

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
CAMPUS DE CUITÉ

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DA EXPRESSÃO DE GENES
DO TIPO *MIRACULINA* EM CITROS**

ADEILMA DANTAS RODRIGUES

CUITÉ - PB

2013

ADEILMA DANTAS RODRIGUES

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DA EXPRESSÃO DE GENES
DO TIPO *MIRACULINA* EM CITROS**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande/Campus Cuité, para obtenção do Grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^ª.Dra. Magnólia de Araújo Campos

CUITÉ - PB

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

R696i Rodrigues, Adeilma Dantas.

Identificação e caracterização *In silico* da expressão de genes do tipo *Miraculina* em citros. / Adeilma Dantas Rodrigues – Cuité: CES, 2013.

50 fl.

Monografia (Curso de Licenciatura em Biologia) – Centro de Educação e Saúde – UFCG, 2013.

Orientadora: Dr. Magnólia de Araújo Campos.

1. Genética; 2. CitEST; 3. *Poncirus trifoliata*; 4. Clorose Variegada dos Citros; 5. *Phytophthora pasitica*. 6. Genoma funcional. I. Título.

CDU: 575

ADEILMA DANTAS RODRIGUES

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DA EXPRESSÃO DE GENES
DO TIPO *MIRACULINA* EM CITROS**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande/Campus Cuité, para obtenção do Grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Magnólia de Araújo Campos (Orientadora)

Prof^a. Dr. Francisco José Victor de Castro

Prof^a. Dr. Renner Leite

A Deus,

Por sempre está presente em todos os momentos de minha vida e por jamais ter me abandonado, principalmente, nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais,

Ademário Rodrigues (in memoriam)

Maria do Carmo (in memoriam)

À minha vó,

Maria Magdalena (in memoriam)

À minha tia,

Luzia Birico (in memoriam)

Ao meu amado esposo e amigo,
Antônio de Lima (Daniel) por sempre ter me aconselhado e incentivado a nunca
desistir dos meus sonhos

Às minhas amadas filhas,

Kauanny Rodrigues

Raianny Rodrigues

Por terem sido elas, o foco principal de minhas lutas constantes em prol da
conclusão de meu curso

AGRADECIMENTOS

Primeiro que tudo agradeço a Deus, pois se não fosse suas bênçãos em minha vida, eu jamais teria conseguido chegar até aqui.

A Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus Cuité-PB, por ter “caído” como uma bênção em minha vida, pois sem a implantação desse Campus nessa cidade, acredito que não teria chegado, aonde cheguei.

A Prof.^a Dra. Magnólia de Araújo Campos, por ter aceitado me orientar, pelas suas palavras de incentivo, pelas críticas construtivas, pela paciência, pelos conselhos tão importantes nos quais me serviram de ensinamentos e lições pelos quais jamais esquecerei.

Ao Dr. Marcos Antônio Machado, co-orientador e pesquisador do Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis – SP, pelo apoio e colaboração neste trabalho.

Ao CNPq e A FAPESP, pelo financiamento dos Projetos Genoma Funcional dos Citros e INCT dos Citros, os quais geraram as informações dos genes e a criação do Banco de Dados CiTEST.

As colegas de projeto Gláucia Diojânia Azevedo Medeiros e Ana Paula Moisés, por terem dado suas contribuições científicas em vários momentos em que precisei.

À Prof.^a Flávia Lins pelos muitos conselhos dados, pelo seu apoio incondicional, pelo carinho e por muitas vezes me fazer acreditar na minha capacidade.

Aos Coordenadores do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, professores, Dr. Francisco Victor de Castro e Dr.^a Marisa Apolinário, pela simplicidade e respeito que sempre demonstraram por mim.

Ao Prof. Antônio Glaúcio da UFCG Campus - Campina Grande, pelo seu apoio e respeito.

Aos irmãos em Cristo, Neuma e Isaías, por terem me acolhido tão calorosamente em seu lar, durante quase dois meses que tive que permanecer com eles até a conclusão do curso.

Aos meus irmãos em Cristo, Flaviana, Carol e Marcleil da igreja em que congreguei em Cuité “Missão Evangélica Pentecostal do Brasil”, pelos momentos de oração.

A Naldiene Maria e a Cecília Medeiros, por terem demonstrado ser verdadeiras amigas, nos momentos em que mais precisei de apoio.

Aos amigos e colegas de curso, Ana Carolina, Mirilene, Thaíse Priscilla, Simone, Diego e Valdeci pelos momentos de alegria, pelos momentos tensos e pelos momentos engraçados de descontração.

Agradeço ainda, aqueles que me aconselharam a seguir em frente e, de certa forma, não me deixaram desistir, aqueles que oraram por mim, aqueles que sempre me deram uma palavra de carinho e muitas vezes, de conforto, que sempre acreditaram em minha capacidade, a essas pessoas, eu só tenho a agradecer, a vocês, meu muito obrigada.

“Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento, com a destra da minha justiça porque eu, o Senhor teu Deus, te segura pela tua mão direita e te digo: Não temas; eu te ajudarei.”

(Isaías 41:10)

RESUMO

O Brasil é considerado o maior produtor de citros do mundo detendo atualmente cerca de 26% da produção de laranjas e 53% de suco, gerando em torno de 1,5 bilhão de dólares anuais com a exportação de suco concentrado congelado de laranja. No entanto, ao longo dos anos, os citros vêm sofrendo perdas significativas na produção devido a fatores ambientais e, principalmente, patológicos. *Phytophthora parasitica*, clorose variegada dos citros (CVC), leprose dos citros e vírus da tristeza dos citros (CTV) são os principais agentes causadores de doenças em citros. Uma estratégia relevante atualmente é explorar bancos de dados para analisar a expressão de genes envolvidos nas respostas de plantas a patógenos, visando o entendimento das funções biológicas destes genes bem como o direcionamento de trabalhos futuros considerando sua aplicação biotecnológica. O objetivo desse trabalho foi identificar e caracterizar a expressão de genes *miraculina* de citros presentes no banco de dados CitEST, usando ferramentas computacionais e caracterizar *in silico* a expressão de genes *miraculina* em pelo menos uma espécie de citros encontrada no CitEST. Foram feitas buscas por genes do tipo *miraculina* em citros no banco de dados do genoma funcional dos citros – CitEST, usando o programa Unigene Editor e a palavra-chave “miraculin” e as sequencias identificadas foram analisadas usando o BLASTx para encontrar sequencias homólogas a miraculina no banco de dados GenBank. Foram encontrados 127 genes do tipo *miraculina* no banco de dados CitEST, os quais estão expressos em órgãos das espécies *Poncirus trifoliata*, *Citrus reticulata*, *C. sinensis* e *C. aurantium*. Além disso, existem genes miraculina com homologia ao inibidor de proteinase e expressos em órgãos de *Poncirus trifoliata* induzidos sob condições de patógenos.

Palavras-chave: CitEST, *Poncirus trifoliata*, Clorose Variegada dos Citros, *Phytophthora parasitica*, genoma funcional.

ABSTRACT

Brazil is considered the largest producer of citrus in the world currently holding about 26% of production and 53% orange juice, generating approximately \$ 1.5 billion with annual exports of frozen concentrated orange juice. However, over the years, the citrus have suffered significant losses due to environmental factors and particularly pathological. *Phytophthora parasitica*, citrus variegated chlorosis (CVC), leprosis citrus and citrus sadness virus (CTV) are the major causative agents of disease in citrus. A strategy is currently exploring relevant databases to analyze the expression of genes involved in plant responses to pathogens in order to understand the biological functions of these genes and the direction of future work considering their biotechnological applications. The aim of this study was to identify and characterize the expression of genes present in citrus *miraculin* database CitEST, using computational tools to characterize and *in silico miraculin* gene expression in at least one citrus species found in CitEST. We searched for genes in citrus type miraculin in the database of functional genome of citrus - CitEST using Unigene Editor program and the keyword "miraculin" and identified the sequences were analyzed using BLASTx to find homologous sequences in *miraculin* GenBank database. We found 127 genes in the type miraculin database CitEST, which are expressed in organs of species *Poncirus trifoliata*, *Citrus reticulata*, *C. sinensis* and *C. aurantium*. Furthermore, there are *miraculin* genes with homology to proteinase inhibitor expressed in organs and *Poncirus trifoliata* induced under conditions of pathogens.

Keywords: CitEST, *Poncirus trifoliata*, Citrus Variegated Chlorosis, *Phytophthora parasitica*, functional genome.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Espécies de Citros: A (<i>Citrus sinensis</i>); B (<i>citrus limonia</i>); C (<i>Citrus reticulata</i>); D (<i>Citrus paradisi</i>); E (<i>Citrus latifolia</i>); F (<i>Citrus grandis</i>) e G (<i>Citrus medica</i>).....	17
FIGURA 2	Imagens de CVC em citros.....	21
FIGURA 3	Imagens de Leprose em citros	22
FIGURA 4	Imagens de <i>Phytophthora</i> em Citros.....	23

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Identificação e similaridade dos unigenes do tipo <i>miraculina</i> encontrados em <i>Poncirus trifoliata</i> por BLASTx	30
TABELA 2	Identificação e similaridade dos unigenes do tipo <i>miraculina</i> encontrados em <i>Citrus reticulata</i> por BLASTx	33
TABELA 3	Identificação e similaridade dos unigenes do tipo <i>miraculina</i> encontrados em <i>Citrus sinensis</i> usando BLASTx	35
TABELA 4	Identificação e similaridade por BLASTx dos unigenes do tipo <i>miraculina</i> encontrados em <i>Citrus aurantium</i>	36
TABELA 5	Bibliotecas de citros indicando as espécies, tecidos e condições em que os genes do tipo <i>miraculina</i> selecionados foram expressos	37
TABELA 6	Genes <i>miraculina</i> expressos em folhas de <i>Poncirus trifoliata</i> encontrados no banco de dados Unipaper2/CitEST	39
TABELA 7	Genes <i>miraculina</i> expressos em cascas de caules de <i>Poncirus trifoliata</i> encontrados no banco de dados CitEST	41
TABELA 8	Genes <i>Mir</i> de <i>Poncirus trifoliata</i> expressos em cascas de caule/ <i>Phytophthora</i> e em folhas/CTV, encontrados no banco de dados CitEST	42
TABELA 9	Genes <i>Mir</i> expressos apenas em folhas e em cascas de caule presentes na espécie <i>Poncirus trifoliata</i> , encontradas no banco de dados CitEST	43

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Citros	17
2.2 A Importância da citricultura no Brasil	18
2.3 A Importância da citricultura para a região Nordeste e o estado da Paraíba..	18
2.4 A Clorose variegada dos citros (CVC) causada por <i>Xylella fastidiosa</i>	20
2.5 Vírus da leprose dos citros (<i>Citrus leprosis virus</i> , CILV)	21
2.6 Doenças de <i>Phytophthora</i> em citros	22
2.7 Melhoramento Genético de Citros	23
2.8 Importância de genes <i>Miraculina</i>	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Identidade e caracterização molecular de genes <i>Miraculina</i> de citros	27
3.2 Análise <i>in silico</i> da expressão de genes <i>Miraculina</i> em <i>Poncirus trifoliata</i>	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Identificação de genes do tipo <i>Miraculina</i> em citros a partir do banco de dados CitEST	28
4.2 Expressão de genes <i>Miraculina</i> de diferente espécies de citros induzidos em diferentes tecidos sob diferentes condições	36
4.3 Estudo dos genes <i>Miraculina</i> expressos em <i>Poncirus trifoliata</i>	38

4.4 Genes <i>Miraculina</i> expressos em folhas de <i>Poncirus trifoliata</i>	38
4.5 Genes <i>Miraculina</i> expressos em casca de caule de <i>Poncirus trifoliata</i>	40
4.6 Identificação de genes <i>Miraculina</i> expressos tanto em cascas de caule como em folhas de <i>Poncirus trifoliata</i> induzidos por patógenos	42
4.7 Genes <i>Miraculina</i> expressos apenas em folhas e em cascas de caule de <i>Poncirus trifoliata</i> inoculada e não inoculada pelos seus respectivos patógenos, CTV e <i>Phytophthora parasítica</i>	42
CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira detêm atualmente cerca de 26% da produção de laranjas e 53% do suco, tornando-se um dos setores mais competitivos do agronegócio mundial de citros (RIETH, 2012). O Brasil além de ser considerado o maior produtor de citros do mundo, é também considerado o maior exportador de suco concentrado congelado de laranja, tem gerado cerca de 1,5 bilhão de dólares anuais, juntamente com outros derivados (BRAGA, 2010).

Dentre os principais agentes causadores de doenças em citros, temos como principais destaques: *Phytophthora parasitica* Dastur, causadora da gomose dos citros, provocando a podridão do pé, tronco, raízes e radículas, presente em todas as fases de desenvolvimento da planta, provocando perdas irreparáveis para a citricultura; clorose variegada dos citros (CVC) causada por uma bactéria denominada *Xylella fastidiosa*, a planta quando inoculada por esse patógeno, apresenta manchas pequenas e amarelas internervais na face superior da folha, manchas de coloração marrons avermelhadas na face inferior, provocando ainda, obstrução dos vasos xilemáticos, (CAVALCANTI, 2005); leprose dos citros, provocada por um agente vetor denominado *Brevipalpus phoenicis*. Essa doença provoca lesões necróticas em ramos, folhas e frutos (BITANCOURT, 1955), causando vários prejuízos na produção citrícola. E por fim, o vírus da tristeza dos citros (CTV), o qual é transmitido pelo pulgão preto dos citros, *Toxoptera citricidus* Kirk e por meio de material propagativo (GARNSEY & LEE, 1989). Os sintomas apresentados pelo CTV ocorre de forma variável, dependendo da estirpe presente e da simbiose entre copa/porta-enxerto afetada.

Esses patógenos têm sido a causa de grandes perdas em pomares de citros, levando-os a prejuízos inestimáveis, devido a tais problemas, o programa de melhoramento genético de citros se faz necessário, visando diversificar variedades de porta-enxertos que sejam eficazes e resistentes a pragas, doenças, condições edafoclimáticas, entre outras. O Limão Cravo, mesmo sendo suscetível a algumas doenças, é ainda, o porta-enxerto mais utilizado no Brasil, apresentando “diversas” vantagens como produção precoce, alto vigor e compatibilidade com todas as copas (MAZZINI, 2009). Soares Filho et al. (2000) alegam que a tangerina ‘Sunki’ por

possuir alto pegamento, baixa poliembrionia e elevada frequência de híbridos, é considerada um importante parental feminino em programas de melhoramento genético de citros, principalmente quando se é usada com o parental masculino *Poncirus trifoliata* e seus híbridos. O porta-enxerto, *Poncirus trifoliata* (L.) Rafinesque 'Rubidoux', espécie única do gênero é indicado para combinações com laranjas, limas ácidas e tangerinas, apresenta boas características fitossanitárias de interesses agrônomicas como: resistência a nematóides, CTV, xiloporose e, principalmente, a *Phytophthora* spp (SIVIERO et al, 2002). Este porta-enxerto induz melhor qualidade do suco, no entanto, é intolerante ao exocorte, ao declínio e a seca (MARENGO, 2009; FARIA, 2007).

Sabendo que a molécula de DNA contém as informações genéticas dos seres vivos e são elas as responsáveis pelas características hereditárias, uma estratégia relevante atualmente é explorar bancos de dados para analisar a expressão de genes envolvidos nas respostas de plantas a patógenos, visando o entendimento das funções biológicas destes genes bem como o direcionamento de trabalhos futuros considerando sua aplicação biotecnológica. Neste contexto, o estudo de genes do tipo *miraculina* em plantas de citros se faz necessário para a citricultura, uma vez que as proteínas codificadas por eles têm sido descritas associadas à defesa da planta e a modificação do sabor ácido em doce. Por isso, o objetivo geral deste trabalho foi identificar e caracterizar a expressão de genes *miraculina* de citros, presentes no banco de dados CitEST, usando ferramentas computacionais. O objetivo específico foi caracterizar *in silico* a expressão de genes *miraculina* em pelo menos uma espécie de citros encontrada no CitEST.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Citros

Os citros são plantas dicotiledôneas que pertencem a família Rutaceae, subfamília *Aurantioideae*, tribo *Citreae* e subtribo *Citrinae*, Possuindo cerca de 13 gêneros e 65 espécies, onde: *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus* são consideradas de grande importância econômica no mundo (BRUGNARA, 2006). Tais gêneros são conhecidos popularmente e comercialmente pelos seus frutos, dentre eles as laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*Citrus reticulata*, *C. deliciosa* e *C. sunki*), limas ácidas como o Tahiti (*Citrus latifolia*), limões (*Citrus limonia*) e o galego (*Citrus aurantiifolia*), doces como o pomelo (*Citrus paradisi*), a cidra (*Citrus medica*), a lima da Pérsia (*Citrus limettioides*), laranja-azeda (*Citrus aurantium*) e toranjas (*Citrus grandis*) (CEAGESP, 2011), (Figura 1).

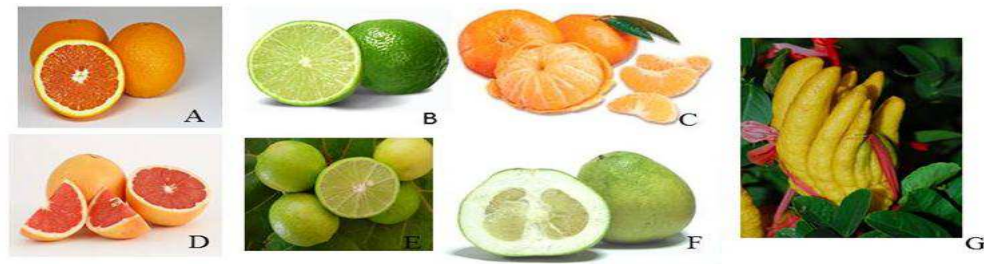


Figura 01. Espécies de citros: A (*Citrus sinensis*); B (*Citrus limonia*); C (*Citrus reticulata*); D (*Citrus paradisi*); E (*Citrus latifolia*); F (*Citrus grandis*); G (*Citrus medica*).

As plantas cítricas desse gênero, em sua maioria, são plantas que possuem porte médio (arbustivo/arbóreo), apresentando flores brancas e aromáticas, onde seus frutos possuem em seu interior, vesículas preenchidas por um suco que é de grande interesse comercial (ARAÚJO *et al*; 2005). A reprodução dessas plantas ocorre de forma, sexuada, por fecundação cruzada e por meio de autopolinização, e assexuada, por meio de apomixia nucelar (MACHADO *et al*; 2005). Nessas plantas,

geralmente, o número básico de cromossomos é $X = 9$, onde a diploidia é $2n = 2x = 18$ (MOREIRA; PIO, 1991).

Acredita-se que os primeiros relatos sobre a utilização dos citros, tanto do ponto de vista ornamental quanto alimentício seja bastante antiga e teria surgido na China, de lá teria se espalhado pelo resto do mundo, mais especificamente para a Europa, seguindo depois para as Américas, África e por último, Austrália (MAZZINI, 2009). Os citros são originários do Continente Asiático, e só foram introduzidos em nosso território na época do Brasil Colônia, tendo sido trazidos pelos colonizadores portugueses, onde encontraram condições apropriadas para o seu desenvolvimento (COELHO, 2001).

2.2 A importância da citricultura no Brasil

A citricultura brasileira detêm, atualmente cerca de 26% da produção de laranjas e 53% do suco, tornando-se um dos setores mais competitivos do agronegócio mundial de citros (RIETH, 2012). O Brasil além de ser considerado o maior produtor de citros do mundo, é também considerado o maior exportador de suco concentrado congelado de laranja, tem gerado cerca de 1,5 bilhão de dólares anuais, juntamente com outros derivados (BRAGA, 2010).

Segundo dados do IBRAF (2010), China e Índia são considerados os países líderes como produtores mundiais de frutas, ficando o Brasil com a terceira colocação, no entanto, com relação à produção de citros, é considerado o maior produtor mundial com mais de 19 milhões de toneladas, sendo o Estado de São Paulo o mais importante pólo produtor com aproximadamente 83% da produção brasileira. Na última década, observa-se que as regiões Sul e Nordeste vêm contribuindo de maneira relevante na produção de citros (Revista Verde, 2011).

2.3 A importância da citricultura para a região Nordeste e o estado da Paraíba

Segundo Azevedo (2003), de toda produção nacional de citros do Brasil, a região Nordeste é responsável por cerca de 9% desta produção, colocando-a no ranking de 2º maior produtor de citros, onde o estado da Bahia assume a liderança seguida por Sergipe, favorecendo desta forma, uma inquestionável importância econômica. Em meio aos estados produtores da Região Nordeste, a Paraíba assume o 8º lugar no ranking, onde a produção de tangerinas é sua grande

importância (INTESA, 2010). Segundo dados do IBGE (2011), os principais municípios paraibanos produtores de citros são Matinhas, Alagoa Nova, São Sebastião de Lagoa de Roça, Lagoa Seca e Esperança, sendo tangerina 'Dancy' (*Citrus tangerina* Hort. ex.; Tanaka) o cultivo predominante de citros nesses municípios.

O Brasil lidera o ranking mundial como sendo o maior produtor de citros do mundo, ocupado dessa forma, lugar de destaque no país não apenas por seu grande valor de exportação, mas também, por sua importância social em gerar grande número de empregos (ROSSETTO, 2010). Os citros ao longo dos últimos anos vêm enfrentando diversos problemas, principalmente, de origem fitossanitária, o que têm e muito afetado a produtividade dos mesmos. Várias doenças de origem bacteriana vêm afetando a cultura dos citros, dentre elas: a clorose variegada dos citros (CVC), o cancro cítrico e, mais recentemente, o Huanglongbing (HLB), sendo estes, os maiores desafios enfrentados até o presente momento (FÁVERO, 2010). A maioria das doenças causadas em citros pelos patógenos acima citados, já foram e outros ainda são, os grandes vilões responsáveis por perdas econômicas significativas para o mercado brasileiro.

São exemplos de algumas doenças de origem bacteriana que afetam os citros: a clorose variegada dos citros (CVC) causada por *Xylella fastidiosa*, o cancro cítrico, por *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* e mais recentemente, o Huanglongbing, causado por *Candidatus Liberibacter*, esta conhecida também como greening; causadas por fungos temos: pinta preta (*Guignardia citricarpa* Kiely), verrugose (*Elsinae* ssp), melanose (*Diaporthe citri*), podridão floral (*Colletotrichum acutatum*) e a gomose de *Phytophthora* (*Phytophthora* spp); dentre as causadas por vírus, destacam-se a tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*) e a leprose dos citros (*Citrus leprosis virus*). Há ainda, doenças de causas desconhecidas que também são importantes como: a morte súbita dos citros (MSC) e o declínio dos citros (FUNDECITRUS, 2010). Merecem destaque, algumas espécies de patógenos observadas nas bibliotecas de citros estudadas, dentre elas: a clorose variegada dos citros (CVC), a leprose dos citros, vírus da tristeza dos citros (CTV) e a *Phytophthora parasitica*.

2.4 A clorose variegada dos citros (CVC) causada por *Xylella fastidiosa*

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) é uma doença causada pelo patógeno *Xylella fastidiosa*, uma bactéria gram-negativa que pertence à classe das Gamaproteobactérias, família Xanthomonadaceae (BERNARDES, 2010). A CVC, também denominada como 'amarelinho dos citros', foi descoberta pela primeira vez no ano de 1987, em pomares de regiões noroeste pertencentes ao Estado de São Paulo vitimando as principais variedades de *Citrus sinensis* L.Osbeck (ROSSETTI & DE NEGRI, 1990; CAVALCANTI, 2005). Sendo restrita apenas aos vasos xilemáticos da planta, essa bactéria necessita, principalmente, da ação dos insetos vetores das famílias Cicadellidae, Cicadellinae e Cercopidae para a sua disseminação (MARUCCI et al., 2002), insetos sugadores conhecidos popularmente como cigarrinhas (LOPES, 1996). E em menor proporção, a bactéria também se dissemina nas plantas cítricas por meio de borbulhas (MACHADO et al, 1992). Até o presente momento, não se têm relatos de sintomas de CVC em variedades como tangerinas comerciais (Cravo, Poncã), limões verdadeiros (Siciliano, eureka), tangor Murcote, entre outras, no entanto, todas as variedades de laranja doce são afetadas por essa doença sobre diferentes porta-enxertos (CAVALCANTI, 2005).

A CVC após ser transmitida para a planta obstrui os vasos xilemáticos (FUNDECITRUS, 2010). Os sintomas iniciais da doença aparecem na copa e depois se espalha para outras partes da planta, quando se encontra em estágio avançado, brota pouco e possui crescimento reduzido (CAVALCANTI, 2005). As plantas inoculadas por CVC perdem grande parte da sua capacidade de realizar fotossíntese, o que irá influenciar em sua baixa produtividade e na produção de frutos raquíticos (RIBEIRO, 2002). O sintoma aparente da CVC inicia-se com pequenas manchas amarelas internevais presentes na face superior foliar (CAVALCANTI, 2005). Segundo ROSSETTO (2001), A CVC pode ser encontrada em várias regiões distintas produtoras de citros no Brasil, entre elas, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul e outras, só no Rio Grande do Sul, ela se faz presente em 32 municípios. Uma medida bastante recomendável para o controle da CVC é a realização da poda para eliminação dos ramos infectados, pois essa importante medida tem a capacidade de eliminar as fontes de inóculo pelas quais as cigarrinhas

poderiam adquirir e transmitir as bactérias, tal medida também evita a proliferação da bactéria na planta (CAVALCANTI, 2005), (Figura 02).



Figura 02. Imagens de CVC em citros.

2.5 Vírus da leprose dos citros (*Citrus leprosis virus*, CiLV)

Uma das mais importantes viroses presentes na citricultura brasileira é a leprose dos citros, sendo esta, causada pelo *Citrus leprosis* vírus C (CiLV-C) que é transmitida pelo ácaro denominado *Brevipalpus phoenicis* (BASTIANEL et al., 2008). De acordo com RODRIGUES et al (2003) são conhecidas duas formas do vírus da leprose, uma de rara ocorrência e que está associada ao núcleo celular (CiLV-N) e outra que está associada ao citoplasma da célula (CiLV-C) onde, esta, ocorre com maior frequência (RODRIGUES et al., 2003), há algumas décadas, essa doença é citada como sendo uma das mais graves da citricultura, acarretando vários danos e prejuízos à produção citrícola (RODRIGUES et al, 2001). O vírus transmitido de forma persistente induz unicamente, o aparecimento de sintomas locais nas plantas (MARQUES et al., 2007). De acordo com Bitancourt (1955), as lesões necróticas ocorrem em ramos, folhas e frutos (Figura 03).



Figura 03. Imagens de leprose em citros.

2.6 Doenças de *Phytophthora* em citros

Compreendendo mais de 90 espécies, o gênero *Phytophthora* é pertencente ao reino Stramenopila, ao filo Oomicota, à classe Oomicetes e da ordem Pythiales (SASSERON, 2008). Atualmente, onze espécies de gênero *Phytophthora* estão associadas a doenças prejudiciais em citros (ERWIN & RIBEIRO, 1996). TIMMER et al. (2000), alegam que em todas as regiões citrícolas do mundo, o agente causador da gomose se faz presente, provocando elevados custos na proteção e no controle em viveiros e no campo (TIMMER et al., 2000). Dentre os gêneros *Phytophthora*, apenas duas espécies foram relatadas no Brasil como sendo causadoras de doenças em citros, *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (*P. parasitica* Dastur) e *Phytophthora citrophthora* (BASSAN et al., 2010). No entanto, a presença de *Phytophthora parasitica* é a de maior predominância na maioria dos viveiros e pomares comerciais (FEICHTENBERGER, 2001). Dentre os sintomas causados por este patógeno podemos citar: podridões de raízes e radículas, a podridão do colo e do tronco (gomose) e rachaduras na casca (SILVA et al., 2008). Feichtenberger (2001) salienta que dentre as manifestações dos sintomas provocados por *Phytophthora* ssp., podridões de raízes e radículas estão entre as mais relevantes encontradas em pomares de citros.

Dentre os principais métodos de controle da gomose estão: plantio de mudas saudáveis, evitar plantio em áreas encharcadas por água, evitar plantio em áreas infestadas com o patógeno, evitar ferimentos nas plantas todas as vezes que se faz

necessário o controle cultural, realizar controle químico com uso sistêmico, entre outros, no entanto, o método mais econômico e eficiente, ainda continua sendo o uso de cultivares resistente a gomose (SIVIERO, 2001). Ocorrendo a mais de cem anos no Brasil, a gomose de *Phytophthora* só passou a ter importância maior com o surgimento do vírus da tristeza dos citros (CTV) nos anos 40, tendo este, devastado cerca de 90% dos pomares citrícolas do estado de São Paulo, neste mesmo período, as plantas cítricas estavam enxertadas sobre a laranja 'azedada' (*Citrus aurantium* L.), a qual é resistente a *Phytophthora* (BOAVA et al., 2003), (Figura 04).



Figura 04. Imagens de *Phytophthora* em citros

2.7 Melhoramento Genético de Citros

Pragas e doenças são capazes de causar danos irreversíveis em plantações de citros, agindo negativamente na produtividade e na produção desses pomares, podendo ainda, influenciar também, de forma negativa na qualidade e quantidade dos frutos cítricos (GARBIN et al., 2009). Com o aumento de problemas relacionados a doenças em citros em todo o mundo, fez-se necessário o uso de ferramentas biotecnológicas nos programas de melhoramento genético em citros, o qual é de suma importância em facilitar o desenvolvimento de cultivares com características superiores (COSTA et al., 2003).

As mudas cítricas podem ser produzidas, principalmente, por sementes e por enxertia (CARVALHO et al, 2005), existindo, ainda, outros métodos como a estaquia, o cultivo de tecidos (POMPEU JÚNIOR, 2005) e a microenxertia, método que permiti separar o material contaminado da maioria dos patógenos (BAPTISTA et al., 1991). O método de enxertia une tecidos de duas espécies de planta de uma mesma família, favorecendo na precocidade da produção, planta de menor porte e

com alta capacidade reprodutiva, maior qualidade e quantidade de frutos, melhor desenvolvimento e vigor da copa, resistente a pragas e doenças, e ainda favorece uma melhor capacidade de adaptação da planta às condições adversas do ambiente, dentre outras (POMPEU JUNIOR, 2005). Mourão Filho et al (2002) afirmam que, além de gerar frutos diferenciados, o melhoramento genético também vai garantir a sanidade dos pomares assim como a sua produtividade, mesmo sendo uma ferramenta que leva um longo período de tempo para dar resultados, mas, que são permanentes. Soares Filho et al. (2000) alegam que a tangerina 'Sunki' por possuir alto pegamento, baixa poliembrionia e elevada frequência de híbridos, é considerada um importante parental feminino em programas de melhoramento genético de citros, principalmente quando se é usada com o parental masculino, *Poncirus trifoliata* e seus híbridos.

Citrus sunki é um importante porta-enxerto que se originou no sudeste da China, é indicado para laranjas, tangerinas e pomelos, possuindo diversas características de interesse comercial devido sua tolerância ao declínio, a xiloporose, CTV, sorose e por apresentar resistência a solos salinos e a seca, e ainda, por induzir boa formação de copa (SIVIERO et al., 2002). No entanto, a tangerina sunki apresenta aspectos indesejáveis como: o número de sementes viáveis por fruto é produzido em pequenas quantidades, além disso, é suscetível a gomose (MARENGO, 2009; FARIA, 2007). O porta-enxerto, *Poncirus trifoliata* (L.) Rafinesque 'Rubidoux', espécie única do gênero é indicado para combinações com laranjas, limas ácidas e tangerinas, apresenta boas características fitossanitárias de interesses agrônomicas como: resistência a nematóides, CTV, xiloporose e, principalmente, a *Phytophthora* spp (SIVIERO et al, 2002). Este porta-enxerto induz melhor qualidade do suco, no entanto, é intolerante ao exocorte, ao declínio e a seca (MARENGO, 2009; FARIA, 2007).

2.8 Importância de genes *Miraculina*

Os primeiros estudos a cerca do gene *miraculina* (*Mir*) foram realizados em bagas vermelhas de um arbusto tropical nativo da África Ocidental denominado *Richadela dulcifica* (fruto do milagre), ela é uma glicoproteína que tem a capacidade de modificar o sabor azedo em doce (TREERASILP & KURIHARA, 1988; THEERASILP et al., 1989). Como forma de melhorar a palatibilidade das bebidas e

alimentos acídicos, os indígenas, frequentemente, utilizavam as bagas do arbusto do fruto do milagre (SUGAYA, 2008). *Miraculina* está presente, unicamente, nas bagas vermelhas do fruto do milagre, não tendo sido observada a presença da mesma, em outras partes da planta (HIRAI, 2011), mais precisamente, ela está localizada entre os espaços intercelulares do fruto (HIRAI et al, 2009).

Treerasilp e Kurihara (1988) descobriram a *miraculina* como o único polipeptídeo com 191 aminoácidos, sua sequência completa purificada a partir de frutos de *Richadela dulcifica*. *Mir* possui sua estrutura de oligossacarídeos N-ligados a sítios de pontes de dissulfeto (TREERASILP et al., 1989). No entanto, outros trabalhos foram realizados com *miraculina* e ficou comprovado que uma sequência de 220 aminoácidos foi determinada, onde 759 bp (pares de bases) que codificam para a cDNA *miraculina* foram clonadas e sequenciadas (MASUDA et al. 1995), *Mir* forma um dímero e seu peso molecular aparentemente é de 47 kDa (HIRAI et al, 2009).

Em um estudo com alface transgênico, Sun et al., (2006) afirmaram que a proteína *miraculina* tem um princípio ativo incomum, ao ser capaz de transformar o sabor amargo em doce, e ainda acrescentaram que, a grande quantidade expressa dessa proteína em folhas de alface foi de grande relevância, possuindo, então, a atividade indutora do sabor doce. *Miraculina*, por si só, não é doce, mas possui a propriedade de modificar o sabor amargo em doce (HIRAI et al., 2011).

Miraculina é uma proteína relativamente solúvel e termoestável, podendo ser um eficiente adoçante em alimentos quem contêm ácidos, como os refrigerantes; essa proteína também pode funcionar muito bem, mesmo que em meios às concentrações extremas de baixas temperaturas (BACHCHU et al, 2011). Elas são usadas como adoçantes, realçadores de sabor, como suplementos de animais forrageiros e na indústria de processamento de alimentos (SUN et al., 2006). Similaridade de sequência coloca a proteína codificada na família da soja como inibidor de tripsina (Kunitz). O mRNA da *LeMir* é encontrado na raiz, hipocótilo, e tecidos de flores, com maior expressão nas raízes. Indução rápida da expressão sobre infecção por nematóides está localizada na extremidade da raiz. Hibridização *in situ* mostra que *LeMir* é expresso constitutivamente na coifa e na epiderme da raiz.

Outros estudos realizados com *miraculina*, por exemplo, no cultivo dessa proteína em frutos de tomates transgênicos sob estresse salino, revelou que, nessas condições, houve um maior teor de *miraculina* por grama de peso fresco do que os frutos de tomates cultivados em condições de não estresse, acredita-se que esse grande aumento de concentração de *miraculina* tenha ocorrido devido um efeito de enriquecimento por miniaturização dos tomates cultivados sob o estresse salino (HIRAI et al., 2011). Sugaya et al (2008) alegam que quando o ácido cítrico é exposto à *miraculina*, sua doçura induzida é estimada em cerca de 3000 vezes a da sacarose, eles acreditam ainda que, o aumento de interesse por *miraculina* vem crescendo devido ela possuir essa fascinante propriedade; essa função em modificar o sabor, pode não apenas, ser utilizado como adoçantes possuidores de baixas calorias, mas também, como sendo à base de um novo estilo de vida para diabéticos (TANASE et al., 2011).

No Japão, o fruto do milagre está sendo vendido in natura, em pó e em forma de comprimidos, sendo bastante apreciado entre pessoas diabéticas e pessoas que fazem dietas, *miraculina* é uma forma natural e derivada da fruta do milagre, sendo sua oferta limitada devido às plantas terem origem tropical (SUGAYA, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

As sequências gênicas estudadas foram obtidas do CitEST, do Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis-SP e as análises computacionais foram realizadas no Laboratório de Informática do Centro de Educação e Saúde – UFCG, Cuité-PB.

3.1 Identificação e caracterização molecular de genes *Miraculina* de citros

A busca por genes do tipo *miraculina* de citros foi realizada no banco de dados do genoma funcional dos citros – CitEST (<http://biotecnologia.centrodecitricultura.br>) usando o programa Unigene Editor e a palavra-chave “miraculin”. As informações das sequências e o tamanho de cada unigene foram coletadas. Em seguida, as sequências identificadas foram analisadas usando o programa BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) para encontrar sequências homólogas a *miraculina* no banco de dados disponível mundialmente, o *GenBank*.

3.2 Análise *in silico* da expressão de genes *Miraculina* em *P. trifoliata*

O estudo da expressão de genes *miraculina* nos genomas das espécies de citros presentes no banco de dados do genoma funcional dos citros – CitEST (<http://biotecnologia.centrodecitricultura.br>) foi realizado por meio da identificação do número de reads (ESTs, expressed sequence tags) de cada unigene e em quais bibliotecas do CitEST elas foram localizadas. Neste trabalho procurou-se dar ênfase ao estudo da expressão dos genes encontrados em *Poncirus trifoliata*.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Identificação de genes do tipo *miraculina* em citros a partir do banco de dados CitEST

Após o sequenciamento de bibliotecas de genes, uma etapa primordial é o agrupamento (*clustering*) das sequências para eliminar a redundância, ou seja, evitar que um mesmo gene seja contabilizado muitas vezes. Por critérios biológicos e estatísticos, sequências iguais são então agrupadas *in silico*, e cada grupo é considerado um único gene, ou unigene. Em se tratando do sequenciamento de fragmentos de sequências expressas (ESTs, *Expressed Sequence Tags*), diz-se que as sequências fazem parte de um genoma funcional. Isto porque a expressão de um gene em RNA e posterior tradução deste em proteína está associada a função biológica que esse gene desempenha no organismo. Nestes casos, as bibliotecas de genoma funcional são geradas a partir dos DNAs complementares aos RNAs isolados a partir de tecidos/órgãos de uma determinada espécie, chamados cDNAs (*complementary DNA*), os quais são clonados e sequenciados, e as sequências encontradas informam uma função biológica associada a condição que o tecido se encontrava quando os RNAs foram isolados. Além disso, o número de ESTs agrupado em cada unigene significa também quantas cópias de um mesmo RNA foi encontrado expresso naquela condição.

Neste trabalho, um total de 127 unigenes tipo *miraculina* foram encontrados no banco de dados do genoma funcional dos citros (CitEST), usando a estratégia de busca por palavra-chave “miraculin” no minibanco de unigenes de citros denominado Unipaper2 (www.limonia.centrodecitricultura.br/unipaper2), presente no CitEST (www.centrodecitricultura.br/citest). Compostos por 1 ou mais ESTs isoladas a partir de espécies de citros, estes unigenes representam possivelmente 127 genes *miraculina* (genes *Mir*) existentes nos genomas das espécies vegetais encontradas, comumente como famílias multigênicas. Representando o unipaper2 está o agrupamento de sequências expressas em 09 espécies de citros encontradas a partir de 31 bibliotecas de cDNA, realizadas sob condições contrastantes de estresses bióticos e abióticos, as quais compõem o banco de dados CitEST (TARGON et al., 2007). Além dessas, o Unipaper2 está ainda enriquecido por sequências gênicas expressas em 05 espécies de citros encontradas a partir de 33

bibliotecas de cDNA, que representam o banco de genes de citros da Universidade de Harvard (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>).

Visando confirmar a confiabilidade dos dados automatizados, cada unigene encontrado foi posteriormente analisado quanto a similaridade com sequências de proteínas *miraculina* disponíveis em bancos de dados públicos, usando o Programa BLASTx (GenBank/NCBI). Como resultado, todos os 127 unigenes apresentaram regiões de similaridade com proteínas do tipo *miraculina* (dados não mostrados). A organização dos unigenes por espécie vegetal de origem levou a identificação de 79 unigenes contendo sequências expressas de *Poncirus trifoliata* (Tabela 01), 20 de *Citrus reticulata* (Tabela 02), 25 de *Citrus sinensis* (Tabela 03) e 03 de *Citrus aurantium* (Tabela 04).

Dos 79 unigenes do tipo *miraculina* encontrados em *Poncirus trifoliata*, 08 deles codificam proteínas cujas sequências de aminoácidos compartilham entre 65 a 90% de similaridade por BLASTx com o inibidor de tripsina (*Trypsin inhibitor*) de *Murraya koenigii*, enquanto que os 71 unigenes restantes codificam proteínas cujas sequências de aminoácidos compartilham entre 48 a 99% de similaridade com outras proteínas *miraculinas* de *Citrus aurantifolia*, *C. maxima*, *C. jambhiri*, *C. limonia*, *Citrus x paradise*, *Citrus hybrid* cultivar e *Murraya paniculata* (Tabela 01).

Tabela 01. Identificação e similaridade dos unigenes do tipo *Miraculina* encontrados em *Poncirus trifoliata* por BLASTx.

IDENTIFICAÇÃO	UNIGENE	TAMANHO (pb)	No. DE ESTs	NÚMERO DE ACESSO	GENE	ORGANISMO	SIMILARIDADE (%)
1	CAS-PT-300021.1	1181	4	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	126/172 (73%)
2	CAS-PT-301251.1	1288	14	gb ACS37303.1	Trypsin inhibitor	<i>Murraya koenigii</i>	190/215 (88%)
3	CAS-PT-301450.1	961	5	gb ACS37303.1	Trypsin inhibitor	<i>Murraya koenigii</i>	189/215 (88%)
4	CAS-PT-301511.1	1050	2	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	189/213 (89%)
5	CAS-PT-301774.1	824	4	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	193/213 (91%)
6	CAS-PT-301832.1	1252	201	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	189/213 (89%)
7	CAS-PT-301859.1	1254	1374	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	189/213 (89%)
8	CAS-PT-301901.1	1403	123	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	161/214 (75%)
9	CAS-PT-302022.1	967	8	gb ACL78790.1	Putative miraculin-like protein 2	<i>Citrus unshiu</i>	215/220 (98%)
10	CAS-PT-302105.1	1063	3	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	63/75 (84%)
11	CAS-PT-302143.1	1188	75	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	210/213 (99%)
12	CAS-PT-302644.1	1536	79	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	43/74 (58%)
13	CAS-PT-302672.1	885	14	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	91/108 (84%)
14	CAS-PT-302686.1	1392	22	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	189/213 (89%)
15	CAS-PT-302716.1	1055	2	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	76/110 (69%)
16	CAS-PT-302818.1	1041	16	gb ACS37303.1	Trypsin inhibitor	<i>Murraya koenigii</i>	185/233 (79%)
17	CAS-PT-302833.1	908	5	dbj BAE79510.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus jambhiri</i>	226/232 (97%)
18	CAS-PT-302909.1	957	2	gb ACS37303.1	Trypsin inhibitor	<i>Murraya koenigii</i>	145/169 (86%)
19	CAS-PT-303019.1	727	3	gb AAG38517.1	Miraculin-like protein	Citrus x paradise	228/232 (98%)
20	CAS-PT-303067.1	818	2	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	85/97 (88%)
21	CAS--303277.1	841	5	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	199/214 (93%)
22	CAS-PT-303362.1	910	9	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	63/69 (91%)
23	CAS-PT-303563.1	918	2	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	174/194 (90%)

24	CAS--303420.1	1428	26	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	53/65 (82%)
25	CAS-PT-303714.1	945	9	dbj BAE79511.1	Miraculin-like protein 2	<i>Citrus jambhiri</i>	215/223 (96%)
26	CAS-PT-304028.1	1246	26	gb AEK31191.1	Miraculin-like protein 1	<i>C. aurantiifolia</i>	154/169 (91%)
27	CAS-PT-304155.1	1184	9	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	204/213 (96%)
28	CAS--304370.1	657	12	dbj BAE79511.1	Miraculin-like protein 2	<i>Citrus jambhiri</i>	118/123 (96%)
29	CAS-PT-305239.1	915	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	41/74 (55%)
30	CAS-PT-305279.1	902	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	89/172 (52%)
31	CAS-PT-305831.1	885	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	55/80 (69%)
32	CAS-PT-305919.1	823	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	53/81 (65%)
33	CAS-PT-305922.1	890	1	dbj BAE79510.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus jambhiri</i>	79/165 (48%)
34	CAS-PT-305953.1	726	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	68/95 (72%)
35	CAS-PT-305983.1	1170	1	gb AEK31192.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus maxima</i>	62/75 (83%)
36	CAS-PT-306167.1	872	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	50/69 (72%)
37	CAS-PT-306420.1	940	1	gb AEK31195.1	Miraculin-like protein 1	<i>Murraya paniculata</i>	91/135 (67%)
38	CAS-PT-306524.1	1056	1	gb AEK31191.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus aurantiifolia</i>	69/78 (88%)
39	CAS-PT-306694.1	1009	1	gb AEK31191.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus aurantiifolia</i>	146/166 (88%)
40	CAS-PT-306762.1	854	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	168/174 (97%)
41	CAS-PT-306823.1	727	1	gb AEK31192.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus maxima</i>	117/124 (94%)
42	CAS-PT-306943.1	898	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	86/173 (50%)
43	CAS-PT-306965.1	947	1	gb AEK31191.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus aurantiifolia</i>	86/159 (54%)
44	CAS-PT-306967.1	966	1	gb AEK31191.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus aurantiifolia</i>	79/142 (56%)
45	CAS-PT-307078.1	933	1	gb AEK31191.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus aurantiifolia</i>	49/56 (88%)
46	CAS-PT-307191.1	932	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	110/188 (59%)
47	CAS-PT-307262.1	808	1	gb AEK31190.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus limonia</i>	57/86 (66%)
48	CAS-PT-307355.1	898	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	93/142 (65%)
49	CAS-PT-307361.1	915	1	gb ACS37303.1	Trypsin inhibitor	<i>Murraya koenigii</i>	64/92 (70%)
50	CAS-PT-307482.1	848	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	57/93 (61%)
51	CAS-PT-307517.1	887	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	88/112 (79%)

52	CAS-PT-307593.1	837	1	gb AEK31195.1	Miraculin-like protein 1	<i>Murraya paniculata</i>	39/65 (60%)
53	CAS-PT-307594.1	911	1	gb AEK31191.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus aurantiifolia</i>	58/90 (64%)
54	CAS-PT-307681.1	856	1	gb ACS37303.1	Trypsin inhibitor	<i>Murraya koenigii</i>	37/41 (90%)
55	CAS-PT-307770.1	830	1	gb AEK31192.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus maxima</i>	76/114 (67%)
56	CAS-PT-307790.1	804	1	gb ACS37303.1	Trypsin inhibitor	<i>Murraya koenigii</i>	121/186 (65%)
57	CAS-PT-307798.1	833	1	gb AEK31192.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus maxima</i>	60/81 (74%)
58	CAS-PT-307826.1	842	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	82/131 (63%)
59	CAS-PT-307872.1	597	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	35/52 (67%)
60	CAS-PT-307958.1	945	1	gb AEK31190.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus limonia</i>	28/44 (64%)
61	CAS-PT-307971.1	924	1	gb AEK31192.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus maxima</i>	77/130 (59%)
62	CAS-PT-308263.1	901	1	gb AEK31195.1	Miraculin-like protein 1	<i>Murraya paniculata</i>	98/167 (59%)
63	CAS-PT-308283.1	879	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	75/111 (68%)
64	CAS-PT-308375.1	903	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	103/188 (55%)
65	CAS-PT-308432.1	586	1	gb AEK31192.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus maxima</i>	32/39 (82%),
66	CAS-PT-308523.1	853	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	99/189 (52%)
67	CAS-PT-308561.1	951	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	47/55 (85%)
68	CAS-PT-308626.1	966	1	gb AEK31191.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus aurantiifolia</i>	151/167 (90%)
69	CAS-PT-308714.1	858	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	156/179 (87%)
70	CAS-PT-308833.1	903	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	99/123 (80%)
71	CAS-PT-308987.1	957	1	gb AEK31191.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus aurantiifolia</i>	49/89 (55%)
72	CAS-PT-309120.1	822	1	gb ACS37303.1	Trypsin inhibitor	<i>Murraya koenigii</i>	130/198 (66%)
73	CAS-PT-309250.1	876	1	gb AEK31191.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus aurantiifolia</i>	121/157 (77%)
74	CAS-PT-309320.1	863	1	gb AEK31192.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus maxima</i>	82/131 (63%)
75	CAS-PT-309740.1	971	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	56/67 (84%)
76	CAS-PT-309963.1	771	1	gb AEK31191.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus aurantiifolia</i>	59/67 (88%)
77	CAS-PT-309982.1	820	1	gb AEK31192.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus maxima</i>	77/87 (89%)
78	CAS-PT-310070.1	907	1	gb ABL67650.1	Putative miraculin-like protein 2	Citrus hybrid cultivar	178/180 (99%)
79	CAS-PT-310818.1	800	1	gb AEK31191.1	Miraculin-like protein 1	<i>Citrus aurantiifolia</i>	73/80 (91%)

Dos 20 unigenes do tipo *miraculina* encontrados em *Citrus reticulata*, apenas 01 deles codifica uma proteína cuja sequência de aminoácidos deduzida compartilha entre 71% de similaridade por BLASTx com o inibidor de tripsina (*Trypsin inhibitor*) de *Murraya koenigii*. Por outro lado, os 19 unigenes restantes codificam proteínas cujas sequências de aminoácidos compartilham entre 54 a 100% de similaridade com outras proteínas *miraculinas* de *C. unshiu*, *C. maxima*, *C. jambhiri*, *Citrus x paradise* e “*Citrus hybrid cultivar*” (Tabela 02).

Tabela 02. Identificação e similaridade dos unigenes do tipo *Miraculina* encontrados em *Citrus reticulata* por BLASTx.

IDENTIFICAÇÃO	UNIGENE	TAMANHO (pb)	NÚMERO DE ESTs	GENE	NÚMERO DE ACESSO	ORGANISMO	SIMILARIDADE (%)
1	CAS-CR-200576.1	867	32	Miraculin-like protein 2	dbj BAE79511.1	<i>Citrus jambhiri</i>	222/223 (99%)
2	CAS-CR-202402.1	910	21	Trypsin inhibitor	gb ACS37303.1	<i>Murraya koenigii</i>	154/217 (71%)
3	CAS-CR-205079.1	1130	79	Miraculin-like protein 1	dbj BAE79510.1	<i>Citrus jambhiri</i>	232/232 (100%)
4	CAS-CR-205086.1	985	10	Miraculin-like protein 3	gb AAG38519.1 AF283534_1	<i>Citrus x paradisi</i>	205/205 (100%)
5	CAS-CR-205719.1	902	2	Miraculin-like protein 1	dbj BAE79510.1	<i>Citrus jambhiri</i>	199/202 (99%)
6	CAS-CR-205804.1	1463	90	Miraculin-like protein 2	dbj BAE79511.1	<i>Citrus jambhiri</i>	219/223 (98%)
7	CAS-CR-205821.1	942	59	Putative miraculin-like protein 2	gb ACL78790.1	<i>Citrus unshiu</i>	203/208 (98%)
8	CAS-CR-205827.1	841	24	Miraculin-like protein 2	dbj BAE79511.1	<i>Citrus jambhiri</i>	220/223 (99%)
9	CAS-CR-206483.1	912	10	Putative miraculin-like protein 2	gb ABL67650.1	<i>Citrus hybrid cultivar</i>	211/213 (99%)
10	CAS-CR-210784.1	871	1	Putative miraculin-like protein 2	gb ACL78790.1	<i>Citrus unshiu</i>	69/111 (62%)
11	CAS-CR-211504.1	870	1	Miraculin-like protein 1	gb AEK31192.1	<i>Citrus maxima</i>	61/76 (80%)
12	AS-CR-214751.1	941	1	RlemMLP2 mRNA for miraculin-like protein 2, complete	dbj AB213396.1	<i>Citrus jambhiri</i>	88/93 (95%)
13	CAS-CR-214947.1	926	1	Miraculin-like protein 2	dbj BAE79511.1	<i>Citrus jambhiri</i>	102/189 (54%)
14	CAS-CR-215276.1	1007	1	Putative miraculin-like protein 2	gb ACL78790.1	<i>Citrus unshiu</i>	196/213 (92%)
15	CAS-CR-215950.1	906	1	Putative miraculin-like protein 2	gb ACL78790.1	<i>Citrus unshiu</i>	88/161 (55%)
16	CAS-CR-216007.1	887	1	Miraculin-like protein 2	dbj BAE79511.1	<i>Citrus jambhiri</i>	127/138 (92%)
17	CAS-CR-216164.1	895	1	Miraculin-like protein 1	dbj BAE79510.1	<i>Citrus jambhiri</i>	115/150 (77%)
18	CAS-CR-216950.1	889	1	Miraculin-like protein 2	dbj BAE79511.1	<i>Citrus jambhiri</i>	186/187 (99%)
19	CAS-CR-217330.1	990	1	Miraculin-like protein 2	gb AEK31196.1	<i>Citrus limonia</i>	50/59 (85%)
20	CAS-CR-217357.1	868	1	Putative miraculin-like protein 2	gb ACL78790.1	<i>Citrus unshiu</i>	104/175 (59%)

De um total de 25 unigenes do tipo *miraculina* encontrados em *Citrus sinensis*, apenas 01 deles codifica uma proteína cuja sequência de aminoácidos deduzida compartilha entre 71% de similaridade por BLASTx com o inibidor de tripsina (*Trypsin inhibitor*) de *Murraya koenigii*. Por outro lado, os 24 unigenes restantes codificam proteínas cujas sequências de aminoácidos compartilham entre 60 a 100% de similaridade com outras proteínas miraculinas de *C. unshiu*, *C. jambhiri*, *Citrus x paradise* e *Citrus hybrid* cultivar (Tabela 03).

Tabela 03. Identificação e similaridade dos unigenes do tipo *Miraculina* encontrados em *Citrus sinensis* usando BLASTx.

IDENTIFICAÇÃO	UNIGENE	TAMANHO (pb)	NÚMERO DE ESTs	GENE	NÚMERO DE ACESSO	ORGANISMO	SIMILARIDADE (%)
1	CAS-CS-103444.1	822	8	Trypsin inhibitor	gb ACS37303.1	<i>Murraya koenigii</i>	154/217 (71%)
2	CAS-CS-103575.1	1068	78	Putative miraculin-like protein	gb ACL78790.1	<i>Citrus unshiu</i>	218/218 (100%)
3	CAS-CS-105567.1	815	2	Putative miraculin-like protein 2	gb ACL78790.1	<i>Citrus unshiu</i>	203/208 (98%)
4	CAS-CS-106095.1	1009	7	Miraculin-like protein 3	gb AAG38519.1	<i>Citrus x paradisi</i>	205/205 (100%)
5	CAS-CS-106143.1	1008	37	Miraculin-like protein 2	dbj BAE79511.1	<i>Citrus jambhiri</i>	222/223 (99%)
6	CAS-CS-106984.1	819	3	Putative miraculin-like protein 2	gb ABL67650.1	<i>Citrus hybrid cultivar</i>	178/180 (99%)
7	CAS-CS-107226.1	908	6	Putative miraculin-like protein 2	gb ABL67650.1	<i>Citrus hybrid cultivar</i>	211/213 (99%)
8	CAS-CS-107297.1	894	9	Miraculin-like protein 2	dbj BAE79511.1	<i>Citrus jambhiri</i>	220/223 (99%)
9	CAS-CS-107308.1	975	19	Miraculin-like protein	gb AAG38517.1 AF283532_1	<i>Citrus x paradisi</i>	231/232 (99%)
10	CAS-CS-107510.1	850	17	Miraculin-like protein 3	gb AAG38519.1 AF283534_1	<i>Citrus x paradisi</i>	202/205 (99%)
11	CAS-CS-107556.1	1525	17	Miraculin-like protein	gb AAG38517.1 AF283532_1	<i>Citrus x paradise</i>	223/225 (99%)
12	CAS-CS-107757.1	943	13	Miraculin-like protein 2	dbj BAE79511.1	<i>Citrus jambhiri</i>	219/223 (98%)
13	CAS-CS-108140.1	962	24	Miraculin-like protein 2	dbj BAE79511.1	<i>Citrus jambhiri</i>	219/223 (98%)
14	CAS-CS-109117.1	758	2	Miraculin-like protein	gb AAG38517.1 AF283532_1	<i>Citrus x paradise</i>	64/66 (97%)
15	CAS-CS-119802.1	910	1	Miraculin-like protein 2	dbj BAE79511.1	<i>Citrus jambhiri</i>	178/221 (81%)
16	CAS-CS-119964.1	1010	1	Putative miraculin-like protein 2	gb ACL78790.1	<i>Citrus unshiu</i>	162/197 (82%)
17	CAS-CS-120059.1	966	1	Miraculin-like protein 2	dbj BAE79511.1	<i>Citrus jambhiri</i>	53/59 (90%)
18	CAS-CS-122084.1	403	1	Putative miraculin-like protein 2	gb ACL78790.1	<i>Citrus unshiu</i>	75/75 (100%)
19	CAS-CS-124320.1	771	1	Putative miraculin-like protein 2	gb ACL78790.1	<i>Citrus unshiu</i>	91/145 (63%)
20	CAS-CS-124740.1	924	1	Miraculin-like protein 1	dbj BAE79510.1	<i>Citrus jambhiri</i>	134/222 (60%)
21	CAS-CS-124786.1	810	1	Putative miraculin-like protein 2	gb ABL67650.1	<i>Citrus hybrid cultivar</i>	98/134 (73%)
22	CAS-CS-124869.1	387	1	Miraculin-like protein 2	dbj BAE79511.1	<i>Citrus jambhiri</i>	38/38 (100%)
23	CAS-CS-125583.1	986	1	Miraculin-like protein 2	dbj BAE79511.1	<i>Citrus jambhiri</i>	173/196 (88%)
24	CAS-CS-131323.1	1047	1	Putative miraculin-like protein 2	gb ACL78790.1	<i>Citrus unshiu</i>	98/121 (81%)
25	CAS-CS-131338.1	999	1	Putative miraculin-like protein 2	gb ABL67650.1	<i>Citrus hybrid cultivar</i>	52/52 (100%)

Apenas 03 unigenes do tipo *miraculina* foram encontrados em *Citrus aurantium*, os quais codificam proteínas cujas sequências de aminoácidos deduzidas compartilham entre 98 a 99% de similaridade por BLASTx com proteínas *miraculinas* de *C. unshiu*, *C. jambhiri* e *Citrus x paradise* (Tabela 04).

Tabela 04. Identificação e similaridade por BLASTx dos unigenes do tipo *Miraculina* encontrados em *Citrus aurantium*.

IDENTIFICAÇÃO	UNIGENE	TAMANHO (pb)	No. DE ESTs	GENE	NÚMERO DE ACESSO	ORGANISMO	SIMILARIDADE (%)
1	CAS-CA-400262.1	820	5	Putative miraculin-like protein 2	gb ACL78790.1	<i>Citrus unshiu</i>	217/218 (99%)
2	CAS-CA-400355.1	683	5	Miraculin-like protein	gb AAG38517.1 AF283532_1	Citrus x paradise	209/212 (99%),
3	CAS-CA-402310.1	781	1	Miraculin-like protein 2	dbj BAE79511.1	<i>Citrus jambhiri</i>	174/177 (98%)

4.2 Expressão de genes *Mir* de diferentes espécies de citros induzidos em diferentes tecidos sob diferentes condições

Todas as células somáticas dos vegetais possuem a mesma informação genética do organismo, mas a diferenciação celular e a atividade especializada dos tecidos ocorrem porque alguns genes se expressam e outros estão desligados nos diferentes tecidos. A atual hipótese estabelece que quando um gene se expressa, a proteína codificada por ele irá executar uma dada função em uma determinada célula/tecido/órgão do organismo e que a expressão gênica pode acontecer em resposta a alguma condição normal ou de estresse, seja biótico ou abiótico. Portanto, o estudo da expressão de genes gera informações que respondem a questões a respeito das funções biológicas associadas a eles, tais como “quando?” (sob qual condição?), “onde?” (em qual tecido?) e o “quanto?” (números de RNAs transcritos ou de proteínas produzidas?) um determinado gene foi expresso.

Neste contexto, a análise da expressão dos genes do tipo *miraculina* encontrados no genoma funcional dos citros (CitEST) levou a descoberta de que estes foram isolados a partir de 21 bibliotecas de cDNA (DNA complementar ao RNAm), sendo 04 de *Poncirus trifoliata*, 06 de *Citrus reticulata*, 10 de *Citrus sinensis* e 01 de *Citrus aurantium*, em tecidos e sob as condições descritas na Tabela 05.

Tabela 05. Bibliotecas de citros indicando as espécies, tecidos e condições em que os genes do tipo *Miraculina* selecionados foram expressos.

Identificação da Biblioteca	Nº EST ¹	Espécie Vegetal	Tecido	Condição
PT11-C1-900	6917	<i>Poncirus trifoliata</i> var <i>Rubidoux</i> BAG 835 CN RG 035	Folha	Não inoculada com CTV - controle "mock" ²
PT11-C1-901	6968	<i>P. trifoliata</i> var <i>Rubidoux</i> BAG 835 CN RG 035	Folha	Inoculada com CTV
PT11-C2-300	4204	<i>P. trifoliata</i> var <i>Rubidoux</i> BAG 835 CN RG 035	Casca	Não inoculado com <i>Phytophthora parasitica</i> controle "mock"
PT11-C2-301	2955	<i>P. trifoliata</i> var <i>Rubidoux</i> BAG 835 CN RG 035	Casca	Inoculado com <i>P. parasitica</i>
CR05-C1-100	7490	<i>C. reticulata</i> cv 'Ponkan'	Folha	Não inoculada com <i>X. fastidiosa</i> – Controle "mock"
CR05-C1-102	6891	<i>C. reticulata</i> cv 'Ponkan'	Folha	Infectado por <i>Xyella fastidiosa</i> , 30 d.a.i. ³
CR05-C1-103	5853	<i>C. reticulata</i> cv 'Ponkan'	Folha	Infectada por <i>X. fastidiosa</i> , 60 d.a.i.
CR05-C3-700	5398	<i>C. reticulata</i> cv 'Ponkan'	Fruto*	1 cm de diâmetro*
CR05-C3-701	6793	<i>C. reticulata</i> cv 'Ponkan'	Fruto	2,5 cm de diâmetro
CR05-C3-702	7056	<i>C. reticulata</i> cv 'Ponkan'	Fruto	5 cm de diâmetro
CS00-C1-100	7185	<i>C. sinensis</i> cv 'Pêra IAC'	Folha	Não infectado <i>X. fastidiosa</i> mock
CS00-C1-102	7231	<i>C. sinensis</i> cv 'Pêra IAC'	Folha	Infectada por <i>X. fastidiosa</i> , 30 d.a.i.
CS00-C1-101	5899	<i>C. sinensis</i> cv 'Pêra IAC'	Folha	Infectada por <i>X. fastidiosa</i> , estágio1
CS00-C3-700	8454	<i>C. sinensis</i> cv 'Pêra IAC'	Fruto	1 cm de diâmetro
CS00-C3-701	7052	<i>C. sinensis</i> cv 'Pêra IAC'	Fruto	2,5 cm de diâmetro
CS00-C3-702	7909	<i>C. sinensis</i> cv 'Pêra IAC'	Fruto	5 cm de diâmetro
CS00-C3-703	6387	<i>C. sinensis</i> cv 'Pêra IAC'	Fruto	7 cm de diâmetro
CS00-C5-003	4330	<i>C. sinensis</i> cv 'Pêra IAC'	Flor	Sadia de casa-de-vegetação
CS00-C2-003	5451	<i>C. sinensis</i> cv 'Pêra IAC'	Casca	Sadia de casa-de-vegetação
CS00-C1-401	1068	<i>C. sinensis</i> cv 'Pêra IAC'	Folha	Infectada por leprose dos citros
CA26-C1-002	5950	<i>C. aurantium</i> BAG cv 299 source/2380	Folha	Sadia do campo

1) ESTs, *Expressed Sequence Tags* (fragmentos de sequências expressas); 2) Controle mock representa a mesma condição de inoculação exceto pela presença do patógeno; 3) d.a.i. significa dias após a inoculação.

É possível que existam mais do que 127 unigenes do tipo *miraculina* no Unipaper2, uma vez que o banco de dados CitEST é muito extenso e abrangente, contendo sequências de bibliotecas feitas no Brasil e em Harvard. Além disso, existem sequências *miraculinas* descritas no banco de dados mundialmente disponível, o GenBank/NCBI, de espécies que constam no Unipaper2, por exemplo *Citrus sunki*. Especula-se que o programa de busca por palavra-chave não tenha conseguido gerar e disponibilizar as informações completas. Por outro lado, como as

sequências disponíveis no banco de dados estudado foram obtidas a partir de bibliotecas de cDNA, onde a informação sequenciada foi gerada a partir de RNAm expresso sob determinadas condições, existe ainda a possibilidade de que eventuais genes *Mir* não tenham sido expressos nas espécies devido as condições em que foram geradas as bibliotecas do Unipaper2.

4. 3 Estudo dos genes *Mir* expressos em *Poncirus trifoliata*

Os genes *Mir* encontrados expressos em *Poncirus trifoliata* foram induzidos por diferentes condições em dois órgãos dessa espécie: folha e casca de caule.

4. 4 Genes *Mir* expressos em folhas de “*P. trifoliata*”

Um total de 83 unigenes do tipo *miraculina* foram expressos em folhas de *Poncirus trifoliata*, sendo 35 induzidos em folhas inoculadas com o Vírus da Tristeza dos Citros (CTV) e 48 em folhas não inoculadas com este patógeno (Tabela 06).

Tabela 06. Genes *Miraculina* expressos em folhas de *Poncirus trifoliata* encontrados no banco de dados Unipaper2/CitEST.

TECIDO	CONDIÇÃO	UNIGENES	READS		
FOLHA	INFECTADA COM CTV	1	1		
		2	6		
		3	3		
		4	1		
		6	44		
		7	489		
		8	13		
		9	1		
		11	6		
		12	4		
		13	1		
		14	8		
		16	7		
		19	1		
		20	1		
		24	8		
		26	5		
		29	1		
		30	1		
		31	1		
		32	1		
		33	1		
		34	1		
		35	1		
		36	1		
		37	1		
		38	1		
		39	1		
		40	1		
		41	1		
		42	1		
		43	1		
		44	1		
		45	1		
		46	1		
		FOLHA	NÃO INFECTADA COM CTV	2	6
				3	1
				5	3
				6	50
				7	682
				8	23
				9	1
				10	2
				11	7
				12	6
				13	4
14	9				
15	1				
16	6				
17	3				
18	2				
19	1				
23	1				
24	2				
25	1				
26	1				
47	1				
48	1				
49	1				
50	1				
51	1				
52	1				
53	1				
54	1				
55	1				

		56	1
		57	1
		58	1
		59	1
		60	1
		61	1
		62	1
		63	1
		64	1
		65	1
		66	1
		67	1
		68	1
		69	1
		70	1
		71	1
		72	1
		73	1

Alguns genes podem ser encontrados expressos em todas as células do organismo, cuja expressão é chamada constitutiva, os quais estão envolvidos nas atividades vitais de todas as células. Alguns genes podem ser expressos apenas em um determinado tecido e são chamados de específicos de tecidos. Outros genes podem ter sua expressão induzida somente mediante a condição de indução. Entretanto, a expressão de um determinado gene em um órgão pode ser regulada para ele ser mais expresso ou menos expresso, dependendo da condição.

Com base nestas informações, observou-se que 14 unigenes *Mir* de *P. trifoliata* foram encontrados expressos em folhas nas duas condições estudadas. Além disso, a quantidade de sequências expressas de alguns destes genes não foi, aparentemente, afetada pela presença do patógeno, tendo sido praticamente a mesma nas folhas inoculadas com CTV quanto nas não inoculadas. Por exemplo, os genes identificados como 2, 14 e 16, na Tabela 06, acima. Por outro lado, alguns genes que estavam superexpressos em folhas não induzidas por CTV tiveram sua expressão regulada para menos mediante a presença do patógeno CTV. Exemplos desses genes *Mir* são os genes identificados como 7 e 8 na referida tabela. Comparando ainda os genes expressos em folhas nas duas condições citadas, observou-se que 34 genes (5, 10, 15, 17, 18, 23, 25, 47-73) que estavam expressos nas folhas não inoculadas foram silenciados nas folhas inoculadas com CTV. Assim como 21 genes *Mir* (1, 4, 20, 29-46) foram expressos apenas nas folhas inoculadas por CTV. Especula-se que os genes *Mir* expressos em tecidos induzidos por patógenos estejam envolvidos nas respostas da planta a este patógeno.

4.5 Genes *Miraculina* expressos em cascas de caule de “*Poncirus trifoliata*”

Um total de 49 unigenes do tipo *Miraculina* foram expressos em cascas de caule de *P. trifoliata*, sendo 18 induzidos em caules inoculados com *Phytophthora parasitica* e 31 em caules não inoculados com este patógeno (Tabela 07).

Tabela 07. Genes *Miraculina* expressos em cascas de caules de *Poncirus trifoliata* encontrados no banco de dados CitEST.

TECIDO	CONDIÇÃO	UNIGENE	READS
CASCA DE CAULE	INOCULADA COM <i>Phytophthora parasitica</i>	1	01
		2	01
		3	01
		4	01
		6	22
		7	39
		8	33
		9	03
		11	18
		12	34
		13	04
		14	03
		22	04
		24	11
		25	02
		26	04
		27	05
		28	08
CASCA DE CAULE	NÃO INOCULADA	1	02
		2	01
		5	01
		6	85
		7	164
		8	54
		9	03
		10	01
		11	44
		12	35
		13	04
		14	02
		15	01
		16	03
		17	02
		19	01
		20	01
		21	05
		22	05
		23	01
		24	04
25	05		
26	16		
27	04		
28	04		
74	01		
75	01		
76	01		
77	01		
78	01		
79	01		

Observou-se que 16 genes *Mir* foram expressos induzidos nas duas condições de casca de caule estudadas (1, 2, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 22, 24, 25, 26, 27 e 28), conforme Tabela 07. Aparentemente, 15 genes que estavam sendo

expressos em casca de caule não inoculada (05, 10, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 23, 74-79) foram silenciados pela presença do patógeno em cascas de caule inoculadas. Ainda, observou-se que 02 genes (03 e 04) foram induzidos especificamente pela condição de patógeno, estando expressos apenas na casca inoculada com *P. parasitica*.

4.6 Identificação de genes *Mir* expressos tanto em cascas de caule como em folhas de “*Poncirus trifoliata*” induzidos por patógenos

A análise comparativa das tabelas 06 e 07, visando identificar quais os genes *Mir* de *Poncirus trifoliata* foram induzidos apenas sob condição de patógenos, levou a identificação de um total de 25 genes, dos quais 21 foram expressos em folhas especificamente induzidos por CTV e 04 foram expressos em cascas de caule induzidos por *Phytophthora parasítica* (Tabela 08).

Tabela 08. Genes *Mir* de *Poncirus trifoliata* expressos em cascas de caule/*Phytophthora* e em folhas/CTV, encontrados no banco de dados CitEST.

CONDIÇÃO	UNIGENES
Folha inoculada com CTV	16, 19, 20, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46
Casca de caule inoculada com <i>P. parasitica</i>	22, 25, 27 e 28

Nesta análise desconsiderou-se os genes induzidos nos tecidos sob condições de não inoculados com os patógenos. Curiosamente, os genes identificados nesta análise foram diferentes e gerou a dúvida se estes eram específicos da resposta a cada patógeno ou se eram específicos do tecido.

4.7 Genes *Mir* expressos apenas em folhas e em cascas de caule de “*Poncirus trifoliata*” inoculadas e não inoculadas pelos seus respectivos patógenos, CTV e “*Phytophthora parasitica*”

Para verificar a existências de genes *Mir* expressos em *P. trifoliata* induzidos apenas pelo tecido vegetal, realizou-se uma análise comparativa das tabelas 06 e 07, considerando desta vez genes induzidos pelos tecidos, independente de serem

inoculados ou não por patógenos. Neste caso, genes encontrados expressos em ambos os tecidos foram desconsiderados. Como resultado, 56 genes foram expressos especificamente nos dois tecidos, sendo 46 presentes em folhas induzidas por CTV e 10 foram expressos em cascas de caules induzidas por *P. parasitica*.

Tabela 09. Genes *Mir* expressos apenas em folhas e em cascas de caule presentes na espécie *Poncirus trifoliata*, encontradas no banco de dados CitEST.

TECIDO	UNIGENES
SÓ EM FOLHAS	18, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73
SÓ EM CASCA DE CAULE	21, 22, 27, 28, 74, 75, 76, 77, 78, 79

CONCLUSÕES

- No banco de genes expressos em citros CitEST contém pelo menos 127 genes do tipo *miraculina*.
- Genes *miraculina* presentes no banco de dados CitEST estão expressos em órgãos das espécies *Poncirus trifoliata*, *Citrus reticulata*, *C. sinensis* e *C. aurantium*.
- Existem genes *miraculina* com homologia com inibidor de proteinase.
- Genes *miraculina* expressos em órgãos de *Poncirus trifoliata* induzidos sob condições de patógenos são fortes candidatos ao entendimento das interações *Poncirus* – patógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, E.F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros. In: MATTOS Jr. D.; Negri, J.D.; PIO, R. M.; POMPEU Jr. J. (eds). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005.
- AZEVEDO, C.L.L. Sistema de produção de citros para o Nordeste. Embrapa Mandioca e Fruticultura: Cruz das Almas, BA. Sistema de Produção, 16. Versão eletrônica, 2003. Disponível em: <http://sistemasdeprodução.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste.Htm>>Acesso em 19/11/2012.
- BACHCHU, M. A.A.; JIN, S. B.; PARK, J. W.; BOO, K. H.; SUN, H. J.; KIM, Y. W.; LEE, H. Y.; RIU, K. Z.; KIM, J. H. Functional expression of miraculin, a taste-modifying protein, in transgenic *Miyagawa wase Satsuma mandarin (Citrus unshiu Marc.)*. **J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.** Vol. 54 (1), pp. 24-29, 2011.
- BAPTISTA, C. R.; ROSSETTI, V. V.; MÜLLER, G. W.; VEGA, J.; SILVÉRIO, J. L. Microenxertia. In: Rodriguez, O.; Viégas, F.; Pompeu Júnior, J.; Amaro, A. A. (eds) **Citricultura Brasileira**. 2. Ed. Campinas: Fundação Cargill, v. 2, p. 763-774, 1991.
- BASSAN, M.M.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J.; FREIRE, B. F. S.; AVILÉS, T. E. C.; BELTRAME, A. B. Reação de híbridos somáticos de citros à infecção por *Phytophthora nicotianae*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal – SP, v. 32, n. 2, p. 429-435, junho, 2010.
- BERNARDES, F. S. **Diversidade bacteriana endofítica associada à *Citrus sinensis* (L.) Osbeck com sintomas de greening**. 2010. 60 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- BITANCOURT, A. A. Estudos sobre a leprose-dos-citros. I. Distribuição geográfica e sintomatologia. II. Transmissão natural às folhas. III. Transmissão natural às frutas. IV. Experiências de tratamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.22, p. 161-231, 1955.
- BOAVA, L. P.; SIVIERO, A.; MASUDA, Y.; FURTADO, E. L.; MACHADO, M. A. Resistência de citrandarins e citranges a *Phytophthora parasitica*. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 24, n.1, p. 135-144, 2003.
- BRAGA, G. L. **Identificação e clonagem de R – genes candidatos potencialmente envolvidos na resistência ao cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *Citri*)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, São Paulo. 61p. Junho, 2010.

BRUGNARA, E. C. **Caracterização morfológica, citogenética e molecular de híbridos da tangerina ‘montenegrina’**. Dissertação (Mestrado em fitotecnia). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. p. 84. Dezembro, 2006.

CARVALHO, S.A.; GRAF, C. C.D.; VIOLANTE, A. R. Produção de material básico e propagação In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico, 2005. P. 279-316.

CAVALCANTI, L. S. **Papel da celulose XF – 0818 na interação *Xylella fastidiosa* X citros**. 2005. 102 p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2005.

COELHO, I. R. et al. Caracterização morfológica da planta, frutos, sementes, e plântulas de tangerina (*Citrus reticulata* L.) de ocorrência natural no sul do estado do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 23, nº 2, p. 294-301, 2001.

COSTA, M. A. P.; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Somatic hybridisation for improvement of citrus rootstock: production of five new combinations with potential for improved disease resistance. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 43, p. 1151-1156, 2003.

ERWIN, D.C., RIBEIRO, O. K. **Phytophthora diseases worldwide**. St. Paul: APS Press, 1996. 562p.

FARIA, L. M. **Mapeamento genético e detecção de qtls em um cruzamento de limão ‘cravo’ e citrumelo ‘swingle’**. Dissertação (Mestrado), Instituto Agronômico, Campinas, SP, 2007.

FÁVERO, P. **Transformação genética de três cultivares de laranja doce a partir de explantes de plantas adultas**. 2010. 58 p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In.: LUZ, E. D. M. N., MATSUOKA, K. SANTOS, A. F. (Eds.). **Doenças Causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Livraria Rural Editora: Piracicaba, 2001. P. 283-342.

FUNDECITRUS. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br>. Acesso em: 18 nov. 2012.

GARBIN, J. F. CARVALHO, S. A. LATADO, R. R. MÜLLER, G. W. **Avaliação de dois isolados de vírus da tristeza dos citros para proteção cruzada da lima**

ácida 'galego'. Bolsista CNPq/PIBIC: Graduando em Ciências Biológicas, Centro Universitário Hermínio Ometto, Araras – SP, 2009.

GARNSEY, S. M., LEE, R. F. Tristeza. In WHITESIDE, J. O.; GARNSEY, S. M.; TIMMER, L. W. **Compendium of citrus diseases**, St. Paul, p. 48-50, 1989.

HIRAI, T.; DUHITA, N.; TANASE, K. H.; EZURA, H. Cultivation under salt stress increases the concentration of recombinant miraculin in transgenic tomato fruit, resulting in an increase in purification efficiency. **Plant Biotechnology**. vol. 28, pp. 387-392, Japan, 2011.

HIRAI, T.; SATO, M.; TOOYOKA, K.; SUN, H.J.; YANO, M.; EZURA, H. Miraculin, a taste-modifying protein is secreted into intercellular spaces in plant cells. **J Plant Physiol**. vol. 167, pp. 209-215, 2009.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201110.pdf. Acesso em: dezembro de 2011.

IBRAF. Instituto Brasileiro de Frutas. Brasil é o 3º produtor mundial de frutas. 2010. Disponível em: http://www.ibraf.org.br/news_item.asp?NewsID=81.

INTESA (Pombal – PB – Brasil) v.4, n.1, p. 25 - 35 janeiro/dezembro de 2011. <http://revista.gvaa.com.br>

LOPES, J. R. S. Mecanismos de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 21, p. 329, 1996.

MACHADO, M. A. et al. Avaliação da transmissão e seleção de variedade à clorose variegada dos citros (CVC). **Laranja**, Cordeirópolis, v. 13, n. 2 p. 515-531, 1992.

MACHADO, M. A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A. M.; OLIVEIRA, A. C.; Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas. Instituto Agrônomo; Fundag, 2005. 926 p.

MARENCO, S. **Mapeamento genético de tangerina sunki e *Poncirus trifoliata* para resistência ao huaglongbing (greening) dos citros**. Dissertação (Mestrado), Instituto Agrônomo, Campinas, SP, 2009.

MARUCCI, R. C.; CAVICHIOLI, R. R.; ZUCCHI, R. A. Espécies de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae) em pomares de citros da região de Bebedouro, SP, com descrição de uma nova espécie de Acrogonia Stal. **Revista Brasileira de Entomologia**. Vol. 46, Nº 2 (2002), pp. 149-164.

MASUDA, Y.; NIRASAWA, S.; NAKAYA, K.; KURIHARA, Y. Cloning and sequencing of a cDNA encoding a taste-modifying protein, miraculin. **Gene**. v. 161, pp. 175-177, 1995.

MAZZINI, R.B. **Caracterização morfológica e propagação de *Citrus* sp. e de gêneros afins com potencial ornamental**. 2009. 71f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – pós graduação – IAC.

MOREIRA, C. S.; PIO, R. M. Melhoramento de citros . IN: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.S. **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. V. 1. P. 116 – 152.

MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J.; DONADIO, L. C. Citros. In: BRUCKNER, C. H. (Ed.) **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, 2002. P. 77-224.

POMPEU JR., J. Porta-enxertos In: MATTOS JR., D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, RM.; POMPEU JR., J. (Eds.) **Citros**, Campinas, 2005. p. 61-104.

Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil) v.6, n.3, p. 39 - 48 julho/setembro de 2011. <http://revista.gvaa.com.br>

RIBEIRO, R. V. **Influência da temperatura na fotossíntese de laranja ‘Pêra’ com clorose variegada dos citros**. Piracicaba, 2002. 58 p. Dissertação (Mestrado) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

RIETH, S. **Desinfestação de substratos e fungos micorrízicos na produção de porta-enxertos**. Dissertação (Mestrado em fitotecnia), Faculdade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. 104p. Março, 2012.

RODRIGUES, J. C. V.; CHILDERS, C.C.; KITAJIMA, E. W.; MACHADO, M. A & NOGUEIRA, N. L. Uma estratégia para o controle de leprose dos citros. **Laranja**, v. 22, n. 2, p. 411-423, 2001.

RODRIGUES, J. C. V.; KITAJIMA, E. W.; CHILDERS, C. C.; CHAGAS, C. M. Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v.30, p.161-179, 2003.

ROSSETO, E.A. **Aspectos epidemiológicos da clorose variegada dos citros no estado do Rio Grande do sul**. Porto Alegre, 2001. Tese (Doutorado em Agronomia – Fitotecnia). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

ROSSETTI, V.; DE NEGRI, J. D. Clorose variegada dos citros: revisão. **Laranja**, v. 11, p. 1-14, 1990.

SASSERON, S. R. **Desenvolvimento e validação de diagnóstico molecular de fungos patogênicos a citros**. Dissertação (Mestrado), Instituto Agronômico, Campinas, SP, 2008.

SILVA, K. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; BONFIM, M. P.; SILVA, D. S.; ABEL, J. R. S.; BENETT, C. G. S. Atividade antagônica in vitro de isolados de *Trichoderma* ssp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 749-754, out/dez. 2008.

SIVIERO, A. **Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* à gomose**. Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2011.

SIVIERO, A.; CRISTOFANI, M.; BOAVA, L. P.; MACHADO, M. A. Mapeamento de QTLs associados à produção de frutos e sementes em híbridos de *Citrus sunki* Vs. *Poncirus trifoliata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**., Jaboticabal – SP, v. 24, n. 3, p. 741-743, 2002.

SOARES FILHO, W.S., MOREIRA, C. S., CUNHA, M. A. P., CUNHA SOBRINHO, A. P., PASSOS, O. S. Poliembrionia e frequência de híbridos em *Citrus* ssp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 35, n. 4, p. 857- 864, 2000.

SUGAYA, T.; YANO, M.; SUN, H. J.; HIRAI, T.; EZURA, H. Transgenic strawberry expressing the taste-modifying protein miraculin. **Plant Biotechnology**. vol. 25, pp. 329-333, 2008.

SUN, H. I.; CUI, M. L.; MA, B.; EZURA, H. **Functional expression. Of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce**. Federation of European Biochemical Societies. Letters 580, pp. 620-626, 2006.

TANASE, H. K.; HIRAI, T.; KATO, K.; DUHITA, N.; EZURA, H. From miracle fruit to transgenic tomato: mass production of the taste-modifying protein miraculin in transgenic plants. **Plant Cell Rep.** (2011) 31: 513-525.

TIMMER, L. W., GARNSEY, S.M., GRAHAM, J. H. **Compendium of Citrus Diseases**. APS Press. St. Paul, 2000. 132p.

TREERASILP, S., and KURIHARA, Y. **The Journal of Biological Chemistry.** vol. 263, pp. 11536-11539, 1988.

TREERASILP, S.; HITOTSUYA, H.; NAKAJO, S.; NAKAYA, K.; NAKAMURA, Y.; KURIARA, Y. Complete amino acid sequence and structure characterization of the taste-modifying protein, Miraculin. **The Journal of Biological Chemistry.** vol. 264, n. 12, Issue of april 25, pp. 6655-6659, Pinnted in U. S. A. 1989.