biossíntese de lenhina em plantas transgênicas de tabaco. Foi proposto que a expressão dos genes MYBPLANT em grandes quantidades podia inibir a actividade de proteínas activadoras destas vias metabólicas por competição consequente do reconhecimento dos mesmos *cis-acting elements*. No trabalho de Tamagnone *et al.*, ficou demonstrado que a transcrição dos genes *C4H* (cinamato-4-hidroxilase), *4Cl* (4-cumaróilo-CoA ligase) e *CAD* (cinamil álcool desidrogenase) cuja actividade é essencial para a produção dos precursores da lenhina (álcool 4-cumarílico; álcool coniferílico; álcool sinapílico), foi afectada pela expressão de AmMYB308. Curiosamente, a expressão da transcrição do gene *PAL* (fenilalanina amónia liase) não é afectada pelo factor de transcrição AmMYB308.

A associação que parece existir entre a presença da PAL-Box nos promotores de genes de peroxidases e o seu envolvimento na lenhificação ou suberização, foi reforçada pela identificação destes motivos nos promotores de duas peroxidases do arroz (*poxA*; *poxN*) que se expressam especificamente em células do xilema (Ito *et al.*, 2000). Estudos histoquímicos e bioquímicos realizados *in vitro* suportam a teoria que os ácidos hidroxicinâmicos, os álcoois hidroxicinâmicos e derivados destes compostos são convertidos em radicais fenóxilo por peroxidases localizadas na parede celular (Takabe *et al.*, 2001). Os radicais fenóxilo instáveis ligam-se e dão origem a polímeros como a lenhina ou são integrados no domínio poliaromático da suberina. As macromoléculas polimerizadas são depositadas posteriormente na superfície extracelular fortalecendo a parede celular, restringindo a expansão das células e a invasão por parte dos agentes patogénicos, conferindo suporte estrutural ao corpo da planta, o que é especialmente importante, nas árvores, para a construção dos vasos do xilema (Hiraga *et al.*, 2001).

Dos muitos motivos de *cis-acting elements* presentes no promotor de *QsPOXI* há que fazer referência, em conjunto, aos elementos G-box (-733; CACGTG), I-Box (-718; GATAA), GATA-box (-1105, -1065, -719, -648, -399, -356) e GT-1-Box (-918, -717, -543, -383; GA/GA/TAAA/T). As sequências destes motivos são preservadas nas regiões promotoras de genes cuja expressão é induzida ou regulada pela luz de vários comprimentos de onda. Os genes mais estudados têm sido o *rbcS* (subunidade pequena da *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase*), *CHS* (*chalcone synthase*) e os genes que codificam as proteínas *cab* (*chlorophyll a/b-binding proteins*) (Gilmartin *et al.*, 1990; Terzaghi e Cashmore, 1995).

No gene *rbcS-3A* da ervilha, estão presentes dois locais de ligação dos factores de transcrição GT-1, na região dos 170 nucleótidos que antecedem o início da

transcrição do gene. A substituição das guaninas por citosinas num dos motivos resulta na incapacidade de ligação dos factores de transcrição às GT-1-Box *in vitro* e na ausência da transcrição do gene, *in vivo* (Green *et al.* 1988). A existência destes motivos na forma de pares ou de tétradas, como em *QsPOXI*, parece ter uma importância estrutural para o funcionamento do promotor *in vivo*.

A transcrição dos genes induzida pela luz requer a ligação de factores de transcrição GT-1 às GT-1-Box não sendo, no entanto, a ligação destes factores suficiente para a sua transcrição *in vivo*. Supõe-se a existência doutro motivo, presente na região -166 do promotor do gene *rbcS-3A*, responsável pela interacção entre as duas GT-1-Box, que resulta na transcrição do gene *in vivo* (Green *et al.*, 1988; Gilmartin *et al.*, 1990). Segundo Le Gourrierec *et al.* (1999), GT-1 pertence a uma classe de proteínas que interagem com DNA através do reconhecimento de sequências que existem nos promotores de muitos genes com características diferentes. Os factores GT-1 activam a transcrição dos genes por interacção directa com o complexo de iniciação da transcrição, criado pela ligação dos factores TFIIA e TBP à TATA-Box.

A G-Box tem como sequência consensual TCTTACACGTGGCAC/TC/T, obtida por comparação entre as regiões promotoras de genes que são estimulados ou regulados pela luz. Sete bases desta sequência (5' ACGTGGC 3') foram consideradas como nucleares para que a expressão do gene seja controlada pela luz, deduzindo-se que são essenciais para o reconhecimento dos factores de transcrição (Block *et al.*, 1990). A remoção de regiões contendo os motivos da G-Box, I-Box e GT-1-Box dos promotores dos genes *rbcS-1A* de *A. thaliana* e do gene *cabE* no tabaco resultou na ausência da indução da transcrição pela luz daqueles genes (Donald e Cashmore, 1990; Castresana *et al.*, 1988). Análises mutacionais, realizadas posteriormente, e dirigidas de forma independente, a cada um destes *cis-acting elements*, revelou que as mutações provocadas na G-Box e I-Box, provocam alterações significativas na expressão de genes usados como indicadores do funcionamento do promotor, ao passo que as mutações provocadas nas GT-1-Box, não afectam de forma significativa a expressão (Donald e Cashmore, 1990). A sequência da I-Box (ATGATAAGG) possui no seu interior uma GATA-Box, que é um motivo encontrado com frequência nos genes regulados pela luz. O motivo GATA tem sido considerado como necessário para regular a expressão deste tipo de genes, assim como, a expressão em tecidos específicos. No entanto, embora os motivos GATA sejam muito frequentes neste tipo de promotores, e já tenham sido isolados vários factores de transcrição (ASF-2; 3AF-1; GAF-1) que reconhecem esta

sequência, estes *cis-acting elements* não parecem ter todos a mesma função. GAF-1 reconhece especificamente a I-Box e está presente em grande quantidade nos extractos de plantas do tabaco cultivadas na presença de luz, contrariamente ao que acontece nas plantas cultivadas no escuro (Gilmartin *et al.*, 1990).

Em experiências realizadas com protoplastos de *Petroselinum crispum*, dirigidas para o promotor do gene *CHS*, foram identificadas quatro regiões implicadas na resposta à radiação ultravioleta (UV), correspondendo duas, a motivos da G-Box. (Gilmartin *et al.*, 1990). Block *et al.* em 1990, ao estudarem este promotor, observaram que a acção da G-Box requeria a presença dum outro *cis-acting element*, localizado a uma certa distância. Ao verificarem, também, que os factores de transcrição que reconheciam a G-Box não eram específicos dos genes regulados pela luz formularam a seguinte hipótese: “uma sequência dum *cis-acting element*, que esteja presente num número limitado de genes, regulados de forma diversificada, adquire funcionalidade e especificidade, combinando-se com outros elementos que estejam localizados nas regiões flanqueantes do promotor”.

No promotor de *QsPOXI* está presente uma G-Box e uma PAL-Box que sugerem o envolvimento desta peroxidase no metabolismo de fenilpropanóides e, ao mesmo tempo, estão presentes outros *cis-acting elements* que interagem, também, com a G-Box e que sugerem poder haver indução ou regulação deste gene pela luz. Estas constatações tornam-se interessantes quando pensamos nalgumas características fenotípicas associadas à produção de cortiça. É de conhecimento geral que só se forma cortiça nas raízes, semelhante à que se forma no tronco, quando as raízes não estão enterradas e também, que a cortiça de um sobreiro que nunca tenha sido descortiçado, não cresce indefinidamente.

Jansen *et al.* (2001) verificaram que o mecanismo de protecção das plantas à radiação UV tem a contribuição das peroxidases da classe III que catalisam a oxidação de compostos fenólicos. Estes autores observaram uma ligação estreita entre a actividade das peroxidases e a tolerância à radiação UV, em plantas transgénicas de tabaco e em ecotipos naturais e mutantes de lentilha-de-água. O aumento da expressão dum peroxidase aniónica em plantas transgénicas de tabaco provou que as peroxidases da classe III, que catalisam compostos fenólicos, são capazes de contribuir para a protecção do PSII (*Photosystem II*) contra a radiação UV-B (280-315 nm). Os resultados da investigação indicam que o mecanismo subjacente se traduz numa modificação do conteúdo ou da composição dos compostos fenólicos presentes nas

folhas, no sentido de formar um écran ou algum tipo de estrutura que sirva para separar ou proteger. Estes resultados baseiam-se no seguinte: a) a tolerância observada é específica à radiação UV e não resulta nem está associada à tolerância a outros tipos de *stress* (luz branca; calor; frio); b) os compostos fenólicos absorvem fortemente na região ultravioleta do espectro e isto torna-os substâncias excelentes para funcionar como tela de protecção; c) muitos compostos fenólicos são substratos das peroxidases; d) os polifenóis polimerizados e associados à parede celular podem funcionar como complemento de blindagem dos flavonóides que estão presentes nos vacúolos.

No promotor de *QsPOX1* estão presentes cinco motivos (AAAG) para ligação das proteínas Dof. Estas proteínas foram identificadas, recentemente, como factores de transcrição específicos das plantas e aparecem associadas a promotores de vários tipos de genes. Estas proteínas regulam a transcrição dos genes da *cyPPDK* (*cytosolic orthophosphate dikinase*), *PEPC* (*phosphoenolpyruvate carboxylase*) e *C4PEPC* (*C4 photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase*). As regiões que flanqueiam os motivos de ligação dos factores de transcrição Dof afectam a interacção destas proteínas com o DNA. Estes motivos foram observados no promotor de *cyPPDK1* em associação com motivos para a ligação de proteínas bZIP (Yanagisawa, 2000). Em *QsPOX1*, estão presentes dois motivos DOF com a sequência ACAAAGG em posições muito próximas (-57, -670) de motivos 2SEEDDPROTBNAPA com a sequência CNAACAC, localizados a -43 e -635, encontrados com frequência nos promotores das proteínas que constituem os tecidos de reserva das sementes (Ellerstrom *et al.*, 1996).

II.4.2.2.3. Estrutura da proteína deduzida do gene *QsPOX1*.

A sequência nucleotídica dos 4 exões em conjunto, com 993 pb, corresponde a um quadro de leitura aberto ou ORF (*open reading frame*) que codifica, teoricamente, uma pré-proteína com 331 aminoácidos, com uma Mr (massa molecular relativa) de 35,9 (Figura 99). Na região da extremidade NH₂ estão presentes maioritariamente aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas fazendo parte de um potencial peptídeo sinal a ser clivado entre Ala-31 e a Lys-32 (Nielsen *et al.*, 1997). É previsível uma estrutura em hélice- α entre o aminoácido 10 (Ala) e o 25 (Phe), comum às proteínas que se destinam ao retículo endoplasmático e que sofrem modificações após a tradução (Figura 99). A proteína madura corresponderá a uma peroxidase básica (pI 9,55)

constituída por 300 aminoácidos, com uma Mr de 32,8, glicosilada na asparagina 102, de acordo com o sinal de glicosilação Asn-X-Ser e destinada a ser segregada para o meio extracelular. A comparação da proteína deduzida de *QsPOX1* com proteínas presentes nas bases de dados, através do programa pBlast do NCBI, mostra que apresenta homologia elevada (> 60 %) com as peroxidases de classe III de plantas.

```

1   MAAHSTSHSA SSFLLVLSLA VLVIFTGNSS AKLSTNFYSK SCPKVFSTVQ
51  SVVHSAVSKQ PRQGASLLRL HFHDCFVNGC DGSILLDDTP TFTGKEKTARP
101 NNGSIRAFEV VDEIKSKVEK ECPGVVSCAD ILAIAARDSV KILGGPKWDV
151 KLGRRDSKTA SFSAANSGVI PPPTSTLGNL INRFKAKGLS TKDMVALSGA
201 HTVGQARCTV FRDRIYKDKN IDSSFAKTRQ NKCPKTTGLP GDNKIAPLDD
251 QTPTAFDNYY YKNLIKEKGL LRSQQQLFNG GSTDSL VKKY SQDTKTFYSY
301 FVNAMIKMGD IQPLTGSSGE IRKNCRKVVN *
```

Figura 99. Sequência em aminoácidos da proteína QsPOX1, deduzida da sequência de DNA.

A classe III das peroxidases de plantas (POX, EC 1.11.1.7) inclui peroxidases que são segregadas para o meio extracelular, via retículo endoplasmático, contêm íons cálcio na sua estrutura, várias pontes dissulfureto e resíduos glicosilados. Algumas proteínas desta classe possuem uma extensão de aminoácidos na extremidade carboxílica e são dirigidas para o vacúolo. A peroxidase catiónica 1SCH A, isolada de *Arachis hypogea* (planta do amendoim), foi escolhida como referência para identificar em QsPOX1 os motivos estruturais característicos das peroxidases da classe III e para examinar a estrutura secundária prevista teoricamente para esta proteína (Buffard *et al.*, 1990). As sequências em aminoácidos destas proteínas têm uma homologia de 63 %. A estrutura cristalográfica de 1SCH A já foi determinada, tornando-a numa referência para as novas peroxidases da classe III (Schuller *et al.*, 1996).

Fazem parte da proteína madura QsPOX1 dois motivos típicos muito conservados nas peroxidases: GASLLRLHFHDC (consenso AXXXIRIXFHXC) e DMVALSGAHTV (consenso DLXXLSGAHTV) (Figura 100). As histidinas 42 (distal) e 170 (proximal) fazem parte destes dois motivos e estão localizadas próximo do grupo prostético heme, integrado no centro activo da enzima. QsPOX1 possui 8 cisteínas envolvidas na formação de 4 pontes dissulfureto, estabilizadoras da estrutura terciária das peroxidases, em geral (Kato *et al.*, 2001).

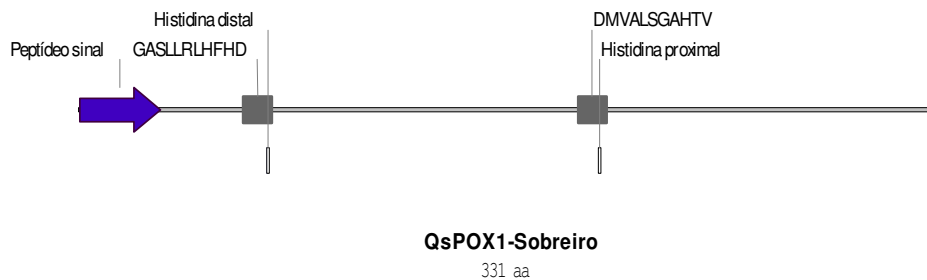


Figura 100. Representação esquemática dos domínios da proteína QsPOX1. Peptídeo sinal com 31 aminoácidos localizado na extremidade NH₂ e motivos com a sequência GASLLRLHFHD e DMVALSGAHTV que incluem as histidinas 42 (distal) e 170 (proximal), localizadas próximo do grupo prostético heme, integrado no centro activo da enzima.

Na figura 101 estão alinhadas as sequências primárias das peroxidases 1SCH A e QsPOX1 e na figura 102 é ilustrada a estrutura 3D de 1SCH A.

As estruturas terciárias das peroxidases da classe III revelam, em comum, a existência de 10 hélices- α , denominadas de A a J e três folhas- β . As hélices- α criam dois domínios estruturais que funcionam como topo e base de encaixe para o grupo heme. Os dois catiões Ca²⁺ aparecem associados, cada um deles, ao domínio estrutural distal e proximal da enzima (Chittoor *et al.*, 1999). Existem aminoácidos nas peroxidases da classe III que são praticamente invariáveis como é o caso das histidinas 170 e 42, da arginina 38, asparagina 70 e ácido aspártico 247. Estes resíduos são considerados importantes para a função catalítica da enzima. A numeração dos aminoácidos tem como referência a HRP C (*Horseradish peroxidase*) por ser a peroxidase mais estudada e referenciada (Veitch e Smith, 2001). O ácido aspártico 247 corresponde em QsPOX1 ao resíduo 243. Como estas enzimas catalisam uma vasta gama de substratos, deduz-se que as diferenças na reactividade devam resultar também, da natureza doutros resíduos ou doutros aspectos da estrutura. Efectuou-se a previsão da estrutura secundária de QsPOX1 com base na estrutura primária, a fim de avaliar a probabilidade de formação das 10 hélices- α referidas para as peroxidases. A previsão foi realizada através do programa PROF (*profile network prediction*; <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein>). O índice de confiança (IC) situa-se entre 0 e 9 e foi usada a notação h minúsculo no caso dos resíduos envolvidos em hélices- α , com valores de IC inferiores a 5, e H maiúsculo para valores de IC superiores ou iguais a 5. Foram identificadas 9 regiões em que existe uma probabilidade elevada de

formação de hélices- α que coincidem com as existentes na proteína de referência (Figura 101).

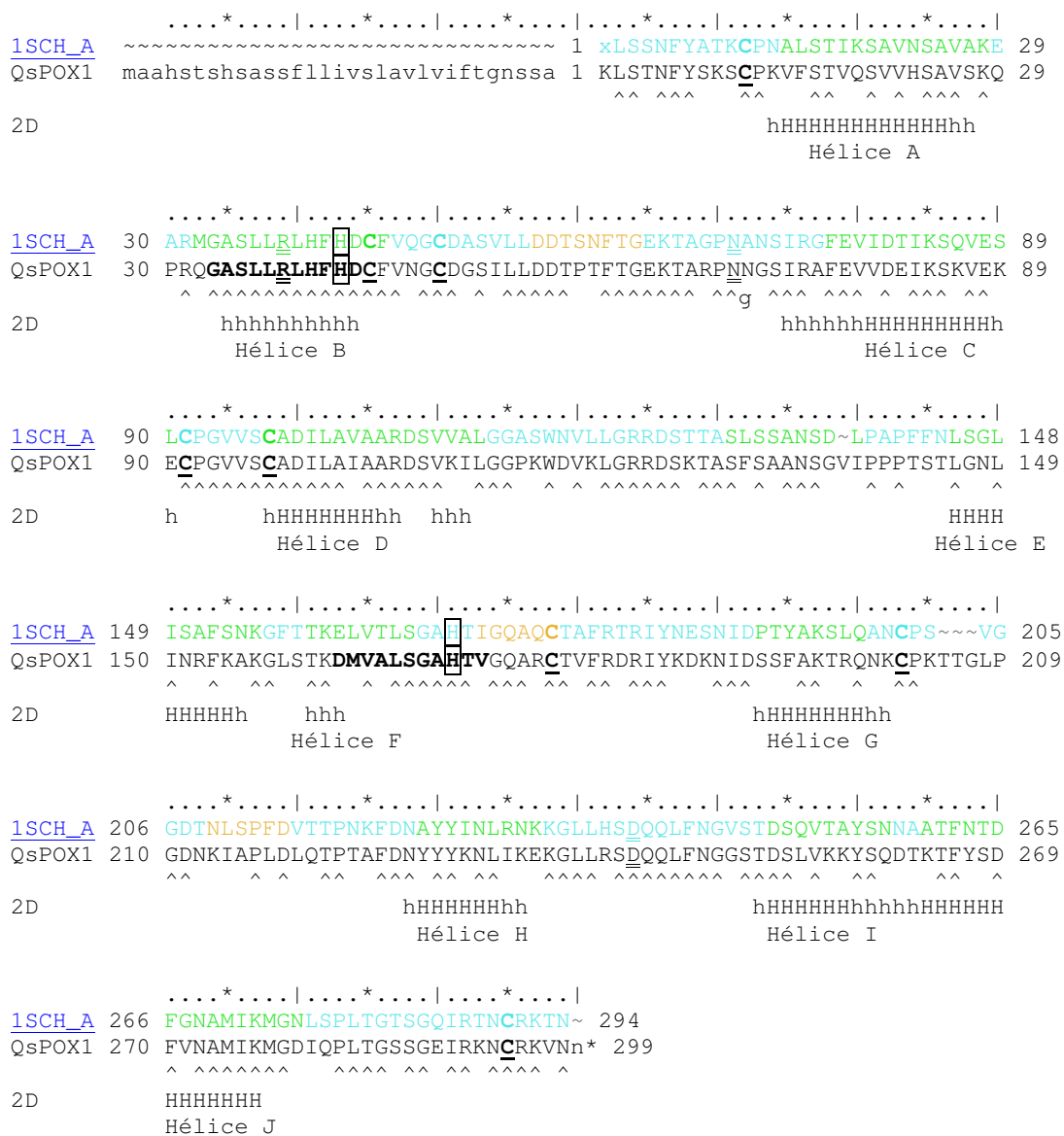


Figura 101. Alinhamento das sequências em aminoácidos de 1SCH A (peroxidase da classe III de *Arachis hypogaea*) e de QsPOX1 (peroxidase de *Q. suber*). Na sequência de 1SCH A estão assinalados a verde os segmentos em hélice- α , a castanho os segmentos em folha- β e a azul os segmentos de ligação entre as conformações. As cores usadas mantêm-se na estrutura 3D apresentada na figura 102. Os motivos estruturais típicos de peroxidases, discutidos no texto, estão identificados a negrito. As histidinas proximal e distal estão delimitadas por caixas, as oito cisteínas aparecem a negrito e sublinhadas, os resíduos conservados nas peroxidases da classe III estão duplamente sublinhados e os aminoácidos comuns às duas sequências estão assinalados com ^. Os segmentos em hélice- α previstos na estrutura 2D para QsPOX1 estão identificados com h (índice de confiança 0-4) ou H (índice de confiança 5-9) (vide texto). Na figura foi incluída a localização das 10 hélices A-J comuns a este tipo de peroxidases. Ao local de glicosilação previsto em QsPOX1 foi atribuída a letra g.

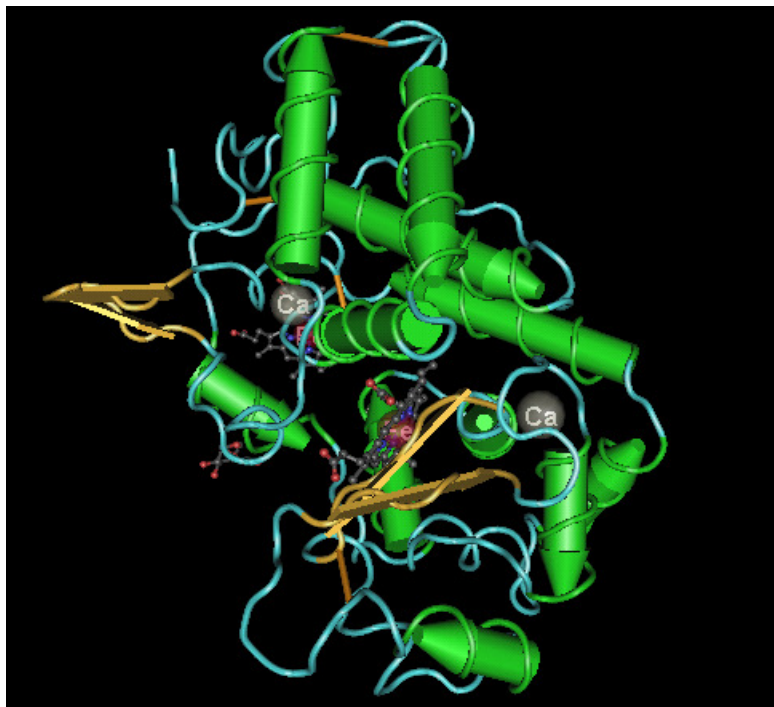


Figura 102. Representação da estrutura 3D da peroxidase catiónica 1SCH A da classe III de *A. hypogaea*. A proteína tem 294 aminoácidos e está acompanhada de um grupo heme e dois íons cálcio. As regiões com conformação em hélice- α estão representadas na forma de cilindros, a verde, as três regiões em folha- β na forma de setas paralelas com sentidos opostos, a amarelo, e os segmentos que ligam estes elementos da estrutura, a azul. (Estrutura 1SCH A, disponível no NCBI; Schuller *et al.*, 1996)

II.4.2.2.4. Identificação duma isoforma da peroxidase *QsPOX1*.

Após a análise da estrutura do gene *QsPOX1* e da proteína deduzida da sequência nucleotídica considerou-se importante averiguar se *QsPOX1* se expressava nas raízes e se a sua expressão aumentava nas primeiras 24 horas de interação entre *P. cinnamomi* e o sobreiro. Utilizámos o método RACE-PCR para obter o cDNA de *QsPOX1* utilizando os *primers* específicos PAP-1F e PAP-1R. Foram amplificados a partir de mRNA de raízes de *Q. suber* dois fragmentos, um na extremidade 3' e outro na extremidade 5', que se sobrepõem em 299 pb e que formam uma sequência nucleotídica com 1213 pb (Figura 103). A análise desta sequência revelou um quadro de leitura aberto de 993 pb apresentando 97,0 % de homologia com a sequência codificante de *QsPOX1* obtida a partir do DNA genómico. Considerou-se, deste modo, que terá sido amplificada uma isoforma de *QsPOX1*, que foi designada *QsPOX2* (AY443340). A proteína deduzida do cDNA mantém os mesmos aspectos estruturais referidos anteriormente para *QsPOX1* assim como, massa molecular e o ponto isoeléctrico, com excepção do local de glicosilação referido em *QsPOX1*. A semelhança entre as

sequências em aminoácidos é de 95 % e o alinhamento entre as sequências das duas proteínas deduzidas é apresentado na figura 104.

```

1      1      GGCAAACACT TAACGCAGCC TTCTCCTGA GTTTGATTAT TAAGCAAGAA AATGGCTGCT CGTCTACTT
      8      . H S A S S F L L I V S L A V L V I F S G N S S .
71     31     CTGATTCTGC TTCTTCTTC CTACTCATAG TTTTCATTAGC AGTTCTCGTG ATTTTCTCTG GGAACCTCTC
      31     . A K L S T N F Y Y K S C P K V F S T V Q S V V
141    54     TGCTAAACTC TCAACAAATT TCTACTATAA AAGCTGTCCA AAGGTGTTTA GCACCGTTCA ATCAGTTGTT
      54     H S A I S K Q P R Q G A S L L R L H F H D C F V .
211    78     CATTCTGCCA TTTCGAAACA ACCCCGCCAG GGTGCTTCTC TGCTTCGCCT CCACTTTCAT GATTGTTTTG
      78     . N G C D G S V L L D D T P T F T G E K T A G P .
281    101    TCAATGGTTG TGATGGGTCA GTACTCTTGG ATGACTCTCC AACTTTCACA GGTGAGAAGA CAGCAGGTCC
      101    . N K G S I R G F E F V D E I K S K V E K E C P
351    124    CAACAAGGGA TCAATTAGGG GATTGAGTT TGTAGATGAA ATAAAGTCCA AGGTCGAGAA AGAATGCCCC
      124    G V V S C A D I L A I A A R D S V K I L G G P K .
421    148    GGAGTGGTCT CATGCGCTGA TATCTTAGCC ATTGCTGCTC GGGACTCTGT TAAAATCTCT GGAGGCCCA
      148    . W D V K L G R R D S K T A S L K A A N S G V I .
491    171    AATGGGATGT CAAGCTTGA AGAAGAGATT CCAAACAGC AAGCTTAAAG GCTGCCAACA GTGGGGTCAT
      171    . P P P T S T L S N L I N R F K A K G L S T K D
561    194    CCCTCCCCC ACTTCTACCC TTAGCAATCT CATTAAATAGA TTTAAAGCAA AAGGTCTCTC TACCAAGGAC
      194    M V A L S G A H T I G Q A R C T V F R D R I Y K .
631    218    ATGGTTGCC TGTGAGGAGC CCACACAATT GGGCAAGCAA GGTGTACAGT TTTTAGAGAT CGCATATATA
      218    . D K N I D S S F A K T R Q N T C P K T T G L P .
701    241    AAGATAAAA TATTGATAGT TCATTGCCA AGACTAGGCA GAATACATGT CCAAAGACTA CTGGCCTTCC
      241    . G D N K I A P L D L Q T P T A F D N Y Y K N
771    264    AGGAGATAAC AAGATTGCAC CTCTAGATCT CCAAACCTCT ACAGCTTTTG ACAACTATTA CTATAAGAAC
      264    L I K Q K G L L R S D Q Q L F N G G S T D S L V .
841    288    CTTATCAAGC AAAAGGTCT TCTTCGCTCT GATCAACAAT TGTTCATGG TGGATCCACT GACTCATTGG
      288    . K K Y S Q D T K S F Y S D F V N A M I K M G D .
911    311    TTAATAAATA CAGCCAGGAT ACTAAGTCT TCTATTCTGA CTTGTCAAC GCAATGATCA AAATGGGAGA
      311    . I Q P L T G S S G E I R K N C R K V N H *
981    981    CATAAGCCC CTCACTGGAT CAAGTGGTGA AATTAGGAAG AACTGCAGAA AGGTGAATCA TTAATGGGGG
1051   1051   TAATTTTAGC TCCAAAAGAG GGCAATTTGT TTGTTTGTGC TAAGGAACCT TGAGTGAAAA ATTTGGAATT
1121   1121   ATTTATTGT AGAAGTTTG AAGTTGTTC GACTTTGAAT TATTGTTAAA TTTAATAAAT TCCTTTTTC
1191   1191   CTAAAAAAA AAAAAA AAA

```

Figura 103. Sequência nucleotídica do cDNA de *QsPOX2* e sequência em aminoácidos da proteína deduzida. A sequência do peptídeo sinal está duplamente sublinhada e o sinal de poliadenilação está sublinhado.

```

1 MAARSTSHSASSFLLIVSLAVLVIFSGNSSAKLSTNFYKSCPKVSTVQ 50
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1 MAAHSTSHSASSFLLIVSLAVLVIFTGNSSAKLSTNFYSKSCPKVSTVQ 50

51 SVVHSAISKQPRQGASLLRHLHFHDCFVNGCDGSVLLDDTPTFTGKTAGP 100
| | | | | : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
51 SVVHSAVSKQPRQGASLLRHLHFHDCFVNGCDGSILLDDTPTFTGKTAGP 100

101 NKGSI RGF EFVDEIKSKVEKECPGVVSCADILAI AARD SVKILGGPKWDV 150
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
101 NNGSIRAF EFVDEIKSKVEKECPGVVSCADILAI AARD SVKILGGPKWDV 150

151 KLGR RDSKTASLKAANSGVIP PPTSTL SNL INRFKAKGLSTKDMVALSGA 200
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
151 KLGR RDSKTASLKAANSGVIP PPTSTLGNL INRFKAKGLSTKDMVALSGA 200

201 HTIGQARCTVFRDR IYKDKNIDSSFAKTRQNTCPKTTGLPGDNKIAPLDL 250
| | : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
201 HTVQARCTVFRDR IYKDKNIDSSFAKTRQNKCPKTTGLPGDNKIAPLDL 250

251 QTPTAFDNYKYK NLIKQKGLLRS DQQLFN GGSTDSL VKKYSQDTKSFYSD 300
| | | | | | | | | | | : | | | | | | | | | | | | | | | | |
251 QTPTAFDNYKYK NLIKEKGLLRS DQQLFN GGSTDSL VKKYSQDTKTFYSD 300

301 FVNAMIKMGDIQPLTGSSGEIRKNCRKVN H* 331
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
301 FVNAMIKMGDIQPLTGSSGEIRKNCRKVN H* 331

```

Figura 104. Alinhamento das sequências de aminoácidos *QsPOX2* e *QsPOX1*. A notação usada para o grau de semelhança entre os aminoácidos significa: | = Identidade; : = 2 (semelhança elevada); . = 1 (semelhança baixa).

Em muitas espécies tem sido feita referência a famílias de genes de peroxidases catiónicas e aniónicas. Na planta do amendoim foram isoladas duas peroxidases catiónicas que apresentavam uma homologia entre elas de 46 % (Buffard *et al.*, 1990) e na soja foram identificadas 4 peroxidases (GmEpa1, GmEpa1, GmEpb1, GmEpb1) muito semelhantes (homologia > 90 %) duas a duas e que mostravam especificidade relativamente aos tecidos onde se expressavam (Chen *and* Vierling, 2000). Recentemente, no arroz foram identificados 42 ESTs (*Expressed sequence tags*) independentes, dos quais 21 correspondem a genes de peroxidases da classe III. A expressão destes genes, analisada com recurso a sondas e hibridação, revelou que a expressão de cada um deles, está relacionada de forma específica, com o estado de desenvolvimento da planta, com os seus órgãos constituintes e com a resposta a estímulos externos, sugerindo os autores do trabalho, que a família de genes estará, em conjunto, implicada num grande número de processos fisiológicos (Hiraga *et al.*, 2000). Todos os genes de *POX* analisados no arroz, com excepção de um, são expressos de forma constitutiva nas raízes e apresentam níveis de expressão variáveis entre eles. Parte dos genes que se expressam nas raízes também se expressam nas partes aéreas da planta. Sete genes *POX* respondem a estímulos externos tais como, traumatismo, radiação ultravioleta e tratamentos com metiljasmonato e em 14 não há qualquer variação na expressão (Hiraga *et al.*, 2000). Noutras espécies também têm sido descritos resultados semelhantes aos obtidos por Hiraga *et al.* no arroz. A expressão de uma peroxidase aniónica isolada de *Cucurbita pepo* (abóbora italiana) foi identificada por hibridação *in situ* em vários tipos de tecidos das raízes, dos cotilédones e dos hipocótilos (Carpin *et al.*, 1999).

A atribuição de uma função a uma determinada isoforma de uma peroxidase da classe III tem constituído um desafio para muitos investigadores nos últimos anos. Recentemente, as peroxidases têm sido relacionadas com a lenhificação, suberização e outros metabolismos associados à formação da parede celular das células (Bernards *et al.*, 1999; Quiroga *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2001), catabolismo de auxinas (Charvet-Candela *et al.*, 2002), *stress* traumático ou causado por factores abióticos (Sasaki *et al.*, 2002; Hiraga *et al.*, 2000a; Chaloupková *and* Smart, 1994), defesa contra infecções por agentes patogénicos (Kristensen *et al.*, 1999) e envolvimento na resposta hipersensível característica das interacções incompatíveis entre hospedeiro e patogénio (Blee *et al.*, 2001).

II.4.2.2.5. Relação de QsPOX1 e QsPOX2 com a patogénese em *Q. suber*.

Em 1999, Chittoor *et al.* compararam a sequência de 62 genes de peroxidases da classe III e mostraram que havia uma correlação entre a estrutura primária e o perfil de expressão dos genes de *POX* relacionados com a patogénese. Estes autores verificaram que a região mais variável das peroxidases da classe III é o segmento que tem início no local de ligação proximal do grupo heme e que se estende até à região da sétima cisteína. A sequência das peroxidases, neste segmento, é divergente no tamanho e no tipo de aminoácidos e, segundo as estruturas cristalográficas da *POX* da planta do amendoim e do rábano, a região referida faz parte da constituição do canal de acesso do substrato. Desta análise filogenética resultou a organização dos 62 genes de *POX* em 10 grupos diferentes, com as peroxidases induzidas por agentes patogénicos agrupadas no Grupo 2, estando este subdividido nos grupos 2A (monocotiledóneas) e 2B (dicotiledóneas) (Chittoor *et al.*, 1999).

Com referência no trabalho de Chittoor *et al.* escolhemos sequências de *POX* em cada um dos 10 grupos, incluímos as sequências *POD3* do algodão e *TPOXC1* do tabaco, as que apresentam maior homologia com *QsPOX1* e *QsPOX2*, e refizemos a análise filogenética. Verificámos que *QsPOX1*, *QsPOX2*, *POD3* e *TPOXC1* se agrupam com as peroxidases do Grupo 2, ou seja, as peroxidases relacionadas com a patogénese. A figura 105 mostra um extracto do alinhamento das sequências em aminoácidos das 21 *POX* usadas, na região de maior variabilidade. Nesta região existe uma isoleucina que é exclusiva das peroxidases do grupo 2.

O envolvimento das peroxidases, identificadas em *Q. suber*, na resposta à infecção por *P. cinnamomi*, foi confirmado por RT-PCR e hibridação, a partir de RNA total isolado de raízes não infectadas e de raízes que estiveram em contacto com o fungo durante 24 horas. Por amplificação do DNA genómico com os *primers* PAP-1F e PAP-1R, foi preparada uma sonda com 300 pb, complementar dos cDNAs de ambos os genes (*QsPOX1* e *QsPOX2*). A sonda foi marcada com digoxigenina e após hibridação observou-se uma banda com o tamanho esperado (588 pb) que se destaca numa mancha escura (Figura 106). A mancha escura corresponde, provavelmente, a um conjunto de RNAs mensageiros doutras peroxidases que se expressam nas raízes e que são amplificados, e que também são reconhecidos pela sonda. A área da banda que se destaca foi delimitada e o sinal emitido nessa região foi determinado por densitometria.

A absorvência medida foi sempre mais elevada nas amostras de raízes infectadas do que nas amostras não infectadas, observando-se um aumento da absorvência com o aumento da diluição da amostra, nas raízes infectadas. Provavelmente, há indução da expressão de várias peroxidases cujos cDNAs são reconhecidos pelos *primers* e que competem na reacção de amplificação com o fragmento alvo da sonda. Este factor torna-se menos significativo com o aumento da diluição da amostra porque a especificidade da reacção PCR aumenta e por isso, o valor da absorvência medido nas raízes infectadas aumenta com o aumento da diluição (Figura 107).



Podemos deduzir que o mRNA detectado corresponde, pelo menos, a *QsPOX2*, porque sabemos experimentalmente que se expressa nas raízes. A sequência do gene que codifica para *QsPOX2* foi obtida a partir de cDNA e portanto, o RNA mensageiro deste gene é, após transcrição reversa, reconhecido pela sonda específica. *QsPOX2* é portanto, um gene relacionado com a patogénese e é induzido após infecção. A análise por RT-PCR e hibridação confirma o seu agrupamento com genes doutras peroxidases relacionadas com a patogénese.

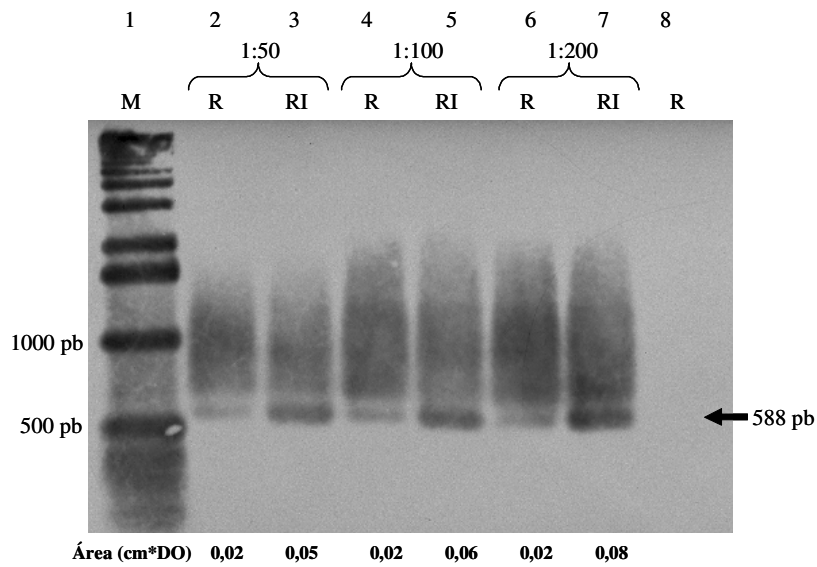


Figura 106. Padrão de expressão de genes de peroxidases, analisado por RT-PCR e hibridação a partir de RNA total extraído de raízes de *Q. suber* não infectadas (R) e de raízes infectadas com *P. cinnamomi* (RI). Foi utilizada uma sonda marcada com digoxigenina dirigida para os genes *QsPOX1* e *QsPOX2*. A reacção de amplificação foi realizada em soluções de cDNA diluídas de 1:50, 1:100 e 1:200. O tamanho do fragmento amplificado de 588 pb, está assinalado com uma seta e destaca-se da mancha escura presente no gel. A intensidade do sinal de hibridação emitido foi medida por densitometria considerando apenas a área delimitada pela banda que se destaca com o tamanho esperado. Os valores das áreas delimitadas pelos picos de absorvência estão referidos na base da imagem. M: marcador de massa molecular. Canal 8: ausência de sinal de hibridação entre a sonda e o fragmento amplificado do gene da actina.

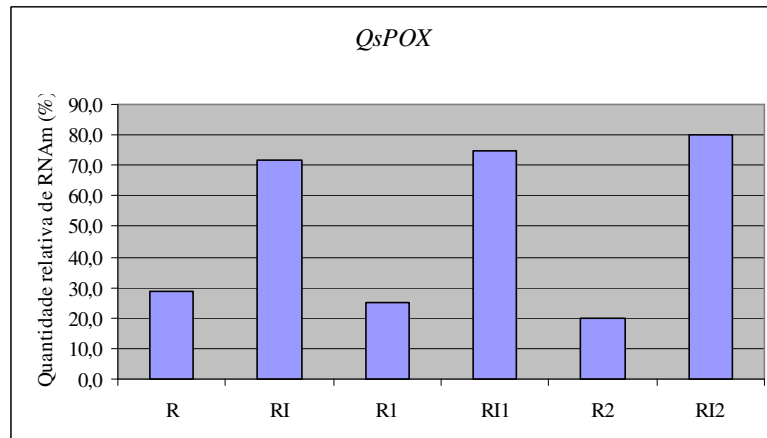


Figura 107. Gráfico de barras com as quantidades relativas, em percentagem, de mRNA de *QsPOX1* e/ou *QsPOX2* presente nas amostras de raízes de *Q. suber* não infectadas (R) e infectadas (RI) com *P. cinnamomi*, disponível para ser transcrito *in vitro* e amplificado. R e RI: diluição do cDNA 1:50; RI e RI1: diluição de 1:100; R2 e RI2: diluição de 1:200.

Quanto a *QsPOXI* não podemos garantir que se expressa nas raízes ou que é induzido após infecção e no caso das peroxidases a semelhança entre sequências não indica necessariamente semelhança de funções. Na análise do promotor deste gene não foram encontrados *cis-acting elements* semelhantes aos que estão presentes em genes relacionados com a patogênese e/ou que são induzidos por substâncias eliciadoras (Zhu *et al.*, 1996; Büttner and Singh, 1997). Os elementos *cis* presentes no promotor sugerem que a peroxidase codificada por *QsPOXI* está envolvida no metabolismo de fenilpropanóides e na resposta a vários tipos de *stress* causados por factores abióticos e portanto, apenas relacionada indirectamente com a patogênese. Evidências experimentais acerca do envolvimento de peroxidases básicas na síntese de lenhina e suberina, assim como, a indução da expressão do gene por acção de *stress* salino, foram obtidas por Quiroga *et al.* (2000) em plantas do tomate. Estes autores purificaram cinco peroxidases das raízes de plantas do tomate com pontos isoeléctricos que variam de 3,6 a 9,6 e verificaram a sua eficiência catalítica para com a seringaldazina, um substrato análogo dum monómero da lenhina. As duas peroxidases com pI 3,6 e 9,6 apresentam os valores de catálise mais elevados. Ao nível imunológico as duas peroxidases também são semelhantes. Anticorpos preparados contra a peroxidase com pI 9,6 reconhecem as duas enzimas, independentemente do seu pI. Durante este estudo, os autores verificaram que a peroxidase básica isolada corresponde ao produto do gene *TPX1* identificado por Botella *et al.* (1993). Consideraram que a diferença observada entre o pI determinado teoricamente para a proteína deduzida (7,5) e o pI da peroxidase isolada experimentalmente (9,6), é devido, provavelmente, à glicosilação e à conformação adquirida pela proteína madura. Para determinar a localização de *TPX1*, a peroxidase foi expressa em plantas de tabaco e o mRNA foi analisado por hibridação *in situ*, confirmando-se que a expressão do gene é restrita às células das raízes onde ocorre suberização/lenhificação.

A semelhança existente entre as isoformas das peroxidases de uma determinada família, presentes em cada espécie de plantas, parece contrariar a constatação de se expressarem em tecidos específicos ou em resposta a um determinado estímulo. É possível que sejam os elementos presentes no promotor que definam essa especificidade ou que a expressão das peroxidases esteja dependente do tipo de factores de transcrição que são produzidos nos tecidos ou na resposta a estímulos.

II.4.2.2.6. *Microssatélite presente no intrão 3 de QsPOX1.*

Foi interessante constatar, que a região mais variável nas peroxidases da classe III, corresponde ao segmento do quarto exão no gene *QsPOX1* e que, no intrão que antecede este exão está presente a sequência CT, repetida 45 vezes. As sequências repetidas deste tipo são denominadas microssatélites ou SSR (*single sequence repeats*) e normalmente, são as responsáveis pela ocorrência, *in vivo*, de fenómenos de alinhamento incorrecto que ocorrem durante a replicação do DNA (Krawczak e Schmidtke, 1998). Os deslizos no alinhamento ocorrem quando a cadeia de DNA monocatenária que está a servir de molde se enrola na forma de laço e hidrida, temporariamente, na cadeia nascente, devido à presença de motivos repetidos (Figura 108). Este tipo de erros dá origem a mutações pontuais (substituição de 1 pb) ou à inserção ou à eliminação de cópias do motivo repetido, acompanhado das sequências que o flanqueiam (Krawczak e Schmidtke, 1998).

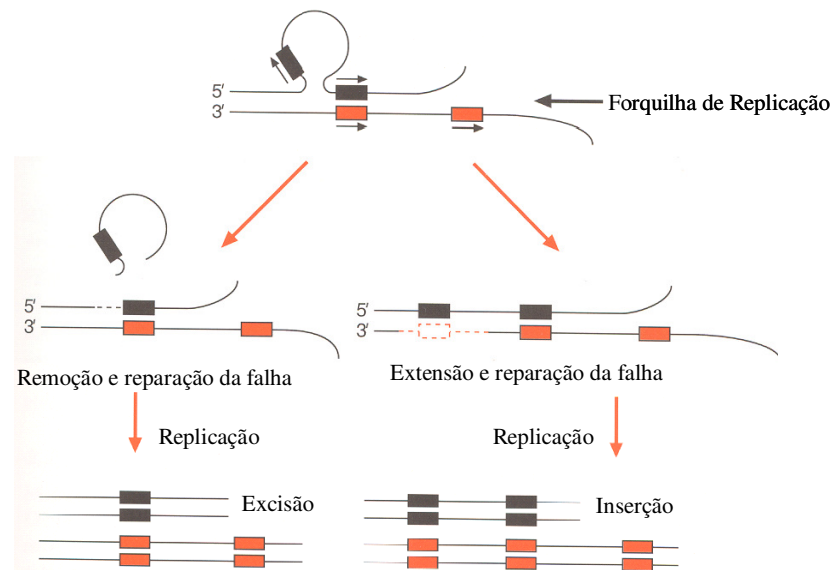


Figura 108. Esquema ilustrativo das mutações que podem ocorrer durante a replicação do DNA devido ao alinhamento incorrecto da cadeia alvo e da cadeia nascente derivado da presença de sequências repetidas (Adaptado do livro DNA Fingerprinting, Krawczak e Schmidtke, 1998).

Estas sequências são, portanto, particularmente instáveis, apresentam índices de mutação 10^{-2} a 10^{-4} por gene e por geração e podem estar na origem do elevado polimorfismo presente nas peroxidases (Streiff, 1998). Em extractos de plantas do arroz

e do tabaco distinguiram-se 25 e 12 peroxidases de classe III, respectivamente, só com base no ponto isoelétrico. A comparação das sequências primárias das POXs que já foram identificadas, mostra que estas enzimas formam famílias dentro de cada espécie, caracterizadas por uma variabilidade elevada, com valores de semelhança entre as isoenzimas que se situam entre 35 % e os 97 %. Os perfis de expressão das isoformas destes genes relaciona-os com múltiplos processos fisiológicos e o leque de peroxidases existente em cada espécie mantém as mesmas características noutras espécies diferentes (Hiraga *et al.*, 2001).

O microssatélite identificado neste gene adquire uma importância ainda maior por estar associado a um gene específico e por ser a sequência do primeiro microssatélite com o motivo CT a ser identificada em *Q. suber*. Normalmente, as sequências repetidas encontram-se em regiões não codificantes do genoma, externas aos intrões e exões (Streiff, 1998). A sua descoberta vai permitir estudar a variabilidade genética deste *locus* em *Q. suber* e determinar os índices de heterozigocidade nas populações, associados a esta peroxidase. Recentemente, em Outubro de 2003, foram registadas por Borges *et al.* no NCBI, seis sequências de microssatélites identificadas em *Q. suber*, com a designação AC1 a AC6 e com os números de identificação AY386128 a AY386132 que correspondem a regiões do genoma com repetições dos motivos AC, CA e TG. Em 2001, Hornero *et al.* testaram, em *Q. suber*, *primers* que permitem amplificar *loci* de microssatélites, identificados em *Q. myrsinifolia*, *Q. petraea* e *Q. robur* e verificaram que, em 54 % dos *loci* estudados, a transferência entre espécies tinha sido bem sucedida.

II.4.2.3. Gene que codifica uma cinamil álcool desidrogenase 2 de *Q. suber* (*QsCAD2*).

II.4.2.3.1. Clonagem de sequências parciais do gene *QsCAD2* de *Q. suber*.

A partir de DNA genómico de *Q. suber* foi amplificado, com os *primers* de sequência heterogénea PCAD2 e PCAD4, um fragmento dum gene que codifica uma potencial cinamil álcool desidrogenase (II.4.2.1.1.). Na sequência deste fragmento definiram-se os *primers* CINAMIL-1 e CINAMIL-2 para amplificar um fragmento correspondente ao cDNA completo do gene *CAD2*, a partir de RNA total extraído das raízes de *Q. suber*. Não houve amplificação com o *primer* CINAMIL-2, concebido para realizar a amplificação na direcção da extremidade 5' do cDNA do gene *QsCAD2*, mas houve amplificação na direcção da extremidade 3' do gene, com o *primer* CINAMIL-1. A sequência do fragmento amplificado, de 760 pb, sobrepõe-se à do fragmento amplificado com os *primers* PCAD2 e PCAD4 (II.4.2.1.1.), na região correspondente ao exão 3, em 60 pb e em 14 pb, no início do exão 4 (Figura 109). A atribuição desta organização baseia-se na comparação com o gene que codifica uma CAD em *Populus balsamífera* (II.4.2.1.1.). As sequências do DNA genómico e do mRNA são idênticas nas regiões em que se sobrepõem, com excepção de 2 nucleótidos na sequência do *primer* de sequência heterogénea, PCAD2 (Figura 110). Supõe-se, portanto, que se trata do mesmo gene. Na caracterização do gene *QsCAD2* será considerada a região codificante do DNA genómico correspondente ao exão 3 e a sequência do cDNA.

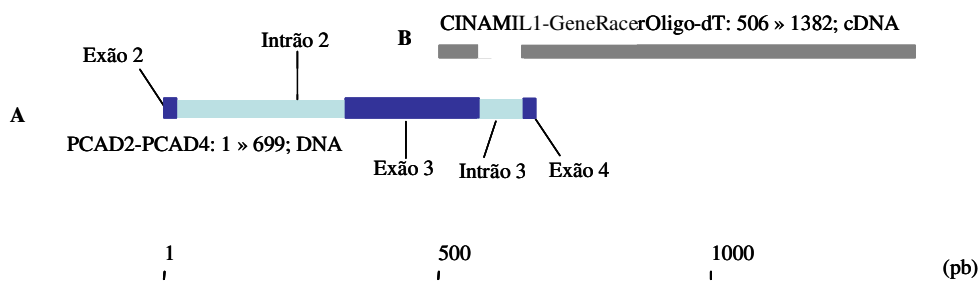


Figura 109. Organização dos fragmentos do gene *QsCAD2* amplificados com os *primers* Pcad2/Pcad4 a partir de DNA genómico (A) e com os *primers* cinamil1/GeneRacerOligo-d(T) a partir de cDNA (B). Sobrepõem-se, nos dois fragmentos, 60 pb localizadas na extremidade 3' do exão 3 e 14 pb no exão 4.

O banco genómico de *Q. suber* foi escrutinado com uma sonda de 630 pb, preparada a partir de DNA genómico, por amplificação com os *primers* específicos PCAD-1R e PCAD-1F (Figura 110), dirigida ao gene *QsCAD2*, mas não foi identificado nenhum clone positivo.

```

» QsCAD2-DNA      (1)  ATTATCCTATGGTTCCTGGgtacatgcaactaaaacacacccccctttctttttcttacttatttt
                PCAD2→                PCAD-1R→
» QsCAD2-DNA      (70)  tttgtagttccggttaatgcccctctattttagaaaagtttttataagaaatataatattgtcgaat
» QsCAD2-DNA      (140) aactaattatattttcgctttttcataaaaaaaaaactttctaaaagcagcggttaatgaattcctgtttt
» QsCAD2-DNA      (210) ttatagccatctcctgattctagtcagtgattgggtttcttattttttgtctcagtcctttttcccc
» QsCAD2-DNA      (280) attttgtgcttgccttattaacttttattattttaaattggtgaaaactgaaacagGCATGAAGTGGTG
» QsCAD2-DNA      (350) GGTGAGGTAGTGGAGGTGGGTTCCAGATGTGAGTAAGTTCAGAGCAGGAGACATAGTGGGAGTGGGAGCCA
» QsCAD2-DNA      (420) TTGTTGGATGCTGCAGAAACTGCCATCCATGCAAAAAGGGACATAGAGCAATACTGCAACAAGAAAATTTG
                →CINAMIL-1/CINAMIL-2←
» QsCAD2-cDNA     (1)  TACACTGATGGCAAACCCACCCAAGGAGGCTTTGCTAGCTCCATGGTTGTAGAC
» QsCAD2-DNA      (490) GTCCTATAACGATGTTTACACTGATGGCAAACCCACCCAAGGAGGCTTTGCTAGCTCCATGGTTGTAGAC

» QsCAD2-cDNA     (55)  CAAAAGT-----
» QsCAD2-DNA      (560) CAAAAGTaatctcaactcaaaacaaaaccccttcacatcatatcaaaaaattgatctttcttgc aatta

» QsCAD2-cDNA     (62)  -----TTGTGGTGAAGATACC
» QsCAD2-DNA      (630) aagaaaagatatggatagcaaaaactctaaaatctattttcttttgatttataggtTTGTGGTGA AAAATCC
                PCAD-1F←                PCAD4←
» QsCAD2-cDNA     (78)  AGAAGGGATGGACCCAGAACAGGCAGCACCACTATTGTGTGCAGGAGTGACAGTTTACAGTCCACTGAGT
» QsCAD2-cDNA     (148) CACTTTGGGTGAAGCAGAGTGGGTTGAGAGGAGGGATATTGGGGCTTGGAGGAGTGGGACACATGGGGG
» QsCAD2-cDNA     (218) TGAAGATAGCCAAGGCCATGGGCCACCATGTGACTGTGATAAGCTCTTCTGATAAGAAAAGAGAGGAGGC
» QsCAD2-cDNA     (288) ACTGGACCATCTTGGCGCTGACGAGTACTTGGTTCAGCTCTGATGCCACTAAAATGCAGGAAAAGGCTGAC
» QsCAD2-cDNA     (358) ACACCTGGATTACATCATTGATACTGTGCTGTGTTTCATCCTCTTGAGCCTTACCTTTCTTGTGTAAGC
» QsCAD2-cDNA     (428) TAGATGGGAAGTTGATCTTGATGGGTTTATAACACTCCTCTGCAGTTTCTCACTCCAATGGTTATGCT
» QsCAD2-cDNA     (498) CGGGAGGAAGACAATCACTGGAAGCTTTGTGGAAGTATTACGGAAATAGGGGAGATGCTTGAGTTCTGC
» QsCAD2-cDNA     (568) AAAGAGAAGGCTTGACTTCCATGATTGAAGTCATCAAGATGGACTATGTTAACAAAGCCATTGAAAGGC
» QsCAD2-cDNA     (638) TGGAAAAGAATGATGTTAGATACAGATTCGTAGTGGATGTTGCTGGAAGCAAACCTTGATCAGTGAAAACA
» QsCAD2-cDNA     (708) AAATACACTTTTGAGTGAACCAAGATTCATCCTCTGTGGAAGACATAAACT

```

Figura 110. Alinhamento das seqüências nucleotídicas dos fragmentos de DNA genómico (preto) e cDNA (azul), do gene que codifica uma cinamil álcool desidrogenase em *Q. suber*, designado *QsCAD2*. Identificação dos *primers* de seqüência heterogénea PCAD2/PCAD4 e dos *primers* específicos CINAMIL-1/CINAMIL2, usados para iniciar as amplificações a partir de DNA genómico e de cDNA, respectivamente. Os *primers* PCAD-1F e PCAD-1R delimitam o fragmento de DNA genómico usado como sonda para escrutinar o banco genómico e para analisar a expressão de *QsCAD2* em raízes de *Q. suber* (II.4.2.3.3.). As bases constituintes das seqüências dos intrões 2 e 3 estão escritas com letras minúsculas e as dos exões 2, 3 e 4 com letras maiúsculas.

II.4.2.3.2. Seqüência em aminoácidos deduzida das seqüências de DNA e cDNA de *QsCAD2*.

A cinamil álcool desidrogenase (CAD) catalisa a reacção de redução de hidroxycinamilaldeídos (p-coumaril; coniferil; sinapil) nos álcoois correspondentes, que constituem os monómeros estruturais da lenhina. Nas gimnospérmicas a enzima foi purificada a partir do abeto (*Picea abies*) e do pinheiro (*Pinus taeda*) e mostra preferência pelos substratos p-coumarilaldeído e coniferilaldeído, ao passo que a CAD isolada das angiospérmicas (choupo, eucalipto) apresenta uma preferência específica

pelo sinapilaldeído. Na última década foi dada uma relevância crescente aos estudos relacionados com a CAD, com o objectivo de controlar e manipular a expressão dos genes da via metabólica de monolenhóis e de modificar, dessa forma, a composição e quantidade de lenhina presente nas plantas, através desta enzima. Estes estudos revelaram que em várias espécies de plantas existem duas isoformas de cinamil álcool desidrogenase, designadas por CAD1 e CAD2, cuja identidade nas sequências em aminoácidos, é inferior a 60 % (Anterola e Lewis, 2002; Grima-Pettenati *et al.*, 1994).

Em *Q. suber* foram determinadas duas sequências de cDNA, uma completa e outra parcial, que codificam potencialmente duas cinamil álcool desidrogenases, QsCAD1 e QsCAD2, respectivamente, que apresentam homologia superior a 70 % com as isoenzimas EgCAD1 e EgCAD2, isoladas a partir de *E. gunnii*.

A sequência parcial do cDNA do gene de *Q. suber*, que codifica para uma potencial CAD2 (QsCAD2) possui 760 pb e uma região de leitura aberta que se estende do nucleotídeo 1 ao 702 (Figura 111).

```

      Y T D G K P T Q G G F A S S M V V D Q K F V V
1  TACACTGATGGCAAACCCACCCAAGGAGGCTTTGCTAGCTCCATGGTTGTAGACCAAAAGTTTGTGGTGA
  K I P E G M D P E Q A A P L L C A G V T V Y S P ·
71  AGATAACCAGAAGGGATGGACCCAGAACAGGCAGCACCCTATTGTGTGCAGGAGTGACAGTTTACAGTCC
  · L S H F G L K Q S G L R G G I L G L G G V G H
141  ACTGAGTCACTTTGGGTTGAAGCAGAGTGGGTTGAGAGGAGGGATATTGGGGCTTGGAGGAGTGGGACAC
  M G V K I A K A M G H H V T V I S S S D K K R
211  ATGGGGGTGAAGATAGCCAAGGCCATGGGCCACCATGTGACTGTGATAAGCTCTTCTGATAAGAAAAGAG
  E E A L D H L G A D E Y L V S S D A T K M Q E K ·
281  AGGAGGCACTGGACCATCTTGGCGCTGACGAGTACTTGGTCAGCTCTGATGCCACTAAAAATGCAGGAAAA
  · A D T L D Y I I D T V P V F H P L E P Y L S L
351  GGCTGACACACTGGATTACATCATTGATACTGTGCCTGTGTTTCATCCTCTTGAGCCTTACCTTTCTTTG
  L K L D G K L I L M G V I N T P L Q F L T P M
421  TTGAAGCTAGATGGGAAGTTGATCTTGATGGGTGTTATTAACACTCCTCTGCAGTTTCTCACTCCAATGG
  V M L G R K T I T G S F V G S I T E I G E M L E ·
491  TTATGCTCGGGAGGAAGACAATCACTGGAAGCTTTGTTGGAAGTATTACGGAAATAGGGGAGATGCTTGA
  · F C K E K G L T S M I E V I K M D Y V N K A I
561  GTTCTGCAAAGAGAAGGGCTTGAATCCATGATTGAAGTCATCAAGATGGACTATGTTAACAAGCCATT
  E R L E K N D V R Y R F V V D V A G S K L D Q
631  GAAAGGCTGGAAAAGAATGATGTTAGATACAGATTTCGTAGTGGATGTGCTGGAAGCAAACCTTGATCAGT
  *
701  GAAAACAAAATACACTTTTGAGTGAAACCAAAGATTCCATCCTGTGGAAGACATAAACTA

```

Figura 111. Sequência parcial do cDNA duma cinamil álcool desidrogenase de *Q. suber* e tradução em aminoácidos da região de leitura aberta, deduzida da sequência nucleotídica.

As sequências parciais, em aminoácidos, deduzidas do cDNA e do DNA, foram comparadas com as sequências em aminoácidos de cinamil álcool desidrogenases de *Nicotiana tabacum*, *Populus tremuloides*, *Eucalyptus gunnii* e *Medicago sativa* com as

quais apresentam homologies superiores a 78 %, na região em que se sobrepõem (Figura 112).

EgCAD2 (*Eucalyptus gunnii*) foi classificada como uma álcool desidrogenase de cadeia longa, possuidora de domínios catalíticos e estruturais para ligação do ião zinco. A análise da sequência em aminoácidos revelou que esta enzima é muito conservada entre espécies. A percentagem de identidade desta enzima e de QsCAD2 com cinamil álcool desidrogenases identificadas no tabaco, milho, choupo e alface situa-se entre 75 % e 80 %. No eucalipto, EgCAD2, expressa-se de forma diferencial nos vários órgãos e tecidos, com predomínio para os tecidos onde ocorre lenhificação ou suberização, e utiliza como substratos, especificamente, os três cinamilaldeídos associados à formação da lenhina (Grima-Pettenati *et al.*, 1993).

Considerando como referência a sequência da CAD2 de *E. gunnii*, assinalámos na figura 112 os motivos comuns a estas enzimas, tais como, uma sequência consensual GHEXXGXXXXXGXXV presente entre os aminoácidos 68 e 82, designada por domínio catalítico de ligação do ião zinco e um domínio de ligação ao cofactor NADP com o motivo GXGXXG, presente entre os aminoácidos 188 e 193. Na interacção com o ião zinco, estão envolvidas as cisteínas 47 e 163, conjuntamente com a histidina 69. As cisteínas 100, 103, 106 e 114 foram identificadas como ligandos estruturais do zinco. Na extremidade carboxílica está presente um domínio hidrófobo que contém o motivo SKL, conhecido por funcionar como um sinal peptídico presente nas proteínas que são sintetizadas no citoplasma e que são transportadas, em seguida, para os peroxissomas, atravessando a membrana peroxissómica (Magalhães, 1999).

As enzimas EgCAD1 e QsCAD1 foram comparadas e caracterizadas no ponto II.4.1.2. desta dissertação, no qual foi referido poderem ser proteínas directamente relacionadas com a patogénese, mais especificamente com a inactivação de toxinas produzidas por organismos patogénicos. Em *E. gunnii*, as diferenças entre CAD1 e CAD2 existem ao nível da estrutura primária da proteína e reflectem-se nas propriedades funcionais e bioquímicas. Ao contrário da EgCAD2, a isoenzima EgCAD1 é incapaz de catalisar a redução do sinapilaldeído, mas tem um espectro mais amplo de substratos, porque catalisa benzaldeídos e derivados destes, para além do coniferaldeído e do cinamilaldeído (Grima-Pettenati *et al.*, 1993; Hawkins e Boudet, 1994).

Para além do sobreiro e do eucalipto, também foram identificadas e caracterizadas, na alface (*Medicago sativa*), duas cinamil-álcool-desidrogenases (MsaCAD1 e MsaCAD2). As sequências em aminoácidos de MsaCAD1 e MsaCAD2,

deduzidas dos cDNAs, têm 54 % de semelhança entre si e 25 % e 77 % de semelhança com EgCAD1 e EgCAD2, respectivamente (Brill *et al.*, 1999). É interessante constatar que MsaCAD2 exibe actividade catalítica elevada para substratos precursores da lenhina e que MsaCAD1 tem capacidade para reduzir os substratos derivados do cinamilaldeído e também, aldeídos alifáticos e derivados de benzaldeídos, tal como foi descrito, para EgCAD1 e EgCAD2 (Brill *et al.*, 1999). A semelhança existente entre os pares de proteínas referidas não se restringe, no entanto, à actividade bioquímica, mas parece existir também, ao nível da função que desempenham e no número de cópias dos genes que as codificam, que se prevê, sejam dois ou três (Fellbrich *et al.*, 2000).

		1		70
CAA44216/ <i>N. tabacum</i>	(1)	MGGLEVEKTTIGWAARDPSGVLSPYTYTLRNTGPEDEVKVLYCGLCHTDLHQVKNDLGMSNYPLVPGHE		
AAF43140/ <i>P. tremuloides</i>	(1)	MGSLETERKIVGWAATDSTGHLAPYTYSLRDTGPEVDLIKVISCGLCHTDLHQIKNDLGMSHYPMVPGHE		
P31655/ <i>E. gunnii</i>	(1)	MGSLEKERTTTGWAARDPSGVLSPYTYSLRNTGPEDELYIKVLSGCVGHSDIHQIKNDLGMSHYPMVPGHE		
QsCAD2-DNA/ <i>Q. suber</i>	(1)	-----		HE
QsCAD2-cDNA/ <i>Q. suber</i>	(1)	-----		-----
		71		140
CAA44216/ <i>N. tabacum</i>	(71)	VVGEVVEVGPVDSKFKVGDIVGVGLLVGSCRNCGPCKRDIQYCNKKIWNCDVYTDGKPTQGGFAKSMV		
AAF43140/ <i>P. tremuloides</i>	(71)	VVGEVVEVGSVDVTKFKAGDVVGVGVIVGSCRNCHPCKSELEQYCNKKIWSYNDVYTDGKPTQGGFAESMV		
P31655/ <i>E. gunnii</i>	(71)	VVGEVLEVGSSEVTKYRVGDVGTGLVVGCCRSQSPCNSDQEQYCNKKIWNVNDVYTDGKPTQGGFAGEIV		
QsCAD2-DNA/ <i>Q. suber</i>	(3)	VVGEVVEVGSVDSKFRAGDIVGVGALIVGCCRNCHPCKRDIQYCNKKIWSYNDVYTDGKPTQGGFASSMV		
QsCAD2-cDNA/ <i>Q. suber</i>	(1)	-----		YTDGKPTQGGFASSMV
		141		210
CAA44216/ <i>N. tabacum</i>	(141)	VDQKFVVKIPEGMPEQAAPLLCAGITVYSPLNHFQKQSGLRGGILGLGGVGHMGVKAAMGHHVTVI		
AAF43140/ <i>P. tremuloides</i>	(141)	VDQKFVVRIPDGMSPQAAPLLCAGLTVYSPLKHFGLKQSGLRGGILGLGGVGHMGVKAAMGHHVTVI		
P31655/ <i>E. gunnii</i>	(141)	VGERFVVKIPDGLSEQAAPLMAGVTVYSPLVRFGLKQSGLRGGILGLGGVGHMGVKAAMGHHVTVI		
QsCAD2-DNA/ <i>Q. suber</i>	(73)	VDQK-----		
QsCAD2-cDNA/ <i>Q. suber</i>	(17)	VDQKFVVKIPEGMPEQAAPLLCAGVTVYSPLSHFGLKQSGLRGGILGLGGVGHMGVKAAMGHHVTVI		
		211		280
CAA44216/ <i>N. tabacum</i>	(211)	SSSNKKRQEALEHLGADDYLVSSDIDKMQEASDSDLDYIIDTVPVGHLEPYLSLLKIDGKLLIMGVINTP		
AAF43140/ <i>P. tremuloides</i>	(211)	SSSDKKREAMEHLGADEYLVSSDVESMQAADQLDYIIDTVPVVHPLEPYLSLLKLDGKLLIMGVINTP		
P31655/ <i>E. gunnii</i>	(211)	SSSDKKRTEALEHLGADAYLVSSDENGMKEATDSDLDYIDTIPVHPLEPYLALLKLDGKLLITGVINAP		
QsCAD2-DNA/ <i>Q. suber</i>	(77)	-----		
QsCAD2-cDNA/ <i>Q. suber</i>	(87)	SSSDKKREALEHLGADEYLVSSDATKMQEADTLDYIIDTVPVFHPLEPYLSLLKLDGKLLIMGVINTP		
		281		350
CAA44216/ <i>N. tabacum</i>	(281)	LQFISPMVMLGRKSIITGSFISGMKETEEMLDFCKEKGVTSQIEIVKMDYINTAFERLEKNDVRYRFVVDV		
AAF43140/ <i>P. tremuloides</i>	(281)	LQFVSPMVMLGRKSIITGSFISGMKETEEMLEFCKEKGLASMIIEVIKMDYINTAFERLEKNDVRYRFVVDV		
P31655/ <i>E. gunnii</i>	(281)	LQFISPMVMLGRKSIITGSFISGMKETEEMLEFCKEKGLTSQIEVIKMDYVNTAFERLEKNDVRYRFVVDV		
QsCAD2-DNA/ <i>Q. suber</i>	(77)	-----		
QsCAD2-cDNA/ <i>Q. suber</i>	(157)	LQFLTPMVMLGRKSIITGSFVGSITETIGEMLEFCKEKGLTSMIEVIKMDYVNTAFERLEKNDVRYRFVVDV		
		351		
CAA44216/ <i>N. tabacum</i>	(351)	IGSKLDQ-		
AAF43140/ <i>P. tremuloides</i>	(351)	AGSKLIP-		
P31655/ <i>E. gunnii</i>	(351)	VGSKLD-		
QsCAD2-DNA/ <i>Q. suber</i>	(77)	-----		
QsCAD2-cDNA/ <i>Q. suber</i>	(227)	AGSKLDQ-		

Figura 112. Comparação das sequências em aminoácidos de QsCAD2, deduzidas das sequências do cDNA e do DNA genómico (exão 3), com as sequências de cinamil álcool desidrogenases (CAD2) presentes noutras espécies de plantas, com as quais apresentam homologias elevadas (> 78%). As regiões conservadas que são importantes, em termos funcionais, estão assinaladas da seguinte forma: □-resíduos importantes do local activo para ligação do íão Zn; C-cisteínas identificadas como ligandos estruturais do zinco; **GLGGVG**-domínio de ligação da coenzima; **GHEXXGXXXXXGXXV**-região responsável pela ligação do Zn; **SKL**-sinal peptídico de enzimas que são transportadas para os peroxissomas. (Brill *et al.*, 1999; Grima-Pettenati *et al.*, 1993).

Brill *et al.*, 1999 examinaram a relação de *MsaCAD1* e *MsaCAD2* com o sistema de defesa das plantas, por medição dos níveis de mRNA acumulado nas folhas após traumatismo físico (ferida; lesão) ou tratamento com ácido salicílico (SA). Verificaram que o nível de expressão basal de *MsaCAD1* é superior ao de *MsaCAD2* e que a expressão de ambas atinge o valor máximo após 4 horas de ter sido provocada a lesão. Foi observado que, 2 horas após a lesão, o nível de mRNA de *MsaCAD1* acumulado nas folhas sofre uma diminuição para valores inferiores aos basais (instante 0). A aplicação de SA, isoladamente, não provocou qualquer alteração na expressão dos genes, mas, combinado com traumatismo físico, reflectiu-se numa diminuição do tempo necessário (2 h) para atingir o valor de expressão máximo, obtido no caso de lesão, para ambas as enzimas. Nestas condições não parece haver diferença na função a atribuir a *MsaCAD1* e *MsaCAD2*, no entanto, não foi testada a expressão destes genes na presença de agentes patogénicos ou de substâncias eliciadoras. É provável que a expressão de *MsaCAD1* na presença de substâncias eliciadoras seja diferente da de *MsaCAD2*, porque a sua sequência em aminoácidos apresenta uma homologia elevada com ELI3, uma CAD identificada em *Petroselinum crispum*, comprovadamente relacionada com o sistema de defesa. ELI3 é fortemente activada em células tratadas com o eliciador Pep25, um oligopeptídeo duma proteína de 42 kDa, isolada da parede celular de *Phytophthora sojae* (Logemann *et al.*, 1997). ELI3, tal como *MsaCAD1* e *EgCAD1*, possui um largo espectro de substratos e é capaz de reduzir de forma eficiente cinamil aldeídos e benzil aldeídos utilizando NADPH como cofactor.

II.4.2.3.3. Expressão do gene *QsCAD2* em raízes de *Q. suber*.

Em *Q. suber*, a expressão de *QsCAD2* foi analisada por RT-PCR e hibridação, com uma sonda específica marcada com digoxigenina, a partir de RNA total extraído de raízes não infectadas e de raízes que estiveram em contacto com micélio de *P. cinnamomi*, durante 24 horas. A sonda, com 630 pb, foi preparada por amplificação com os primers PCAD-1R e PCAD-1F, a partir de DNA genómico, e reconhece um fragmento de cDNA do gene *QsCAD2* com tamanho superior a 800 pb que se estende, desde a posição do primer CINAMIL1, até à região de poliadeninas em 3'. A região de complementaridade entre a sonda e o cDNA de *QsCAD2* é de 61 pb correspondentes ao exão 3 do gene. A quantidade de transcritos disponível para a transcrição reversa e para

ser amplificado, parece ser menor nas raízes infectadas do que nas não infectadas, relativamente aos ensaios das diluições de 1:50 e de 1:100, verificando-se o inverso na diluição de 1:200 (Figura 113A, B e C). Estes resultados podem não corresponder à realidade no que diz respeito, especificamente, ao gene *QsCAD2*, porque houve amplificação doutros fragmentos, para além daquele cuja expressão se pretendia analisar. Os produtos amplificados, após a transcrição reversa, foram separados por electroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio, antes da transferência para a membrana e hibridação com a sonda específica para *QsCAD2* marcada com digoxigenina. No gel de agarose observam-se fragmentos amplificados de tamanho inferior ao fragmento reconhecido pela sonda, constatando-se que a quantidade de amplificações não específicas é muito superior nas raízes infectadas do que nas raízes não infectadas (Figura 113A). Estas amplificações não específicas podem ter proveniência em genes codificantes doutras isoformas de *QsCAD2*, induzidas após a infecção e que são reconhecidas pelo *primer* usado na amplificação. A absorvência do sinal emitido após detecção com a sonda é influenciada negativamente pela amplificação que antecede a hibridação (Figura 113B e C). O decréscimo gradual da absorvência que se observa com o aumento da diluição, nas amostras de cDNA obtido a partir de raízes não infectadas, reflete a diminuição do número de transcritos de *QsCAD2* disponíveis para serem amplificados e confirma que, o que se observa nas raízes infectadas resulta de amplificações não específicas (Figura 113B e C). Para diluições mais elevadas (1:200), as amplificações não específicas são um factor menos significativo. Os resultados não permitem concluir que *QsCAD2* codifica uma cinamil álcool desidrogenase, que seria induzida durante a interacção com *P. cinnamomi*.

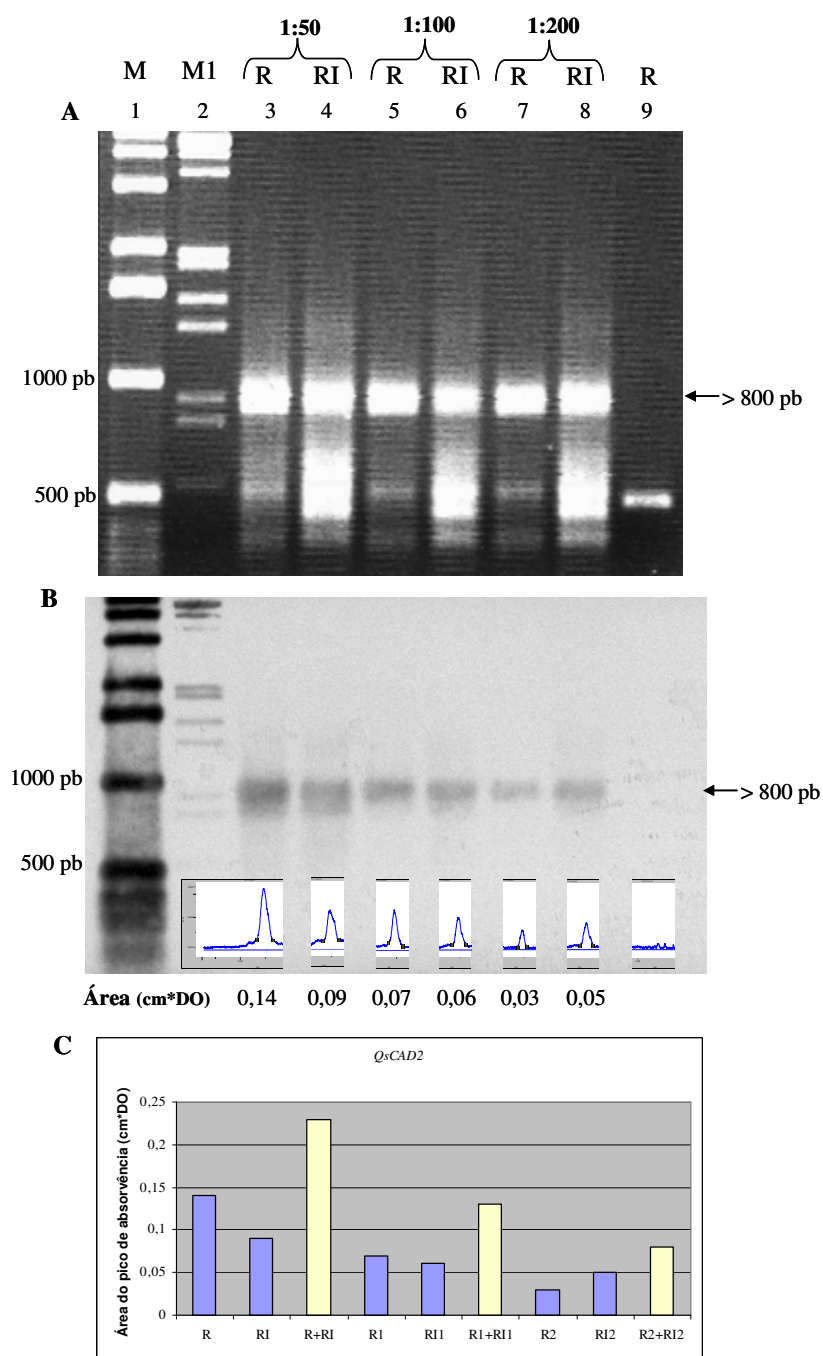


Figura 113. Expressão de *QsCAD2*, analisada por RT-PCR e hibridação, a partir de RNA total extraído de raízes de *Q. suber* não infectadas (R) e de raízes que estiveram em contacto com micélio de *P. cinnamomi*, durante 24 horas (RI). O fragmento de cDNA amplificado e detectado pela sonda específica, marcada com digoxigenina, tem tamanho superior a 800 pb, de acordo com a sequência nucleotídica do gene.

A: Separação dos produtos RT/PCR, por electroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, das amostras de cDNA diluídas de 1:50, 1:100 e 1:200.

B: Imagem da película *X-ray* após hibridação com a sonda; visualização dos picos de absorvência resultantes da medição, por densitometria, do sinal de hibridação e valores da área delimitada pelos mesmos.

C: Gráfico de barras com os valores da absorvência medidos como indicado em B relativos às diluições 1:50 (R e RI), 1:100 (R1 e RI1) e 1:200 (R2 e RI2). Indicação do valor de absorvência total, calculado para cada uma das diluições.

II.4.2.3.4. Análise filogenética de cinamil álcool desidrogenases.

O gene isolado em *Q. suber* codifica, provavelmente, uma cinamil álcool desidrogenase envolvida na lenhificação ou suberização devido à elevada homologia observada entre a sequência em aminoácidos de QsCAD2 e as sequências de CADs2, presentes noutras espécies.

Para validar esta hipótese foi feita uma análise de grupos (*Neighbor-joining method*) e construída uma árvore filogenética com sequências em aminoácidos de cinamil álcool desidrogenases já identificadas. As cinamil álcool desidrogenases aparecem divididas em três grupos, A, B e C (Figura 114). Esta separação é concordante, com a obtida num estudo realizado por Lynch *et al.* (2002), dedicado à caracterização de sequências homólogas de três genes que codificam três cinamil álcool desidrogenases, em *Lolium perenne* L.. A árvore filogenética construída no trabalho referido, inclui 35 sequências de aminoácidos de CADs de várias espécies e foi elaborada, tendo como referência, a álcool desidrogenase de fígado de cavalo (HADH; ID: AAA30931) (Lynch *et al.*, 2002; Danielsson *et al.*, 1994).

No grupo A estão agrupadas as CADs potencialmente implicadas na lenhificação e/ou suberização e que utilizam especificamente, como substratos, coumarilaldeído, sinapilaldeído e coniferilaldeído (Selman-Housein *et al.*, 1999). A QsCAD2 integra este grupo, conjuntamente com MsaCAD2 e EgCAD2, que foram as duas CADs mais referidas na sua caracterização. QsCAD2 forma um subgrupo com uma cinamil álcool desidrogenase de *Populus tremuloides*.

O grupo B forma, provavelmente, a classe de CADs cuja expressão é induzida por moléculas eliciadoras libertadas por fungos patogénicos ou bactérias, em interações incompatíveis. Fazem parte deste grupo ELI3 e MsaCAD1. Estas enzimas apresentam como característica principal aceitarem um espectro de substratos mais diversificado do que as CADs do grupo A, tais como, derivados de cinamil aldeídos e de benzil aldeídos. As proteínas deste grupo retêm em comum com as do grupo A, os domínios característicos da função de desidrogenase de substratos com função aldeído.

No grupo C figuram as proteínas que têm uma homologia superior a 50 % com VR-ERE, uma enzima envolvida na desactivação de toxinas do tipo da eutipina, também capaz de reduzir cinamil aldeídos e benzil aldeídos. Uma das hipóteses formuladas neste trabalho é que, EgCAD1, MdCAD1, QsCAD1, QrCAD1 e AtCAD3

formam um grupo de proteínas que divergiu das CADs envolvidas na lenhificação e ou suberização. Provavelmente, são enzimas cuja expressão é induzida em reacções de compatibilidade, com manifestação de sintomatologia da doença ou não, contrariamente ao que acontece com o tipo de interacção em que estão envolvidas as CADs do grupo B. As sequências primária e secundária destas enzimas divergem das do grupo A e B e a sua classificação como CADs está associada à capacidade que possuem para reduzir substratos com função aldeído, tal como as CADs dos grupos A e B. O seu espectro de substratos é diversificado, como as do grupo B, não obstante darem mostras de ter evoluído num processo de especialização em determinadas substâncias tais como, toxinas, para as quais deverão apresentar um potencial catalítico mais elevado.

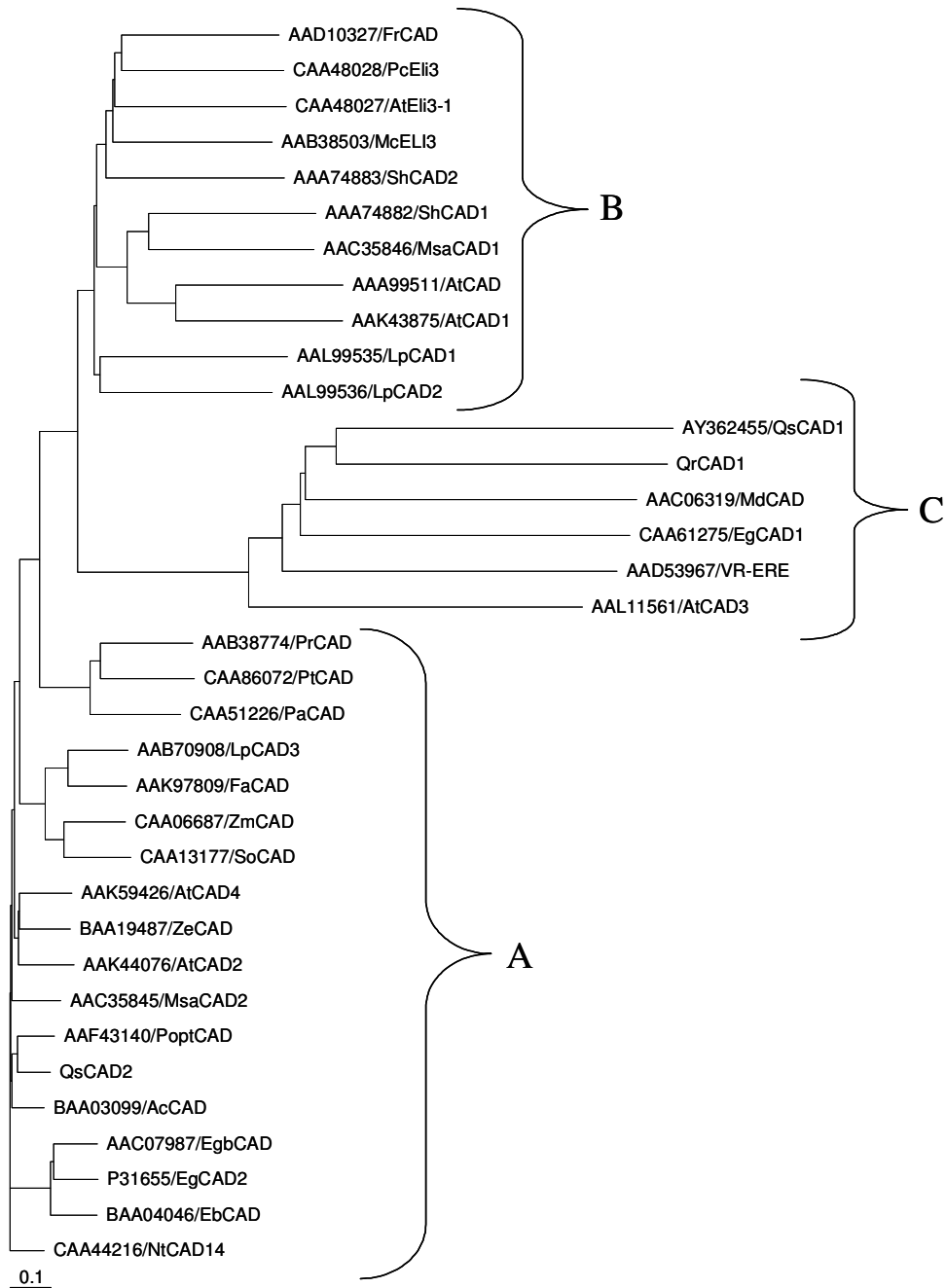


Figura 114: Árvore filogenética construída com sequências em aminoácidos de CADs (cinamil álcool desidrogenase) de plantas presentes no GenBank. Foi incluído no alinhamento a enzima VR-ERE (*Vigna radiata eutypine-reducing enzyme*). Os números de identificação dos genes estão referidos na figura. As CADs pertencem às seguintes espécies de plantas: *Pinus radiata* (PrCAD); *Pinus taeda* (PtCAD); *Picea abies* (PaCAD); *Lolium perenne* (LpCAD1, LpCAD2, LpCAD3); *Festuca arundinacea* (FaCAD); *Zea mays* (ZmCAD); *Saccharum officinarum* (SoCAD); *Arabidopsis thaliana* (AtCAD, AtCAD1, AtCAD2, AtCAD3, AtCAD4; AtEli3-1); *Zinnia elegans* (ZeCAD); *Medicago sativa* (MsaCAD1, MsaCAD2); *Populus tremuloides* (PoptCAD); *Aralia cordata* (AcCAD); *Eucalyptus globulus* (EgbCAD); *Eucalyptus gunnii* (EgCAD1, EgCAD2); *Eucalyptus botryoides* (EbCAD); *Nicotiana tabacum* (NtCAD14); *Stylosanthes humilis* (ShCAD1, ShCAD2); *Mesembryanthemum crystallinum* (McELI3); *Fragaria x ananassa* (FrCAD); *Petroselinum crispum* (PcEli3); *Malus domestica* (MdCAD); *Quercus suber* (QsCAD1; QsCAD2); *Quercus rotundifolia* (QrCAD1); *Vigna radiata* (VR-ERE).

II.4.2.4. Gene que codifica uma fenilalanina amónia liase de *Q. suber* (*QsPAL*).

II.4.2.4.1. Clonagem do mRNA transcrito do gene *QsPAL* de *Q. suber*.

A fenilalanina amónia liase (PAL) catalisa o primeiro passo no metabolismo dos fenilpropanóides que consiste na desaminação da *L*-fenilalanina para formar o *trans*-ácido cinâmico. O ácido cinâmico e derivados deste ácido são usados posteriormente na biossíntese de um grande número de compostos naturais tais como, flavonóides, ácido salicílico, lenhina, suberina e ácidos hidroxicinâmicos, associados à parede celular (Anterola *and* Lewis, 2002). Alguns autores têm defendido que a actividade deste gene é importante na regulação do fluxo metabólico das várias vias que compõem o metabolismo de fenilpropanóides e que a actividade da enzima é regulada ao nível da transcrição (Gray-Mitsumune *et al.*, 1999). A função atribuída é concordante com o perfil de expressão dos genes PAL. Estes genes expressam-se em vários tecidos, em momentos diferentes do desenvolvimento da planta e em resposta a estímulos tais como, traumatismo (Kumar e Knowles, 2003), infecção por agentes patogénicos (Sherwood *and* Berg, 1991), factores de avirulência (Dorey *et al.*, 1999) e radiação UV (Wu e Hahlbrock, 1992).

Os mecanismos moleculares, subjacentes às interacções entre substâncias eliciadoras produzidas pelos fungos e as células do hospedeiro, simulam os aspectos envolvidos na resposta de defesa promovida pelo hospedeiro, durante a infecção. A activação destes mecanismos por parte do hospedeiro é regulada no espaço e no tempo e as respostas de defesa por parte da planta, incluem: 1) reconhecimento do agente patogénico; 2) transdução do sinal; 3) execução dos programas de defesa. A morte celular no local de infecção, a produção em grande quantidade de compostos oxigenados muito reactivos, a activação da transcrição dos genes de defesa e posteriormente, indução de SAR (*systemic acquired resistance*), fazem parte desses mecanismos (Kombrink e Somssich, 1995).

A variação da expressão dos genes que codificam para fenilalaninas amónia liases faz parte dos aspectos envolvidos na resposta de defesa e por esse motivo, este gene tornou-se uma referência nos estudos dos sistemas patógeno-hospedeiro, em interacções do tipo compatível ou incompatível. A importância atribuída ao gene *PAL*

na defesa determinou que fosse um dos genes incluídos no estudo da interacção entre *Q. suber* e *P. cinnamomi*.

A primeira sequência dum gene que codifica uma potencial PAL em *Q. suber* foi obtida com os *primers* de sequência heterogénea PPAL4 e PPAL5 (II.4.2.1.3.) a partir de DNA genómico. No fragmento obtido, seleccionaram-se os *primers* específicos PAL-C1 e PAL-1R para amplificar o cDNA do gene, sintetizado a partir de mRNA de raízes de *Q. suber* infectadas com *P. cinnamomi*. Foram amplificados dois fragmentos, por RACE-PCR, com 1164 pb e 2499 pb, iniciados nos *primers* PAL-C1 e PAL-1R, respectivamente. Estes fragmentos sobrepõem-se entre si e com o fragmento de DNA obtido por PCR utilizando os *primers* PPAL4 e PPAL5, em 450 pb (Figura 115). O cDNA completo tem 2499 pb e integra uma região de leitura aberta com 2130 pb que codifica uma potencial fenilalanina amónia liase com 710 aminoácidos (Figura 116). O gene que está na origem deste transcrito denominou-se *QsPAL* (AY443341) e a proteína deduzida, QsPAL. O banco genómico de *Q. suber* foi escrutinado com uma sonda de 460 pb, preparada por amplificação com os *primers* PAL-1F e PAL-1R, dirigida ao gene *QsPAL*, mas não foi identificado nenhum clone positivo.

A sequência em aminoácidos de QsPAL apresenta uma homologia de 87 % com uma PAL de *Populus balsamifera* subsp. *trichocarpa* x *Populus deltóides* (ID: AAQ74878) e com uma PAL de *Manihot esculenta* (ID: AAK62030). As regiões mais conservadas entre a proteína deduzida de *QsPAL* e as duas PAL referidas, pode visualizar-se através do alinhamento efectuado com recurso ao programa *ClustalW* (Figura 117).

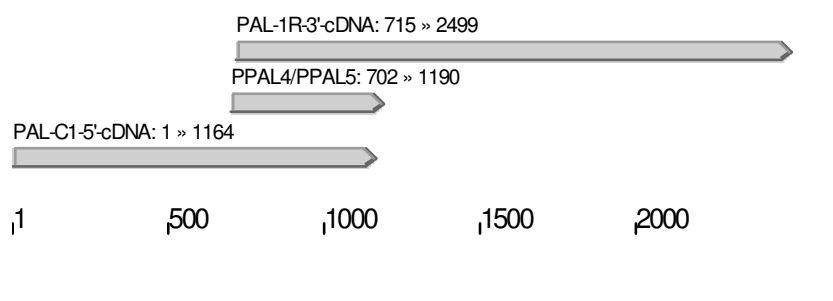


Figura 115 Esquema que ilustra a sobreposição das três sequências nucleotídicas dos fragmentos do gene *QsPAL* obtidos por PCR utilizando os *primers* PPAL4 e PPAL5 e por RACE-PCR dirigido para a região 5' e 3' do gene.

```

1   TCGACTGGAG ACGAGGACAC TGACATGGGA CTGAAGGAGT AGAAAAGGAA TATTTTCGCT CTCACAAAGC
71  TTGAAAATTT CCGCAACACT ATTTTTTGTC TCATTGTTTT CCATCCTTAG CCATTTCATG CACTGTTGAT
141 CAGTTTTTAT CATCTGGGTC ATTGAGAAAA ATTTGACATT AAATTCCTTA AGAGTTTTTA GTGTGTTGTA
1   M E Y C N G N G S S V N S C K S S .
211 TTCATTTTCT TTCTAAAAAC AATGGAGTAT TGCAATGGAA ATGGCTCATC AGTTAACTCT TGCAAGAGCA
18  . D P L N W G L A A E G L K G S H L D E V K R M .
281 GTGACCCATT GAACCTGGGG TTAGCTGCTG AGGGGCTCAA AGGGAGCCAC CTTGATGAGG TGAAGCGCAT
41  . V D E F R K P L V K P G G K S L T I A Q V A A
351 GGTGATGAG TTTCGTAAGC CACTGGTTAA GCCAGGGGGT AAGAGCTTGA CCATAGCTCA AGTGGCTGCA
64  I A S Q D G A I K V E L A E E A R A G V K A S S .
421 ATTGCTAGCC AAGATGGTGC GATCAAGGTG GAGTAGCTG AGGAAAGCTCG GGCTGGGGTT AAGGCCAGCA
88  . D W V M G S M D K G K D S Y G V T T G F G A T .
491 GTGATTGGGT CATGGGCAGC ATGGACAAA GCAAGGACAG TTATGGTGTG ACCACTGGTT TTGGTGCAAC
111 . S H R R T K Q G G A L Q R E L I R F L N A G I
561 CTGCGCATAG AGGACCAAGC AAGGTGGGGC CCTTCAAAGA GAGCTTATTA GATTCTTGA TGTCTGATC
134 F G N G T E S C H T L P H T A T R A A M L V R I .
631 TTTGGCAATG GCATGAATC ATGCCACACA TTACCTCACA CGGCGACTCG TGCCGCCATG TTGGTGAGGA
158 . N T L L Q G Y S G I R F E I M E A I T K F L N .
701 TCAACACCCT CCTCCAAGT TACTCAGGCA TCAGATTGA AATCATGGAA GCCATCACCA AGTTTCTCAA
181 . H N I T P C L P L R G T I T A S G D L V P L S
771 CCACAACATT ACTCCATGCT TGCCACTCCG GGTACCATC ACTGCATCG GCGACCTGTT TCCTCTATCT
204 Y I A G L L T G R P N S K A V G P N G E S L D A .
841 TACATTGCTG GACTTTTAAC AGGCAGACCC AATTCCAAGG CTGTTGGGCC CAATGGAGAG TCTCTAGACG
228 . T K A F E L A G I D G G F F E L Q P K E G L A .
911 CCACCAAGGC CTTTGAATTA GCAGGGATTG ATGGTGGGTT TTTTGAATTA CAACCCAAG AGGGTCTAGC
251 . L V N G T A V G S G L A S M V L F E A N V Q A
981 ACTAGTGAAT GGCAGTGCAG TTGGTCTGG CCTAGCTTCC ATGGTTCTTT TTGAGGCCAA CGTACAAGCT
274 V F A E V L S A I F A E V M Q G K P E F T D H L .
1051 GTTTTTGCTG AAGTTTTATC AGCAATTTTT GCCGAAGTGA TGCAAGGAAA GCCCGAATTT ACAGACCATT
298 . T H K L K H H P G Q I E A A A I M E H I L D G .
1121 TGACACATAA ATTGAAGCAC CATCTGGGCC AAATTGAGGC AGCAGCTATA ATGGAACACA TTTTATAGTG
321 . S A Y I K A A Q K L H E I D P L Q K P K Q D R
1191 AAGTGCTTAT ATTAAGCAG CCCAAAAGTT GCATGAGATT GATCCTCTTC AGAAGCCTAA ACAAGATCGT
344 Y A L R T S P Q W L G P Q I E V I R T A T K M I .
1261 TATGCCCTTA GAACCTCTCC ACAATGGCTT GGCCACAAA TTGAAGTTAT CAGGACAGCA ACCAAGATGA
368 . E R E I N S V N D N P L I D V A R N K A L H G .
1331 TTGAGAGGGA GATTAAGTGC GTGAATGATA ACCCATTGAT TGATGTTGCA AGGAACAAGG CTCTACATGG
391 . G N F Q G T P I G V S M D N T R L A I A S V G
1401 TGTTAACTTC CAAGGGACCC CAATTGGTGT TTCTATGGAT AACACACGTC TAGCCATTGC TTCAGTTGGC
414 K L M F A Q F S K L V N D Y Y N N G L P S N L T .
1471 AAATAATGT TTGCTCAATT TTCAAAGCTT GTCAATGACT ATTACAACAA TGGATTGCCT TCAAACTCA
438 . A S R N P S L D Y G F K G A E I A M A S Y C S .
1541 CAGCAAGCCG CAATCCAAGT TTGATTATG GTTTCAAAGG TGCAAGAGAT GCAATGGCAT CTACTGCTC
461 . E L Q F L A N P V T N H V Q S A E Q H N Q D V
1611 AGAACTCCAA TTCTTAGCCA ATCCTGTAC CAACCATGTC CAAAGTCCGG AGCAACATAA CCAAGATGTA
484 N S L G L I S S R K T A E A V D I L K L M S T T .
1681 AACTCTTTGG GGTGATTTC CTCAAGAAAG ACAGCTGAGG CTGTGGACAT ATTGAAGCTC ATGTCAACCA
508 . F L V A L C Q A V D L R H M E E N L K N T V K .
1751 CTTTCTTAGT TGCAATATGC CAAGCTGTG ATTTAAGGCA TATGGAGGAG AACTTGAAGA ACATGTGCAA
531 . N T V S Q V A K R V L T M G S N G E L H P S R
1821 GAACACAGTC AGTCAAGTGG CCAAAGAGT CCTAACCATG GGCTCAAATG GTGAGCTTCA CCCATCCAGG
554 F C E K D L L K V V N R E Y V F A Y I D D P C S .
1891 TTCTGTGAAA AAGACTTGCT CAAAGTTGTT AACAGAGAGT ACGTTTTTGC ATACATTGAT GACCCCTGCA
578 . A T Y P L M Q K L R Q V L V E H A L N N G D K .
1961 GTGCAACCTA TCCATTAATG CAAAAGCTGA GGCAAGTCCCT GGTGAGCAT GCTTTGAACA ATGGCGACAA
601 . E T N L S T S I F Q K I G A F E E E L K T L L
2031 AGAGACCAAC TTGAGCACTT CAATTTTCCA AAAGATTGGA GCTTTTGAGG AGGAGCTTAA GACCCTTTTG
624 P K E V E G A R I E I E N G K A A I P N P I K E .
2101 CCCAAAGAAG TAGAGGGCCG AAGGATAGAA ATTGAGAAATG GGAAAGCAGC AATTCCTAAC CCAATTAAGG
648 . C R S Y P L Y R F V R E E L G T S L L T G E R .
2171 AGTGCAGGTC GTACCCACTA TACAGGTTTG TGAGAGAAGA ACTGGGAACA AGTTTACTAA CTGGCGAGAG
671 . I R S P G E E F D K V F S A M C A G K L I D P
2241 AATTCGATCA CCTGGTGAAG AATTCGATAA GGTATTCTCA GCAATGTGCG CAGGGAAGTT GATTGATCCT
694 L L D C L K E W N G A P L P I N *
2311 TTGCTGGATT GTCTGAAGGA GTGGAATGGT GCTCCTCTTC CTATAAATTA AGATGCTTTA ATTTGTTACA
2381 TTTAAATTGT TATTGTTTCA ATCGTTTTTT TTTTAAATG CTTATTGTCA ATGTACTCTG TATATGTAAT
2451 ATCAAACCTG CTATGCTAGC CGTTTGTGTT TTTGTTCTTA TATAATAAT

```

Figura 116. Sequência nucleotídica do cDNA do gene que codifica uma potencial fenilalanina amônia liase em *Q. suber* e sequência em aminoácidos da proteína deduzida. Os *primers* PAL-1R e PAL-C1, usados para iniciar as amplificações a partir de cDNA, por RACE-PCR, estão localizados nas posições 715 a 734 e 1144 a 1163; as sequências estão sublinhadas. Os *primers* PAL-1R e PAL-1F (sublinhado duplo) delimitam o fragmento usado como sonda para escrutinar o banco genómico e para analisar a expressão de *QsPAL* em raízes de *Q. suber*.

		1	70
M. esculenta	(1)	MEFCEAH-NVTASPGFSSADPLNWGMAAESLKGSHLDEVKRMVDEYRKPVVRLLGGETLTIAGVTAIANHND	
QsPAL	(1)	MEYCNG--NGSSVNSCKSSDPLNWGLAAELKGSGLDEVKRMVDEFRKPLVLPKGGKSLTIIAQVAIAISQD	
P. bals x P. del	(1)	MEFCQDSRNGNGSLGFNTDPLNWGMAAESLKGSHLDEVKRMIEEYRKPVVKLGGETLTIAGVTAIASRD	
Consensus	(1)	MEFCNA NGSAS GF SADPLNWGMAAESLKGSHLDEVKRMVDEYRKPVVKLGGETLTIAGVTAIAS D	
		71	140
M. esculenta	(70)	SGVKVELSEEARAGVKASSDWMVDSMKNKTD SYGVTTGFGATSHRRTKQGGALQRELIRFLNAGIFGNQ	
QsPAL	(69)	GATKVELAEARAGVKASSDWMVDSMKNKTD SYGVTTGFGATSHRRTKQGGALQRELIRFLNAGIFGNQ	
P. bals x P. del	(71)	VGVMVELSEEARAGVKASSDWMVDSMKNKTD SYGVTTGFGATSHRRTKQGGALQRELIRFLNAGIFGNQ	
Consensus	(71)	GVKVELSEEARAGVKASSDWMVDSM KGTDSYGVTTGFGATSHRRTKQGGALQRELIRFLNAGIFGNQ	
		141	210
M. esculenta	(140)	ESCHTISHTATRAAMLVRIINTLLQGYSGIRFEILEAITKFLNNVTPRLPLRGITITASGDVPLPSYIAGL	
QsPAL	(139)	ESCHTIPHTATRAAMLVRIINTLLQGYSGIRFEILEAITKFLNNVTPRLPLRGITITASGDVPLPSYIAGL	
P. bals x P. del	(141)	ESHTLPRSATRAAMLVRIINTLLQGYSGIRFEILEAITKFLNNVTPRLPLRGITITASGDVPLPSYIAGL	
Consensus	(141)	ESCHTIPHTATRAAMLVRIINTLLQGYSGIRFEILEAITKFLNNVTPRLPLRGITITASGDVPLPSYIAGL	
		211	280
M. esculenta	(210)	LTGRPNKSLGPNGESIDAAAEKLAGINGGFFELQPK EGLALVNGTAVGSGGLASMLVFEANVLAVLSEV	
QsPAL	(209)	LTGRPNKAVGPNGESIDATKAFELAGIDGGFFELQPK EGLALVNGTAVGSGGLASMLVFEANVAVFAEV	
P. bals x P. del	(211)	LTGRPNKAVGPNGESIDAAAEKLAGINGGFFELQPK EGLALVNGTAVGSGGLASMLVFEANVLAVLSEV	
Consensus	(211)	LTGRPNKAVGPNGESLDAAEAF LAGIDGGFFELQPK EGLALVNGTAVGSGGLASMLVFEANVLAVLSEV	
		281	350
M. esculenta	(280)	LSAIFAEVMLGKPEFTDHLTHKHKHPGQIEAAAIMEHVLDGSSYIKAAQKLVHEIDPLQPKQDRYALRT	
QsPAL	(279)	LSAIFAEVMQGKPEFTDHLTHKHKHPGQIEAAAIMEHILDGSAIYKAAQKLVHEIDPLQPKQDRYALRT	
P. bals x P. del	(281)	LSAIFAEVMQGKPEFTDHLTHKHKHPGQIEAAAIMEHILDGSAIYKAAQKLVHEIDPLQPKQDRYALRT	
Consensus	(281)	LSAIFAEVMQGKPEFTDHLTHKHKHPGQIEAAAIMEHILDGSAIYKAAQKLVHEIDPLQPKQDRYALRT	
		351	420
M. esculenta	(350)	SPQWLGPQIEVIRTATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVSMNDTRLAIASIGKLMFA	
QsPAL	(349)	SPQWLGPQIEVIRTATKMIEREINSVNDNPLIDVARNKALHGGNFQGTPIGVSMNDTRLAIASVGLMFA	
P. bals x P. del	(351)	SPQWLGPLIEVIRTSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVSMNDTRLAIASIGKLMFA	
Consensus	(351)	SPQWLGPQIEVIRTATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVSMNDTRLAIASIGKLMFA	
		421	490
M. esculenta	(420)	QFSELVNDFYNNGLPSNLTGGRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGL	
QsPAL	(419)	QFSKLVNDYNNGLPSNLASRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGL	
P. bals x P. del	(421)	QFSELVNDFYNNGLPSNLTGGRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGL	
Consensus	(421)	QFSELVNDFYNNGLPSNLTGGRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGL	
		491	560
M. esculenta	(490)	ISSRKTAEAVDILKLMSTYLVALCQAVDLRHIEENLKNTVKNTVSQVAKRVLTMGNGELHPSRFCEKD	
QsPAL	(489)	ISSRKTAEAVDILKLMSTLFLVALCQAVDLRHMEENLKNTVKNTVSQVAKRVLTMGNGELHPSRFCEKD	
P. bals x P. del	(491)	ISSRKTAEAVDILKLMSTLFLVGLCQAVDLRHIEENLKNTVKNTVSQVAKRVLTMGNGELHPSRFCEKD	
Consensus	(491)	ISSRKTAEAVDILKLMSTLFLVALCQAVDLRHIEENLKNTVKNTVSQVAKRVLTMG NGELHPSRFCEKD	
		561	630
M. esculenta	(560)	LLKVVDRREYVYAVDDPCSATYPLMQKLRQVLVDHAMNGEKEKNSSTISIFQKIGAFEEELKTLLPKEVE	
QsPAL	(559)	LLKVVNREYVYAVDDPCSATYPLMQKLRQVLVEHALNNGDKETNLSSTISIFQKIGAFEEELKTLLPKEVE	
P. bals x P. del	(561)	LLKVVDRREYVFSYVDDPCSATYPLMQKLRQVLVEHALVNGEREINSSSTISIFQKIGSFEELKTLLPKEVE	
Consensus	(561)	LLKVVDRREYVYAVYVDDPCSATYPLMQKLRQVLVEHALMNGEKEKNSSTISIFQKIGAFEEELKTLLPKEVE	
		631	700
M. esculenta	(630)	SARTEYENGPAISNKIKECRSYPLYKRVREELGCSLLTGEKIRSPGEEFDKVFSAICAGKLIDPLLECL	
QsPAL	(629)	GARIEYENGKAATPNPIKECRSYPLYKRVREELGTSLLTGERIRSPGEEFDKVFSAICAGKLIDPLLECL	
P. bals x P. del	(631)	SARLEVENGPAIPNRKIKECRSYPLYKRVREELGTSLLTGEKVKSPGEEFDKVFSAICAGKLIDPLLECL	
Consensus	(631)	SARIEIENGPAIPNKIKECRSYPLYKRVREELGTSLLTGEKIRSPGEEFDKVFSAICAGKLIDPLLECL	
		701	712
M. esculenta	(700)	KEWNGAPLPIC-	
QsPAL	(699)	KEWNGAPLPIN-	
P. bals x P. del	(701)	KEWDGAPLPIC-	
Consensus	(701)	KEWNGAPLPIC	

Figura 117. Alinhamento entre a sequência da proteína deduzida de *QsPAL* e sequências das fenilalaninas amónia liases de *Populus balsamifera* subsp. *trichocarpa* x *Populus deltóides* (ID: AAQ74878) e *Manihot esculenta* (ID: AAK62030).

II.4.2.4.2. Expressão do gene *QsPAL* em raízes de *Q. suber*.

A expressão do gene *QsPAL* foi analisada por RT-PCR e hibridação, com uma sonda específica, a partir de RNA total extraído de raízes de *Q. suber* não infectadas e de raízes que estiveram em contacto com o micélio de *P. cinnamomi*, durante 24 horas. O objectivo foi avaliar a existência de indução da expressão de *QsPAL*, após 24 horas de interacção entre o hospedeiro e o agente patogénico, através da determinação semi-quantitativa do mRNA acumulado nas raízes. Uma sonda preparada por PCR com os *primers* PAL-1F e PAL-1R, a partir de DNA genómico, com 460 pb, reconhece um fragmento de cDNA com 1837 pb do gene *QsPAL* e que se estende, desde a posição 715, até à região de poliadeninas em 3'. Como se pode observar na figura 118A, o sinal de hibridação com o cDNA derivado das raízes não infectadas não decresce continuamente com o aumento da diluição, verificando-se um aumento da absorvência na diluição de 1:100, relativamente à diluição de 1:50 e em seguida, um decréscimo na diluição de 1:200 para valores inferiores aos verificados na diluição de 1:50. Estes resultados indicam que ocorreu, provavelmente, um erro de manipulação, na amplificação da amostra de cDNA relativa à diluição de 1:100 e, por isso, serão apenas considerados para a discussão, os resultados relativos às diluições do cDNA de 1:50 e 1:200. No gráfico de barras B (Figura 118B) pode-se observar que o número de transcritos disponíveis para amplificação, após transcrição *in vitro*, é maior nas amostras das raízes infectadas do que nas amostras das raízes não infectadas, para as diluições 1:50 e 1:200. A percentagem relativa de mRNA é portanto, superior nas amostras de raízes que estiveram em contacto com o fungo durante 24 horas, o que leva a supor que *QsPAL* seja um dos genes, cuja transcrição é induzida durante a interacção com *P. cinnamomi*.

A presença dum maior número de transcritos do gene *QsPAL* nas raízes infectadas, confirma que houve activação do sistema de defesa em *Q. suber* com indução provável, da transcrição de genes relacionados com a patogénese. Estes resultados estão de acordo com a presença de necroses nas raízes de *Q. suber*, visíveis após 24 horas de contacto com *P. cinnamomi*, resultantes duma resposta hipersensível por parte do hospedeiro, típica de interacções incompatíveis ou da acção de toxinas. Prevê-se que nas interacções incompatíveis, os mecanismos de defesa sejam iniciados por substâncias eliciadoras, produzidas pelos fungos ou outros agentes patogénicos, que

são reconhecidas pelo hospedeiro ou por substâncias endógenas, que resultam da infecção (Knogge, 1996).

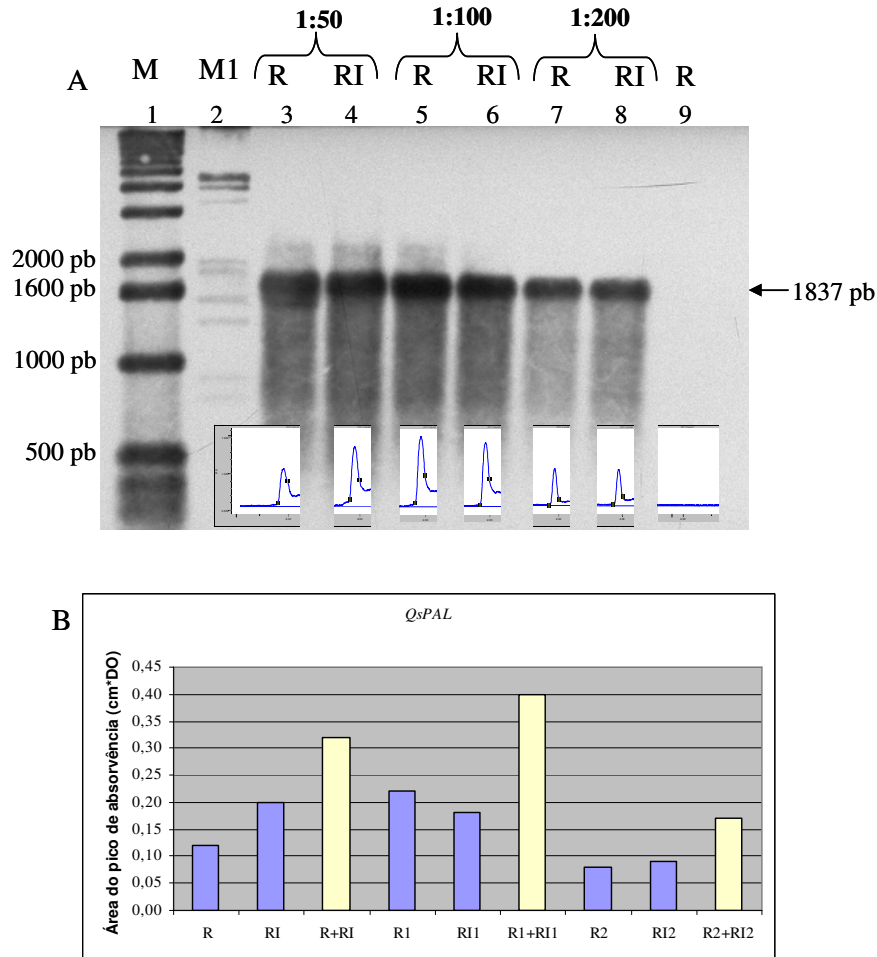


Figura 118. A: Hibridação do fragmento amplificado de cDNA do gene *QsPAL*, obtido a partir RNA total de raízes infectadas e não infectadas com *P. cinnamomi*, com uma sonda específica marcada com digoxigenina. A reacção de amplificação foi realizada com diluições do cDNA de 1:50, 1:100 e 1:200 que resultaram da transcrição do mRNA acumulado nas raízes de *Q. suber* não infectadas (R) e nas raízes infectadas com *P. cinnamomi* (RI). Os picos de absorvência resultantes da medição da intensidade do sinal de hibridação por densitometria estão representados na base dos canais. M e M1 são marcadores de massa molecular. O canal 9 corresponde ao fragmento amplificado do gene da actina não reconhecido pela sonda.

B: Gráfico de barras com os valores das áreas delimitadas pelos picos de absorvência medidos nas amostras das diluições 1:50 (R e RI), 1:100 (R1 e RI1) e 1:200 (R2 e RI2).

Todas as espécies de *Phytophthora*, com excepção para *P. parasitica* var. *nicotianae*, segregam elicinas, capazes de induzir respostas de defesa em *Nicotiana tabacum*, que incluem, morte celular na forma de resposta hipersensível, produção de compostos oxigenados muito reactivos e activação da transcrição de genes relacionados

com a patogénese (Ponchet *et al.*, 1999). Em *P. cinnamomi* já foram identificados quatro genes, organizados na forma de *cluster*, que codificam para elicinas básicas e acídicas (Duclos *et al.*, 1998), mas não existem ainda, evidências experimentais que importem a estas proteínas, de pequena massa molecular, a responsabilidade da potencial resposta hipersensível que se observa no sobreiro.

As alterações celulares que decorrem em células expostas a eliciadores, estejam eles associados a fragmentos do micélio do fungo ou sejam moléculas bem definidas, como as elicinas, tem sido muito explorada nos últimos anos em culturas de células vegetais. Em células do tabaco, foi avaliada a intensidade das respostas de defesa e o tempo que decorria até à sua indução, após tratamento com substâncias solúveis em água e libertadas por acção do calor do micélio de *Phytophthora nicotianae*. A síntese de fitoalexinas começou a ser detectada 3-4 horas após eliciação e atingiu valores máximos passadas 20-28 horas. A deposição de lenhina nas paredes celulares foi detectada 4 horas após eliciação. A síntese deste polímero atingiu valores máximos entre as 12 e 96 horas (Oelofse e Dubery, 1996). A acumulação de lenhina ou de compostos do tipo da lenhina nos tecidos das plantas pode limitar a progressão da infecção. Alguns autores defendem que a deposição de lenhina, assim como a formação de ligações cruzadas com hidratos de carbono e proteínas, a ocorrer durante a lenhificação, interfere com a hidrólise enzimática e com a penetração mecânica, operada pelos fungos nos tecidos das plantas. A lenhificação pode impedir, também, o movimento de água e solutos entre a planta e o fungo (Bruce e West, 1989). A produção de fitoalexinas e a acumulação de mRNA do gene *PAL* foi analisada em culturas celulares de *Petroselinum crispum*, como resposta aos eliciadores Pep-25, um peptídeo derivado duma proteína de 42 kDa da parede celular de *P. sojae* e Pp, um eliciador preparado com fragmentos das paredes celulares de *P. parasitica*. Tal como foi referido para o sistema tabaco/*P. nicotianae*, os eliciadores Pep-25 e Pp provocam um aumento linear da produção e segregação de fitoalexinas nas culturas celulares de *Pe. crispum*, entre 10 e 30 horas após a adição dos eliciadores. O RNA total extraído das células de *Pe. crispum*, após eliciação durante 3 horas com Pep-25 e Pp, foi separado por electroforese em gel de agarose, transferido para membranas e hibridado com uma sonda complementar ao mRNA que codifica para PAL2. A intensidade do sinal, obtido após eliciação, indica que os dois eliciadores induzem a expressão da fenilalanina amónia liase (Fellbrich *et al.*, 2000).

A via de transdução do sinal que leva à activação da transcrição de genes, induzidos por eliciadores, integra alterações rápidas e transitórias da permeabilidade da membrana plasmática aos iões cálcio, potássio, hidrogénio e cloro e fosforilação e desfosforilação de proteínas específicas. Nürnberger *et al.* (1994) investigaram qual o efeito da entrada de cálcio nas células de *Pe. crispum*, após eliciação com Pep-25, nomeadamente se Ca^{2+} era necessário para a activação da transcrição dos genes de defesa e subsequente biossíntese de fitoalexinas. Estes autores verificaram que não há acumulação do mRNA que codifica uma fenilalanina amónia liase, após adição do eliciador, na ausência do ião cálcio no meio de cultura das células. A omissão do ião cálcio inibe a activação da síntese de fitoalexinas, mas não tem interferência na ligação dos eliciadores aos potenciais receptores membranares, sugerindo que os procedimentos que ocorrem depois da percepção do eliciador são dependentes do influxo de Ca^{2+} .

Sasabe *et al.* (2000) investigaram o envolvimento dos compostos oxigenados muito reactivos e a expressão de genes de defesa, na via de transdução de sinal que dá origem à resposta hipersensível das células do tabaco, quando são expostas à elicítina INF1, segregada por *P. infestans*. Esta elicítina induz nas células do tabaco, a acumulação rápida de H_2O_2 e a expressão de PAL, após 1 hora e 3 horas de tratamento. Os autores usaram inibidores químicos das vias de transdução de sinal e verificaram que as vias associadas à morte celular, à produção de espécies oxigenadas e à expressão de genes de defesa, se tornam independentes, para cada um destes tipos de resposta de defesa, logo nos primeiros estágios da interacção que se seguem ao reconhecimento da elicítina pelas células do tabaco. A morte celular requer proteases serínicas, Ca^{2+} e quinases; a produção de espécies oxigenadas não é necessária nem suficiente para induzir morte celular ou expressão do gene *PAL*; a via requerida para induzir a expressão do gene *PAL* envolve quinases (Sasabe *et al.*, 2000).

A fosforilação de proteínas parece estar implicada na regulação das respostas de defesa provocadas por eliciadores, incluindo as elicítinas (Yu, 1995). A parasiticeína e a criptogeína induzem, em suspensões de células do tabaco, a activação rápida (10 min) de uma quinase com 48 kDa, a alcalinização do meio e o aumento da expressão do gene *PAL*, quase em paralelo. A activação da quinase mantém-se com valores elevados durante 4 horas e decresce com a morte celular que ocorre na resposta hipersensível, aproximadamente 8 horas após exposição ao eliciador. Para além desta quinase, as elicítinas activam mais duas quinases, com 44 kDa e 40 kDa, num momento próximo da morte celular. A activação da primeira quinase depende da fosforilação de resíduos de

tirosina e não da activação dum gene, não havendo, portanto, variação dos níveis de mRNA ou de proteína nas células. O tamanho e o tipo de substratos que é catalisado pela quinase com 48 kDa indica tratar-se duma quinase induzida por ácido salicílico que foi recentemente purificada e clonada tendo-se mostrado que pertence à família MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). A utilização de inibidores de quinases suprime a alcalinização do meio e a activação do gene *PAL*, o que sugere que a quinase identificada, está relacionada com a activação da transcrição de genes, que nas plantas estão relacionados com a defesa (Zhang, S. *et al.*, 1998).

Num trabalho recente, ficou comprovado que *Q. suber* era hospedeiro de *P. cinnamomi* (Marcelino, 2001), mas não ficou esclarecido se o tipo de interacção que ocorria entre o agente patogénico e o hospedeiro era do tipo compatível ou incompatível. A morte celular causada pelo agente patogénico nos tecidos das raízes, após 24 horas de contacto, pode ter como causa o reconhecimento das elicinas produzidas por *P. cinnamomi*, com indução de uma resposta hipersensível ou pode ser o resultado da acção de toxinas ou ambas. *P. cinnamomi* pode produzir factores de avirulência e factores de virulência, em simultâneo, durante a infecção. As diferenças observadas nas respostas de defesa podem residir no genótipo do hospedeiro. Estudos citológicos revelaram que a morte celular associada à resposta hipersensível e a morte celular induzida por toxinas, têm características comuns, que incluem a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA (Wang *et al.*, 1996; Ryerson e Heath, 1996).

O aumento da expressão do gene *QsPAL*, durante a interacção entre *Q. suber* e *P. cinnamomi*, reflete a existência duma resposta de defesa por parte do hospedeiro, mas não esclarece acerca do tipo de interacção, porque a expressão destes genes é induzida em interacções susceptíveis e em resistentes.

Em 1992, Joos e Hahlbrock estudaram duas isoformas da fenilalanina amónia liase (*PAL1* e *PAL2*) na planta da batata (*Solanum tuberosum* L. cv. *Datura*). Pretendiam observar em que órgãos da planta havia maior abundância do mRNA destes genes e, também, analisar a sua expressão em interacções compatíveis e incompatíveis com *P. infestans*. Globalmente, a percentagem de mRNA de *PAL1* e *PAL2*, acumulado nas folhas, é maior nas interacções compatíveis do que nas incompatíveis. *PAL1* é estimulado de forma rápida e transitória, 10 horas após inoculação com *P. infestans*, durante a interacção compatível. Na interacção incompatível, o valor mais elevado de mRNA de *PAL1* ocorre, após, aproximadamente, 18 horas. Após 24 horas de interacção, o mRNA de *PAL1* acumulado nas folhas infectadas com a estirpe virulenta ou com a

estirpe avirulenta é apenas 10-20 % superior ao medido no controlo. A quantidade de mRNA de *PAL2* aumenta nas primeiras 19 horas, nos dois tipos de interacção e mantém-se com valores elevados posteriormente, apenas na interacção compatível. O mRNA da fenilalanina amónia liase é mais abundante nos ramos e nas raízes e os valores observados nas folhas, após estimulação com o fungo, são inferiores aos observados naqueles órgãos (Joos e Hahlbrock, 1992).

Um dos aspectos interessantes da indução dos genes relacionados com a patogénese é o de não ser restrita às células onde ocorre morte celular, mas, alastrar para as células adjacentes, imediatamente circundantes. Este fenómeno só acontece, no entanto, se ocorrer morte celular no local de acção dos eliciadores ou dos agentes patogénicos. Quando a acção do fungo ou a quantidade de eliciador aplicada não provocam uma resposta hipersensível, não existe activação dos genes relacionados com a patogénese, para além do local da interacção (Dorey *et al.*, 1997; Costet *et al.*, 1999).

II.5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.

A interacção entre *Q. suber* e *P. cinnamomi* apresenta aspectos de interacção compatível e incompatível. Nas primeiras 24 horas de infecção, o fungo induz a expressão de genes potencialmente relacionados com a desactivação de factores de virulência (como por exemplo, toxinas) e com a resposta a factores de avirulência (AVR). Neste estudo foram identificados vários genes de *Q. suber* cuja expressão é induzida após a infecção, o que foi comprovado pela acumulação de mRNA nas células das raízes. Com base na homologia existente entre a sequência em aminoácidos deduzida destes genes e a de proteínas já caracterizadas noutras espécies, é possível conceber um modelo hipotético que ilustre os acontecimentos iniciais da interacção entre o fungo e o hospedeiro (Figura 119).

Assim, propõe-se que *P. cinnamomi* invade as células do hospedeiro com destruição da parede celular e segrega factores de virulência do tipo da eutipina, um composto derivado do benzaldeído, sintetizado pelo micélio de *Eutipa lata*, o agente patogénico causador do declínio da vinha. À semelhança do que se observa durante a interacção *Eutipa lata/Vitis vinifera*, na árvore, a toxina migraria através do floema por difusão passiva desde as raízes até às folhas da copa dos sobreiros, acumular-se-ia no citoplasma das células e inibiria alguma enzima interveniente em alguma via metabólica essencial. A suposição de que *P. cinnamomi* segrega factores de virulência baseia-se na identificação, em *Q. suber*, do cDNA do gene *QsCAD1* que codifica uma potencial cinamil álcool desidrogenase, dependente de NAD/NADPH. A sequência em aminoácidos, deduzida de *QsCAD1*, apresenta uma homologia superior a 68 % com a VR-ERE, uma eutipina redutase que usa como cofactor NAD/NADPH e é capaz de reduzir a toxina eutipina em eutipinol, uma substância não tóxica para as células. A manifestação da doença do declínio nalguns sobreiros, sob a forma de morte súbita, poderá estar relacionada com a produção duma proteína homóloga de *QsCAD1*, incapaz de reduzir a toxina. No presente estudo, foi identificado um fragmento polimórfico deste gene, num sobreiro com fenótipo de morte súbita, que poderá corresponder a um potencial marcador de susceptibilidade a esta forma da doença.

O isolamento e caracterização estrutural da hipotética toxina de *P. cinnamomi*, seguida da sua síntese química, teriam grande interesse para estudar bioquimicamente a

proteína recombinante QsCAD1 e fazer ensaios de toxicidade em plantas lenhosas. Guillén *et al.* (1998) prepararam anticorpos policlonais contra VR-ERE, que distinguem, por *Western blot*, a VR-ERE produzida por uma espécie resistente ao fungo duma proteína homóloga produzida por uma espécie susceptível. A utilização destes anticorpos para identificar QsCAD1, a partir de extractos proteicos de raízes e folhas de sobreiros que sofrem morte súbita e de sobreiros que sofrem de declínio lento, pode ajudar a comprovar que a proteína codificada pelo gene correspondente ao fragmento polimórfico, identificado nos sobreiros que sofrem morte súbita, está na origem deste fenótipo da doença do declínio.

O gene *QsCAD1* deve ser encarado com um potencial marcador de resistência básica à infecção por *P. cinnamomi*.

Se o sobreiro possuir um mecanismo de desactivação da toxina, inicia-se um processo de resistência, desencadeado pelo reconhecimento dos factores de avirulência produzidos por *P. cinnamomi*, que poderão ser as elicinas. Deste processo fazem parte o reconhecimento dos factores de avirulência e a transdução de sinal, a produção de espécies oxigenadas activas (AOS) e a morte celular na forma de resposta hipersensível. Todos estes mecanismos de defesa estão dependentes da activação de factores de transcrição que vão interagir directamente com motivos presentes nos promotores dos genes relacionados com a patogénese e com o metabolismo de fenilpropanóides, regulando a sua expressão.

Os factores de avirulência segregados por *P. cinnamomi* devem ser reconhecidos pelo domínio LRR da proteína de resistência (deduzida do cDNA do gene *QsRPC*) localizado no lado externo da membrana plasmática das células. A interacção LRR-AVR será transmitida ao domínio NBS (*nucleotide binding site*) intracelular que, por sua vez, deve hidrolisar ATP e activar as proteínas que estão associadas a este domínio e ao domínio CC (*coiled coil*) da extremidade amínica. O reconhecimento do factor de avirulência vai desencadear a fosforilação de proteínas em cadeia, como o canal de cálcio e de polipeptídeos envolvidos em reacções de transmissão de sinal. O influxo de cálcio promove a activação de várias proteínas associadas à membrana plasmática (canal do ião cloreto; NADPH oxidase) e pode contribuir para a activação do canal de potássio e inibição duma H⁺-ATPase, tal como foi observado com a criptogéina em células do tabaco. A entrada de cálcio também poderá activar, em série, quinases dependentes de cálcio.

Uma das proteínas que, provavelmente, interage com o domínio NBS de QsR_{Pc} é o produto do gene *QsRSH*. Este gene codifica para uma proteína potencial do tipo RelA/SpoT, com capacidade para sintetizar (p)ppGpp, que se supõe ter nas plantas função de cofactor de transcrição, que é rapidamente activado. A regulação, ao nível da transcrição de genes relacionados com a patogénese ou com outros processos metabólicos, como a morte celular programada que está na origem da resposta hipersensível, pode ser mediada por (p)ppGpp.

A activação do complexo NADPH-oxidase, originada pelo influxo de cálcio, cria aniões superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogénio que invadem a célula, provocando uma “explosão oxidativa”. Os radicais livres hidroxilo (OH[•]) são responsáveis pela peroxidação lipídica, danificam o DNA e oxidam as proteínas. A alteração do estado de oxidação-redução das células seria reconhecido pela PDI (*protein disulfide isomerase*), codificada pelo gene *QsPDI* que, em resposta, modificaria o estado de oxidação dos resíduos das suas cisteínas e activaria, por isomerização, factores de transcrição.

Os mecanismos descritos, até agora, indicam a existência de três vias de transmissão de sinal, uma mediada pela proteína de resistência (QsR_{Pc}), outra mediada pela RSH e uma terceira mediada pela PDI. Os factores de transcrição que resultam da transdução de sinal destas três vias independentes regulariam, em simultâneo, a transcrição de genes envolvidos na morte celular, na defesa e no metabolismo de fenilpropanóides. A activação da transcrição do gene *QsPAL* é fundamental para a produção de fitoalexinas, lenhina, suberina e ácido salicílico. O ácido salicílico e o peróxido de hidrogénio funcionam como moléculas mensageiras para activação do sistema de defesa das células adjacentes ao local de infecção. Nessas células, será estimulada a incorporação de compostos fenólicos nas paredes celulares, tornando-as menos permeáveis à invasão por *P. cinnamomi*. A polimerização oxidativa dos fenóis seria catalisada por QsPOX, localizada na parede celular que utilizaria, como receptor final de electrões, o peróxido de hidrogénio produzido pela superóxido dismutase.

Dada a complexidade dos mecanismos envolvidos na resposta de defesa, é possível que o declínio lento no sobreiro esteja dependente da rapidez de reconhecimento dos factores de avirulência e da activação dos mecanismos de defesa. Os sintomas do declínio lento denunciam uma resistência parcial à doença. É provável que cada um dos quatro alelos do gene *QsR_{Pc}* esteja relacionado com a resistência parcial à doença e que seja necessária a acção conjunta de vários genes de resistência

para conferir reconhecimento aos vários factores de avirulência segregados por *P. cinnamomi* durante a infecção.

O silenciamento de cada um dos genes de *Q. suber* que foram identificados em plantas transgénicas de tabaco, pode mostrar quais as vias de transdução de sinal que estão associadas a cada uma das formas de resposta de defesa.

O isolamento de complexos de proteínas em ensaios do tipo *Two-Hybrid*, efectuados com plasmídeos “armadilha”, possuidores dos genes *QsRPs*, *RSH* e *PDI*, permitiria confirmar se *QsRPs* interage com *QsRSH* e permitiria identificar quais as proteínas que interagem com o produto de *QsPDI*, durante a interacção entre *Q. suber* e *P. cinnamomi*.

O sobreiro está em desvantagem em relação ao fungo quanto à aquisição de novas especificidades para o reconhecimento dos factores de avirulência, por ser uma planta lenhosa, com um ciclo de vida longo. Apesar disso, constata-se que alguns povoamentos de sobreiro têm conseguido sobreviver, em parte, a uma destruição massiva provocada por *P. cinnamomi*, tal como a que se tem verificado em florestas de eucalipto, castanheiro e outras espécies de *Quercus*, devido à sua elevada biodiversidade. É de todo o interesse que, no futuro, sejam seleccionados sobreiros que resistam a *P. cinnamomi* mantendo, no entanto, a biodiversidade da espécie. A pressão selectiva exercida sobre o fungo pode ser facilmente ultrapassada pelo agente patogénico, com o aparecimento de novos factores de avirulência que o hospedeiro não reconhece ou pelo silenciamento dos que são reconhecidos.

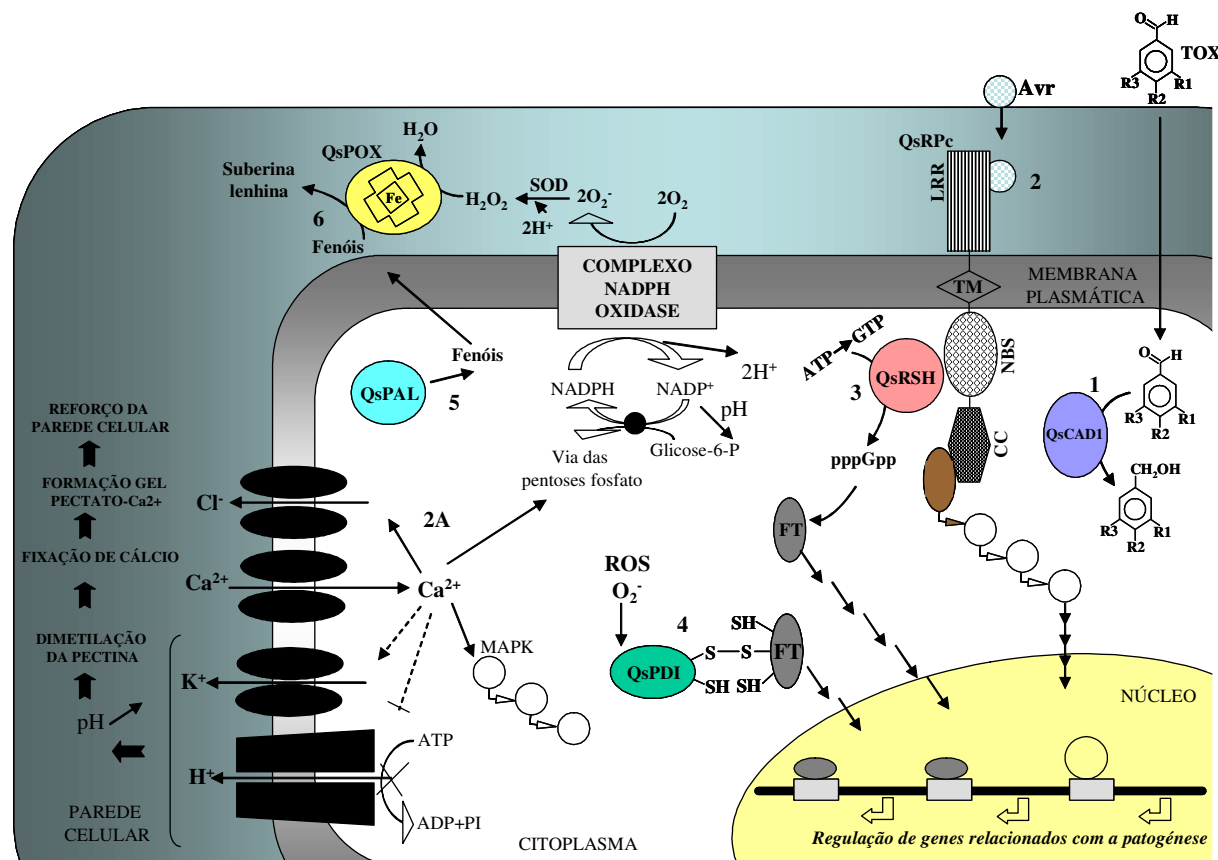


Figura 119. Modelo hipotético que ilustra os acontecimentos iniciais da interação entre *Q. suber* e *P. cinnamomi*.

1. *P. cinnamomi* produz factores de virulência (TOXinas) que atravessam a membrana plasmática e que são desactivados por uma cinamil álcool desidrogenase de *Q. suber*, codificada pelo gene *QsCAD1*. **2.** O domínio LRR do produto do gene de resistência *QsRPs* reconhece os factores de avirulência segregados pelo fungo. Esta interacção é transmitida ao domínio intracelular NBS que hidrolisa ATP e activa proteínas que interagem com este domínio e com o domínio CC da extremidade amínica. **2A.** O reconhecimento do factor de avirulência dá origem a um influxo de cálcio que promove a activação de várias proteínas associadas à membrana plasmática (canal do ião cloreto; NADPH oxidase), pode contribuir para a activação do canal de potássio, inibição dum H^+ -ATPaseA e activação de quinases dependentes de cálcio, em série. **3.** A proteína codificada por *QsRSH* interage com o domínio NBS da proteína de resistência e sintetiza (p)ppGpp que funcionará como cofactor para activação dos factores de transcrição. **4.** A produção de ROS altera o estado de oxidação-redução da célula, que é reconhecido pelo produto do gene *QsPDI* e activa factores de transcrição por isomerização dos resíduos de cisteínas. **5.** Activação de genes do metabolismo de fenilpropanóides como *QsPAL*, que inicia as vias metabólicas de produção de ácido salicílico e de compostos fenólicos. **6.** Polimerização oxidativa dos fenóis na membrana plasmática, catalisada por *QsPOX*, com produção de suberina e lenhina.

III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Aarts, N., Metz, M., Holub, E., Staskawicz, B.J., Daniels, M.J. and Parker, J.E. (1998). Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signalling pathways in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 10306-10311.

Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, **15** (1): 63-78.

Agrios, G.N. (1991). Enfermedades ocasionadas por Phycomycetes. In: *Fitopatologia*. Noriega (Ed.). Editorial Limusa, México, cap. 10, pp. 244-257.

Ajmone-Marsan, P., Valentini, A., Cassandro, M., Vecchiotti-Antaldi, G., Bertoni, G. and Kuiper, M. (1997). AFLP™ markers for DNA fingerprinting in cattle. *Animal Genetics*, **28**: 418-426.

Allen, R.D., Bernier, F., Lessard, P.A. and Beachy, R.N. (1989). Nuclear factors interact with a soybean beta-conglycinin enhancer. *Plant Cell*, **1** (6): 623-631.

Almeida, M.P. (2000). Uma Floresta de Trabalho. In: *Florestas de Portugal*, Direcção Geral das Florestas, Lisboa, 255 pp.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25** (17): 3389-3402.

Anderson, P.A., Lawrence, G.J., Morrish, B.C., Ayliffe, M.A., Finnegan, E.J. and Ellis, J.G. (1997). Inactivation of the flax rust resistance gene *M* associated with loss of a repeated unit within the leucine-rich repeat coding region. *The Plant Cell*, **9**: 641-651.

Anterola, A.M. and Lewis, N.G. (2002). Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry*, **61**: 221-294.

Archer, M., Rodrigues, M. L., Aurélio, M., Biemans, R., Cravador, A. and Carrondo, M. A. (2000). Crystallisation and preliminary X-ray diffraction analysis of β -cinnamomin, an elicitor secreted by the phytopathogenic fungus *Phytophthora cinnamomi*. *Acta Cryst. D* **56**: 363-366.

Arnold, M.L., Bulger, M.R., Burke, J.M., Hempel, A.L. and Williams, J.H. (1999). Natural hybridization: how low can you go and still be important? *Ecology*, **80** (2): 371-381.

Arnold, M.L., Kentner, E.K., Johnston, J.A., Cornman, S. and Bouck, A.C. (2001). Natural hybridisation and fitness. *Taxon*, **50**: 93-104.

Aslund, F. and Beckwith, J. (1999). Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation. *Cell*, **96**: 751-753.

Aurélio, M.T. (1999). "Expressão, purificação e actividade biológica da cinamomina β e de duas proteínas análogas". Relatório de estágio da licenciatura em Bioquímica, Universidade do Algarve, 110 pp.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1990). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.

Bachem, C.W.B., van der Hoeven, R.S., de Bruijn, S.M., Vreugden-Hill, D., Zabeau, M. and Visser, R.G.F. (1996). Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant Journal*, **9** (5): 745-753.

Bachem, C.W.B., Oomen, R.J.F.J. and Visser, R.G.F. (1998). Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol. *Plant Mol. Biol. Reporter*, **16**: 157-173.

Baker, M.E. and Blasco, R. (1992). Expansion of the mammalian 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/plant dihydroflavonol reductase superfamily to include a bacterial cholesterol dehydrogenase, a bacterial UDP-galactose-4-epimerase, and open reading frames in vaccinia virus and fish lymphocystis disease virus. *FEBS LETTERS*, **301** (1): 89-93.

Bakker, E.G., Van Dam, B.C., Van Eck, H.J. and Jacobsen, E. (2001). The description of clones of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. With microsatellites and AFLP in an ancient woodland. *Plant Biol.*, **3**: 616-621.

Baldauf, S.L., Roger, A.J., Wenk-Siefert, I. and Doolittle, W.F. (2000). A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science*, **290**: 972-977.

Baugh, L.R., Hill, A.A., Brown, E.L. and Hunter, C.P. (2001). Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. *Nucleic Acids Res.*, **29** (5): 1-29.

Baumann, K., De Paolis, A., Costantino, P. and Gualberti, G. (1999). The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the rolB oncogene in plants. *Plant Cell*, **11** (3): 323-334.

Belahbib, N., Pemonge, M.-H., Ouassou, A., Sbay, H., Kremer, A. and Petit, R.J. (2001). Frequent cytoplasmic exchanges between oak species that are not closely related: *Quercus suber* and *Q. ilex* in Marocco. *Molecular Ecology*, **10**: 2003-2012.

Bellarosa, R. (2002). Introduction: Brief Synthesis of the Current Knowledge on Cork Oak. In: *Evaluation of genetic resources of cork oak for appropriate use in breeding and gene conservation strategies*, Handbook of the concerted action, European Union funded projects FAIR 1 CT 95-0202 and Micro Action B7/4100. Varela, C. Ed., INIA-EFN, Oeiras, Portugal, 102 pp.

Bellarosa, R., Delre, V., Schirone, B. and Maggini, F. (1990). Ribosomal RNA genes in *Quercus* spp. (*Fagaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, **172**: 127-139.

Bendahmane, A., Kanyuka, K. and Baulcombe, D.C. (1999). The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *The Plant Cell*, **11**: 781-791.

Bernards, M.A. (2002). Demystifying suberin. *Can. J. Bot.*, **80**: 227-240.

Bernards, M.A., Fleming, W.D., Llewellyn, D.B., Priefer, R., Yang, X., Sabatino, A. and Plourde, G.L. (1999). Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiol.*, **121**: 135-145.

Bernards, M.A. and Razem, F.A. (2001). The poly(phenolic) domain of potato suberin: a non-lignin cell wall bio-polymer. *Phytochemistry* **57**: 1115-1122.

Bernards, M.A., Susag, L.M., Bedgar, D.L., Anterola, A.M. and Lewis, N.G. (2000). Induced phenylpropanoid metabolism during suberization and lignification: a comparative analysis. *J. Plant Physiol.*, **157**: 601-607.

Bio-Rad Laboratories. (1988). *Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoresis Transfer Cell Instruction Manual*, BIORAD, U.S.A., 8 pp.

Bittner-Eddy, P.D., Crute, I.R., Holub, E.B. and Beynon, J.L. (2000). RPP13 is a simple locus in *Arabidopsis thaliana* for alleles that specify downy mildew resistance to different avirulence determinants in *Peronospora parasitica*. *The Plant J.*, **21**: 177-188.

Blee, K.A., Jupe, S.C., Richard, G., Zimmerlin, A., Davies, D.R. and Bolwell, G.P. (2001). Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members of the gene family. *Plant Mol. Biol.*, **47**: 607-620.

Blein, J-P. (2002). Involvement of lipid-protein complexes in plant-microorganism interactions. *OCL (Oliagineux Corps Gras Lipides)*, **9**(1): 31-36.

Block, A., Dangl, J.L., Hahlbrock, K. and Schulze-Lefert, P. (1990). Functional borders, genetic fine structure, and distance requirements of cis elements mediating light responsiveness of the parsley chalcone synthase promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 5387-5391.

Boavida, L.C., Silva, J.P. and Feijó, J.A. (2001). Sexual reproduction in the cork oak (*Quercus suber* L). II. Crossing intra- and interspecific barriers. *Sex Plant Reprod*, **14**: 143-152.

Bodenes, C. (1996). Différenciation moléculaire entre chêne sessile *Quercus petraea* (Matt) Liebl. et chêne pédonculé *Quercus robur* L.. *Tese de Doutorado em Biologia Florestal*, Universidade de Bordeaux I.

Bogdanove, A.J. and Martin, G.B. (2000). Avr-Pto-dependent Pto-interacting proteins and AvrPto-interacting proteins in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 8836-8840.

Boissy, G., La Fortelle, E., Kahn, R., Huet, J.-C., Bricogne, G., Pernollet, J.-P. and Brunie, S. (1996). Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure*, **4**(12): 1429-1439.

Bonnet, P., Lacourt, I., Venard, P. and Ricci, P. (1994). Diversity in pathogenicity to tobacco and in elicitor production among isolates of *Phytophthora parasitica*. *J. Phytoathol.*, **141**: 25-37.

Borodovsky, M. and McIninch, J. (1993). GeneMark: parallel gene recognition for both DNA strands. *Computers & chemistry*, **17** (19): 123-133.

Botella, M.A., Quesada, M.A., Hasegawa, P.M. and Valpuesta, V. (1993). Nucleotide sequences of two peroxidase genes from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Physiol.*, **103**: 665-666.

Botella, M.A., Parker, J.E., Frost, L.N., Bittner-Eddy, P.D., Beynon, J.L., Daniels, M.J., Holub, E.B. and Jones, J.D.G. (1998). Three genes of the Arabidopsis

RPP1 complex resistance locus recognize distinct *Peronospora parasitica* avirulence determinants. *The Plant Cell*, **10**: 1847-1860.

Boudet, A.-M. (2000). Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiol. Biochem.*, **38** (1/2): 81-96.

Bourque, S., Ponchet, M., Binet, M-N., Ricci, P., Pugin, A. and Lebrum-Garcia, A. (1998). Comparison of binding properties and early biological effects of elicitors in tobacco cells. *Plant Physiol.*, **118**: 1317-1326.

Bourque, S., Binet, M-N., Ponchet, M., Pugin, A. and Lebrum-Garcia, A. (1999). Characterization of the cryptogein binding sites on plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, **274**(49): 34699-34705.

Bourque, S., Lemoine, R., Sequeira-Legrand, A., Fayolle, L., Delrot, S. and Pugin, A. (2002). The elicitor cryptogein blocks glucose transport in tobacco cells. *Plant Physiology*, **130**: 2177-2187.

Bower, M.S., Matias, D.D., Fernandes-Carvalho, E., Mazzurco, M., Gu, T., Rothstein, S.J. and Goring, D.R. (1996). Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a Brassica S locus receptor kinase. *The Plant Cell*, **8**: 1641-1650.

Brasier, C.M. (1992). Oak tree mortality in Iberia. *Nature*, **360**: 539.

Brasier, C.M., Sobredo, F. and Ferraz, J.F.P. (1993). Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant Pathology*, **42**: 140-145.

Brill, E. M., Abrahams, S., Hayes, C.M., Jenkins, C., L.D. and Watson, J.M. (1999). Molecular characterisation and expression of a wound-inducible cDNA encoding a novel cinnamyl-alcohol dehydrogenase enzyme in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Plant Mol. Biol.*, **41**: 279-291.

Britt, A.B. (1996). DNA damage and repair in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**: 75-100.

Brosch, G., Ransom, R., Lechner, T., Walton, J.D. and Loidl, P. (1995). Inhibition of maize histone deacetylases by HC toxin, the host-selective toxin of *Cochliobolus carbonum*. *The Plant Cell*, **7**: 1941-1950.

Bruce, R.J. and West, C.A. (1989). Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiol.*, **91**: 889-897.

Brummer, M., Arend, M., Fromm, J., Schlenzig, A. and Obwald, F. (2002). Ultrastructural changes and immunocytochemical localization of the elicitor quercinin in *Quercus robur* L. roots infected with *Phytophthora quercina*. *Physiol. and Mol. Plant Path.*, **61**: 109-120.

Buffard, D., Breda, C., van Huystee, R.B., Asemota, O., Pierre, M., Dang Ha, D.B. and Esnault, R. (1990). Molecular cloning of complementary DNAs encoding two cationic peroxidases from cultivated peanut cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 8874-8878.

Burger, W.C. (1975). The species concept in *Quercus*. *Taxon*, **24**(I): 45-50.

Büttner, M. and Singh, K.B. (1997). Arabidopsis thaliana ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 5961-5966.

Cabral, J.M.P., Carvalho, A.H. and Lima, M.B. (1977). Aplicação de métodos de taxonomia numérica na classificação de águas minerais de Portugal Continental. *Comunicações dos Serviços Geológicos de Portugal*, **61**: 343-363.

Cadahia, J.M., Cobos, J.M., Soria, S., Clauser, F., Gellini, R., Grossini, P. and Ferreira, M.C. (1991). Observação de danos em espécies florestais mediterrâneas. *Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação*, Secretaria Geral Técnica e Comissão das Comunidades Europeias.

Caritat, A., Gutiérrez, E. and Molinas, M. (2000). Influence of weather on cork-ring width. *Tree Physiology*, **20**: 893-900.

Carlile, M.J., Watkinson, S.C. and Gooday, G.W. (2001). Parasites and mutualistic symbionts. In: *The Fungi*, 2nd Edition, Academic Press, pp 363-426.

Carpin, S., Crèvecoeur, M., Greppin, H. and Penel, C. (1999). Molecular cloning and tissue-specific expression of an anionic peroxidase in Zucchini. *Plant Physiol.*, **120**: 799-810.

Cashel, M., Gentry, D.R., Hernandez, V.J. and Vinella, D. (1996). The stringent response. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Eds. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.C., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umberger, H.E., American Society for Microbiology Press, Washington, D.C., pp. 1458-1496.

Castresana, C., Garcia-Luque, I., Alonso, E., Malik, V.S. and Cashmore, A.R. (1988). Both positive and negative regulatory elements mediate expression of a photoregulated CAB gene from *Nicotiana plumbaginifolia*. *EMBO J.*, **7**: 1929-1936.

Ceresini, P., Shew, H.D., Vilgalys, R.J. and Cubeta, M.A. (2002). Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco in North Carolina. *Mycologia*, **94** (3): 437-449.

Cervera, M.T., Gusmão, J., Steenackers, M., Peleman, J., Storme, V., Vanden Broeck, A., Van Montagu, M. and Boerjan, W. (1996). Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus*. *Theor. Appl. Genet.*, **93**: 733-737.

Cervera, M.T., Gusmão, J., Steenackers, M., Van Gysel, A., Van Montagu, M. and Boerjan, W. (1996). Application of AFLP-based molecular markers to breeding of *Populus* spp. *Plant Growth Regulation*, **20**: 47-52.

Chaloupková, K. and Smart, C.C. (1994). The abscisic acid induction of a novel peroxidase is antagonized by cytokinin in *Spirodela polyrrhiza* L.. *Plant Physiol.*, **105**: 497-507.

Chappell, J., Levine, A., Tenhaken, R., Lusso, M. and Lamb, C. (1997). Characterization of a diffusible signal capable of inducing defense gene expression in tobacco. *Plant Physiol.*, **113**: 621-629.

Charvet-Candela, V., Hitchin, S., Reddy, M.S., Cournoyer, B., Marmeisse, R. and Gay, G. (2002). Characterization of a *Pinus pinaster* cDNA encoding an auxin up-regulated putative peroxidase in roots. *Tree Physiol.*, **22**: 231-238.

Chen, H. and Vierling, R.A. (2000). Molecular cloning and characterization of soybean peroxidase gene families. *Plant Science*, **150**: 129-137.

Chen, X., Lim, S.H., Wong, S.M., Lee, Y.H., Kuo, J., Yam, T.W. and Lin, J.-J. (1999). Amplified fragment length polymorphism analysis of vandaceous orchids. *Plant Science*, **141**: 183-189.

Cheng, J., Smith-Becker, J. and Keen, N.T. (1998). Genetics of plant-pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biotechnol.*, **9**: 202-207.

Cheong, Y.H., Yoo, C.M., Park, J.M., Ryu, G.R., Goekjian, V.H., Nagao, R.T., Key, J.L., Cho, M.J. and Hong, J.C. (1998). STF1 is a novel TGACG-binding factor with a zinc-finger motif and a bZIP domain which heterodimerizes with GBF proteins. *Plant J.*, **15** (2): 199-209.

Chittoor, J.M., Leach, J.E. and White, F.F. (1999). Induction of peroxidase during defense against pathogens. In: *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*, Eds Datta, S.K. and Muthukrishnan, CCR Press LLC, **8**: 171-193.

Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J. and Kim, S.Y. (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Biol. Chem.*, **275**: 1723-1730.

Christensen, J.H., Overney, S., Rohde, A., Diaz, W.A., Bauw, G., Simon, P., Montagu, M.V. and Boerjan, W. (2001). The syringaldazine-oxidizing peroxidase PXP 3-4 from poplar xylem: cDNA isolation, characterization and expression. *Plant Mol. Biol.*, **47**: 581-593.

Clarke, L. and Carbon, J. (1976). A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**: 91-99.

Coelho, A.C. (1996). Desenvolvimento de um sistema colorimétrico rápido, específico e sensível de identificação de *Phytophthora cinnamomi*. *Dissertação de Mestrado em Química Celular*, UCEH-Universidade do Algarve, 102 pp.

Coelho, A.C., Cravador, A., Bollen, A., Ferraz, J.F.P., Moreira, A.C., Fauconnier, A. and Godfroid, E. (1997). Highly specific and sensitive non-radioactive molecular identification of *Phytophthora cinnamomi*. *Mycological Research*, **101** (12): 1499-1507.

Colas, V., Conrod, S., Venard, P., Harald, K., Ricci, P. and Panabières, F. (2001). Elicitin genes expressed *in vitro* by certain tobacco isolates of *Phytophthora parasitica* are down regulated during compatible interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **14**(3): 326-335.

Collins, N., Drake, J., Ayliffe, M., Sun, Q., Ellis, J., Hulbert, S. and Pryor, T. (1999). Molecular characterization of the Maize Rp1-D rust resistance haplotype and its mutants. *The Plant Cell*, **11**: 1365-1376.

Colrat, S., Latché, A., Guis, M., Pech, J.-C., Bouzayen, M., Fallot, J. and Roustan, J.-P. (1999). Purification and characterization of a NADPH-dependent aldehyde reductase from mung bean that detoxifies eutypine, a toxin from *Eutypa lata*. *Plant Physiology*, **119**: 621-626.

Cooper, B. (2001). Collateral gene expression changes induced by distinct plant viruses during the hypersensitive resistance reaction in *Chenopodium amaranticolor*. *The Plant J.*, **26** (3): 339-349.

Correia, A.V. and Oliveira, A.C. (2002). Principais espécies florestais com interesse para Portugal, Zonas de Influência Mediterrânica. *Estudos e Informação* n^o 318, 2^a Ed., Direcção Geral das Florestas, Lisboa.

Correia, T.P. (1993). Threatened landscape in Alentejo, Portugal: the “montado” and other “agro-silvo-pastoral” systems. *Landscape and Urban Planning*, **24**: 43-48.

Correia, T.P. and Mascarenhas, J. (1999). Contribution to the extensification/intensification debate: new trends in the Portuguese *montado*. *Landscape and Urban Planning*, **46**: 125-131.

Costet, L., Cordelier, S., Dorey, S., Baillieul, F., Fritig, B. and Kauffmann, S. (1999). Relationship between localized acquired resistance (LAR) and the hypersensitive response (HR): HR is necessary for LAR to occur and salicylic acid is not sufficient to trigger LAR. *Mol. Plant Microbe-Interact.*, **12** (8): 655-662.

Cottrell, J.E., Munro, R.C., Tabbener, H.E., Milner, A.D., Forrest, G.I. and Lowe, A.J. (2003). Comparison of fine-scale genetic structure using nuclear microsatellites within two British oakwoods differing in population history. *For. Ecol. and Manage.*, **176**: 287-303.

Courtois, M. and Masson, P. (1999). Relations entre la qualité du liège, sa composition minérale et la composition minérale des feuilles du chêne-liège (*Quercus suber* L.). *Ann. For. Sci.*, **56**: 521-527.

Crandall, K.A. (1996). Identifying links between genotype and phenotype using marker loci and candidate genes. *The impact of plant molecular genetics*, BSW Sobral Edt., Birkhäuser Boston, **8**: 137-157.

Curvelo-Garcia, A.S., Lima, M.B., Spranger-Garcia, M.I. and Coelho, D. (1987). Caracterização analítica de vinhos rosados por aplicação das técnicas de taxonomia numérica. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, **6**: 79-97.

Danielsson, O., Atrian, S., Luque, T., Hjelmqvist, L., González-Duarte, R. and Jörnvall, H. (1994). Fundamental molecular differences between alcohol dehydrogenase classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 4980-4984.

D’Emerico, S., Paciolla, C. and Tommasi, F. (2000). Contribution to the Karyomorphology of some species of the Genus *Quercus*. *Silvae Genetica*, **49** (6): 243-245.

Dennis Lo, Y.M., Mehal, W.Z. and Flaming, K.A. (1990). Incorporation of biotinylated dUTP. In: *PCR protocols: a guide to methods and amplifications*, Academic Press Inc., San Diego, pp: 113-118.

De Lorenzo, G. and Ferrari, S. (2002). Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr. Opin. In Plant Biol.*, **5**: 295-299.

Deslandes, L., Olivier, J., Theulières, F., Hirsch, J., Feng, D.X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J. and Marco, Y. (2002). Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**: 2404-2409.

Deswarte, C., Eychenne, J., Davy de Virville, J., Roustan, J.-P., Moreau, F. and Fallot, J. (1996). Protonophoric activity of Eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, in plant mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **334**: 200-205.

Direcção Geral das Florestas (2001). Inventário Florestal Nacional, 3ª Revisão (1995-1998). *Direcção Geral das Florestas*, Eds, Lisboa, 233 pp.

Ditt, R.F., Nester, E.W. and Comai, L. (2001). Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** (19): 10954-10959.

Dixon, M.S., Jones, D.A., Keddie, J.S., Thomas, C.M., Harrison, K. and Jones, J.D. (1996). The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell*, **84**: 451-459.

Dixon, M.S., Golstein, C., Thomas, C.M., van der Biezen, E.A. and Jones, J.D.G. (2000). Genetic complexity of pathogen perception by plants: the example of *Rcr3*, a tomato gene required specifically by *Cf-2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 8807-8814.

Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Pryor, A. and Ellis, J.G. (2000). Resistance genes and resistance protein function. In: *Molecular Plant Pathology Ann. Plant Rev*, Eds Dickinson, M. and Beynon, J., Sheffield, Academic Press, UK, **4** (4): 88-107.

Donald, R.G. and Cashmore, A.R. (1990). Mutation of either G box or I box sequences profoundly affects expression from the *Arabidopsis rbcS-1A* promoter. *EMBO J.*, **9** (6): 1717-1726.

Dorey, S., Baillieul, F., Pierrel, M-A., Saindrenan, P., Fritig, B. and Kauffmann, S. (1997). Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Plant Microbe-Interact.*, **10** (5): 646-655.

Dorey, S., Kopp, M., Geoffroy, P., Fritig, B. and Kauffmann, S. (1999). Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanina ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. *Plant Physiol.*, **121**: 163-171.

Doyle, E.A. (2000). Structure-function analysis of *Phytophthora parasitica* elicitors. *PhD thesis*. Univ. Calif., Davis.

Duclos, J., Fauconnier, A., Coelho, A.C., Bollen, A., Cravador, A. and Godfroid, E. (1998a). Identification of an elicitor gene cluster in *Phytophthora cinnamomi*. *J. Seq. Mapp.*, **9** (4): 231-237.

Duclos, J., Trincão Aurélio, M., Graça, J., Coelho, A.C., Fauconnier, A., Jacquet, A., Bollen, A., Cravador, A., Biemans, R. and Godfroid, E. (1998b). Identification of an elicitor gene cluster in *Phytophthora cinnamomi* and analysis of the necrotic activity of a purified recombinant beta-cinnamomin. *Proceedings of Twelfth Forum for Applied Biotechnology*, Med.Fac.Landbouww, Univ.Gent, **63/4b**.

Dudareva, N., Cseke, L., Blanc, V.M. and Pichersky, E. (1996). Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel patterns of *S-linalool synthase gene expression in the C. breweri flower*. *Plant Cell*, **8** (7): 1137-1148.

Dubouzet, J.G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E.G., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought, high-salt and cold-responsive gene expression. *Plant J.*, **33** (4): 751-763.

Duguid, J.R., Rohwer, R.G. and Seed, B. (1998). Isolation of cDNAs of Scrapie-modulated RNAs by subtractive hybridization of a cDNA library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 5738-5742.

Edwards, J., Ravassard, P., Icard-Liepkalns, C. and Mallet, J. (1995). cDNA cloning by RT-PCR. In: *PCR 2: A practical approach*. Eds McPherson, M.J., Hames, B.D. and Taylor, G.R., IRL PRESS, Oxford University Press, New York, pp. 111-113.

Elena-Rossello, J.A., Lumaret, R., Cabrera, E. and Michaud, H. (1992). Evidence for hybridization between sympatric holm-oak and cork-oak in Spain based on diagnostic enzyme markers. *Vegetatio*, **99-100**: 115-118.

Elena-Rossello, J.A., Rio, J.M., Garcia Valdecantos, J.L. and Santamaria, I.G. (1993). Ecological aspects of the floral phenology of the cork-oak (*Q. suber* L.): why do annual and biennial biotypes appear? *Ann. Sci. For.*, **50** (S1): 114s-121s.

Elena-Rossello, J.A. and Cabrera, E. (1996). Isozyme variation in natural populations of cork-oak (*Quercus suber* L.). Population structure, diversity, differentiation and gene flow. *Silvae Genetica*, **45**: 229-235.

Elgar, G.S. and Brenner, S. (1992). A novel method for the isolation of large insert DNA from recombinant lambda DNA. *Nucleic Acid Res.*, **20**: 4667.

Elgar, G. (1997). Lambda genomic cloning. In: *Plant Molecular Biology: a laboratory manual*, Ed. Clark, M.S., Springer-Verlag, Berlin, Germany, **I** (2.3): 94-116.

Ellerstrom, M., Stalberg, K., Ezcurra, I. and Rask, L. (1996). Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription. *Plant Mol. Biol.*, **32** (6): 1019-1027.

Ellis, J.G., Lawrence, G.J., Luck, J.E. and Dodds, P.N. (1999). Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene L that determine differences in gene-for-gene specificity. *The Plant Cell*, **11**: 495-506.

Emanuel, J.R. (1991). Simple efficient system for synthesis of nonradioactive nucleic acid hybridization probes using PCR. *Nucleic Acids Res.*, **19**: 2790.

Ezcurra, I., Ellerstrom, M., Wycliffe, P., Stalberg, K. and Rask, L. (1999). Interaction between composite elements in the napA promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. *Plant Mol. Biol.*, **40** (4): 699-709.

Fellbrich, G., Blume, B., Brunner, F., Hirt, H., Kroj, T., Ligterink, W., Romanski, A. and Nürnberger, T. (2000). *Phytophthora parasitica* elicitor-induced reactions in cells of *Petroselinum crispum*. *Plant Cell Physiol.*, **41** (6): 692-701.

Fellbrich, G., Romanski, A., Varet, A., Blume, B., Brunner, F., Engelhardt, S., Felix, G., Kemmerling, B., Krzymowska, M. and Nürnberger, T. (2002). NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and Arabidopsis. *The Plant Journal*, **32**: 1-16.

Ferrari and Söling (1999). The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem. J.*, **339**: 1-10.

Ferreira, A., Lopes, F. and Pereira, H. (2000). Caractérisation de la croissance et de la qualité du liège dans une région de production. *Ann. For. Sci.*, **57**: 187-193.

Ferrier-Cana, E., Geffroy, V., Macadré, C., Creusot, F., Imbert-Bolloré, P., Sévignac, M. and Langin, T. (2003). Characterization of expressed NBS-LRR resistance gene candidates from common bean. *Theor. Appl. Genet.*, **106**: 251-261.

Fineschi, S., Turchini, D., Grossoni, P., Petit, R.J. and Vendramin, G.G. (2002). Chloroplast DNA variation of white oaks in Italy. *For. Ecol. and Manage.*, **156**: 103-114.

Finkeldey, R. and Mátyás, G. (2003). Genetic variation of oaks (*Quercus spp.*) in Switzerland. 3. Lack of impact of postglacial recolonization history on nuclear gene loci. *Theor. Appl. Genet.*, **106**: 346-352.

Flaishman, M.A. and Kolattukudy, P.E. (1994). Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as a signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 6579-6583.

Foster, R., Izawa, T. and Chua, N.H. (1994). Plant bZIP proteins gather at ACGT elements. *FASEB J.*, **8** (2): 192-200.

Frederick, R.D., Thilmony, R.L., Sessa, G. and Gregory, B.M. (1998). Recognition specificity for the bacterial avirulence protein AvrPto is determined by Thr-204 in the activation loop of the tomato Pto kinase. *Molecular Cell*, **2**: 241-245.

Frohman, M. A. (1993). Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal race. *Methods in Enzymology*, **218**: 340-356.

Gassmann, W., Hinsch, M.E. and Staskawicz, B.J. (1999). The *Arabidopsis RPS4* bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease-resistance genes. *The Plant J.*, **20**: 265-277.

Gatehouse, J.A. (1997). Regulation of gene expression in plants. In: *Plant Biochemistry*, Eds Dey, P.M. and Harborne, J.B., Academic Press, San Diego, California, USA, , **9**: 353-381.

GeneMark.hmm (2000). Versão 2.2a. <http://dixie.biology.gatech.edu>

Gilmartin, P.M., Sarokin, L., Memelink, J. and Chua, N-H. (1990). Molecular light switches for plant genes. *The Plant Cell*, **2**: 369-378.

Gion, J.-M., Rech, P., Grima-Pettenati, J., Verhaegen, D. and Plomion, C. (2000). Mapping candidate genes in *Eucalyptus* with emphasis on lignification genes. *Mol. Breeding*, **6**: 441-449.

Goffner, D., Doorselaere, J.V., Yahiaoui, N., Samaj, J., Grima-Pettenati, J. and Boudet, A.M. (1998). A novel aromatic alcohol dehydrogenase in higher plants: molecular cloning and expression. *Plant Mol. Biol.*, **36**: 755-765.

Gouveia, M.E.M. (1993). Doença da tinta do Castanheiro. Avaliação da resistência à *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Tese do Curso de Mestrado em Protecção Integrada*, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.

Gower, J.C. (1966). Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika*, **53**: 325-338.

Gower, J.C. and Ross, G.J.S. (1969). Minimum spanning tree and single-linkage cluster analysis. *Applied Statistics*, **18**: 54-64.

Gower, J.C. (1971). A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics*, **27**: 857-871.

Grant, M.R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R.W. and Dangl, J.L. (1995). Structure of the Arabidopsis RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science*, **269**: 843-846.

Graur, D. and Wen-Hsiung, L. (2000). *Fundamentals of Molecular Evolution*, 2nd edn, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.

Gray-Mitsumune, M., Molitor, E.K., Cukovic, D., Carlson, J.E. and Douglas, C.J. (1999). Developmentally regulated patterns of expression directed by poplar PAL promoters in transgenic tobacco and poplar. *Plant Mol. Biol.*, **39**: 657-669.

Green, P.J., Yong, M-H., Cuzzo, M., Kano-Murakami, Y., Silverstein, P. and Chua, N-H. (1988). Binding site requirements for pea nuclear protein factor GT-1 correlate with sequences required for light-dependent transcriptional activation of the *rbcS-3A* gene. *EMBO J.*, **7**: 4035-4044.

Grima-Pettenati, J., Campargue, C., Boudet, A. and Boudet, A.M. (1994). Purification and characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase isoforms from *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry*, **37** (4): 941-947.

Grima-Pettenati, J., Feuillet, C., Goffner, D., Borderies, G. and Boudet, A.M. (1993). Molecular cloning and expression of a *Eucalyptus gunnii* cDNA clone encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant Mol. Biol.*, **21**: 1085-1095.

Gubler, U. and Hoffmann, B.J. (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* **25** (2-3): 263-269.

Gubler, U. (1988). A one tube reaction for the synthesis of blunt-ended double stranded cDNA. *Nucleic Acids Res.*, **16** (6): 2726.

Guillén, P., Guis, M., Martínez-Reina, G., Colrat, S., Dalmayrac, S., Deswarte, C., Bouzayen, M., Roustan, J.-P., Fallot, J., Pech, J.-C. and Latché, A. (1998). A novel NADPH-dependent aldehyde reductase gene from *Vigna radiata* confers resistance to the grapevine fungal toxin eutypine. *The Plant J.*, **16** (3): 335-343.

Habu, Y. and Iida, S. (1998). AFLP (Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism)-Based mRNA fingerprinting. *Plant Biotechnology*, **15** (4): 249-251.

Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G. (1997). Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**: 575-607.

Han, F., Kleinhofs, A., Kilian, A. and Ullrich, S.E. (1997). Cloning and mapping of a putative barley NADPH-dependent HC-toxin reductase. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **10** (2): 234-239.

Hansen, E. and Delatour, C. (1999). *Phytophthora* species in oak forest of north-east France. *Ann. For. Sci.*, **56**: 539-547.

Hansen, E.M. (1999). Disease and diversity in forest ecosystems. *Australasian Plant Pathology*, **28**: 313-319.

Hansen, M., Kraft, T., Christiansson, M. and Nilsson, N.-O. (1999). Evaluation of AFLP in *Beta*. *Theor. Appl. Genet.*, **98**: 845-852.

Hardham, A.R. (2001). The cell biology behind *Phytophthora* pathogenicity. *Australasian Plant Pathology*, **30**: 91-98.

Hartman, T.P.V., Johnson, M.A.T., Leitch, I.J., Hanson, L., Davey, M.R., Power, J.B., Blackhall, N.W. and Cocking, E.C. (1998). Tree chromosomes, genome size and the potential of fluorescence in situ hybridisation for their analysis. *In: Tree Biotechnology: Towards the Millennium*, M.R. Davey, P.G. Alderson, K.C. Lowe and J.B. Power Editors, Nottingham University Press, UK, **40**: 367-386.

Hattori, T. and Nakamura, K. (1988). Genes encoding for the major tuberous root protein of sweet potato: Identification of putative regulatory sequence in the 5' upstream region. *Plant Mol. Biol.*, **11**: 417-426

Hawkins, S.W. and Boudet, A.M. (1994). Purification and Characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase isoforms from the periderm of *Eucalyptus gunnii* Hook. *Plant Physiol.*, **104**: 75-84.

- Heath, M.C. (2000a). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.*, **44**: 321-334.
- Heath, M.C. (2000b). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. in Plant Biol.*, **3**: 315-319.
- Heiser, I, Fromm, J., Giefing, M., Koehl, J., Jung, T. and Obwald, W. (1999). Investigations on the action of *Phytophthora quercina*, *P. citricola* and *P. gonapodyides* toxins on tobacco plants. *Plant Physiol. and Biochem.*, **37**: 73-81.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. and Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nuc. Acids Res.*, **27** (1): 297-300.
- Hill, M., Witsenboer, H., Zabeau, M., Vos, P., Kesseli, R. and Michelmore, R. (1996). PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp.. *Theor. Appl. Genet.*, **93**: 1202-1210.
- Hiraga, S., Yamamoto, K., Ito, H., Sasaki, K., Matsui, H., Honma, M., Nagamura, Y., Sasaki, T. and Ohashi, Y. (2000). Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase genes. *FEBS Letters*, **471**: 245-250.
- Hiraga, S., Hiroyuki, I., Sasaki, K., Yamakawa, H., Mitsuhara, I., Toshima, H., Matsui, H., Honma, M. and Ohashi, Y. (2000a). Wound-induced expression of a tobacco peroxidase is not enhanced by ethephon and suppressed by methyl jasmonate and corotene. *Plant Cell Physiol.*, **41** (2): 165-170.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y. and Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.*, **42** (5): 462-468.
- Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K. and Yodoi, J. (1997). AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 3633-3638.
- Holtke H.J., Ankenbauer, W., Muhlegger, K., Rein, R., Sagner, G., Seibl, R. and Walter, T. (1995). The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids--an overview. *Cell. Mol. Biol.*, **41**(7):883-905.
- Hornero, J., Gallego, F.J., Martinez, I. and Toribio, M. (2001). Testing the conservation of *Quercus* spp. Microsatellites in the cork oak, *Q. suber* L.. *Silvae Genetica*, **50**: 162-167.
- Hornero, J., Martinez, I., Celestino, C., Gallego, F.J., Torres, V. and Toribio, M. (2001). Early checking of genetic stability of cork oak somatic embryos by AFLP analysis. *Int. J. Plant Sci.*, **162** (4): 827-833.

Hughes, A.L. and Yeager, M. (1998). Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annu. Rev. Genet.*, **32**: 415-435.

Ito, H., Hiraga, S., Tsugawa, H., Matsui, H., Honma, M., Otsuki, Y., Murakami, T. and Ohashi, Y. (2000). Xylem-specific expression of wound-inducible rice peroxidase genes in transgenic plants. *Plant Science*, **155**: 85-100.

Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution floral. *Bulletin de la Société Vaudoise de Science Naturelle*, **44**: 223-270.

Jansen, M.A.K., van der Noort, R.E., Adillah Tan, M.Y., Prinsen, E., Lagrimini, L.M. and Thorneley, R.N.F. (2001). Phenol-Oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. *Plant Physiology*, **126**: 1012-1023.

Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P. and Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The EMBO J.*, **19**: 4004-4014.

Jiang, C., Iu, B. and Singh, J. (1996). Requirement of a CCGAC cis-acting element for cold induction of the BN115 gene from winter Brassica napus. *Plant Mol. Biol.*, **30** (3): 679-684.

Jiménez, P., Agúndez, D., Alía, R. and Gil, L. (1999). Genetic variation in central and marginal populations of *Quercus suber* L.. *Silvae Genetica*, **48**: 278-284.

John, D.C. and Bulleid, N.J. (1994). Prolyl 4-hydroxylase: defective assembly of alpha-subunit mutants indicates that assembled alpha-subunits are intramolecularly disulfide bonded. *Biochemistry*, **33**: 14018-14025.

Jones, A. (2000). Resistance genes and resistance protein function. In: *Molecular Plant Pathology Ann. Plant Rev.*, Eds Dickinson, M. and Beynon, J., Sheffield, Academic Press, UK, **4** (5): 108-143..

Jones, D.A., Thomas, C.M., Hammond-Kosack, K.E., Balint-Kurti, P.J. and Jones, J.D. (1994). Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*, **266** (5186): 789-93.

Jones, J.T. and Harrower, B.E. (1998). A comparison of the efficiency of differential display and cDNA-AFLPs as tools for the isolation of differentially expressed parasite genes. *Fundm. Appl. Nematol.*, **21** (1): 81-88.

Jung, H.W. and Hwang, B.K. (2000). Isolation, partial sequencing, and expression of pathogenesis-related cDNA genes from Pepper leaves infected by

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **13** (1): 136-142.

Jung, T., Blaschke, H. and Newmann, P. (1996). Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *Eur. J. For. Path.*, **26**: 253-272.

Jung, T., Blaschke, H. and Obwald, W. (2000). Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathology*, **49**: 706-718.

Kagaya, Y., Ohmiya, K. and Hattori, T. (1999). RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Res.*, **27** (2): 470-478.

Kanai, S., Toh, H., Hayano, T. and Kikuchi, M. (1998). Molecular evolution of the domain structures of protein disulfide isomerases. *J. Mol. Evol.*, **47**: 200-210.

Kamoun, S., Klucher, K.M., Coffey, M.D. and Tyler, B.M. (1993). A gene encoding a host-specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **6**: 573-581.

Kamoun, S., van West, P., Jong, A.J., de Groot, K.E., Vleeshouwers, V.G.A.A. and Govers, F. (1997). A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **1**: 13-20.

Kamoun, S., van West, P., Vleeshouwers, V.G.A.A., de Groot, K.E. and Govers, F. (1998). Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. *The Plant Cell*, **10**: 1413-1425.

Kamoun, S., Dong, S., Huitema, E., Torto, G.A., van West, P., Vleeshouwers, V.G.A.A. and Govers, F. (2000). Dissection of nonhost resistance of *Nicotiana* to *Phytophthora infestans*. In: *Biology of Plant Microbe Interactions*. Eds Wit, P.J.G.M., Bisseling, T. and Stiekema, W.J., St. Paul MN: Int. Soc. Mol. Plant Microbe Interactions, vol. **2**, pp. 180-185.

Kamoun, S. (2001). Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Curr. Op. Plant Biol.*, **4**: 295-300.

Kang, J.Y., Choi, H.I., Im, M.Y. and Kim, S.Y. (2002). Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell*, **14** (2): 343-357.

- Kaothien, P., Kawaoka, A., Ebinuma, H., Yoshida, K. and Shinmyo, A. (2002). Ntlm1, a PAL-box binding factor, controls promoter activity of the horseradish wound-inducible peroxidase gene. *Plant Mol. Biol.*, **49**: 591-599.
- Katagiri, F., Lam, E. and Chua, N.H. (1989). Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. *Nature*, **340** (6236): 727-730.
- Kato, Y., Sakuma, Y., Azuma, T., Ando, A., Miura, K., Takabe, K. and Tamai, Y. (2001). Isolation and characterization of a novel anionic peroxidase cDNA found in poplar (*Populus nigra*) suspension cultured cells. *J. Wood Sci.*, **47**: 165-170.
- Kawaoka, A., Kaothien, P., Yoshida, K., Endo, S., Yamada, K. and Ebinuma, H. (2000). Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlm1 involved in lignin biosynthesis. *The Plant J.*, **22** (4): 289-301.
- Keizer, D.W., Schuster, B., Grant, B.R. and Gayler, K.R. (1998). Interactions between elicitors and radish *Raphanus sativus*. *Planta*, **204**: 480-489.
- Keller, H., Blein, J-P., Bonnet, P. and Ricci, P. (1996). Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Physiol.*, **110**(2): 365-376.
- Kieffer, F., Lherminier, J., Simon-Plas, F., Nicole, M., Paynot, M., Elmayan, T. and Blein, J-P. (2000). The fungal elicitor cryptogein induces cell wall modifications on tobacco cell suspension. *J. Exp. Bot.*, **51**(352): 1799-1811.
- Kim, J. and Mayfield, S.P. (1997). Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast translational activation. *Science*, **278**: 1954-1957.
- Kim, S.Y., Chung, H.J. and Thomas, T.L. (1997). Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant J.*, **11** (6): 1237-1251.
- Klein, P., Kanehisa, M. and DeLisi, C. (1985). The detection and classification of membrane-spanning proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **815** (3): 468-476.
- Knogge, W. (1996). Fungal infection of plants. *The Plant Cell*, **8**: 1711-1722.
- Kobe, B. and Deisenhofer, J. (1995). Proteins with leucine-rich repeats. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**: 409-416.
- Köhler, Th., Lassner, D., Rost, A.-K., Thamm, B., Pustowoit, B. and Remke, H. (1995). *Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction. Nonradioactive PCR methods*. Springer Laboratory Manual, Springer-Verlag Berlin, 165 pp.

- Kolattukudy, P.E. (1984). Biochemistry and function of cutin and suberin. *Can. J. Bot.*, **62**: 2918-2933.
- Kolattukudy, P.E., Rogers, L.M., Li, D., Hwang, C.-S. and Flaishman, A. (1995). Surface signalling in pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 4080-4087.
- Kombrink, E. and Somssich, I.E. (1995). Defense responses of plants to pathogens. In: *Advances in Botanical Research*. Eds Andrews, J.H. and Tommerup, I.C., Academic Press, Vol. **21**, pp. 1-34.
- König, A.O., Ziegenhagen, B., Van Dam, B.C., Csaikl, U.M., Coart, E., Degen, B., Burg, K., de Vries, S.M.G. and Petit, R.J. (2002). Chloroplast DNA variation of oaks in western Central Europe and genetic consequences of human influences. *For. Ecol. and Manage.*, **156**: 147-166.
- Krawczak, M. and Schmidtke, J. (1998). In: *DNA Fingerprinting*, 2nd Edition. Ed. Andrea Boshier, BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK, 107 pp.
- Kremer, A. and Petit, R.J. (1993). Gene diversity in natural populations of oak species. *Ann. Sci. For.*, **50** (suppl 1): 186s-202s.
- Kristensen, B.K., Bloch, H. and Rasmussen, S.K. (1999). Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. *Plant Physiol.*, **120**: 501-512.
- Kuhn, E. (2001). From library screening to microarray technology: strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants. *Annals of Botany*, **87**: 139-155.
- Kumar, G.N.M. and Knowles, N.R. (2003). Wound-induced superoxide production and PAL activity decline with potato tuber age and wound healing ability. *Physiologia Plantarum*, **117**: 108-117.
- Kurooka, H., Kato, K., Minoguchi, S., Takahashi, Y., Ikeda, J., Habu, S., Osawa, N., Buchberg, A.M., Moriwaki, K., Shisa, H. and Honjo, T. (1997). Cloning and characterization of the nucleoredoxin gene that encodes a novel nuclear protein related to thioredoxin. *Genomics*, **39**: 331-339.
- Lagrimini, L.M., Gingas, V., Finger, F., Rothstein, S. and Liu, T.Y. (1997). Characterization of antisense transformed plants deficient in the tobacco anionic peroxidase. *Plant Physiology*, **114**: 1187-1196.

Lam, E., Benfey, P.N., Gilmartin, P.M., Fang, R.X. and Chua, N.H. (1989). Site-specific mutations alter in vitro factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86** (20): 7890-7894.

Lang, B.F., Seif, E., Gray, M.W., O'Kelly, C.J. and Burger, G. (1999). A comparative genomics approach to the evolution of eukaryotes and their mitochondria. *J.Eukaryot. Microbiol.*, **46** (4): 320-326.

Lascombe, M.-B., Ponchet, M., Venard, P., Milat, M.-L., Blein, J.-P. and Prangé, T. (2002). The 1.45 Å resolution structure of the cryptogein-cholesterol complex: a close-up view of a sterol carrier protein (SCP) active site. *Acta Cryst.*, **D58**: 1442-1447.

Laugé, R., Joosten, M.H.A.J., Haanstra, J.P.W., Goodwin, P.H., Lindhout, P. and de Wit, P.J.G.M. (1998). Successful search for a resistance gene in tomato targeted against a virulence factor of a fungal pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 9014-9018.

Laughner, B.J., Sehnke, P.C. and Ferl, R.J. (1998). A novel nuclear member of the thioredoxin superfamily. *Plant Physiol.*, **118**: 987-996.

Lawrence, G.J., Finnegan, E.J., Ayliffe, M.A. and Ellis, J.G. (1995). The *L6* gene for flax rust resistance is related to the Arabidopsis bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*. *The Plant Cell*, **7**: 1195-1206.

Lebreton, P., Barbéro, M. and Quézel, P. (2001). Contribution morphométrique et biochimique à la structuration et à la systématique du complexe spécifique Chêne vert *Quercus ilex* L.. *Acta Bot. Gallica*, **148** (4): 289-317.

Lebrun-Garcia, A., Bourque, S., Binet, M.-N., Ouaked, F., Wendehenne, D., Chiltz, A., Schaffner, A. and Pugin, A. (1999). Involvement of plasma membrane proteins in plant defense responses. Analysis of the cryptogein signal transduction in tobacco. *Biochimie*, **81**: 663-668.

Lecourieux-Ouaked, F., Pugin, A. and Lebrun-Garcia, A. (2000). Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **13** (8): 821-829.

Lee, S.W., Tomasetto, C. and Sager, R. (1991). Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 2825-2829.

Le Gourrierec, J., Li, Y.F. and Zhou, D.X. (1999). Transcriptional activation by Arabidopsis GT-1 may be through interaction with TFIIA-TBP-TATA complex. *Plant J.*, **18** (6): 663-668.

Lehmann, A.R., Walicka, M., Griffiths, D.J.F., Murray, J.M., Watts, F.Z., McCready, S. and Carr, A.M. (1995). The rad18 gene of *Schizosaccharomyces pombe* defines a new subgroup of the SMC superfamily involved in DNA repair. *Mol. and Cell. Biol.*, **15** (12): 7067-7080.

Leister, R.T. and Katagiri, F. (2000). A resistance gene product of the nucleotide binding site-leucine rich repeats class can form a complex with bacterial avirulence proteins *in vivo*. *The Plant Journal*, **22**: 345-354.

Leroy, P., Merlino, M., Nègre, S., Caissard, J. C., Sourdille, P., Lu, Y. H. and Bernard, M. (1997). Non-radioactive methods of detection on Southern Blots. In: *Plant Molecular Biology-A laboratory Manual*, Melody S. Clark (Ed.), Springer, New York., pp: 41-53.

Lewin, B. (2000). Nuclear splicing. *Genes VII*, Oxford University Press Inc., New York, cap.22, 686-718.

Liang, P. and Pardee, A.B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, **257**: 967-971.

Lima, M.B. (1996). A biodiversidade de algumas plantas cultivadas e o seu aproveitamento do ponto de vista económico. *Instituto Nacional de Investigação Agrária*, Oeiras (não publicado).

Liu, C-N. (1997). Cosmid libraries. In: *Plant Molecular Biology: a laboratory manual*, Ed. Clark, M.S., Springer-Verlag, Berlin, Germany, **I** (2.4): 117-120.

Logemann, E., Reinold, S., Somssich, I.E. and Hahlbrock, K. (1997). A novel type of pathogen defense-related cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Biol. Chem.*, **378**: 909-913.

Lopes, F.J. and Ribeiro, J.R. (2000). Os montados do Alentejo. In: *Florestas de Portugal*, Direcção Geral das Florestas, Lisboa, 255 pp.

Louro, G. (1999). Avaliação da aplicação de programas de apoio à floresta na região do Algarve. *Direcção-Geral das Florestas*, Lisboa.

Lu, Z.-X., Sossey-Alaoui, K., Reighard, G.L., Baird, Wm.V. and Abbott, A.G. (1999). Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot

nematode resistance, and its application to peach rootstock breeding. *Theor. Appl. Genet.*, **99**: 115-122.

Luke, J., Cohen, M., Savé, R., Biel, C. and Álvarez, I. (1999). Effects of three fungal pathogens on water relations, chlorophyll fluorescence and growth of *Quercus suber* L., *Ann. For. Sci.*, **56**: 19-26.

Luke, J., Parladé, J. and Pera, J. (2000). Pathogenicity of fungi isolated from *Quercus suber* in Catalonia (NE Spain). *For. Path.*, **30**: 247-263.

Lynch, D., Lidgett, A., McInnes, R., Huxley, H., Jones, E., Mahoney, N. and Spangenberg, G. (2002). Isolation and characterisation of three cinnamyl alcohol dehydrogenase homologue cDNAs from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), *J. Plant Physiol.*, **9**: 1037-1043.

Mace, E.S., Gebhardt, C.G. and Lester, R.N. (1999). AFLP analysis of genetic relationships in the tribe Datureae (Solanaceae). *Theor. Appl. Genet.*, **99**: 634-641.

Magalhães, M.M. (1999). Peroxissomas, glicossomas e hidrogenossomas. In: *Biologia Celular e Molecular*, coordenação C. Azevedo, LIDEL-Edições Técnicas, Lisboa (3ª Ed.).

Malajczuk, N., McComb, A.J. and Parker, C.A. (1977). Infection by *Phytophthora cinnamomi* Rands of roots of *Eucalyptus calophylla* and *Eucalyptus marginata*. *Aust. J. Bot.*, **25**: 483-500.

Manos, P.S., Zhou, Z-K and Cannon, C.H. (2001). Systematics of *Fagaceae*: Phylogenetic tests of reproductive trait evolution. *International Journal of Plant Sciences*, **162** (6): 1361-1379.

Manos, P.S., Doyle, J.J. and Nixon, K.C. (1999). Phylogeny, Biogeography, and Processes of Molecular Differentiation in *Quercus* Subgenus *Quercus* (*Fagaceae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **12** (3): 333-349.

Marcelino, A.C.P.M.S. (2001). Aspectos da interação entre *Phytophthora cinnamomi* e a doença do declínio em *Q. suber* e *Q. rotundifolia*. *Tese de Doutorado*, FERN, Universidade do Algarve, 279 pp.

Margulis, L. (1992). Biodiversity: molecular biological domains, symbiosis and kingdom origins. *BioSystems*, **27**: 39-51.

Mariette, S., Cottrell, J., Csaikl, U.M., Goihochea, P., König, A., Lowe, A.J., Van Dam, B.C., Barreneche, T., Bodénès, C., Streiff, R., Burg, K., Groppe, K., Munro, R.C., Tabbener, H. and Kremer, A. (2002). Comparison of levels of genetic diversity

detected with AFLP and microsatellite markers within and among mixed *Q. petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L. stands. *Silvae Genetica*, **51**: 72-79.

Maruyama, K. and Sugano, S. (1994). Oligo-Capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* **138**: 171-174.

Matos, M.F.A.S. (2001). Caracterização morfológica por taxonomia numérica e análise da variabilidade genética por AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) de oito raças bovinas nacionais. *Dissertação de mestrado*, Universidade Técnica de Lisboa, 112 pp.

Matton, D.P., Constabel, P. and Brisson, N. (1990). Alcohol dehydrogenase gene expression in potato following elicitor and stress treatment. *Plant Mol. Biol.*, **14** (5): 775-783.

Maurel, M., Robin, C., Capron, G. and Desprez-Loustau, M.-L. (2001). Effects of root damage associated with *Phytophthora cinnamomi* on water relations, biomass accumulation, mineral nutrition and vulnerability to water deficit of five oak and chestnut species. *For. Path.*, **31**: 353-369.

Matz, M.V. and Lukyanov, S.A. (1998). Different strategies of differential display: areas of application. *Nucleic Acids Res.*, **26** (24): 5537-5543.

Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.*, **65** (1): 499-560.

McDowell, J.M., Dhandaydham, M., Long, T.A., Aarts, M.G.M., Goff, S., Holub, E.B. and Dangl, J.L. (1998). Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the *RPP8* locus of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **10**: 1861-1874.

Menke, U. and Mueller-Roeber, B. (2001). RNA fingerprinting of specific plant cell types: adaptation to plants and optimization of RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR). *Plant Mol. Biol. Rep.*, **19**: 33-48.

Merouani, H., Branco, C., Almeida, M.H. and Pereira, J.S. (2001). Comportement physiologique des glandes de chêne liège (*Quercus suber* L.) durant leur conservation et variabilité inter-individus producteurs. *Ann. For. Sci.* **58**: 143-153.

Meyers, B.C., Shen, K.A., Rohani, P., Gaut, B.S. and Michelmore, R.W. (1998). Receptor-like genes in the major resistance locus of lettuce are subject to divergent selection. *The Plant Cell*, **11**: 1833-1846.

Michaud, H. (1993). Étude de la variabilité génétique du Chêne vert (*Quercus ilex* L.) à l'aide de marqueurs enzymatiques et moléculaires. Thèse Doctorat, Université Aix-Marseille III, 73p.

Michelmore, R.W. and Meyers, B.C. (1998). Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and birth-and-death process. *Genome Research*, **8**: 1113-1130.

Mikami, K., Tabata, T., Kawata, T., Nakayama, T. and Iwabuchi, M. (1987). Nuclear proteins binding to the conserved DNA hexameric sequence postulated to regulate transcription of wheat histone genes. *FEBS Lett.*, **223** (2): 273-278.

Mikes, V., Milat, M-L., Ponchet, M., Ricci, P. and Blein, J-P. (1997). The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Letters*, **416**: 190-192.

Mikes, V., Milat, M-L., Ponchet, M., Panabières, F., Ricci, P. and Blein, J-P. (1998). Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **245**(1):133-139.

Miller, J.H. (1992). *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 456 pp.

Milligan, S.B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P. and Williamson, V.M. (1998). The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding leucine-rich repeat family of plant genes. *The Plant Cell*, **10**: 1307-1319.

Mindrinis, M., Katagiri, F., Yu, G.L. and Ausubel, F.M. (1994). The *A. thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell*, **78**: 1089-1099.

Mitchell, H.J., Hall, J.L. and Barber, M.S. (1994). Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant Physiol.*, **104**: 551-556.

Money, T., Reader, S., Qu, L.J., Dunford, R.P. and Moore, G. (1996). AFLP-based mRNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, **24** (13): 2616-2617.

Morais, C.E. and Pereira, M.R. (2000). Diversidade biológica. In: *Florestas de Portugal*, Direcção Geral das Florestas, Lisboa, 255 pp.

Moro, R. (2002). Alcornoque (*Quercus suber* L.). *Guía de Los Árboles de España*, Omega eds, Barcelona, 407 pp.

Moyle, R., Moody, J., Phillips, L., Walter, C. and Wagner, A. (2002). Isolation and characterization of a *Pinus radiata* lignin biosynthesis-related O-methyltransferase promoter. *Plant Cell Rep.*, **20**: 1052-1060.

Müller-Starck, G., Herzog, S. and Hattemer, H.H. (1993), Intra and inter population genetic variation in juvenile populations of *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt) Liebl. *Ann. Sci. For.*, **50**(suppl 1): 233s-244s.

Mullis, K.B., Ferré, F. and Gibbs, R.A. (1994). *The polymerase chain reaction*. Birkhäuser, Boston, USA, 458 pp.

Nakamura, H., Nakamura, K. and Yodoi J. (1997). Redox regulation of cellular activation. *Annu. Rev. Immunol.*, **15**: 351-369.

Nakamura, M., Tsunoda, T. and Obokata, J. (2002). Photosynthesis nuclear genes generally lack TATA-boxes: a tobacco photosystem I gene responds to light through an initiator. *Plant J.*, **29** (1): 1-10.

Narusaka, Y., Nakashima, K., Shinwari, Z.K., Sakuma, Y., Furihata, T., Abe, H., Narusaka, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J.*, **34** (2): 137-148.

Natividade, J.V. (1950). *Subericultura*. Ministério da Agricultura, Lisboa.

Newton, A.C., Allnutt, T.R., Gillies, A.C.M., Lowe, A.J. and Ennos, R.A. (1999). Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Tree*, **14**: 140-145.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and Von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.*, **10**: 1-6.

Niks, R.E. and Rubiales, D. (2002). Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialised fungal pathogens. *Euphytica*, **124**: 201-216.

Nixon, K.C. (1993). Infrageneric classification of *Quercus* (*Fagaceae*) and typification of sectional names. *Ann. Sci. For.*, **50**(suppl 1): 25s-34s.

Nóbrega, F. and Bruno de Sousa, R. (1993). Identificação de isoenzimas do sobreiro (*Quercus suber* L.). *Silva Lusitana*, **1** (2): 199-216.

Noël, L., Moores, T.L., van der Biezen, E.A., Parniske, M., Daniels, M.J., Parker, J.E. and Jones, J.D.G. (1999). Pronounced intraspecific haplotype divergence at

the RPP5 complex disease resistance locus of Arabidopsis. *The Plant Cell*, **11**: 2099-2111.

Noir, S. and Lashermes, P. (2000). Organisation et évolution des genes de résistance chez les plantes. *Cahiers d'études et de recherches francophones*, **9**: 301-309.

Nürnbergger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K. and Scheel, D. (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell*, **78**: 449-460.

Oelofse, D. and Dubery, I.A. (1996). Induction of defense responses in cultured tobacco cells by elicitors from *Phytophthora nicotianae*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **28**: 295-301.

Ori, N., Eshed, Y., Paran, I., Presting, G., Aviv, D., Tanksley, S., Zamir, D. and Fluhr, R. (1997). The *I2C* family from the wilt disease resistance locus *I2* belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *The Plant Cell*, **9**: 521-532.

Osman, H., Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M-L., Panabières, F., Marais, A., Brunie, S., Maume, B., Ponchet, M. and Blein, J-P. (2001a). Mediation of elicitin activity on tobacco is assumed by elicitin-sterol complexes. *Mol. Biol. Cell*, **12**: 2825-2834.

Osman, H., Mikes, V., Milat, M-L., Ponchet, M., Marion, D., Prangé, T., Maume, B.F., Vauthrin, S. and Blein, J-P. (2001b). Fatty acids bind to the fungal elicitor cryptogein and compete with sterols. *FEBS Letters*, **489**: 55-58.

Pan, Q., Wendel, J. and Fluhr, R. (2000). Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. *J. Mol. Evol.*, **50**: 203-213.

Panabières, F., Marais, A., Leberre, J.Y., Penot, I., Fournier, D. and Ricci, P. (1995). Characterization of a gene cluster of *Phytophthora cryptogea* which codes for elicitins, proteins inducing a hypersensitive-like response in tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **8**: 996-1003.

Pariser, H.P., Zhang, J. and Hausman, R.E. (2000). The cell adhesion molecule retina cognin is a cell surface protein disulfide isomerase that uses disulfide exchange activity to modulate cell adhesion. *Exp. Cell Res.*, **258** (1): 42-52.

Parker, J.E., Coleman, M.J., Szabò, V., Frost, L.N., Schmidt, R., Van der Biezen, E.A., Moores, T., Dean, C., Daniels, M.J. and Jones, J.D.G. (1997). The

Arabidopsis downy mildew resistance gene *RPP5* shares similarity to the Toll and Interleukin-1 receptors with *N* and *L6*. *The Plant Cell*, **9**: 879-894.

Perez, V., Huet, J.C., Nespoulous, C. and Pernollet, J.C. (1997). Mapping the elicitor and necrotic sites of *Phytophthora* elicitors with synthetic peptides and reporter genes controlled by tobacco defense gene promoters. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **10**: 750-760.

Perez, V., Huet, J.C., O'Donohue, M., Nespoulous, C. and Pernollet, J.C. (1999). A novel elicitor necrotic site revealed by α -cinnamomin sequence and site-directed mutagenesis. *Phytochemistry*, **50**: 961-966.

Perham, R.N., Scrutton, N.S. and Berry, A. (1991). New enzymes for old: redesigning the coenzyme and substrate specificities of glutathione reductase. *Bioessays*, **13** (10): 515-525.

Pernollet, J.C., Sallatin, M., Sallé-Tourne, M. and Huet, J.C. (1993). Elicitor isoforms from seven *Phytophthora* species: comparison of their physico-chemical properties and toxicity to tobacco and other plant species. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.*, **42**: 53-67.

Petit, R.J., Pineau, E., Demesure, B., Bacilieri, R., Ducouso, A. and Kremer, A. (1997). Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 9996-10001.

Petit, R.J., Csaikl, U.M., Bordács, S., Burg, K., Coart, E., Cottrell, J., van Dam, B., Deans, D.J., Dumolin-Lapègue, S., Fineschi, S., Finkeldey, R., Gillies, A., Glaz, I., Goicoechea, P.G., Jensen, J.S., König, A.O., Lowe, A.J., Madsen, S.F., Mátyás, G., Munro, R.C., Olalde, M., Pemonge, M-H., Popescu, F., Slade, D., Tabbener, H., Turchini, D., de Vries, S.G.M., Ziegenhagen, B. and Kremer, A. (2002). Chloroplast DNA variation in European white oaks Phylogeography and patterns of diversity based on data over 2600 populations, *For. Ecol. and Manag.*, **156**: 5-26.

Pinto, P. (2001). Identification and characterisation of elicitors in *Phytophthora cambivora*. *Relatório de estágio da licenciatura em Engenharia Biotecnológica*, FERN, Universidade do Algarve, 53 pp.

Podila, G.K., Rogers, L.M. and Kolattukudy, P.E. (1993). Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiol.*, **103** (1): 267-272.

Ponchet, M., Panabières, F., Milat, M-L., Mikes, V., Montillet, J-L., Suty, L., Triantaphylides, C., Tirilly, Y. and Blein, J-P. (1999). Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell. Mol. Life Sci.*, **56**: 1020-1047.

Prévot, V. (2002). Isolation and characterization of the elicitor genes from *Phytophthora cambivora* and study of their expression *in vivo*. *Relatório de estágio da licenciatura em Engenharia Biotecnológica*, FERN, Universidade do Algarve, 96 pp.

Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M.A., Barceló, A., Amaya, I., Medina, M.I., Alonso, F.J., Milrad de Forchetti, S., Tigier, H. and Valpuesta, V. (2000). A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.*, **122**: 1119-1127.

Razem, F.A. and Bernards, M.A. (2002). Hydrogen Peroxide is required for poly(phenolic) domain formation during wound-induced suberization. *J. Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 1009-1015.

Reed, K.K. and Mann, D.A. (1985). Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Res.*, **13**: 7207-7221.

Ribeiro, O. K. (1978). *A source book of the Genus Phytophthora*. J. Cramer, Vaduz, Liechtenstein, 417 pp.

Ricci, P., Bonnet, P., Huet, J.C., Sallatin, M., Beauvais-Cante, F., Bruneteau, M., Billard, V., Michel, G. and Pernollet, J.C. (1989). Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem.*, **183**: 555-563.

Rigobello, M.P., Donella-Deana, A., Cesaro, L. and Bindoli, A. (2001). Distribution of protein disulphide isomerase in rat liver mitochondria. *Biochem.J.*, **356**: 567-570.

Ritz, D., Patel, H., Doan, B., Zheng, M., Aslund, F., Storz, G. and Beckwith, J. (2000). Thioredoxin 2 is involved in the oxidative stress response in *Escherichia Coli*. *The J. of Biol. Chem.*, **275** (4): 2505-2512.

Rivera-Madrid, R., Mestres, D., Marinho, P., Jacquot, J.-P., Decottignies, P., Miginiac-Maslow, M. and Meyer, Y. (1995). Evidence for five divergent thioredoxin h sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 5620-5624.

Robin, C., Capron, G. and Desprez-Loustau, M.L. (2001). Root infection by *Phytophthora cinnamomi* in seedlings of three oak species. *Plant Pathology*, **50**: 708-716.

Robin, C., Dupuis, F. and Desprez-Loustau, M.L. (1994). Seasonal changes in Northern Red Oak susceptibility to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Disease*, **78**: 369-374.

Rocha, S.M., Goodfellow, B.J., Delgadillo, I., Neto, C. and Gil, A.M. (2001). Enzymatic isolation and structural characterisation of polymeric suberin of cork from *Quercus suber* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, **28**: 107-119.

Roche Molecular Biochemicals (2000). *DIG Application Manual for Filter Hybridization*. Ed. Roche Diagnostics GmbH, Germany, 225 pp.

Rodrigues, M.L., Archer, M., Martel, P., Jacquet, A., Cravador, A. and Carrondo, M.A. (2002). Structure of β -cinnamomin, a protein toxic to some plant species. *Acta Cryst.*, **D58**: 1314-1321.

Rodríguez-Molina, M.C., Torres-Vila, L.M., Blanco-Santos, A., Palo Núñez, E.J. and Torres-Álvarez, E. (2002). Viability of holm and cork oak seedlings from acorns sown in soils naturally infected with *Phytophthora cinnamomi*. *For. Path.*, **32**: 365-372.

Rohlf, F.J. (1982). Single-link clustering algorithms. In: *Handbook of Statistics*. Krishnaiah, P.R. and Kanal, L.N. (eds). North-Holland Publishing Co., **2**: 267-284.

Rohlf, F. J. (1997). NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis, version 1.80. *Exeter Software*. Setauket, New York.

Rohlf, F. J. (1998). NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis, version 2.0. *Exeter Software*. Setauket, New York.

Roussel, S. Nicole, M., Lopez, F., Ricci, P., Geiger, J-P., Renard, M. and Brun, H. (1999). *Leptosphaeria maculans* and cryptogin induce similar vascular responses in tissues undergoing the hypersensitive reaction in *Brassica napus*. *Plant Science*, **144**: 17-28.

Rushton, B.S. (1993). Natural Hybridization within the genus *Quercus* L. *Ann. Sci. For.*, **50**(suppl 1): 73s-90s.

Ryerson, D.E. and Heath, M.C. (1996). Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *Plant Cell*, **8**: 393-402.

Sackin, M.J. and Jones, D. (1993). Computer-assisted Classification. In *Handbook of New Bacterial Systematics*, Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G. (eds), Academic Press, London, **7**: 281-313.

Sacks, W., Nürnberger, T., Hahlbrock, K. and Scheel, D. (1995). Molecular characterization of nucleotide sequences encoding the extracellular glycoprotein elicitor from *Phytophthora megasperma*. *Mol.Gen.Genet.*, **246**: 45-55.

Salmeron, J.M., Oldroyd, G.E., Rommens, C.M., Scofield, S.R., Kim, H.S., Lavelle, D.T., Dahlbeck, D. and Staskawicz, B.J. (1996). Tomato Prf is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the Pto kinase gene cluster. *Cell*, **86**: 123-133.

Sambrook, J. and Russell, D. (2001) Extraction, purification, and analysis of mRNA from Eukaryotic Cells In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Samuel, R., Bachmair, A., Jobst, J. and Ehrendorfer, F. (1998). ITS sequences from nuclear rDNA suggest unexpected phylogenetic relationships between Euro-Mediterranean, East Asiatic and North American taxa of *Quercus* (*Fagaceae*). *Plant Systematics and Evolution* **211**: 129-139.

Samuel, R. (1999). Identification of hybrids between *Quercus petraea* and *Q. robur* (*Fagaceae*): results obtained with RAPD markers confirm allozyme studies based on the *Got-2* locus. *Plant Syst. Evol.*, **217**: 137-146.

Sánchez, M.E., Caetano, P., Ferraz, J. and Trapero, A. (2002). *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in south-western Spain. *For. Path.*, **32**: 5-18.

Sasabe, M., Takeuchi, K., Kamoun, S., Ichinose, Y., Govers, F., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Yamada, T. (2000). Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. *Eur. J. Biochem.*, **267**: 5005-5013.

Sasaki, K., Hiraga, S., Ito, H., Seo, S., Matsui, H. and Ohashi, Y. (2002). A wound-inducible tobacco peroxidase gene expresses preferentially in the vascular system. *Plant Cell Physiol.*, **43** (1): 108-117.

Schaefer, B. C. (1995). Revolutions in Rapid Amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal. Biochem.* **227**: 255-273.

Schuller, D.J., Ban, N., Huystee, R.B., McPherson, A. and Poulos, T.L. (1996). The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure*, **4** (3): 311-321.

Schürmann, P. and Jacquot, J-P. (2000). Plant thioredoxin systems revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**: 371-400.

Shakesby, R.A., Coelho, C.O.A., Schnabel, S., Keizer, J.J., Clarke, M.A., Lavado Contador, J.F., Walsh, R.P.D., Pereira, A.J.D. and Doerr, S.H. (2002). A ranking methodology for assessing relative erosion risk and its application to dehesas and montados in Spain and Portugal. *Land Degrad. & Develop.*, **13**: 129-140.

Seibl, R., Höltnke, H.-J., Ruger, R., Meindl, A., Zachau, H. G., Rasshofer, R., Roggendorf, M., Wolf, H., Arnold, N. and Wienberg, J. (1990). Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids. III. Applications of the digoxigenin system. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **371**:939-951.

Sela-Buurlage, M.B., Budai-Hadrian, O., Pan, Q., Carmel-Goren, L., Vunsch, R., Zamir, D. and Fluhr, R. (2001). Genome –Wide dissection of *Fusarium* resistance in tomato reveals multiple complex loci. *Mol. Genet. Genomics*, **265**: 1104-1111.

Selman-Housein, G., Lopez, M., Hernandez, D., Civardi, L., Miranda, F., Rigau, J. and Puigdomenech, P. (1999). Molecular cloning of cDNAs coding for three sugarcane enzymes involved in lignification. *Plant Sci.*, **143**: 163-171.

Shearer, B.L. and Tippett, J.T. (1989). Jarrah Dieback: the dynamics and management of *Phytophthora cinnamomi* in the Jarrah (*Eucalyptus marginata*) Forest of South-western Australia. Department of Conservation and Land Management. Western Australia. *Research Bulletin*, **3**: 1-76.

Sherwood, R.T. and Berg, C.C. (1991). Anatomy and lignin content in relation to resistance of *Dactylis glomerata* to Stagonospora leaf spot. *Phytopathology*, **81** (11): 1401-1407.

Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using Vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.*, **269**: 32678-32684.

Simons, G., Groenendijk, J., Wijbrandi, J., Reijans, M., Groenen, J., Diergaarde, P., van der Lee, T., Bleeker, M., Onstenk, J., de Both, M., Haring, M., Mes, J., Cornelissen, B., Zabeau, M. and Vos, P. (1998). Dissection of the *Fusarium I2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *The Plant Cell*, **10**: 1055-1068.

Singh, A., Negi, M.S., Rajagopal, J., Bhatia, S., Tomar, U.K., Srivastava, P.S. and Lakshmikumaran (1999). Assessment of genetic diversity in *Azadirachta indica* using AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, **99**: 272-279.

Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973). *Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. W.H. Freeman and Co., San Francisco.

Sokal, R.R. and Michener, C.D. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Scientific Bulletin*, **38**: 1409-1438.

Sokal, R.R. (1974). Classification: Purposes, Principles, Progress, Prospects. *Science*, **185**: 1115-1123.

Song, W.Y., Wang, G.L., Chen, L.L., Kim, H.S., Pi L.Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.X., Zhu, L.H., Fauquet, C. and Ronald, P. (1995). A receptor kinase-like protein encoded by rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, **270**: 1804-1806.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.*, **98**: 503-517.

Stalberg, K., Ellerstrom, M., Ezcurra, I., Ablov, S. and Rask, L. (1996). Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the napA storage-protein promoter in transgenic Brassica napus seeds. *Planta*, **199** (4): 515-519.

Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H. and Schimper, A.F.W. (1994). *Tratado de Botânica*, 8ª Edición castellana. Ed. Omega, S.A., Barcelona.

Streiff, R. (1998). Structure genetique spatiale et flux polliniques dans une chenaie mixte: *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Quercus robur* L.. *Tese de Doutoramento*, Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, França.

Tabata, T., Takase, H., Takayama, S., Mikami, K., Nakatsuka, A., Kawata, T., Nakayama, T. and Iwabuchi, M. (1989). A protein that binds to a cis-acting element of wheat histone genes has a leucine zipper motif. *Science*, **245** (4921): 965-967.

Tainter, F.H. (2000). *Phytophthora cinnamomi* as a cause of oak mortality in the State of Colima, Mexico. *Plant Disease*, **84**: 394-398.

Takabe, K., Takeuchi, M., Sato, T., Ito, M. and Fujita, M. (2001). Immunocytochemical localization of enzymes involved in lignification of the cell wall. *J. Plant Res.*, **114**: 509-515.

Tamagnone, L., Merida, A., Parr, A., Mackay, S., Culianez-Macia, F.A., Roberts, K. and Martin, C. (1998). The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *The Plant Cell*, **10**: 135-154.

Tang, X., Frederick, R.D., Zhou, J., Halterman, D.A., Jia, Y. and Martin, G.B. (1996). Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science*, **274**: 2060-2063.

Tavernier, E., Stallaert, V., Blein, J-P. and Pugin, A. (1995). Changes in lipid composition in tobacco cells treated with cryptogein, an elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Plant Science*, **104**: 117-125.

Teakle, G.R., Manfield, I.W., Graham, J.F. and Gilmartin, P.M. (2002). *Arabidopsis thaliana* GATA factors: organization, expression and DNA-binding characteristics. *Plant Mol. Biol.*, **50**: 43-57.

Terada, K., Manchikalapudi, P., Noiva, R., Jauregui, H.O., Stockert, R.J. and Schilsky, M.L. (1995). Secretion, surface localization, turnover and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. *J.Biol.Chem.*, **270** (35): 20410-20416.

Terzaghi, W.B. and Cashmore, A.R. (1995). Light-regulated transcription. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **46**: 445-474.

Tey-Rulh, P., Philippe, I., Renaud, J.-M., Tsoupras, G., Angelis, P., Fallot, J. and Tabacchi, R. (1991). Eutypine, a phytotoxin produced by *Eutypa lata* the causal agent of dying-arm disease of grapevine. *Phytochemistry*, **30** (2): 471-473.

Thomas, C.M., Jones, D.A., Parniske, M., Harrison, K., Balint-Kurti, P.J., Hatzixanthis, K. and Jones, J.D.G. (1997). Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognitional specificity in Cf-4 and Cf-9. *The Plant Cell*, **9**: 2209-2224.

Thomas, F.M., Blank, R. and Hartmann, G. (2002). Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe. *For. Path.*, **32**: 277-307.

Thompson, J.D., Higgins, D.J. and Gibson, T.J. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, **22**: 4673-4680.

Thum, KE, Kim, M., Morishige, D.T., Eibl, C., Koop, H.U. and Mullet, J.E. (2001). Analysis of barley chloroplast psbD light-responsive promoter elements in transplastomic tobacco. *Plant Mol. Biol.*, **47**(3): 353-366.

Toumi, L. and Lumaret, R. (1998). Allozyme variation in cork oak (*Quercus suber* L.): the role of phylogeography and genetic introgression by other Mediterranean oak species and human activities. *Theor. Appl. Genet.*, **97**: 647-656.

Toumi, L. and Lumaret, R. (2001). Allozyme characterisation of four Mediterranean evergreen oak species. *Biochemical Systematics and Ecology*, **29**: 799-817.

Toyoda, K., Collins, N.C., Takahashi, A. and Shirasu, K. (2002). Resistance and susceptibility of plants to fungal pathogens. *Transgenic Research*, **11**: 567-582.

Tsai, B., Rodighiero, C., Lencer, W.I. and Rapoport, T.A. (2001). Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell*, **104**: 937-948.

Tyler, B.M. (2002). Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **40**: 137-167.

Van der Biezen, E.A. and Jones, J.D.G. (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *TIBS*, **23**: 454-456.

Van der Biezen, E.A. and Jones, J.D.G. (1998a). The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Current Biology*, **8**: R226-R227.

Van der Biezen, E.A., Juwana, H., Parker, J.E. and Jones, J.D.G. (2000). cDNA-AFLP display for the isolation of *Peronospora parasitica* genes expressed during infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **13** (8): 895-898.

Van der Biezen, E.A., Sun, J., Coleman, M.J., Bibb, M.J. and Jones, J.D.G. (2000a). Arabidopsis RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 3747-3752.

Van der Biezen, E.A., Freddie, C.T., Kahn, K., Parker, J.E. and Jones, J.D.G. (2002). Arabidopsis RPP4 is a member of the RPP5 multigene family of TIR-NB-LRR genes and confers downy mildew resistance through multiple signalling components. *The Plant J.*, **29**: 439-451.

Van der Merne, M., Winfield, M.O., Arnold, G.M. and Parker, J.S. (2000). Spatial and temporal aspects of the genetic structure of *Juniperus communis* populations. *Molecular Ecology*, **9**: 379-386.

Van der Vossen, E.A.G., Rouppe van der Voort, J.N.A.M., Kanyuka, K., Bendahmane, A., Sandbrink, H., Baulcombe, D.C., Bakker, J., Stiekema, W.J. and

Klein-Lankhorst, R.M. (2000). Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *The Plant J.*, **23**: 567-576.

Van Valen, L. (1976). Ecological species, multispecies and oaks. *Taxon*, **25** (2/3): 233-239.

Van West, P., Morris, B.M., Reid, B., Appiah, A.A., Osborne, M.C., Campbell, T.A. and Shepherd, S.J. (2002). Oomycete plant pathogens use electric fields to target roots. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **15** (8): 790-798.

Varela, M.C. and Valdivieso, T. (1996). Phenological phases of *Quercus suber* L. flowering. *Forest Genetics*, **3**: 93-102.

Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M-L., Ponchet, M., Maume, B., Osman, H. and Blein, J-P. (1999). Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1419**: 335-342.

Veitch, N. and Smith, A.T. (2001). Horseradish peroxidase. *Adv. In Inorg. Chem.*, **51**: 107-162.

Verdoucq, L., Vignols, F., Jacquot, J-P., Chartier, Y. and Meyer, Y. (1999). In vivo characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. *The J. of Biol. Chem.*, **274** (28): 19714-19722.

Vettraino, A.M., Barzanti, G.P., Bianco, M.C., Ragazzi, A., Capretti, P., Paoletti, E., Luisi, N., Anselmi, N. and Vannini, A. (2002). Occurrence of *Phytophthora* species in oak stands in Italy and their association with declining oak trees. *For. Path.*, **32**: 19-28.

Volloch, V., Schweitzer, B. and Rits, S. (1994). Ligation-mediated amplification of RNA from Murine Erythroid Cells Reveals a Novel Class of Beta-Globin mRNA with an extended 5'-untranslated region. *Nucleic Acids Research* **22**: 2507-2511.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, **23** (21): 4407-4414.

Wang, H., Li, J., Bostock, R.M. and Gilchrist, D.G. (1996). Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell*, **8**: 375-391.

Wang, Z-X., Yano, M., Yamanouchi, U., Iwamoto, M., Monna, L., Hayasaka, H., Katayose, Y. and Sasaki, T. (1999). The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to

the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *The Plant J.*, **19**: 55-64.

Warren, R.F., Henk, A., Mowery, P., Holub, E. and Innes, R.W. (1998). A mutation within the leucine-rich repeat domain of the *Arabidopsis* disease resistance gene *RPS5* partially suppresses multiple bacterial and downy mildew resistance genes. *The Plant Cell*, **10**: 1439-1452.

Welsh, J., Chada, K., Dalal, S.S., Cheng, R., Ralph, D. and McClelland, M. (1992). Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res.*, **20**: 4965-4974.

Wendehenne, D., Lamotte, O. Frachisse, J-M., Barbier-Brygoo, H. and Pugin, A. (2002). Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *The plant cell*, **14**: 1937-1951.

Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., and Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, **78**: 1101-1115.

Whittemore, A.T. and Schaal, B.A. (1991). Interspecific gene flow in sympatric oaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 2540-2544.

Wolpert, T.J., Dunkle, L.D. and Ciuffetti, L.M. (2002). Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name? *Annu. Rev. Phytopathol.*, **40**: 251-285.

Wu, S.C. and Hahlbrock, K. (1992). *In situ* localization of phenylpropanoid-related gene expression in different tissues of light-grown and dark-grown parsley seedlings. *Z. Naturforsch*, **47c**: 591-600.

Xu, N., Hagen, G. and Guilfoyle, T. (1997). Multiple auxin response modules in the soybean SAUR 15A promoter. *Plant Sci.*, **126**: 193-201.

Yamada, A., Tsutsumi, K., Tanimoto, S. and Ozeki, Y. (2003). Plant RelA/SpoT homolog confers salt tolerance in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Cell Physiol.*, **44** (1): 3-9.

Yanagisawa, S. and Schmidt, R.J. (1999). Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant J.*, **17** (2): 209-214.

Yanagisawa, S. (2000). Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *Plant J.*, **21** (3): 281-288.

Yoshimura, S., Yamanouchi, U., Katayose, Y., Toki, S., Wang, Z.-X., Kono, I., Kurata, N., Yano, M., Iwata, N. and Sasaki, T. (1998). Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 1663-1668.

Yu, D., Chen, C. and Chen, Z. (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell*, **13**: 1527-1539.

Yu, L.M. (1995). Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 4088-4094.

Zabeau, M. and Vos, P. (1993). Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. *European Patent Application* 924026297. Publication number 0534858A1.

Zhang, L.-H., Ozias-Akins, P., Kochert, G., Kresovich, S., Dean, R. and Hanna, W. (1999). Differentiation of bermudagrass (*Cynodon spp.*) genotypes by AFLP analyses. *Theor. Appl. Genet.*, **98**: 895-902.

Zhang, S., Du, H. and Klessig, F. (1998). Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora spp.*. *The Plant Cell*, **10**: 435-449.

Zhihuan, G., Yongbiao, X. and Jingrui, D. (2001). cDNA-AFLP analysis reveals that maize resistance to *Bipolaris maydis* is associated with the induction of multiple defense-related genes. *Chinese Sci. Bull.*, **46** (17): 1454-1458.

Zhou, C., Yang, Y. and Jong, A. Y. (1990). Mini-prep in ten minutes. *Bio/Technology*, **8**: 2.

Zhu, Q., Dröge-Laser, W., Dixon, R.A. and Lamb, C. (1996). Transcriptional activation of plant defense genes. *Curr. Opin. In Genetics & Develop.*, **6**: 624-630.

Zhou, X.L., Stumpf, M.A., Hoch, H.C. and Kung, C. (1991). A mechanosensitive channel in whole cells and in membrane patches of the fungus *Uromyces*. *Science*, **253**: 1415-1417.

Zoldos, V., Papes, D., Brown, S.C., Panaud, O. and Siljak-Yakovlev, S. (1998). Genome size and base composition of seven *Quercus* species: inter- and intra-population variation. *Genome*, **41**: 162-168.

Zoldos, V., Papes, D., Cerbah, M., Panaud, O., Besendorfer, V. and Siljak-Yakovlev, S. (1999). Molecular-cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal

conserved genome organization among 11 *Quercus* species. *Theoretical Applied Genetics*, **99**: 969-977.

Zou, H., Li, Y., Liu, X. and Wang, X. (1999). An APAF-1 cytochrome *c* multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *The J. Biol. Chem.*, **274**: 11549-11556.

ANEXO I - Sequências nucleotídicas dos fragmentos AFLP.

Sequências nucleotídicas dos fragmentos AFLP. A designação dos fragmentos corresponde à utilizada no ponto I.4.1.2 dos resultados e discussão.

-J17

```
1 TAAATTCAAG CAGANGATGA AAATATGGAG AGAATCAAGG TAATCCTTGA
51 AACTTACTCT AGCTGGTTTG GATAGAAAGT AAACCTTTTG AAGTCTCTGA
101 CAATTTTCAG TAAAAACCTT TCACATGGGG TGAAAAATCG CCTAGCTAGG
151 TCGATAGGAA TAAATGTCTC AGATAGAAAA GAAAAATATT TGGGCATTGC
201 TATGGCCTCT TGTAAGGATA AAAAGGCAAC ATCAAAGGAG ATTATAAAAA
251 AAGTAAAGTC AAAGCCTCAA GGATGGAAAA TGAAAACCTT ATCACAGGCG
301 GGCAGAACTA CCCTTATCAC ATCAATGGTG AATT 334
```

-J42

```
1 TAAATTGGGA GAGGACGGAC GAGGCAAATA TTCTAAACTT AGAACTTTAC
51 CTATAAACCG AAGCCTTCAT TGTTTGTGAT AAGACACCGG TTCAGATAAA
101 GTAACCTCCA TGGAAGTTAT GGAAGTTACC TCTGACTTTG GTGAATT 147
```

-K20

```
1 TAAACCAACT TTGAGNNAGN CTAATAAAGA CTAATACAA TGTTTTGATC
51 ATGGTTTGCC AACATTGCAA ATTAGAGTTC TAAATACATA AAATCCTAAG
101 ACCTTAGAAC CTAACAATTC GCTCTTTATG GTCCATTTTG GTCCACTTTC
151 GTCCCTTAGG TACACTTTAT TCCATGAGGT CCTTTTGCTC CATTTCGTCC
201 ACTTTGGTCT TTTAGGTCCC AAATGATTTG GTCCTTTTGT CCACTTCACT
251 CTATTAGGTC CACTTCGGTG AATT 274
```

-K22

```
1 TAAACCACCT GTGAGTGAGG TTGTCAAACC CGTAGAAGTT TTACCTCCTA
51 AGAAGAATAG GGTTGATCTG AGAGAAACTA AACCTACCCT TTCTAAGGAC
101 AAGATGCATG GTAAACCTGC TTGGGTTTGT CATTTTTGTG GTAAGTCTAG
151 ACACATTCGT TCTAACTGTT ACAAGCTTCA AGCTGCTAAG AGAGCAAACA
201 AACCAAAAGT CTCTGTGTCA CAAGCACAAG ATCCTATGGC ACTTATTGGT
251 GAATT 255
```

-K27

```
1 TAAACCTCAT GATGGTTGNA AGACACCTNA TGTCAGCTGC AAAGGCAGTA
51 GTGTTGAGGC ATTTCCCTTC TCTAACTCCA CCAATATGAG ATTGGACAAT
101 TTCAATGGAT AGCATCCTGT CTTTGTAAATG GGTGAAGTCA TGGTCATCCA
151 TATCTCCAAA CCCCAGCACC TCATCTATGT CATCTACATC TATGGTGAAT
201 T
```

-K31

```
1 TAAACCAACA AGTGGGcACG CAAAAGCCCA ACTTGTGGCT TCAGCTAGCC
51 CAAAAGGCAA GGGCCACTTA GAACTGCCTA AACCAATACT TCTAAGTGTT
101 GAGAATACAC TTTCTGTGTG TATGAAGGTG TTAGGCGAGT GTTCGAGAGG
151 TGGTGGGTTG CCAGCAAGTG GTGAATT 177
```

-L23

```
1 TAAACCCAAA GGCTcATTGC CCACCCCTCA ACCCAAATAG GCAAACACCC
51 TTATCTCATT CCTTTCTAAT TATTTGAAGG ACATTTTACC ATTTCAAAAA
101 CCTCCAGTGA TGTGCATGAA ATATATACAA TAAAGTACTC ACATATCTAC
151 ATATTTAGCC TTACTTTTAT GTTATTTTAT GACTGATTAT ATAATATATT
201 TGTGTTGTAG GTAACAAGGG CTTTACATGC AAAGTGGGCT AGGCCAATTG
251 AATCAAGCCA ACTTACATCC AGCTAGGCAT GAATT 285
```

-M29

```
1 AATTCACCAC ATAGAAAGGG GTCAACTGAG TTCTGCTTCC CACGGTCAGA
51 TCTAGTGACC AGAGGACACT TCTTACTAAT TGAGCAAAAG GGCAGCATAG
101 TCCATTAGGG AGGAATACGG GGAActAAAG GTACGGATCC CAGAGGTATC
151 CGGACAAGGT GATGCAACAA TGGGTAGACA AAATAAATAT TAGAAGATAC
201 TAGTTCAAGC TACTAAGGGA AAGCTTTTAT TATGAGTATA AATCCATTA 249
```

-M30

```
1 TAATGGCCAC AATGGCGAAA TCAAGTGACC ACGTTACCTT CATCAGCGAA
51 TCTAGTGAGA TCTAGCTTGA TTATTTTCTA ATATGCTAGT GGTGAGATGA
101 GGTCAAGAAG AAACGAATTG GGAAGATAT GAAAAAAAAA TCAAGAGAGA
151 GCTGCACTGA AATGAATTGA GGAAGAAAGA TGTGAGTTA TGGTTTGTA
201 TTTGTATTTT TCTGGTACTC GGAATTTGGA ATTGTGATTG GTGAATT 247
```

-M32

```
1 AATTCACCAA CATGGAagGC CAAGAGGCAA AAGCGTGTCC TCAATGGAGT
51 ATCTATATGG ACAGGTCGTC TAACAGACAA GCAGACGAAG TTGGTATAGT
101 ACTTCATTCC CCAAAAAGGA ACGAGATTGA ATGCATGGTC CGACTCGATT
151 TTCCTACAAC CAATAATGAA ACGAAGTACG AATCTTTAGT AGCAGGGCTA
201 GATCTCGCCA AAGCAGCATG AGCCATTA 228
```

-M36

```
1 TAATGGGTAC ATTCTtGTTG GtTTACTTGC TAAAGAGTGT TGAAGATGGC
51 TGAGTGAGCG TGTGCCAGGG TGTCTCACCC AAATGACAAT AGTATAAGGA
101 GTCTTATATG GGAAGTATGG GAGTAGCTAA GGGGTGTGAG AGAGAGGTGG
151 GATGCAGCTT GATGTAATGC TGGTGAATT 179
```

-M37

```
1 TAATGGGACC ATATGCTATC ATTTGTACAT TATTCTATTA GAATTTTCAG
51 ATTGCAGACT AGCCAGTGAA ATTTCCCTTAG CTGGAAGCTC TTGATCATGT
101 CAACCATATC CTTGCATGCA AGCCACAGTC CTTACTAAGG GGGTGTTTAC
151 ATTTGCTCCC TAGTCGTGTG GTGAATT 177
```

-M39

```
1 AATTCACCAA CGGGGAaGAC AAGGGGGTAG AGAAATGCC TCAATAGAGT
51 ATACATAAAG ACGGGTCATC CAACAGGCAG GCCAAGGGAG TAGGTGTCAT
101 GTTCCTTTCT CCTGAAGGAG ACAAGATTGA ATGTATGGTC CACCTCGACT
151 TTCCTACCAT TA 162
```

-N27

```
1 AATTCACCAC ATTTGGGAGT GTAGAGAAGA GAGAAACTAT GATGATGTTG
51 ATGGACAAAG CTATGATCAT ATTGTTGAAC AAAGGGCTAG AAACCCAAGA
101 ATCCACGCCC ATAGCTGTGT GTGAGAGAGA TATCAAAAAC CAAGCTTATG
151 CAATGAATAT ATATATATAG TGTGGGTTTG GATAGCAATT A 191
```

-N33

```
1 ATTGGCGCAT cAACCAGATG ATCACATGTA TGTTTACTCT CTACTAGAAA
51 TGTTGCATTT GCTAGGCTTC TTGCTCAAAT AATTAGGAAA TTGATAATTA
101 GGTTGCGAGC ACAATTTTCCT AATTATCCAA TTAGGAAAAT ACGTTTAGAT
151 AATGCTGGTG AATT 164
```

-N35

```
1 TAATTGCCAA TGTGcTAAAA ATTATGATTT TACTAAAACA AAGGACTGTC
51 TACGGACAGG CATTGTAGGG TGCTACTTGC TCACTCCCAA GTGCAGAAGA
101 TCGTAGCTAT ATAATTCTTG GAGTATCGTG GTCGAACCAC AAGGAGCAGG
151 GTGAATT 157
```

ANEXO II - Sequências nucleotídicas dos fragmentos cDNA-AFLP.

Sequências nucleotídicas dos fragmentos cDNA-AFLP. A designação dos fragmentos corresponde à utilizada na tabela 13 dos resultados e discussão (II.4.1.1.).

-C1 (Clone 1.1)

1 ACCCGACGAG GATTGATCAC GGTCACCTGA GATGAATATG ATTTCAAATG GGTGTGCTT TCTTTGATC
TCATTGTATG CTTTACAAG CTTAGGCAGG AATGCGCGAC ATGGGGGCA CCAAGTGAAGT GAAAAATAGA
GCAGAATGTT CTTTCCAAC AGTTCAGACA CCAGGACCTT GGAACCACTT TTGTCTATCA CAAAATCACT
TTCTCAGAA ACTAAAATTG TTTCTAGCGT CTGTGCTTCA AGTCTAGCCT TCTCAATCTC AGCAAGCTCA
GCAAGCTTCT CTGGAGTAAA AGGTAAGCT TCAATACCAT GCTCCTCAAT GAGTTCAGCC ACATTTGGT 350

-C2 (Clone 2.1)

1 ACCCGACGAG ATAATCGGTT TTGCTGCCGT CCAGATACCA GCGGGGCATG CCGCCCCAGG TCGGGCTGTC
GGTGTGGT TGCTGGAATT CGTAGCCTGC GAAAGCAGG GTGGAATCAG TCAGGTCAGC ATCAACGGTG
GCATAGACGA ATTTTTTGT TGCGCCGTA CGTTCAACGT AGCCGTTTTT GTCCGTATAA CCGGGCATCA
GACGGCCACG TATACTGCCG GTTTCGTTCA GCGGAGTGGC TAAATCCGCC ACGTAACGCT GTTTATTCCA
GCTGCCGTAA GTAGCCGAAA CATTACCGGT 310

-C3 (Clone 3.1)

1 GACTGCGTAC CAATCACCT GTTGAAGTGT GTTGTGAATG AATCTGTTGT CACTGTTTCA TGGATGAAT
TGTTGTCAAT CAAAACACAA GGGATGTGAG CTATCTTGA CCACTCTGT CTTTTCTCAT TATTGCAATG
TTGACTTAGC AGAGGACAA TACGGATTC AAGTTGTGTA AGTGAGGGAG GCAGTCCCTC CTTTGGTAAG
GATGTGAGCT TTAGGCAAT ATAGATCTT AGTTGGTTA CTCAGGACTC ATC 263

-C4 (Clone 4.2)

1 ACCGTTGATT TTCTGTGCAC CATTACCATC ACACCAGGTC TAGTTGCCGC GCAAGAACCA ACTAGAAGGA
AAACGAAAAA TATAACATGA AAAGTGTGTC ATGAAACATG TTGGGATTTA GAATTAGAAA GAGAAGAAGC
CATTGGAGAA GTTGTNTGG GGAGCTATAA GAAAGGGT 178

-C8 (Clone 8.1)

1 GACTGCGTAC CAATCACCC GAGAGAGTGA CAAGGAAAC TTTTGTATGT TGAAGCAGTA TGCACGACGT
GCACTACGCC ATGCCATGCT GCACGCTCAA GGCTGATGAT GTTGCCTGCA AGTGAAATGT GTGCGTTTGG
TGGTCAATTG GATCTGGCTG GACGGGGGAT TGCCCTTGGT ATTGGAATGG GCTTTTCGTT CATAGTGGCT
TTTGTTTTGT AGCGTGCAAG TGAATGTGT GTCAATGGG ATCTCGCTGG AAGGGGGATT GCCTTGGTTT
ACTCAGGACT CATC 294

-C9 (Clone 9.2)

1 ACCCAAATG GATGTGAAT TGAAAGAATT ATCCCTATCC ATGTAATGTG GAAACAATTC AGCCTTCAGT
TCTCTGGAA CTTCAATCTC TAGGTCTGTG ACATTATGAT AGAAGGGAGA TGCAGTGTGG AAAACCCCAT
CACAGCCCTC AACAGCAGAA TCAAAAAGAAC CTCTTCCAG TAGATTGTCT TTGAATAGGT 200

-C13 (Clone 13.2)

1 ACCCATGCT CCACCGCTTG TGCGGGCCCC TGAGCAGACT GCCGGTGATA AGCCGGAGGA AGGTGAGGAT
GACGTCAAGT CATCATGCC CTTATGCCCT GGGCGACACA CGTGCTACAA TGGCCGGGAC AAAGGGTCGC
GATCCCGCA GGGTGAGCTA ACCCAAATA CCCGCTCTCA GTTCGGATTG TAGGCTGCAA CTCGCCTGCA
TGAAGCCGGA ATCGCTAGTA ATCGCCGGTC AGCCATACGG CCGT 254

-C14 (Clone 14.1)

1 ACCGAAAGG AGATGGGTAG CCAGAAGCGG GTGTTTATAA GTAGCACACA CAAACAGATC AAACATATAA
TAATACTTAC TAATACAACA GAAATCCTTA TACCAAGAA GAAGTGGAGA AGATGACCAT TGGACTGATC
AGCGACGATA CTCAGAGCTG TTTGGAACAA GCACAGTTG TAATGGAAGC CTCGAAGTCT TCATCCGTAG
GCCAGCCAGA TTCTTCTCCC ACTGTAATTA GGGT 244

-C36 (Clone 36.1)

1 ACCCATGCC TATGCTGATT CGATTAGGCC ACCCTGCACA TTCCCTTCGC ATTCTGAGGA TTGTCCGTAT
TCATATAAGC CACACTGTGG CCAGGATGGG CCTGTGTTTG TGATCATGAT TGAGAATGAT AAGATGTCAG
TACAGGAGTT TCCTGCTAAC TCGACGATAA TGGATTTGTT GGAAAGATCT GGACGAGGAA GCTCAAGATG
GACACCGTAT GGTTCCTT TGAAGGAAGA ATTGAGGCCA AGGCTGAACC ATCAGCCAGT GAATGACCCC
ATGTGCAAGT TGAAAATGGG GGATGTGTTG GAG 313

-C39 (Clone 39.2)

1 CTCAGTGGAA AATTGAAGGC ATTATATGTA CTGAACGTCT GGGTTTGCAG AAAATTGAAT ATCCAGAATA
GTAGGT 76

-C42 (Clone 42.1)

1 ACCAACACCC AGNGAAATGT TGACCAGCAG CACGCCTGCC AGCAGCAGGT AGAAGCTCAG GGAGTTCAGG
AACGGGAAGG CAACGTCACG TGCACCGATC TGCAGAGGAA CCGCAAGGTT CATCAGGCCG GTGAAGAACG
GCATCGCCAT GAAGATGATC ATGATCACAC CGTGGGCGGT GAAGATCTGG TCATAGTGTT CAGGCGGCAG
GTAGCCTTCG GAGCCACCGG TGGCGGCGGC CAGCTGGGTA CGCATCATGA TCGCGTCGGC GAAGCCGCGC
AGCAGCATGA CCATAGCGAC NATGATGTAC ATCACGCCGA TTTTCTTGTG GTCGACCGTG GTCAGCCACT
CGGTCCACAA GTNNGTCACT TGCGGAAATA GGTGATGGCA CCAACG 396

-C44 (Clone 44.1)

1 CTCGTTTTAC TGACTGGGTA TCTAACTTAC TAACTGGTG TTTAGATCAC TATATCAAAA CAATGGCTAT
TGTATTAGTA ATGTTCTTTG GAACGATCTT CTGGTTAATG GGAGGCGGAT ACATTGGAGG AGAGTTCTTC
GCAGCATCTG ATAGTGGT 158

-C46 (Clone 46.1)

1 ACCAAGTGTT GGATTGTTCA CCCACCAGTA GGGAACGTGA GCTGGAGTTA CTCAGGACTC ATCATCTGAT
AGCGTGCTAA GCGCGAGCTT CGAAAGGGAA TCGAG 105

-C47 (Clone 47.1)

1 ACCGACCACT GTTACAAACT TTGCTGGTTT TCGAAGTAAA AACCGATCAA CTTCGGCGGG CGAGAGAGGG
TCACCCGAAG GAAGGGCCAA ACGAG 95

-C53 (Clone 53.1)

1 ACCCATGCC TATGCTGATT CGATTAGGCC ACCCTGCACA TTCCCTTCGC ATTCTGAGGA TTGTCCGTAT
TCATATAAGC CACACTGTGG CCAGGATGGG CCTGTGTTTG TGATCATGAT TGAGAATGAT AAGATGTCAG
TACAGGAGTT TCCTGCTAAC TCGACTATAA TGGATTTGTT GGAAAGATCT GGACGAGGAA GCTCAAGATG
GACACCGTAT GGTTCCTT TGAAGGAAGA ATTGAGGCCA AGGCTGAACC ATCAGCCAGT GAATGACCCC
ATGTGCAAGT TGAAAATGGG GGATGTGTTG GAG 313

-C54 (Clone 54.1)

1 ACCAAGNGTT GGATTGTTCA CCCACCAATA GGGAACGTGA GCTGACATCG AAGGATCAAA AAGCAACGTC
GCTATGAACG CTGGCTGCC ACAAGCCAGN TATCCCTGTG GNACTTTTC TGACACCTCT AGCTTCAAA
TCTATTTCTC TACCACCCTT TCCTGGGAGG GAGTGCTCAA TAGACCAAGG GAGCCTGAC CCTCACAGCC
ACCTTCTCTT TGGAG 225

-C72 (Clone 72.1)

1 ACCACATCAT CCACCCTTG TGCGGGTCCC CGTCAATTCC TTTGAGTTT AACCTTGCGG CCGTACTCCC
CAGCGGTCA ACTTCACGGG TTAGCTTCGT TACTGAGTCA GTGAAGACCC AACCAACAGT TGACATCGTT
TAGGGCGTGG ACTACCAGGG TATCTAATCC TGTGCTCC CCACGCTTTC GTGCATGAGC GTCAGTATTG
ACCCAGGGGG CTGCCTTCGC CATCGGTATT CCTCCACATC TCTACGCATT TCACTGCTAC ACGTG 275

-C73 (Clone 73.1)

1 ACCATTCATG CGCGTCACTA ATTAGATGAC GATGAGTCCT GAGTAAGACC CGACAACCTAG TAGACATCGT
TTAGGGCGTG GACTACCAGG GTATCTAATC CTGTTTGCTC CCCACGCTTT CGTGATGAG CGTCAATCTT
GACCCAGGGG GCTGCCTTCG CCATCGGTGT TCCTCCACAT CTCTACGCAT TTCCTGCTA CACGTG 206

-C77 (Clone 77.1)

1 ACCAACTATT TCTTCTCTC CTTCTCAGCT TCTGCTGCTT TCTTCTGCCT GGCACCAACA TGACGATGAG
TCCTGAGTAA GTGCGACTGG CTATTTTAC ACATTTGTAT GAAGCAACGT CTCGTCGAT ACTATCTCTA
GAGCTTGTA GACCGCGACT GATCCTCAAA GGAATGAATG GAAAAAGCAG CATGTCGTAT CAATGTG 207

-C78 (Clone 78.1)

1 ACCTCACTGT CTTTGACAAT GGCCTGCACT GGCCAATGGT GACGATGAGT CCTGAGTAAG TGCGACTGGC
TATTTTTACA CATTGTATG AAGCAACGTC TTCGTCGATA CTATCTCTAG AGCTTGTAAG ACCGCGACTG
ATCCTCAAAG GAATGAATGG AAAAAGCAGC ATGTCGTATC AATGTG 186

-C83 (Clone 83.1)

1 CCCGGCCAGG CCAACAACAT CACCATCAAA GTTGGTACGC GAGCCAACCG CACGAAC TTT CGAGTAATTG
TGATCCGGCG AGAACAATGT CCAGGACTGA TAACCAGTGC CGTCATTCAA CGCCCGGAAA GTGATGATCG
TAGGCTGCC GGTGCTGTTC TGGAAATGGT AGTGACCGTA TACGATGTCG TAATTGACGC CGTTCGGCT
GAATTTCCG CTGAAGGTGC CGTTGGAGTC GTTGCCATCG GTAATCGTCA GTTTGGCGCC AGCGTTAGCG
TTTACATAAT TGCCA 295

-C84 (Clone 84.1)

1 CACAAGGACG ACCTAATTCA GTCCACACAT CCTGTGGGGA CGCACCGAAA GGAATATGTT GGCCACCAAC
AGTAGAATAT AATTCTTCTC CAAGCTTAAC ATGCACCTCT TCCATGTAAA GACTGCCAGC AGGTAATGGA
GGAGCATAAG CCTGTCCA 159

-C85 (Clone 85.1)

1 CAGCCGACTA AATTGAACAT CATGAACAGT CAAATAGATT GGCCTGAGCC AATAGTTCGA GTCCAATCCT
TGCTGACAG CCGGTTACCT GTGATTCTG ATCGATACGT CAAGCCTCCG ACTGAAAGGC CAGCCA 136

-C95 (Clone 95.1)

1 ATTGAAGACA TGAAGACTAC TCAAGAACTG TTCAAGAAAA GTGCAATATG TAGGTCTCGA CGATGAGTCC
TGAGTACGCG AATACCGGAA GCAGAACC GG ATCACCAAAT GCGTACAGGC GTCATCGCCG CCCAGCAACA
GCACAACCCA AACTGAGCCG TAGCCACTGT CTGTCT 177

-C96 (Clone 96.3)

1 AGCAACCTTA TGTTTGGGGT GGAGAGCCTG AGTTGCTGAT GGCTTCTCAT GTTTTGAAGA CGCCAATATC
AGTCTTCATG ATAAATAGAA CATCGGGTGC TTTGGTAAAC ATAGCGAAAT ATGGTGAAGA GTATCGAAAG
GATGAAGAGA GTCCCATAAA TGTGCTGTTT CATGGGTATG GTCACATGA CCTGTTGGAG TATATCTCAG
AAGAAAGTTG CCAGAAATAA ACGTGTAGAA GTTGGCTATA AATTCTTCAT GCCTGAATCA AATAAGNCTA
AACACAATA GGAAGAGTGT ACNITTCCAC TGAGCAAGTG CTCGGCTGA TCAAGATACT GNCTCAAGTT
CAGCGGNTTG CTGCAATTAT CTCAAT 376

-C98 (Clone 98.1)

1 ATTCATTAGA ATTAGAGAAA GTTCTCTGCT GTACTTTTAG TCCATTTGCT GTTCCATTAT TTCAACTGC
CAGATACATT CCGGTTGATT TTAATAAAT GTAATAATTG CCGGCCCGT CAGAAACAAA TCTCCAACGC
TGGTTATTT CACCACCGT AGTTATATCA TATTGCT 177

-C103 (Clone 103.1)

1 AGGCATTACG AAATATGGGA CTACGGGGGG GCATTCCATC CTCAAAAAGG AGGATTTGAT TGAGTATCGA
GGAGTCAAAG AATGAAGCC AAAATACCAA ATGAAAATAG ATCGATTTT TTTCATTCCC GAGGAAGTAC
ATATTTTGGC AGAATCTTCT TCCATAATGG TACAGAACAA TAGTCTCATT GGACTAGATA CACGAATCAC
CTTACTCAG ACTCATCGTC ATTGTACACC GGCTGCTTTC TGCATCTTAA GGGATATACA AGCTTCCATC
AATATTCCAA GACAGAGCCC AACTAACTAG TATCGCTGAC AAT 323

ANEXO III-ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema geral das metodologias a serem adoptadas num estudo de taxonomia numérica...	30
Figura 2. Áreas dos tipos de povoamento florestal em Portugal continental...	32
Figura 3. Distribuição percentual dos tipos de povoamento florestal...	32
Figura 4. Distribuição de povoamentos de <i>Q. suber</i> e <i>Q. rotundifolia</i> em Portugal...	35
Figura 5. Esquema que ilustra o funcionamento do montado...	36
Figura 6. Mapa geográfico de Portugal Continental...	51
Figura 7. Sobreiro BS281HA...	59
Figura 8. Sobreiro BS268HA...	60
Figura 9. Sobreiro BS284HA...	61
Figura 10. Folhas de sobreiros da Herdade do Azinhal, Grândola, Alentejo...	62
Figura 11. Exemplo dos perfis AFLP...	70
Figura 12. Separação por electroforese em gel de poliácridamida dos fragmentos amplificados com o par de <i>primers EcoRI-ACC/MseI-ATT</i> ...	76
Figura 13. Fenograma da combinação I1...	78
Figura 14. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores, obtida pela análise em coordenadas principais, baseada no coeficiente de <i>Jaccard</i> (combinação I1) ...	80
Figura 15. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais. A atribuição de padrões aos pontos para identificação do grau de desfoliação...	81
Figura 16. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais. A atribuição de padrões aos pontos, para identificação da qualidade da cortiça...	82
Figura 17. Projecção dos pontos representativos dos 57 marcadores AFLP (J1 a J57) nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2...	79
Figura 18. Separação por electroforese em gel de poliácridamida dos fragmentos amplificados com os <i>primers EcoRI-ACC/MseI-ACC</i> (combinação I2) ...	86
Figura 19. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais, baseada no coeficiente de <i>Jaccard</i> (combinação I2) ...	89
Figura 20. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais. A atribuição de padrões aos pontos para identificação do grau de desfoliação...	90
Figura 21. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais. A atribuição de padrões aos pontos para identificação da qualidade da cortiça...	91
Figura 22. Projecção dos pontos representativos dos 55 marcadores AFLP (K1 a K55) nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2. ...	88
Figura 23. Fenograma da combinação I2...	92
Figura 24. Separação por electroforese em gel de poliácridamida dos fragmentos amplificados com os <i>primers EcoRI-ACG/MseI-ACC</i> (combinação I3) ...	96
Figura 25. Separação por electroforese em gel de poliácridamida dos fragmentos amplificados com os <i>primers EcoRI-ACC/MseI-TTG</i> (combinação I10) ...	97
Figura 26. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais da combinação I3, baseada no coeficiente de <i>Jaccard</i> ...	98
Figura 27. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais da combinação I10, baseada no coeficiente de <i>Jaccard</i> ...	99
Figura 28. Fenograma da combinação I3...	100
Figura 29. Fenograma da combinação I10...	101
Figura 30. Separação por electroforese em gel de poliácridamida dos fragmentos amplificados com os <i>primers EcoRI-ACC/MseI-TGG</i> (combinação I9) ...	107
Figura 31. Fenograma da combinação I9...	109

Figura 32. Projecção dos pontos representativos das 365 árvores, nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais dos dados AFLP da combinação I9...	111
Figura 33. Perspectiva de ordenação dos pontos representativos das 365 árvores no espaço das três primeiras dimensões...	112
Figura 34. Projecção dos pontos representativos dos 56 fragmentos AFLP nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2...	110
Figura 35. Fenograma da combinação I1, I2, I3, I9 e I10...	118
Figura 36. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores, nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 2, obtida pela análise em coordenadas principais dos dados AFLP resultante da soma das matrizes das combinações I1, I2, I3, I9 e I10...	119
Figura 37. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores, nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 3, obtida pela análise em coordenadas principais dos dados AFLP resultante da soma das matrizes das combinações I1, I2, I3, I9 e I10...	121
Figura 38. Projecção dos pontos representativos dos 291 fragmentos AFLP nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 3...	120
Figura 39. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores, nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 3, obtida pela análise em coordenadas principais dos dados AFLP resultante da soma das matrizes das combinações I1, I2, I3, I9 e I10. A atribuição de padrões aos pontos para identificação da qualidade da cortiça...	122
Figura 40. Projecção dos pontos representativos das 315 árvores, nos planos definidos pelos eixos principais 1 e 3, obtida pela análise em coordenadas principais dos dados AFLP resultante da soma das matrizes das combinações I1, I2, I3, I9 e I10. A atribuição de padrões aos pontos para identificação do grau de desfoliação...	123
Figura 41. Separação electroforética de fragmentos AFLP, presentes nos perfis obtidos com as combinações I1, I2, I3, I9 e I10...	125
Figura 42. Fenómeno de atracção dos zoósporos de oomicetes para as raízes das plantas...	141
Figura 43. Tipos de interacção genética que ocorrem entre plantas e agentes patogénicos...	146
Figura 44. Modelo para entrada das elicitinias nas células do tabaco via endocitose, mediada por um receptor e interacção com um receptor intracelular...	157
Figura 45. Modelo hipotético que integra os acontecimentos observados nas células do tabaco por acção da criptogéina...	158
Figura 46. Representação esquemática dos domínios conservados dos produtos dos genes de resistência a doenças, nas plantas e de proteínas do sistema imunológico, nos animais...	164
Figura 47. Sobreiros com 1 ano de idade em solo infestado artificialmente...	170
Figura 48. Raízes de sobreiro...	171
Figura 49. Sobreiro com G.D. = 0, localizado num local de declínio na Herdade dos Leitões, em Montargil...	173
Figura 50. Sobreiros com G.D. = 3, localizados num local de declínio na Herdade dos Leitões, em Montargil...	174
Figura 51. Alinhamento das regiões codificantes das sequências nucleotídicas dos genes <i>CAD</i> ...	187
Figura 52. Alinhamento das regiões codificantes das sequências nucleotídicas dos genes <i>PAL</i> ...	188
Figura 53. Alinhamento das regiões codificantes das sequências nucleotídicas dos genes <i>POX</i> ...	189
Figura 54. Esquema que ilustra o procedimento seguido na análise do mRNA de <i>Q. suber</i> e <i>Q. rotundifolia</i> por cDNA-AFLP...	226
Figura 55. Exemplo do perfil de mRNA, obtido por cDNA-AFLP...	227
Figura 56. Alinhamento das sequências de cDNA dos genes...	230
Figura 57. Sequência do cDNA de gene <i>QsCAD1</i> ...	232
Figura 58. Alinhamento e comparação das sequências em aminoácidos...	236
Figura 59. Árvore filogenética...	237
Figura 60. Alinhamento múltiplo das sequências em aminoácidos do domínio do local de ligação potencial de NAD/NADP(H) ...	238
Figura 61. Alinhamento das sequências de cDNA do gene <i>QsCAD1</i> e do fragmento C9...	241
Figura 62. Análise do padrão de expressão do gene <i>QsCAD1</i> em raízes de <i>Q. suber</i> ...	243
Figura 63. Sequência nucleotídica parcial do gene de resistência de <i>Q. suber</i> ...	246
Figura 64. Alinhamento das sequências nucleotídicas dos alelos <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> e <i>d</i> do gene de resistência <i>QsRPs</i> ...	248
Figura 65. A: Esquema representativo dos fragmentos amplificados e sequenciados de cDNA e de DNA do gene <i>QsRPs</i> de <i>Q. suber</i> . B: Indicação das sequências comuns...	250
Figura 66. Sobreposição das sequências de cDNA do gene <i>QsRPs</i> ...	251

Figura 67. Separação por electroforese em gel de agarose 1 % de fragmentos amplificados do gene <i>QsRPr</i> ...	253
Figura 68. Representação esquemática dos domínios estruturais e funcionais da proteína de resistência, deduzida do gene <i>QsRPr</i> ...	254
Figura 69. Sequência em aminoácidos da proteína deduzida do cDNA do gene <i>QsRPr</i> ...	255
Figura 70. Alinhamento das sequências em aminoácidos das proteínas de resistência deduzidas dos genes de resistência <i>I2</i> do tomateiro, <i>JA78</i> do feijoeiro e <i>QsRPr</i> do sobreiro...	258
Figura 71. Alinhamento dos segmentos da <i>QsRPr</i> que apresentam motivos ricos em leucinas...	260
Figura 72. A. Padrão de expressão do gene <i>QsRPr</i> , analisada por RT-PCR e hibridação... B. Gráfico de barras representando as quantidades relativas, em percentagem, de mRNA de <i>QsRPr</i> ...	262
Figura 73. A: Separação electroforética dos fragmentos amplificados com os <i>primers</i> PR2 e PR3... B: Perfis de restrição obtidos por digestão com <i>Mse</i> I...	267
Figura 74. Representação esquemática das sequências dos alelos <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> e <i>d</i> do gene <i>QsRPr</i> ...	266
Figura 75. Padrões de restrição criados por <i>Mse</i> I, previstos para os alelos <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> e <i>d</i> do gene <i>QsRPr</i> ...	266
Figura 76. Representação do DNA e do cDNA do gene <i>QsPDI</i> ...	271
Figura 77. Alinhamento das sequências nucleotídicas do DNA (negro) e do cDNA (azul) do gene <i>QsPDI</i> ...	272
Figura 78. Sequência da região do promotor do gene <i>QsPDI</i> ...	275
Figura 79. Alinhamento das sequências das proteínas deduzidas das regiões codificantes de <i>QsPDI-1</i> e <i>QsPDI-2</i> ...	276
Figura 80. A. Representação das sequências dos três módulos repetidos.... B. Representação esquemática da proteína <i>QsPDI</i> ...	277
Figura 81 Alinhamento das sequências de aminoácidos dos módulos <i>a</i> e <i>a'</i> de <i>QsPDI</i> ...	278
Figura 82. A. Padrão de expressão do gene <i>QsPDI</i> , analisada por RT-PCR e hibridação..... B. Gráfico de barras representando as quantidades relativas, em percentagem, de mRNA de <i>QsPDI</i> ...	280
Figura 83. mecanismos possíveis para a formação, redução e isomerização de ligações dissulfureto...	281
Figura 84. Análise do gene <i>QsPDI</i> por PCR-RFLP efectuada em seis sobreiros...	285
Figura 85. A: Sequências do fragmento de DNA genómico amplificado com os <i>primers</i> TIO e C1SP1 B: Representação esquemática dos locais de restrição previstos na sequência de <i>QsPDI-1</i> .	286
Figura 86. Sequência nucleotídica parcial do gene <i>QsRSH</i> de <i>Q. suber</i> ...	289
Figura 87. Estrutura do gene <i>AtRSH2</i> de <i>A. thaliana</i> ...	290
Figura 88. Estrutura prevista para o gene <i>QsRSH</i> de <i>Q. suber</i> ...	290
Figura 89. A. Alinhamento das sequências de cDNA e de DNA do gene <i>QsRSH</i> . B. Esquema com o alinhamento dos fragmentos...	291
Figura 90. Sequência em aminoácidos, traduzida das sequências nucleotídicas das regiões codificantes, do fragmento de gene <i>QsRSH</i> ...	293
Figura 91. Comparação entre as sequências de <i>AtRSH1</i> ...	296
Figura 92. Vias metabólicas da síntese de monolenóis, ácidos fenólicos (ácidos hidroxicinâmicos) e seus derivados...	298
Figura 93. Comparação entre a sequência amplificada com os <i>primers</i> PCAD2/PCAD4 e a sequência da região codificante do gene duma cinamil álcool desidrogenase...	300
Figura 94. Alinhamento da sequência nucleotídica duma peroxidase de <i>P. kitakamiensis</i> (POPPrXA1/ID: D11102) com a sequência amplificada com os <i>primers</i> PAP4 e PAP5 em <i>Q. suber</i> ...	301
Figura 95. Alinhamento da sequência do gene de referência D43802, entre o codão de iniciação ATG e o de terminação TAA, com a sequência amplificada em <i>Q. suber</i> ...	302
Figura 96. Sequência do DNA do gene <i>QsPOX1</i> constituída por 4221 ...pb	304
Figura 97. Organização dos elementos constituintes do gene <i>QsPOX1</i> ...	305
Figura 98. Sequência do nucleotídica da região do promotor de gene <i>QsPOX1</i> de <i>Q. suber</i> ...	307
Figura 99. Sequência em aminoácidos da proteína <i>QsPOX1</i> , deduzida da sequência de DNA...	313
Figura 100. Representação esquemática dos domínios da proteína <i>QsPOX1</i> ...	314
Figura 101. Alinhamento das sequências em aminoácidos de 1SCH A (peroxidase da classe III de <i>Arachis hypogaea</i>) e de <i>QsPOX1</i> (peroxidase de <i>Q. suber</i>) ...	315
Figura 102. Representação da estrutura 3D da peroxidase catiónica 1SCH A da classe III de <i>A. hypogaea</i> ...	316
Figura 103. Sequência nucleotídica do cDNA de <i>QsPOX2</i> e sequência em aminoácidos da proteína deduzida...	317
Figura 104. Alinhamento das sequências de aminoácidos <i>QsPOX2</i> e <i>QsPOX1</i> ...	317

Figura 105. Alinhamento das sequências em aminoácidos entre o local de ligação proximal do grupo heme e o resíduo de ácido aspártico (D) de POXs...	320
Figura 106. Padrão de expressão de genes de peroxidases, analisado por RT-PCR e hibridação...	321
Figura 107. Gráfico de barras com as quantidades relativas, em percentagem, de mRNA de <i>QsPOX1</i> e/ou <i>QsPOX2</i> ...	321
Figura 108. Esquema ilustrativo das mutações que podem ocorrer durante a replicação do DNA...	323
Figura 109. Organização dos fragmentos do gene <i>QsCAD2</i> amplificados com os <i>primers</i> Pcad2/Pcad4 a partir de DNA genómico...	325
Figura 110. Alinhamento das sequências nucleotídicas dos fragmentos de DNA genómico...	326
Figura 111. Sequência parcial do cDNA duma cinamil álcool desidrogenase de <i>Q. suber</i> ...	327
Figura 112. Comparação das sequências em aminoácidos de <i>QsCAD2</i> ...	329
Figura 113. Expressão de <i>QsCAD2</i> , analisada por RT-PCR e hibridação.... A: Separação dos produtos RT/PCR, por electroforese em gel de agarose.... B: Imagem da película <i>X-ray</i> após hibridação com a sonda.... C: Gráfico de barras com os valores da absorvência...	332
Figura 114. Árvore filogenética construída com sequências em aminoácidos de CADs...	335
Figura 115. Esquema que ilustra a sobreposição das três sequências nucleotídicas dos fragmentos do gene <i>QsPAL</i> ...	337
Figura 116. Sequência nucleotídica do cDNA do gene que codifica uma potencial fenilalanina amónia liase em <i>Q. suber</i> ...	338
Figura 117. Alinhamento entre a sequência da proteína deduzida de <i>QsPAL</i> e sequências das fenilalaninas amónia liases...	339
Figura 118. A: Hibridação do fragmento amplificado de cDNA do gene <i>QsPAL</i> B: Gráfico de barras com os valores das áreas delimitadas pelos picos de absorvência...	341
Figura 119. Modelo hipotético que ilustra os acontecimentos iniciais da interacção entre <i>Q. suber</i> e <i>P. cinnamomi</i> ...	350

ANEXO IV-ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Descrição de algumas técnicas de biologia molecular usadas para determinar a variação genética.....	22
Tabela 2. Sobreiros e azinheiras analisados....	54
Tabela 3. Dados relativos aos fragmentos AFLP que foram obtidos por amplificação com a combinação de <i>primers</i> I1...	77
Tabela 4. Dados relativos aos fragmentos AFLP que foram obtidos por amplificação com a combinação de <i>primers</i> I2...	87
Tabela 5. Dados relativos aos fragmentos AFLP que foram obtidos por amplificação com a combinação de <i>primers</i> I3...	102
Tabela 6. Dados relativos aos fragmentos AFLP que foram obtidos por amplificação com a combinação de <i>primers</i> I10...	103
Tabela 7. Dados relativos aos fragmentos AFLP que foram obtidos por amplificação com a combinação de <i>primers</i> I9...	108
Tabela 8. Homologias existentes entre as sequências nucleotídicas dos fragmentos AFLP de <i>Q. suber</i> ...	126
Tabela 9. Genes de resistência a doenças nas plantas e factores de avirulência respectivos...	168
Tabela 10. Identificação das sequências nucleotídicas usadas para selecção dos <i>primers</i> ...	184
Tabela 11. Aspectos relacionados com as sondas usadas para escrutinar o banco genómico...	207
Tabela 12. Parâmetros relacionados com as sondas usadas na análise por RT-PCR e hibridação...	218
Tabela 13. Homologias existentes entre os fragmentos cDNA-AFLP que se expressam diferencialmente e as sequências presentes nas bases de dados de plantas...	228