



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE  
UNIDADE ACADÊMICA DE BIOLOGIA E QUÍMICA  
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JOSÉ CLÁUDIO GOMES DE ARAÚJO

**EXPRESSÃO QUANTITATIVA DOS GENES EFETORES *NPP1* E *CBEL* EM  
*Phytophthora parasitica* DURANTE INTERAÇÃO COM FOLHAS DE CITROS**

CUITÉ - PB

2017

UFCG/BIBLIOTECA

JOSÉ CLÁUDIO GOMES DE ARAÚJO

**EXPRESSÃO QUANTITATIVA DOS GENES EFETORES *NPP1* E *CBEL* EM  
*Phytophthora parasitica* DURANTE INTERAÇÃO COM FOLHAS DE CITROS**

Monografia apresentada ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), *Campus Cuité*, como parte das exigências para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Magnólia de Araújo Campos

CUITÉ - PB

2017



Biblioteca Setorial do CES.

Julho de 2021.

Cuité - PB

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

A663e Araújo, José Cláudio Gomes de.

Expressão quantitativa dos genes efetores NPP1 e CBEL em *Phytophthora parasitica* durante interação com folhas de citros. / José Cláudio Gomes de Araújo. – Cuité: CES, 2017.

48 fl.

Monografia (Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas) – Centro de Educação e Saúde / UFCEG, 2017.

Orientadora: Dra. Magnólia de Araújo Campos.

1. Oomiceto. 2. Interação citros-*Phytophthora*. 3. RT-PCR. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCEG

CDU 575


JOSÉ CLÁUDIO GOMES DE ARAÚJO


**EXPRESSÃO QUANTITATIVA DOS GENES EFETORES *NPP1* E *CBEL* EM  
*Phytophthora parasitica* DURANTE INTERAÇÃO COM FOLHAS DE CITROS**

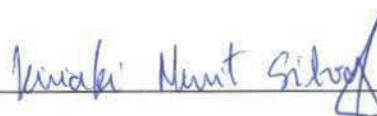
Monografia apresentada ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), *Campus Cuité*, como parte das exigências para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 12/06/2017

BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Drª. Magnólia de Araújo Campos  
(Orientadora – CES/UFCG)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcus José Conceição Lopes  
(Membro Titular – CES/UFCG)

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Drª. Kiriaki Nurit Silva  
(Membro Titular – CES/UFCG)

Aos meus queridos pais, José Severino de  
Araújo e Cláudia Gomes Pedrosa de  
Araújo, por toda dedicação e amor.

**Dedico**

UFCG/BIBLIOTECA

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me ajudar e me manter de pé para superar todos os obstáculos, iluminando a cada dia todos os meus passos.

A Universidade Federal de Campina Grande – *Campus Cuité*, PB, pela graduação realizada.

Ao Laboratório de Biotecnologia do *Campus Cuité*, PB, pelo espaço ofertado para a realização da pesquisa.

A minha orientadora, prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Magnólia de Araújo Campos, pela pessoa maravilhosa que é, mesmo diante de várias dificuldades, nunca desistiu de mim, sempre visando meu crescimento. É uma pessoa que admiro demais, e que pretendo me espelhar, pois é uma das melhores profissionais que eu conheço.

Aos membros da banca examinadora, prof. Dr. Marcus Lopes, e prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Kiriaki Nurit, pela disponibilidade e por aceitarem o desafio.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto e manutenção da bolsa do programa PIBIC 2015/2016.

A minha família que amo muito, em especial, meus pais, José Severino de Araújo, Cláudia Gomes Pedrosa de Araújo e meu irmão, João Victor Gomes de Araújo, por todo apoio e amor em todos os momentos da minha vida, pois, sempre oram por mim e acreditam que sou capaz.

Aos grandes amigos de curso, em especial, Johab Moreira, José Lucas, Lívio Ian, Luan Medeiros e Taynan Lopes, pela amizade, e que pretendo levar para vida toda.

Aos colegas integrantes do Laboratório de Biotecnologia (LBiotec) do CES, em especial, Rayane Abreu, Thamara Medeiros e Graciete Balbino, por toda ajuda, paciência, disponibilidade e amizade.

A Prof<sup>a</sup> Dra. Michelle Gomes Santos, que não mediu esforços para ajudar em tudo que fosse possível na coordenação de Ciências Biológicas, uma excelente profissional e um amor de pessoa.

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

"Deus é fiel"

UFCCG/BIBLIOTECA



## RESUMO

*Phytophthora parasitica* é um oomiceto capaz de infectar todas as partes das plantas dos citros e afetar todas as etapas da cadeia produtiva, do viveiro ao fruto comercializado. Esta espécie secreta efetores que modulam as respostas da planta, facilitando a infecção. Neste trabalho, a expressão quantitativa, temporal e comparativa de genes efetores extracelulares de *P. parasitica* foi analisada durante interação com folhas de citros, por meio de RT-qPCR. A partir de RNAs isolados de estruturas do patógeno (micélio, esporângios, clamidósporos e zoósporos) mantidas apenas na água (não inoculadas, NI) e inoculadas (I) em pedaços de folhas de laranjeira azeda (*Citrus aurantium*) mantidos na água, durante os tempos 0, 1,5, 3, 6 e 12 horas após a inoculação (h.a.i.), a análise das mudanças na expressão dos genes *NPP102* e *CBEL02* em *P. parasitica* revelou que o perfil de expressão foi diferente entre eles, embora tenham sido transcritos nos dois tratamentos e nos tempos estudados. O gene *NPP102* apresentou dois picos de expressão máxima, as 1,5 e as 6 h.a.i., nos dois tratamentos, ocorrendo um nível de expressão maior em I as 1,5 h.a.i. e em NI as 6 h.a.i. Por outro lado, o gene *CBEL02* alcançou níveis de expressão mais baixos nos dois tratamentos em todos os tempos de estudos, variando de 0,3 vezes, em I, a 6,4 em NI, exceto as 12 h.a.i. em NI. O estudo da expressão de genes efetores durante interação citros-*P. parasitica* pode contribuir para o entendimento de mecanismos de patogenicidade desse patógeno, visando à elaboração de alternativas de controle.

**Palavras-chave:** oomiceto; interação citros-*Phytophthora parasitica*; RT-qPCR.

## ABSTRACT

*Phytophthora parasitica* is able to infect all parts of the citrus plants and affect all stages of the production chain, from the nursery to the marketed product. This species secret effectors which modulate the plant responses, facilitating infection. In this study, the quantitative expression, temporal and comparative extracellular effector genes of *P. parasitica* was analyzed during citrus interaction, by using RT-qPCR. From RNAs isolated from pathogen structures (mycelium, sporangium, chlamydospores and zoospores) held only in water (non-inoculated, NI) and inoculated (I) in pieces of sour orange leaves (*Citrus aurantium*) within water during times 0, 1.5, 3, 6 and 12 hours after inoculation (h.a.i.), analysis of changes in expression of *CBEL02* and *NPP102* genes in *P. parasitica* revealed that the expression pattern was different between them, although they have been transcribed in both treatments and the studied time points. The *NPP102* gene showed two maximum expression peaks, 1.5 and 6 h.a.i. in both treatments, with a expression level higher in the I at 1.5 h.a.i. and in the NI treatment at 6 h.a.i. Moreover, the gene *CBEL02* achieved lower levels of expression for both treatments at all studied time points ranging from 0.3 times, in the I treatment, until 6.4 in NI, an except for I at 12 h.a.i. The study of the effector gene expression during citrus-*P. parasitica* interaction may contribute to the understanding of pathogenicity mechanisms of this pathogen, aiming at developing control alternatives.

**Keywords:** Oomycete; citrus-*Phytophthora parasitica* interaction; RT-qPCR.

## LISTAS DE FIGURAS

	Pág.
<p><b>Figura 1.</b> Imagens ilustrativas da montagem do bioensaio de ativação da patogenicidade de <i>P. parasitica</i> pelo método de isca (Sousa 2013). (A) Folha inoculada após 8 dias. (B) Transferência da folha inoculada para o meio com antibióticos. (C) Repicagem de <i>P. parasitica</i> para meio não seletivo após 12 dias de cultivo em meio com antibióticos.....</p>	26
<p><b>Figura 2.</b> Ilustrações da montagem do bioensaio de inoculação de <i>P. parasitica</i> em citros. (A) 130 placas em meio não seletivo; (B) Folha-água; (C) <i>Phytophthora</i>-água; (D) <i>Phytophthora</i>-folha-água.....</p>	27
<p><b>Figura 3</b> Crescimento de <i>Phytophthora parasitica</i> de citros em diferentes Ágar Ágar. (A) Ágar powder, bacteriological-(HIMEDIA); (B) Ágar Ágar, type I (HIMEDIA); (C) Ágar Laboratório de Biotecnologia; (D) Nutrient Ágar (KASVI).....</p>	33
<p><b>Figura 4.</b> Crescimento micelial de <i>P. parasitica</i> após ativação da patogenicidade pelo método de isca (SOUSA, 2013) (A) e em meio não seletivo (B).....</p>	34
<p><b>Figura 5.</b> Eletroforese em gel de agarose 0,8% de DNA isolado de <i>P. parasitica</i> (1, 2).....</p>	35
<p><b>Figura 6.</b> Eletroforese em gel de agarose 0,8% de RNAs extraídos. (1) Vazio; (2) 0h NI; (3) 1,5h NI; (4) 3h NI; (5) 6h NI; (6) 12h NI; (7) 0h I; (8) 1,5h I; (9) 3h I; (10) 6h I; (11) 12h I.....</p>	36

**Figura 7** Eletroforese em gel de agarose 0,8% de produtos de PCR de RNAs de *P. parasitica* com primers para os genes *NPP102* (poços 1-5, 11) e *Elicitina* (poços 6-10, 12). (1) 0h NI; (2) 1,5h NI; (3) 3h NI; (4) 6h NI; (5) 12h NI; (6) 0h I; (7) 1,5h I; (8) 3h I; (9) 6h I; (10) 12h I; (11) Amostra de DNA de *P. parasitica* (12) Amostra de DNA *P. parasitica* (M) Marcador..... 39

**Figura 8** Perfil de expressão relativa de genes efetores extracelulares *NPP102* e *CBEL02* de *P. parasitica* durante os tempos 0, 1,5, 3, 6 e 12 h.a.i. em folhas de laranjeira azeda. No eixo Y estão indicados os níveis de RNAm relativos quantificados por RT-qPCR nas amostras. (NI, não inoculadas) *P. parasitica* apenas em água. (I, inoculada) *P. parasitica* induzida em pedaços de folhas de laranjeira azeda (*Citrus aurantium*) mantidos na água. (h.a.i.) horas após a inoculação..... 41

## LISTAS DE TABELAS

	Pág.
<b>Tabela 1.</b> Quantificação dos RNAs totais extraídos em espectrofotômetro NanoDrop 2000.....	37
<b>Tabela 2.</b> Ilustrações da montagem do bioensaio de inoculação de <i>P. parasitica</i> em citros. (A) 130 placas em meio não seletivo; (B) Folha-água; (C) <i>Phytophthora</i> -água; (D) <i>Phytophthora</i> -folha-água.....	38
<b>Tabela 3</b> Quantificação do cDNA em espectrofotômetro NanoDrop 2000.....	40

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

**Avr** – Avirulência

**CA** – Cenoura-ágar

**CBEL** – *Cellulose-binding elicitor lectin*

**cDNA** – *Complementary DNA*

**CES** – Centro de Educação e Saúde

**CRN** – *Crinklers*

**CTAB** – Brometo de Cetil Trimetilamonio

**DEPC** – Dicarbonato de dietila

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**DNase I** – Desoxirribonuclease I

**dNTPs** – Desoxirribonucleotídeo

**ETOH** – Etanol

**h.a.i.** – Horas após a inoculação

**INCT Citros** – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia dos citros

**LBiotec** – Laboratório de Biotecnologia

**MgCl<sup>2</sup>** – Cloreto de Magnésio

**NaAc** – Acetato de Sódio

**NPP102** – *Necrosis-inducing Phytophthora protein 1 gene 02*

**PAMP** – *Pathogen-associated molecular pattern*

**PCR** – *Polimerase Chain Reaction*

**PRR** – *Plant resistance receptor*

**R** – Resistência

**RNA** – Ácido ribonucleico

**RT-qPCR** – *Real time quantitative PCR*

**UFMG** – Universidade Federal de Campina Grande

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	18
2 OBJETIVOS .....	20
2.1 Objetivo geral: .....	20
2.2 Objetivos específicos:.....	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO .....	21
3.1 Efetores.....	21
3.2 Importância de estudar efetores de <i>Phytophthora parasitica</i> de citros.....	22
3.3 Estudos da expressão gênica .....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	25
4.1 Condições de cultivo do isolado patogênico <i>Phytophthora parasitica</i> .....	25
4.2 Bioensaio de patogenicidade de <i>Phytophthora parasitica</i> .....	25
4.3 Bioensaio de inoculação de <i>P. parasitica</i> em citros .....	26
4.4 Extração de DNA .....	27
4.5 Extração de RNA .....	28
4.6 Eletroforese horizontal em gel de agarose.....	29
4.7 Estimativa da quantidade e pureza do RNA por espectrofotometria .....	29
4.8 Digestão com DNase I.....	30
4.9 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	30
4.10 Síntese de cDNA.....	31
4.11 Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33

5.1	Estabelecimento de cultivo adequado de <i>Phytophthora parasitica</i>	33
5.2	Ativação da patogenicidade de <i>Phytophthora parasitica</i>	34
5.3	Análise do DNA e RNA totais purificados	35
5.4	Teste da amplificação de RNAs após digestão com DNase I	38
5.5	Análise da expressão quantitativa dos genes <i>NPP102</i> e <i>CBEL02</i> por RT-qPCR	40
6	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS	44



## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Phytophthora* está classificado como oomicetos, pertencentes ao Reino Straminopila ou Oomycota Peronosporales que têm a habilidade de entrar em contato com o vegetal, penetrar em seus tecidos e romper a sua resistência, promovendo assim a infecção, por isso são consideradas destruidoras de plantas. Dentre as espécies de *Phytophthora* onze estão associadas ao complexo de doenças causadas em citros (gêneros *Citrus*, *Fortunela* e *Poncirus*). No entanto, apenas duas, *Phytophthora parasitica* Dastur (= *P. nicotianae* Breda de Haan), estão associadas às doenças presentes no Brasil, sendo de particular interesse *P. parasitica* por apresentar formas alternativas de multiplicação, podendo sobreviver por alguns anos no solo na forma de micélio, esporângio, cisto, clamidiósporos e oósporos; e por estar associada a perdas em todas as fases da cultura de citros (ROSSETTI, 2001; ERWIN; RIBEIRO, 1996; MENG et al., 2014).

A citricultura brasileira é 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. Um dos problemas fitossanitários mais sérios para a citricultura é causado por *P. parasitica*. Este patógeno é capaz de infectar todas as partes das plantas dos citros e afetar todas as etapas da cadeia produtiva, do viveiro ao fruto comercializado, cujos sintomas são podridão na base do tronco com exsudação de goma (gomose), nas raízes e radículas, folhas e frutos, levando a um definhamento das plantas e eventual morte. Altas temperatura e umidade relativa do ar e solo são favoráveis ao desenvolvimento da gomose, causada pela rápida produção de esporângios e zoósporos em tecidos infectados, nessas condições (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 2005).

A interação entre *Phytophthora* e plantas envolve uma gama de troca de sinais, nos quais se incluem defesa por parte da planta, ataque por parte do patógeno, e inibição de uma ou mais ações dos componentes envolvidos. Essa interação é medida

pela ação dos componentes do sistema imune inato das plantas (similar aos mecanismos de "imunidade inata" dos animais), cujos fenótipos são resistência específica de hospedeira (interação Avr-R) e resistência basal ou de não hospedeira (interação PAMP-PRR), como também por moléculas efetoras de patógenos, que são proteínas que entram (no citoplasma) em células vegetais e tem como função principal suprimir as vias de transdução de sinais que mediam as respostas de defesa de plantas (TYLER, 2008).

As espécies de *Phytophthora* possuem proteínas efetoras típicas capazes de atravessar a membrana plasmática do hospedeiro e, uma vez dentro das células, suprimem a sinalização de defesa da planta hospedeira, por ligação às proteínas "alvo de efetores", levando aos sintomas da doença. Efetores extracelulares do tipo NPP1 induzem morte celular em plantas e contam com uma distribuição relevante entre espécies de *Phytophthora*, de *P. parasitica*, PsojNIP de *P. sojae*, e PiNPP1 de *P. infestans* (STASSEN; ACKERVEKEN, 2011). Outro efetor extracelular relevante é do tipo CBEL (*Cellulose Binding Elicitor Lectin*), uma glicoproteína de 34 kDa importante na diferenciação morfológica e adesão de *P. parasitica* a superfície celular em interações parasitárias, que foi purificada pela primeira vez a partir de *P. parasitica* var. *nicotianae* (SÉJALON-DELMAS et al. 1997).

Portanto, o estudo da expressão de genes efetores de *P. parasitica* pode contribuir para o entendimento da patogenicidade desse patógeno sobre os citros, o que pode levar a medidas de controle. Além disso, estudos sobre efetores de *P. parasitica* durante interação com citros são escassos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar a expressão quantitativa de genes efetores extracelulares de *Phytophthora parasitica* Dastur durante interação com citros.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Realizar bioensaios de interação discos de folha de laranja azeda (*Citrus aurantium*) e *P. parasitica*;
2. Analisar a expressão temporal e comparativa de genes efetores extracelulares de *P. parasitica*, por meio de RT-qPCR (*Reverse Transcriptase-quantitative Polimerase Chain Reaction*).

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Efetores

Os efetores são moléculas liberadas por um organismo para mudar a fisiologia de outro, as quais podem ser capazes de modular a defesa das plantas. Assim, os efetores tanto podem induzir quanto podem suprimir a defesa da planta (STASSEN; ACKERVEKEN, 2011).

Com relação à indução da defesa, a planta hospedeira ao sentir a presença do patógeno, utiliza alguns mecanismos de defesa, como por exemplo, uma rápida morte celular no sítio de infecção, mais conhecida como reação de hipersensibilidade, que é comum de acontecer quando a imunidade desencadeada pelo efector é ativada (WIN *et al.*, 2012).

Esses efetores podem ser apoplásticos ou citoplasmáticos, ganharam tais definições por causa do seu local de atuação nas células. Quando secretados pelos patógenos, os efetores podem agir no meio extracelular, região exposta, ou no interior das células, no qual possuem a capacidade de atravessar a membrana plasmática e logo migrar para o citoplasma, onde mantém contato com as organelas (BLOCK *et al.*, 2008). Tanto os efetores apoplásticos quanto os citoplasmáticos têm condições de eliminar respostas de defesa das plantas. Ao chegar no local certo, no momento ideal, os efetores podem exercer interação com as proteínas do hospedeiro para realizarem as suas funções, fazendo com que sua invasão e colonização seja bem-sucedida (WIN *et al.*, 2012).

Os oomicetos translocam seus efetores para dentro da célula da planta por meio de haustórios, que tanto podem absorver nutrientes, quanto translocar os efetores através da membrana hospedeira, que são os chamados de efetores intracelulares ou citoplasmáticos, como exemplo, os RXLR (STASSEN; ACKERVEKEN, 2011). Foi demonstrado por Birch *et al.* (2008) que o motivo RXLR foi essencial para a translocação dentro de células hospedeiras e que diferentes funções foram associadas as regiões estruturais dos efetores RXLR, no qual o domínio N-terminal foi associado a secreção e translocação, enquanto o domínio C-terminal está

relacionado com a modulação de respostas por parte da célula hospedeira. Outro exemplo de efetores intracelulares são os Crinklers (CRN), que foram identificadas e têm um fenótipo característico de enrugamento de folhas, observado na expressão ectópica de proteínas secretadas por *P. infestans* em plantas (STAM et al., 2013).

Um exemplo de efetores apoplásticos são os NPP1 (*necrosis-inducing Phytophthora protein 1*), que representam uma família de proteínas indutoras de necrose, ou seja, induz a morte celular ou também pode disparar o mecanismo de defesa da planta (GIJZEN;NÜRNBERGER, 2006; QUTOB et al., 2006). Outro exemplo são os efetores CBEL (*cellulose-binding elicitor lectin*), que são proteínas capazes de ajudar na adesão do patógeno a planta, ou seja, ajuda na ligação da hifa da *P. parasitica* a parede da célula hospedeira (GAULIN et al., 2002).

### 3.2 Importância de estudar efetores de *Phytophthora parasitica* de citros

*Phytophthora parasitica* Dastur, também chamado de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan, é um organismo do tipo fungo classificado como Oomiceto, que é capaz de infectar mais de 400 espécies de plantas, incluindo os citros. No gênero *Phytophthora* (do grego, destruidor de plantas) existem mais de 90 espécies de *Phytophthora*, e a maioria é considerada destrutiva (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

*P. parasitica* interage com as plantas através de uma gama de troca de sinais, ou seja, a defesa por parte da planta e o ataque por parte do patógeno. E nessa interação também ocorrem inibições de um ou mais componentes envolvidos. Então, para conseguir seu objetivo, *P. parasitica* utiliza efetores para suprimir as vias de transdução de sinais que interferem nas respostas de defesa da planta que, para sobreviver, busca alternativas de defesa para agir contra a possível infecção. É uma interação molecular muito interessante e dinâmica (TYLER, 2008).

Na citricultura, esse patógeno causa danos em todas as fases da produção e da comercialização, infectando sementes e plântulas recém-germinadas, raízes, caule, folhas e frutos, desde a sementeira até a planta adulta em pomares, e depois infectando frutos durante o transporte a armazenamento, na fase pós-colheita. Portanto, o patógeno age abaixo da superfície do solo, em troncos e nos ramos. A

podridão no pé e a gomose são as doenças mais sérias causada pela *P. parasitica*, e podem ser reconhecidas facilmente, pois, se manifestam no campo (FILHO et al., 2004, FEICHTENBERGER, 2005).

Os sintomas que *P. parasitica* causa nos citros são a podridão da casca de raízes, exsudação de goma no caule, morte e descoloração de camadas mais internas do lenho e podridão de radículas em porta-enxertos suscetíveis, podendo haver o escurecimento dos tecidos localizados abaixo da casca, na superfície do lenho, por ter havido a infiltração de goma nesses tecidos. Em troncos e ramos, os tecidos infectados da casca permanecem firmes até secar completamente, quando aparecem fendas longitudinais e rachaduras, podendo haver ainda, morte e escurecimento de camadas internas de lenho na região das lesões. Os somatórios desses sintomas podem culminar com a morte completa da planta (THEODORO; KOLLER, 2013).

O ciclo de vida de *Phytophthora parasitica*, tipicamente, inclui fases sexuadas e assexuadas, em que, o crescimento micelial é composto por hifas hialinas e assépticas. *P. parasitica* torna-se destrutivo devido a sua produção alternativa de três tipos de esporos, sendo zoósporos e clamidósporos as estruturas assexuadas e oósporos a estrutura sexuada. Os zoósporos são células sem parede celular e com dois flagelos, que os permitem nadar, produzidos nos esporângios sob condições de disponibilidade de água, poucos nutrientes, luz, baixa temperatura e elevado O<sub>2</sub>. Já os clamidósporos são esporos assexuados multinucleados, cujas condições ótimas para sua germinação diretamente das hifas são as desfavoráveis, tais como pouco nutriente, pouca água e baixo O<sub>2</sub> (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 2005).

É clara a relevância da citricultura para a economia nacional, visto que o país é o primeiro produtor e o maior exportador mundial de citros de suco concentrado e congelado de citros (ALMEIDA; PASSOS, 2011). A produção brasileira de citros é bastante extensa, pois, se distribui por todas as regiões do país, mas, com uma maior concentração na região sudeste, especialmente no estado de São Paulo, no qual o principal citro cultivado é a laranja doce (ALMEIDA; PASSOS, 2011).

No Nordeste, o estado que se destaca na produção de citros é a Bahia, que atingiu 1.111.1382 milhões de toneladas, e a Paraíba, que a citricultura é predominante no planalto da Borborema, vem crescendo ao longo dos anos,

encontrando-se na quinta posição do ranking, atingindo 22.610 mil toneladas (IBGE, 2015). Na Paraíba se produz tangerina, principalmente, e a produção contribui para exportação e consumo interno *in natura*. Entretanto, todos os campos de cultivo dos citros no Brasil estão contaminados com *Phytophthora parasitica*, inclusive na Paraíba.

### 3.3 Estudos da expressão gênica

A expressão de genes tem um alto nível de complexidade, e pode ser definida como o processo responsável pelo aumento ou redução da produção dos produtos finais derivados dos genes de um organismo (LACERDA, 2003).

A técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) é usada para quantificar a amplificação de DNA ou de cDNA, que é o DNA complementar ao RNA mensageiro, gerado pela reação da enzima da transcrição reversa, a transcriptase reversa (RT). Quando esta técnica é usada para a detecção de cDNA, tem sido identificada como RT-qPCR, indicando análises da expressão de genes. A vantagem da técnica RT-PCR nos estudos de expressão gênica, é que sua empregabilidade em estudos é definida em função de que apenas a região codificadora de um gene eucarioto pode ser obtida (MACEDO; LOPES; DAMALO, 2010).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Condições de cultivo do isolado patogênico *Phytophthora parasitica*

Este trabalho foi todo desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia (LBiotec) do Centro de Educação e Saúde da UFCG, *Campus Cuité*, inclusive a análise da expressão gênica por RT-qPCR.

O isolado IAC095 de *Phytophthora parasitica* Dastur (= *P. nicotianae* Breda de Haan), proveniente do Centro APTA Sylvio Moreira/IAC foi disponibilizado pelo pesquisador Dr. Marcos Antônio Machado no âmbito da colaboração do INCT Citros. O patógeno foi cultivado *in vitro* no LBiotec/CES/UFCG, obedecendo às instruções propostas pelo Laboratório de Fitopatologia do referido Centro. O cultivo do patógeno foi conduzido sob condições assépticas, tendo sido mantido em Placas de Petri contendo meio cenoura-ágar (CA) autoclavado (500 mL de água destilada, 100g de cenoura e 10g de ágar) sob iluminação constante e temperatura ambiente (25°C). As repicagens foram realizadas com uma periodicidade de 8-12 dias, a fim de manter o crescimento micelial do isolado constante.

### 4.2 Bioensaio de patogenicidade de *Phytophthora parasitica*

Após sucessivos subcultivos *in vitro*, a ativação da patogenicidade da *P. parasitica* foi feita pela inoculação do patógeno em folhas de citros na água, seguindo o método descrito por Souza (2013). Após 8 dias, as folhas inoculadas foram transferidas para meio cenoura-ágar suplementado com antibióticos ampicilina (100µg/mL) e rifampicina (50µg/mL) em placas de Petri e incubadas a temperatura constante de 26°C, no escuro por 8 dias (Figura 1).



Figura 1- Imagens ilustrativas da montagem do bioensaio de ativação da patogenicidade de *P. parasitica* pelo método de isca (Souza 2013). (A) Folha de *Citrus Aurantium* inoculada após 8 dias. (B) Transferência da folha inoculada para o meio com antibióticos. (C) Repicagem de *P. parasitica* para meio não seletivo após 12 dias de cultivo em meio com antibióticos.



Fonte: Dados da pesquisa (2016).

#### 4.3 Bioensaio de inoculação de *P. parasitica* em citros

Para o bioensaio da expressão de genes efetores de *P. parasitica* durante a interação com citros foi aplicado o método de isca proposto por Sousa (2013). A espécie do gênero *Citrus* utilizada para os experimentos foi a laranja azeda (*Citrus aurantium*). Os tratamentos analisados foram micélio do patógeno em água (não inoculado NI) *versus* pedaços de folhas de laranjeira azeda inoculada (I) com micélio de *P. parasitica*.

Primeiramente, folhas jovens de *C. aurantium* foram colhidas individualmente no CES-UFCG com auxílio de luvas, embrulhadas em papel alumínio e conduzidas ao LBiotech em uma caixa térmica. Após a coleta, as folhas foram higienizadas por meio da lavagem com água destilada e detergente comercial e, logo após, cortadas em discos com auxílio de um furador de 3,0 mm de diâmetro. Para o tratamento não-inoculado, foi pesada 1g de discos foliares de laranja azeda que, em seguida, foi colocada em um Becker de 250 mL contendo 100 mL de água. No tratamento inoculado o procedimento inicial foi o mesmo que o anterior, porém neste foi adicionado o micélio de *P. parasitica* cultivado por um período de 8 dias. Tempos: 0, 1,5, 3, 6 e 12 horas após a inoculação (h.a.i.). Foram necessárias 130 placas de Petri contendo crescimento micelial de *P. parasitica* após 13 dias (Figura 2).

Figura 2- Ilustrações da montagem do bioensaio de inoculação de *P. parasitica* em citros. (A) 130 placas em meio não seletivo; (B) Folha-água; (C) *Phytophthora*-água; (D) *Phytophthora*-folha-água.



Fonte: Dados da pesquisa (2016).

O material biológico dos tratamentos, *Phytophthora*-água (não inoculado) e *Phytophthora*-folha-água (inoculado), foi coletado e imediatamente adicionado ao tampão de extração de RNA e armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração de RNA.

#### 4.4 Extração de DNA

DNA total do oomiceto *P. parasitica* foi extraído usando tampão CTAB (2% de CTAB, 1,4M de NaCl; 200mM de Tris-Hcl pH 8.0; 20mM de EDTA pH 8.0). O tecido micelial da *Phytophthora* raspado de 3 placas com meio de cultivo foi macerado utilizando cadinho e pistilo autoclavados e congelados, ao qual foi adicionado o tampão de extração CTAB junto com 1% de P.V.P (Polivinilpirrolidona). O extrato foi

distribuído em alíquotas de 800  $\mu$ L em eppendorf de 2 mL. Na capela de exaustão adicionou-se à amostra,  $\beta$ -mercaptoetanol e Proteinase K (AMRESCO). A amostra foi aquecida a  $65^{\circ}\text{C}$  em banho-maria durante 15 minutos, sendo suavemente misturada a cada 5 min. Em seguida, às amostras foi adicionado igual volume de clorofil (Clorofórmio:álcool isoamílico, 24:1), misturado no vórtex e centrifugado a 12000 rpm, durante 10 minutos à  $20^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo eppendorf 1,5 mL, onde o DNA foi precipitado usando isopropanol gelado, durante 2 horas à  $-20^{\circ}\text{C}$  e, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm, durante 10 min à  $20^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado em Etanol 70% gelado, centrifugados a 12000 rpm, durante 5 minutos à  $20^{\circ}\text{C}$ , para remoção de sais contaminantes. Após descartar o sobrenadante, o pellet foi seco à temperatura ambiente na capela de exaustão e o DNA foi ressuspensionado em 100  $\mu$ L de água milli-Q.

#### 4.5 Extração de RNA

Os RNAs totais das amostras de dois tratamentos NI (não inoculado) e I (inoculado) nos diferentes tempos foram extraídos usando tampão de extração (Tris Hcl pH 7,5; 10 mM de EDTA; 1 M de NaCl; 1% de SDS 20%; água DEPC e  $\beta$ -mercaptoetanol). As amostras foram maceradas usando cadinho e pistilo lavados em EDTA, autoclavados e congelados, ao qual foi adicionado tampão de extração junto com 1% de PVP (Polivinilpirrolidona). O extrato foi distribuído em alíquotas de 800  $\mu$ L em eppendorf de 2 mL. Na capela de exaustão adicionou-se à amostra,  $\beta$ -mercaptoetanol e clorofane vortexados e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugados por 10 minutos à  $4^{\circ}\text{C}/12000$  rpm. O sobrenadante foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente e adicionado clorofórmio livre de RNase, gelado vortexado e incubado por 3 minutos a temperatura ambiente, centrifugado por 15 minutos à  $4^{\circ}\text{C}/12000$  rpm. Ao sobrenadante foi adicionado isopropanol livre de RNase e tampão citrato livre de RNase, gelado, incubados por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugado por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}/12000$  rpm, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado etanol 75% livre de RNase, gelado

vortexado e centrifugado por 5 minutos à 4°C/8000 rpm, logo o sobrenadante veio a ser descartado e os tubos foram levados para a capela de exaustão para que o pellet viesse a secar e após ser ressuspendido em água milli-Q DEPC.

Foram realizadas 22 extrações de RNA, sendo 11 inoculados (planta/patógeno) e 11 não inoculados (apenas o patógeno), com os tempos de 0 h, 1h30min, 3h, 6h e 12h para analisar a interação a partir dessa expressão temporal.

#### **4.6 Eletroforese horizontal em gel de agarose**

Gel de agarose foi preparado na concentração de 0,8%, em tampão T.A.E. (100 mM de Tris HCl pH 8,0, 57.1 mL de ácido acético glacial e 500mM de EDTA pH 7,5) 1 X. Após o gel atingir a temperatura ideal (40 °C), e foi colorido com 1% de brometo de etídio. O gel foi vertido na cama de eletroforese, aguardando aproximadamente 30 minutos para a solidificação e retirada do pente. Depois de encaixar a cama na cuba de eletroforese, foi adicionado T.A.E. 1X.

Foi aplicado alíquotas de 5 µL de DNA e RNA juntamente com 1% de Tampão de amostra nos poços. A condição de corrida para a migração do DNA e RNA em gel foi realizada a 80 Voltz por 30 minutos. O gel foi visualizado posteriormente sob luz ultravioleta e documentado usando um Fotodocumentador Transiluminator Molecular Image LPIX (Loccus Biotecnologia).

#### **4.7 Estimativa da quantidade e pureza do RNA por espectrofotometria**

As amostras de DNA e RNA extraídas nos diferentes tempos e tratamentos foram quantificadas e sua pureza estimada usando uma pequena alíquota de 1 µL/cada em espectrofotômetro do tipo Nanodrop 2000 (ThermoScientific). As leituras ópticas foram realizadas para DNA, tendo a concentração padrão de 50 µg, nas absorvâncias de 230, 260 e 280nm e para o RNA de 40 µg, nas absorvâncias de 230, 260 e 280 nm.

#### 4.8 Digestão com DNase I

O DNA contaminante presente na amostra de RNA foi eliminado por digestão com enzima desoxiribonuclease I (DNase I), de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). As amostras foram armazenadas na B.O.D. por 2 horas, à 37 °C. Os RNAs digeridos foram lavados com clorofane, centrifugando a 6000 rpm por 3 minutos, ao sobrenadante foi adicionado clorofil centrifugando a 6000 rpm por 3 minutos, após a centrifugação foi adicionado ao sobrenadante 10% de NaAc DEPC 3 M e 2,5 volumes de ETOH gelado absoluto e levado ao -20°C por 10 minutos e centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com ETOH 70% DEPC gelado e centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos após descartar o sobrenadante, o pellet foi seco a temperatura ambiente na capela de exaustão e os RNAs foram ressuspensos em 25 µL de água DEPC.

#### 4.9 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Reações em cadeia da polimerase foram realizadas usando DNA total e RNA total como molde e primers específicos para genes efetores *NPP102* e *Elicitina* de *P. parasitica*. As condições para as reações de polimerização foram realizadas por meio de um preparo de um Master mix para 22 reações de 15 µL, utilizando 1 X de Tampão PCR Buffer minus Mg (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,2 mM de dNTPs, 0,25 mM de Primer direto (forward), 0,25 mM de Primer reverso; 1,5 U da enzima Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen), e 50 ng de DNA. As reações ocorreram sob as seguintes condições térmicas: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95° por 1 min, 30 ciclos de desnaturação (95 °C por 45 seg) anelamento (50 °C por 15 seg); extensão (72 °C por 5 min). O diagnóstico das PCRs foi realizado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% usando 15 µL de cada reação e fotodocumentados sob luz ultravioleta.

#### 4.10 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, em uma primeira etapa desnaturou-se 100 ng de RNA total e 500 µg de RandomPrimers do kit GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega) a 70°C/5 min e 4°C/5 min a um volume final de 10 µL, para cada amostra. Em uma segunda etapa, foram adicionados aos tubos tampão Go-Script 5X, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, Mix PCR nt 10 mM, inibidor RNase 40 U/µL e GoScript-RT (Promega). As reações ocorreram em volume final de 20 µL nas seguintes condições térmicas: 42°C/50min e 70°/15min.

#### 4.11 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram preparadas usando 1 µL do cDNA sintetizado como molde para analisar a expressão dos genes efetores extracelulares *NPP102* e *CBEL02* (1 µM/cada) de *P. parasitica* de citros pela detecção de ROX, de acordo com os procedimentos dos fabricantes para o kit GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega). As reações aconteceram em 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. A análise da expressão gênica por RT-qPCR foi realizada em sistema de detecção de sequências ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems), usando o método de quantificação de curva padrão, que determina a quantificação absoluta da expressão gênica nas amostras. A análise da expressão gênica quantificação relativa foi feita pelo método de Livak e Schmittgen (2001), que calcula a expressão de um gene alvo com base em uma amostra de referência. Os dados obtidos foram coletados e analisados usando o *software Real-Time PCR Miner* (<http://ewindup.info/miner/>), 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. Os dados foram normalizados usando a equação:  $\Delta Ct = Ct(\text{gene alvo}) - Ct(\text{controle endógeno})$ , tendo como controle endógeno a expressão do gene que codifica uma proteína ribossomal S3A (WS21) de *P. parasitica* (YAN; LIOU, 2006). A calibração foi determinada para

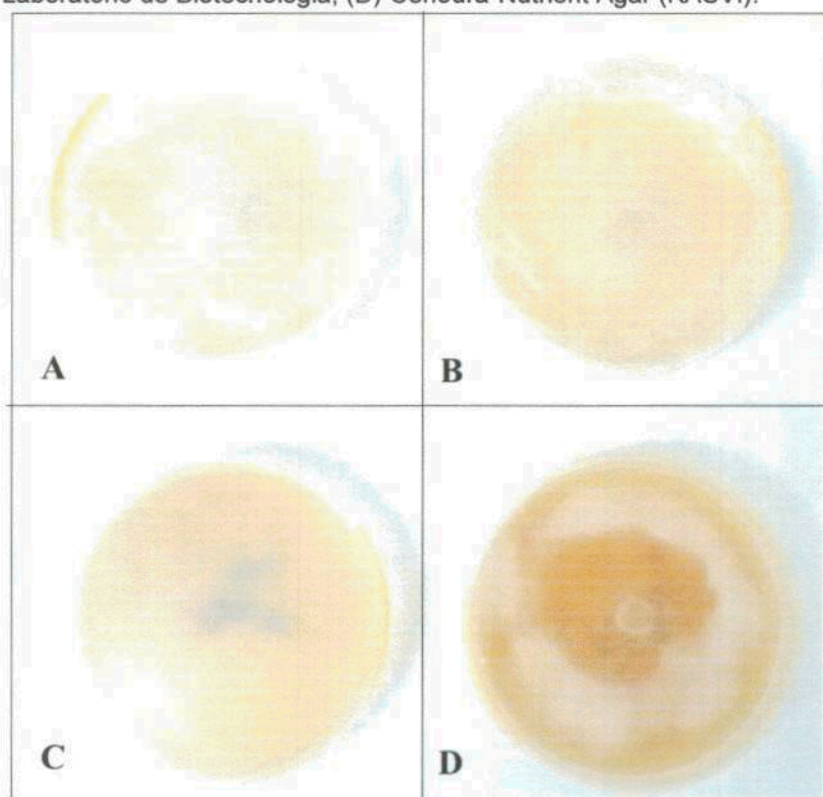
cada tempo estudado, através da fórmula:  $\Delta\Delta Ct$  ( $\Delta Ct$  (amostra) -  $\Delta Ct$  (calibrador)) e a quantificação relativa foi obtida por meio da fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , usando os dados de réplicas de cada tratamento.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estabelecimento de cultivo adequado de *Phytophthora parasitica*

O teste preliminar para a determinação de qual ágar disponível no LBiotec, dentre quatro tipos diferentes, apontou o Ágar Ágar, type I, do fabricante HIMEDIA como mais adequado, levando a um melhor crescimento *in vitro* de *Phytophthora parasitica* (Figura 3).

Figura 3 – Crescimento de *Phytophthora parasitica* de citros em meio cenoura em diferentes Ágar Ágar. (A) Cenoura-Ágar powder, bacteriological- (HIMEDIA); (B) Cenoura-Ágar Ágar, type I (HIMEDIA); (C) Cenoura-Ágar Laboratório de Biotecnologia; (D) Cenoura-Nutrient Ágar (KASVI).



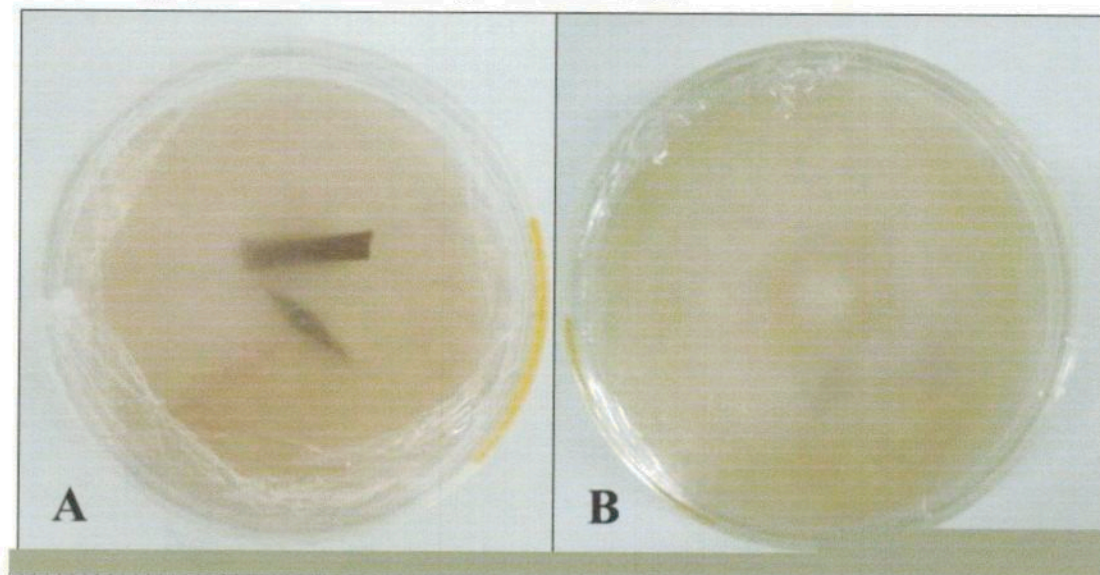
Fonte: Dados da pesquisa (2015).



## 5.2 Ativação da patogenicidade de *Phytophthora parasitica*

A ativação da patogenicidade de *P. parasitica* pelo método de isca foi bem-sucedida, como mostra a Figura 4. Ao contato com a planta, *P. parasitica* saiu do disco de meio de cultura CA e infectou pedaços de folhas de laranja azeda, durante 8 dias. Após esse tempo, *P. parasitica* saiu dos pedaços de folhas inoculadas e cresceu bem sob meio de cultura CA seletivo, contendo os antibióticos rifampicina e ampicilina, para eliminação de eventuais microrganismos contaminantes, durante 13 dias (Figura 4A). O subcultivo de *P. parasitica* para meio CA sem antibióticos também ocorreu com sucesso, durante mais 13 dias, tendo sido obtido, portanto, *P. parasitica* foi recuperada pura após ativação *in planta* (Figura 4B).

Figura 4 – Crescimento micelial de *P. parasitica* após ativação da patogenicidade pelo método de isca (SOUSA, 2013) (A) e em meio Cenoura-Ágar não seletivo (B).

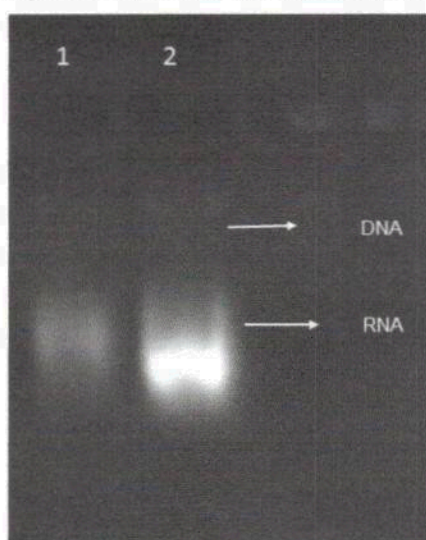


Fonte: Dados da pesquisa (2016).

### 5.3 Análise do DNA e RNA totais purificados

A extração de DNA pelo método CTAB foi eficiente para obtenção do DNA do oomiceto *P. parasitica*. A visualização em gel de agarose mostrou que o DNA extraído apresenta-se como pouca intensidade, representativo de baixa quantidade, e com contaminação com RNA, porém íntegro e passível de ser utilizado em reações de PCR (Figura 5).

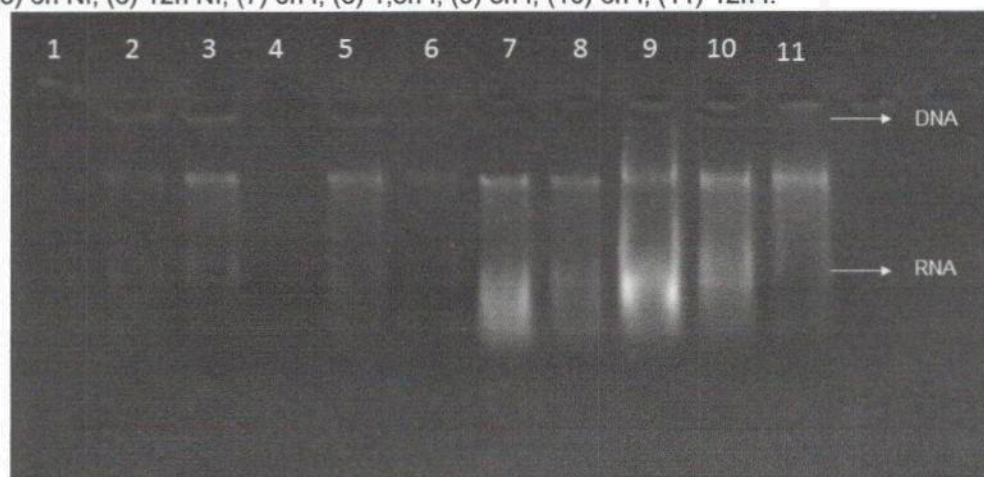
Figura 5- Eletroforese em gel de agarose 0,8% de DNA isolado de *P. parasitica* (1, 2).



Fonte: Dados da pesquisa (2016).

O RNA total foi isolado de estruturas do patógeno (micélio, esporângios, clamidósporos e zoósporos) mantidas apenas na água (não inoculadas, NI) e inoculadas (I) em pedaços de folhas de laranjeira azeda (*Citrus aurantium*) mantidos na água, durante os tempos 0, 1,5, 3, 6 e 12 horas após a inoculação (h.a.i.) (Figura 6). A análise em gel de agarose mostrou que foi obtida uma boa qualidade dos RNAs extraídos, sendo visualizado RNA íntegro e ainda a presença uma banda de alto peso molecular acima do RNA total, indicativo de DNA genômico contaminante, normalmente encontrado em preparações de RNA. Amostras 1 e 4 não apresentaram quantidade suficiente para visualização no gel, comparado com as demais amostras.

Figura 6- Eletroforese em gel de agarose 0,8% de RNAs extraídos. (1) Vazio; (2) 0h NI; (3) 1,5h NI; (4) 3h NI; (5) 6h NI; (6) 12h NI; (7) 0h I; (8) 1,5h I; (9) 3h I; (10) 6h I; (11) 12h I.



Fonte: Dados da pesquisa (2016).

O DNA contaminante foi eliminado por digestão das amostras de RNA com a enzima DNase I (dados não mostrados). Os dados da quantidade e pureza por espectrofotometria (NanoDrop) do RNA, tanto antes como depois da digestão com DNase estão dispostos nas Tabelas 1 e 2. A quantidade da amostra foi estimada pela leitura de densidade ótica a 260nm, multiplicando o valor de 40  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  vezes o fator de diluição da amostra. A quantificação do RNA é um passo essencial para ensaios baseados em RNA e análise de expressão de genes, por isso é usado em uma grande variedade de processos laboratoriais, tornando-se um passo crítico para determinar a expressão de um tipo específico de gene em um determinado tecido (ARANDA et al, 2009).

Tabela 1- Quantificação dos RNAs totais extraídos em espectrofotômetro NanoDrop 2000.

<b>AMOSTRA</b>	<b>ng/<math>\mu</math>L</b>	<b>A260/280</b>	<b>A260/230</b>
<b>0h NI</b>	86,1	1,74	0,22
<b>1h30min NI</b>	145,9	2,01	0,74
<b>3h NI</b>	174,8	1,36	0,72
<b>6h NI</b>	236,1	1,98	0,59
<b>12h NI</b>	81,7	0,71	0,45
<b>0h I</b>	77,5	1,75	0,20
<b>1h30min I</b>	129,6	1,58	0,52
<b>3h I</b>	7,6	1,68	0,12
<b>6h I</b>	71,7	2,09	0,22
<b>12h I</b>	48,9	2,11	0,19

Fonte: Dados da pesquisa (2016).

Tabela 2-Quantificação dos RNAs digeridos com DNase 1 em espectrofotômetro NanoDrop 2000.

AMOSTRA	ng/ $\mu$ L	A260/280	A260/230
0h NI	13,9	1,31	0,31
1h30min NI	24,1	1,52	1,00
3h NI	12,4	1,20	0,92
6h NI	28,8	1,60	0,75
12h NI	39,7	1,39	0,74
0h I	42,4	1,45	1,11
1h30min I	44,3	1,77	1,44
3h I	81,4	1,60	1,28
6h I	71,7	1,97	1,47
12h I	38,9	1,59	1,26

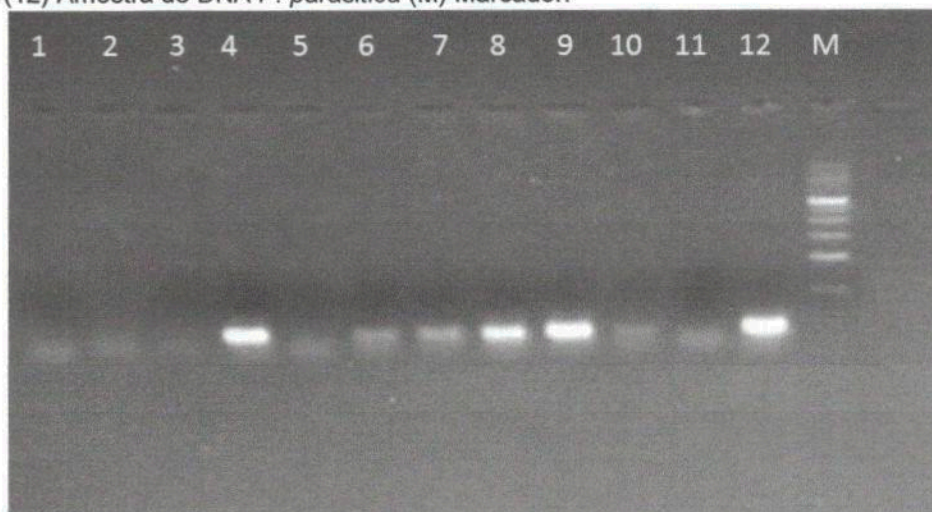
Fonte: Dados da pesquisa (2016).

Analisando as Tabelas 1 e 2 foi possível observar que a quantidade de RNA total após a digestão foi inferior como já era esperado, entretanto com uma pureza maior já que o DNA genômico foi retirado das amostras. A quantidade de RNA obtida após a digestão variou entre 12,4 ng/ $\mu$ L e 81,4 ng/ $\mu$ L e com A260/280 entre 1,4 e 1,9.

#### 5.4 Teste da amplificação de RNAs após digestão com DNase I

Após digestão e quantificação, os RNAs totais de todas as amostras foram testados para amplificação por PCR dos genes *NPP102* e *Elicítina*. Como resultado da PCR observou-se que não ocorreu amplificação tanto de RNAs quanto de DNA de *P. parasítica*, usando amostras dos tratamentos NI e I, tendo sido observado apenas bandas menores indicativas de dímero de primers (Figura 7).

Figura 7- Eletroforese em gel de agarose 0,8% de produtos de PCR de RNAs de *P. parasitica* com primers para os genes *NPP102* (poços 1-5, 11) e *Elicitina* (poços 6-10, 12). (1) 0h NI; (2) 1,5h NI; (3) 3h NI; (4) 6h NI; (5) 12h NI; (6) 0h I; (7) 1,5h I; (8) 3h I; (9) 6h I; (10) 12h I; (11) Amostra de DNA de *P. parasitica* (12) Amostra de DNA *P. parasitica* (M) Marcador.



Fonte: Dados da pesquisa (2016).

A não amplificação dos RNAs após digestão com DNase I representa um critério fundamental para a síntese da 1ª fita de cDNA, a partir dessas amostras. Uma vez que o cDNA será utilizado para reações quantitativas de amplificação em qPCR, a presença de DNA genômico é indesejada, pois irá mascarar os resultados de estudos de expressão gênica, visto que apenas uma única cópia de DNA é capaz de gerar um falso positivo nas análises (BIRTIC; KRANNER, 2006). Com base neste resultado, a 1ª fita de cDNA foi construída e a quantidade obtida em leituras espectrofotométricas para cada amostra está indicada na Tabela 3, onde é possível observar que o cDNA foi sintetizado com bom rendimento, quando comparado com as concentrações obtidas a partir das leituras mostradas na Tabela 2.

Tabela 3-Quantificação do cDNA em espectrofotômetro NanoDrop 2000.

AMOSTRA	ng/ $\mu$ L	A260/280	A260/230
0h NI	709,7	1,61	1,83
1h30min NI	851,4	1,63	1,94
3h NI	910,3	1,63	1,93
6h NI	515,5	1,62	1,33
12h NI	910,7	1,63	1,85
0h I	911,9	1,62	1,75
1h30min I	956,0	1,62	1,86
3h I	860,3	1,62	1,83
6h I	865,4	1,63	1,82
12h I	910,1	1,62	1,81

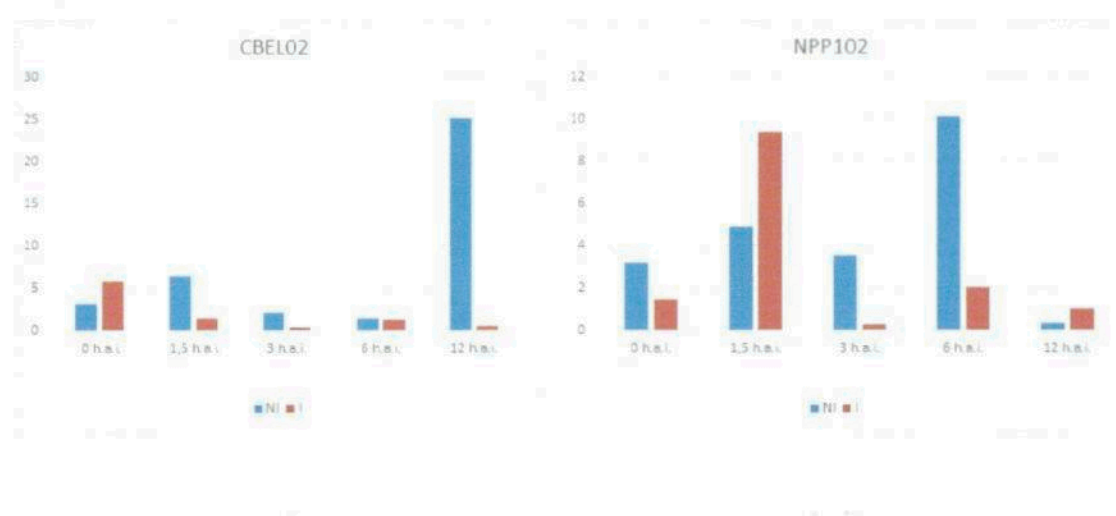
Fonte: Dados da pesquisa (2016).

### 5.5 Análise da expressão quantitativa dos genes *NPP102* e *CBEL02* por RT-qPCR

A expressão quantitativa, temporal e comparativa de genes efetores extracelulares *NPP102* e *CBEL02* de *P. parasitica* foi analisada durante interação com citros, por meio de RT-qPCR, a partir de RNAs isolados de estruturas do patógeno (micélio, esporângios, clamidósporos e zoósporos) mantidas apenas na água (não inoculadas, NI) e inoculadas (I) em pedaços de folhas de laranjeira azeda (*Citrus aurantium*) mantidos na água, durante os tempos 0, 1,5, 3, 6 e 12 horas após a inoculação (h.a.i.). A análise das mudanças na expressão dos genes *NPP102* e *CBEL02* em *P. parasitica* revelou que o perfil de expressão foi diferente entre eles, embora tenham sido transcritos nos dois tratamentos e nos tempos estudados (Figura 8). O gene *NPP102* apresentou dois picos de expressão máxima, as 1,5 e as 6 h.a.i., nos dois tratamentos, ocorrendo um nível de expressão maior em I as 1,5 h.a.i. e em NI as 6 h.a.i., que pode estar relacionado a expressão na fase biotrófica da infecção. Por outro lado, o gene

*CBEL02* alcançou níveis de expressão mais baixos nos dois tratamentos em todos os tempos de estudos, variando de 0,3 vezes, em I, a 6,4 em NI, exceto as 12 h.a.i. em NI.

Figura 8- Perfil de expressão relativa de genes efetores extracelulares *NPP102* e *CBEL02* de *P. parasitica* durante os tempos 0, 1,5, 3, 6 e 12 h.a.i. em folhas de laranjeira azeda. No eixo Y estão indicados os níveis de RNAm relativos quantificados por RT-qPCR nas amostras. (NI, não inoculadas) *P. parasitica* apenas em água. (I, inoculada) *P. parasitica* induzida em pedaços de folhas de laranjeira azeda (*Citrus aurantium*) mantidos na água. (h.a.i.) horas após a inoculação.



Fonte: Dados da pesquisa (2016).

O perfil de expressão do gene *CBEL02* observado para amostras do tratamento NI foi diferente do obtido por Azevedo (2016), para este mesmo gene, durante interação com raízes de *Poncirus trifoliata*, planta que apresenta resistência ao patógeno. Já o perfil de expressão do gene *CBEL02* em amostras do tratamento I foi semelhante ao apresentado para *Citrus sunki*, planta que apresenta suscetibilidade ao patógeno *P. parasitica*. Entretanto, o fato da laranjeira azeda (*Citrus aurantium*) utilizada neste trabalho apresentar suscetibilidade a *P. parasitica*, precisa ser confirmado.

Por outro lado, o gene *NPP102* apresentou perfil de expressão diverge totalmente do encontrado para os três genes *NPP1* estudados por Azevedo (2016),



incluindo o *NPP102*. O que pode ter como justificativa tanto a planta estudada nesse trabalho como o tipo de interação, já que o experimento de Azevedo (2016) foi realizado com interações de *P. parasitica* com raízes de *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*, que pode apresentar expressão genica diferente da interação desse patógeno em folhas de laranjeira azeda (*Citrus aurantium*).

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados, é possível concluir que:

O inóculo de *P. parasitica* é recuperado puro, após o método de ativação da patogenicidade “*in planta*”.

RNAs extraídos de amostras *P. parasitica*/Água e *P. parasitica*/Água/Folhas de laranjeira azeda, apresentaram quantidade e qualidade suficientes para as análises.

O perfil de expressão para os dois genes *NPP102* e *CBEL02* diferente entre eles e entre os tratamentos estudados.

O gene *NPP102* apresenta dois picos de expressão máxima, as 1,5 e as 6 h.a.i., nos dois tratamentos, que mostra um nível de expressão maior em I as 1,5 h.a.i. e em NI as 6 h.a.i.

O gene *CBEL02* demonstra níveis de expressão mais baixos nos dois tratamentos em todos os tempos de estudos.

O estudo da expressão de genes efetores durante interação citros-*P. parasitica* pode contribuir para o entendimento de mecanismos de patogenicidade desse patógeno, visando à elaboração de alternativas de controle.

## 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.

ARANDA IV, R. et al, Comparison and evaluation of RNA quantification methods using viral, prokaryotic, and eukaryotic RNA over a 10<sup>4</sup> concentration range. **Analytical Biochemistry**, v. 387, p 122-127, 2009. Disponível em:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269709000232>>. Acesso em 10 de abril de 2017.

AZEVEDO, T.M. **Expressão quantitativa de genes de *Phytophthora parasitica* e de citros durante a interação**. Dissertação (Pós-Graduação em Biotecnologia) Cuité, 2016.

BIRTIC & KRANNER. Isolation of high-quality RNA from polyphenol-polysaccharide- and lipid-rich seeds. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p, 144-148, 2006. Disponível em:< [https://www.researchgate.net/publication/7034398\\_Isolation\\_of\\_high-quality\\_RNA\\_from\\_polyphenol-\\_polysaccharide-\\_and\\_lipid-rich\\_seeds](https://www.researchgate.net/publication/7034398_Isolation_of_high-quality_RNA_from_polyphenol-_polysaccharide-_and_lipid-rich_seeds)>Acesso em 12 de abril de 2017.

BLOCK, Anna et al. Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 4, p. 396-403, 2008.

ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. **Phytophthora diseases worldwide**, American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN. 1996. 562 Págs.

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. Disponível em:< <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAakoMAG/manual-fitopatologia-volume-2-doencas-das-plantas-cultivadas>>Acesso em 07 de maio de 2017.

FILHO, H. P.M.; BORDIGNON Rita; SIQUEIRA, W.J ; FEICHTENBERGER ,Eduardo; CARVALHO, Marli. R.T. **Tolerance of hybrids and rootstock clones of citrus to root rot infection caused by *Phytophthora nicotianae***. *Fitopatol. bras.* [online].

2004, v.29, n.2, Disponível em:< [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-41582004000200008](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582004000200008)> Acesso em 22 de maio de 2017.

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. Disponível em:< <http://www.gene-quantification.net/livak-2001.pdf>> Acesso em 15 de maio de 2017.

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.

MEDINA FILHO, H. P. et al. Tolerance of hybrids and rootstock clones of citrus to root rot infection caused by *Phytophthora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira** [online], vol.29, n.2, p.169-178. 2004.

MENG, Y.; ZHANG, Q.; DING, W.; SHAN, W. *Phytophthora parasitica*: a model oomycete plant pathogen. **Mycology**, v. 5, n. 2, p. 43-51, 2014.

ROSSETI, V.V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Piracicaba: Fealq/Fundecitrus, 2001. 207 p. Disponível em:< <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/975532/1/cot380citros.pdf>> Acesso em 17 de maio de 2017.

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.

SOUZA, A. P. M. **Identificação *in silico* de genes efetores citosólicos a partir do secretoma de *Phytophthora parasitica* dos citros**. Monografia, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, PB, 2013.

STASSEN, J.H.M., VAN DEN ACKERVEKEN, G.. How do oomycete effectors interfere with plantlife?, **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 4, , P. 407-414. 2011.

STAM, R.; JUPE, J.; HOWDEN, A.J.M.; MORRIS, J.A.; BOEVINK, P.C.; HEDLEY, P.E. et al. Identification and characterisation CRN effectors in *Phytophthora capsici* shows modularity and functional diversity. **PLoS ONE** v.8, (3), 2013.

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

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.

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.