



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia

THAMARA DE MEDEIROS AZEVEDO

**EXPRESSÃO QUANTITATIVA DE GENES DE *Phytophthora parasitica* E DE
CITROS DURANTE A INTERAÇÃO**

CUITÉ – PB

2016

THAMARA DE MEDEIROS AZEVEDO

**EXPRESSÃO QUANTITATIVA DE GENES DE *Phytophthora parasitica* E DE
CITROS DURANTE A INTERAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Magnólia de Araújo Campos

Coorientador: Dr. Marcos Antônio Machado

CUITÉ – PB

2016

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

A994e Azevedo, Thamara de Medeiros.

Expressão quantitativa de genes de *Phytophthora parasítica* e de citros durante a interação. / Thamara de Medeiros Azevedo. – Cuité: CES, 2016.

106 fl.

Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais e Biotecnologia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2016.

Orientadora: Dra. Magnólia de Araújo Campos.

Coorientador: Dr. Marcos Antônio Machado.

1. Oomiceto. 2. Podridão de raízes. 3. Interação planta - patógeno. I. Título.

THAMARA DE MEDEIROS AZEVEDO

**EXPRESSÃO QUANTITATIVA DE GENES DE *Phytophthora parasitica* E DE
CITROS DURANTE A INTERAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Magnólia de Araújo Campos
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG
(Orientadora)

Prof. Dr. Plinio Delatorre
Universidade Federal da Paraíba – UFPB
(Examinador Interno)

Dr. Ronaldo José Durigan Dalio
Centro de Citricultura Sylvio Moreira – IAC
(Examinador externo)

Aos meus queridos pais, Natália Medeiros e Valdemar Azevedo, pelo amor incondicional e todos os ensinamentos de vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre iluminar o meu caminhar e fortalecer minha fé diante todos os momentos da vida.

A Universidade Federal de Campina Grande – *Campus* Cuité, PB. Em especial ao Programa de Pós Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia, pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Laboratório de Biotecnologia do Centro APTA Citros Sylvio Moreira – IAC, Cordeirópolis-SP, pelo fornecimento de infra-estrutura para a realização de parte substancial da pesquisa.

A minha orientadora, prof^a Dr^a. Magnólia de Araújo Campos, pelos ensinamentos, orientações, paciência, confiança e por me ensinar a fazer Ciência. Não apenas meu sincero agradecimento, como minha profunda admiração pela pessoa maravilhosa e profissional que é.

Ao Dr. Marcos Antônio Machado por abrir as portas do Centro de Citricultura Sylvio Moreira e pela oportunidade de realizar este trabalho junto a uma instituição de excelência em pesquisa.

Ao Dr. Ronaldo José Durigan Dalio por me receber tão gentilmente em seu grupo de pesquisa no Centro de Citricultura, por toda a ajuda, confiança, ensinamentos compartilhados e, acima de tudo, por não medir esforços para auxiliar na realização desta pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos funcionários e amigos do Centro de Citricultura, especialmente aos integrantes do grupo de estudos “oomicetos”. A Heros Máximo por compartilhar seu conhecimento em biotecnologia, auxílio na análise dos resultados, sugestões e confiança, e Tiago Oliveira por todas as dicas, apoio e prontidão em ajudar no que fosse possível.

Aos colegas do mestrado pela convivência e laços de amizade formados.

Aos integrantes e ex integrantes do Laboratório de Biotecnologia (LBiotec) do CES, em especial, Ana Luiza, Rayane Abreu, Francielly Negreiros e Fernanda Furtado pela amizade, convivência agradável, experiência compartilhada e colaboração.

A minha amada família, em especial aos meus pais, Natália Medeiros e Valdemar Azevedo e meu irmão, Sandro Azevedo, minha cunhada, Lorena Freires e meu sobrinho, Matheus Azevedo, pelas orações, confiança, amor incondicional e acima de tudo, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim. Me orgulho em tê-los em minha vida.

A minha avó, Francisca, que sempre me incentivou. Aos meus avós, Sebastiana, Estevam e Francisco (*in memoriam*), exemplos de força e sabedoria.

A minha amiga de infância, Fernanda Souza, por se fazer sempre presente, pela amizade, conselhos, compreensão em momentos de ausência, pela disposição em ajudar sempre que possível e por me alegrar sempre.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

“Seja a mudança que você deseja ver no mundo.”

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

A gomose, provocada principalmente pelo oomiceto *Phytophthora parasitica*, é uma das mais graves doenças que acometem culturas de citros no âmbito mundial. Durante a interação, plantas induzem cascatas de sinalização a fim de induzir respostas de defesa. Contudo, *P. parasitica* secreta proteínas efetoras capazes de modular estas respostas por parte do hospedeiro, a fim de promover a infecção. No gênero *Citrus*, espécies comercialmente importantes são suscetíveis a infecção por este patógeno e a resistência a gomose é encontrada na espécie de citros *Poncirus trifoliata*. Considerando a escassez de informações acerca do patossistema citros-*P. parasitica*, o presente trabalho objetivou analisar, por meio de RT-qPCR, a expressão quantitativa de genes efetores apoplásticos e citoplasmáticos de *P. parasitica* e da cascata de defesa em citros, durante interações com espécies suscetíveis e resistentes, *Citrus sunki* e *P. trifoliata*, respectivamente. Dos 17 genes efetores estudados, 10 apresentaram expressão quantitativa relativa diferencial ao nível de significância induzida em *P. parasitica* após inoculação em raízes de *P. trifoliata*, sendo 06 apoplásticos e 04 citosólicos. Os perfis de expressão dos 17 genes efetores de *P. parasitica* apresentaram dois picos máximos de expressão, indicativos da síntese *de novo* desses genes ao longo dos pontos temporais de interação, sendo o acúmulo dos transcritos mais precoce sobre *P. trifoliata* (as 6 h.a.i.) e mais tardio sobre *C. sunki* (as 96 h.a.i.). Os elevados níveis de expressão de genes efetores em *P. parasitica* induzidos por *C. sunki* as 96 h.a.i. devem corresponder a fase necrotrófica de vida do oomiceto, conseqüentemente devido ao sucesso na penetração das células vegetais suscetíveis e acúmulo de biomassa do patógeno. A presença de hifas intracelulares no córtex de raízes de *C. sunki* foi abundantemente visualizada em micrografias as 96 h.a.i., a qual deve ocorrer como consequência da suscetibilidade da planta ao patógeno. Seis grupos hierárquicos de genes co-regulados foram formados a partir dos perfis de expressão dos 17 genes efetores em *P. parasitica*, os quais são reagrupados de modo diferente de acordo com a interação com *C. sunki* ou com *P. trifoliata*, indicando que o patógeno foi capaz de reconhecer entre hospedeiros suscetível ou resistente e sintetizar seletivamente quais efetores e em que intensidade devem ser segregados. As raízes de *C. sunki* expressaram 10 componentes de cascatas de resistência mediada pelo SA em resposta não bem-sucedida a infecção por *P. parasitica*. A supressão por *P. parasitica* da expressão de 05 genes de cascatas de resistência mediada pelo SA foi observada em raízes de *P. trifoliata* e deve indicar tentativas do patógeno de burlar com a imunidade da planta. Entretanto, a resistência de *P. trifoliata* a *P. parasitica* não deve utilizar genes envolvidos na cascata de resistência mediada pelo SA, mas sim genes *PR-5* e *calose sintase*, envolvendo barreiras bioquímicas e estruturais. Portanto, o presente trabalho fornece uma nova visão para o entendimento acerca do processo de modulação de efetores de *P. parasitica* em interações suscetíveis e resistentes e, a maneira como estes hospedeiros respondem mediante interação.

Palavras-chave: Oomiceto. Podridão de raízes. Interação planta-patógeno.

ABSTRACT

The gummosis, mainly caused by the oomycete *Phytophthora parasitica*, is one of the most serious diseases affecting citrus crops worldwide. During the interaction, plants induce signaling cascades in order to induce defense responses. However, *P. parasitica* secretes effector proteins capable of modulating these host responses in order to promote the infection. In *Citrus* genus, commercially important species are susceptible to infection by this pathogen and the gummosis resistance is achieved in *Poncirus trifoliata* citrus species. Considering the lack of information on citrus-*P. parasitica* pathosystem, this study aimed to analyze, through RT-qPCR, the quantitative expression of *P. parasitica* effector and citrus defense genes during citrus-*P. parasitica* susceptible and resistant interactions, with *Citrus sunki* and *P. trifoliata*, respectively. As results, *P. parasitica* was able to recognize among susceptible or resistant host and selectively synthesize which effectors and in that intensity should be expressed. Of the 17 studied effector genes, 10 showed quantitative relative differential expression at significance level induced in *P. parasitica* after inoculation in trifoliolate orange roots, being 06 apoplastics and 04 cytosolics. The expression profiles for the 17 effector genes in *P. parasitica* had two maximum peaks of expression, that are indicative of *de novo* synthesis of these genes along the time points of interaction, showing transcript accumulation earlier on *P. trifoliata* (at 6 h.a.i.) and later on *C. sunki* (at 96 h.a.i.). High levels of the effector gene expression in *P. parasitica* induced by *C. sunki* at 96 h.a.i. must match the necrotrophic phase of life of this oomycete, consequently due to their successful penetration into the susceptible plant cells and pathogen biomass accumulation. The presence of intracellular hyphae in cortex of *C. sunki* roots was abundantly visualized in the micrographs at 96 h.a.i., which may occur as a result of the plant susceptibility to the pathogen. Six hierarchical groups of co-regulated genes were formed from the expression profiles of the 17 effector genes in *P. parasitica*, which are grouped differently according to interact with *C. sunki* or *P. trifoliata*, indicating that the pathogen was able to recognize between susceptible or resistant host and selectively synthesize which effectors and in that intensity should be segregated. The roots of *C. sunki* expressed 10 components of the cascade resistance mediated by SA in response not successful to *P. parasitica* infection. The suppression by *P. parasitica* of the expression of 05 genes of the cascade resistance mediated by SA was found in *P. trifoliata* roots, and must indicate pathogen attempts to circumvent with the immunity of the plant. However, *P. trifoliata* resistance to *P. parasitica* should not use genes involved in the resistance cascade mediated by SA, but instead *PR-5* and callose synthase genes, involving biochemical and structural barriers. In conclusion, this study provides a new insight into the understanding of the effectors of modulation process of *P. parasitica* in susceptible and resistant interactions and how these hosts respond through interaction.

Keywords: Oomycete. Root rot. Plant-pathogen interaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo proposto para a via de transdução de sinais do SA.....	28
Figura 2 – Modo de ação de moléculas efetoras.....	32
Figura 3 – Modelo de entrada de efetores em célula vegetal hospedeira.....	38
Figura 4 – Sinais de localização nuclear (NLS) preditos para três candidatos a efetores RXLR, indicando sua posição na sequência proteica em vermelho.....	54
Figura 5 – Perfil de expressão relativa de genes candidatos a efetores NPP1 de <i>P. parasitica</i> durante o estabelecimento de interações com raízes de <i>C. sunki</i> e <i>P. trifoliata</i> . Os níveis de RNAm relativos foram quantificados, por RT-qPCR, em amostras correspondentes as raízes das plântulas inoculadas com <i>P. parasitica</i> em diferentes pontos temporais de infecção. Os dados são apresentados como expressão relativa aos genes de referência WS21 e UBC. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis:*P <0,05.....	56
Figura 6 – Perfil de expressão relativa de genes candidatos a efetores CBEL de <i>P. parasitica</i> durante o estabelecimento de interações com raízes de <i>C. sunki</i> e <i>P. trifoliata</i> . Os níveis de RNAm relativos foram quantificados, por RT-qPCR, em amostras correspondentes as raízes das plântulas inoculadas com <i>P. parasitica</i> em diferentes pontos temporais de infecção. Os dados de expressão foram normalizados com base nos genes endógenos WS21 e UBC. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis:*P <0,05.....	59
Figura 7 – Perfil de expressão relativa de genes candidatos a efetores Elicitina de <i>P. parasitica</i> durante o estabelecimento de interações com raízes de <i>C. sunki</i> e <i>P. trifoliata</i> . Os níveis de RNAm relativos foram quantificados, por RT-qPCR, em amostras correspondentes as raízes das plântulas inoculadas com <i>P. parasitica</i> em diferentes pontos temporais de infecção. Os dados de expressão foram normalizados com base nos genes endógenos WS21 e UBC. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis:*P <0,05.....	62
Figura 8 – Perfil de expressão relativa do gene candidato a efector CRN de <i>P. parasitica</i> durante o estabelecimento de interações com raízes de <i>C. sunki</i> e <i>P. trifoliata</i> . Os níveis de RNAm relativos foram quantificados, por RT-qPCR, em amostras correspondentes as raízes das plântulas inoculadas com <i>P. parasitica</i> em diferentes pontos temporais de infecção. Os dados de expressão foram normalizados com base nos genes endógenos WS21 e UBC. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Diferenças	

estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis: *P < 0,05..... 65

Figura 9 – Perfil de expressão relativa dos genes candidatos a efetor RXLR de *P. parasitica* durante o estabelecimento de interações com raízes de *C. sunki* e *P. trifoliata*. Os níveis de RNAm relativos foram quantificados, por RT-qPCR, em amostras correspondentes as raízes das plântulas inoculadas com *P. parasitica* em diferentes pontos temporais de infecção. Os dados de expressão foram normalizados com base nos genes endógenos WS21 e UBC. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis: *P < 0,05..... 67

Figura 10 – Agrupamento hierárquico dos genes efetores apoplásticos e citoplasmáticos expressos em *P. parasitica* durante interações com raízes de *C. sunki* (A) e *P. trifoliata* (B). O nível de expressão dos genes está indicado como uma transformação Log2 a partir do valor relativo. Verde e vermelho foram utilizados para condições *down-regulated* e *up-regulated*, respectivamente, conforme a escala. As linhas verticais indicam os grupos de genes com intensidades de expressão correlacionadas ao longo do *time course*..... 70

Figura 11 – Micrografias sob luz de cortes longitudinais de raízes de citros inoculadas com zoósporos de *P. parasitica* as 96 h.a.i., em solução de Karnovsky e coradas com azul de toluidina. (A – C) *C. sunki*, (B – D) *P. trifoliata*. Setas = hifas, * = esporângios..... 76

Figura 12 - Perfil de expressão relativa de genes associados a via de sinalização do SA de *C. sunki* e *P. trifoliata* durante interação com *P. parasitica*. Os níveis de RNAm relativos foram quantificados, por RT-qPCR, em amostras correspondentes as raízes das plântulas inoculadas em diferentes pontos temporais de infecção. Os dados são apresentados como expressão relativa aos genes de referência GAPC2, EGIDH e DIM1 para amostras de *C. sunki* e, Cyclo, FBOX e GAPC2 para *P. trifoliata*. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis: *P < 0,05..... 79

Figura 13 – Perfil de expressão relativa de fatores de transcrição do tipo WRKY de *C. sunki* e *P. trifoliata* durante interação com *P. parasitica*. Os níveis de RNAm relativos foram quantificados, por RT-qPCR, em amostras correspondentes as raízes das plântulas inoculadas em diferentes pontos temporais de infecção. Os dados são apresentados como expressão relativa aos genes de referência GAPC2, EGIDH e DIM1 para amostras de *C. sunki* e, Cyclo, FBOX e GAPC2 para *P. trifoliata*. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis: *P < 0,05..... 82

Figura 14 – Perfil de expressão relativa de um gene PR-5 de *C. sunki* e *P. trifoliata* durante interação com *P. parasitica*. Os níveis de RNAm relativos

foram quantificados, por RT-qPCR, em amostras correspondentes as raízes das plântulas inoculadas em diferentes pontos temporais de infecção. Os dados são apresentados como expressão relativa aos genes de referência GAPC2, EGIDH e DIM1 para amostras de *C. sunki* e, Cyclo, FBOX e GAPC2 para *P. trifoliata*. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis: *P <0,05.....

84

Figura 15 – Perfil de expressão relativa de genes calose sintases de *C. sunki* e *P. trifoliata* durante interação com *P. parasitica*. Os níveis de RNAm relativos foram quantificados, por RT-qPCR, em amostras correspondentes as raízes das plântulas inoculadas em diferentes pontos temporais de infecção. Os dados são apresentados como expressão relativa aos genes de referência GAPC2, EGIDH e DIM1 para amostras de *C. sunki* e, Cyclo, FBOX e GAPC2 para *P. trifoliata*. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis: *P <0,05.....

85

Figura 16 – Perfil de expressão de genes associados às cascatas de respostas de raízes de *C. sunki* (A) e *P. trifoliata* (B) a *P. parasitica*. O nível de expressão dos genes está indicado como uma transformação Log2 a partir do valor relativo. Verde e vermelho foram utilizados para condições *down-regulated* e *up-regulated*, respectivamente. Os níveis de transcrição foram normalizados em relação à expressão de GAPC2, EGIDH e DIM1 para amostras de *C. sunki* e, Cyclo, FBOX e GAPC2 para *P. trifoliata*.....

87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração e pureza das amostras de RNA obtidas a partir das raízes infectadas de <i>C. sunki</i>	46
Tabela 2 – Concentração e pureza das amostras de RNA obtidas a partir das raízes infectadas de <i>P. trifoliata</i>	47
Tabela 3 – <i>Primers</i> utilizados nas reações de RT-qPCR para genes candidatos a efetores de <i>P. parasitica</i>	50
Tabela 4 – <i>Primers</i> utilizados nas reações de RT-qPCR para genes de defesa de <i>C. sunki</i> e <i>P. trifoliata</i>	51
Tabela 5 – Similaridade via BLASTp de 11 novos genes candidatos a efetores apoplásticos de <i>P. parasitica</i> isolado IAC 01/95 selecionados para análise de expressão quantitativa.....	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
3.1	Caracterização e importância da citricultura brasileira	18
3.2	<i>Phytophthora parasitica</i> dos citros	20
3.3	Alternativas para o controle de <i>P. parasitica</i> em citros.....	22
3.4	Interação molecular planta-patógeno	23
3.5	Interação citros- <i>P. parasitica</i>	28
3.6	Efetores de <i>P. parasitica</i> : caracterização e modo de ação	30
3.6.1	EFETORES APOPLÁSTICOS	34
3.6.2	EFETORES CITOPLASMÁTICOS.....	36
3.7	Bases para estudos em expressão gênica.....	40
4	METODOLOGIA	44
4.1	Condições de cultivo do isolado patogênico <i>P. parasitica</i> , e bioensaio de inoculação.....	44
4.2	Extração de RNA	45
4.3	Microscopia	47
4.4	Síntese de cDNA e RT-qPCR	48
4.5	Desenho de <i>primers</i>	49
4.6	Análise estatística	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1	Seleção de novos genes candidatos a efetores.....	52
5.2	Análise quantitativa da expressão de genes de <i>P. parasitica</i>	54

5.3	Expressão de genes efetores apoplásticos de <i>P. parasitica</i>	55
5.3.1	GENES <i>NPP1</i>	55
5.3.2	GENES <i>CBEL</i>	58
5.3.3	GENES <i>ELICITINA</i>	61
5.4	Expressão de candidatos a efetores citoplasmáticos de <i>P. parasitica</i>	64
5.4.1	GENE <i>CRN</i>	64
5.4.2	GENES <i>RXLR</i>	66
5.5	Padrão de expressão de genes efetores de <i>P. parasitica</i> ao longo do seu desenvolvimento biotrófico e necrotrófico.....	70
5.6	Análise histológica da interação citros- <i>P. parasitica</i> as 96 h.a.i.....	75
5.7	Análise quantitativa da expressão de genes associados às cascatas de respostas de citros a <i>P. parasitica</i>	77
5.7.1	GENES ASSOCIADOS A VIA DE SINALIZAÇÃO DO SA.....	78
5.7.1.1	GENE <i>PR-5</i>	83
5.7.2	GENES <i>CALOSE SINTASE</i>	85
5.8	Padrão de expressão de genes associados às cascatas de respostas de citros a <i>P. parasitica</i>	86
6	CONCLUSÕES.....	90
	REFERÊNCIAS.....	92

1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira ocupa lugar de destaque no cenário mundial, onde o Brasil, atualmente, é considerado como o maior produtor de laranja e principal exportador de suco concentrado. Difundida por todo o continente, a atividade citrícola refere-se à produção de laranjas, limas, limões, tangerinas e pomelos, sendo que no Brasil esta atividade está concentrada predominantemente no estado de São Paulo, o qual contribui com mais da metade da produção de laranja do País. Em 2015 foram produzidas 16.197.828 toneladas de laranja no Brasil a partir de 688.248 hectares cultivados, tendo São Paulo contribuído com 11.749.470 toneladas (IBGE, 2016).

Muito embora a citricultura seja um dos principais agronegócios brasileiros, sua produção é constantemente ameaçada por diversas doenças e pragas. A gomose de *Phytophthora* é considerada economicamente importante e uma das mais graves doenças que acometem *Citrus* em todas as regiões produtoras do mundo. As manifestações da doença variam de acordo com o tecido da planta que é acometido, sendo que a podridão de raízes e a gomose em troncos são caracterizadas como as mais graves (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 2005).

Em regiões produtoras do Brasil, *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan var. *parasitica* (*P. parasitica* Dastur) é descrita como o agente patogênico mais frequentemente associado à gomose e podridão de raízes. *P. parasitica* pertence ao grupo dos oomicetos, constituído por microrganismos eucarióticos semelhantes a fungos, mas que são filogeneticamente relacionados a algas marrons e diatomáceas (LAMOUR; WIN; KAMOUN, 2007). Em *Citrus*, muitas espécies comercialmente importantes são suscetíveis a este fitopatógeno, a exemplo do porta-enxerto tangerina 'Sunki' (*Citrus sunki*). A resistência a *Phytophthora* tem sido relatada especialmente na espécie do gênero *Poncirus*, *Poncirus trifoliata*, que é aplicada como porta-enxerto em citros, embora apresente incompatibilidade com a copa de algumas espécies, o que restringe sua utilização em certos casos (KOLLER., 2013).

O oomiceto *P. parasitica* é habilitado para, mediante o contato com a espécie vegetal, penetrar seus tecidos e romper a sua resistência, promovendo a infecção. Contudo, a interação estabelecida entre planta-patógeno é feita através de uma troca de sinais moleculares proveniente de ambos. Durante a interação, uma vez

ocorrido o reconhecimento do patógeno por proteínas extra ou intracelulares, as células da planta hospedeira ativam uma série de respostas de defesa, a fim de inativar ou restringir a infecção. Por outro lado, patógenos desenvolveram uma gama de proteínas capazes de superar ou manipular as defesas da célula hospedeira a fim promover a infecção. Essas proteínas são conhecidas como efetores (JIANG et al., 2008).

Duas classes de efetores são relatadas entre os oomicetos baseados nos sítios-alvos de atuação na planta hospedeira: os efetores apoplásticos, que interagem com alvos específicos ou receptores na superfície da célula hospedeira; e os efetores citoplasmáticos, os quais são segregados para o espaço intracelular (KAMOUN, 2006). Considerando a importância dos efetores derivados de *P. parasitica* durante o processo de patogênese, a caracterização de algumas moléculas efetoras tem sido elucidada. Contudo, apesar dos recentes avanços nessa área e diante do repertório de moléculas desta espécie capazes de modular respostas de defesa em plantas, seu estudo ainda é considerado limitado (MENG et al., 2015).

Além disso, apesar da relevância econômica de cultivares de citros e dificuldades impostas para o controle das doenças podridão de raízes e gomose, ainda são limitados os trabalhos que avaliam a interação molecular citros-*P. parasitica*. Nesse contexto, o estudo de genes expressos diferencialmente entre genótipos resistentes e suscetíveis podem fornecer candidatos promissores para identificação de transcritos envolvidos na resistência à doença (BOAVA et al., 2011a).

Nessa perspectiva, identificar e analisar a expressão de efetores de *P. parasitica*, responsáveis pela indução ou manipulação de cascatas de defesa; assim como proteínas envolvidas nas respostas de defesa em citros, pode contribuir, significativamente, para o entendimento molecular funcional de genes durante interações citros-patógeno. Portanto, a compreensão dos mecanismos moleculares de patogenicidade de *P. parasitica*, assim como de resistência em hospedeiros, podem ser aplicados posteriormente em favor do desenvolvimento de alternativas de controle do patógeno mais precisas, reprodutíveis e que minimizem os riscos de contaminação do meio ambiente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Analisar a expressão quantitativa de genes efetores de *P. parasitica* e de genes de citros durante interações suscetível e resistente citros-*P. parasitica*.

2.2 Objetivos específicos:

- Selecionar e desenhar *primers* específicos de genes candidatos a efetores apoplásticos e citoplasmáticos de *P. parasitica*;
- Analisar a expressão quantitativa relativa temporal de genes candidatos a efetores apoplásticos e citoplasmáticos de *P. parasitica* após inoculação em raízes de *C. sunki* e *P. trifoliata*, por meio de RT-qPCR;
- Analisar a interação de *P. parasitica* com raízes de *C. sunki* e *P. trifoliata* às 96 horas após a inoculação, por meio de histologia sob microscopia de luz;
- Analisar a expressão quantitativa relativa temporal de genes associados às cascatas de respostas de raízes de *C. sunki* e *P. trifoliata* a *P. parasitica*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Caracterização e importância da citricultura brasileira

Os citros contemplam um grande número de plantas pertencentes ao gênero *Citrus* e outros gêneros afins (*Fortunella* e *Poncirus*) ou ainda a híbridos da família Rutaceae (MATTOS JUNIOR et al., 2005). A taxonomia do gênero *Citrus* envolve ampla complexidade em função da elevada diversidade existente no gênero. Esta diversidade deve-se, em parte, as particularidades envolvendo a biologia reprodutiva dos seus integrantes, onde a intercompatibilidade sexual favoreceu o surgimento de híbridos interespecíficos e intergenéricos durante a história evolutiva do grupo (ARAÚJO; ROQUE, 2005). Nessa perspectiva, há anos existe grande divergência no tocante à classificação, em especial, quanto ao número de espécies abrangentes pelo gênero, onde, inicialmente Swingle & Reece (1967) propuseram 16 espécies, enquanto que Barret & Rhodes (1976) propuseram três espécies e Tanaka (1977) propôs um sistema de classificação para o gênero contemplando 162 espécies (OLIVEIRA, 2006).

Sob a visão econômica, a família *Rutaceae* se sobressai sobre as demais abrangidas pelo gênero. Nesta, as espécies que contam com maior expressividade nos pomares dos principais países citrícolas correspondem aos grupos das laranjas doces (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck); seguido pelas tangerinas (*Citrus reticulada* Blanco e *Citrus clementina* hort. ex Tanaka); limões verdadeiros (*Citrus limon* (L.) Brum. F. e *Citrus aurantiifolia* (Christm.), Swingle); e limas ácidas (*Citrus latifolia* (Yu.Tanaka) Tanaka) (BASTOS et al., 2014).

As plantas cítricas, segundo registros, apontadas como de origem asiática, foram introduzidas no continente americano por volta dos anos de 1500 durante a colonização. No Brasil, a laranja encontrou condições propícias para o seu desenvolvimento possibilitando a sua propagação por todo o território nacional, o que contribuiu significativamente para a sua atuação como maior produtor mundial de laranjas e principal produtor e exportador de suco concentrado de laranja, comandando mais de 80% desse mercado (ABECITRUS, 2010). No ranking mundial, atualmente, o Brasil representa o país de maior produção global de laranja, seguido pela China, União Europeia e Estados Unidos, respectivamente (USDA, 2016).

A produção de citros distribui-se por todo o País, contanto com uma concentração predominante na região Sudeste, em especial no estado de São Paulo (ALMEIDA; PASSOS, 2011). O chamado “cinturão citrícola”, formado pelo estado de São Paulo e pelo Triângulo Mineiro, é responsável por mais de 80% da produção de laranja no Brasil. Devido a mudança ocorrida no padrão tecnológico da citricultura, a produtividade do cinturão alcançou um aumento de 16% na última década (NEVES et al., 2010). O seu potencial de expansão se distribui ainda na região Nordeste, onde em 2015, os dois maiores produtores foram Bahia (925.361 toneladas) e Sergipe (552.817 toneladas), tendo a Paraíba contribuído com 5.448 toneladas (IBGE, 2016).

A citricultura brasileira, apesar de seu destaque no cenário mundial, enfrenta dificuldades que variam de ordem institucional ao âmbito tecnológico. Nesse contexto, destacam-se os riscos derivados do avanço de novas pragas e doenças, os quais constituem uma ameaça potencial para a produção (NEVES; JANK, 2006). O estado de São Paulo vem tentando superar problemas na citricultura acarretados pela ação de doenças e pragas há longa data. Em 2014, fatores como a seca, baixos preços oferecidos pela indústria e a incidência de pragas, especialmente o vetor do *greening*, foram alguns dos responsáveis por reduções significativas na citricultura paulista (IBGE, 2014).

A produção do cinturão citrícola do país é ameaçada por uma série de fatores fitossanitários. Estima-se que dentre as diversas doenças de plantas cítricas, mais de cinquenta delas são causadas apenas por fungos. Entre as quais, destacam-se pinta-preta (*Guignardia citricarpa* (*Phyllosticta citricarpa*)), a verrugose (*Elsinoe* spp.) e a rubelose (*Erythriscium salmonicolor*). Nesse grupo está incluída ainda a podridão de raízes de *Phytophthora* spp., apesar do gênero não pertencer mais ao grupo dos chamados “fungos verdadeiros” (FEICHTENBERGER, 2013). Além disso, em função de sua distribuição cosmopolita, dados coletados nos últimos anos ressaltam que a podridão de raízes de *Phytophthora* spp. provocou perdas significativas tanto em São Paulo, maior região produtora de citros, quanto na segunda maior produtora mundial, Flórida, USA (GRAHAM; FEICHTENBERGER, 2015).

3.2 *Phytophthora parasitica* dos citros

A origem do gênero *Phytophthora* está fortemente associada ao evento hoje conhecido como Grande Fome Irlandesa (1845-1846) onde de quatro a oito milhões de habitantes irlandeses foram levados a óbito ou submetidos a emigração devido uma grave praga de batata, formalmente nomeado de *Phytophthora infestans* (LAMOURE et al., 2003). Caracteristicamente, *Phytophthora* e fitopatógenos afins são oomicetos, grupo de organismos morfológica e fisiologicamente semelhantes aos fungos, todavia distantes filogeneticamente (TYLER, 2002). A principal diferença bioquímica entre fungos e oomicetos reside na composição da parede celular, enquanto que em fungos a parede celular é composta em sua maior parte por quitina, a de oomicetos é constituída predominantemente por 1-3- β -glucanas e algumas de 1-4- β -glucanas e 1-6- β -glucanas (LATIJNHOUWERS, DE WIT, GOVERS, 2003; WERNER et al., 2002).

Atualmente, o gênero *Phytophthora* é classificado como pertencente ao Reino Stramenopila, ao Filo Oomycota, à Classe Oomicetes e à Ordem Pythiales (SASSERON, 2008) e até 2010 este gênero incluía mais de 100 espécies (KROON et al., 2012), sendo que esse número está em constante crescimento devido, especialmente, a utilização de ferramentas moleculares.

Estima-se que existam aproximadamente 60 espécies patogênicas de *Phytophthora*, entre as quais podem infectar um diversificado número de plantas e desencadear uma gama de sintomas como podridão de raízes, caules, folhas e frutos (TYLER, 2002). Elas parasitam desde plantas hospedeiras diversas, até culturas de plantas ornamentais e populações naturais. Além disso, calcula-se que as perdas incitadas por organismos do gênero *Phytophthora* em citros estejam entre 10 a 30% de toda a produção citrícola mundial (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

No Brasil, as espécies *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (*P. parasitica* Dastur) e *Phytophthora citrophthora* são os principais agentes etiológicos da doença conhecida como gomose, considerada, economicamente, uma das mais importantes doenças fúngicas em citros no âmbito mundial e a principal doença fúngica em escala nacional. Contudo, *P. parasitica* corresponde à espécie mais frequentemente associada em regiões produtoras do País (BASTIANEL, 2013), esta consiste em uma das espécies do gênero mais estudada, em especial, devido as grandes perdas acarretadas por sua invasão em culturas de citros, além de sua distribuição

cosmopolita (CAIXETA, 2010). Soma-se a isto o fato de que *P. parasitica* possui um amplo espectro de hospedeiros, podendo infectar mais de 255 gêneros pertencentes a 90 famílias diferentes (COOKE et al., 2000).

Entre as manifestações da doença provocada por *P. parasitica*, as mais graves são as chamadas podridão de raízes e gomose em troncos e ramos. Estas são originadas a partir do ataque do oomiceto ao tronco e raízes principais e o sintoma tradicionalmente relatado, mas não exclusivo, consiste na exsudação de goma, de onde se origina o nome da doença. A gomose resulta da colonização da haste acima do solo por *Phytophthora* conduzindo à produção de uma substância caracteristicamente escura e viscosa na superfície externa da casca. Tal sintoma é resultado da lesão ao floema de determinadas espécies de plantas (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 2005; HAYDEN et al., 2013).

A podridão de raízes, por outro lado, resulta da infecção pelo patógeno nos tecidos externos do córtex radicular causando deterioração das raízes fibrosas. Esta pode ocorrer tanto em viveiros quanto em pomares, sendo uma problema comum em cultivos dos maiores produtores mundiais. Frente a ação de ataques contínuos pelo patógeno a absorção de água e nutrientes minerais pode ser severamente prejudicada, além das reservas de carboidratos nas raízes. Estes danos podem conduzir a redução no tamanho do fruto e na produção devido à perda de folhas. A podridão de raízes pode ser especialmente grave quando acomete porta-enxertos suscetíveis em solo de viveiros infestados ou em mudas jovens plantadas em solo infestado. Em árvores de pequeno porte, a perda de um número significativo de raízes pode culminar na morte da espécie vegetal acometida (GRAHAM; FEICHTENBERGER, 2015).

P. parasitica, assim como fitopatógenos afins, é hemibiotrófico, ou seja, alimenta-se dos tecidos vivos do hospedeiro durante um período de tempo e depois avança para a fase necrotrófica, colonizando os tecidos mortos da planta. A infecção por *P. parasitica*, em geral, é mediada por zoósporos biflagelados, produzidos a partir de esporângios localizados no ápice de hifas durante a esporulação assexuada. Após atingirem a superfície vegetativa do hospedeiro, os zoósporos germinam podendo aderir e infectar tecidos suscetíveis da espécie. *P. parasitica* produz ainda esporos de resistência chamados clamidósporos, importantes para a manutenção da sobrevivência a longo prazo quando as condições não são propícias para o desenvolvimento micelial (LUDOWICI et al., 2013).

As características atribuídas a *P. parasitica* evidenciam que os principais fatores favoráveis ao desenvolvimento de doenças incitadas por este patógeno são temperaturas elevadas, umidade relativa do ar e umidade do solo. Portanto, solos mal drenados, e técnicas de manejo e irrigação impróprias consistem em fatores de risco para o estabelecimento do patógeno (SIVIERO, 2001).

Entre as particularidades atribuídas à *P. parasitica* se destacam a capacidade de produção de zoósporos móveis e o desenvolvimento de clamidiósporos, habilitados para permanecerem latentes durante condições adversas por um prolongado período de tempo, o torna um patógeno potencialmente resistente e epidêmico (GRAHAM; FEICHTENBERGER, 2015). Dessa forma, alternativas de controle são necessárias para evitar a propagação do fitopatógenos e, conseqüentemente, o desencadeamento de perdas substanciais na citricultura.

3.3 Alternativas para o controle de *P. parasitica* em citros

O controle da gomose e a podridão de raízes de *P. parasitica* em citros pode ser desenvolvido mediante o manejo integrado, estratégia que procura contemplar quatro linhas de atuação: higiene e sanidade; controle cultural e biológico; resistência varietal e, de maneira complementar, controle químico. É fortemente recomendado adotar medidas essenciais de higiene na produção tais como o plantio de mudas sadias, proteção adequada para plantas com eventuais cortes que possam facilitar a infecção pelo patógeno, evitar ferimentos que possam suprimir a barreira mecânica das plantas e ainda cuidados com irrigação. Além de contribuir com o controle da gomose e podridão de raízes, o manejo integrado fornece vantagens no sentido de reduzir custos na produção e causar menor impacto ao meio ambiente. Contudo, embora o manejo integrado seja indicado para doenças causadas por *Phytophthora* spp. essa estratégia trata de controlar a doença a um nível tolerável, haja vista que, a erradicação se aplica a um restrito número de casos (FEICHTENBERGER; SPÓSITO, 2004).

Contudo, controlar doenças provocadas por *P. parasitica* representa um verdadeiro desafio considerando as particularidades inerentes ao patógeno, como sua vasta gama de hospedeiros, limitada disponibilidade de porta-enxertos resistentes, veiculação pelo solo, produção de zoósporos móveis e período de latência. O controle químico torna-se inviável considerando que poucos produtos

tem eficácia contra *P. parasitica*, além disso, há registros do surgimento de isolados resistentes até mesmo aqueles produtos que antes eram aplicados efetivamente contra a ação do patógeno, como os fungicidas fosetyl-Al e metataxyl (LUDOWICI et al., 2013).

O método de prevenção mais difundido para doenças provocadas por *Phytophthora* em citros, em particular para os casos de podridão de raízes, consiste no uso de porta-enxertos resistentes ou tolerantes a espécies do gênero, a exemplo de *P. trifoliata*, *Cleopatra mandarim* e *Swingle citrumelo* (SANDLER et al., 1989). De acordo com sua suscetibilidade às infecções de troco por *P. parasitica*, as mais relevantes espécies de citros são classificadas em cinco classes: Suscetibilidade muito alta; alta; moderada; baixa; muito baixa. Entretanto, embora uma espécie possa ser resistente à infecção de tronco, o mesmo comportamento pode não ser igualmente efetivo para as raízes, como é o caso observado na laranja azeda (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 2005).

Nesse contexto, o desenvolvimento de culturas geneticamente resistentes vem despertando interesse por possibilitar um controle efetivo, além de econômica e ambientalmente seguro, tornando viável a redução na disseminação das doenças acima relatadas. Esse método consiste basicamente em transformar porta-enxertos geneticamente através da inclusão de genes capazes de promover resistência ou tolerância ao agente etiológico (FAGOAGA et al., 2001).

3.4 Interação molecular planta-patógeno

A interação planta-patógeno é estabelecida através de uma intrincada rede de ataque *versus* defesa. Por um lado, o patógeno se esforça para invadir as células hospedeiras, a fim de obter nutrientes indispensáveis para o seu ciclo de vida. Por outro lado, a planta recorre a sistemas de defesa em busca de irromper a infecção e assegurar sua sobrevivência (EVANGELISTI et al., 2013).

Em seu ambiente natural as plantas frequentemente estão em contato com uma diversidade de inimigos potenciais a exemplo de bactérias, fungos, vírus, nematoides, além de animais herbívoros. Em função da sua impossibilidade de deslocamento e a ausência de um sistema imunológico complexo, os vegetais tornam-se resistentes a agentes patogênicos pela presença de mecanismos de

defesa. Defesas estruturais incluem cutícula e epiderme, enquanto que as químicas englobam os compostos secundários (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Pesquisas com ênfase em fisiologia e bioquímica fitopatológica concluíram que os mecanismos de defesa utilizados pelas plantas para inibir a ação dos fitopatógenos se dividem em dois grupos: pré-formados e pós-formados. Os mecanismos pré-formados incluem estruturas presentes na planta antes do ataque pelo patógeno, como cutículas, tricomas, estômatos e compostos químicos, como fenóis e alcaloides. Enquanto que os pós-formados, ou induzíveis, contemplam fatores ausentes ou com baixa concentração no vegetal antes da infecção, como formação de suberificação, lignificação, e bioquímicos, tais como, síntese de fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (PR) e enzimas líticas como glucanases e quitinases (PASCHOLATI; CIA, 2006). Uma planta é considerada resistente quando está apta a reconhecer o agente patogênico e modular respostas de defesa através de sinais específicos que atuam, subsequentemente, ativando barreiras químicas ou físicas contra o invasor (FERNANDES et al., 2009).

Sob a perspectiva molecular, no século 20, Harold Flor (1942) propôs a existência de uma complementariedade entre os genes de ataque do patógeno e aqueles que conferem imunidade à planta. Segundo sua teoria, existe uma correspondência intrínseca entre de um gene de avirulência (*Avr*) no patógeno e a proteína complementar produzida a partir de um gene de resistência (*R*) na planta. Esta interação gene-a-gene culminaria em respostas de defesa na planta associadas com a inibição da virulência do patógeno.

Atualmente sabe-se que as plantas desenvolveram um sistema imune inato composto por duas camadas de defesa, a fim de reconhecer a ação de patógenos, o qual foi proposto como um modelo co-evolucionário em zig-zag por Jones e Dangl (2006). Na primeira camada, padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* – PAMPs) são reconhecidos por proteínas denominadas receptores de reconhecimento padrões (*Pattern-Recognition Receptors* – PRRs) localizadas na face extracelular. O reconhecimento pelos PRRs leva a imunidade disparada por PAMPs (*PAMP-Triggered Immunity* – PTI) (DODDS; RATHJEN, 2010).

Após o reconhecimento, vias de sinalização são requeridas, por meio de cascatas de MARKs e reprogramação transicional conduzida por fatores de transcrição do tipo WRKY. A superfamília WRKY inclui proteínas que atuam em

diversos processos fisiológicos em plantas e, podem funcionar como reguladores de respostas de defesa (WU et al., 2011). Entre elas, WRKY28, por exemplo, foi relatada como sendo induzida rapidamente por elicitores de patógenos, ligando a expressão de genes de defesa disparados pelo patógeno ao acúmulo de ácido salicílico (VERK; BOL; LINTHORST, 2011). WRKY70 foi demonstrado com a capacidade de ativar a expressão de genes envolvidos no balanço entre as vias SA e JA (LI et al., 2006).

A indução de PTI está frequentemente associada com a sinalização de MAP cinases, indução de genes responsivos à patógenos e deposição de calose afim de atuar no fortalecimento da parede celular no local de infecção, atuando conjuntamente na impedimento da colonização pelo fitopatógeno (CAMPOS; RESENDE; SILVA, 2011). Contudo, patógenos evolutivamente bem sucedidos desenvolveram uma estratégia capaz de irromper a PTI. Nesta, os chamados efetores secretados, derivados do patógeno, assumem a função de suprimir as respostas de defesa desencadeadas por PTI, culminando em suscetibilidade desencadeada por efector (*Effector-Triggered Susceptibility* – ETS) (THOMMA; NURNBERGER; JOOSTEN, 2011).

Nos últimos anos vêm sendo proposto que a PTI em plantas é mediada via a ação do tráfico de vesículas, especialmente o endocítico. Neste, o reconhecimento de PAMPs na superfície celular é acompanhado pela invaginação da membrana plasmática acompanhada pela formação de uma vesícula que conduz a molécula derivada do patógeno através do sistema de endomembranas, para a degradação vacuolar. Contudo, diversos efetores usam a internalização celular do hospedeiro ao seu favor, já tendo sido comprovado que alvos destas proteínas secretadas pelo patógeno incluem a manipulação do tráfico endocítico através de reguladores de transporte subcelular, os quais contribuem para o sucesso da infecção (BEN KHALED; POSTMA; ROBATZEK, 2015).

Os efetores são moléculas difundidas entre uma série de parasitas, como, vírus, bactérias, fungos, oomicetos, nematóides e, ainda, insetos (QIAO et al., 2013). Conceitualmente, efetores são proteínas secretadas por patógenos e encarregadas por manipular o metabolismo celular, suprimindo respostas de defesa da planta, a fim de promover a infecção nas células hospedeiras. Algumas dessas moléculas, como toxinas, podem difundir até o seu sítio alvo, enquanto outros efetores, como proteínas, atuam na zona de infecção, seja fora das células hospedeiras ou ainda no

interior das mesmas (MACKEY; MCFALL, 2006). Ainda que se estime a função dessas moléculas associada estritamente ao potencial de patogênese, acredita-se que estas possam estar envolvidas ainda na facilitação de nutrientes para o crescimento do agente patogênico (BOZKURT, 2012).

As plantas hospedeiras, objetivando superar a ação das moléculas efetoras de patógenos, desenvolveram uma segunda camada de defesa. Nesta, os efetores secretados pelo patógeno são reconhecidos por receptores intracelulares do hospedeiro. Esta identificação conduz à imunidade desencadeada por efector (*Effector Triggered Immunity* – ETI). Apesar da semelhança entre as respostas das duas estratégias de defesa, ETI é significativamente mais rápida e culmina, na maioria das vezes, na chamada resposta de hipersensibilidade (*Hypersensitive Response* - HR) (DODDS; RATHJEN, 2010). A HR consiste em uma reação de defesa que induz necrose limitada em torno do local de penetração do patógeno, resultando na restrição da ação do agente microbiano e, conseqüente, inibição da infecção sistêmica na planta (THAKUR; SOHAL, 2013).

Uma vez tenha ocorrido o reconhecimento do patógeno pela planta, seja por PTI ou ETI, tem início uma resposta celular rápida envolvendo a síntese de moléculas sinalizadoras e precede a HR. Sinais típicos incluem fluxos de íons, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) (FEECHAN et al., 2015). A amplificação desses sinais é mediada por compostos secundários como ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET), culminando na ativação de fatores de transcrição, genes de defesa e, posteriormente, na resistência sistêmica adquirida ou resistência sistêmica induzida (GRANT; LAMB, 2006).

A síntese SA, em geral, sinaliza a expressão de proteínas relacionadas à patogênese (*pathogenesis-related* – PR), produção de ROS e morte celular localizada. Sendo esta desencadeada frequentemente frente a ação de agentes biotróficos (BOAVA et al., 2011a). Estudos genéticos ressaltam que uma série de genes está envolvida na via de transdução de sinal do SA. Entre estes genes, proteínas R típicas após o reconhecimento do patógeno ativam módulos de sinalização onde, EDS1 (*Enhanced Disease Susceptibility 1*) heterodimeriza com PAD4 (*Phytoalexin Deficient 4*) e ambos são induzidos por meio da infecção do patógeno e atuam modulando os níveis de SA (VAN VERK; BOL; LINTHORST, 2011). Simultaneamente, NDR1 forma um complexo com RAR1 (*required for Mla12 resistance 1*) e ambos desempenham papéis importantes para a indução de

resistência a doenças. Nesse contexto, HSP90 (*Heat shock protein*), uma chaperona molecular, forma um complexo com estas duas proteínas atuando na estabilização de proteínas R, contribuindo para o reconhecimento de efetores secretados pelo patógeno (SHIBATA; KAWAKITA; TAKEMOTO, 2011).

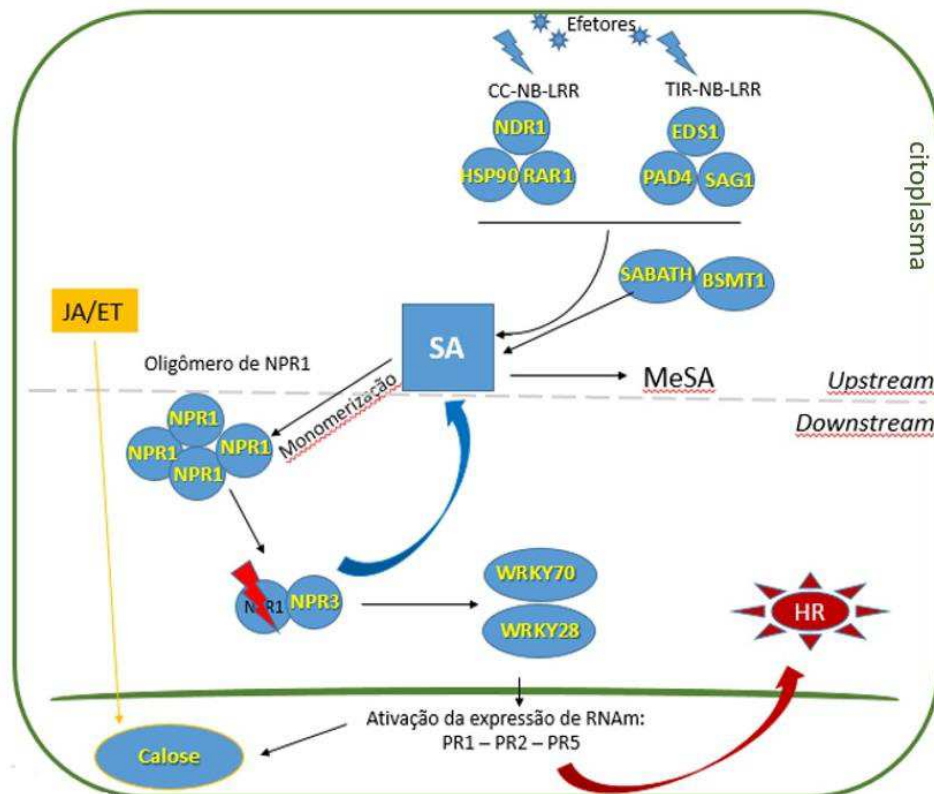
Ainda envolvido na via do SA está inclusa a família SABATH metiltransferases, que abrange enzimas que atuam na metilação do grupo carboxila de outras substâncias de crescimento como o SA, JA, e auxina (IAA) (VARBANOVA et al., 2007). BSMT1 (*SA carboxyl Methyltransferase*), um dos membros da família SABATH metiltransferases, tem sido demonstrado como atuando na conversão de SA para o seu metabólito MeSA, uma suposta forma de armazenamento intracelular de SA, o qual é induzido durante a infecção por patógenos (SONG et al., 2008). Contudo, segundo Loake e Grant (2007), MeSA isoladamente é ineficaz em induzir uma resposta de defesa, embora possa funcionar como uma molécula volátil sinalizadora.

Mediante o ataque do patógeno, a defesa da planta sinaliza o aumento de SA conduzindo a mudança do estado redox celular. Esta mudança é detectada pela proteína NPR1, regulador de genes de defesa, o qual sofre redução em sua estrutura e conseqüente liberação dos seus monômeros, os quais são translocados para o núcleo celular onde ativam a expressão de proteínas PR (TADA et al., 2008). Proteínas PR compreendem um grupo composto por 17 famílias, que são em sua maioria induzidas pela infecção por fitopatógenos. Entre elas, destacam-se aquelas pertencentes à família PR5 que tem atividade antifúngica e contra oomicetos (EL-KEREAMY et al., 2011). Durante o mecanismo em que SA controla NPR1, seus parálogos NPR3 e NPR4 ligam-se ao SA com diferentes afinidades, de maneira negativa e positiva, respectivamente. Onde NPR3, diante as elevadas concentrações de SA e sua baixa afinidade por ele, atua mediando a degradação da NPR1, a fim de liberar a supressão que esta exerce sobre a morte celular e, portanto, induzindo à HR (FU et al., 2012). Em suma, via de transdução de sinal do SA pode ser esquematizada de acordo com a figura 1.

Embora a ETI seja consideravelmente eficaz para irromper a infecção patogênica, a seleção natural imposta a isolados microbianos favoreceu com que efetores ineficazes fossem perdidos, alterados, ou ainda, que uma série de novos efetores, resultantes de mutações favoráveis, fossem adquiridos com capacidade de burlar a resposta de ETI (THOMMA; NURNBERGER; JOOSTEN, 2011). Portanto,

com base neste paradigma da interação planta-patógenos em “zig-zag”, patógenos bem-sucedidos evolutivamente, frente à ETI, desenvolveram múltiplos efetores aptos a invadir esta defesa do hospedeiro e exercer seu potencial virulento (JONES; DANGL, 2006).

Figura 1 – Modelo proposto para a via de transdução de sinais do SA. A percepção do patógeno pela célula hospedeira mediada por proteínas R como CC-NB-LRR e TIR-NB-LRR ativa módulos de sinalização mediados pelos complexos proteicos NDR1/RAR1/HSP90 e EDS1/PAD4/SAG1, os quais atuam na via *upstream* do SA, mediando mudanças a jusante nos níveis de SA. O acúmulo deste hormônio aumenta a toxicidade celular. A fim de promover a homeostase da célula, SABATH e BSMT1 atuam no metabolismo do SA convertendo parte dele em seu derivado volátil, MeSA. Em função do acúmulo de SA ocorre uma alteração no estado redox da célula, levando a redução da proteína NPR1 em seus monômeros. Em altas concentrações de SA, a proteína reguladora NPR3 atua *downstream* na via, se associando aos monômeros de NPR1 e mediando sua degradação. A superexpressão de fatores de transcrição do tipo WRKY70 e WRKY28 aumenta a expressão de genes PR, dependentes do SA. Além disso, mecanismos de acúmulo de calose podem ser estimulados pelo metabolismo do SA ou pelas vias do JA ou ET. Todos estes eventos da cascata do SA culminam, frequentemente, com a indução de HR.



Fonte: Baseado em Dandlen (2016) e Sartor (2015).

3.5 Interação citros-*P. parasitica*

Por se tratar de um patógeno de solo, a interação citros-*P. parasitica* tem sido estudada ao nível de espécie, utilizando o porta-enxerto tangerina ‘Sunki’

(*Citrus sunki* hort. ex Tanaka) como espécie suscetível e o porta-enxerto *P. trifoliata* como espécie resistente. Isto porque, assim como para outras pragas e patógenos, a suscetibilidade a doenças ocorre no gênero *Citrus* (CRISTOFANI et al., 2005; POMPEU JUNIOR, 2005). A resistência a gomose de *Phytophthora* é encontrada em um número restrito de plantas cítricas. Entre elas, *Poncirus trifoliata*, que embora pertença a um gênero diferente de *Citrus*, possui alta resistência. Híbridos de *P. trifoliata* também demonstram padrão semelhante quanto à resistência a gomose. Esta espécie consiste em um recurso valioso considerando a presença de diversos genes associados com características agronômicas relevantes, além de resistência a podridão de raízes de *Phytophthora*, e que podem contribuir em programas de melhoramento (CHEN et al., 2008). Entretanto, esta resistência ainda não está bem caracterizada ao nível molecular.

Neste contexto, estudos com ênfase na expressão diferencial de genes dentro desse patossistema vêm contribuindo significativamente para uma melhor compreensão dessa interação. Genes diferencialmente expressos foram caracterizados em porta enxertos suscetíveis e resistentes, *C. sunki* e *P. trifoliata*, mediante a inoculação com *P. parasitica* em estudos como de o Teixeira (2005). Neste, a autora observou que a inoculação do patógeno potencializou a expressão dos genes de defesa selecionados, *POX*, *LOX*, *PAL*, *PR2* e *PR5*, entre as duas espécies, contando com expressões mais rápidas e intensas em *P. trifoliata*. Boava et al. (2011a) também conduziram um estudo acerca desse patossistema analisando o comportamento de genes *PR*, *PAL*, *CHS*, *LOX* e *POX* envolvidos na defesa das plantas ao longo de tempos de interação. Os autores identificaram que estes genes foram regulados positivamente e significativamente em plantas de *P. trifoliata*. Por outro lado, genes como *PR5* e *CHS* foram regulados negativamente em *C. sunki* após interação com o patógeno. Os dados por eles encontrados forneceram candidatos promissores envolvidos na resposta de defesa mediante o ataque do patógeno. Faldoni et al. (2015) avaliaram genes diferencialmente expressos, *CHI*, *LOX*, *POX*, *GLU* e *CHS*, na interação citros-*P. parasitica*, e observaram que estes foram regulados positivamente diante a interação com o oomiceto mais intensamente na espécie resistente, *P. trifoliata*. Enquanto na espécie suscetível, Caipira sweet, a indução foi detectada significativamente apenas quando esta foi tratada com adubo orgânico.

3.6 Efeitores de *P. parasitica*: caracterização e modo de ação

A interação planta hospedeira-*Phytophthora* envolve uma vasta e intrincada rede de troca de sinais moleculares de ambos os envolvidos (CHANG; YAN; LIOU, 2015). Contudo, previamente a interação molecular ser estabelecida, o primeiro contato entre patógenos filamentosos (fungos e oomicetos) e a planta hospedeira consiste na penetração do tecido vegetal via cutícula ou parede celular. Este processo é caracteristicamente executado através de uma estrutura especializada no patógeno conhecida como apressório ou, ainda, por meio dos estômatos (GIRALDO; VALENT, 2013).

Muito embora a função do apressório esteja associada à adesão e penetração da célula hospedeira, sua atuação é proposta para uma atividade ainda mais refinada, a produção de efetores que modulam o controle nos tecidos da planta antes da entrada na célula. Uma vez no interior celular, a invasão biotrófica é realizada através de hifas biotróficas que, em algumas espécies, pode ser acompanhada pela formação de uma estrutura chamada haustório (YI; VALENT, 2013).

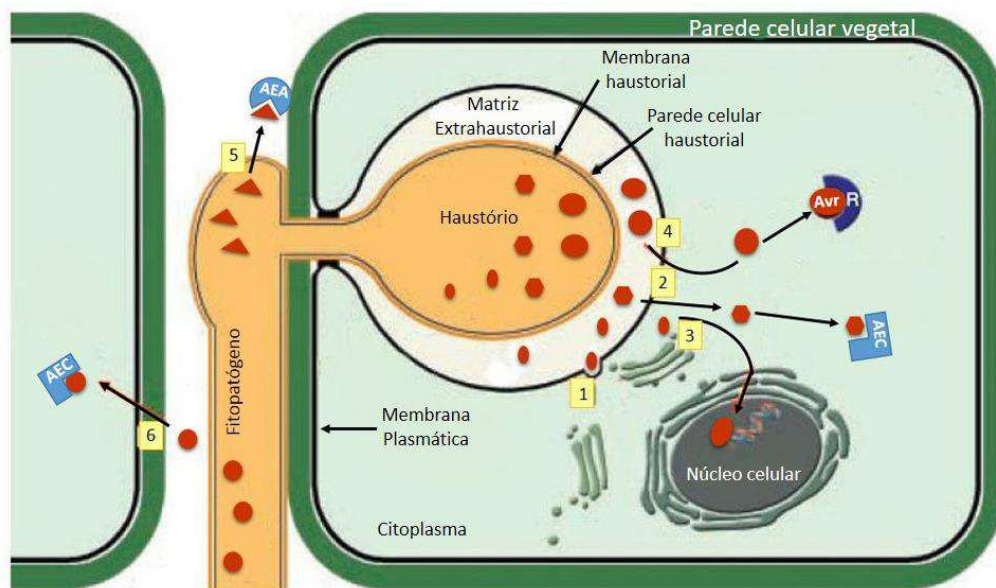
Hifas e haustórios são conhecidos como estruturas especializadas de infecção. Nos últimos anos, têm sido demonstrado o potencial de desenvolvimento de haustórios no interior da célula hospedeira e sua participação na expressão e secreção das moléculas de virulência, os efetores (WHISSON et al., 2007; RAFIQI et al., 2010). Attard et al. (2010) estudaram a interação entre *A. thaliana* e *P. parasitica* por meio de análise citológica, e relataram que a penetração do patógeno nas raízes da planta foi mediada pelo apressório. Adicionalmente, o desenvolvimento de haustório foi observado, por estes autores, a 24 h.a.i. (horas após inoculação) estando associado, até então, a fase de desenvolvimento biotrófica do patógeno. Em consonância a isto, Kebdani et al. (2010) demonstraram que a penetração de *P. parasitica* em epiderme de cebola e raiz de tomate foi mediada, em estágio precoce de 2-4 h.a.i., por apressório e foi comprovado um acúmulo na expressão de genes efetores durante a fase de desenvolvimento do apressório em ambos os hospedeiros.

Teorias e modelos de patogênese em oomicetos postulam que estes executam a colonização parasita de plantas por meio da manipulação do mecanismo de defesa das células hospedeiras, utilizando para isso a liberação de uma matriz de

proteínas efetoras (KAMOUN, 2006). Com base em sua atuação a nível subcelular, os efetores podem ser classificados em três tipos: apoplásticos (secretados via hifa ou apressório), citoplasmáticos (secretados via haustório) e nucleares.

Efetores apoplásticos atuam no espaço extracelular e supõe-se que este seja o primeiro tipo de efetor a ativar a imunidade da planta, agindo nos estágios iniciais de atividade do patógeno. Além disso, eles podem desempenhar um papel ainda mais relevante para o patógeno ao proteger a parede celular à medida que atua como agente de compostos antimicrobianos produzidos pela célula hospedeira. Por outro lado, os efetores citoplasmáticos atuam de maneira intermediária no processo de patogênese, no citoplasma eles podem ser direcionados para alvos específicos e desabilitar a imunidade intracelular do hospedeiro. Mais recentemente, estudos envolvendo a fusão de efetores com GFP demonstraram que certos tipos de efetores de fitopatógenos são localizados no núcleo das células. Neste caso, os efetores nucleares atuam de maneira crítica no processo de patogênese considerando que no núcleo da célula ocorrem processos metabólicos cruciais para o hospedeiro, e dessa forma, a interferência dos efetores pode desestabilizar criticamente a imunidade da planta (CHAUDHARI et al., 2014). Em suma, o método de ação dos efetores pode ser resumido conforme a Figura 2.

Figura 2 – Modo de ação de moléculas efetoras: Durante a infecção, o patógeno penetra a parede celular do hospedeiro por meio da invaginação da membrana plasmática acompanhada pelo desenvolvimento de haustório. Esta estrutura permanece separada do citoplasma celular por meio da parede haustorial, a qual é circundada por uma matrix extrahaustorial. Esta última, supostamente, desempenha um papel importante na patogenicidade, é onde os efetores segregados pelo oomicetos são acumulados e seletivamente direcionados para alvos específicos no interior celular. Moléculas efetoras ou atravessam diretamente a membrana extrahaustorial ou por meio de vesículas secretadas e direcionadas para o sistema de endomembranas (1). Uma vez no interior da célula hospedeira, os efetores citoplasmáticos podem atuar suprimindo respostas de defesa da planta, e conduzindo à suscetibilidade desencadeada por efetor (ETS), via ligação em alvos de efetores citoplasmáticos (AEC) (2). Além disso, podem atuar de maneira mais severa ao serem direcionados para o núcleo celular onde influenciam potencialmente a expressão gênica durante a infecção (3). Efetores reconhecidos por produtos de genes de resistência da planta são referenciados como proteínas de avirulência (Avr) culminando, frequentemente, com a resposta de hipersensibilidade (4). Moléculas efetoras podem ser segregadas ainda pelo apressório interagindo com alvos de efetores apoplásticos (AEA) (5) e atuando nos estágios iniciais de manipulação da célula hospedeira. Além disso, há registros de que o apressório pode secretar ainda efetores citoplasmáticos como os pertencentes à família RXLR (6).



Fonte: Adaptado de Catanzariti; Dodds; Ellis (2007); Win et al. (2012).

Muito embora ferramentas bioquímicas, biomoleculares e de engenharia genética venham contribuindo para o direcionamento, seja individual ou conjuntamente, na determinação de genes efetores em oomicetos, especialmente na última década, impulsionando a uma larga compreensão no ramo da caracterização de efetores de *Phytophthora*, apenas uma pequena parcela destas proteínas efetoras teve sua função molecular completamente elucidada (EVANGELISTI et al., 2013).

Nessa perspectiva, ainda que estudos recentes direcionem maior interesse em determinadas espécies do gênero *Phytophthora*, especialmente, *P. infestans* e

P. sojae (MENG et al., 2015), Attard et al. (2008) atentam para o fato de que estas duas espécies não são, de fato, representativas, haja visto que a primeira é um patógeno restrito ao tecido foliar, enquanto que a segunda é limitada a uma restrita relação de hospedeiros. Considerando que a maioria das espécies de *Phytophthora* é parasita radicular, *P. parasitica* vem se tornando um modelo referência em função de ser mais representativa para o gênero. Em consonância a isto, esta espécie tem recebido destaque em função do seu vasto espectro de hospedeiros. Sendo assim, a caracterização envolvendo a interação entre *P. parasitica* e seus anfitriões pode ser projetada efetivamente para outras espécies de oomicetos radiculares (LE BERRE; ENGLER; PANABIÈRES, 2008).

Estudos recentes, apoiados na utilização de ferramentas e métodos moleculares, contribuíram com o fornecimento de informações detalhadas acerca do patossistema de interação compatível entre efetores de *P. parasitica* e a planta modelo *Arabidopsis thaliana*. A descrição do modelo de ação patogênica do oomiceto é de suma importância no sentido de fornecer embasamento para o desenvolvimento de estratégias de controle de doença mais eficazes (MENG et al., 2015). Por outro lado, considerando a gama de hospedeiros que *P. parasitica* pode infectar, as possíveis particularidades inerentes à ação do patógeno e expressão diferencial de efetores, é necessário desenvolver estudos de interação com outras espécies passíveis de infecção, a fim de fornecer informações relevantes, em especial, para o controle da podridão de raízes e gomose de citros.

Pesquisas com ênfase no sistema de interação citros-*P. parasitica* ainda são restritas diante da importância econômica de doenças provocadas por *P. parasitica* na citricultura. Entre elas, Rosa et al. (2007) desenvolveram o primeiro relato sobre a expressão gênica global em *P. parasitica* dos citros. Neste, os autores utilizaram como base duas bibliotecas de cDNA, construídas a partir de duas diferentes condições de crescimento do patógeno *P. parasitica*, as quais estão incluídas no banco de dados do genoma funcional dos citros e seus patógenos, o CitEST (*Citrus Expressed Sequence Tags*), desenvolvido pelo Centro APTA Citros Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo de Campinas, Cordeirópolis SP. Rosa e colaboradores (2007) realizaram um agrupamento das ESTs a partir de CitEST/PP e, identificaram diversos genes que podem contribuir para os mecanismos de patogenicidade de *P. parasitica* em citros. Costa (2007), usando sequências fornecidas pelo CitEST/PP,

avaliou a expressão de genes efetores de *P. parasitica* que induzem respostas de defesa em plantas dentro de fases específicas do desenvolvimento do patógeno.

3.6.1 EFETORES APOPLÁSTICOS

Durante os estágios iniciais de invasão, oomicetos necessitam superar barreiras bioquímicas impostas pelo apoplasto das células hospedeiras. Nesse aspecto, três categorias de efetores apoplásticos foram caracterizadas: inibidores de enzima, peptídeos com motivo RGD (Arg-Gly-Asp) e toxinas (STASSEN; ACKERVEKEN, 2011).

Diversas plantas, frente a ação de agentes fitopatogênicos, expressam uma gama de genes em resposta, os quais estão incluídos uma vasta família conhecida como genes relacionados à patogênese. Entre os genes contemplados neste grupo, as enzimas mais bem estudadas são conhecidas como quitinases e β -1,3-glucanases, responsáveis por inibir o crescimento fúngico e de oomicetos, respectivamente (AMARAL et al., 2012). Contudo, oomicetos fitopatogênicos, como aqueles pertencentes à *Phytophthora*, evoluíram estratégias capazes de superar a defesa imposta pela atividade enzimática de proteínas hidrolíticas, por meio da secreção de uma série de efetores apoplásticos capazes de inibirem a sua atividade. Estas, portanto, compreendem a primeira classe de efetores apoplásticos, os chamados inibidores de enzima (BOZKURT et al., 2012).

Kamoun (2006) descreveu alguns inibidores de enzima entre espécies de *Phytophthora*. Entre eles, destacam-se inibidores de glucanase GIP1 e GIP2, ambos secretados por *P. sojae*, encarregados por bloquear a ação de β -1-3-glucanase derivada de soja. São mencionados ainda em seu catálogo inibidores de serina-protease, EPI1 e EPI10 e inibidores de cisteína protease, EPIC1 e EPIC2, caracterizados pelo seu potencial de inibir proteases de defesa sintetizadas pela planta hospedeira.

A segunda classe de efetores apoplásticos está associada a proteínas tipicamente contendo um motivo RGD, cuja função está relacionada a interferência entre parede celular e membrana plasmática da célula hospedeira. O exemplo melhor descrito até o momento é a chamada proteína IPI-O de *P. infestans*, demonstrada por estabelecer a ligação do seu motivo RGD ao receptor de lectina LecRK-1.9 de *A. thaliana*, resultando na interferência da integridade entre parece

celular hospedeira e membrana plasmática, facilitando subsequentemente a infecção (WAWRA et al., 2012). Bouwmeester et al., (2011), comprovaram em seu estudo que IPI-O rompe a aderência entre parece celular e membrana plasmática compreendendo, portanto, uma das estratégias de *Phytophthora* para irromper a infecção aumentando a suscetibilidade de *A. thaliana* à doença.

A terceira estratégia de ataque usada pelos oomicetos fitopatogênicos, entre os efetores apoplásticos, é feita mediante a secreção de toxinas. Existem duas famílias de proteínas tóxicas sintetizadas por esses patógenos: proteínas PcF/SCR e proteínas do tipo NEP1 (*Nep1-Like Proteins*, NLPs). NLPs são melhores descritas entre diversas espécies, especialmente aquelas do gênero *Phytophthora*. Sua função está estritamente associada à indução de morte celular, ou necrose, em hospedeiros (STASSEN; ACKERVEKEN, 2011).

Proteínas dessa família contam com uma distribuição relevante entre espécies de *Phytophthora*, entre elas NPP1 de *P. parasitica*, PsojNIP de *P. sojae*, e PiNPP1 de *P. infestans*. Foi relatado ainda por Stassen e Ackerveken (2011) que a proteína tóxica NLPPp, por exemplo, produzida por *P. parasitica* pode desencadear morte celular em dicotiledôneas. Kebdani et al. (2010) desenvolveram uma análise molecular referente à interação entre *P. parasitica* e raiz de tomate. A biblioteca de cDNA construída por eles a partir da fase de penetração apresentou sequências de genes, apoplásticos e citoplasmáticos, abundantes associados à fase de patogenicidade, incluindo proteínas do tipo Nep1, onde foi sugerido que este gene pode ser expresso precocemente durante a interação.

Ainda no grupo de efetores apoplásticos destacam-se CBEL e elicitor. CBEL (*Cellulose Binding Elicitor Lectin*) uma glicoproteína de 34kDa que foi purificada pela primeira vez a partir de *P. parasitica* var. *nicotianae* (SÉJALON-DELMAS et al. 1997). Caracteristicamente, essa glicoproteína não enzimática é constituída por dois CBDs (domínios de ligação à celulose) e dois domínios nomeados de PAN/APPLE descritos com função ligar a estrutura cristalina de celulose (MARTINEZ et al., 2015). Considerando a importância da adesão de microrganismos a superfície celular em interações parasitárias, bem como de comprovar a participação de CBEL na adesão de *P. parasitica* a superfícies celulósicas, Gaulin et al. (2002) realizaram experimentos de genética reversa pela geração de isolados de *P. parasitica* suprimidos quanto a expressão de genes CBEL, os quais foram incapazes de formar agregados miceliais quando cultivados *in vitro* sobre membrana de celofane e fibras

de celulose. Os autores apontaram a relevância dessa glicoproteína na diferenciação morfológica e adesão de *P. parasitica* em resposta a esses substratos.

CBEL além de possuir função comprovada na aderência do micélio em substratos celulósicos na planta, possui em sua constituição dois domínios de ligação à celulose (CBDs) os quais foram estipulados por Gaulin et al., (2006) como PMAPs suficientes para estimular respostas de defesa na planta e ativar PTI. Os referidos pesquisadores analisaram por meio de infiltração em folhas de *Nicotiana tabacum*, que a produção de CBEL por *E. coli* via expressão heteróloga desencadeou lesões de necrose e a expressão de genes de defesa em planta. Por outro lado, foi observado por eles que mutações em cada um dos CBDs de CBEL reduziu consideravelmente a indução de necrose. Assim, os autores reafirmaram o papel da integridade desses constituintes deve ser mantida para que seja efetivada sua atividade de elicitor na defesa na planta.

Elicitinas são pequenas proteínas extracelulares altamente conservadas entre o gênero *Phytophthora*, secretadas também por espécies de *Phytium*. Sua função foi classicamente avaliada usando como planta modelo *N. tabacum*. Durante interação com esta espécie foi possível inferir às elicitinas o papel de associação ao acúmulo de proteínas PR na planta, indução de resposta de hipersensibilidade (HR), além de atuação como ativador de resistência sistêmica adquirida (SAR) (YU, 1995). Kamoun et al. (1993), por exemplo, conduziram a expressão transiente de uma elicitina, *parA1*, de *P. parasitica* em folhas de tabaco e verificaram a capacidade de indução de necrose resultante dessa expressão. Por outro lado, Kamoun et al. (1997) identificaram que a expressão de uma elicitina de *P. infestans*, *inf1*, em nove espécies de *Solanaceae* foi *down*-regulada, indicando uma possível não participação no desencadeamento da doença entre essas espécies. Contudo, quando os autores realizaram a expressão em folhas de tabaco houve indução de necrose, resposta interpretada por eles como sendo resultado do reconhecimento dessa elicitina por tabaco corresponde a um componente de defesa contra *P. infestans*.

3.6.2 EFETORES CITOPLASMÁTICOS

Adicionalmente aos efetores apoplásticos, ou extracelulares, oomicetos aumentam seu potencial de infecção em células hospedeiras por meio da secreção

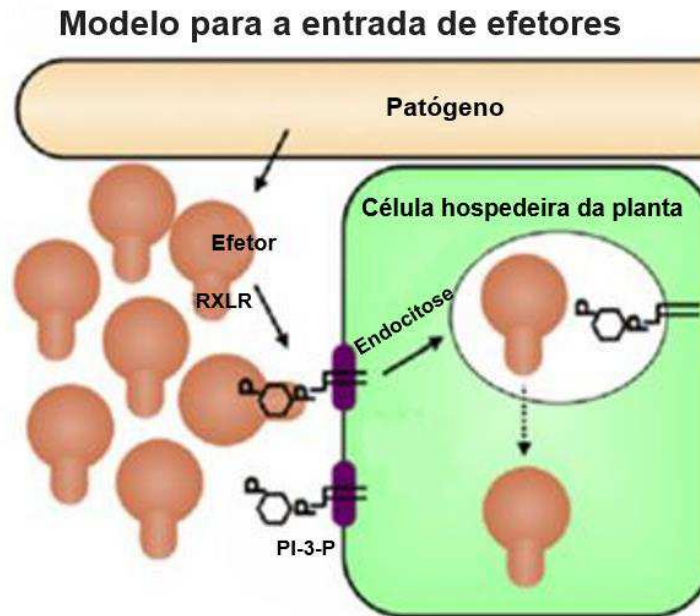
de efetores citoplasmáticos, os quais são direcionados para o citoplasma na intenção de manipular defesas provenientes do espaço intracelular.

Efetores citoplasmáticos estão agrupados em duas classes distintas. A primeira consiste nos efetores RXLR (onde X representa um aminoácido qualquer e os outros, respectivamente, Arginina, Leucina e Arginina) os quais são caracterizados por possuírem um domínio N-terminal, um motivo do tipo RXLR, um motivo de aminoácidos opcional e um domínio efector C-terminal (HARDHAM; CAHILL, 2010). Efetores RXLR evidenciam poucas semelhanças entre as sequências de diversas espécies de *Phytophthora* até o momento sequenciadas (STASSEN; ACKERVEKEN, 2011). Quanto à distribuição filogenética, RXLR encontra-se restrito a espécies de *Phytophthora* contando com limitada representação entre *Pythium* e, possivelmente, ausência em genomas de outros patógenos (BOZKURT, 2012). Estima-se que apenas em *P. infestans* existam 563 efetores do tipo RXLR (HAAS, 2009).

Birch et al. (2008) ressaltaram que efetores RXLR estão envolvidos na supressão do PTI e desencadeamento do ETI e, existem características em comum no mecanismo de translocação entre RXLXE/D/Q do *Plasmodium* e RXLR derivados de oomicetos. Foi demonstrado por estes autores que, durante a secreção dessas proteínas efectoras na matriz extrahaustorial, o motivo RXLR foi necessário para a translocação dentro de células hospedeiras. Demonstrou-se ainda que funções distintas foram associadas as regiões estruturais dos efetores RXLR, onde o domínio N-terminal foi relacionado a secreção e translocação, enquanto que o domínio C-terminal encarrega-se da modulação de respostas por parte da célula hospedeira.

O mecanismo molecular de translocação de proteínas RXLR elucidado propõe que a endocitose desses efetores de oomicetos é mediada por meio de ligação a um receptor de lipídeos, fosfatidilinositol-3-fosfato (PI-3-P). A hipótese de que a ligação entre RXLR e PI3P medeia a entrada de oomicetos em células vegetais hospedeiras foi reforçada diante do fato de que mutações testadas em RXLR inibiu a ligação à PI3P e conseqüente entrada nas células alvo (KALE et al., 2010). Este mecanismo foi esquematizado por Kale et al. (2010) (Figura 3).

Figura 3 – Modelo de entrada de efetores em célula vegetal hospedeira: A ligação mediada pelo domínio RXLR ao PI-3-P conduz a entrada, via endocitose, das proteínas efetoras. A estratégia usada pelos efetores para escapar dos endossomos permanece desconhecida.



Fonte: Traduzido de Kale et al. (2010).

Attard et al. (2014) avaliaram a expressão de enzimas de degradação de parede celular (CWDEs) e proteínas efetoras de *P. parasitica* durante a infecção em raízes de *A. thaliana*. Apesar de efetores RXLR estarem caracterizados, *a priori*, como sendo expressos preferencialmente no citoplasma por meio de haustórios, foi observado por estes autores que doze dos genes avaliados acumularam-se durante os estágios iniciais de penetração do patógeno. Entre estes, o gene CL380 foi selecionado por ter sido intensamente expresso na fase de penetração e utilizado para fusão com GFP. A fluorescência de GFP foi acompanhada durante o período de 2 a 30 h.a.i. em raízes, onde Attard e colaboradores (2014) puderam verificar que o gene que codifica CL380 RXLR foi transitoriamente expresso durante a infecção, contando com maior expressão durante o estágio de penetração. Além disso, os referidos autores sugeriram que apressórios poderiam funcionar não apenas como estruturas de penetração na célula, como também atuarem na secreção de efetores citoplasmáticos do tipo RXLR.

Sob a perspectiva de caracterização funcional de efetores RXLR, Evangelisti et al. (2013) avaliaram o papel do Efetor 1 de Penetração Específica (PSE1) de *P. parasitica* no patossistema com *A. thaliana*. Em corroboração ao

trabalho anteriormente descrito, os autores puderam identificar uma acumulação transiente de PSE1 nos estágios iniciais de infecção, especialmente na fase de penetração mediada por apressório (2,5 h.a.i.) e durante o processo de penetração (6 h.a.i.). De acordo com os autores, a expressão de PSE1 em *A. thaliana* perturbou o desenvolvimento das plantas ao modular localmente o teor de auxina das raízes durante o estágio de penetração. Além disso, foi sugerido que efetores da família RXLR poderiam agir inclusive sobre hormônios vegetais a fim de aumentar a sua suscetibilidade à *P. parasitica*.

A segunda classe de efetores abrange os chamados Crinklers (CRN). O nome atribuído ao grupo deriva dos fenótipos de enrugamento (*crinkling*) e necrose desencadeados em folhas após sua expressão (WAWRA, 2012). Identificados pela primeira vez como sendo expressos em *P. infestans*, atualmente efetores CRN encontram-se expandidos entre muitas espécies de *Phytophthora* sequenciadas e quantidades inferiores entre outros oomicetos fitopatogênicos (BOZKURT, 2012). Estruturalmente, efetores CRN partilham semelhanças RXLR compreendendo uma região conservada N-terminal (Leu-Xaa-Leu-Fen-Leu-Ala-Lys – LxLFLAK)), seguido por um tripeptídeo (Asp-Trp-Leu – DWL) e terminando com uma região C-terminal altamente conservada (His-Val-Leu-Val-Xaa-Xaa-Pro – HVLVXXP) (WAWRA, 2012).

Efetores citoplasmáticos CRN foram originalmente identificados a partir de transcritos de *P. infestans* que codificam peptídeos indutores de necrose em planta. A análise do genoma de *P. infestans* revelou uma grande família correspondendo a 196 genes CRN, quando comparada as sequências determinadas para *P. sojae* (100 CRNs) e *P. ramorum* (19 CRNs). Muitas vezes, genes CRNs clusterizam no genoma incluindo muitos genes e pseudogenes. E apesar dos números expressivos, pouco se conhece sobre as funções desses genes durante o processo de interação (HAAS, 2009).

Talvez em função de sua descoberta posteriormente aos efetores RKLR, os efetores da família CRN estão em fase de avanço acerca da elucidação do seu mecanismo funcional. Em um dos trabalhos pioneiros, Tyler (2009) descreveu um impasse na determinação de qual o papel de efetores CRN na virulência do patógeno, haja vista que tomando como premissa o fato de que sua expressão induz necrose em folhas, como tal sintoma seria usado em benefício de patógeno biotrófico e, ainda, havia a possibilidade desse esse resultado ser uma resposta de defesa do hospedeiro frente à detecção do efetor.

Como os efetores RXLR, o domínio C-terminal dos efetores CRN é amplamente variado e, estima-se que ele consiste na sequência de acolhimento nuclear e/ou indução de morte celular durante a expressão no interior de células vegetais hospedeiras (STASSEN; ACKERVEKEN, 2011). Schornack et al. (2010) comprovaram o papel do domínio N terminal de efetores CRN de *P. infestans* em mediar a sua translocação para dentro da célula. Além disso, atribuíram ao domínio C terminal a atuação determinante de possuir como alvo o compartimento nuclear do hospedeiro. Para isto, os autores utilizaram agroinfiltração para identificar a localização subcelular de efetores CRN por meio de fusões com GFP via expressão em folhas de *N. benthamiana*. Por meio de microscopia confocal realizada 24 h.a.i., Schornack e colaboradores (2010) demonstraram que as cinco proteínas CRN avaliadas se acumularam especificamente no núcleo celular, evidenciando assim, que distintos domínios C terminal possuem como alvo compartimentos nucleares vegetais. Essa localização foi determinante para a indução da morte celular durante a infecção, fato este comprovado via inibição do acúmulo de efetores CRN no núcleo, o qual preveniu a ativação da morte celular (SCHORNACK et al., 2010).

Rajput et al. (2015) ressaltaram que embora tais efetores estejam associados predominantemente com a indução de necrose, há uma parcela de CRNs que podem atuar inibindo a morte celular desencadeada por PAMPs. Nessa perspectiva, estes autores testaram o papel de um efetor do tipo CRN, PsCRN, de *P. sojae* durante a infecção em plantas de *N. benthamiana* e comprovaram que a expressão desse efetor inibiu a morte celular provocada por diversos indutores, entre eles BAX, efetor RxLR de *P. sojae* Avh241, efetor CRN PsCRN63 e proteína indutora de necrose PsojNIP. Para Rajput e colegas (2015), a ação do efetor PsCRN em suprimir a morte celular deve ter consequentemente beneficiado a atividade de virulência de *P. sojae*, durante a fase biotrófica, em infectar a planta hospedeira

3.7 Bases para estudos em expressão gênica

No âmbito da Biologia Molecular, um Dogma Central define que o fluxo da informação genética dentro da célula ocorre no sentido DNA → RNA → Proteína. Esse conceito estabelece que, o DNA não direciona a síntese proteica diretamente, mas necessita do RNA como molécula intermediária (MALAJOVICH, 2012). Nesse

contexto, a expressão gênica pode ser definida como o processo responsável pelo aumento ou redução da produção dos produtos finais derivados dos genes de um organismo. Contudo, uma exceção escapa a esse modelo básico, os chamados retrovírus possuem o seu genoma constituído por uma molécula de RNA. Esses vírus realizam a transcrição reversa através da ação da enzima chamada transcriptase reversa (*Reverse Transcriptase* - RT), por meio da qual o RNA é convertido em DNA. A descoberta desse mecanismo em retrovírus proporcionou avanços na Biologia Molecular através da aplicação da enzima RT em diversas técnicas (TURNER et al., 2004).

As moléculas de RNA são sintetizadas a partir do molde de DNA por meio do processo de transcrição. Contudo, a transcrição não é feita a partir da sequência contínua de DNA, mas sim com base em sequências específicas, chamadas de genes. Sequências regulatórias contidas nos genes do DNA determinam quais e em que intensidade determinadas sequências deve ser transcritas, com base em sua necessidade. O RNAm, transcrito, então direciona a síntese de proteínas na célula. Dependendo da célula ou do momento ao qual ela esteja submetida, os genes podem dirigir a transcrição de RNA em elevadas quantidades, ou ainda sua transcrição pode ser limitada ou inibida completamente (ZAHA et al., 2003).

O mecanismo de controle da expressão gênica é tido como um dos mais relevantes para o desenvolvimento dos seres vivos, considerando que todas as células de um organismo possuem o mesmo material genético, a regulação do processo de expressão permite, por exemplo, que as células se diferenciem em tecidos específicos com funções definidas e capazes de responder a estímulos diferentes (MARTINS; MACIEL FILHO, 2010).

O emprego atual de tecnologias de sequenciamento em adição ao fato de genomas completos de diversas espécies estarem disponíveis em bancos de dados, vem despertando interesse crescente para o estudo dos genomas com ênfase na análise funcional de genes e proteínas por eles codificadas. As pesquisas em expressão gênica estão focadas na identificação de onde, como, quando e quanto os genes no DNA são expressos durante o desenvolvimento de uma espécie e, ainda, a variação em sua síntese quando os organismos estão submetidos à ação de fatores bióticos ou abióticos (MORGANTE et al., 2009).

A função metabólica dos genes pode ser identificada mediante a utilização de enfoques específicos no estudo da expressão. Nessa perspectiva, a análise da

expressão temporal é um aspecto preliminar relevante na genômica funcional, por meio dele é possível identificar e caracterizar o nível e variação entre as funções gênicas sob diferentes tempos (JUNIOR; BENEDITO; FIGUEIRA, 2004). Além deste enfoque, a expressão comparativa possibilita analisar a expressão gênica diferencial em órgãos/tecidos de um organismo quando submetidos a condições diferentes, como estresse hídrico, visando identificar a resposta gênica associada ao estresse (CASAGRANDE et al., 2001). Adicionalmente, a expressão heteróloga permite analisar o efeito da expressão de um gene específico de alguma espécie de interesse em um organismo hospedeiro, podendo ser conduzida *in vitro* ou *in planta*.

A expressão gênica pode estudada em níveis de RNAs transcritos ou de proteínas produzidas. A etapa primordial para estudos envolvendo a expressão gênica ao nível consiste na análise da transcrição do gene (ou genes) de interesse em RNAm. Os métodos mais comumente utilizados para análises dos RNAs obtidos consistem em *Northern blotting*, microarranjos (*microarray*) e RT-PCR (*RT – Polymerase Chain Reaction*) (YAN; LIOU, 2006), os quais são considerados métodos qualitativos.

O método *Northern blotting* é considerado padrão para detecção de níveis de RNAm em nível qualitativo, possibilita a obtenção de informações acerca do tamanho do transcrito, sua abundância, e presença de processamento (*splicing*) alternativo em transcritos. Além de permitir o modo de expressão gênica tecido-específico. As análises qualitativas do nível de expressão do gene de interesse são feitas por meio da comparação entre a intensidade de radioatividade das bandas geradas, pelo método de eletroforese (MACEDO; LOPES; DAMALO, 2010). Contudo, mesmo sendo um método robusto e preciso, não possui a eficiência e rapidez fundamentais para acompanhar o ritmo acelerado de sequenciamento, visto que só pode-se analisar a expressão de um único gene por vez (JUNIOR; BENEDITO; FIGUEIRA, 2004).

Os microarranjos representam um método baseado em hibridização utilizado extensamente para a análise de transcritos em diversos organismos. Embora sua utilização esteja restrita apenas as espécies que possuem sequenciamento genômico completo ou ainda grandes quantidades de cDNA ou ESTs disponíveis. Ao contrário do método anterior, este possui a vantagem de analisar conjuntamente uma quantidade significativa de transcritos (até 50000). Contudo, apesar da sua eficiência e praticidade, suas principais limitações consistem no alto custo de

equipamentos e devido à restrição de análise para apenas frações sequenciadas dos genes ou ESTs poderem ser analisadas (JUNIOR; BENEDITO; FIGUEIRA, 2004).

A técnica de PCR conhecida como RT-PCR (é formada por duas etapas: inicialmente, o processo de transcrição reversa do RNA em cDNA e, logo após, a PCR propriamente dita. Para realizar esse método são requeridos os seguintes componentes, DNA molde que contenha a sequência que se deseja amplificar, os quatro desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), a enzima DNA polimerase e os *primers*, ou iniciadores, da sequência de interesse (MALAJOVICH, 2012). A vantagem da técnica RT-PCR para empregabilidade em estudo de expressão gênica define-se em função de que apenas a região codificadora de um gene eucarioto pode ser eficientemente obtida. Além disso, esse procedimento possibilita a obtenção de milhares de cópias de uma mesma sequência em pouco tempo, fato este que contribui para a sua versatilidade entre as mais variadas áreas da agricultura a medicina forense (MACEDO; LOPES; DAMALO, 2010; MALAJOVICH, 2012).

A maior precisão em estudos de expressão gênica tem sido proporcionada pela técnica de RT-qPCR (*Reverse Transcriptase – quantitative Polymerase Chain Reaction*), a qual executa a quantificação das amostras de RNA amplificadas em estudo de forma precisa e com acurada reprodutibilidade em tempo real, pois identifica valores durante a fase exponencial da reação, em contraste com a PCR convencional que fornece apenas resultados qualitativos. O sucesso dessa técnica em estudos sobre expressão gênica pode ser justificado devido a capacidade de determinar RNAs específicos, além de sua quantificação, possibilitando estudos de expressão diferencial, nos quais genes de um determinado organismo demonstram alteração em sua expressão quando submetidos a uma determinada condição. Soma-se a isso ainda a facilidade na quantificação, maior precisão, agilidade de análise e melhor controle de qualidade no processo (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; BUTTOW; BONOW, 2013).

4 METODOLOGIA

4.1 Condições de cultivo do isolado patogênico *P. parasitica*, e bioensaio de inoculação

A realização dos bioensaios de inoculação do patógeno em raízes de citros envolveu a produção de zoósporos, a inoculação das plantas e, subsequentemente, extrações de RNA, etapas que foram conduzidas por MÁXIMO et al. (Dados não publicados), descritas como segue: O isolado IAC 01-95 de *P. parasitica* foi cultivado no Laboratório de Micologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo de Campinas, Cordeirópolis – SP. O cultivo do patógeno foi realizado em Placas de Petri contendo meio cenoura-ágar (CA) autoclavado (500 mL de água destilada, 100 g de cenoura e 10g de ágar) e mantido no escuro a temperatura ambiente (25 °C). Onde, inicialmente, a indução de zoósporos foi realizada após a colônia ter atingido até 80% das placas, estágio no qual o desenvolvimento de esporângios foi conduzido mediante a adição de água destilada autoclavada na placa, a qual foi substituída diariamente durante uma semana. Após sete dias, a liberação de zoósporos foi induzida via submissão das placas de Petri a 4 °C durante uma hora. A quantidade de zoósporos lançada foi gravada utilizando uma câmara de Neubauer e a suspensão de zoósporos foi ajustada para 1×10^5 zoósporos por mililitro.

Sementes de *C. sunki* e *P. trifoliata* foram semeadas em substrato estéril e mantidas durante 3 meses em estufa. Após este período as plantas foram submetidas ao bioensaio de interação, onde, primeiramente as plântulas foram cuidadosamente removidas dos recipientes e tiveram, subsequentemente, suas raízes enxaguadas e imersas em tubos Falcon contendo 50 ml de água autoclavada e selada com Parafilm. A inoculação das raízes foi conduzida por meio da adição de 1×10^5 zoósporos (por planta) à água contida nos tubos. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento a 20°C e fotoperíodo de 12 horas. Objetivando identificar a expressão temporal e comparativa de genes relacionados à defesa e ao ataque na interação citros *versus P. parasitica*, as amostras foram divididas em tratamentos, de acordo com os tempos de coleta, sendo 0, 3, 6, 12, 24, 48, e 96 h.a.i. Após o ato da coleta, as amostras foram submetidas à etapa de extração de RNA.

4.2 Extração de RNA

Para a extração do RNA total, 50 mg de raízes infectadas foram maceradas em nitrogênio líquido utilizando um almofariz e pistilo. O RNA total foi extraído utilizando o kit de purificação de RNA MasterPure Planta (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA) seguindo as instruções do fabricante, incluindo o tratamento com DNase I.

As amostras de RNA extraídas a partir das raízes infectadas de *C. sunki* e *P. trifoliata* com *P. parasitica* nos diferentes pontos temporais de interação foram submetidas a análises de concentração e pureza usando espectrofotômetro (NanoDrop 8000, Thermo Scientific). Cada amostra contou com três repetições biológicas. Todas as amostras apresentaram concentrações superiores a 500 ng/ μ L. No que diz respeito à avaliação de pureza, todas obtiveram relações de absorbância A260/ A280 e A260/A230 com valores entre 1,8 e 2,1 (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Concentração e pureza das amostras de RNA obtidas a partir das raízes infectadas de *C. sunki*.

Amostras		RNA total		
Tempo de Interação (h.a.i.)	Repetição	ng/ μ L	A260/280	A260/230
0	1	1407	2,07	2,11
	2	1286	2,10	2,12
	3	1154	2,04	2,05
3	1	1682	2,09	2,19
	2	1712	2,02	2,09
	3	1525	2,06	2,13
6	1	1091	2,11	2,08
	2	1046	2,11	2,10
	3	1396	2,10	2,09
12	1	1223	1,85	1,81
	2	1829	2,04	2,07
	3	1384	2,03	2,08
24	1	889,2	2,03	2,03
	2	1102	2,07	2,04
	3	717,3	2,01	2,08
48	1	1141	2,06	2,01
	2	1019	1,98	2,07
	3	1065	2,01	2,08
96	1	963	2,01	2,07
	2	900,1	1,98	2,01
	3	889,1	1,99	1,98

Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 2 – Concentração e pureza das amostras de RNA obtidas a partir das raízes infectadas de *P. trifoliata*.

Amostras		RNA total		
Tempo de Interação (h.a.i.)	Repetição	ng/ μ L	A260/280	A260/230
0	1	2384	2,05	2,09
	2	1098	2,04	2,05
	3	1296	2,06	2,05
3	1	1074	2,05	2,09
	2	1047	2,05	2,08
	3	1050	2,04	2,06
6	1	1453	2,10	2,07
	2	1260	2,11	2,05
	3	1338	2,07	2,07
12	1	1111	2,05	2,08
	2	1294	2,04	2,03
	3	843,6	2,06	2,05
24	1	664	2,13	1,92
	2	606,3	1,96	1,88
	3	708,2	2,06	2,09
48	1	1294	2,11	2,04
	2	1232	2,02	2,08
	3	1215	2,04	2,11
96	1	1169	2,01	2,03
	2	1339	2,03	2,11
	3	1191	2,04	2,10

Fonte: dados da pesquisa.

4.3 Microscopia

Amostras da ponta das raízes infectadas de *C. sunki* e *P. trifoliata* por *P. parasitica* foram coletadas no tempo de 96 h.a.i. e fixadas em solução de Karnovsky (2% de paraformaldeído; 2,5% de glutaraldeído em tampão de fosfato 0,1 M, pH 7,4). Após três dias, as amostras foram lavadas em tampão de fosfato (pH 7,4) e embebidas em parafina histológica. As estacas foram processadas em micrótomo (cortes longitudinais - 1 nM), coradas com azul de toluidina (solução a 0,05%, pH

6,0) durante oito minutos e, posteriormente, analisadas e fotodocumentadas em microscopia de luz.

4.4 Síntese de cDNA e RT-qPCR

Para a síntese de cDNA foi utilizado 1 µg de RNA total obtido a partir de cada amostra com *primers* oligo-dT e a enzima transcriptase reversa M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) do kit de síntese de cDNA de primeira cadeia (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA).

A análise da expressão gênica por RT-qPCR foi realizada em sistema de detecção de sequências ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems), de acordo com os procedimentos padrões fornecidos pelo fabricante. As amostras de RNA usadas para RT-qPCR foram obtidas a partir de três replicatas biológicas obtidas nos diferentes *time points*. Os experimentos de RT-qPCR foram realizados usando uma diluição 1:20 de cDNA (0,05 µg) de primeira cadeia com os produtos químicos da Absolute SYBRGreen ROX (ABgene, Hamburg, Germany) e realizando 40 ciclos de desnaturação a 94 ° C durante 30 s, hibridação a 60 ° C durante 30 s e extensão a 72 ° C durante 30 s. O método de quantificação aplicado foi o de curva padrão, o qual é utilizado para a determinação da quantificação absoluta da expressão gênica nas amostras.

Os genes que codificam para uma enzima de conjugação de ubiquitina (UBC) e uma proteína ribossomal S3A (WS21) foram selecionados como controle endógeno para os ensaios de expressão gênica do oomiceto *P. parasitica* (YAN; LIOU, 2006). Os genes que codificam as proteínas GAPC2, *EgIDH* e *DIM1* foram selecionados como controle endógeno para os ensaios com *C. sunki* e *Cyclo*, *FBOX* e *GAPC2* para *P. trifoliata*. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata.

De modo geral, a confiabilidade dos dados desta análise está de acordo com os critérios da MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN et al., 2009), especialmente quanto a obtenção criteriosa de RNAs a partir de todas as amostras coletadas da interação citros-*P. parasitica*; para as quais foram obtidas concentrações superiores ao valor mínimo ideal estipulado de 500 ng/µL (ASIF et al., 2006), bem como relações de absorvância A260/ A280 e A260/A230 com valores entre 1,8 e 2,1, indicativos de alta qualidade e pureza por descontaminação das amostras por polissacarídeos e

proteínas, respectivamente (LOGEMANN; SCHELL; WILLMITZER, 1987; MANNING, 1991).

4.5 Desenho de *primers*

As sequências de nucleotídeos que codificam proteínas candidatas à efetores apoplásticos NPP1, Elicitina e CBEL foram obtidas por meio de comparação do genoma do isolado virulento IAC 01-95 com sequências caracterizadas na literatura de *P. parasitica* via BlastP (*Basic Local Alignment Search Tool*). Em seguida, as sequências selecionadas foram submetidas as seguintes ferramentas de bioinformática: SignalP 3.0 para predizer a presença de peptídeo sinal, um marcador de segregação da proteína (essencial para efetores), TMHMM v. 2.0 para predizer a presença de domínio transmembrana e, por fim, GPI-SOM a fim de predizer a presença de domínio de ancoragem.

As sequências de efetores citoplasmáticos RXLR e CRN foram selecionadas a partir candidatos a efetores de *P. parasitica* identificados e descritos previamente, sendo os primeiros selecionados a partir de um espectro de 171 candidatos a efetores RXLR (DALIO et al., 2014). Estas sequências escolhidas foram então submetidas a uma ferramenta adicional, chamada cNLS Mapper, a qual possibilita a predição de sinais de localização nuclear da proteína.

O desenho de *primers* foi conduzido usando o *software* Primer3Plus. Oligonucleotídeos específicos para os genes CRN, RXLR, NPP1, Elicitina, e CBEL foram desenhados obedecendo aos seguintes parâmetros: Amplicons entre 70-200 pares de base (pb); Tamanho adequado do *primer* entre 18-24 nucleotídeos; conteúdo de G/C no range de 45-55% e temperatura de anelamento de 59-61°C. A síntese foi feita pela Exxtend (<http://www.exxtend.com.br/site/>), e as sequências estão descritas na Tabela 3. Por fim, após a obtenção dos pares de oligonucleotídeos, suas sequências foram submetidas ainda a ferramenta *primer blast*, do NCBI, para a verificação de especificidade de anelamento do *primer* apenas para o gene de interesse.

Tabela 3 – *Primers* utilizados nas reações de RT-qPCR para genes candidatos a efetores de *P. parasitica*.

Gene	Descrição	Sequência do primer (5'–3')	Tm (°C)	Amplicon (pb)
NPP101	<i>Npp1-like protein</i>	Fw AACGAAAACCCCTGAACCTT	59.8	108
		Rv GAAGTTGCTACCGCTTCGTC	60.0	
NPP102	<i>Npp1-like protein</i>	Fw CTCGATAACCCCAGCATTGT	60	134
		Rv TCGAGGATCACCCAGCTAGT	59.8	
NPP103	<i>Npp1-like protein</i>	Fw AGTTCAAACCGCAGATCCAC	60.1	171
		Rv AGACGCCATTGTACGTAGCC	60.2	
NPP104	<i>Npp1-like protein</i>	Fw GCCCATAACGGCTACACAGT	60	102
		Rv GGCGTGATTGATCAGCAGTA	59.8	
CBEL01	<i>cellulose-binding domain</i>	Fw ATCAACGAGAACCCTGATGG	59.9	170
		Rv CAGCAAGTTGGGCCACTATT	60.1	
CBEL02	<i>cellulose-binding domain</i>	Fw TTTCTTGGCACAATGAGCAG	60	152
		Rv CTACTGTCAGCCGTGGAACA	59.9	
CBEL03	<i>cellulose-binding domain</i>	Fw TGCTTGTCAACTAGCGGATG	60	162
		Rv CTTCGGAGTGTGGTCTTGGT	60.2	
CBEL04	<i>cellulose-binding domain</i>	Fw GCGTATTTTGGCTTGGATGT	60	135
		Rv GTGAATATCGGATGGGATGG	60	
Elicitina01	<i>Elicitin</i>	Fw AGGCGAGTTGGTACACGTTT	60.2	183
		Rv CCTCGGAATCAGGCTACAAC	59.7	
Elicitina02	<i>Elicitin</i>	Fw GAACACGTAATTCGCTGTCG	59.5	165
		Rv AGCATGTTGTAGCCCGAGTC	60.3	
Elicitina03	<i>Elicitin</i>	Fw CTCGAACGTAGAGGCGAGTT	59.6	194
		Rv CCTCGGAATCAGGCTACAAC	59.7	
CRN04	<i>Crinkler (CRN) family protein</i>	Fw CTGACTGCAAACGAGGTCAA	60	161
		Rv ATCACATTCACAGGGCCATT	60.2	
RXLR01	<i>RXLR family protein</i>	Fw AGCGCATTGCTAAGAATCGT	60	143
		Rv TGGCCAGTAAGAGATCCAC	60.1	
RXLR02	<i>RXLR family protein</i>	Fw AACTGAAGAGCGACGAGGT	60.1	108
		Rv GTTGCTTGGGATTCAGCTTC	59.8	
RXLR08	<i>RXLR family protein</i>	Fw TTAGCTACGGACTCGGCTGT	60	127
		Rv TAAGCGTCATCTGCCAACTG	60	
RXLR11	<i>RXLR family protein</i>	Fw GCAAAGTTGGAACGGACATT	60	109
		Rv CGGCCGTAGTTCTTCTTCAG	60	
RXLR17	<i>RXLR family protein</i>	Fw ACACCATAAACGGCAGGAAG	60	138
		Rv CAGAACCGTGAATCGACGTA	59.9	

Fonte: dados da pesquisa.

Primers específicos para genes associados à cascata de defesa em *Citrus* desenhados usando o software Primer 3 Plus, e atendendo aos mesmos parâmetros anteriormente citados (OLIVEIRA, 2013), foram gentilmente cedidos pelo pesquisador Dr. Marcos Antônio Machado. A síntese foi feita pela Exxtend e as sequências estão listadas na Tabela 4.

Tabela 4 – *Primers* utilizados nas reações de RT-qPCR para genes de defesa de *C. sunki* e *P. trifoliata*.

Gene	Descrição	Sequência do primer (5'–3')	Tm (°C)	Amplicon (pb)
PR5	<i>Pathogenesis-related (PR)-5 proteins</i>	Fw TCGGGCTCCGTTGTGGCTTG	59.6	87
		Rv ATCCGGCGTGGCATGATCGC	60.2	
NPR3	<i>Non-expressor of Pathogenesis Related gene3</i>	Fw TCTGGAGGGAGAAATGAGG	55.3	70
		Rv TGTGGGAGGTGATAAAGGC	56.7	
HSP90	<i>Heat Shock Protein90</i>	Fw CACATGGGAGAAACCGAGAC	58.2	180
		Rv AGCATCGAGCTTGCTCTTGT	60.0	
PAD4	<i>Protein Arginine Deiminases</i>	Fw GCTTGGCAAATTCTGGGATGGTGT	60.0	200
		Rv ACCTCCTTGGTCTTCCATGCTTCA	60.0	
SABATH	<i>SABATH methyltransferase</i>	Fw TCTGGTGGCCATGTGCTCCTCA	59.8	74
		Rv TCCAGCCGGTACATCTAGGGT	58.2	
BSMT1	<i>Benzoid acid/SA carboxyl Methyltransferase1</i>	Fw GTTTAACGAGGCCGTTGATG	57.4	200
		Rv TCGTCAAGGAAACTGTCACG	58.1	
WRKY28	<i>WRKY28 transcription fator</i>	Fw GGACGACACTCCCAAGAAGA	60.2	144
		Rv CTATGATTCCCTGAATCTTCATCTG	60.3	
WRKY70	<i>WRKY70 transcription fator</i>	Fw CAGCAGCAGCAGGCCGAATTCTT	58.9	100
		Rv GTCCTTCGCCGCCGGTCTCT	59.4	
Cal 5	<i>Calose Synthase5</i>	Fw CCCAAGTATTCCGGCCCTTT	60.0	107
		Rv CACGGGGGTCAAGACAATCA	59.9	
Cal 7	<i>Calose Synthase7</i>	Fw CAGGTGTATGGGCAGCAGAA	60.0	121
		Rv CATCCCTCCCCAAGTGAACC	60.0	

Fonte: Oliveira (2013).

4.6 Análise estatística

Para a análise da expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa, o qual determina a expressão de um gene alvo com base em uma amostra de referência (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os dados obtidos, inicialmente, foram analisados usando o *software Real-Time PCR Miner* (<http://ewindup.info/miner/>), o qual utiliza cálculos com base na cinética das reações individuais de PCR fornecendo o cálculo direto da eficiência da reação e valores de Ct (limiar do ciclo) de cada conjunto experimental. Para normalização, foi utilizada a equação: $\Delta Ct = Ct$ (gene alvo) - Ct (controle endógeno). A calibração foi determinada para cada tempo estudado, através da fórmula: $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt (amostra) - ΔCt (calibrador)) e a quantificação relativa foi obtida por meio da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, a fim de verificar a significância entre os tratamentos e pontos temporais de interação (KRUSKALL; WALLIS, 1952).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de novos genes candidatos a efetores

A expressão quantitativa relativa temporal foi estudada para 17 genes candidatos a efetores em *Phytophthora parasitica* de citros, sendo 11 novos genes que codificam efetores apoplásticos identificados e selecionados neste trabalho e 06 genes codantes para efetores citoplasmáticos identificados por Dalio et al. (2014). Os 11 novos genes candidatos a efetores apoplásticos foram selecionados a partir do genoma do isolado IAC 01/95 de *P. parasitica* de citros, disponíveis nos bancos de dados EMBL/GenBank/DDBJ (https://olive.broadinstitute.org/strains/phyt_para_iac_01_95.1), sendo 04 genes do tipo NPP1, 04 CBEL e 03 elicinas, os quais foram identificados e analisados via BLASTp utilizando como sequencias referências ou iscas as sequências de aminoácidos *necrosis-inducing protein NPP1 of Phytophthora parasitica* (Q9AT28), *CBEL protein* (O42830) e *Elicitin* (P41801.1), respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 – Similaridade via BLASTp de 11 novos genes candidatos a efetores apoplásticos de *P. parasitica* isolado IAC 01/95 selecionados para análise de expressão quantitativa.

Gene	Definição	Acesso (GenBank)	Similaridade via BLASTp
NPP101	hypothetical protein L914_03812	ETM52620.1	67,3% (145/237)
NPP102	hypothetical protein L914_14524	ETM39327.1	68,8% (163/237)
NPP103	hypothetical protein L914_14520	ETM39323.1	100% (237/237)
NPP104	hypothetical protein L914_14523	ETM39326.1	67,5% (160/237)
CBEL01	hypothetical protein L914_00536	ETM56502.1	47,4% (127/268)
CBEL02	hypothetical protein L914_15012	ETM38759.1	39,4% (105/268)
CBEL03	hypothetical protein L914_10931	ETM43740.1	45,1% (120/268)
CBEL04	hypothetical protein L914_10667	ETM44060.1	48,4% (129/268)
Elicitina01	hypothetical protein L914_07185	ETM48243.1	47,5% (56/118)
Elicitina02	hypothetical protein L914_04646	ETM51527.1	46,2% (54/118)
Elicitina03	hypothetical protein, variant	ETM48244.1	47,5% (56/118)

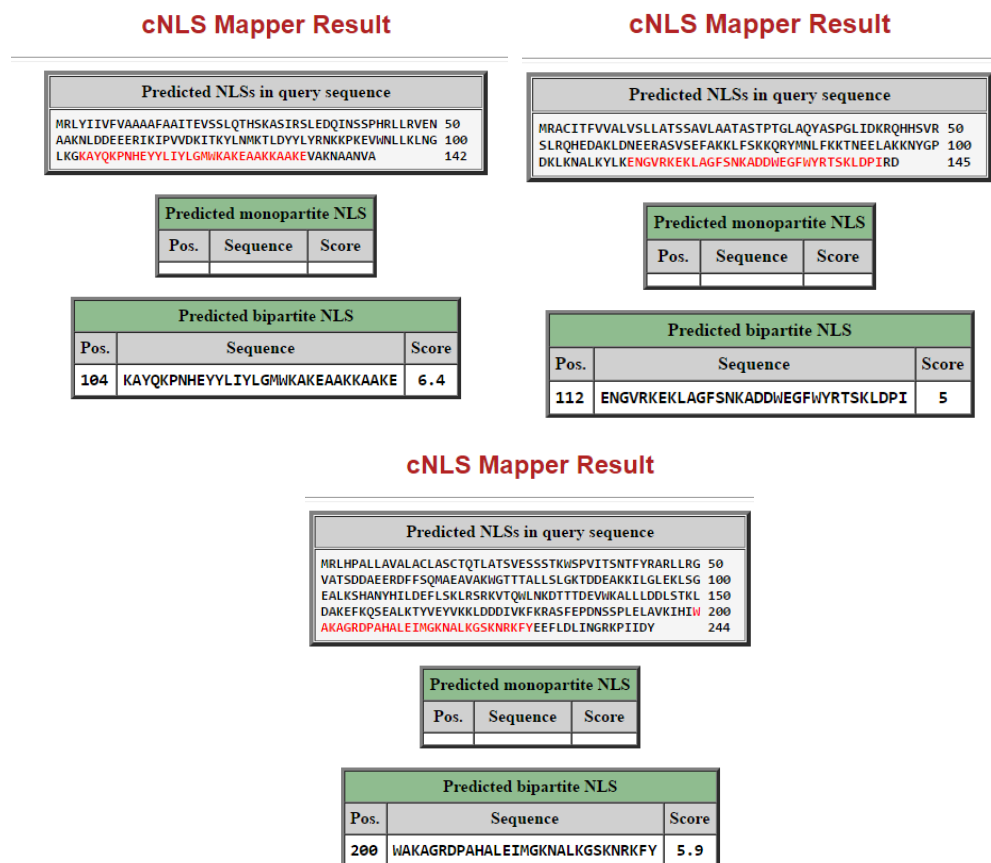
Fonte: dados da pesquisa.

A análise de BLASTp no banco de dados EMBL/GenBank/DDBJ resultou na identificação de 68 sequências candidatas a efetores NPP1, 09 candidatas a CBEL e 05 candidatas a elicitinas no genoma de *P. parasitica* isolado IAC 01/95. Dentre estas, as sequências gênicas estudadas foram selecionadas por codificarem proteínas com as seguintes características: (i) elevada similaridade de sequência com estes efetores apoplásticos; (ii) presença de peptídeo sinal, um marcador fundamental na secreção de proteínas, (iii) ausência de domínio transmembrana e (iv) ausência de ancoragem, conforme listadas na Tabela 5.

Entre as sequências de efetores citoplasmáticos indicadas por Dalio et al. (2014), cinco genes *RXLR* foram selecionados. Dentre estes, os genes *RXLR08*, *RXLR11* e *RXLR17* codificam proteínas que apresentarem sinal de localização nuclear, de acordo com a cNLS Mapper (Figura 4). Segundo Schornack et al. (2010), a presença de sinais de localização funcionais indica um recurso celular de importação para o núcleo da célula hospedeira. Proteínas com essa característica,

portanto, podem atuar interferindo com processos nucleares do hospedeiro. Neste sentido, a presença de efetores RXLR no compartimento subcelular já foi demonstrada para o efector RXLR AVR1 de *P. infestans* onde a ativação da defesa e a sua percepção aconteceram dependente da presença nuclear da sua proteína R cognata, a proteína NLR R1 de *Solanum tuberosum* (DU; BOUWMEESTER; GOVERS, 2014). Entretanto, se estas três proteínas de *P. parasitica* podem ser translocadas para o núcleo da célula hospedeira precisa ser mais bem investigado por ensaios laboratoriais.

Figura 4 – Sinais de localização nuclear (NLS) preditos para três candidatos a efetores RXLR, indicando sua posição na sequência proteica em vermelho.



Fonte: dados da pesquisa.

5.2 Análise quantitativa da expressão de genes de *P. parasitica*

Os 17 genes de *P. parasitica* selecionados como descrito anteriormente tiveram sua expressão quantitativa relativa, temporal, diferencial e comparativa analisada em pontos temporais (0, 3, 6, 12, 24, 48 e 96 h.a.i.) durante interações com raízes de genótipos suscetível (*Citrus sunki*) e resistente (*Poncirus trifoliata*) de

citros, respectivamente, após inoculação com zoósporos móveis desse patógeno. As mudanças na expressão dos genes foram dadas como valores em vezes que se referem à expressão relativa ao tempo zero, inoculado e imediatamente coletado.

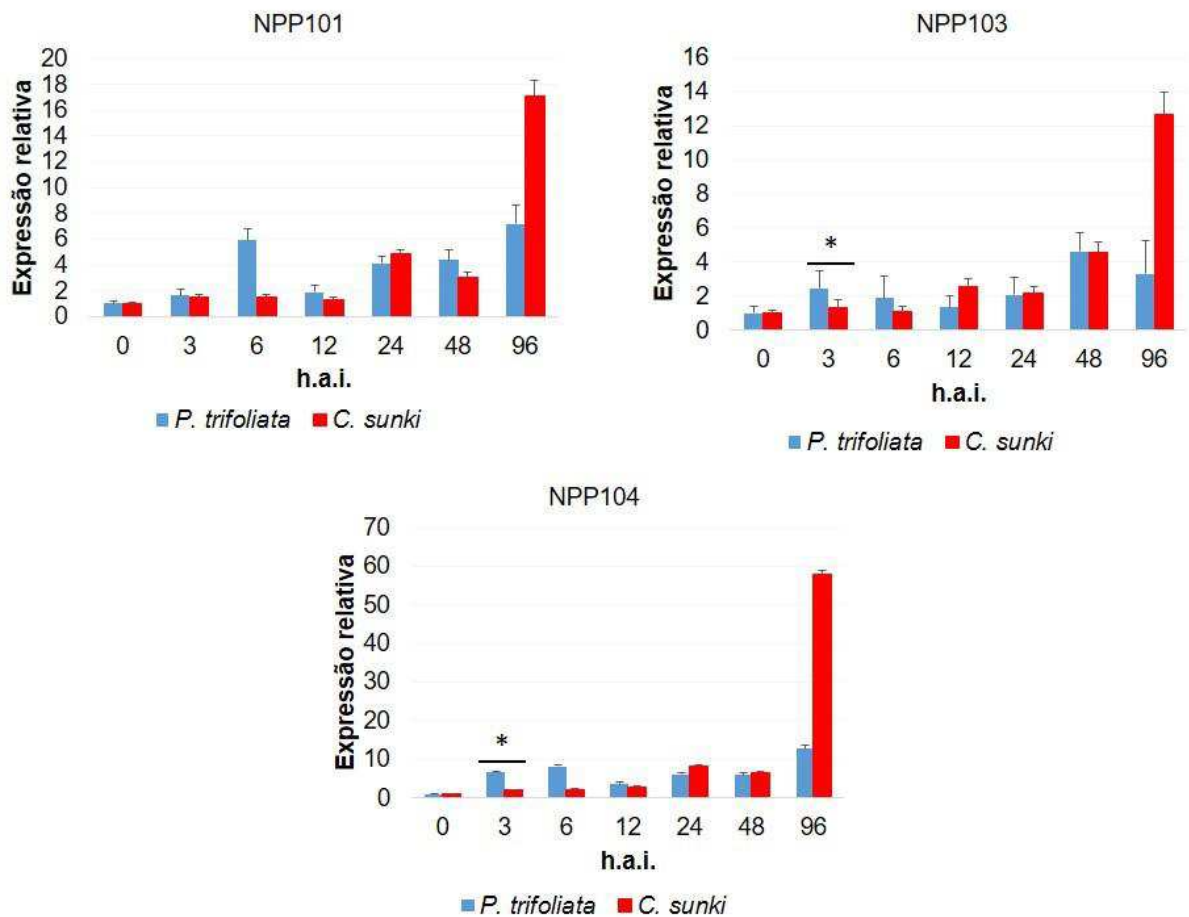
5.3 Expressão de genes efetores apoplásticos de *P. parasitica*

Todos os *primers* específicos para genes efetores apoplásticos utilizados neste estudo amplificaram fragmentos esperados em todas as amostras analisadas, exceto para os genes *NPP102* e *Elicitina01*. Uma vez que estes amplificaram DNA genômico de *P. parasitica*, a não amplificação destes genes pode ser um indicativo de que ambos não participam da interação patogênica de *P. parasitica* com citros, nas condições estudadas e nos pontos temporais de interação observados.

5.3.1 GENES *NPP1*

Os genes candidatos a efetores *NPP1* de *P. parasitica* foram transcritos ao longo dos pontos temporais estudados de interações com citros. O padrão de expressão encontrado foi semelhante entre os três candidatos avaliados (*NPP101*, *NPP103* e *NPP104*), evidenciando uma tendência no perfil de expressão com dois picos máximos, indicativos de síntese *de novo*, os quais podem ser observados as 6 e 96 h.a.i. para os genes *NPP101* e *NPP104* e as 3 e 48 h.a.i. para o gene *NPP103*, após indução por raízes de *P. trifoliata*, enquanto que sobre raízes de *C. sunki* foram observados as 24 e 96 h.a.i. para os genes *NPP101* e *NPP104* e as 12 e 96 h.a.i. para o gene *NPP103* (Figura 5). Quanto aos níveis de expressão relativa, houve uma tendência de transcritos do gene *NPP104* acumularem-se em níveis mais elevados do que dos genes *NPP101* e *NPP103*. Entre as interações, os níveis dos transcritos *NPP103* e *NPP104* acumulados as 3 h.a.i. foram diferencialmente expressos ao nível de significância ($p < 0,05$), sendo mais elevados sobre raízes de *P. trifoliata* do que sobre *C. sunki* (Figura 5).

Figura 5 – Perfil de expressão relativa de genes candidatos a efetores NPP1 de *P. parasitica* durante o estabelecimento de interações com raízes de *C. sunki* e *P. trifoliata*. Os níveis de RNAm relativos foram quantificados, por RT-qPCR, em amostras correspondentes as raízes das plântulas inoculadas com *P. parasitica* em diferentes pontos temporais de infecção. Os dados são apresentados como expressão relativa aos genes de referência WS21 e UBC. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis: *P <0,05.



Fonte: dados da pesquisa

A expressão de genes efetores *NPP1* em *P. parasitica* observada nos primeiros pontos temporais de interação ocorreu mais cedo sobre *P. trifoliata*, as 3 (*NPP103*) e 6 h.a.i. (*NPP101* e *NPP104*), do que sobre *C. sunki*, as 12 (*NPP103*) e 24 h.a.i. (*NPP101* e *NPP104*), revelando um perfil similar de expressão desses genes sobre as duas espécies de citros. Possivelmente, genes *NPP1* sejam expressos mais rapidamente sobre a espécie resistente do que sobre a suscetível devido a dificuldades de penetração mediada por barreiras de defesa expressas em *P. trifoliata*. Esta hipótese está embasada no papel dualístico proposto para efetores *NPP1* de induzir a morte celular ou para disparar o mecanismo de defesa da planta

(GIJZEN; NUERNBERGER, 2006; QUTOB et al., 2006). Assim, possivelmente frente à ação de respostas de defesa em *P. trifoliata* houve uma baixa notável na expressão dos três genes em *P. parasitica* as 12 h.a.i., vindo a ocorrer uma tendência na elevação dos níveis de expressão na síntese *de novo* entre os tempos mais tardios, 24 e 96 h.a.i.

Por outro lado, sobre *C. sunki* foi observada uma manutenção em baixo nível de expressão destes genes em *P. parasitica* nos estágios iniciais da interação, de 3 até 12 h.a.i., tendo a quantidade de transcritos *NPP1* aumentado lenta e gradativamente a partir de 24 h.a.i., até atingir valores máximos de expressão a 96 h.a.i., onde os altos níveis de transcritos alcançaram 17, 12 e 57 vezes para os três candidatos *NPP101*, *NPP103* e *NPP104*, respectivamente (Figura 5). Portanto, na presença de raízes de *C. sunki*, o fitopatógeno expressou genes *NPP1* em níveis baixos nos tempos iniciais, embora em tempos mais tardios, compatíveis com a fase necrotrófica, houve uma tendência no aumento dos níveis de expressão.

Uma vez que proteínas *NPP1* são indutoras de necrose, a expressão mais alta em estágio tardio da interação pode estar relacionada a esta função de sintoma de necrose baseada na multiplicação e disseminação no tecido vegetal em interações compatíveis. Neste sentido, Fellbrich et al. (2002) demonstraram que folhas agroinfiltradas de *N. benthamiana* e *A. thaliana* expressando transientemente uma proteína *NPP1* de *P. parasitica* apresentaram lesões de necrose em 48 h.a.i. Similarmente, Kebdani et al. (2010) evidenciaram a abundância de transcritos de *P. parasitica* que codificam outra classe de proteínas indutoras de necrose, proteínas tipo *Nep1* (*necrosis and ethylene-inducing proteins*) na fase necrotrófica do patógeno, indicando sua abundância mais tardia na interação com plantas hospedeiras.

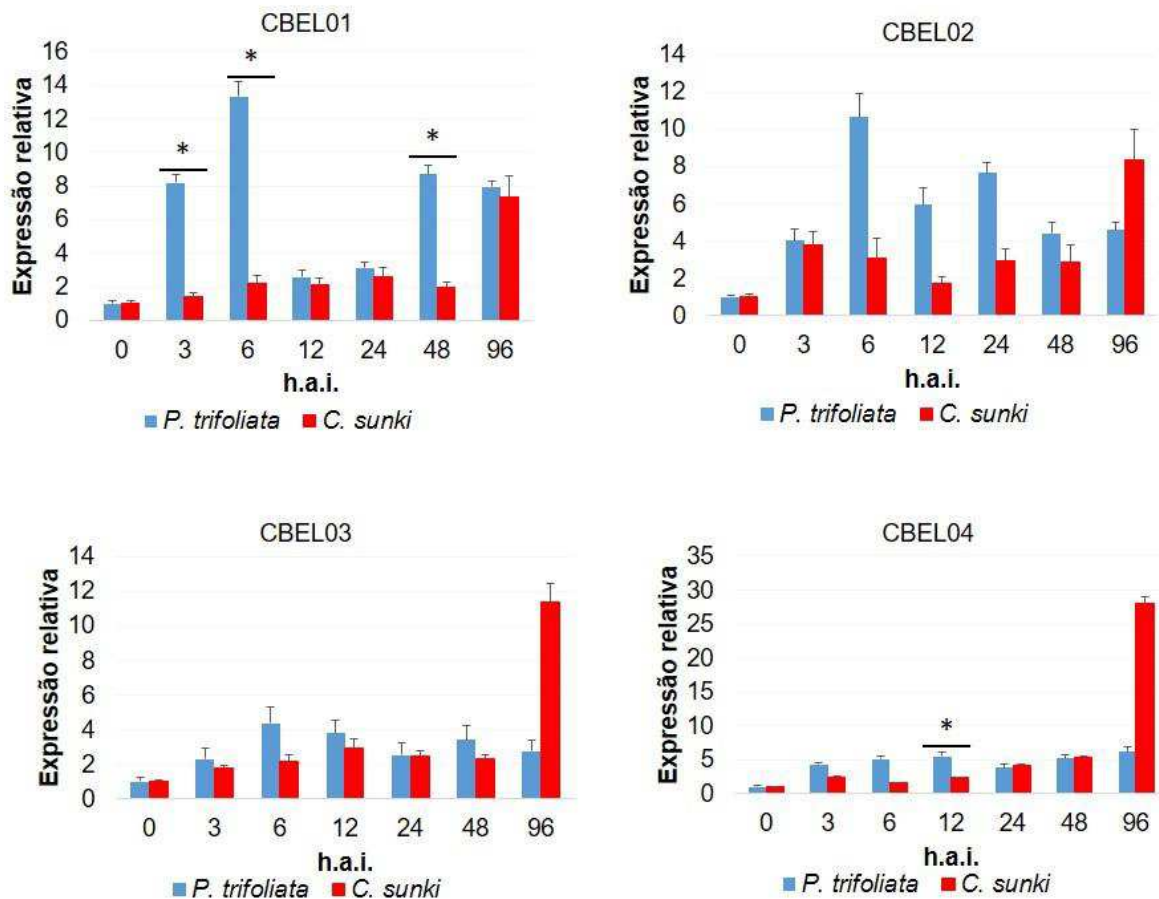
Resultados semelhantes foram encontrados por Kanneganti et al. (2006) para o patossistema *N. benthamiana*-*P. infestans*, em que o gene *PiNPP1.1* apresentou um padrão de expressão fracamente detectável até 1 d.a.i. Entretanto, ao avançar de 3 d.a.i. a expressão aumentou continua e amplamente. Estes autores propuseram uma hipótese que pode ser aplicada aos resultados aqui encontrados. Segundo eles, a desativação inicial nos níveis de transcrição seguida por uma elevada regulação positiva é uma característica comum em *Phytophthora* spp. hemibiotróficas e que tal fenômeno pode estar correlacionado, portanto, a transição da fase biotrófica para a fase necrotrófica, onde essas proteínas, uma vez

consideradas como PAMPs, podem atuar como toxinas. Em caso positivo, o colapso do tecido hospedeiro pode suprimir as defesas e favorecer a colonização pelo patógeno no período tardio.

5.3.2 GENES *CBEL*

Os padrões de expressão observados para os quatro genes candidatos a efetores *CBEL* foram divergentes entre si, exceto para *CBEL01* e *CBEL03* sobre *P. trifoliata*, e entre as plantas inoculadas. Os níveis de expressão do gene *CBEL01* as 3, 6 e 48 h.a.i. foram significativamente maiores sobre *P. trifoliata* do que sobre *C. sunki*, similarmente ao gene *CBEL04*, as 12 h.a.i. (Figura 6).

Figura 6 – Perfil de expressão relativa de genes candidatos a efetores CBEL de *P. parasitica* durante o estabelecimento de interações com raízes de *C. sunki* e *P. trifoliata*. Os níveis de RNAm relativos foram quantificados, por RT-qPCR, em amostras correspondentes as raízes das plântulas inoculadas com *P. parasitica* em diferentes pontos temporais de infecção. Os dados de expressão foram normalizados com base nos genes endógenos WS21 e UBC. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis: *P < 0,05.



Fonte: dados da pesquisa.

Dois picos de expressão máxima foram observados nos padrões de expressão dos quatro genes *CBEL* em *P. parasitica*, sendo que níveis mais elevados de expressão em estádios cedo da interação com raízes de *P. trifoliata* ocorreram as 6 (*CBEL01*, *CBEL02* e *CBEL03*) e 12 (*CBEL04*) h.a.i., enquanto que a síntese *de novo* da expressão foi observada as 24 (*CBEL02*), 48 (*CBEL01* e *CBEL03*) e 96 (*CBEL04*) h.a.i. A expressão de genes *CBEL* induzida pela espécie suscetível *C. sunki* exibiu uma tendência de expressão em estádios iniciais da interação, as 3 h.a.i., para os genes *CBEL02* e *CBEL04*, 6 e 12 h.a.i. para *CBEL01* e *CBEL03*,

respectivamente, enquanto que a síntese *de novo* tardia foi observada somente as 96 h.a.i. para os quatro genes.

De modo geral, os níveis mais elevados da expressão de genes *CBEL* foram alcançados durante interação de *P. parasitica* com raízes de *P. trifoliata*, observados para os genes *CBEL01* e *CBEL02*, com valores de 13 e 10 vezes relativos ao tempo zero. Ao passo que sobre *C. sunki* o nível de expressão destes dois genes se manteve relativamente baixo e estável, contando com picos máximos de expressão com valores de 7 e 8 vezes, respectivamente, apenas às 96 h.a.i (Figura6).

Com relação aos genes *CBEL03* e *CBEL04*, o perfil de expressão demonstrou uma tendência de indução sobre *P. trifoliata* nos tempos iniciais entre 3 a 12 h.a.i., embora com níveis mais baixos, contando com um posterior declínio no caso de *CBEL03* e manutenção no padrão de expressão constante em *CBEL04*. O padrão de expressão dos genes *CBEL03* e *CBEL04* sobre *C. sunki* foi praticamente idêntico aos dois primeiros genes candidatos, onde, a indução foi mantida em um nível relativamente baixo, aumentando lenta e gradativamente ao longo dos pontos temporais de interação até atingir valores máximos a 96 h.a.i. Contudo, houve uma tendência no aumento dos níveis de expressão relativa destes genes atingindo valores superiores aos primeiros, correspondendo a 11 e 28 vezes mais expressos, respectivamente (Figura 6).

Aparentemente, *P. parasitica* sintetiza níveis mais elevados de genes *CBEL* sobre *P. trifoliata* em etapas iniciais de interação, a fim de aderir sobre suas células radiculares, enquanto que sobre a planta suscetível, *C. sunki*, a expressão se manteve em níveis mais baixos, indicando que o patógeno não expressa amplamente genes candidatos a *CBEL* em estágios iniciais de interação e penetração, mas sim no tempo tardio, onde há uma tendência de síntese atingindo valores máximos de expressão. Já que proteínas *CBEL* atuam participando, em especial, na ligação a celulose e aposição da hifa de *P. parasitica* na parede da célula hospedeira (GAULIN et al., 2002), o perfil de expressão dos genes *CBEL* estudados indicam uma atuação na adesão do fitopatógeno durante as interações com *P. trifoliata* e *C. sunki*.

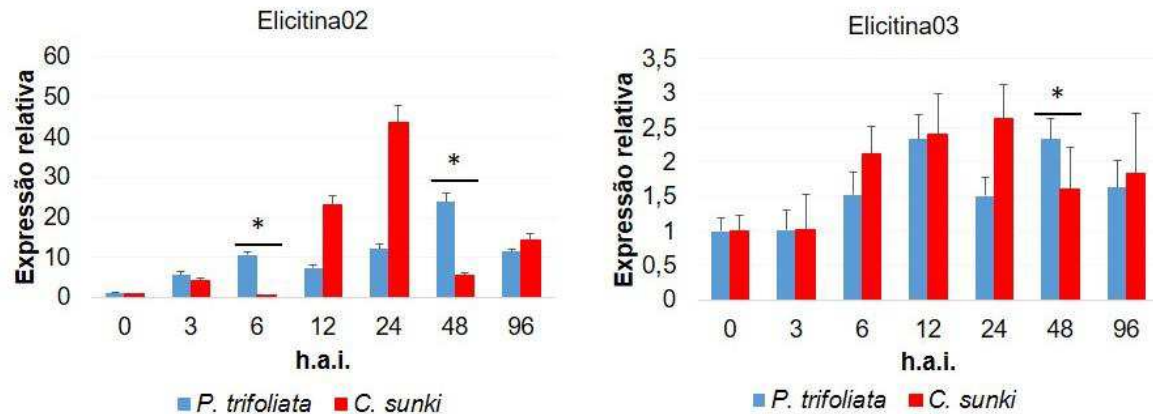
De acordo com Attard et al. (2014), o acúmulo de transcritos do tipo *CBEL* durante interação compatível *A. thaliana*-*P. parasitica* ocorreu 6 h.a.i. e estava relacionada a propagação de micélio e apressórios do patógeno. Já para Kebdani et

al. (2010), o desenvolvimento dessas estruturas especializadas de penetração, os apressórios, ocorre a partir de 2,5 h.a.i. Portanto, a expressão dos genes *CBEL* observada sobre *P. trifoliata*, em estádios iniciais entre 3 e 6 h.a.i., pode representar um indicativo do desenvolvimento micelial e tentativa de penetração nas raízes desta planta resistente durante este período, tendo sido posteriormente reduzida em função da não efetivação do processo de penetração e colonização nas células dessa planta. Por outro lado, o perfil de expressão observado sobre *C. sunki* se deve, possivelmente, aos estágios de penetração na célula hospedeira, e a tendência de notáveis picos às 96 h.a.i. é compatível com os altos níveis de expressão em função do crescimento e propagação de hifas do patógeno nas células hospedeiras, pressuposto reforçado por Costa (2007) que relatou predominância máxima na expressão de *CBEL* durante a fase micelial de *P. parasitica*.

5.3.3 GENES *ELICITINA*

O padrão e o nível de expressão de dois candidatos a genes efetores *Elicitina*, *Elicitina02* e *Elicitina03*, induzidos em *P. parasitica* durante a interação com *C. sunki* e *P. trifoliata* foram diferentes dentro e entre as espécies de plantas inoculadas (Figura 7).

Figura 7 – Perfil de expressão relativa de genes candidatos a efetores Elicitina de *P. parasitica* durante o estabelecimento de interações com raízes de *C. sunki* e *P. trifoliata*. Os níveis de RNAm relativos foram quantificados, por RT-qPCR, em amostras correspondentes as raízes das plântulas inoculadas com *P. parasitica* em diferentes pontos temporais de infecção. Os dados de expressão foram normalizados com base nos genes endógenos WS21 e UBC. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis: *P < 0,05.



Fonte: dados da pesquisa.

A expressão do gene *Elicitina02* foi induzida logo no início das interações com raízes de *P. trifoliata* e *C. sunki*, às 3 h.a.i., contando com valores de 5 e 4 vezes mais expressos que no tempo zero, respectivamente. Posteriormente, às 6 h.a.i., este gene foi significativamente regulado positivamente sobre a espécie resistente atingindo o valor de 10 vezes mais expresso, enquanto que, sobre a espécie suscetível foi reprimido. Nos tempos intermediários, 12 e 24 h.a.i., a expressão deste candidato apresentou uma tendência de aumento atingindo valores máximos sobre *C. sunki*, chegando a ser 43 vezes mais expresso. Nos pontos temporais posteriores a expressão declinou para *C. sunki* e foi novamente elevada e significativa em *P. trifoliata* (Figura 7).

Por outro lado, a expressão do gene *Elicitina03* manteve-se em um nível baixo, variando de 1 a 2,5, nos tempos das interações avaliadas, quando comparado com os valores obtidos para *Elicitina02*. Os perfis de expressão do gene *Elicitina03* foram similares entre as interações durante os tempos 3, 6 e 12 h.a.i., apresentando expressão basal que permaneceu até às 3 h.a.i., embora os valores de expressão induzida sobre *C. sunki* tenham sido mais elevados do que sobre *P. trifoliata*. Após este tempo, o perfil de expressão induzida sobre *P. trifoliata* alcançou picos máximos às 12 e significativamente regulado às 48 h.a.i., indicativos de síntese *de novo*,

enquanto que sobre *C. sunki* um pico máximo foi alcançado às 24 h.a.i., seguido de leve declínio até às 96 h.a.i (Figura 7).

A expressão precoce, às 3 h.a.i., de genes *elicítina* em *P. parasitica* foi encontrada durante a interação com células de cebola por Kibdani et al. (2010). Entretanto, a expressão de genes *elicítina* tem sido relatada permanecer até dias após a inoculação com a planta. No patossistema *Q. suber-P. cinnamomi* foi encontrado aumento crescente na expressão de *elicítinas* ao longo do *time course* de 12 até 36 h.a.i (HORTA et al., 2008). Similarmente, em *P. citricola* a expressão de um gene *elicítina* induzida sobre raízes de *Fagus sylvatica* foi encontrada, ainda que fracamente, cerca de 6 h.a.i., com aumento constante a partir de 24 h.a.i. até atingir valores máximos de expressão entre os 4 e 5 d.a.i., vindo a declinar fortemente após este período (FLEISCHMANN et al., 2005).

Corroborando com os resultados de expressão encontrados para *Elicítina03*, níveis mais baixos de expressão de genes *elicítina* têm sido relatados, como por exemplo, durante a interação raiz de tomate-*P. parasitica*, onde Le Berre et al. (2008) identificaram níveis de expressão abaixo de 1 para três *elicítinas* avaliadas, no período de 4 d.a.i. Além disso, Colas et al. (2001) demonstraram que um gene *elicítina* altamente conservado em *Phytophthora*, o gene *para1*, apresentou mecanismo de regulação negativo durante interações compatíveis com tabaco e tomate, onde a expressão em um outro isolado de *P. parasitica* patogênico sobre tomate e não patogênico sobre tabaco tenha ocorrido aos 3 d.a.i. Os autores levantaram a hipótese de que o baixo nível de expressão do gene pode ser um mecanismo adequado para infectar as plantas hospedeiras e que a expressão pode estar mais associada ao isolado do que a espécie inoculada.

Diferentemente dos dados de expressão relativa descritos para os demais candidatos a efetores apoplásticos, para genes *Elicítina* não se pode notar um padrão específico de expressão entre os dois genes. A evidência de que cada grupo de *elicítina* executa uma função diferente foi proposta por Jiang et al. (2006). Estes pesquisadores usaram uma comparação filogenética de genes *elicítina* de *Phytophthora* spp. e verificaram que aqueles pertencentes a um mesmo grupo possuíam padrões de expressão similares entre si e que divergiam dos demais grupos. Assim, é possível supor que a indução na síntese de genes *elicítina* sofre influências substanciais e alterações por diversos fatores incluindo, hospedeiros, ponto de interação, isolado patogênico e proximidade filogenética. Além disso, com

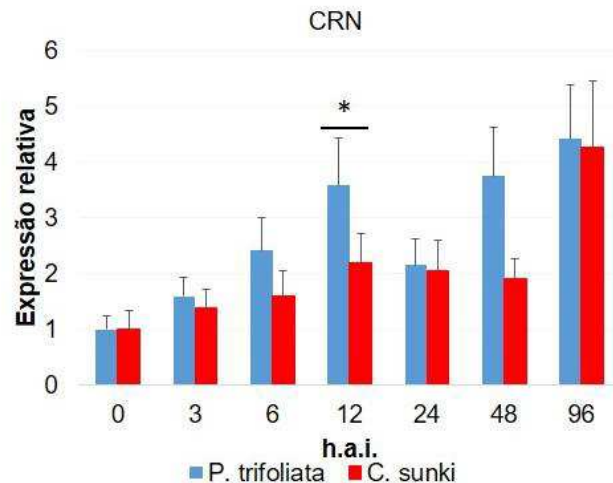
base em resultados encontrados na literatura supracitados e, considerando a notável divergência de expressão entre os dois candidatos aqui avaliados, possivelmente estes dois genes devem executar papéis diferentes na patogênese de *P. parasitica*. Sendo assim, estudos adicionais desses efetores são requeridos para determinação de papéis particulares por eles desempenhados durante a infecção.

5.4 Expressão de candidatos a efetores citoplasmáticos de *P. parasitica*

5.4.1 GENE *CRN*

O perfil da expressão induzida sobre raízes das espécies *C. sunki* e *P. trifoliata* observado para o gene candidato a efetor da família *CRN* divergiu entre as interações no nível na maioria dos pontos temporais estudados. Como é possível observar a partir da Figura 8, o perfil da expressão induzida sobre as espécies de citros foi marcado pela tendência de dois picos máximos de síntese, que ocorreram as 12 e 96 h.a.i. em ambas. Contudo, este gene *CRN* foi significativamente regulado positivamente sobre a espécie resistente as 12 h.a.i., exibindo posteriormente uma tendência no aumento de níveis de expressão as 48 e 96 h.a.i. sobre *P. trifoliata*, indicando uma rápida síntese *de novo* desses genes, enquanto que sobre *C. sunki* houve uma tendência no aumento do nível de expressão apenas as 96 h.a.i., sendo os demais níveis mais baixos do que sobre a espécie resistente.

Figura 8 – Perfil de expressão relativa do gene candidato a efetor CRN de *P. parasitica* durante o estabelecimento de interações com raízes de *C. sunki* e *P. trifoliata*. Os níveis de RNAm relativos foram quantificados, por RT-qPCR, em amostras correspondentes as raízes das plântulas inoculadas com *P. parasitica* em diferentes pontos temporais de infecção. Os dados de expressão foram normalizados com base nos genes endógenos WS21 e UBC. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis: *P <0,05.



Fonte: dados da pesquisa.

Curiosamente, houve uma tendência na expressão máxima deste gene atingida as 96 h.a.i. sobre ambas as espécies inoculadas com o patógeno (Figura 8). Portanto, aparentemente, o acúmulo de transcritos desse gene *CRN* em níveis mais elevados deve acontecer em tempo mais tardio da interação, sendo compatível, portanto, com a fase necrotrófica de *P. parasitica* e com a sua função característica de indução de necrose. Essa especulação poderia explicar os níveis observados sobre a planta suscetível *C. sunki*, contribuindo com a necrose de sintomas, enquanto que sobre a espécie resistente *P. trifoliata* precisa ser mais bem compreendido.

Os dados de expressão do gene *CRN* obtido neste trabalho estão de acordo com os descritos por Attard et al. (2014) para o patossistema *A. thaliana*-*P. parasitica*, em que a expressão de 10 efetores CRN contou com valores baixos (2,5 h.a.i.) na fase de penetração, cujos transcritos regulados positivamente acumularam preferencialmente nos pontos de 10.5 e 30 h.a.i.

Entretanto, o perfil e nível de expressão de genes *CRN* parecem variar de acordo com o patossistema. Durante interação com *N. benthamiana*, transcritos de um gene efetor *CRN* de *P. capsici* foram detectáveis, ainda que em um baixo nível,

as 3 h.a.i. com posterior aumento na expressão as 6 h.a.i. e um pico máximo observado as 12 h.a.i. Contudo, uma vez que o número de transcritos foi fracamente detectável ao avançar da fase necrotrófica, 36 a 48 h.a.i., os autores ressaltaram que tal gene deve estar envolvido, portanto, com a manipulação inicial da defesa do hospedeiro e morte celular (MAFURAH et al., 2015).

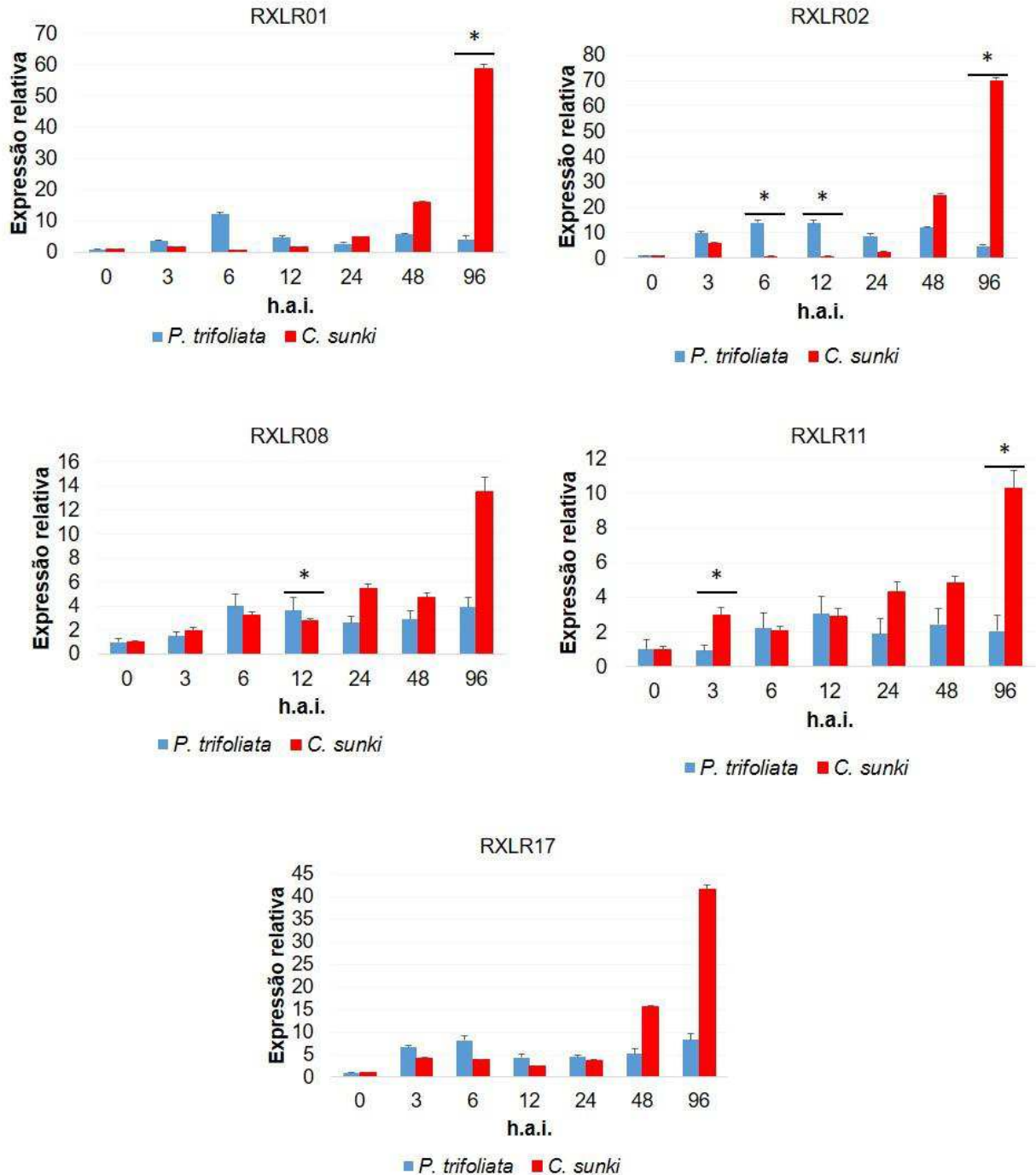
Por outro lado, um estudo global sobre 49 genes efetores *CRN* expressos durante a interação *Solanum lycopersicum*-*P. capsici* revelou padrões de expressão diferentes entre eles, possibilitando sua classificação em dois grupos. No primeiro foram incluídos aqueles positivamente regulados entre 0 e 8 h.a.i., em seguida regulados negativamente nas fases biotróficas de 16 a 48 h.a.i. e posterior síntese *de novo* na fase necrotrófica, a 72 h.a.i. No segundo grupo foram incluídos aqueles com pouca ou nenhuma expressão nas fases biotróficas e acúmulo elevado de transcritos apenas na fase necrotrófica, entre 48 e 72 h.a.i. (STAM et al. 2013).

Muito embora efetores CRN sejam caracterizados por induzir morte celular no hospedeiro, Rajput et al. (2015) observaram que o efector PsCRN de *P. sojae* foi capaz de suprimir a morte celular de diversos indutores de necrose, sugerindo, portanto, a possível participação de efetores CRN também na fase biotrófica, propiciando a infecção hemibiotrófica do patógeno. Portanto, estudos de expressão transiente poderão contribuir para o melhor entendimento da(s) função(ões) envolvidas no gene *CRN* estudado neste trabalho durante as interações suscetíveis e resistentes com citros.

5.4.2 GENES *RXLR*

A expressão quantitativa relativa temporal foi analisada para cinco genes de *P. parasitica* de citros candidatos a efetores do tipo *RXLR*. De modo geral, o perfil de expressão induzida por raízes de *P. trifoliata* e *C. sunki* foi similar dentro e entre as espécies inoculadas quanto a existência de dois pontos máximos de expressão, indicando síntese *de novo* destes genes as 6 e 48 h.a.i. sobre *P. trifoliata* e as 3 e 48 h.a.i. sobre *C. sunki* (Figura 9). Com base nos níveis de transcritos nos *time points*, é possível agrupar os genes em dois grupos, com níveis mais elevados (*RXLR1* e *RXLR2*) e com níveis mais baixos (*RXLR8*, *RXLR11* e *RXLR17*).

Figura 9 – Perfil de expressão relativa dos genes candidatos a efetor RXLR de *P. parasitica* durante o estabelecimento de interações com raízes de *C. sunki* e *P. trifoliata*. Os níveis de RNAm relativos foram quantificados, por RT-qPCR, em amostras correspondentes as raízes das plântulas inoculadas com *P. parasitica* em diferentes pontos temporais de infecção. Os dados de expressão foram normalizados com base nos genes endógenos WS21 e UBC. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis: * $P < 0,05$.



Fonte: dados da pesquisa.

Em *RXLR01* e *RXLR02* é notável a semelhança no perfil de expressão com altas intensidades. Onde, a indução inicial para ambos ocorreu em 3 h.a.i, ainda que, a resposta tenha sido mais intensificada sobre *P. trifoliata*. Após este período, a expressão passou a predominar sobre esta espécie entre 6 e 12 h.a.i., sendo inclusive suprimida sobre *C. sunki* em 6 h.a.i. e *RXLR02* sendo regulada positivamente em *P. trifoliata* nestes pontos de interação. Contudo, a partir de 48 h.a.i. a expressão assumiu altos e significantes níveis sobre a segunda espécie, alcançando picos máximos e significativamente regulados positivamente as 96 h.a.i. Enquanto que, neste mesmo tempo sobre *P. trifoliata* o acúmulo de transcritos sofreu um aparente declínio (Figura 9).

Quanto aos três demais genes candidatos, *RXLR08*, *RXLR11* e *RXLR17*, é importante salientar que além da semelhança no padrão de expressão entre eles, todos estes possuem predição de sinais de localização nuclear mensurada pelo cNLS Mapper. Os genes *RXLR08* e *RXLR11* compartilham entre si as maiores similaridades, nota-se que a indução também foi detectada inicialmente a 3 h.a.i. Inclusive, *RXLR11* foi significativamente regulado positivamente sobre *C. sunki* neste tempo de interação. Nos tempos posteriores, em contraste com os dois genes iniciais, foi identificada apenas uma ínfima alteração no nível de expressão entre 6 e 12 h.a.i., contanto com valores discretamente mais elevados sobre *P. trifoliata*, significativo apenas em *RXLR08* as 12 h.a.i. Contudo, a partir de 24 h.a.i. a expressão passou a ser aumentada sobre *C. sunki* conduzindo a picos a 96 h.a.i, significativo em *RXLR11*. Perfil semelhante pode ser observado em *RXLR17*, a principal diferença neste caso reside na tendência de altos valores de expressão atingidos (Figura 9).

Padrão similar de expressão foi encontrado por Whisson et al. (2007) em um estudo com *P. infestans* inoculada em batata, no qual diversos genes *RXLR* foram regulados positivamente durante interação avaliada entre 12 e 72 h.a.i. Estes autores associaram os altos níveis de expressão de efetores *RXLR* à acumulação de transcritos preferencialmente durante penetração das células por haustório, no estágio biotrófico até 36 h.a.i. Fato este que explicaria os altos níveis de expressão observados sobre *C. sunki* em 96 h.a.i., considerando sua suscetibilidade ao patógeno e, conseqüentemente, o favorecimento na propagação de haustórios entre 24 e 96 h.a.i. Contudo, isto também implica em uma possível baixa indução e/ou

ausência em tempos iniciais de interação, devido à escassez no desenvolvimento de haustórios, o que contrastaria com os resultados aqui encontrados.

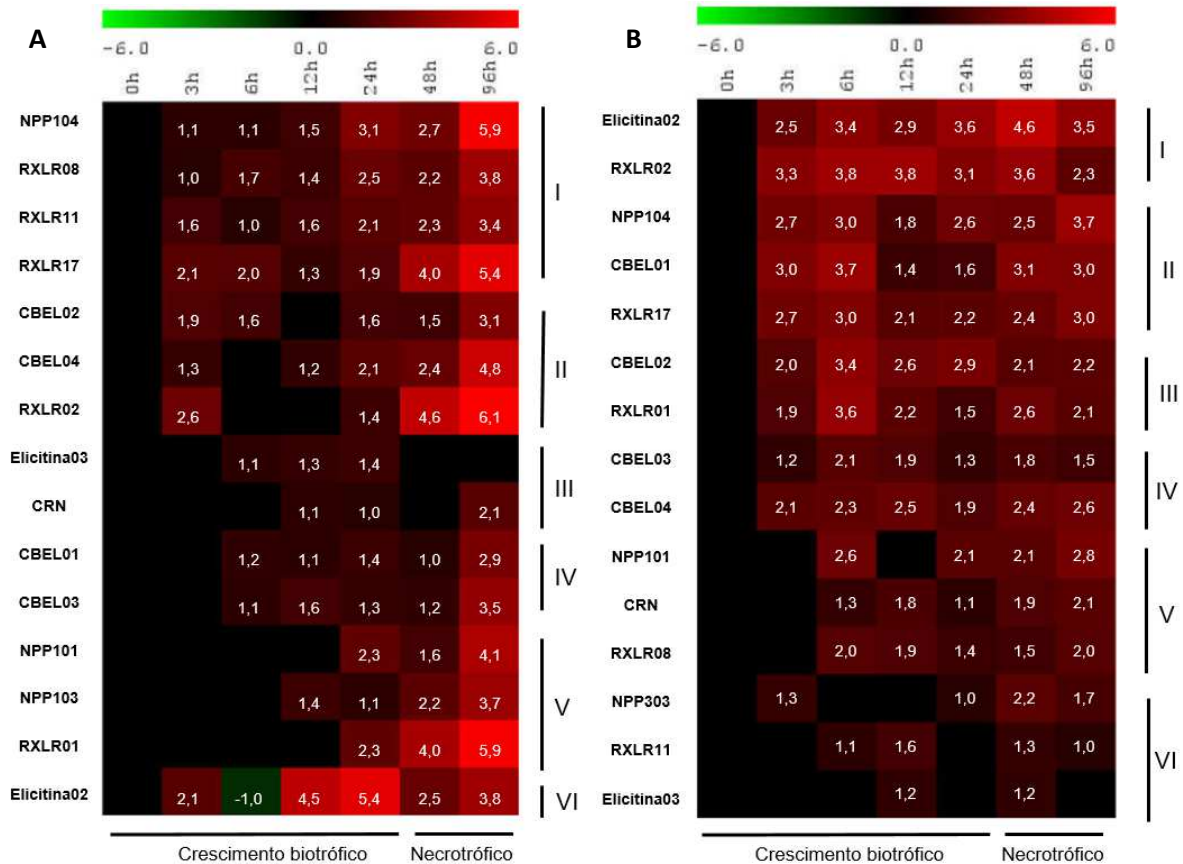
Em corroboração aos dados de expressão precoce de genes *RXLR* aqui relatados, Attard et al. (2014) encontraram genes com esse domínio amplamente expressos entre 2,5 e 6 h.a.i. no patossistema *A. thaliana*-*P. parasitica*, além de alguns desses também contarem com expressões significativas as 30 h.a.i. Não obstante, estes autores, baseados no pressuposto de secreção de efetores citoplasmáticos restrito a haustórios, utilizaram a fusão de um gene *RXLR* com GFP, a fim de detectar sua expressão acumulada transitoriamente ao logo da interação. Assim como os dados de expressão, a detecção desse gene por fluorescência foi observada fracamente em 2 h.a.i., acumulou-se em 3 h.a.i., fase de penetração por apressórios, e alcançou um pico em 6 h.a.i. O sinal foi detectado ainda na fase de hifa entre 10 e 30 h.a.i. Attard et al. (2014) sugeriram uma hipótese que pode ser aplicada a indução elevada de *RXLR01* e *RXLR02*, especialmente sobre *P. trifoliata*, entre 3 e 6 h.a.i. Segundo eles, a rápida indução em estágios precoces é um indício de que hifas e apressórios podem atuar não apenas na penetração as células, como também na secreção de efetores citoplasmáticos.

A indução de genes *RXLR* em tempos iniciais também foi caracterizada por outros trabalhos envolvendo o patossistema soja-*P. sojae* (EVANGELISTI et al., 2013; WANG et al., 2011). Nestes, foi relatado que genes *RXLR* foram regulados positivamente ao longo dos pontos temporais de interação. Onde houve predominância de transcritos, especialmente entre 6 e 12 h.a.i., associando os elevados níveis de expressão neste último tempo em função da abundância de haustórios. Foi sugerido por estes pesquisadores que a indução inicial, observada entre 3 e 6 h.a.i., pode estar associada não com a indução de necrose, mas com a participação desses genes em suprimir ETI, em busca da preparação da célula para a chegada dos primeiros efetores, atribuídos com a função concentrada de suprimir PTI. Essa hipótese pode ser reforçada quando observados os valores de expressão desses genes sobre *P. trifoliata* especialmente as 6 h.a.i., sendo um indício de tentativa na supressão de respostas de defesa desta planta. Enquanto que sobre *C. sunki* a indução foi significativamente mais baixa, indicando uma baixa necessidade de altos níveis de transcritos diante das defesas da planta suscetível.

5.5 Padrão de expressão de genes efetores de *P. parasitica* ao longo do seu desenvolvimento biotrófico e necrotrófico

A fim de possibilitar uma visão geral da modulação da expressão de genes candidatos a efetores de *P. parasitica* durante a interação com raízes de *C. sunki* e *P. trifoliata*, os dados de expressão relativa foram usados para a construção de *heatmaps* de expressão. Nestes, a aferição dos níveis de transcritos ao longo dos pontos temporais de interação (0, 3, 6, 12, 24, 48 e 96 h.a.i.) permitiu visualizar que todos os genes estudados, selecionados a partir do isolado patogênico IAC 01-95 de *P. parasitica*, foram regulados positivamente para a maioria dos pontos temporais (Figura 10).

Figura 10 – Agrupamento hierárquico dos genes efetores apoplásticos e citoplasmáticos expressos em *P. parasitica* durante interações com raízes de *C. sunki* (A) e *P. trifoliata* (B). O nível de expressão dos genes está indicado como uma transformação Log₂ a partir do valor relativo. Verde e vermelho foram utilizados para condições *down-regulated* e *up-regulated*, respectivamente, conforme a escala. As linhas verticais indicam os grupos de genes com intensidades de expressão correlacionadas ao longo do *time course*.



Fonte: dados da pesquisa.

Considerando-se que *P. parasitica* é um patógeno hemibiotrófico cuja fase biotrófica ocorre normalmente até 36 h.a.i. e sua fase necrotrófica é estabelecida em até 4 d.a.i. (ATTARD et al., 2014, BOAVA et al., 2011b, EVANGELISITI et al., 2013), os pontos temporais de interação de 0 a 24 h.a.i. podem estar associados ao desenvolvimento biotrófico do patógeno, enquanto que de 48 a 96 h.a.i. devem estar selecionados como correspondentes ao estabelecimento da fase necrotrófica.

A partir desse pressuposto, os dados de expressão relativa apresentados nos *heatmaps* sugerem que *P. parasitica* responde diferencialmente na modulação na expressão de genes efetores dentro de cada fase específica de crescimento e entre as espécies hospedeiras. A expressão de genes candidatos a efetores induzida durante a interação com *C. sunki* foi modulada em baixos níveis durante a fase biotrófica, contudo ao avançar da fase necrotrófica valores máximos na abundância de transcritos foram observados para a maioria dos genes. Esse padrão de expressão observado durante interações de *Phytophthora* spp. com espécies suscetíveis também foi descrito por outros autores (ATTARD et al., 2014; WANG et al., 2011; DONG et al., 2012).

Por outro lado, apesar de muitos genes estarem acumulados na fase necrotrófica, a quantidade de transcritos dos efetores induzidos durante a interação com raízes de *P. trifoliata* foi inferior àquela encontrada no mesmo estágio durante interação com *C. sunki*. Todavia, o acúmulo de transcritos dos efetores induzidos na presença de *P. trifoliata* foi maior em estágios precoces de interação, sugerido, portanto, um possível papel desses genes nas etapas iniciais de infecção e desenvolvimento biotrófico de *P. parasitica* sobre esse genótipo de citros resistente.

A fim de correlacionar a o nível e perfil de expressão dos diferentes genes entre os pontos temporais de interação foi realizado um agrupamento hierárquico dos padrões de expressão, onde genes com expressões coordenadas entre os pontos do *time course* potencialmente foram co-expressos e, portanto, classificados em grupos distintos para cada interação. Dessa forma, a expressão dos 17 genes candidatos a efetores induzida por *C. sunki* foi agrupada em 6 conjuntos principais. Nos grupos I (*NPP104*, *RXLR08*, *RXLR11* e *RXLR17*) e II (*CBEL02*, *CBEL04* e *RXLR02*) contêm sequências com expressão *upregulated* durante o contato precoce com a planta hospedeira, as 3 h.a.i., e níveis máximos de expressão *de novo* tardia, as 96 h.a.i. Embora no grupo II estejam incluídos genes não transcritos

em alguns pontos durante a fase biotrófica, o mesmo padrão de expressão foi observado com indução inicial precoce e intensificação durante a fase necrotrófica.

Segundo dados fornecidos por microscopia da interação raízes de tomate-*P. parasitica*, 3 h.a.i. corresponde a fase em que ocorreu a diferenciação de apressórios em *P. parasitica*, auxiliando no estágio inicial de penetração das células (KEBDANI et al., 2010). Logo, a indução destes genes as 3 h.a.i. sobre *C. sunki* pode refletir um papel de atuação coordenado dos genes de I e II durante o estágio precoce de penetração nas células, ou ainda, na manipulação das defesas primárias do hospedeiro. A manutenção na expressão dos genes dos grupos I e II durante a fase biotrófica sugere a necessidade de transcrição nas demais fases do patógeno e a acumulação na fase necrotrófica observada em todos eles reflete, possivelmente, valores de intensidade de expressão tardios frente à suscetibilidade da espécie. Entre os genes dos grupos I e II nota-se ainda uma intensificação nos níveis de transcritos entre 12 e 24 h.a.i. A indução a 12 h.a.i. possivelmente deve-se a colonização de hifas invasivas e ramificadas e o aumento em 24 h.a.i. pode refletir a dependência de alguns genes quanto a abundância de haustórios, documentada para este tempo por Wang et al. (2011).

Por outro lado, os genes incluídos no grupo III (*Elicitina03* e *CRN*) não tiveram sua expressão *upregulated* as 3 h.a.i., no primeiro estágio de interação precoce, mas sim a partir de 6 e 12 h.a.i., respectivamente. Estes dados são indicativos, portanto, de que os valores de expressão destes dois genes foram mais elevados apenas em estágios mais tardios de penetração e invasão. Uma vez que a síntese é concentrada entre 6 e 24 h.a.i., provavelmente ambos atuam na propagação de hifas invasivas e manipulação de defesas durante o estágio biotrófico de *P. parasitica*. Apenas CRN exhibe o padrão de síntese *de novo* a 96 h.a.i., sugerindo uma potencial ação de indução de necrose no estágio tardio.

No grupo IV estão agrupados dois efetores CBEL (*CBEL01* e *CBEL03*) foram modulados semelhantemente a partir de 6 h.a.i., contando com valores de intensidade de expressão baixos até chegar em 96 h.a.i., onde há um pico de expressão. Considerando que a síntese de CBEL foi relatada como sendo expressa preferencialmente na fase de hifas do patógeno (COSTA, 2007), os dados podem sugerir que a detecção de transcritos durante a fase biotrófica representa a proliferação de hifas invasivas, enquanto que o pico em 96 h.a.i. deve-se ao crescimento extenso e aumento da biomassa do patógeno.

A transcrição de genes incluídos no grupo V (*NPP101*, *NPP103* e *RXLR01*) foi restrita preferencialmente na transição da fase biotrófica para necrotrófica, com expressões máximas observadas para 96 h.a.i. Sendo indicativos de expressão de ambos entre estágios mais tardios da interação. Por outro lado, apenas o gene *Elicitina02* ficou em um grupo exclusivo, devido seu perfil de expressão modulado preferencialmente e mais intensamente na fase de propagação biotrófica do patógeno. Entretanto, este gene pode ser considerado interessante para estudos posteriores visto que foi silenciado as 6 h.a.i. durante interação.

Em síntese, durante a interação de *P. parasitica* com raízes de *C. sunki*, somente 08 dos 17 genes estudados apresentaram perfil de expressão *upregulated* as 3 h.a.i., apesar disso, 16 genes foram expressos as 96 h.a.i, a maioria com altos níveis de expressão nesse estágio tardio da interação, onde provavelmente já ocorreu a propagação do patógeno nos tecidos vegetais.

Já para a interação *P. trifoliata*-*P. parasitica*, os dados de padrões de expressão agruparam os 17 genes candidatos a efetores também em 6 grupos principais. No grupo I foram incluídos os genes *Elicitina02* e *RXLR02*, os quais foram fortemente induzidos durante o contato precoce com células hospedeiras, entre 3 e 6 h.a.i. e intensidades altas e semelhantes durante a infecção tardia, a 48 h.a.i. No grupo II, assim como no primeiro, contem genes (*NPP104*, *CBEL01* e *RXLR17*), altamente expressos durante os estágios iniciais de interação, de 3 a 6 h.a.i., contudo, novos picos de expressão foram verificados a 96 h.a.i. com intensidades próximas aos verificados inicialmente. O padrão de expressão observado para os grupos I e II pode ser indicativo de que estes genes são requeridos imediatamente após o contato do patógeno com o hospedeiro, e fortemente induzidos a fim de promover a penetração nas células, ou elicitação de respostas de defesa, durante o período entre 3 e 6 h.a.i. Contudo, a expressão aumentada novamente durante a fase necrotrófica sugere a necessidade de síntese *de novo* durante a interação tardia.

Em contrapartida, os genes classificados no grupo III (*CBEL02* e *RXLR01*) foram preferencialmente mais expressos no estágio precoce de interação, a 6 h.a.i., seguidos de intensidades mais baixas e estáveis ao longo dos demais pontos temporais. Em corroboração ao padrão de expressão precoce dos conjuntos I, II e III, Attard et al. (2014) encontraram diversos genes foram fortemente acumulados durante o período de penetração em *A. thaliana* mediada por apressório de *P.*

parasitica. Segundo estes autores, esta fase foi enriquecida por alguns dos genes aqui encontrados e que são importantes para a patogenicidade, entre eles, elicitinas, NPP1 e RXLR. Considerando ainda a resistência de *P. trifoliata* a *P. parasitica*, a forte indução destes genes durante estágios precoces de interação pode estar atrelada a hipótese formulada por Kebdani et al. (2010), de que estes atuam, conjuntamente, na tentativa de supressão de repostas de defesa da planta ou modificação das células hospedeiras a fim de facilitar a invasão pelo patógeno. A partir disto, seria justificado valores de intensidade menores da parte destes genes durante estágios biotróficos intermediários, mediante as possíveis respostas de defesa da planta resistente e posterior síntese *de novo* em estágios tardios na tentativa de efetivar a invasão.

Os genes classificados no grupo IV (*CBEL03* e *CBEL04*) acumularam transcritos em níveis próximos entre si ao longo das fases biotrófica e necrotrófica. Esse padrão pode indicar que os dois candidatos a efetores CBEL presentes neste grupo foram constantemente expressos durante a infecção, desde os estágios precoces de penetração até o desenvolvimento necrotrófico. Considerando a função de CBEL na aposição do patógeno da parede celular hospedeira, os dados sugerem, portanto, que *P. parasitica* mantém a indução destes genes a fim de promover adesão à celulose das células hospedeiras de *P. trifoliata* durante todas as etapas do processo de infecção.

Genes incluídos no grupo V (*NPP101*, *CRN* e *RXLR08*) tiveram níveis de expressão *upregulated* apenas a 6 h.a.i. mantendo a expressão em níveis semelhantes ao longo dos demais pontos temporais de interação. Estes dados possivelmente indicam a não participação destes genes durante o início da penetração em células hospedeiras, as 3 h.a.i.

Finalmente, genes do grupo VI (*NPP103*, *RXLR11* e *Elicitina03*) apresentaram perfis de expressão exclusivos quanto aos demais. Entre eles o nível de transcritos além de ter sido baixo, a expressão foi observada apenas em alguns dos pontos temporais de interação. Sugerindo, portanto, o não envolvimento direto dos produtos desses genes no desenvolvimento de *P. parasitica* durante a infecção. Entretanto, a expressão observada em estágios tardios pode indicar que a síntese *de novo* seja requerida em alguns pontos temporais frente a infecção, sugerindo que a necessidade da transcrição seja para suprimir mecanismos de defesa de *P. trifoliata* ou facilitar a invasão em suas células.

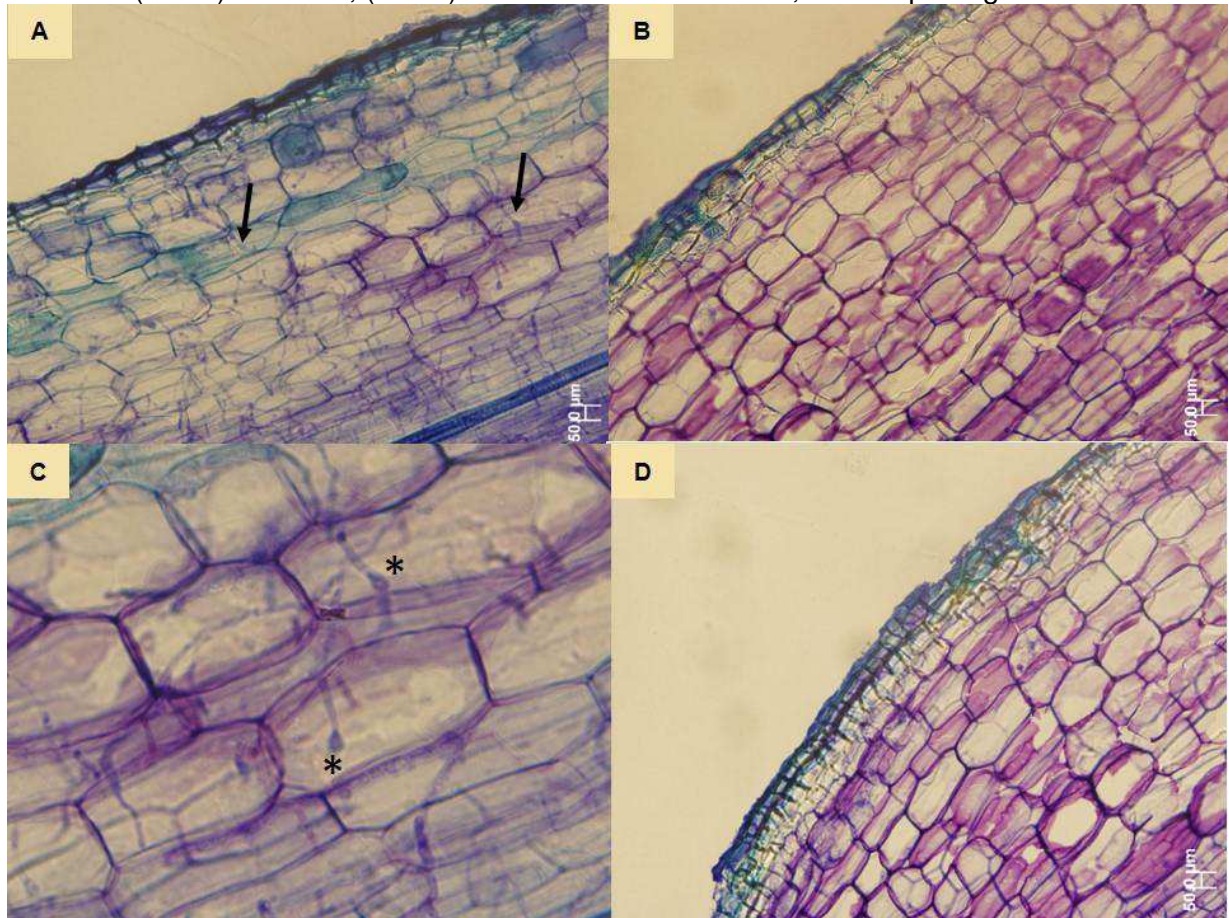
Em síntese, diferentemente dos dados observados sobre *C. sunki*, durante a interação de *P. parasitica* com raízes da espécie resistente *P. trifoliata* observou-se que 12 dos 17 genes estudados apresentaram perfil de expressão *upregulated* as 3 h.a.i., com níveis de expressão que observados em todos os *time points* da interação, chegando 16 genes a estarem expressos as 96 h.a.i. Além disso, observou-se que a composição dos grupos hierárquicos apresentou mais diversidade de classes de genes/grupo do que na interação com *C. sunki*, indicando que diferentes efetores, com diferentes funções são requeridos conjuntamente expressos na estratégia de ataque de *P. parasitica* na tentativa de burlar a resistência de *P. trifoliata* e ter um estabelecimento infeccioso bem sucedido.

5.6 Análise histológica da interação citros-*P. parasitica* as 96 h.a.i.

A fim de averiguar tecidos radiculares de *C. sunki* e *P. trifoliata* sobre infecção com o oomiceto *P. parasitica* as 96 h.a.i., raízes de ambas as espécies inoculadas com zoósporos foram caracterizadas sob microscopia de luz. Os resultados de microscopia mostraram que a colonização do patógeno foi contrastante sobre a espécie suscetível e resistente.

No estágio de interação referente as 96 h.a.i. foram visualizadas hifas distribuídas ao longo de todo o córtex de *C. sunki* (Figura 11 A). Além da elevada colonização de hifas intracelulares foi possível observar o desenvolvimento de estruturas de reprodução do patógeno, esporângios (Figura 11 C). Estes resultados corroboram com Escanferla (2011) que analisou raízes de *C. sunki* inoculadas com *P. parasitica* nas mesmas condições do presente trabalho aos 4 d.a.i. Neste estudo, altas quantidades de hifas intra e intercelulares foram visualizadas além da presença de esporângios na epiderme da raiz. Resultados similares foram encontrados também por Wang et al. (2011) na interação compatível entre *A. thaliana*-*P. parasitica*, onde a partir de 48 h.a.i. foi observada alta colonização do patógeno nos tecidos radiculares marcada pela presença de hifas intra e intercelulares, além da visualização de esporângios.

Figura 11 – Micrografias sob luz de cortes longitudinais de raízes de citros inoculadas com zoósporos de *P. parasitica* as 96 h.a.i., em solução de Karnovsky e coradas com azul de toluidina. (A – C) *C. sunki*, (B – D) *P. trifoliata*. Setas = hifas, e * = esporângios.



Fonte: dados da pesquisa.

Por outro lado, em *P. trifoliata* apesar da análise de múltiplas secções longitudinais, não foi visualizada a presença de hifas nem de esporângios. Além disso, foi possível observar a aparência saudável do tecido radicular com células túrgidas (Figura 11 B, D). Escanferla (2011) e Widmer, Graham e Mitchell (1998), analisaram tecidos radiculares de plantas resistentes a *P. parasitica*, citrumeleiro Swingle e *P. trifoliata*, respectivamente, nas mesmas condições do presente trabalho. Em ambos os estudos foram encontradas hifas do patógeno distribuídas ao longo do córtex, embora em proporção muito inferior àquela encontrada nas espécies suscetíveis. Além disso, houve maior porcentagem de hifas intercelulares em ambos do que intracelulares. Adicionalmente, também foi relatada nestes trabalhos a ausência de esporângio as 96 h.a.i.

O ensaio de patogenicidade e análise microscópica demonstraram que há diferenças na infecção por *P. parasitica* em raízes de plantas hospedeiras

suscetíveis e resistentes as 96 h.a.i. Além disso, a análise do padrão de expressão gênica de efetores *P. parasitica*, contando com genes fortemente expressos as 96 h.a.i., pode ser consequência do forte acúmulo de biomassa do patógeno identificado por meio desta análise histológica sobre a espécie suscetível, *C. sunki*. Widmer, Graham e Mitchell (1998) verificaram que mesmo *P. trifoliata* apresentando uma significativa redução na colonização do patógeno em suas raízes, respostas celulares típicas para um hospedeiro resistente, como a formação de calose ou resposta de hipersensibilidade, não foram observadas no córtex. Segundo eles, este resultado permite inferir que outro fator, ou fatores, putativos de resistência nas raízes desta espécie devem atuar na inibição do crescimento de *P. parasitica*.

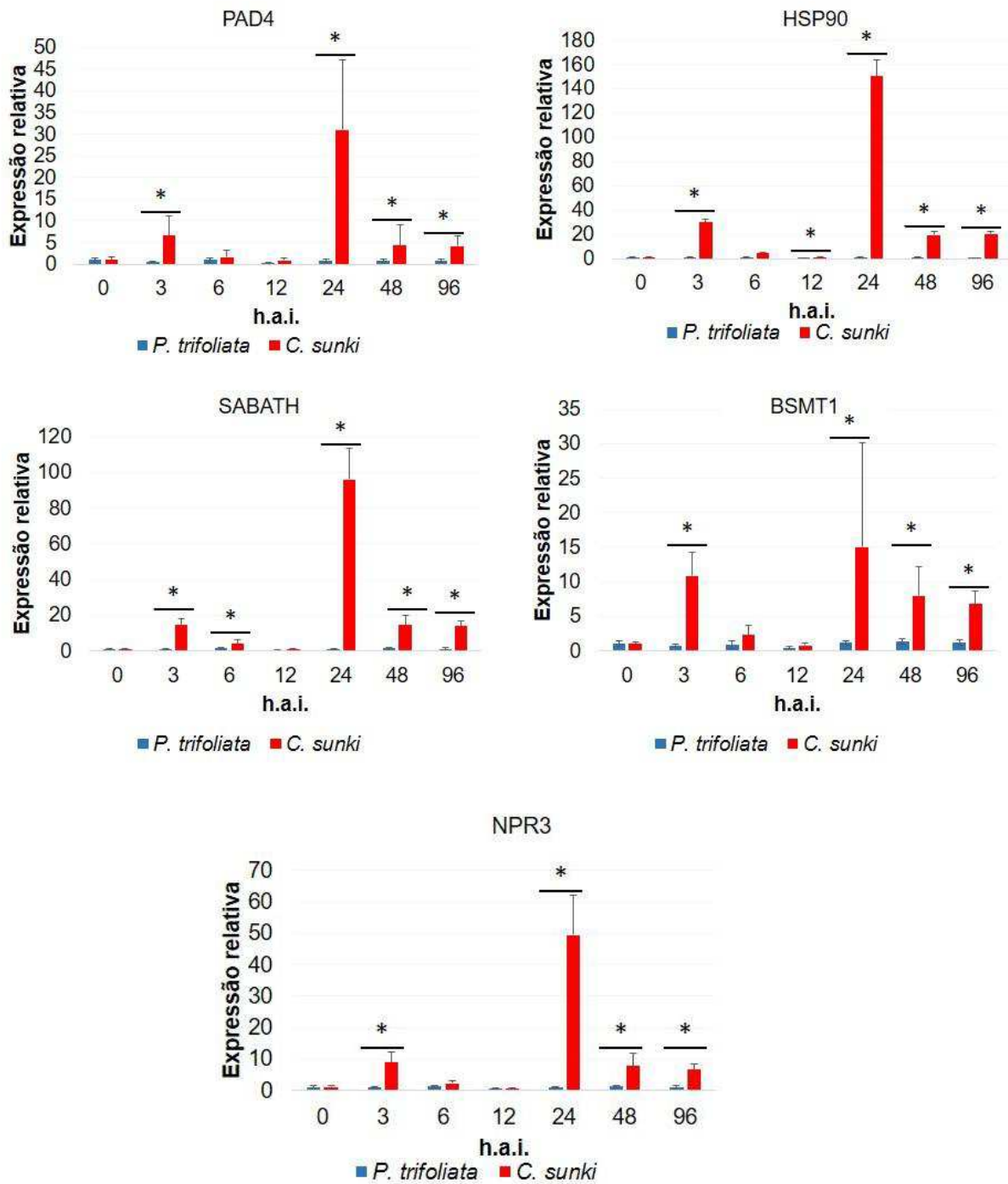
5.7 Análise quantitativa da expressão de genes associados às cascatas de respostas de citros a *P. parasitica*

A análise citológica descrita indicou a aparente suscetibilidade de *C. sunki*, em função da expansiva colonização por *P. parasitica*, em detrimento a infecção não visualizada sobre *P. trifoliata*. Além disso, foi possível observar por meio de RT-qPCR, que o patógeno é capaz de modular diferencialmente a transcrição de genes candidatos a efetores sobre as duas espécies inoculadas. Com base nesse pressuposto, experimentos de RT-qPCR foram então realizados utilizando as mesmas amostras da análise dos genes efetores, a fim de avaliar o perfil de expressão de 10 genes que codificam proteínas envolvidas na sinalização da cascata de defesa, incluindo genes associados à via do ácido salicílico (SA), no intuito de identificar possíveis respostas dessas plantas a infecção por *P. parasitica*, que possam contribuir para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na resistência de *P. trifoliata* e na suscetibilidade de *C. sunki*.

5.7.1 GENES ASSOCIADOS A VIA DE SINALIZAÇÃO DO SA

Genes relacionados à via de sinalização do SA apresentaram um perfil de expressão diferente em plantas de *C. sunki* e *P. trifoliata* infectadas com *P. parasitica*. Alterações na expressão destes genes se mostraram claramente significativas ($p < 0,05$) entre as duas espécies durante a maioria dos pontos temporais de interação. Transcritos de *HSP90*, *NPR3*, *SABATH*, *BSMT1*, *PAD4*, *WRKY28* e *WRKY70* em *C. sunki* foram acumulados inicialmente as 3 h.a.i., com síntese *de novo* as 24 h.a.i. tendo sido detectados como dois picos de expressão. Por outro lado, todos estes genes foram fracamente detectados em raízes inoculadas de *P. trifoliata* ao longo do *time course*, contando com valores máximos correspondentes a apenas 1 vez mais expressos (Figura 12).

Figura 12 - Perfil de expressão relativa de genes associados a via de sinalização do SA de *C. sunki* e *P. trifoliata* durante interação com *P. parasitica*. Os níveis de RNAm relativos foram quantificados, por RT-qPCR, em amostras correspondentes as raízes das plântulas inoculadas em diferentes pontos temporais de infecção. Os dados são apresentados como expressão relativa aos genes de referência GAPC2, EGIDH e DIM1 para amostras de *C. sunki* e, Cyclo, FBOX e GAPC2 para *P. trifoliata*. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis: * $P < 0,05$.



Fonte: dados da pesquisa.

O gene *PAD4*, caracterizado por atuar *upstream* na via do SA, foi significativamente expresso em *C. sunki* com picos as 3 h.a.i. e 24 h.a.i. Por outro lado, em *P. trifoliata* sua expressão foi mantida em nível basal (Figura 12). Diversos trabalhos relataram a superexpressão de *PAD4* durante interação com patógenos diversos, atuando *upstream* na via e modulando os níveis de SA dentro da célula (ZHOU et al., 1998; XING, CHEN et al., 2006; ZHU et al., 2011). O complexo *EDS1-PAD4-SAG101*, é conhecido como importante regulador da imunidade das plantas contra muitos patógenos, atuando após o reconhecimento de efetores por proteínas R, e controlando o nível de SA intracelular (ZHU et al., 2011). Nesse sentido, a alta modulação do gene *PAD4* pode estar correlacionada em *C. sunki* com a defesa induzida por proteínas R após o reconhecimento dos efetores de *P. parasitica*.

O nível de expressão do gene *HSP90* foi significativamente regulado pelo genótipo suscetível após a interação com *P. parasitica*, onde níveis máximos de transcritos foram acumulados as 24 h.a.i (Figura 12). A expressão de *HSP90* contando com um aumento de 50% no acúmulo de transcritos a 24 h.a.i. e manutenção alta de indução também foi relatado na interação *C. sinensis-Xanthomonas axonopodis pv. Citri* (GARAVAGLIA et al., 2009). A expressão basal deste gene em *P. trifoliata* corrobora com os dados encontrados por Martinelli et al. (2012), onde foi observada a sub-regulação de *HSP90* em diferentes fases da doença HLB em *Citrus sinensis*. Segundo estes autores, essa proteína está envolvida, principalmente, na transdução do sinal que conduz à indução de respostas de defesa. Além disso, atua na ativação de proteínas R citosólicas e na estabilidade dessas proteínas durante interações planta-patógeno. Nesse sentido, a fraca expressão de *HSP90* em *P. trifoliata* pode restringir o enrolamento correto de proteínas R, como relatado por Martinelli et al. (2012), o que conduziria a instabilidade em sua conformação e consequente inibição no processo de sinalização que culminaria na resistência induzida por HR nesta espécie.

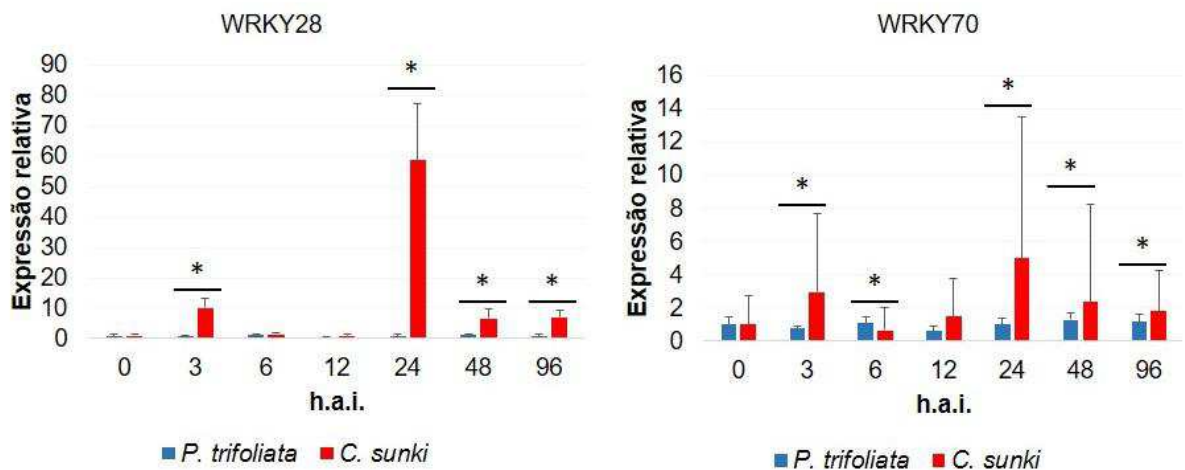
A expressão do gene *SABATH* e um dos membros pertencentes a sua família, o gene *BSMT1*, foi intensa e significativamente regulada para cima em raízes de *C. sunki* nos estádios iniciais da interação, as 3 h.a.i. e 24 h.a.i., com níveis de expressão que foram mais elevados para *SABATH* do que para *BSMT1*. E, assim como os demais genes associados à via do SA analisados, estes dois genes apresentaram expressão basal ao longo do *time course* em *P. trifoliata* (Figura 12). Ambos os genes atuam no metabolismo do SA, convertendo parte do SA em seu

derivado volátil, MeSa, a fim de prevenir a toxicidade provocada por altas concentrações do hormônio dentro da célula (AN; MOU, 2011). Logo, o acúmulo de transcritos de ambos os genes em raízes infectadas de *C. sunki* pode estar associado às elevadas concentrações de SA mediante a interação, dados reforçados quando se analisa o perfil de indução de outros genes anteriormente relatados e associados à cascata do SA. Por outro lado, a fraca expressão desses genes em *P. trifoliata* sustenta a hipótese de que esta espécie possivelmente não responde ao patógeno pela via do SA. Uma vez que, se positivo, o acúmulo de SA mediante interação com *P. parasitica*, a expressão intensa de *SABATH* e *BSMT1* provavelmente seria requerida a fim de garantir a homeostase da célula hospedeira.

Transcritos *NPR3* foram significativamente modulados em *C. sunki* ao longo da maior parte dos pontos temporais, em contraste com a expressão basal detectada em *P. trifoliata* (Figura 12). Níveis mais elevados da expressão do gene *NPR3* possivelmente sinalizam a resposta de *C. sunki* a fim de induzir HR, pois segundo Fu et al. (2012), durante a ativação de ETI, disparada após a interação com patógenos, os níveis SA aumentam em nível local e sistemicamente. Nesta condição, *NPR3* atua *downstream* na via mediando a degradação da NPR1 e liberando conseqüentemente a supressão que esta exerce sobre a morte celular e, portanto, induzindo à HR.

A infecção de raízes de *C. sunki* com *P. parasitica* conduziu o acúmulo de transcritos de genes que codificam dois fatores de transcrição do tipo *WRKY*, com abundância máxima e significativa ($p < 0,05$) de expressão as 3 e 24 h.a.i. Enquanto que a expressão em raízes de *P. trifoliata* apresentou valores muito inferiores, mantendo expressão basal assim como os demais genes associados a via do SA (Figura 13).

Figura 13 – Perfil de expressão relativa de fatores de transcrição do tipo WRKY de *C. sunki* e *P. trifoliata* durante interação com *P. parasitica*. Os níveis de RNAm relativos foram quantificados, por RT-qPCR, em amostras correspondentes as raízes das plântulas inoculadas em diferentes pontos temporais de infecção. Os dados são apresentados como expressão relativa aos genes de referência GAPC2, EGIDH e DIM1 para amostras de *C. sunki* e, Cyclo, FBOX e GAPC2 para *P. trifoliata*. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis: *P <0,05.



Fonte: dados da pesquisa.

Observações semelhantes aquelas encontradas para a espécie suscetível foram observadas em raízes de *Citrus*, abrangendo as espécies *C. sinensis*, *C. clementina* e *Citrus unshiu*, submetidas ao estresse biótico de interação com *P. parasitica*. Nesta condição, entre 47 genes *WRKY* avaliados, 24 foram regulados positivamente incluindo *WRKY 28* e *WRKY 70*, embora este último tenha sido acumulado em folhas. Os autores enfatizaram que os dados de expressão encontrados para *WRKY28* caracteriza seu envolvimento em resposta a *P. parasitica* ao longo do tempo (AYADI et al., 2016).

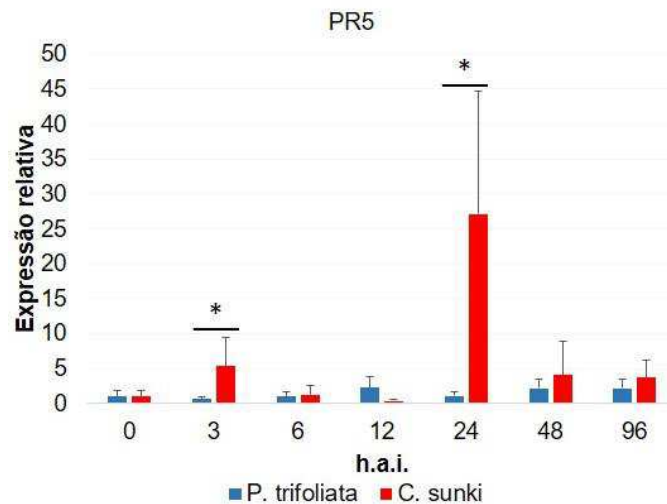
A expressão do fator de transcrição *WRKY70* foi regulada positivamente por *A. thaliana* durante a interação com *Pseudomonas syringae*, onde foi detectado o acúmulo de transcritos máximo a 24 h.a.i., estando associado segundo os autores a execução de um papel significativo na defesa basal da planta (HU; DONG; YU, 2012). Para Hu, Dong e Yu (2012) a indução de *WRKY70* é parcialmente dependente de SA endógeno e que o acúmulo de transcritos desse gene está envolvido na resposta da planta contra patógenos biotróficos. Essa hipótese possivelmente justifica a indução intensa a 24 h.a.i. observada no presente trabalho em *C. sunki*, correspondendo ao estágio de transição para o desenvolvimento

necrotrófico do patógeno. *WRKY0* desempenha uma função antagonista entre SA e JA, onde a regulação positiva na indução de *WRKY70* conduz ao aumento da regulação de genes *PR* e regulação negativa de PDF1.2, levando a uma maior resistência contra patógenos biotróficos e susceptibilidade reforçada a patógenos necrotróficos (SHIM et al., 2013).

5.7.1.1 GENE *PR-5*

O perfil de transcritos que codificam para uma proteína do tipo taumatina, da família *PR-5*, foi diferencialmente modulado para cima entre as espécies suscetível e resistente inoculadas com *P. parasitica*. Em *C. sunki*, o nível de transcritos *PR-5* foi positivamente regulado as 3 h.a.i., e significativamente ($p < 0,05$) mais elevado do que o nível observado para o genótipo resistente entre os tempos de 24, pico de expressão, as 96 h.a.i. Em contrapartida, *P. trifoliata* apresentou regulação positiva do gene *PR-5*, ainda que em nível mais baixo, com valores correspondentes a 2 vezes mais expresso as 12, 48 e 96 h.a.i., contando, inclusive, com regulação positiva significativa as 12 h.a.i., quando o nível de expressão em *C. sunki* não foi detectado (Figura 14).

Figura 14 – Perfil de expressão relativa de um gene PR-5 de *C. sunki* e *P. trifoliata* durante interação com *P. parasitica*. Os níveis de RNAm relativos foram quantificados, por RT-qPCR, em amostras correspondentes as raízes das plântulas inoculadas em diferentes pontos temporais de infecção. Os dados são apresentados como expressão relativa aos genes de referência GAPC2, EGIDH e DIM1 para amostras de *C. sunki* e, Cyclo, FBOX e GAPC2 para *P. trifoliata*. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis: *P <0,05.



Fonte: dados da pesquisa.

Os dados de expressão são semelhantes aos encontrados por Teixeira (2005) durante interação citros-*P. parasitica*, onde foi detectável um pico de indução em *P. trifoliata* a 12 h.a.i. e supressão em *C. sunki*. Além disso, os níveis de expressão da espécie resistente foram mantidos em duas vezes mais expressos de 48 a 96 h.a.i. Contudo, o perfil de expressão foi contrastante em *C. sunki*, uma vez que a detecção do gene *PR-5* foi fracamente relatada a 24 h.a.i. pela autora, com um pico de expressão, também em baixo nível, apenas a 72 h.a.i. De acordo com Teixeira (2005), é possível que níveis basais de transcritos *PR-5* participem da resistência de *P. trifoliata* a *P. parasitica*.

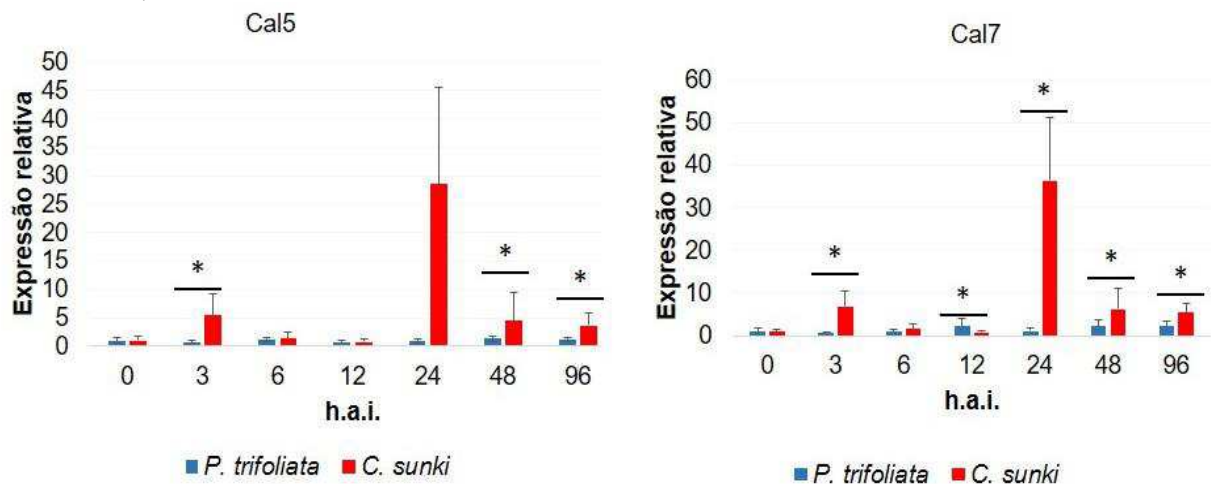
Estes resultados contrastam com os encontrados por Boava et al. (2011a). Neste estudo, o nível do gene *PR-5* foi significativamente regulado para cima em 24 e 48 h.a.i. em *P. trifoliata* inoculado com *P. parasitica*. Em *C. sunki*, o nível do gene *PR-5* foi significativamente reprimido a 24 e 48 h.a.i. Proteínas do tipo *PR-5* tem sido relacionadas com atividade específica contra oomicetos. Uma osmotina de tabaco induz estresse osmótico em patógenos, e seus homólogos em tomate e batata já foram demonstrados como apresentando atividade antioomiceto contra *P. infestans*,

embora o mesmo não ocorra contra *P. parasitica* (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). Diante dos dados aqui relatados, outras investigações são necessárias a fim de inferir a validação da função biológica de *PR-5* em espécies suscetíveis e resistentes de citros e, para melhor caracterizar seus padrões de expressão sob condições de interação com o fitopatógeno *P. parasitica*.

5.7.2 GENES CALOSE SINTASE

A expressão de genes que codificam duas caloses sintases foi acumulada ao longo do tempo, mostrando diferenças significantes ($p < 0,05$) na regulação positiva entre as duas espécies para *Cal5* as 3, 48 e 96 h.a.i. e, para *Cal7*, em todos os pontos temporais com exceção de 6 h.a.i. Os dois genes foram induzidos em raízes de *C. sunki* as 3 h.a.i. e intensamente acumulados a 24 h.a.i. Por outro lado, em raízes de *P. trifoliata* o perfil de expressão de *Cal5* foi fracamente acumulado em torno de 1 vez mais expresso, enquanto que *Cal7*, apesar de apresentar baixo nível de indução, apresentou-se 2 vezes mais expresso as 3, 48 e 96 h.a.i (Figura 15).

Figura 15 – Perfil de expressão relativa de genes calose sintases de *C. sunki* e *P. trifoliata* durante interação com *P. parasitica*. Os níveis de RNAm relativos foram quantificados, por RT-qPCR, em amostras correspondentes as raízes das plântulas inoculadas em diferentes pontos temporais de infecção. Os dados são apresentados como expressão relativa aos genes de referência GAPC2, EGIDH e DIM1 para amostras de *C. sunki* e, Cyclo, FBOX e GAPC2 para *P. trifoliata*. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis: * $P < 0,05$.



Fonte: dados da pesquisa.

Portanto, a espécie suscetível induz rapidamente a síntese de calose sintases no primeiro contato com *P. parasitica* e recorre à síntese *de novo* na transição para o estágio necrotrófico, possivelmente a fim de fornecer uma barreira física contra a colonização expansiva pelo patógeno. Calose é produzida em diferentes locais e sob resposta a fatores bióticos e abióticos. Durante infecções fúngicas a calose é depositada em aposições da parede celular nos locais de infecção e estima-se que proporciona uma barreira para penetração (NISHIMURA et al., 2003). Em *A. thaliana* foi proposto que *Cal5* é responsável pela deposição de calose nas paredes primárias para formação do pólen (DONG et al., 2005). Wawrzynska, Rodibaugh e Innes (2010) encontraram que *Cal5* participa da homeostase natural nas células de *A. thaliana*, contudo a perturbação dessa homeostase devido a presença do patógeno conduz *Cal5* a participar da biossíntese de calose induzida pelo estresse. Apesar disso, a espécie resistente *P. trifoliata* aparentemente não recorre a esta resposta de indução de *Cal5* frente a interação com *P. parasitica*.

Estes resultados corroboram com os encontrados por Hao et al. (2008), no estudo envolvendo a interação entre *Nilaparvata lugens* *Stal*- *BPH*- *Oryza sativa*, entre genótipos resistentes e suscetíveis. Neste, foi detectada a presença de transcritos de quatro calose sintases *OsGSL1*, *OsGSL3*, *OsGSL5*, e *OsGSL7* em ambos os genótipos. Inclusive os autores encontraram que *OsGSL5*, e *OsGSL7* foram regulados positivamente inicialmente a 6 h.a.i. alcançando níveis elevados entre 24 a 96 h.a.i. Os autores relataram ainda que as maiores expressões foram detectadas entre as plantas resistentes, sugerindo, portanto que genes calose sintase foram up-regulados e, conseqüentemente, a síntese de calose foi reforçada tanto em plantas resistentes como susceptíveis atacadas pelo BPH.

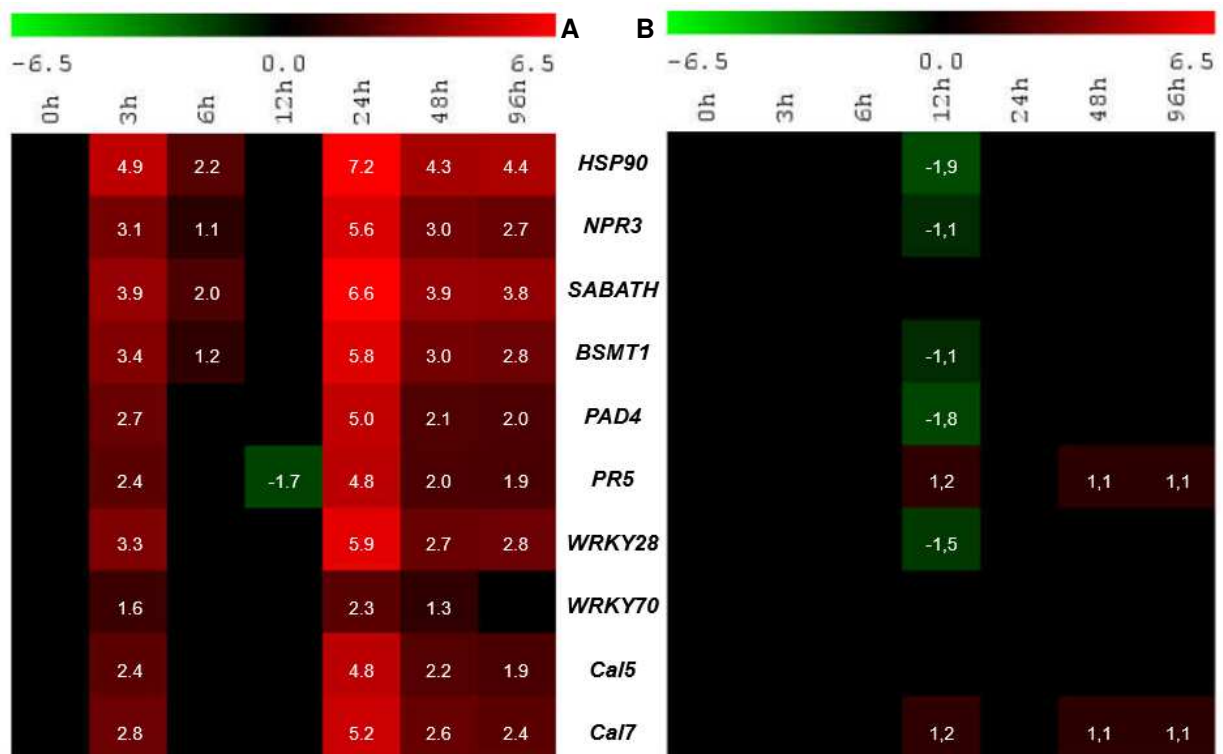
5.8 Padrão de expressão de genes associados às cascatas de respostas de citros a *P. parasitica*

Os dados da análise em PCR quantitativo revelaram padrões similares ou tendências de expressão dentro dos perfis observados em cada espécie de citros inoculada com *P. parasitica*. Curiosamente, os 10 genes selecionados por estarem envolvidos nas respostas de plantas a patógenos foram regulados positivamente e modulados para cima em *C. sunki* nos pontos temporais de interação 3, 48 e 96 h.a.i., enquanto que somente 04 genes (*HSP*, *NPR3*, *SABATH* e *BSMT1*) no ponto 6

h.a.i. Por outro lado, o tempo 12 h.a.i. apareceu como ponto crítico da interação, onde ocorreu a supressão da expressão do gene *PR-5* e nenhuma expressão foi detectada para os demais 09 genes (Figura 16).

Surpreendentemente, em *P. trifoliata* somente 02 destes genes (*PR-5* e *Cal7*) foram regulados positivamente nos pontos temporais as 12, 48 e 96 h.a.i., enquanto que 05 genes (*HSP*, *NPR3*, *BSMT1*, *PAD4* e *WRKY28*) foram suprimidos as 12 h.a.i. e 03 (*WRKY70*, *Cal5* e *SABATH*) não tiveram sua expressão detectada em nenhum dos *time points* estudados (Figura 16).

Figura 16 – Perfil de expressão de genes associados às cascatas de respostas de raízes de *C. sunki* (A) e *P. trifoliata* (B) a *P. parasitica*. O nível de expressão dos genes está indicado como uma transformação Log2 a partir do valor relativo. Verde e vermelho foram utilizados para condições *down-regulated* e *up-regulated*, respectivamente. Os níveis de transcrição foram normalizados em relação à expressão de GAPC2, EGIDH e DIM1 para amostras de *C. sunki* e, Cyclo, FBOX e GAPC2 para *P. trifoliata*.



Fonte: dados da pesquisa.

Nas raízes inoculadas de *C. sunki*, o padrão de expressão foi tipicamente marcado por dois picos principais, onde transcritos foram acumulados inicialmente as 3 h.a.i., posteriormente, houve um com acúmulo abundante as 24 h.a.i e manutenção na expressão entre 48 e 96 h.a.i., embora com níveis mais baixos

(Figura 16). Este perfil de expressão pode ser justificado considerando a relação estabelecida entre PTI e ETI proposta por Tsuda e Katagiri (2010). Segundo estes autores, embora a maquinaria de sinalização entre PTI e ETI seja usada na forma de uma rede de sinalização integrada, a ativação de ambos é utilizada de maneira diferente. Os autores especularam que, é possível que a rede compartilhada contenha múltiplos pontos de entrada, e que diferenças nos níveis e/ou temporização de várias entradas resultam em diferentes maneiras de utilização da rede partilhada. As diferentes formas de uso da rede foram então representadas por: respostas induzidas são transitórias em PTI e prolongadas em ETI. Ou seja, relações sinérgicas entre os setores de sinalização são evidentes no PTI, que pode amplificar o sinal; enquanto que relações compensatórias entre os setores dominam em ETI, o que explica a robustez desta contra perturbações genéticas e patogênicas. Estas diferenças podem explicar a indução inicial transitória dos genes associados à cascatas de defesa, e posterior intensificação prolongada no estágio tardio.

Perfil semelhante de expressão foi relatado por Attard et al. (2010) durante a interação compatível *A. thaliana*-*P. parasitica*. Os autores relataram que alguns dos transcritos, inclusive associados a via do SA, foram acumulados inicialmente as 2,5 h.a.i., contando com uma redução as 6 h.a.i. e, posterior aumento gradual detectado até 30 h.a.i. Segundo eles, o decréscimo da expressão as 6 h.a.i. pode ser um reflexo da manipulação de respostas de defesa do hospedeiro por efetores do oomiceto.

Resultados semelhantes foram encontrados na interação soja-*P. sojae*, onde os níveis de expressão para muitos genes de defesa analisados foram regulados positivamente as 24 h.a.i., embora este aumento na expressão tenha resultado em um posterior declínio de transcritos a 48 h.a.i. Segundo os autores, o tempo de amostragem 24 h.a.i. representou, portanto, um ponto de virada no processo de infecção, podendo estar correlacionado a transição da fase biotrófica para necrotrófica do patógeno. Sugerindo que este período recruta um acúmulo de transcritos de genes de defesa mediante a colonização pelo patógeno e consequente diversidade de genes efetores secretados (MOY et al., 2004). Logo, a posterior redução nos níveis de expressão entre 48 e 96 h.a.i. pode refletir a baixa quantidade de transcritos no estágio necrotrófico, onde uma diversidade de genes

efetores de *P. parasitica* foram amplamente expressos sobre *C. sunki* atuando, possivelmente, na manipulação desses genes de resposta.

O perfil de expressão encontrado em *P. trifoliata* inoculado com o patógeno revelou que transcritos associados a via de sinalização do SA, *HSP90*, *NPR3*, *BSMT1*, *PAD4* e *WRKY28* foram silenciados, enquanto que os genes *WRKY70* e *SABATH* não foram sequer acumulados nos pontos temporais e nas condições estudadas (Figura 16). Logo, o presente resultado é um indicativo que *P. parasitica* silencia a expressão de genes associados a via do SA em *P. trifoliata* durante a interação. Apenas genes que codificam para uma proteína da família PR5 e uma calose sintase foram detectados em alguns pontos temporais de interação, apesar de apresentarem um baixo nível de intensificação. Este resultado é um indicativo, portanto, que *P. trifoliata* expressa estes dois genes possivelmente afim de induzir barreiras bioquímicas e estruturais, respectivamente, contra a infecção pelo patógeno. Os dados de expressão em PR5 corroboram com os encontrados por Teixeira (2005), que relatou a detecção de transcritos deste gene as 12 h.a.i. contando posteriormente com uma redução no nível de expressão até 48 h.a.i.

Portanto, o bioensaio de interação desenvolvido no presente estudo permitiu detectar que genes associados à SA e genes calose sintase de plantas foram ativados em raízes de citros durante interação com *P. parasitica*. Este resultado sugere a validação do método para estudos dessa natureza, uma vez que, para Attard et al. (2010), conhecimentos acerca dos mecanismos de defesa são concentrados em folhas, havendo escassez sobre a base genética das respostas de raízes a fitopatógenos do solo.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados alcançados neste trabalho é possível concluir que:

- *Primers* selecionados e sintetizados são eficientes na quantificação de níveis de expressão de genes efetores apoplásticos e citoplasmáticos do isolado IAC 01-95 de *P. parasitica* modulada ao longo do *time course* das interações com de raízes de *C. sunki* e *P. trifoliata*, respectivamente;
- Dos 17 genes efetores estudados, 10 possuem expressão quantitativa relativa diferencial ao nível de significância induzida em *P. parasitica* após inoculação em raízes de *P. trifoliata*, sendo 06 apoplásticos e 04 citosólicos;
- Os perfis de expressão dos 17 genes efetores de *P. parasitica* apresentando dois picos máximos de expressão são indicativos da síntese *de novo* desses genes ao longo dos pontos temporais de interação, sendo o acúmulo dos transcritos mais precoce sobre *P. trifoliata* (as 6 h.a.i.) e mais tardia sobre *C. sunki* (as 96 h.a.i.);
- Os elevados níveis de expressão de genes efetores em *P. parasitica* induzidos por *C. sunki* as 96 h.a.i. devem corresponder a fase necrotrófica de vida do oomiceto, conseqüentemente devido ao sucesso na penetração das células vegetais suscetíveis com acúmulo de biomassa do patógeno;
- A presença de hifas intracelulares no córtex de raízes de *C. sunki*, abundantemente visualizada em micrografias as 96 h.a.i., deve ocorrer como consequência da suscetibilidade da planta ao patógeno;
- Seis grupos hierárquicos de genes co-regulados são formados a partir dos perfis de expressão dos 17 genes efetores em *P. parasitica*, os quais são reagrupados de modo diferente de acordo com a interação com *C. sunki* ou com *P. trifoliata*, indicando que o patógeno é capaz de reconhecer entre hospedeiros suscetível ou resistente e sintetizar seletivamente quais efetores e em que intensidade devem ser segregados;
- As raízes de *C. sunki* expressam 10 componentes de cascatas de resistência mediada pelo SA em resposta não bem-sucedida a infecção por *P. parasitica*;

- A supressão por *P. parasitica* da expressão 05 genes de cascatas de resistência mediada pelo SA observada em raízes de *P. trifoliata* indica tentativas do patógeno de burlar com a imunidade da planta;
- A resistência de *P. trifoliata* a *P. parasitica* não deve utilizar genes envolvidos na cascata de resistência mediada pelo SA, mas sim genes *PR-5* e *calose sintase*, envolvendo barreiras bioquímicas e estruturais;
- Portanto, o presente trabalho fornece uma nova visão para o entendimento acerca do processo de modulação de efetores de *P. parasitica* em interações suscetíveis e resistentes e, a maneira como estes hospedeiros respondem mediante interação.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. O.; PASSOS, O. S. **Citricultura brasileira em busca de novos rumos: desafios e oportunidades na região Nordeste**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. 160p.
- AMARAL, A. M. et al. Defining the predicted protein secretome of the fungal wheat leaf pathogen *Mycosphaerella graminicola*. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e49904, 2012.
- AN, C.; MOU, Z. Salicylic acid and its function in plant immunity. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 53, n. 6, p. 412-428, 2011.
- ANTUNES JÚNIOR, H. **Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2009. 14 p.
- ARAÚJO, E. F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M. POMPEU JUNIOR, J. (Ed). **Citros**. Campinas: IAC; FUNDAG, p. 115-123, 2005.
- ASIF, M. et al. Isolation of high-quality RNA from apple (*Malus domestica*) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, n. 15, p. 5227-5229, 2006.
- Associação Brasileira dos Exportadores de Citros. **Citricultura**. 2010. Disponível em: <<http://www.associtrus.com.br/index.php?xvar=mostra-noticia&id=1965&idtipo=6>>. Acesso em: 15 Abr. 2016.
- ATTARD, A. et al. Transcriptome dynamics of *Arabidopsis thaliana* root penetration by the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1, 2014.
- ATTARD, A. et al. The immediate activation of defense responses in *Arabidopsis* roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. **New Phytologist**, v. 187, n. 2, p. 449-460, 2010.
- ATTARD, A. et al. Strategies of attack and defense in plant–oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. Nicotianae* Breda de Haan). **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 83-94, 2008.

AYADI, M. et al. The WRKY Transcription Factor Family in *Citrus*: Valuable and Useful Candidate Genes for *Citrus* Breeding. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-28, 2016.

BASTIANEL, M. Clássicos da citricultura brasileira. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.34, n.2, p.75-88, 2013.

BASTOS, D. C. et al. Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.35, n.28, p.36-45, 2014.

BEN KHALED, S.; POSTMA, J.; ROBATZEK, S. A moving view: subcellular trafficking processes in pattern recognition receptor-triggered plant immunity. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 379-402, 2015.

BIRCH, P. R. et al. Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 4, p. 373-379, 2008.

BOAVA, L. P. et al (a). Expression of defense-related genes in response to mechanical wounding and *Phytophthora parasitica* infection in *Poncirus trifoliata* and *Citrus sunki*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 76, n. 2, p. 119-125, 2011.

BOAVA, L. P. et al (b). Global gene expression of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* and their hybrids under infection of *Phytophthora parasitica*. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 1, 2011.

BOUWMEESTER, K. et al. The lectin receptor kinase LecRK-I. 9 is a novel *Phytophthora* resistance component and a potential host target for a RXLR effector. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 3, p. e1001327, 2011.

BOZKURT, T. O. et al. Oomycetes, effectors, and all that jazz. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 4, p. 483-492, 2012.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

BUTTOW, M. V.; BONOW, S. **Estudos de expressão gênica e possibilidades de aplicação no melhoramento genético de pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch]**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2013. 27 p.

CAIXETA, M. P. **Espécies de *Phytophthora* associadas à gomose dos citros no estado do paraná**. Tese (Pós-Graduação em Agronomia). Paraná, 2010.

CAMPOS, M. A.; RESENDE, M. L. V.; SILVA, M. S. Interações moleculares planta-patógeno. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS, F. B. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011.

CASAGRANDE, E. C. et al. Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p.168-184, 2001.

CATANZARITI, A. M.; DODDS, P. N.; ELLIS, J. G. Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, v. 269, n. 2, p. 181-188, 2007.

CHANG, Y.; YAN, H. Z.; LIOU, R. F. A novel elicitor protein from *Phytophthora parasitica* induces plant basal immunity and systemic acquired resistance. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 123-136, 2015.

CHAUDHARI, P. et al. Effector biology during biotrophic invasion of plant cells. **Virulence**, v. 5, n. 7, p. 703-709, 2014.

CHEN, C. et al. EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. **Tree Genetics & Genomes**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2008.

CHRISTINO, J. A. R. Expressão transiente de genes repórter em plantas de arroz e tabaco através de vetores virais. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 25., Porto Alegre, 2013. **Resumos... XXV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS**, 2013.

COLAS, V. et al. Elicitin genes expressed in vitro by certain tobacco isolates of *Phytophthora parasitica* are down regulated during compatible interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 3, p. 326-335, 2001.

COOKE, D. E. L. et al. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. **Fungal Genetics and Biology**, v. 30, n. 1, p. 17-32, 2000.

COSTA, P. S. C. **Expressão de genes em *Phytophthora nicotianae* que codificam proteínas indutoras de respostas de defesa em plantas.** Tese (Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal). Minas Gerais, 2007.

CRISTOFANI, M. et al. Programa de melhoramento de citros por hibridação controlada no Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC em 1997-2005. **Laranja**, v. 26, n. 1, p. 121, 2005.

DALIO, R. J. D. et al. Candidate cytoplasmic-effector proteins from the RxLR and CRN family of *Phytophthora parasitica*, causal agent of citrus gummosis. IN: Congresso brasileiro de Fitopatologia, 47., 2014, Londrina. **Anais...** 47° Congresso brasileiro de Fitopatologia, Vol. 39, 2014.

DANDLEN, S. A. **Aplicações biotecnológicas do supressor de silenciamento de cucumber mosaic virus.** Tese (Pós Graduação em Ciências Agrárias), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, 2016.

DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 8, p. 539-548, 2010.

DONG, S. et al. The NLP toxin family in *Phytophthora sojae* includes rapidly evolving groups that lack necrosis-inducing activity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 7, p. 896-909, 2012.

DONG, X. et al. Callose synthase (CalS5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 42, n. 3, p. 315-328, 2005.

DU, Y.; BOUWMEESTER, K.; GOVERS, F. Subcellular localization of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR1 and its cognate resistance protein R1. In: **Book of Abstracts 4th International Conference on Biotic Plant Interactions**. 2015. p. 116.

EL-KEREAMY, A. et al. *Prunus domestica* pathogenesis-related protein-5 activates the defense response pathway and enhances the resistance to fungal infection. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17973, 2011.

ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. **Phytophthora diseases worldwide**. St Paul, MN, USA: American Phytopathological Society, 1996.

ESCANFERLA, M. E. **Histologia e bioquímica da interação entre porta-enxertos de citros resistente e suscetível a *Phytophthora nicotianae***. Tese (Pós-Graduação em Fitopatologia). Piracicaba, 2011.

EVANGELISTI, E. et al. The *Phytophthora parasitica* RXLR effector Penetration-Specific Effector 1 favours *Arabidopsis thaliana* infection by interfering with auxin physiology. **New Phytologist**, v. 199, p. 476–489, 2013.

FAGOAGA, C. et al. Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic Orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. **Molecular Breeding**, v. 7, p. 175–185, 2001.

FALDONI, L. et al. Effect of Organic Manure in the Induction of Resistance of *Citrus* to *Phytophthora parasitica*. **Journal of Agricultural Science**, v. 7, n. 4, p. 135, 2015.

FEECHAN, A. et al. The Hypersensitive Response in PAMP-and Effector-Triggered Immune Responses. **Plant Programmed Cell Death**. Springer International Publishing, p. 235-268, 2015.

FEICHTENBERGER, E. Manejo das principais doenças fúngicas dos citros sem os benzimidazóis. IN: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 36., 2013, São Paulo. **Resumos...** Summa Phytopathologica, Botucatu, v. 39, 2013.

FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M. B. Doenças fúngicas dos citros: manejo integrado. **Visão Agrícola**, v. 2, p. 44-47, 2004.

FEICHTENBERGER, E.; MULLER, G. W.; GUIRADO, N. Doenças dos Citros (*Citrus* spp.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**, vol. 2, 4. ed., São Paulo: Agronômicas Ceres, 2005. 706p.

FELLBRICH, G. et al. NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 32, n. 3, p. 375-390, 2002.

FERNANDES, C. F. et al. Physiological changes of *Fagus sylvatica* seedlings infected with *Phytophthora citricola* and the contribution of its elicitor "citricolin" to pathogenesis. **Plant Biology**, v. 7, n. 06, p. 650-658, 2005.

FLOR, H. H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Phytopathology**, v. 32, n. 653, p. e69, 1942.

FU, Z. Q. et al. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 228-232, 2012.

GARAVAGLIA, B. S. et al. Hsp70 and Hsp90 expression in citrus and pepper plants in response to *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **European Journal of Plant Pathology**, v. 123, n. 1, p. 91-97, 2009.

GAULIN, E. et al. Cellulose binding domains of a *Phytophthora* cell wall protein are novel pathogen-associated molecular patterns. **The Plant Cell**, v. 18, n. 7, p. 1766-1777, 2006.

GAULIN, E. et al. The CBEL glycoprotein of *Phytophthora parasitica* var-*nicotianae* is involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 23, p. 4565-4575, 2002.

GIJZEN, M.; NÜRNBERGER, T. Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. **Phytochemistry**, v. 67, n. 16, p. 1800-1807, 2006.

GIRALDO, M. C.; VALENT, B. Filamentous plant pathogen effectors in action. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 800-814, 2013.

GRAHAM, J.; FEICHTENBERGER, E. *Citrus Phytophthora* diseases: management challenges and successes. **Journal of Citrus Pathology**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2015.

GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 4, p. 414-420, 2006.

HAAS, B. et al. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. **Nature**, v. 461, n. 7262, p. 393-398, 2009.

HAO, P. et al. Herbivore-induced callose deposition on the sieve plates of rice: an important mechanism for host resistance. **Plant Physiology**, v. 146, n. 4, p. 1810-1820, 2008.

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

HAYDEN, K. J. et al. Oomycete diseases. **Infectious Forest Diseases**, p. 519-546, 2013.

HORTA, M. et al. In vitro and in vivo quantification of elicitor expression in *Phytophthora cinnamomi*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 73, n. 1, p. 48-57, 2008.

HU, Y.; DONG, Q.; YU, D. *Arabidopsis* WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*. **Plant Science**, v. 185, p. 288-297, 2012.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal: Culturas Temporárias e Permanentes**, Rio de Janeiro, v. 41, p.1-100, 2014.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro, v.29, n.6 p.1-79, 2016.

JIANG, R. H. Y. et al. RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. **PNAS**, v. 105, n. 12, p. 4874–4879, 2008.

JIANG, R. H. et al. Ancient origin of elicitor gene clusters in *Phytophthora* genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 2, p. 338-351, 2006.

JONES, J. D.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006.

JUNIOR, T. C.; BENEDITO, V. A.; FIGUEIRA, A. V. O. Análise serial da expressão gênica. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, p. 88-100, 2004.

KALE, S. D. et al. External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. **The Cell**, v. 142, n. 2, p. 284-295, 2010.

KAMOUN, S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p.41-60, 2006.

KAMOON, S. et al. A gene encoding a host-specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 6, p. 573-573, 1993.

KAMOON, S. et al. A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of potato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, n. 1, p. 13-20, 1997.

KANNEGANTI, T. D. et al. Synergistic interactions of the plant cell death pathways induced by *Phytophthora infestans* Nep1-like protein PiNPP1. 1 and INF1 elicitor. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 8, p. 854-863, 2006.

KEBDANI, N. et al. Cellular and molecular characterization of *Phytophthora parasitica* appressorium-mediated penetration. **New Phytologist**, v. 185, n. 1, p. 248-257, 2010.

KOLLER, O.L. **Citricultura catarinense**. Florianópolis: Epagri, 2013. 319p.

KROON, L. P. N. M. et al. The genus *Phytophthora* anno 2012. **Phytopathology**, v. 102, n. 4, p. 348-364, 2012.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American statistical Association**, v. 47, n. 260, p. 583-621, 1952.

LAMOUR, K. H. et al. Etiology of *Phytophthora drechsleri* and *P. nicotianae* (= *P. parasitica*) diseases affecting floriculture crops. **Plant Disease**, v. 87, n. 7, p. 854-858, 2003.

LAMOUR, K. H.; WIN, J.; KAMOON, S. Oomycete genomics: new insights and future directions. **FEMS Microbiology Letters**, n. 274, p. 1-8, 2007.

LATIJNHOUWERS, M.; DE WIT, P. J. G. M.; GOVERS, F. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 462-469, 2003.

LE BERRE, J. Y.; ENGLER, G.; PANABIÈRES, F. Exploration of the late stages of the tomato-*Phytophthora parasitica* interactions through histological analysis and generation of expressed sequence tags. **New Phytologist**, v. 177, n. 2, p. 480-492, 2008.

LI, J. et al. WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. **The Plant Journal**, v. 46, n. 3, p. 477-491, 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOAKE, G.; GRANT, M. Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, n. 5, p. 466-472, 2007.

LOGEMANN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 163, n. 1, p. 16-20, 1987.

LUDOWICI, V. A. et al. **Phytophthora nicotianae**. CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK, 2013.

MACEDO, J. N. A.; LOPES, J. L. L.; DAMALO, J. C. P. **Técnicas de Biologia Molecular e Clonagem**. Brasília-DF: Educacional Editora e Cursos Ltda, 2010. 119 p.

MACKEY, D.; MCFALL, A. J. MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 1365–1371, 2006.

MAFURAH, J. J. et al. A virulence essential CRN effector of *Phytophthora capsici* suppresses host defense and induces cell death in plant nucleus. **PloS One**, v. 10, n. 5, p. e0127965, 2015.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia 2011**. Rio de Janeiro: Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.

MANNING, K. Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. **Analytical Biochemistry**, v. 195, p. 45-50, 1991.

MARTINELLI, F. et al. Transcriptome profiling of citrus fruit response to huanglongbing disease. **PloS One**, v. 7, n. 5, p. e38039, 2012.

MARTINEZ, T. et al. Probing the Functions of Carbohydrate Binding Modules in the CBEL Protein from the Oomycete *Phytophthora parasitica*. **PloS One**, v. 10, n. 9, p. 1-14, 2015.

MARTINS, E. A. C.; MACIEL FILHO, P. R. Mecanismos de expressão gênica em eucariotos. **Revista da Biologia**, v. 4, 2010.

MATTOS JUNIOR, D. et al. **CITROS: principais informações e recomendações de cultivo**. São Paulo: Instituto Agrônomo de Campinas, 2005. 10p.

MENG, Y. et al. The protein disulfide isomerase 1 of *Phytophthora parasitica* (PpPDI1) is associated with the haustoria-like structures and contributes to plant infection. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015.

MORGANTE, C. V. et al. **Seleção de genes de referência para estudos de expressão gênica do gênero *Arachis***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2009. 27p.

MOY, P. et al. Patterns of gene expression upon infection of soybean plants by *Phytophthora sojae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 10, p. 1051-1062, 2004.

NEVES, M. F.; JANK, M. S. **Perspectivas da cadeia produtiva da laranja: a agenda 2015**. São Paulo: Instituto de Estudos do Comércio e Negociações Internacionais, 2006.

NEVES, M. F. et al. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. 1. ed. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010.138p.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, p. 10-13, 2004.

OLIVEIRA, R. P. **Biotecnologia em Citros**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 36 p.

OLIVEIRA, T. S. **Expressão de genes da via do ácido salicílico em resposta à infecção por '*candidatus liberibacter spp.*', agente do *huanglongbing* dos citros**. Dissertação (Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular). Campinas, 2013.

PASCHOLATI, S. F.; CIA, P. **Mecanismos bioquímicos na resistência de plantas às doenças**. São Paulo: Escola Superior de Agricultura, 2006. 7p.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M. POMPEU JUNIOR, J. (Ed). **Citros**. Campinas: IAC; FUNDAG, p. 62-104, 2005.

QIAO, Y. et al. Oomycete pathogens encode RNA silencing suppressors. **Nature Genetics**, v. 45, n. 3, p. 330-333, 2013.

QUTOB, D. et al. Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. **The Plant Cell**, v. 18, n. 12, p. 3721-3744, 2006.

RAFIQI, M. et al. Internalization of flax rust avirulence proteins into flax and tobacco cells can occur in the absence of the pathogen. **The Plant Cell**, v. 22, n. 6, p. 2017-2032, 2010.

RAJPUT, N. A. et al. Overexpression of a *Phytophthora* cytoplasmic CRN effector confers resistance to disease, salinity and drought in *Nicotiana benthamiana*. **Plant and Cell Physiology**, 2015.

ROSA, D. D. et al. *Phytophthora parasitica* transcriptome, a new concept in the understanding of the citrus gummosis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 997-1008, 2007.

SANDLER, H.Á.; TIMMER, L.W.; GRAHAM, J.H.; ZITKO, S.E. Effect of fungicide applications on populations of *Phytophthora parasitica* and on feeder root densities and fruit yields of citrus trees. **Plant Disease**, v. 73, n. 11, p. 902-906, 1989.

SASSERON, G. R. **Desenvolvimento e validação de diagnóstico molecular de fungos patogênicos a citros**. Dissertação (Pós-graduação em Agricultura). São Paulo, 2008.

SARTOR, T. **Expressão de genes relacionados à defesa em plantas de *Solanum tuberosum* tratadas com ácido salicílico e extrato bacteriano**. Dissertação (Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

SCHORNACK, S. et al. Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 40, p. 17421-17426, 2010.

SÉJALON-DELMAS, N. et al. Purification, elicitor activity, and cell wall localization of a glycoprotein from *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, a fungal pathogen of tobacco. **Phytopathology**, v. 87, n. 9, p. 899-909, 1997.

SHIBATA, Y.; KAWAKITA, K.; TAKEMOTO, D. SGT1 and HSP90 are essential for age-related non-host resistance of *Nicotiana benthamiana* against the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 75, n. 3, p. 120-128, 2011.

SHIM, J. S. et al. AtMYB44 regulates WRKY70 expression and modulates antagonistic interaction between salicylic acid and jasmonic acid signaling. **The Plant Journal**, v. 73, n. 3, p. 483-495, 2013.

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 em Agronomia) Botucatu, São Paulo, 2001.

SONG, J. T. et al. H. Overexpression of AtSGT1, an *Arabidopsis* salicylic acid glucosyltransferase, leads to increased susceptibility to *Pseudomonas syringae*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 5, p. 1128-1134, 2008.

STAM, R. et al. Identification and characterisation CRN effectors in *Phytophthora capsici* shows modularity and functional diversity. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59517, 2013.

STASSEN, J. H. M. ACKERVEKEN, G. V. D. How do oomycete effectors interfere with plant life? **Current Opinion in Plant Biology**, v.14, p. 407–414, 2011.

TADA, Y. et al. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 952-956, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 722p.

TEIXEIRA, J. E. C. **Genes de defesa de *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*: expressão constitutiva e induzida por *Phytophthora parasitica***. Dissertação (Pós-Graduação em Agronomia). Minas Gerais, 2005.

THAKUR, M.; SOHAL, B. S. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. **ISRN Biochemistry**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

THOMMA, B. P.; NÜRNBERGER, T.; JOOSTEN, M. H. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. **The Plant Cell**, v. 23, n. 1, p. 4-15, 2011.

TSUDA, K.; KATAGIRI, F. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 4, p. 459-465, 2010.

TURNER, D. et al. Rationale for maintenance of the M184v resistance mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase in treatment experienced patients. **Microbiologica-Quarterly Journal of Microbiological Sciences**, v. 27, n. 2, p. 31-40, 2004.

TYLER, B. M. Entering and breaking: virulence effector proteins of oomycete plant pathogens. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 13-20, 2009.

TYLER, B. M. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 137–1672, 2002.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Citrus: World Markets and Trade**. Foreign Agricultural Service, United States of America, 2016.10p.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

VAN VERK, M. C.; BOL, J. F.; LINTHORST, H. J. M. WRKY transcription factors involved in activation of SA biosynthesis genes. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 1, 2011.

VARBANOVA, M. et al. Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. **The Plant Cell**, v. 19, n. 1, p. 32-45, 2007.

WANG, Q. et al. Transcriptional programming and functional interactions within the *Phytophthora sojae* RXLR effector repertoire. **The Plant Cell**, v. 23, n. 6, p. 2064-2086, 2011.

WANG, Y. et al. Infection of *Arabidopsis thaliana* by *Phytophthora parasitica* and identification of variation in host specificity. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 2, p. 187-201, 2011.

WAWRA, S. et al. Secretion, delivery and function of oomycete effector proteins. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 685-691, 2012.

WAWRZYNSKA, A.; RODIBAUGH, N. L.; INNES, R. W. Synergistic activation of defense responses in *Arabidopsis* by simultaneous loss of the GSL5 callose synthase and the EDR1 protein kinase. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 23, n. 5, p. 578-584, 2010.

WERNER, S. et al. Chitin synthesis during in planta growth and asexual propagation of the cellulosic oomycete and obligate biotrophic grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, n. 2, p. 169-173, 2002.

WHISSON, S. C. et al. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. **Nature**, v. 450, n. 7166, p. 115-118, 2007.

WHISSON, S. C. et al. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. **Nature**, v. 450, n. 7166, p. 115-118, 2007.

WIDMER, T. L.; GRAHAM, J. H.; MITCHELL, D. J. Histological comparison of fibrous root infection of disease-tolerant and susceptible citrus hosts by *Phytophthora nicotianae* and *P. palmivora*. **Phytopathology**, v. 88, n. 5, p. 389-395, 1998.

WIN, J. et al. Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. In: **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 235-247, 2012.

WU, L. T. et al. *Arabidopsis* WRKY28 transcription factor is required for resistance to necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 30, p. 5481-5488, 2011.

XING, D.; CHEN, Z. Effects of mutations and constitutive overexpression of EDS1 and PAD4 on plant resistance to different types of microbial pathogens. **Plant Science**, v. 171, n. 2, p. 251-262, 2006.

YAN, H. Z.; LIOU, R. F. Selection of internal control genes for real-time quantitative RT-PCR assays in the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 43, p. 430–438, 2006.

YI, M.; VALENT, B. Communication between filamentous pathogens and plants at the biotrophic interface. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 587-611, 2013.

YU, L. M. Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 10, p. 4088-4094, 1995.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 3ª ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003.

ZHOU, N. et al. PAD4 functions upstream from salicylic acid to control defense responses in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 10, n. 6, p. 1021-1030, 1998.

ZHU, S. et al. SAG101 forms a ternary complex with EDS1 and PAD4 and is required for resistance signaling against turnip crinkle virus. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 11, p. e1002318, 2011.