

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

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
EFETORES DO TIPO *CRN* (*Crinkling and Necrosis-Inducing Protein*) DE
Phytophthora nicotianae DE CITROS**

REG/BIBLIOTECA

CUITÉ - PB
2010

GLÁUCIA DIOJÂNIA AZEVÊDO MEDEIROS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
EFETORES DO TIPO *CRN* (*Crinkling and Necrosis-Inducing Protein*) DE
Phytophthora nicotianae DE CITROS**

UFMG/BIBLIOTECA

Monografia apresentada ao Curso de Biologia da
Universidade Federal de Campina Grande como
forma de obtenção do Grau de Licenciado.

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

CUITÉ - PB

2010



Biblioteca Setorial do CES.

Junho de 2021.

Cuité - PB

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

M488i Medeiros, Gláucia Diojânia Azevêdo.

Identificação e caracterização molecular de efetores do tipo CRN (*crinkling and necrosis-inducing protein*) de *Phytophthora* de Citros. / Gláucia Diojânia Azevêdo Medeiros – Cuité: CES, 2010.

50 fl.

Monografia (Curso de Licenciatura em Biologia) – Centro de Educação e Saúde – UFCG, 2010.

Orientadora: Dr. Magnólia de Araújo Campos.

1. Gomose. 2. Oomiceto. 3. Bioinformática. I. Título.

CDU 57:681.3

GLÁUCIA DIOJÂNIA AZEVÊDO MEDEIROS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
EFETORES DO TIPO *CRN* (*Crinkling and Necrosis-Inducing Protein*) DE
Phytophthora nicotianae DE CITROS**

Monografia apresentada ao Curso de Biologia da
UFCG/Campus de Cuité, para obtenção do grau de
Licenciatura em Biologia.



Aprovada em 08 / 12 / 10

BANCA EXAMINADORA

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

Prof Dr. Jean César Farias de Queiroz

Prof^a. MSc. Thaís Gaudencio do Rêgo

UFCC/BRUNTECA

Aos meus pais,
Glória e Diógenes (minhas dádivas),
pelo amor e apoio incondicional, guiando meus passos pelos melhores caminhos,
ensinando-me a viver sem medos, cheia de sonhos e esperança;
e aos meus irmãos, a quem busco melhorar e servir de exemplo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pela graça de estar viva e por iluminar meus passos, dando-me serenidade, força e sabedoria para ter chegado até aqui;

Ao Centro de Educação e Saúde (CES), Campus de Cuité da UFCG, pela oportunidade de realização deste curso;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e ao Dr. Marcos Antonio Machado, pesquisador do Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis SP, pela concessão de bolsa nível AT-NM no âmbito do projeto INCT dos Citros;

À minha orientadora, Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos, por ser um exemplo de profissionalismo, e principalmente, por ser uma pessoa maravilhosa e iluminada, que não mediu esforços para realização deste trabalho; sua orientação foi além de conceitos científicos, contribuindo para minha formação moral, intelectual, física e espiritual;

Ao Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, por permitir a realização de parte substancial deste trabalho em suas dependências;

À Luciano Kishi, bioinformata do Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, pela sua colaboração efetiva e preciosa;

À Fabiana, técnica da Clínica Fitopatológica, e Leonardo, bolsista do Laboratório de Biotecnologia do Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, pela boa vontade e contribuição na realização de parte deste trabalho;

Aos meus professores do CES, pela grande contribuição na minha formação acadêmica;

À técnica do Laboratório de Biologia do CES, Jacqueline Mendes e os colegas de projeto, Diego e Géssica, pela amizade e por estarem sempre me apoiando e incentivando;

Aos meus colegas de turma, pelo companheirismo e pela agradável convivência durante estes quatro anos;

Aos meus avós, pelo exemplo de luta e sabedoria;

Aos meus tios, tias, primos e primas, por serem parte muito importante na minha vida;

À minha amiga Elisângela e toda sua família, por abdicarem de sua privacidade, me acolhendo como uma filha em sua casa;

À minhas queridas amigas, que entenderam minha ausência, e com as quais sempre posso contar em todos os momentos da minha vida.

RECEBIDA



“Faça, erre, tente, falhe, lute. Você foi criado para construir pirâmides e versos, descobrir continentes e mundos, e caminhar sempre, com um saco de interrogações na mão e uma caixa de possibilidades na outra...”

Nizan Guanaes

RESUMO

Phytophthora nicotianae var. *parasitica* é um oomiceto agente causador da gomose (ou podridão-do-pé) dos Citros, uma das mais importantes doenças que afetam a Citricultura brasileira. Patógenos desse gênero, incluindo *P. parasitica*, possuem moléculas efetoras típicas que estabelecem uma interação com a planta, modulando a resposta de defesa: capacitando o parasitismo ou ativando a resistência, levando a morte celular programada. Dentre estas merecem destaque efetores do tipo CRN (*Crinkling Necrosis-Inducing and Protein*), os quais são efetores citoplasmáticos que causam fenótipos em plantas de enrugamento foliar e morte celular. O conhecimento da estrutura e função dos efetores de patógenos e os danos que eles causam nas plantas possibilitarão novas estratégias para a manipulação de plantas, levando-as à resistência a patógenos oomicetos. Neste contexto, o objetivo principal deste trabalho foi identificar e caracterizar efetores do tipo CRN de *P. parasitica*, usando ferramentas de Bioinformática para selecionar dentro do banco de dados de sequências expressas de *P. parasitica* - o CitEST/PP, induzidas pelo crescimento *in vitro* após 40 ciclos de subcultivos e *in planta* após interação citros-*P. parasitica*. Como resultado, seis ESTs codificando possíveis efetores do tipo CRN em *P. parasitica* foram selecionados no banco de dados CitEST/PP, os quais foram agrupados em 2 contigs e 2 singlets que compartilham elevada similaridade de sequência de aminoácidos com CRN proteínas de *Phytophthora infestans*. Este é o primeiro relato da caracterização da estrutura de genes do tipo CRN de *P. nicotiana* de citros. Os quatro genes do tipo CRN expressos em *P. parasitica* foram encontrados induzidos durante interação com citros. Apesar de todos apresentarem sequências parciais, as sequências de aminoácidos deduzidas dos quatro genes apresentam região N-terminal conservada e bem caracterizada e região C-terminal muito diversificada e diferente das conhecidas até o momento. Os possíveis efetores do tipo CRN estudados são parte do secretoma de *Phytophthora nicotianae* de citros, estudos futuros contribuirão para a clonagem, completa caracterização da estrutura de genes CRNs de *P. nicotianae* de citros, bem como sua caracterização funcional.

Palavras chaves: Gomose, Oomiceto, Patógeno, CitEST, Bioinformática

ABSTRACT

Phytophthora nicotianae var. *parasitica* is an oomycete causal agent of gummosis (or foot rot) in citrus plants, one of the most important diseases affecting Brazilian Citriculture. Pathogens from this genus, including *P. parasitica*, secrete typical effector molecules to establish an interaction with the host plant, modulating the defense response by either enabling parasitism or activating the resistance mechanisms, leading to programmed cellular death (PDC). Among these, cytoplasmic effectors such as crinkler (CRN, *Crinkling Necrosis-Inducing and Protein*) possessing predicted secretion signals and conserved N-terminal sequence motifs cause leaf crinkling and PDC phenotypes. The understanding of the structure and functions of pathogen effectors as well as those caused by them in plants will contribute to novel strategies for manipulation of plants, leading to resistance to oomycete pathogens. In this context, the main objective of this work was to identify and characterize CRN-like effectors from *P. parasitica*, by using bioinformatic tools to search within the CitEST/PP database for expressed sequences induced by the *in vitro* growth, after 40 subculture cycles, and citrus-*P. parasitica* interaction. As a result, six ESTs encoding putative CRN-like effectors in *P. parasitica* were selected from the CitEST/PP database. These ESTs were grouped into two contigs and two singlets, which share high amino acid sequence similarity with CRN genes from *Phytophthora infestans*. This is the first report on the characterization of CRN-like genes of *P. parasitica*. The four genes were found induced by the citrus interaction. Besides the partial sequences, the amino acid deduced sequences from them possess conserved N-termini and diverse C-terminal regions that are different from others described at the present. The studied putative CRN-like effectors may be part of the *P. parasitica* secretome and future works will contribute to cloning, complete characterization of the CRN-like gene structures and functional roles.

Palavras chaves: Gummosis; Oomycete; CitEST; Bioinformatic.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1 | Gomose dos Citros | 20 |
| FIGURA 2 | Ciclo de vida de <i>Phytophthora nicotianae</i> de citros | 22 |
| FIGURA 3 | Representação esquemática da estrutura de efetores CRN, indicando as regiões N-terminal e C-terminal e os motivos e domínios que as compõem | 25 |
| FIGURA 4 | Sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene <i>PPCRN1</i> . A sequência do peptídeo sinal amino | 35 |
| FIGURA 5 | Sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene <i>PPCRN2</i> . A sequência do peptídeo sinal amino | 36 |
| FIGURA 6 | Sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene <i>PPCRN3</i> . A sequência do peptídeo sinal amino..... | 37 |
| FIGURA 7 | Sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene <i>PPCRN4</i> . A sequência do peptídeo sinal amino..... | 38 |
| FIGURA 8 | Comparação de sequências da região amino-terminal de membros da família <i>crinkler</i> de <i>Phytophthora parasitica</i> com sequências homólogas. A. Comparação de sequências de aminoácidos, demonstrando regiões conservadas típicas de efetores CRN. sinais. B. Comparação de sequências de nucleotídeos, demonstrando a divergência entre os genes <i>PPCRNL</i> . O alinhamento foi realizado usando o programa CLUSTALW. O programa GeneDoc foi usado para sombrear homologias. A seta à esquerda indica o sítio de clivagem dos peptídeos sinais, enquanto que á direita indica o início da região carboxi-terminal | 39 |

- FIGURA 9 Comparação de seqüências da região carboxi-terminal de membros da família *crinkler* de *Phytophthora parasitica* entre si. **A, B e C.** Comparação de seqüências de aminoácidos, demonstrando regiões conservadas. **D.** Comparação de seqüências de nucleotídeos, demonstrando a divergência entre os genes *PPCRNL*. O alinhamento foi realizado usando o programa CLUSTALW. O programa GeneDoc foi usado para sombrear homologias 41

- FIGURA 10 Micrografias de fases do ciclo de vida de *P. nicotianae* var. *parasitica* obtidas para isolamento de RNAm e estudo quantitativo da expressão de genes do tipo *CRN*. **A.** Micélio. **B.** Hifa com esporângio cheio. **C.** Esporângio liberando zoósporos. **D.** Hifa com esporângio vazio 45

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1 | Sequência dos primers desenhados para reações de PCR quantitativo em tempo real para genes do tipo <i>CRN</i> | 30 |
| TABELA 2 | Distribuição de ESTs de <i>Phytophthora parasitica</i> de citros do tipo <i>CRN</i> (família <i>Crinkler</i>) em clusters e similaridade da sequência de aminoácidos deduzidos com proteínas do GenBank | 33 |
| TABELA 3 | Similaridade da sequência de aminoácidos deduzidos das regiões N-terminal e C-terminal de genes de <i>Phytophthora parasitica</i> de citros do tipo <i>CRN</i> (família <i>Crinkler</i>) com proteínas <i>CRN</i> de <i>Phytophthora infestans</i> (HAAS et al., 2010; GenBank) | 43 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------|
| APTA | Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios |
| Arg | Aminoácido Arginina |
| Avr | Avirulência |
| BLAST | Do inglês, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| CAP | Do inglês, <i>Sequence Assembly Program</i> |
| cDNA | DNA complementar |
| CES | Centro de Educação e Saúde |
| CitEST | Banco de dados de segmentos de seqüências expressas de citros |
| CRN | Do inglês, <i>Crinkling and Necrosis-Inducing Protein</i> |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| ESTs | Do inglês, <i>Expressed Sequence Tags</i> , segmentos de seqüências expressas |
| EUA | Estados Unidos da América |
| HR | Resposta de Hipersensibilidade |
| IAC | Instituto Agronômico de Campinas |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| INCT | Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia |
| Leu | Leucina |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| NCBI | Do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NLS | Localização Nuclear Funcional |
| ORF | Do inglês, <i>Open Reading Frame</i> |
| PAMP | Padrão Molecular Associado à Patógeno |
| PCR | Do inglês, <i>Polimerase Chain Reaction</i> |

| | |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| PP | <i>Phytophthora parasitica</i> (= <i>Phytophthora nicotianae</i> var. <i>parasitica</i>) |
| PRR | Receptor de Reconhecimento Padrão |
| R | Resistência |
| RNA | Ácido Ribonucléico |
| Tm | Temperatura |
| UFCG | Universidade Federal de Campina Grande |

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| RESUMO | vii |
| ABSTRACT | viii |
| LISTA DE FIGURAS | ix |
| LISTA DE TABELAS | xi |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | xii |
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| Objetivo Geral | 15 |
| Objetivos Específicos | 15 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 17 |
| 2.1 Características e importância dos Citros | 17 |
| 2.2 Importância de <i>Phytophthora</i> spp. sobre os Citros | 19 |
| 2.3 <i>Phytophthora nicotianae</i> var. <i>parasitica</i> | 22 |
| 2.4 Interação Planta- <i>Phytophthora</i> | 23 |
| 2.5 Efeitores de <i>phytophthora</i> | 25 |
| 2.5.1 Efeitores Citoplasmáticos do tipo CRN (<i>Crinkling and Necrosis-Inducing Protein</i>) ou <i>Crinkler</i> | 25 |
| 2.6. Importância da Bioinformática para identificação e caracterização de genes candidatos a efetores | 27 |
| 3 METODOLOGIA | 29 |
| 3.1 Seleção de genes efetores candidatos | 29 |
| 3.2. Caracterização molecular <i>in silico</i> de genes efetores do tipo CRN (<i>Crinkling and Necrosis-Inducing Protein</i>) de <i>Phytophthora nicotianae</i> de citros | 29 |
| 3.3 Desenho de primers específicos para genes CRN de <i>P. nicotianae</i> de citros | 30 |
| 3.4 Obtenção da separação das diferentes fases do desenvolvimento assexual <i>Phytophthora nicotianae in vitro</i> | 30 |

BIBLIOTECA

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 33 |
| 4.1 Identificação e caracterização molecular de genes do tipo <i>CRN</i> (<i>Crinkling and Necrosis-Inducing Protein</i>) de <i>Phytophthora nicotianae</i> var. <i>parasitica</i> | 33 |
| 4.2 Iniciando os estudos de expressão de genes de <i>P. parasitica</i> | 44 |
| 4.2.1 Primers específicos para genes <i>CRN</i> de <i>P. parasitica</i> | 44 |
| 5 CONCLUSÕES | 46 |
| 6 REFERÊNCIAS | 47 |

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Phytophthora* (do grego, destruidor de plantas), oomiceto anteriormente classificado no reino Fungi, está atualmente inserido no reino Stramenopila, pois apresenta características filogenéticas mais próximas das algas. Existem mais de 90 espécies de *Phytophthora* e a maioria delas são consideradas destrutivas, causando doenças em um grande número de espécies vegetais economicamente importantes, dentre as quais, tomate, batata, soja, mandioca, cebola, cacau, citros (ERWIN & RIBEIRO, 1996). Dentre as espécies de *Phytophthora* onze estão associadas ao complexo de doenças causadas em citros. No entanto, apenas duas, *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (= *P. parasitica*) e *P. citrophthora*, estão associadas às doenças presentes no Brasil (ROSSETTI, 2001), sendo de particular interesse *P. parasitica* por apresentar formas alternativas de multiplicação, podendo sobreviver por alguns anos no solo na forma de micélio, esporângio, cisto, clamidiósporos e oósporos; e por está associada a perdas em todas as fases da cultura de citros.

A citricultura aparece como uma das principais atividades do agronegócio brasileiro, no entanto, os danos causados por ataques sofridos por pragas ou doenças interferem diretamente na quantidade e na qualidade das frutas cítricas produzidas. A gomose, ou podridão-do-pé, causada por *P. parasitica*, é um dos problemas fitossanitários mais sérios da Citricultura, pois as perdas ocorrem em todas as suas fases, tanto em viveiros como no campo, podendo causar podridão na base do tronco, nas raízes e radículas, folhas e frutos, levando a um definhamento das plantas e eventual morte. Altas temperatura e umidade relativa do ar e solo são favoráveis ao desenvolvimento da gomose, causada pela rápida produção de esporângios e zoóporos em tecidos infectados, nessas condições.

A interação entre *Phytophthora* e plantas envolve uma gama de troca de sinais, nos quais se incluem defesa por parte da planta, ataque por parte do patógeno e inibição de uma ou mais ações dos componentes envolvidos. Essa interação é mediada pela ação dos componentes do sistema imune inato das plantas (similar aos mecanismos de “imunidade inata” dos animais), cujos fenótipos são resistência específica de hospedeira (interação Avr-R) e resistência basal ou de não hospedeira (interação PAMP-PRR), como também por moléculas efetoras de patógenos, que são proteínas que entram (no citoplasma) em células vegetais e tem como função principal suprimir as vias de transdução de sinais que mediam as repostas de defesa de plantas

As espécies de *Phytophthora* possuem proteínas efetoras típicas capazes de atravessar a membrana plasmática do hospedeiro e, uma vez dentro das células, suprimem a sinalização

de defesa da planta hospedeira, por ligação às proteínas “alvo de efetores”, levando aos sintomas da doença. Entretanto, proteínas de resistência de plantas podem detectar um efector e/ou um complexo de “efector-proteína alvo” e induzir mecanismos de resistência, que é mediado por uma interação gene-a-gene entre o produto de resistência da planta (R) e o produto de avirulência do patógeno (Avr), ou pela ligação de um eliciador não-específico ou geral denominado Padrão Molecular Associado à Patógeno (PAMP) ao receptor de reconhecimento padrão (PRR), podendo culminar numa morte celular localizada chamada de resposta de hipersensibilidade (HR) (TYLER, 2008).

As proteínas efetoras podem ser extracelulares e intracelulares. Dentre as proteínas intracelulares, incluem-se as atividades dos efetores citoplasmáticos das famílias RXLR e CRN (*Crinkling and Necrosis-Inducing Protein*), sendo de particular interesse os do tipo CRNs, que causam fenótipos em plantas de enrugamento foliar e morte celular. Efetores CRN são codificados por uma ampla família de genes CRNs encontrados expandidos nos cromossomos como regiões repetidas, como resultado de eventos de múltipla duplicação gênica e recombinação intragênica com mais de 300 genes e 390 pseudogenes CRNs descritos, sendo, 196 e 255 em *P. infestans*, 100 e 102 *P. sojae* e 19 e 42 em *P. ramorum*, respectivamente, porém pouco se sabe sobre suas funções durante o processo de infecção (HAAS, 2009).

A genômica funcional tem sido usada com sucesso para identificar sequências de efetores de *Phytophthora* spp. em bancos de dados específicos. O conhecimento da estrutura e função dos efetores de patógenos e os danos que eles causam nas plantas é uma condição para o entendimento da base molecular da patogenicidade e da doença. Assim, análises moleculares mais detalhadas, possibilitarão novas estratégias para a manipulação de plantas, levando-as à resistência a patógenos oomicetos (KAMOUN, 2005).

Neste contexto, o objetivo principal deste trabalho foi identificar e caracterizar efetores do tipo CRN de *P. parasitica*, usando ferramentas de Bioinformática para selecionar dentro do banco de dados de sequências expressas de *P. parasitica* - o CitEST/PP, induzidas pelo crescimento *in vitro* após 40 ciclos de subcultivos e *in planta* após interação citros-*P. parasitica*. A estratégia usada para alcançar este objetivo envolveu: a) Seleção de genes efetores candidatos; b) Caracterização molecular *in silico* de genes efetores do tipo CRN (*Crinkling and Necrosis-Inducing Protein*) de *P. parasitica*; c) Desenho de primers específicos para genes CRN de *P. nicotianae* de citros; d) Obtenção da separação das diferentes fases do desenvolvimento assexual de *P. parasitica in vitro*

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características e importância dos Citros

Os Citros são originários principalmente das regiões tropicais e subtropicais do sul e sudeste da Ásia, incluindo áreas da Austrália e África. O termo Citros além abranger um grande grupo de plantas do gênero *Citrus*, compreende também outros gêneros afins como *Fortunella* e *Poncirus* ou híbridos da família Rutaceae, representado em sua maioria, por laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*Citrus reticulata* e *Citrus deliciosa*), limões (*Citrus limon*), limas ácidas como o Tahiti (*Citrus latifolia*) e o Galego (*Citrus aurantiifolia*), e doces como a lima da Pérsia (*Citrus limettioides*), pomelo (*Citrus paradisi*), cidra (*Citrus medica*), laranja-azeda (*Citrus aurantium*) e toranjas (*Citrus grandis*) (ABECITRUS, 2007).

Apesar de serem considerados mesófitos, suas folhas apresentam características xeromórficas, o que pode ser explicado pelo fato de regiões tropicais e subtropicais apresentarem períodos com baixa disponibilidade de água, provocando adaptações morfo-fisiológicas que permitiram o desenvolvimento dos citros nessas condições (SPIEGEL-ROY & GOLDSCHMIDT, 1996). Suas árvores apresentam porte médio, atingindo em média quatro metros de altura. A copa é densa, de formato normalmente arredondado, as folhas são sempre verdes e aromáticas; as flores, também aromáticas, são pequenas e brancas muito procuradas pelas abelhas melíferas e matéria-prima da água de flor de laranjeira.

Os frutos do tipo baga apresentam-se de diferentes formas e tamanhos, são cheios de sabor e aromas e apresenta valioso valor nutricional, eles são ricos em vitamina C ou ácido ascórbico e ácido fólico, assim como uma boa fonte de fibras, são livres de gordura, além disso, eles contêm potássio, cálcio, fósforo, magnésio, ferro, vitamina A e complexo B, proporcionando muitos benefícios a saúde.

A citricultura brasileira apresenta números expressivos que traduzem a grande importância econômica e social que a atividade tem para a economia do país. Com uma fruticultura diversificada, o Brasil é um dos maiores pólos mundiais de produção de sucos de frutas. No ano de 2003, as exportações do setor alcançaram US\$ 1,25 bilhão. Do total, 95,5% corresponde a suco de laranja, do qual o país é o maior produtor e exportador (MAPA, 2004). Em cada cinco copos de suco de laranja bebidos no mundo, três são produzidos no Brasil. O estado de São Paulo é o maior produtor de laranja, em 2009 colheu mais de 13,6 milhões de toneladas da fruta (IBGE, 2009). As exportações do complexo da laranja somaram US\$ 1,6

bilhão no Estado, em 2009, sendo que 96% desse montante consistiram em suco de laranja. A exportação de suco de laranja congelado ocupou o nono lugar entre os principais produtos exportados pela economia paulista (CITROSBR, 2010; INVESTE SÃO PAULO, 2010). O setor citrícola brasileiro, somente no Estado de São Paulo, gera mais de 500 mil empregos diretos e indiretos (CITROSBR, 2010).

A Região Nordeste responde por 9% da produção nacional de laranja, constituindo-se na segunda maior região produtora do país, com mais de 118.000 hectares cultivados e mais de 1,7 milhões de toneladas da fruta. Dentre os estados produtores, o destaque fica com os estados Bahia e Sergipe, respectivamente segundo e terceiro produtores nacionais (IBGE, 2009). A Paraíba encontra-se no 7º lugar no ranking nacional em volume de produção, com mais de 6 toneladas de laranja (IBGE, 2009). Dessa forma, a citricultura Nordestina aparece como uma atividade com grande potencial para implementar seu crescimento sobretudo em função da ausência de doenças e pragas de grande importância que se encontram distribuídas no Sudeste, maior centro produtor.

Neste contexto, a citricultura se apresenta como uma das mais importantes atividades do agronegócio brasileiro. No entanto, alguns problemas têm atingido o setor, principalmente os crescentes danos causados por pragas e doenças. Os danos causados por esses problemas fitossanitários interferem diretamente na quantidade e na qualidade das frutas cítricas produzidas. Dependendo da intensidade do ataque sofrido por pragas ou doenças, os danos deixados na planta podem torná-la improdutiva ou levar à sua erradicação (MARENGO, 2009).

O método de propagação mais utilizado nas plantas cítricas é a enxertia, raramente são cultivadas na forma de pré-franco. O uso da enxertia busca induzir melhor qualidade dos frutos, aumento e precocidade da produção, longevidade das plantas, tolerância a estresses diversos, causados por fatores bióticos (pragas e doenças) e abióticos (salinidade, déficit hídrico, etc.), preservando as características desejadas das copas (POMPEU JÚNIOR, 1991).

As dificuldades encontradas pelos produtores de citros em lidar com o surgimento e manifestação de doenças os têm levado a buscarem o auxílio dos centros de pesquisas especializados em citros. Sendo elucidada uma alternativa racional frente ao usual controle químico dessas doenças ou de seus vetores que é a obtenção de genótipos com maior resistência aos principais patógenos, através de programas de melhoramento genético e seleção dos citros, os quais têm como foco a obtenção de novas variedades de porta-enxertos

BIBLIOTECA

e de copa com maior tolerância ou resistência a doenças e pragas, e mais adaptadas a condições abióticas adversas (MARENGO, 2009)

2.2 Importância de *Phytophthora* spp. sobre os Citros.

A Citricultura brasileira ocupa lugar de destaque no agronegócio mundial, no entanto, a produtividade ainda é considerada baixa, com uma média de produção de 2 caixas por planta em produção contra 6 caixas por planta obtidas pelos EUA (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2004). Um dos fatores que contribuem para essa situação são os crescentes danos causados por problemas fitossanitários.

A laranjeira e os outros citros podem ser atacados por pragas como o ácaro da ferrugem, a orthezia, a larva minadora (em viveiro ou pomar novo), a cochonilha escama farinha e broca do tronco (besouros que perfuram tronco e ramos), pulgões, moscas-das-frutas, lagartas, cochonilhas e formigas. As doenças mais comuns são causadas por fungos: Verrugose (lesões nas folhas e brotos), gomose (afeta os ramos, raízes e caule), melanose (lesões nos frutos, folhas e ramos), rubelose (ramos e tronco), mancha preta (frutos), Estiolamento (infecta tecidos de flores e frutos jovens); e por bactérias: Cancro Cítrico (folhas, ramos e frutos), clorose variegada dos citros (folhas e frutos) e Huanblongbing (Greening – infecta folhas e frutos) (EMPRAPA, 2003).

Existem ainda doenças causadas por Vírus: Leprose (folhas, ramos e frutos), Tristeza – CTV (nanismo, hipertrofia foliar e caneluras nos tecidos) e sorose (copa das plantas); por Viróides: Exocorte (porta-enxertos) e Xiloporose (folhas e porta-enxerto); e doenças de causas desconhecidas: Morte súbita dos citros, Declínio dos citros e sarampo (EMBRAPA, 2003).

Atualmente existem descritas mais de 35 doenças de importância econômica na cultura de citros, entre as quais destaca-se a gomose de *Phytophthora*, causada principalmente por *Phytophthora nicotianae* Breda de Hann var. *parasitica* (Dastur), também chamada de *Phytophthora parasitica*, que é uma das principais doenças dos citros (*Citrus* spp.) e ocorre em todas as regiões citrícolas do mundo (Graham & Timmer, 1992). Estima-se que os danos provocados por organismos do gênero *Phytophthora* em citros seja de 10 a 30% da produção citrícola mundial (ERWIN & RIBEIRO, 1996).

Existem mais de 90 espécies de *Phytophthora* sendo a maioria delas consideradas agentes destrutivos. Dentre suas espécies, onze estão associadas ao complexo de doenças causadas por *Phytophthora* em Citros, são elas: *P. nicotiana* var. *parasitica*, *P. citrophthora*,

P. citricola, *P. syringae*, *P. hibernalis*, *P. palmivora*, *P. dreschslei*, *P. cinnamomi*, *P. magasperma*, *P. boehmeriae* e *P. cactorum*. No entanto, apenas duas, *P. parasitica* e *P. citrophthora*, estão associadas às doenças presentes no Brasil (ROSSETTI, 2001), sendo que no Estado de São Paulo, *P. parasitica* está associada às perdas mais significativas tanto em viveiros, quanto em pomares (FEICHTENBERGER, 2001).

Os sintomas causados pela infecção de *Phytophthora ssp.* podem variar dependendo da espécie ou cultivar de citros, da idade da planta, dos órgãos onde ocorre o ataque ou das condições ambientais prevalecentes. A gomose de *Phytophthora* é um dos problemas fitossanitários mais sérios da Citricultura, pois as perdas ocorrem em todas as suas fases, tanto em viveiros como no campo. Na sementeira, o patógeno pode provocar o tombamento das plântulas ou mela (*damping-off*), nos viveiros, lesões em folhas, brotos e hastes; nos pomares, ocorrem lesões no colo e no tronco e podridões das raízes e radículas; em pós-colheita, incita a podridão parda dos frutos (FEICHTENBERGER, 2001).

A gomose ou “podridão do pé” é caracterizada pelo escurecimento e morte de tecidos internos na casca e no lenho, visível quando removida a casca na região do tronco da planta, com exudação de goma, mostrando rachaduras e fendilhamentos longitudinais da casca (Figura 1). A morte do tecido pelas lesões pode levar ao anelamento na região do tronco ou das raízes principais, impedindo o fluxo da seiva elaborada para o sistema radicular e provocando a morte da planta (GRAHAM & TIMMER, 1992). Além disso, ocorrem sintomas reflexos da parte aérea, como clorose e queda intensa das folhas correspondendo ao lado do tronco ou das raízes principais onde ocorrem as lesões. Os frutos mais próximos ao solo podem ser contaminados apresentando podridão seca de cloração marrom-parda que apresentam forte cheiro acre (EMBRAPA, 2003)



Figura 1. Gomose dos Citros

Condições de alta temperatura e umidade relativa do ar e solo são favoráveis ao desenvolvimento da gomose. Práticas culturais mal realizadas, como a falta de aeração no solo e drenagem podem favorecer o seu desenvolvimento (SIVIERO, 2001). Para controlar a gomose recomenda-se evitar solos pesados e mal drenados; enxertar as plantas a uma altura de 30 a 40 cm do solo; evitar o acúmulo de umidade e detritos junto ao colo das plantas; podar os galhos inferiores a 80 cm evitando, principalmente a podridão de frutos; pincelar o tronco e a base do ramo com um fungicida preventivo antes do início da estação chuvosa; evitar ferimentos durante os tratos culturais; inspecionar regularmente os pomares, examinando a região da base do tronco (em todo o pomar) e raízes laterais principais (nas plantas da área foco) (EMBRAPA, 2003).

Atualmente a principal forma de controlar doenças causadas por *Phytophthora* spp. é o uso de porta-enxerto resistentes ou tolerantes, tais como Tangerina *Sunki*, *Citranges*, *Citrumelos* e *Poncyrus trifoliata* e limão cravo, por ser de menor custo, facilmente exequível e por reduzir o impacto de produtos químicos ao ambiente (EMBRAPA, 2003). Porém os principais porta-enxertos utilizados atualmente apresentam suscetibilidade a *Phytophthora* spp.

2.3 *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*.

O gênero *Phytophthora*, pertence ao reino Stramenopila, ao filo Oomicota, à classe Oomicetes e à ordem Phytiales, é um patógeno distribuído mundialmente que afeta diversas culturas em regiões de clima tropical, subtropical e temperado. *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (Dastur), também chamado de *P. parasítica* ou *P. nicotianae* dos citros, causa doenças em um grande número de espécies vegetais economicamente importantes, dentre as quais, citros, tomate, fumo, mandioca, cebola, gergelim, ervilha, violeta, e alguns isolados são especificamente patogênicos a um único hospedeiro (TYLER, 2002).

As principais características que diferenciam as espécies de *Phytophthora* dos fungos verdadeiros, são que as espécies de *Phytophthora* possuem zoósporos biflagelados, não sintetizam esteróis, embora requeiram um suprimento exógeno de B-hidroxi esteróis para a esporulação. Além disso, eles possuem paredes celulares compostas por β 1-3 e β 1-6 glucanas e celulose, e órgãos vegetativos diplóides. (ERWIN & RIBEIRO, 1996).

O ciclo de vida de muitos oomicetos que infectam raízes consiste de dois ciclos, um sexual (com produção de oósporos) e um assexual (com produção de zoósporos). Espécies de *Phytophthora* podem sobreviver por alguns anos no solo na forma de micélio, esporângio, cisto, clamidiósporos e oósporos (Figura 2). Em condições de baixas temperaturas são produzidas estruturas de resistência, como clamidiósporo, oósporo e zoósporo encistado, em condições com excesso de umidade e alta aeração essas estruturas podem germinar e produzir, respectivamente, esporângios ou microesporângios (BELTRAME, 2010).

Em condições favoráveis, como umidade elevada e temperatura entre 21 °C e 30 °C, o crescimento de *Phytophthora* spp. é causado pela rápida produção de esporângios e zoósporos em tecidos infectados. Dessas condições, o principal fator abiótico que favorece o desenvolvimento da gomose, é a umidade elevada do solo, pois os zoósporos produzidos sobre os tecidos doentes necessitam de água para se locomoverem e infectar a planta (COSTA, 2007).

No geral, a espécie *P. nicotianae* produzem esporângios apicais e papilados globosos com pedicelo curto e não são caducos e o clamidiósporo, bastante abundante, é formado sob condições desfavoráveis ao crescimento micelial, como baixa temperatura, pouca disponibilidade de nutrientes, de oxigênio, etc. Sob condições favoráveis pode germinar indiretamente, produzindo esporângios e zoósporos, ou diretamente, formando micélio (Figura 2). Necessita também de compatibilidade sexual distintos (A^1 e A^2) em um mesmo

local, pois é uma espécie heterotática e apresentam anterídios anfígenos (ERWIN & RIBEIRO, 1996).

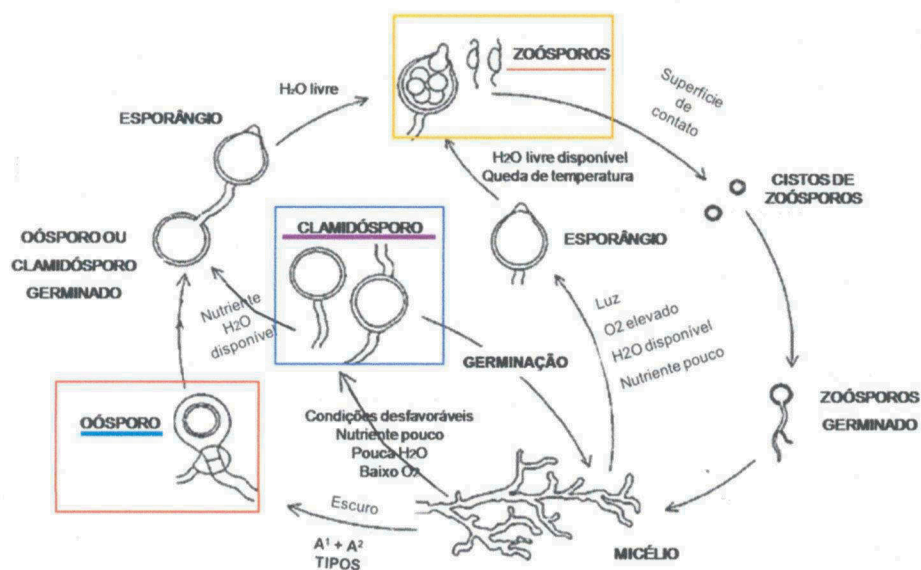


Figura 2. Ciclo de vida de *Phytophthora nicotianae* de citros.

Como esse patógeno pode viver durante muito tempo no solo graças a suas estruturas de resistência, ao encontrar condições favoráveis ao seu desenvolvimento, pode causar danos irreversíveis aos citros. Portanto, faz-se necessário compreender tanto a fisiologia de *Phytophthora* spp. como seus mecanismos genéticos e bioquímicos na interação com as plantas, visando a redução e erradicação de gomose em citros através do desenvolvimento de melhores práticas de controle.

2.4 Interação Planta – *Phytophthora*

Patógenos usam sistemas de secreção especializados e sinais alvos, um processo que é essencial para promover doença e parasitismo (SCHORNACK *et al.*, 2010). As plantas apresentam diferentes meios de resposta para se defenderem dos constantes ataques por patógenos. Esses meios envolvem mecanismos de resistência conhecidos como pré-formados ou constitutivos (ativos antes da chegada do patógeno) e mecanismos de resistência pós-formados ou induzíveis (ativados ou aumentam os níveis dos compostos pré-existentes após o ataque do patógeno). As reações causadas pela infecção do patógeno produzem alterações no fenótipo da planta, provocados por processos bioquímicos e fisiológicos, portanto é

necessário o reconhecimento do patógeno por parte da planta para que ela ative suas respostas bioquímicas e estruturais de defesa (COSTA, 2007).

A interação entre *Phytophthora* e plantas envolve uma gama de troca de sinais, nos quais se incluem defesa por parte da planta, ataque por parte do patógeno e inibição de uma ou mais ações dos componentes envolvidos. Essa interação é mediada pela ação dos componentes do sistema imune inato das plantas (similar aos mecanismos de “imunidade inata” dos animais), cujos fenótipos são resistência específica de hospedeira – resistência gene-a-gene (interação Avr-R) e resistência basal ou de não hospedeira – resistência de todos os genótipos de uma espécie de planta a todas as raças de uma espécie de patógeno (interação PAMP-PRR), como também por moléculas efetoras de patógenos, que são proteínas que entram (no citoplasma) em células vegetais e tem como função principal suprimir as vias de transdução de sinais que mediam as repostas de defesa de plantas (TYLER, 2008).

As moléculas sinais que são reconhecidas por receptores e induzem qualquer resposta de defesa das plantas são chamadas de eliciadores. Os eliciadores podem ser endógenos, quando liberados pela própria planta (geralmente oligogalacturonídeos ou outros oligômeros de parede) ou exógeno, quando provenientes do patógeno (geralmente são os componentes da parede celular microbiana ou moléculas virais); quanto à especificidade, podem ser: Específicos, quando codificados por genes de avirulência (Avr) do patógeno ou quando são resultantes da ação ou degradação do produto desses genes; e Inespecíficos que induzem uma reação de defesa inespecífica, através de estruturas moleculares conservadas em patógenos, que não são encontradas em células hospedeiras, conhecidas como ‘Padrões Moleculares Associados ao Patógeno’ (PAMPs) (RESENDE, 2006). Os eliciadores disparam uma cascata de sinalização nas plantas, induzindo reações de defesa contra vírus, fungos, bactérias ou nematóides, tais reações incluem desde mudanças celulares até moleculares, incluindo a produção de fitoalexinas e várias proteínas PR (RESENDE, 2006).

Em contraposição aos eliciadores, as espécies de *Phytophthora* apresentam proteínas efetoras típicas capazes de atravessar a membrana plasmática do hospedeiro e, uma vez dentro das células, suprimem a sinalização de defesa da planta hospedeira, por ligação às proteínas “alvo de efetores”, levando aos sintomas da doença. Apesar de serem totalmente divergentes em suas sequências primárias, elas estão agrupadas em diferentes classes de efetores: efetores apoplásticos, secretados nos espaços extracelulares, onde eles interagem com alvos extracelulares e receptores de superfície; e efetores citoplasmáticos, que são translocados para dentro da célula vegetal do hospedeiro (KAMOUN, 2006).

De acordo com o local de ação das moléculas efetoras no hospedeiro, elas podem ser classificadas em duas categorias: efetores extracelulares ou apoplásticos, os quais são secretados e permanecem no meio extracelular, interagindo com alvos extracelulares e receptores de superfície; e efetores citoplasmáticos, os quais atravessam a membrana da célula hospedeira e são translocados para o interior das células através de estruturas especializadas, como vesículas e haustórios, que geralmente se desenvolvem dentro do limite da parede celular da planta, e invaginam para dentro da célula do hospedeiro (HARDHAM, 2010).

2.5 Efetores de *phytophthora*

Patógenos filamentosos, tais como fungos e oomicetos patogênicos de plantas, secretam um arsenal de moléculas efetoras que modulam a imunidade inata e capacitam a infecção parasítica. Atualmente já está cientificamente aceito que estes efetores são os determinantes-chaves que capacitam a infecção parasítica (OLIVA *et al.*, 2010). Os efetores são moléculas secretadas pelo patógeno, incluindo bactérias, fungos, nematóides e oomicetos, que interagem com o hospedeiro, manipulando a estrutura e função de suas células de modo a facilitar a infecção (fatores de virulência ou infecção) e/ou provocando respostas de defesa (fatores de avirulência ou eliciadores) (KAMOUN, 2006).

Entre os efetores Apoplásticos incluem-se enzimas hidrolíticas, como proteases, lipases e glicosilases que provavelmente degradam o tecido vegetal. Já no que se refere aos efetores citoplasmáticos de *Phytophthora spp.* existe uma relação de numerosos genes candidatos, entre estes incluem os mais notáveis do tipo RXLR e CRN (*Crinkling and Necrosis-Inducing Protein*). O mapeamento dos genes de avirulência de patógenos oomicetos e a disponibilidade das sequências gênicas de *Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae* e *Phytophthora ramorum* permitiram identificar que os genes que codificam para proteínas efetoras de oomicetos, descobertos até agora, apresentam um domínio N-terminal RXLR, ou seja, contém o motivo do amino-terminal Arg-X-Leu-Arg (em que X representa qualquer aminoácido) o qual se especula ser o responsável pela entrega da proteína no interior das instalações celulares, seguido de um domínio adjacente na região C-terminal, o qual se apresenta bastante diversificado (HARDHAM, 2010).

Presume-se que os efetores com motivo RXLR entram no interior das células hospedeiras de modo a promover a infecção. No entanto, a grande diversidade dessas proteínas possibilitou identificar genes que suprimem a resposta de defesa da planta, como também genes que ativam os mecanismos de defesa por parte da planta (TYLER, 2008).

2.5.1 Efeitores Citoplasmáticos do tipo CRN (*Crinkling and Necrosis-Inducing Protein*) ou *Crinkler*

As proteínas CRNs (*Crinkling and Necrosis-Inducing Protein*) recebem esta denominação por induzir morte celular que causam um fenótipo de enrugamento nas folhas, quando expressas sistemicamente em plantas. Efeitores CRNs são proteínas modulares que se caracterizam pela presença de uma sequência líder secretória predita na região N-terminal, denominada peptídeo sinal, seguido por um domínio definido por motivo LXFLAK conservado, mas não invariante (Figura 3). O motivo LXFLAK é considerado a maior característica que define proteínas CRNs. A maioria da proteínas CRNs, depois do domínio LXLFLAK, conduzem ainda um diversificado domínio DWL que termina com o motivo HVLVXXP, o qual forma uma junção onde estão fusionados os domínios C-terminal (OLIVA *et al.*, 2010). Os motivos LXLFLAK e HVLVXXP são considerados *hot spots* de recombinação gênica, a qual é possível ser comprovada pela diversidade de domínios na região C-terminal originando a diversidade de genes presentes nesta família. Enquanto o N-terminal funciona na translocação dessas proteínas para a célula hospedeira, o C-terminal codifica a atividade efetora (HAAS *et al.*, 2009; SCHORNACK *et al.*, 2010).

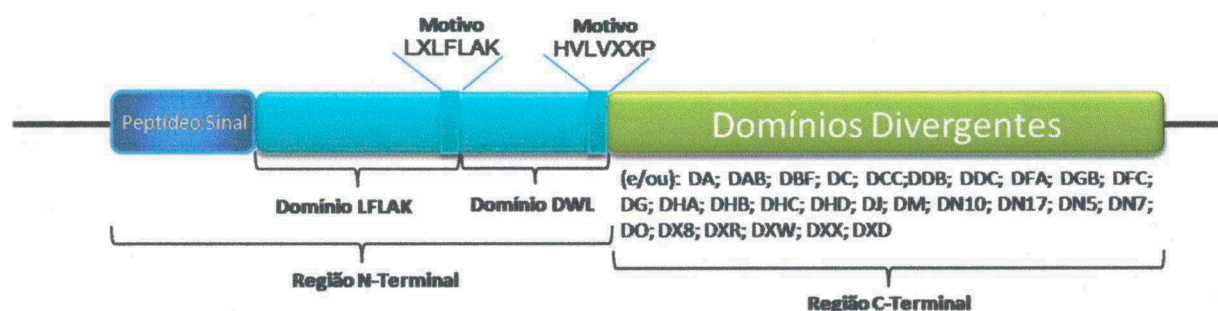


Figura 3. Representação esquemática da estrutura de efetores CRN, indicando as regiões N-terminal e C-terminal e os motivos e domínios que as compõem.

Efeitores do tipo CRN são codificados por uma ampla família de genes *CRNs* encontrados expandidos nos cromossomos como regiões repetidas, como resultado de eventos de múltipla duplicação gênica e recombinação intragênica (HAAS, 2009). Muitas vezes genes *CRNs* clusterizam no genoma incluindo múltiplos genes e pseudogenes. Estes efetores foram

UFRR/BIOLÓGICA

identificados inicialmente a partir do sequenciamento de ESTs de *Phytophthora infestans* e atualmente constituem a segunda maior família de efetores intracelulares com mais de 300 genes e 390 pseudogenes *CRNs* descritos, sendo, 196 e 255 em *P. infestans*, 100 e 102 *P. sojae* e 19 e 42 em *P. ramorum*, respectivamente, porém pouco se sabe sobre suas funções durante o processo de infecção (HAAS, 2009).

O conhecimento da estrutura e função dos efetores de patógenos e os danos que eles causam nas plantas é uma condição para o entendimento da base molecular da patogenicidade e da doença. Assim, análises moleculares mais detalhadas, possibilitarão novas estratégias para a manipulação de plantas, levando-as à resistência a patógenos oomicetos (KAMOUN, 2005).

2.6. Importância da Bioinformática para identificação e caracterização de genes candidatos a efetores.

A bioinformática é uma nova ciência que surge da associação de várias linhas de conhecimento, como a engenharia de softwares, a estatística, a matemática, e principalmente, do casamento entre a ciência da computação e a biologia molecular, visando o armazenamento e interpretação de um vasto arsenal de seqüências gênicas, originadas dos seqüenciadores automáticos de DNA (PROSDOCIMI *et al*, 2003). Essa ciência permitiu armazenar a informação genética em banco de dados, que podem ser considerados, segundo Prosdocimi e colegas (2003) como “uma coleção de dados inter-relacionados, projetado para suprir a necessidade de um grupo específico de aplicações e usuários”.

Atualmente a grande quantidade de informações de seqüências de aminoácidos e nucleotídeos, produzidas principalmente pelos projetos Genoma, Transcriptoma e Proteoma, estão armazenadas em bancos de dados públicos, disponibilizados a nível nacional e internacional, com uma estrutura organizada, atualizada, rápida e de fácil acesso (PROSDOCIMI *et al*, 2003). Um dos bancos de dados mais utilizados em Bioinformática é o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), é um banco de dados público, de seqüência de nucleotídeos e proteínas, com anotação de informações biológicas e bibliográficas; O GenBank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) é um dos maiores repositórios de informações biológicas existentes, contendo as seqüências dos genomas e as respectivas regiões anotadas e bem documentadas (NCBI, 2010).

Os investimentos na construção de bancos de dados têm aumentado significativamente com o crescente número de dados produzidos, resultando em bancos cada vez mais

específicos, como por exemplo o banco de dados genômicos de sequências expressas durante interação planta-patógeno *in vitro* e *in planta* - o CitEST/PP, proveniente do Banco de Dados de Genoma de Citros (CitEST) do Centro APTA Citros Sylvio Moreira (<http://biotecnologia.centrodecitricultura.br/>).

O CitEST/PP surgiu com o intuito de facilitar a investigação sobre a fisiologia e genética de *Phytophthora parasitica*, durante interação com Citros, visando a compreensão dos mecanismos de patogenicidade e desenvolvimento de novas técnicas de controle das doenças causadas por esse patógeno em Citros. Duas bibliotecas de cDNA foram produzidas a partir de duas diferentes condições de cultivo de *P. parasitica*: uma *in vitro*, o isolado foi cultivado em meio líquido de cenoura e seu micélio foi repicado 40x e cultivado nas mesmas condições; e uma *in planta*, com inoculação do patógeno na laranja, visando ativar sua patogenicidade. As bibliotecas clonadas em vetores plasmidiais e fragmentos de cDNA isolados de tais vetores foram seqüenciados, produzindo pequenas sequências que representam etiquetas de genes expressos, ou ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de PP, armazenadas no banco de dados específico (ROSA et al., 2007; TARGON et al., 2007).

Segundo Prosdocimi e colegas (2003) as etapas de armazenamento e identificação das sequências nucleotídicas produzidas envolvem os seguintes processos e seus principais programas:

- I. *Base calling*: Processo de leitura dos dados brutos oriundos do seqüenciador. Principal programa é o PHRED;
- II. Mascaramento de Vetores: Exclusão ou mascaramento de regiões contaminantes na sequência produzida. Principal programa é o CROSS-MATCH;
- III. Agrupamento das sequências: Montagem dos contíguos (*contigs*) através do agrupamento dos pequenos fragmentos de DNA seqüenciados. Principais programas são o PHRAP e o CAP3 ;
- IV. Anotação Gênica: Identificação das sequências obtidas. Principais programas são o Repeat Masker, o Genscan, o tRNAscan-SE, o BLAST, o Iterpro e o Gene Ontology.

Além de armazenar a bioinformática dispõe de programas computacionais para análise das sequências gênicas, que proporcionam o reconhecimento dos genes, o alinhamento das sequências, a reconstrução de árvores filogenéticas, a análise de dados de expressão gênica e de interação entre os genes, a previsão de estruturas de proteínas e montagem de fragmentos. Nesse contexto, a utilização de ferramentas computacionais para a identificação de genes candidatos que preencham uma lista de critérios específicos, seguida pela análise e validação desses genes candidatos por ensaios funcionais, tais como expressão *in planta* e avaliação da

atividade dos eliciadores, tem sido usada com sucesso para identificar sequências de efetores de *Phytophthora spp.* em bancos de dados específicos. (KAMOUN, 2006).

3 METODOLOGIA

Este trabalho é parte de um projeto maior intitulado INCT de genômica dos citros, aprovado pelo CNPq/Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia sob coordenação de Dr. Marcos Antonio Machado, pesquisador do Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis-SP, do qual a Universidade Federal de Campina Grande é instituição colaboradora, sob coordenação da Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos. As atividades desenvolvidas neste trabalho foram realizadas no laboratório de Biologia Molecular do Centro de Educação e Saúde, Campus de Cuité da UFCG, e nos Laboratórios de Biotecnologia e Fitopatologia do Centro de Citricultura APTA Sylvio Moreira.

3.1 Seleção de genes efetores candidatos:

As ESTs (*Expressed Sequence Tags*) que codificam para proteínas efetoras do tipo *CRN* (*Crinkling and Necrosis-Inducing Protein*) usadas nesse trabalho são provenientes do banco de dados do genoma funcional e comparativo dos citros - CitEST/PP (<http://biotecnologia.centrodecitricultura.br/>) de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*, isolado virulento IAC095, Centro APTA Sylvio Moreira, em Cordeirópolis SP. As ESTs foram isoladas por meio de duas bibliotecas de cDNA, construídas após indução de *P. nicotianae in planta* e subcultivo *in vitro* por 40 repicagens (40X), as quais compõem o CitEST/PP (ROSA *et al.*, 2007; TARGON *et al.*, 2007). As 06 sequências dos genes do tipo *CRN* foram obtidas usando palavras chaves no banco de dados CitEST e o Programa Gene Project (CARAZZOLLE *et al.*, 2007) e por comparação, usando o programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) com sequências iscas de *P. infestans* que codificam para proteínas efetoras citoplasmáticas disponíveis no GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências usadas como iscas foram: PITG_22435 (Acesso: XM_002909767) e PITG_22154 (Acesso: XM_002909910).

3.2. Caracterização molecular *in silico* de genes efetores do tipo *CRN* (*Crinkling and Necrosis-Inducing Protein*) de *Phytophthora nicotianae* de citros

Clusters das ESTs obtidas foram construídos usando o programa CAP3 (*Contig Assembly Program*) (HUANG & MADAN, 1999) dentro do Gene Project CitEST. Em seguida as sequências consensos de cada contig e as singlets que não foram agrupadas nos contigs, foram comparadas com sequências de aminoácidos de proteínas homólogas

BIBLIOTECA

depositadas no GenBank, usando o programa BLASTx (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Posteriormente, foram verificadas a existência de uma ORF (*Open Reading Frame*) completa em cada sequência e a presença e localização de sítios de clivagem nos peptídeos sinais, usando o programa SignalP 3.0 (NIELSEN *et al.*, 1997; BENDTSEN *et al.*, 2004). O alinhamento final das seqüências de aminoácidos foi obtido no Clustal W (*Multiple Sequence Alignment*) (HIGGINS, 1994).

3.3 Desenho de primers específicos para genes *CRN* de *P. nicotianae* de citros:

Com o programa *PePrimer* 1.1 (MARSHALL, 2004) para PCR quantitativo em tempo real, primers específicos para genes *CRN* de *P. parasitica*, foram desenhados dentro das ORFs, presentes nas seqüências consensos geradas pela clusterização usando CAP3 (HUANG & MADAN, 1999), via Gene Project no banco de dados CitEST, obedecendo os seguintes parâmetros: Amplicons de 50-150 pb são fortemente recomendados; Tamanho adequado do primer entre 10-24 pb; Conteúdo de G/C no range de 20-80%; Esquivar-se de Runs de um nucleotídeo idêntico. Isto é especialmente verdade para Guanina, onde Runs de 4 ou mais Gs devem ser esquivados; $T_m = 58$ a 60°C ; Os 5 nucleotídeos do 3' terminal devem ter não mais que 2 G e/ou C bases. A síntese foi feita pela Invitrogen do Brasil SA, e as seqüências estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos primers desenhados para reações de PCR quantitativo em tempo real para genes do tipo *CRN*.

| Seqüência | Tamanho do fragmento | T_m^* | % G/C |
|----------------------------|----------------------|---------|-------|
| 5' AAGAAGTTGAAGAAGGGCGA 3' | 20 pb | 61,74 | 45% |
| 5' GAAATCGGATCCTCTCCTTG 3' | 20 pb | 61,68 | 55% |

*Temperatura de *melting* (anelamento)

3.4 Obtenção da separação das diferentes fases do desenvolvimento assexual *Phytophthora nicotianae* *in vitro*

3.4.1 Descrição do isolado de *Phytophthora* e condições de cultivo

A indução da produção, isolamento, pureza e monitoramento microscópico das diferentes fases do ciclo de vida de *P. nicotianae* foram realizados na clínica Fitopatológica do Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis/SP. O isolado utilizado foi o IAC095 de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*, proveniente do Centro APTA Sylvio Moreira do Instituto Agronômico de Campinas. Buscando ativar a patogenicidade, o patógeno foi inoculado em Laranja “Pêra”, em vários pontos da superfície do fruto, depois as regiões de inoculação foram tampadas com esparadrapo (sem óxido de zinco), e os frutos foram mantidos em um recipiente fechado com câmara úmida sob temperatura ambiente até que 3/4 do fruto apresentassem os sintomas.

3.4.2 Isolamento

Em fluxo laminar os frutos foram desinfetados com álcool absoluto por 1 min, depois colocado em hipoclorito por 2 min e depois lavado em água destilada e autoclavada. Após desinfestação dos frutos, pedaços da casca foram transferidos para placas de Petri, com meio de cultura cenoura-ágar contendo os antibióticos ampicilina e rifamicina e um antifúngico o Aderosol e, em seguida, incubados em câmara BDO a 25° por aproximadamente 96 horas. Após esse período, o material foi transferido para novos meios de cultura, sendo distribuídos 3 discos de micélio já purificado para o meio líquido de cenoura em Erlenmeyers, e 3 para o meio sólido de cenoura em placas de Petri, para obtenção das diferentes fases do ciclo de vida.

3.4.3 Obtenção das fases

As fases de micélio, esporângios cheios, esporângios vazios e zoósporos foram obtidos de acordo com os procedimentos adaptados de COSTA (2007). O micélio puro foi retirado do meio líquido após 11 dias de cultivo, antes que começasse a produzir esporângios. O meio de cultura foi eliminado e o micélio armazenado em papel alumínio e colocado em N₂ líquido e posteriormente armazenado a -80°C.

A hifa com esporângios cheios foi retirada do meio de cultura sólido após 20 dias de cultivo, de maneira que produzisse a maior quantidade de esporângios e não liberassem os zoósporos. O material foi coletado da mesma maneira como citado para o micélio puro.

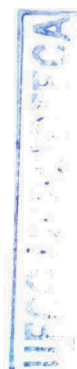
Para coletar a fase de hifa com esporângios vazios, retirou-se do meio de cultura sólido após 20 dias de cultivo e acrescentou-se água destilada e autoclavada, a 4°C, até que cobrisse toda a superfície do micélio. O material foi levado à geladeira por 2 horas, e a partir desse período foi monitorada a liberação do zoósporo. O micélio contendo os esporângios vazios

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS

foram retirados e colocados em N₂ e, posteriormente, armazenado a -80⁰C. A água gelada foi centrifugada a 12000 g, por 10 min em tubos Falcon. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, contendo zoósporos, congelado em N₂, posteriormente armazenados a -80⁰C.

3.5 Isolamento do RNA das fases de *P. nicotianae*

De cada fase obtida, exceto da fase de zoósporos, foi extraído o RNA total visando posterior análise da expressão de genes do tipo CRN por PCR quantitativo em tempo real. A extração do RNA foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis/SP. O RNA total das fases de Hifa somente, hifa com esporângios cheios e hifa com esporângios vazios foi extraído em solução de Trizol – Fenol guanidina isotiocianato – (*Lifes Technologies/Invitrogen*). Os RNAs foram tratados com DNase (*Invitrogen*) para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico e, posteriormente, purificados com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e fenol, precipitados em etanol e mantidos em água tratada com DEPC.



4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Identificação e caracterização molecular de genes do tipo CRN (*Crinkling and Necrosis-Inducing Protein*) de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*

Usando a estratégia de busca por comparação, seis sequências expressas (ESTs) de genes do tipo CRN (*Crinkling and Necrosis-Inducing Protein*) de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* foram selecionada no banco de dados CitEST/PP (<http://biotecnologia.centrodecitricultura.br/>) usando o programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) e sequências homólogas de *Phytophthora spp.* que codificam para proteínas efetoras citoplasmáticas do tipo CRN, disponíveis no GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Estas ESTs foram agrupadas usando o programa CAP3 (*Contig Assembly Program*) (Huang e Madan, 1999) em 4 clusters, sendo 2 contigs, contendo 2 ESTs/cada, e 2 singlets. A comparação das sequências dos 2 contigs e dos 2 singlets, usando o programa BLASTx (ALTSCHUL *et al.*, 1997), revelou que as seqüências de aminoácidos deduzidas compartilham similaridade de seqüência com proteínas de *Phytophthora infestans* da família *crinkler* depositadas no GenBank (Tabela 2). Todas as sequências selecionadas foram encontradas expressas na biblioteca de *Phytophthora parasitica* induzida *in planta*.

Tabela 2. Distribuição de ESTs de *Phytophthora parasitica* de citros do tipo CRN (família *Crinkler*) em clusters e similaridade da seqüência de aminoácidos deduzidos com proteínas do GenBank.

| Cluster | Nº de ESTs | Tamanho (nt) | Seqüência de melhor similaridade via BLASTx | | | |
|--------------------------|------------|--------------|---------------------------------------------|-----------------------------|---------|------------------|
| | | | Organismo | Nº de Acesso | E-Value | Similaridade |
| Contig 1 | 02 | 911 | <i>Phytophthora infestans</i> | gb EEY52988 (PITG_19588) | 7e-41 | 149/231 (65%) |
| Contig 2 | 02 | 981 | <i>Phytophthora infestans</i> | gb EEY54662 (PITG_23175) | 4e-43 | 113/173 (66%) |
| PP14-C7-802-082-A05-CT.F | 1 | 858 | <i>Phytophthora infestans</i> | gb EEY65423 (PITG_16581) | 2e-46 | 135/188 (72%) |
| PP14-C7-802-125-A07-CT.F | 1 | 798 | <i>Phytophthora infestans</i> | gb EEY54046 (PITG_22832) | 4e-39 | 147/256 (58%) |

A análise das sequências dos contigs e singlets pela busca por ORFs (*Open Reading Frame*), usando o programa ORFFinder, revelou a existência de possíveis regiões codificadoras para genes do tipo *CRN* e suas sequências de aminoácidos deduzidas. Nos contigs 1 e 2, bem como nas singletes 1 e 2, estruturas do tipo ORFs foram encontradas contendo 819, 586, 630 e 783 nucleotídeos de comprimento, respectivamente. Estes possíveis genes foram denominados *PPCRNL1* (*Phytophthora parasitica CRN-like* gene 1), *PPCRNL2*, *PPCRNL3* e *PPCRNL4*, os quais estão mostrados nas Figura 4, Figura 5, Figura 6 e Figura 7, com as estruturas primárias deduzidas das suas respectivas proteínas. Por esta análise, sequências codificadoras dos genes *PPCRNL1*, *PPCRNL2*, *PPCRNL3* e *PPCRNL4*, codificam para proteínas precursoras de 272, 186, 209 e 260 aminoácidos de comprimento, respectivamente, dos quais 118, 114, 118 e 120 aminoácidos compõem a região N-terminal, altamente conservada em efetores *CRN*. Entretanto, análises em bancos de dados genômicos de *Phytophthora* spp., descritas por Torto et al. (2003), revelaram que as *CRNs* formam uma complexa família de proteínas relativamente grandes, contendo entre 400-850 aminoácidos de comprimento. Portanto, o comprimento dos genes *PPCRNL* descritos neste trabalho representa sequências parciais desses genes, contendo códons de parada prematuros.

A presença de códons de paradas prematuros dentro de regiões codificadoras para genes em sequências de bancos de dados genômicos pode ser devido à existência de mutações gênicas ou erros de seqüenciamento. Na família de genes *CRN* de *P. infestans* evidências de recombinação e conversão gênica já foram relatadas. Motivos LXLFLAK e HVLVXXP são *hot spots* de recombinação gênica, a qual é possível ser comprovada pela diversidade de domínios na região C-terminal originando a diversidade de genes presentes nesta família. Por outro lado, Haas e colegas (2009) demonstraram que em torno de 255 genes *CRN* encontrados no genoma de *P. infestans* estão fragmentados ou rompidos, e presumivelmente não funcionais. Para os autores, o fato de muitos dos pseudogenes terem apresentado poucas mudanças de bases é um indicativo de conversão recente para pseudogenes.

Portanto, apesar das sequências expressas estudadas terem sido induzidas em *Phytophthora parasitica* após infecção *in planta*, se os genes *PPCRNL* são pseudogenes, precisa ser demonstrado. Neste sentido, uma análise de bioinformática acurada deve fornecer direções para a elucidação dessa hipótese.

```

1 atgggtgaagctcttctgtgctatcgttggagtggcggggaagtgct
  M V K L F C A I V G V A G S A
46 ttctccgtgcgagtggaacgagagcgactcagtggatgacttgaag
  F S V R V D E S D S V D D L K
91 aaggcgatcaaggggaagaaaccagcaacgatcaacttgcgacgcc
  K A I K G K N P A T I T C D A
136 aacgacctg cgtctcttctggcgaaggcggaggacaacgcgtgg
  N D L R L F L A K A E D N A W
181 ctgtcgcgacctcagtgaagatgtaaagaagtgaagaaggcgag
  L S S L S E D V K K L K K G E
226 aagactgctctcgtcgaatctctaacgcacgaagacaaggagatg
  K T A L V E S L T H E D K E M
271 cagggagaggatccgatttctgaatacctggaaggcatggacgct
  Q G E D P I S E Y L E G M D A
316 ccgaaaatgaaacagattcactgctgggtgggttccgatatcca
  P K M K Q I H V L V V V P Y P
361 gaacaggcgaagttgacatggtccacgagtcattatcgctggct
  E Q A Q V D M V H E S L S L A
406 cgacaagctagtgttcgccaatcgcggatggaaatgcgacttgag
  R Q A S V R Q S R M E M R L E
451 caacttgcggcctctttaccacacaaaaacagcaagtcctacact
  Q L A A S L P H K N S K S Y T
496 gatgggacattgggtcaacttttgctagaaagattgaaaaggac
  D G T L G Q L L L E R L K K D
541 aaaatggttctttgatgtcccaccaactgatgatggggaagcattt
  K M F F D V P P T D D G E A F
586 tggtcggccgacattcagcttcaagccaatgccattcagaatgag
  W S A D I Q L Q A N A I Q N E
631 gctgctttcgacgcctttattactcgtatttccagtgcacatctta
  A A F D A F I T P Y F S D I L
676 gacagctgtggtctagtcttcgtcaatagcgaagatgatgaatgg
  D S C G L V F V N S E R Y E W
721 ttgtcccagctctacactcgtgaccaagagta ccgatcttaaccct
  L S Q S T L V T K S T D L N P
766 gatgggtttgcgactcaccgcggggatgtatcgtggcaagccagt
  D G F A T H R G D V S W Q A S
811 accaaatga 819
    T K *

```

Figura 4. Sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene *PPCRN1*. A sequência do peptídeo sinal amino-terminal predita está sublinhada. O motivo característico de efetores LXLFLAK e o motivo HVLVXXP do domínio adjacente DWL estão marcados em cinza.

```

1  atggtgaagctcttttcccgatcgttgggtggcgggaagcgcg
  M V K L F S P I V G V A G S A
46  ttccgggtggatacgacgatggcgggtcgttgccgcattgaag
  F P V D I D D G G S V A A L K
91  gacgcatcaaggggaagaactcaaagacgatcacatgcatgccc
  D A I K G K N S K T I T C D A
136  aaggacctgcagctcttccttgcgaagaaggcggacggcgcgtgg
  K D L Q L F L A K K A D G A W
181  ctctcatcgaaggatocctgacgtgatctctatgcgaagcggggtt
  L S S K D P D V I S M R S G V
226  attcctgagcaagtgaagacactgatgaacgtggaagtggaccg
  I P E Q V K T L M N V E V D P
271  gcagacgatattggggaagcgtatttgaagggtgctccgacgaagaag
  A D D I G D V F E G A P T K K
316  accgttcaagtgctggtggtggttccggagcgggtgggtgggtca
  T V H V L V V V P E A V G G S
361  acgagtgaggcatccaagttggatcacctcgttgataaggtogac
  T S E A S K L D H L V D K V D
406  cgactgtaccaaccaactgaacaagactgggctgggaagaagacaa
  R L Y H Q L N K T G L G R R Q
451  gttatgocactogacccgcgactttccagtctttttgaatacgat
  V M P L D P R L S S L F E Y D
496  tgcatgtgtagaagggtgatcgcgccgcgacgggttcggatcc
  C M C R R A D T P R D G F G F
541  aaggaaactggtaagcaagtag 561
  K E L V S K *

```

Figura 5. Sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene *PPCRN2*. A sequência do peptídeo sinal amino-terminal predita está sublinhada. O motivo característico de efetores LXLFLAK e o motivo HVLVXXP do domínio adjacente DWL estão marcados em cinza.


```

1  atgggtgaagttagtgtgtgcggtcgttgggtgtggcgggaagcgca
   M V K L V C A V V G V A G S A
46  tttcctgtggagatcgacgcgggtcaattagtgaggacttgaag
   F P V E I D A G Q L V G D L K
91  gacgcgatcaaggggaagaa ccaagcaacgatcacttgcgacgcc
   D A I K G K N Q A T I T C D A
136 aaggacctgcagctcttcctggcgaaggcggaggacaacgcgtgg
   K D L Q L F L A K A E D N A W
181 ctgtcgcagcctcactgaagatgtgaagaagtgaagaagggcgag
   L S S L T E D V K K L K K G E
226 aagactgctctcgtcgcgtaacgcacgaagacaaggagatg
   K T A L V D A L T H E D K E M
271 cagggagaggatccgatttctgaatacctggaaggcatggacgct
   Q G E D P I S E Y L E G M D A
316 ccgaaagtgaaacagattcacgtactggtgggtggttcgatatcca
   P K V K Q I H V L V V V P Y P
361 gaacaggcgcaagttgacatggtccacgagtcattatcgctggct
   E Q A Q V D M V H E S L S L A
406 cgacaatcttgtgttctccaatcgcggatggaaatgcgacttgag
   R Q S C V L Q S R M E M R L E
451 caacttggtggcctctttaccacacaaaagcagcaagtcctacact
   Q L V A S L P H K S S K S Y T
496 gatggggcattgggtcaacttttgctagaaaagattgaaaaaggac
   D G A L G Q L L L E R L K K D
541 aaaatgttctttgatgtcccaccaactgatgatggggaagcattt
   K M F F D V P P T D D G E A F
586 tgggtcggccgacattcagcttcgagccaatgccattcagaatga 630
   W V G R H S A S S Q C H S E *

```

Figura 6. Sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene *PPCRN3*. A sequência do peptídeo sinal amino-terminal predita está sublinhada. O motivo característico de efetores LXLFLAK e o motivo HVLVXXP do domínio adjacente DWL estão marcados em cinza.

```

1 atgagcatggtgcagctggttctgtgcgctcggttgagtgaaagga
M S M L Q L F C A L V G V K G
46 aacgccttctccgtgacgatcgatgagcgagcgagtctgtggatgac
N A F S V T I D A S E S V D D
91 ttaaagaaggccatcaagaaggagaaggagaacaagatcaagtgc
L K K A I K K E K E N K I K C
136 gatgcagatgagctgcagctggtcctcgccaaggaggggcgacgac
D A D E L Q L F L A K E G D D
181 aagtggctcgaatcaagcacagatgatgtaagaagctcaagaaa
K W L E S S T D D V K K L K K
226 ggggaaaagactgctcttatcgaagcgtgacacatgaagaccat
G E K T A L I E A L T H E D H
271 gcacttgatggggagtttggcttgaggaggttcttgaggcgatg
A L D G E F G L E E V L E G M
316 ccagaaccgaaaaccaagcaaattcacgtggttggtggttccg
P E P K T K Q I H V L V V V P
361 gaaggtgatcaggcgcaaagggatgaggaacgtgcacttccgaga
E G D Q A Q R D E E R A L P R
406 acgactgtcctaaacgagccggagaagttcgcgagggaatgtatg
T T V L N E P E K F A E E C M
451 tcaactgacagaatggggcgttgacgctgtacacagattccattg
S L T E W G V D A V H E I P L
496 atctggaagtttatgagcagcttgggaggatgcaccagaaacgga
I W K F M S S L G G C T R N G
541 aagatttttggcgattggaagacaagcaggtcgtatcgatactt
K I F W R L E D K Q V V S I L
586 gttgatggatggttcgagagtctactggtggcaacatcaatgtg
V D G W F R E S T V G N I N V
631 cgcgcaaacaaaaagcatctcatgggatcgccggcattggcagt
R A N K K A S H G I A G I G S
676 cgcaactgtgtgtggatggctttatctcggtcacaaggcggacg
R T V V W M A L S R S Q R R T
721 atgcatgacgaagtttcgggtcaagaggggttngccgganatcccc
M H D E V S V K R G X P X I P
766 ccgactttaaaaaagtga 783
P T L K K *

```

Figura 7. Sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene *PPCRN4*. A sequência do peptídeo sinal amino-terminal predita está sublinhada. O motivo característico de efetores LXLFLAK e o motivo HVLVXXP do domínio adjacente DWL estão marcados em cinza.

O motivo LXLFLAK, característico dessa família de efetores, o qual é parte do domínio LFLAK, também está presente na região N-terminal dos 04 prováveis efetores PPCRN4s, posicionado de forma conservada sob alinhamento com sequências homólogas (Figura 8). Além desses, delimitando a região N-terminal com a C-terminal, o motivo HVLVXXP pertencente ao domínio DWL também está presente nas PPCRN4s de *Phytophthora parasitica*. Estes dados sugerem que este polipeptídeo predito apresenta regiões conservadas típicas na região N-terminal dessa família de genes de patógenos, a qual está envolvida na secreção desses efetores para o interior das células hospedeiras.

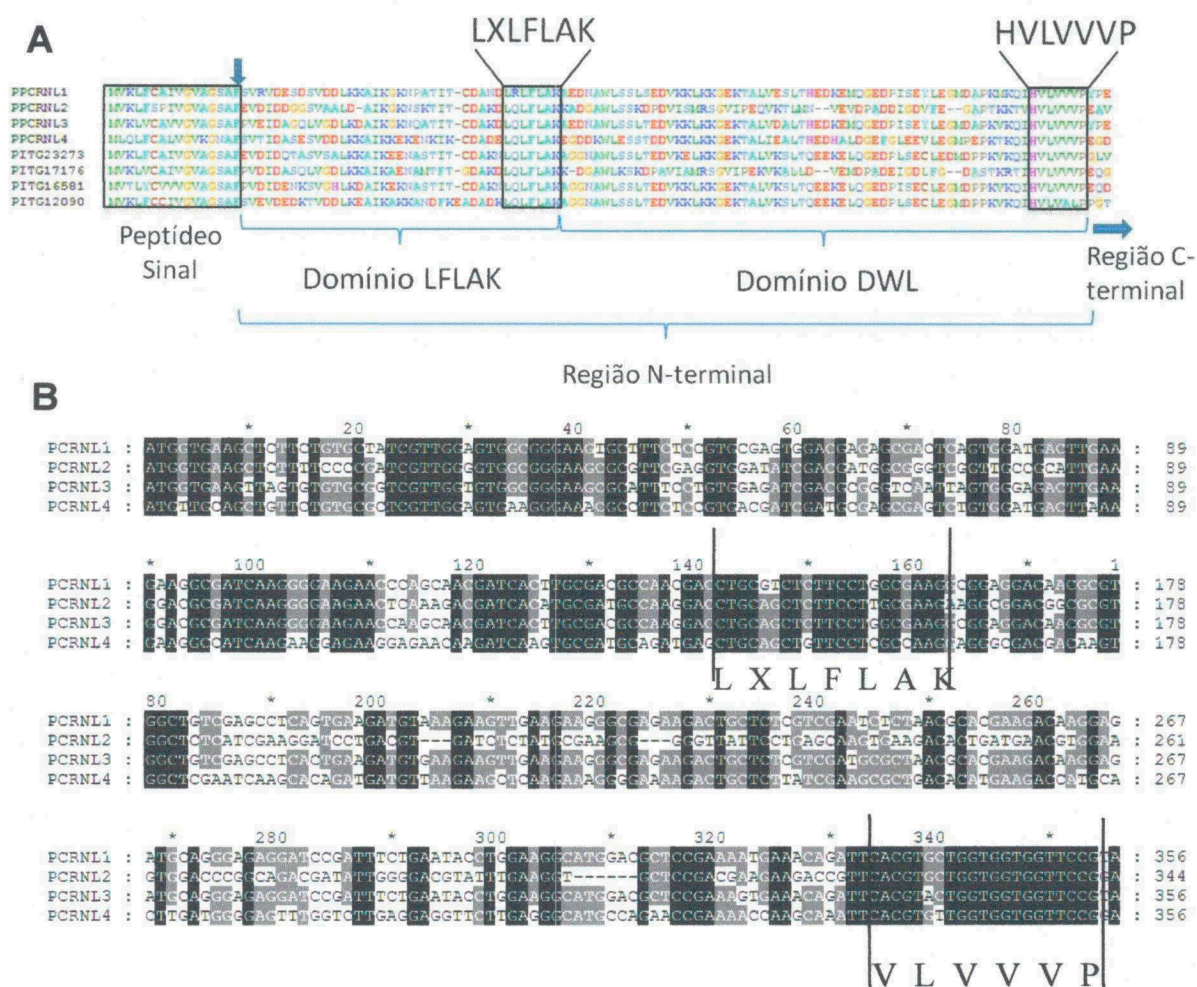


Figura 8. Comparação de seqüências da região amino-terminal de membros da família *crinkler* de *Phytophthora parasitica* com seqüências homólogas. **A.** Comparação de seqüências de aminoácidos, demonstrando regiões conservadas típicas de efetores CRN. **B.** Comparação de seqüências de nucleotídeos, demonstrando a divergência entre os genes *PPCRNL*. O alinhamento foi realizado usando o programa CLUSTALW. O programa GeneDoc foi usado para sombreador homologias. A seta à esquerda indica o sítio de clivagem dos peptídeos sinais, enquanto que à direita indica o início da região carboxi-terminal.

Nesta região N-terminal, os primeiros 17, 22 e 19 aminoácidos das proteínas deduzidas *PPCRNL1*, *PPCRNL3* e *PPCRNL4*, respectivamente, apresentam características típicas de peptídeos sinais, que incluem o comprimento, um núcleo hidrofóbico e um sítio de clivagem situados entre os aminoácidos 17 e 18 (AFS-VR) para *PPCRNL1*, 22 e 23 (IDA-GQ) para *PPCRNL3*, e 19 e 20 (AFS-VT) para a *PPCRNL4*, de acordo com os critérios de

probabilidade do SignalP-NN e SignalP3-HMM (NIELSEN *et al.*, 1997; BENDTSEN *et al.*, 2004). Entretanto, embora possua elevada identidade de aminoácidos com os preditos peptídeos sinais de PPCRNL1, PPCRNL3 e PPCRNL4, os 15 primeiros aminoácidos de PPCRNL2 foram preditos apenas pelas probabilidades definidas no SignalP3HMM, sendo para peptídeo sinal de 0.658 e para sítio de clivagem de 0.358 entre os aminoácidos 15 e 16 (GSA - FP). HMM calcula a probabilidade de a sequência submetida conter um peptídeo sinal ou não. Também revela a probabilidade de um "Sinal Âncora", anteriormente denominado de Peptídeo sinal não clivado. Depois disso, o sítio de clivagem é assinado pela pontuação da probabilidade junto com as pontuações para as regiões do Peptídeo Sinal (NIELSEN *et al.*, 1997; BENDTSEN *et al.*, 2004). Segundo Haas *et al.* (2009), a maioria (60%) dos efetores CRNs possuem um peptídeo sinal predito. Aquelas que faltam o peptídeo sinal predito são tipicamente encontradas em famílias *CRN* contendo membros com sinais de predição. Se PPCRNL2 possui sinal de secreção ou peptídeo sinal não clivado precisa ser determinado. Estes dados sugerem que a região N-terminal desses efetores parece funcional.

Em efetores CRNs, o peptídeo sinal está implicado na secreção desse peptídeo para o lado de fora do patógeno. A demonstração de que o N-terminal de CRNs, mais especificamente o motivo LXLFLAK, media a translocação de domínios efetores C-terminal para dentro da célula hospedeira foi feita recentemente por Schornack e colegas (2010), os quais desenvolveram um ensaio de translocação usando a espécie modelo *Phytophthora capsici*. Uma vez que todos os efetores de oomicetos possuem peptídeos sinais em suas regiões N-terminal e que estes peptídeos podem ser preditos juntamente com os respectivos sítios de clivagem, bancos de secretoma de fungos e oomicetos vêm sendo gerados por ferramentas computacionais (RAFAELLE *et al.*, 2010).

Além dos domínios da região N-terminal, na região C-terminal de efetores CRNs já foram encontrados de 1 a 3 domínios diferentes, podendo alguns estarem repetidos. Entretanto, uma diversidade de 36 domínios diferentes foram relatados até o momento, envolvendo CRNs de *P. soja*, *P. infestans* e *P. ramorum* (HAAS *et al.*, 2009). A análise da região C-terminal de PPCRNLs revelou três regiões conservadas dentro de PPCRNL1 e PPCRNL3 (Figura 9.A). Já em PPCRNL2 foram encontrados três regiões distintas e duplicadas (Figura 9.B), enquanto que em PPCRNL4 não revelou qualquer padrão de sequência (Figura 9.C). O alinhamento das sequências de nucleotídeos da região C-terminal dos 04 genes *PPCRNLs* revelou um elevado grau de divergência gênica, sem regiões conservadas (Figura 9.D). Uma maior análise dessa região poderia elucidar sobre a existência de domínios funcionais ainda não descritos, ou a existência de mutações que possam ter

BIBLIOTECA

levado a perda de função características de pseudogenes ou, ainda se existem significativos erros de seqüenciamento. O seqüenciamento desses genes também contribuirá para melhorar a qualidade das análises e confirmar essas hipóteses.



Figura 9. Comparação de seqüências da região carboxi-terminal de membros da família *crinkler* de *Phytophthora parasitica* entre si. **A**, **B** e **C**. Comparação de seqüências de

aminoácidos, demonstrando regiões conservadas. **D.** Comparação de sequências de nucleotídeos, demonstrando a divergência entre os genes *PPCRNL*. O alinhamento foi realizado usando o programa CLUSTALW. O programa GeneDoc foi usado para sombrear homologies.

Na busca por indicativos de domínios homólogos para a região C-terminal de PPCRNLs, foi realizado um estudo comparativo por meio da análise de BLASTx de cada região separadamente (Tabela 3). Todas as sequências de melhor similaridade foram caracterizadas por Haas e colegas (2009) como sendo genes do tipo *crinkler*. Observou-se que as sequências de melhor similaridade por BLASTx mudaram comparando-se a análise da sequencia total com a sequencia N-terminal e C-terminal, exceto para PPCRNL3, em que a melhor similaridade encontrada para a sequencia total é a mesma para a sequencia N-terminal, aumentando ainda mais a porcentagem de similaridade entre elas. Em todos os casos, a porcentagem de similaridade aumentou quando a análise foi realizada com as sequências da região N-terminal e que os domínios descritos presentes mudam. Curiosamente, a comparação da região C-terminal das sequências homólogas com a mesma região das sequências C-terminal de *P. parasítica* não produziu um alinhamento ótimo. Portanto, essas análises preliminares não foram conclusivas sobre eventuais domínios presentes nesta região das PPCRNLs, necessitando de futuras análises complementares, uma vez que se trata da região que apresenta atividade efetora.

Estudos recentes sobre a localização subcelular de diversas regiões C-terminais de CRNs dentro das células das plantas revelaram que elas acumulam dentro do núcleo das plantas de uma maneira dependente do fator de importação nuclear do hospedeiro, importina α e, no caso de CRN8, dependente da localização nuclear funcional (NLS) (SCHORNACK *et al.*, 2010). A morte celular induzida por CRN8 requer seu acúmulo no núcleo do hospedeiro, sugerindo que efetores CRN têm alvos e perturbam processos nuclear do hospedeiro. Os autores propuseram que, durante a infecção por oomicetos patogênicos de plantas, efetores CRN traficam para o núcleo da célula hospedeira para promover a virulência.

Tabela 3. Similaridade da sequência de aminoácidos deduzidos das regiões N-terminal e C-terminal de genes de *Phytophthora parasitica* de citros do tipo *CRN* (família *Crinkler*) com proteínas *CRN* de *Phytophthora infestans* (HAAS et al., 2009; GenBank).

| Gene | N° de ESTs | Região | Sequência de melhor similaridade via BLASTx | | | | |
|--------|------------|--------|---------------------------------------------|------------------------------|---------|------------------|-----------------------------------------------|
| | | | Identificação (HAAS et al., 2010) | N° de Acesso | E-Value | Similaridade | Domínios |
| PCRNL1 | 02 | TOTAL | PITG_19588 | gb IEEY52988 | 7e-41 | 149/231 (65%) | LFLAK_DWL_DXZ |
| | | N-TER | PITG_23273 | gb IEEY59521 | 6e-39 | 103/118 (88%) | LFLAK_DWL_DFB_DFB |
| | | C-TER | PITG_22837 | gb IEEY54050 | 1e-27 | 104/200 (52%) | LFLAK_DI_DWL_DN7_DN10_DN10_DN10_DN10_DN10_DFC |
| PCRNL2 | 02 | TOTAL | PITG_23175 | gb IEEY54662 | 4e-43 | 110/138 (80%) | LFLAKdom_DWL_DXZ |
| | | N-TER | PITG_17176 | gb IEEY66550 | 2e-31 | 85/107 (80%) | LFLAKdom_DWL_DXX_DXV |
| | | C-TER | PITG_05049 | gb IEEY68560 | 0.004 | 25/31 (81%) | LFLAKdom_DI_DWL_DXZ |
| PCRNL3 | 1 | TOTAL | PITG_16581 | gb IEEY65423 | 2e-46 | 135/188 (72%) | LFLAKdom_DWL_DXZ |
| | | N-TER | PITG_16581 | gb IEEY65423 | 8e-42 | 96/111 (87%) | LFLAKdom_DWL_DXZ |
| | | C-TER | PITG_22829 | gb IEEY53989 | 1e-06 | 43/90 (48%) | LFLAKdom_DI_DWL_DFC |
| PCRNL4 | 1 | TOTAL | PITG_22832 | gb IEEY54046 | 4e-39 | 147/256 (58%) | LFLAKdom_DI_DWL_DM_DXX |
| | | N-TER | PITG_12090 | gb IEEY59526 | 8e-25 | 85/112 (76%) | LFLAKdom_DWL_D2 |
| | | C-TER | PITG_22831 | gb IEEY54045 | 3e-31 | 83/117 (71%) | LFLAKdom_DI_DWL_DM_DXX |

DFGG/2011/01564

4.2 Iniciando os estudos de expressão de genes de *P. parasitica*

4.2.1 Primers específicos para genes *CRN* de *P. parasitica*

Dois primers específicos para genes *CRN* de *P. parasitica* de Citros foram desenhados utilizando o programa *PePrimer* para PCR quantitativo em tempo real e sintetizados pela Invitrogen do Brasil SA., sendo um forward que irá copiar a fita sense, e um reverse, para copiar a fita antisense. Estes primers serão usados para amplificar fitas molde de cDNA (DNA complementar a fita de RNA mensageiro), que serão utilizados em futuras reações de qPCR. Futuros primers também serão desenhados de modo a amplificar o maior numero de genes do tipo *CRN* de *P. parasitica*.

4.2.2 Obtenção de fases do desenvolvimento assexual de *Phytophthora nicotianae* de citros *in vitro*.

Neste trabalho foram obtidas as seguintes fases do crescimento de *P. nicotiana* dos citros: hifa, hifa com esporângio cheio, hifa com esporângio vazio e zoósporos. Durante o ensaio de obtenção das fases foram monitoradas com preparação de lâminas e visualização sob microscópio, visando identificar a presença das fases em estudo (Figura 10). Utilizou-se os procedimentos descritos por COSTA (2007) e as facilidades do laboratório da Clínica Fitopatologica do Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, Cordeiropolis sp. As fases obtidas foram usadas para extração de RNA total, exceto zoósporos devido a pequena quantidade obtida. Os RNAs isolados encontram-se disponíveis para a realização das futuras análises de expressão.



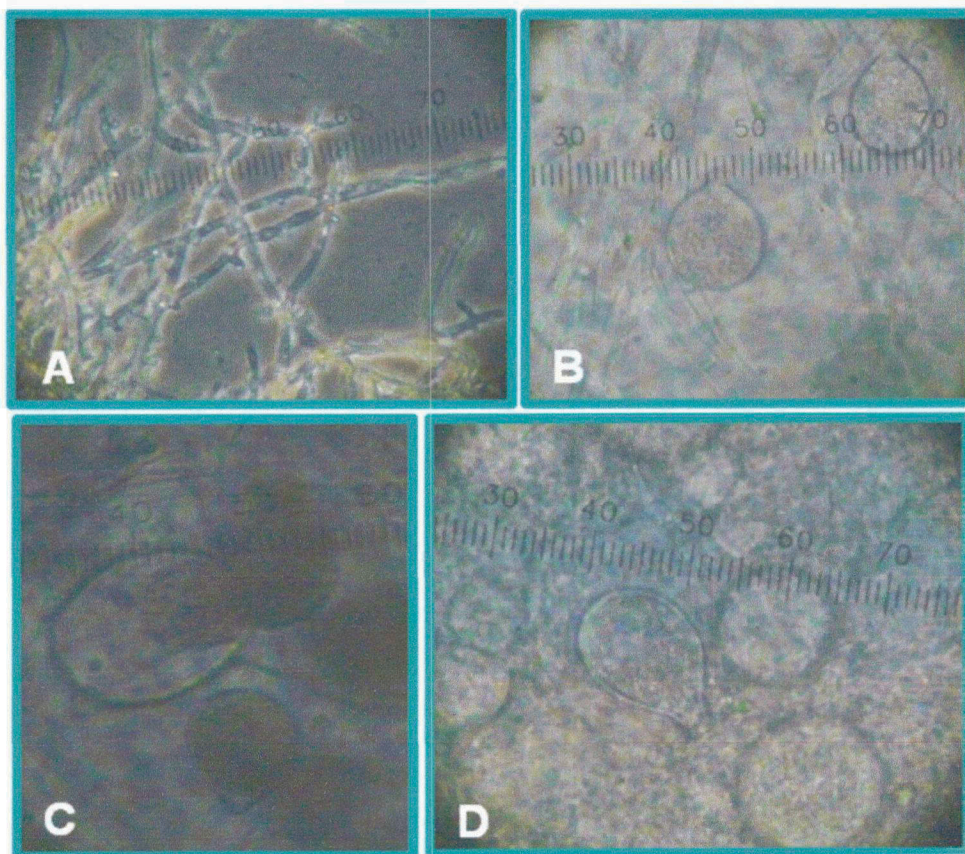


Figura 10. Micrografias de fases do ciclo de vida de *P. nicotianae* var. *parasitica* obtidas para isolamento de RNAm e estudo quantitativo da expressão de genes do tipo *CRN*. **A.** Micélio. **B.** Hifa com esporângio cheio. **C.** Esporângio liberando zoósporos. **D.** Hifa com esporângio vazio.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que:

- 1) Este é o primeiro relato da caracterização da estrutura de genes do tipo CRN de *Phytophthora nicotiana* de citros;
- 2) Quatro genes do tipo *CRN* são expressos em *Phytophthora nicotianae* de citros durante interação com a planta;
- 3) Os quatro genes estudados apresentam sequências parciais;
- 4) Sequências de aminoácidos deduzidas dos quatro genes apresentam região N-terminal conservada e bem caracterizada e região C-terminal muito diversificada e diferente das conhecidas até o momento;
- 5) Os possíveis efetores do tipo CRN estudados são parte do secretoma de *Phytophthora nicotianae* de citros
- 6) Estudos futuros contribuirão para a clonagem, completa caracterização da estrutura de genes CRNs de *Phytophthora nicotianae* de citros, bem como sua caracterização funcional;
- 7) É possível obter as fases de hifa, hifa com esporângios cheios e hifa com esporângios com rapidez e eficiência.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F., *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.*, 25, 3389-3402.

ABECITRUS (Associação Brasileira dos exportadores de Citros). Disponível em: <http://www.abecitrus.com.br/exporta_br.html>. Acesso em: 18 de setembro de 2009.

BELTRAME, André Boldrin. **Interação *Phytophthora nicotianae* – porta-enxerto de citros (tangerina Sunki e citrumelo Swingle): efeito no sistema radicular, aspectos biológicos e bioquímicos.** Tese (Doutorado) –ESALQ/USP, 2010, p. 137.

BENDTSEN, J. D.; NIELSEN, H.; HEIJNE G. von.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0.J. *Mol. Biol.*, 340:783-795, 2004

CitrusBR - Associação Nacional de Exportadores de Sucos Cítricos. Disponível em: <http://www.citrusbr.com.br/download/An_Citrus.pdf> Acesso em: 22 de abril de 2010.

COSTA, Paula de Souza Cabral., **Expressão de genes em *Phytophthora nicotianae* que codificam proteínas indutoras de respostas de defesa em plantas.** Tese (Doutorado) – Universidade federal de Lavras, 2007, p. 56.

CARAZZOLLE, M. F. Gene projects: A genome Web tool for ongoing mining and annotation applied to CitEST. *Genetics and Molecular Biology*, 30, 3 (suppl), 1030-1036 (2007)

EMBRAPA. **Sistema de Produção de Citros para o Nordeste** (2003). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/index.htm>. Acesso em: 21 de maio de 2010.

ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. **Phytophthora diseases worldwide.** [S.l.]: APS, 1996.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: Luz, E.D.M.N; MATSUOKA, K.; SANTOS, A. F.; BEZERRA, J.L. (Ed). **Doenças causadas por *phytophthora* no Brasil.** Campinas: Livraria Rural, 2001. p. 283-342.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agriannual: Anuário de Agricultura brasileira.** São Paulo, 2004. P. 241-283.



GRAHAM, J.H. & TIMMER, L.W. *Phytophthora* disease of citrus. In: **Plant Diseases of International Importance**. Kummer, J. (Ed.). N. Jersey. Prentice-Hall. 1992. pp.250-269.

HARDHAM, A. R. ; CAHILL, D. M. The role of oomycete effectors in plant-pathogen interactions. **Functional Plant Biology**, 2010, 37, 919-925

HAAS, B. J. *et al.* Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. **Nature**. Vol 461, 2009

HIGGINS, D., *et al.* CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22:4673-4680, 1994

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. **Genome Res.**, v.9, p. 868-877, 1999

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>. Acesso em: 18 de setembro de 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Principais produtos das lavouras permanentes. Produção agrícola municipal.** 2009. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=pb>. Acesso em: 18 de setembro de 2010.

INVESTE SÃO PAULO - Agência Paulista de Promoção de Investimentos e Competitividade -. Disponível em: <http://www.investimentos.sp.gov.br/setores/agronegocios> Acesso em: 22 de abril de 2010.

KAMOUN, S. (2005) A Catalogue of the Effector Secretome of Plant Pathogenic Oomycetes. **Rev. Phytopathol.** 44:2.1-2.20

KAMOUN, Sophien. (2006) A Catalogue of the Effector Secretome of Plant Pathogenic Oomycetes. **Rev. Phytopathol.** 44:41-60

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agricultura Brasileira em Números - Anuário 2004.** Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 22 de abril de 2010.



MARSHALL, O. J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics**. 20(15):2471-2472, 2004

MARENGO, S. A.; **Mapeamento genético de tangerina sunki e *Poncirus trifoliata* para resistência ao Huanglongbing (greening) dos citros**. Dissertação de mestrado; Instituto Agrônomo de Pós- Graduação – IAC, Campinas-SP, 2009.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Acesso em: 18 de setembro de 2010

NIELSEN, H.; ENGELBRECHT, J.; BRUNAK, S.; HEIJNE G. von. Identification of Prokaryotic and Eukaryotic Signal Peptides and Prediction of Their cleavagesites. **Protein Engineering**, 10:1-6, 1997.

OLIVA, R., *et al.* Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. **Cellular Microbiology**, 12(6), 705–715, 2010.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. **Citricultura Brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, p.265-280, 1991

PROSDOCIMI, F. *et al.* **Bioinformática: Manual do usuário**. Revista BIO Tecnologia, nº 29, 2003.

RAFFAELE, S.; WIN, J.; CANO, L.M.; KAMOUN, S. Analyses of genome architecture and gene expression reveal novel candidate virulence factors in the secretome of *Phytophthora infestans*. **BMC Genomics**, 11:637. 2010.

RESENDE, M. L. V. *et al.* **PERCEPÇÃO E TRANSDUÇÃO DE SINAIS PARA A ATIVAÇÃO DE RESPOSTAS DE DEFESA EM PLANTAS CONTRA PATÓGENOS** RAPP – Volume 14, 2006. p. 70.

ROSSETTI, V.V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Piracicaba: FEALQ/Fundecitrus, 2001. 207 p.

ROSA, D. D.; CAMPOS, M. A.; TARGON, M. L.P. N.; SOUZA, A. A. *Phytophthora parasitica* transcriptome, a new concept in the understanding of the citrus gummosis. **Genetics and Molecular Biology**, 30, 3 (suppl), 997-1008 (2007)

SIVIERO, A. **Métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus Trifoliata* a gomose.** Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2001, p. 114.

SCHORNACK, S. *et al.* Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. **PNAS.** vol. 107 .no. 40, 17421–17426, 2010

SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E.E. **Biology of *Citrus*.** Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 230p.

TARGON, M. L. P. N. CitEST libraries. **Genetics and Molecular Biology**, 30, 3 (suppl), 1019-1023 (2007)

TYLER, Brett M. (2002) **Molecular basis of recognition between *Phytophthora pathogens* and their hosts.** Annual review Phytopathology, Palo Alto, v. 40, p. 137-167.

TYLER, Brett M. (2008) **Entering and breaking: virulence effector proteins of oomycete plant pathogens.** Blackwell Publishing Ltd, Cellular Microbiology, 11, 13–20.

TORTO, *et al.* EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. **Genome Res.**,13(7):1675-85, 2003