

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE-CES

UNIDADE ACADÊMICA DE EDUCAÇÃO-UAE

ANA LUIZA GUEDES CORREIA

**EXPRESSÃO TEMPORAL E COMPARATIVA DE GENES EFETORES  
INTRACELULARES DE *Phytophthora parasitica* DURANTE A  
INTERAÇÃO COM CITROS**

CUITÉ – PB

2014

ANA LUIZA GUEDES CORREIA

**EXPRESSÃO TEMPORAL E COMPARATIVA DE GENES EFETORES  
INTRACELULARES DE *Phytophthora parasitica* DURANTE A  
INTERAÇÃO COM CITROS**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito obrigatório para obtenção do Grau de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dr. Magnólia de Araújo Campos.

CUITÉ – PB

2014

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

C824e      Correia, Ana Luiza Guedes.

Expressão temporal e comparativa de genes efetores intracelulares de *Phytophthora parasitica* durante a interação com citros. / Ana Luiza Guedes Correia. – Cuité: CES, 2014.

48 fl.

Monografia (Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2014.

Orientadora: Dra. Magnólia de Araújo Campos.

1. *Citrus aurantium*. 2. CRN. 3. *Phytophthora*. I. Título.

CDU 575

ANA LUIZA GUEDES CORREIA

**EXPRESSÃO TEMPORAL E COMPARATIVA DE GENES EFETORES  
INTRACELULARES DE *Phytophthora parasitica* DURANTE A  
INTERAÇÃO COM CITROS**

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Dra. Liziane Maria de Lima

---

Prof. Dr. Marcus José Conceição Lopes

## DEDICATÓRIA

*A minha mãe e meu avô,  
meus maiores incentivos de vencer!*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, pelo amor incondicional e por iluminar sempre o meu caminho e a Santa Rosa de Lima por fortalecer minha fé em Deus cada vez mais.

À minha mãe linda, querida, idealizadora dos meus sonhos, formadora da minha identidade, meu referencial, minha fortaleza, meu exemplo e claro, minha Rainha! Seu exemplo de batalhadora, coragem, fez toda a diferença na minha imensa vontade de vencer na vida. Toda minha conquista, dedico a Senhora, Te amo, mãe!

À minha família linda e amada, ao meu pai, Luiz Geraldo Correia por todos os ensinamentos e amor, meus avós maternos, Maria Guedes Cavalcante e Afonso Guedes Filho, por todos os cuidados e experiência de vida, aos meus irmãos Andreza Guedes Correia e Afonso Guedes Neto, por toda a dedicação e amor, ao meu lindo e amado sobrinho/filho, Luiz Afonso, alegria de todos os meus dias, te amo incondicionalmente meu pequeno príncipe, a minha querida cunhada Karina Araújo, por todo amor, atenção e dedicação em todos os momentos, e a todos os meus familiares pelo apoio e companheirismo.

À Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde-CES, Cuité-PB, por oferecer um ensino de qualidade, a coordenação do curso de Ciências Biológicas e a todos os professores pela transmissão de conhecimento, bem como aos demais servidores que contribuíram de alguma forma na minha vida acadêmica.

À minha orientadora, Prof. Dra. Magnólia de Araújo Campos, por acreditar em mim sempre, acreditar que eu era capaz, muito obrigada, pela ajuda, pelos ensinamentos, pela sua fé que contagia a todos que estão ao seu lado, por me encorajar a seguir firme sempre e principalmente, por me aceitar mesmo com todas as minhas dificuldades. Pode ter certeza que a senhora fez toda a diferença na minha vida acadêmica!

À Cláudia Ramos, aluna do mestrado de Ciências Naturais e Biotecnologia, pela grande dedicação, ensinamentos e amizade. Obrigada por toda ajuda no meu trabalho e pelo incentivo dizendo sempre “vai dar tudo certo, Aninha!”

À Francielly Negreiros, em especial, por todos os ensinamentos, paciência, dedicação, pelas correções do meu trabalho e pelas incansáveis ajudas, com certeza, sem você eu não teria ido tão longe amiga, você é um dos seres humanos mais lindos que já conheci, Minha eterna gratidão, TE AMO!

À toda equipe do Laboratório de Biotecnologia-LBiotec, Francielly Negreiros, Graciete Balbino, Larissa Thuane, Larissa Cavalcante, Rayane Abreu, Ana Paula Sousa, Cláudia Ramos, por fazerem parte do meu dia a dia no laboratório, assim como, me ensinar as tarefas essenciais em um laboratório, vocês são as melhores companhias de trabalho, com certeza com a presença de vocês, qualquer ambiente de trabalho torna-se agradável, aprendi muito com cada uma de vocês lindas, muito obrigada!

Ao Laboratório de Biotecnologia da EMBRAPA Algodão, em especial a Dra. Liziane Maria e Vandrê, pelo o acolhimento, meu muito obrigada pela disponibilidade e auxílio durante a realização do experimento

À Dra. Liziane Maria e ao Prof. Dr. Marcus Lopes, pela prontidão no aceite do convite para participar da minha banca, em especial ao Prof. Marcus Lopes, por ser um excelente professor, pelos conselhos e incentivo, principalmente, pela disponibilidade de sempre.

Às amigadas construídas ao longo de todo esse tempo na universidade, em especial as de curso, Ayane Emília, Priscilla Fernandes, Marcelo Maciel, Marina Rocha e Ana Paula Martins, meu muito obrigada por tudo, amo vocês!

Aos meus amigos do coração, que estiveram presente ao longo de toda essa caminhada vocês são indispensáveis. Maria das Neves, Ana Paula Martins, Aparecida Fernandes, Amanda Medeiros, Alice Madilza, Fábria Ataliba, Isis Daniele, Allana Louise, Renata Medeiros, Larissa Thuane, Francielly Negreiros, Raquel Martins, Jessica Monteiro e demais amigos que não estão listados aqui. Muito obrigada pelo apoio de cada uma de vocês, por compreenderem a minha ausência em momentos importantes, pela troca de conhecimentos e pela motivação, vocês estarão sempre presentes em meus pensamentos. Meu muito obrigada! Amo vocês!

À linda família que Deus me deu, família EJC, obrigada por todo amor dedicado a mim, vocês são essências em minha vida.

Foram muitas as pessoas que contribuíram de uma maneira ou outra para que esse trabalho se tornasse possível. Gostaria muito de agradecer aqui a todos, um a um, mas tão importante quanto a gratidão é o reconhecimento. Obrigada a todos pela contribuição, ensinamentos, respeito, amparo, amizade e por cada sorriso que confortou meu coração nos momentos difíceis.

## **EPÍGRAFE**

*A graça é fruto da paciência (Santa Rosa de Lima)*



## RESUMO

Espécies de *Phytophthora*, assim como muitos outros patógenos, secretam proteínas efetoras que são capazes de modular a imunidade inata da planta e promover a colonização do hospedeiro. As proteínas efetoras de oomicetos dividem-se em duas classes: efetores apoplásticos/extracelulares e citoplasmáticos/intracelulares. O objetivo desse trabalho foi analisar a expressão temporal e comparativa de genes efetores intracelulares de *Phytophthora parasitica* durante a interação com citros, por meio de RT-qPCR (*reverse transcriptase-quantitative PCR*). Para isso foram realizados bioensaios de interação de discos de folhas de laranja azeda (*Citrus aurantium*) e micélio do isolado IAC095 de *Phytophthora parasitica*, nos tratamentos inoculados e não inoculados (folhas apenas), nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas, com 5 repetições biológicas para cada tempo. RNAs total de cada uma das amostras de todos os tratamentos foram isolados pelo método com SDS/fenol e analisados quanto a quantidade e qualidade por eletroforese em gel de agarose e espectrofotometria. cDNAs fitas simples foram sintetizados para 3 repetições biológicas de cada tempo estudado/tratamento. As condições de cultivo e manuseio do material vegetal e de *Phytophthora parasitica* durante o bioensaio foram fundamentais para a obtenção de RNAs de qualidade e para as respostas biológicas a serem analisadas. O método empregado para o isolamento de RNAs de folhas de citros e mistura de folhas de citros e *Phytophthora parasitica* foi bem sucedido. A quantidade e qualidade dos RNAs extraídos variaram entre as amostras, nos diferentes tempos estudados. DNA de *Phytophthora parasitica* amplificado com o primer CRN foi um bom controle positivo para comparar com amostras de RNAs digeridas com DNase I para eliminação de DNAs contaminantes. A quantidade dos cDNAs sintetizados estimada por espectrofotometria para DNA fita simples foi diagnóstico da presença dos cDNAs nas amostras. A expressão de genes efetores *RXLR* foi visualizada nas amostras I0h e I24h, de acordo com a análise quantitativa.

**Palavras-chaves:** CRN; RXLR; *Citrus aurantium*; RT-qPCR.

## ABSTRACT

*Phytophthora* species, such as many other pathogens, secrete effector proteins that are able to modulate the plant innate immunity to promote the host colonization. The Oomycete effector proteins can be divided into two classes: apoplastics/extracellular and cytosolics/intracellular effectors. The objective of this work was to analyse the temporal and comparative expression of intracellular effectors from *Phytophthora parasitica* during the citrus interaction, by using RT-qPCR (*reverse transcriptase-quantitative PCR*). Then, interaction bioassays were performed using leaf discs of acidic orange (*Citrus aurantium*) and micelia of *Phytophthora parasitica* IAC095 isolate for inoculate treatment and only leaf discs from uninoculated treatment, in times 0, 12, 24, 36 e 48 hours, with 5 biological repetitions for each time. Total RNAs from each sample of all treatments were isolated by using a SDS/phenol method and analyzed in relation to quantity and quality by electrophoresis in agarose gel and spectrophotometry. Single strand cDNAs were synthesized for 3 biological repetitions from each studied time/treatment. The culture and manuser conditions of the plant material and *Phytophthora parasitica* during the bioassay were fundamentals to obtaining of RNAs of quality and to biological responses to be analysed. The employed method to isolation of citrus leaf RNAs and mix of citrus leaf and *Phytophthora parasitica* RNAs was successfully. The quantity and quality of extracted RNAs varied among samples in different studied times. *Phytophthora parasitica* DNA amplified with the CRN primers was a good positive control to comparing with sample RNAs digested with DNase I, in order to eliminate contaminant genomic DNAs. The quantity of synthesized cDNAs estimated by single strand DNA spectrophotometry was diagnostic for presence of cDNAs into the samples. The expression of *RXLR* effector genes was visualized into the I0h and I24h samples, according to quantitative analysis.

**Keywords:** CRN; RXLR; *Citrus aurantium*; RT-qPCR.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustrações de sintomas da gomose dos Citros .....	20
Figura 2. Interação molecular efetores intracelulares das classes RXLR-dEER e CRN de oomicetos e proteínas de plantas hospedeiras. A interação direta de uma proteína RXLR-dEER com uma proteína de resistência leva a resistência da planta. Especula-se que a interação direta de RXLR-dEER com uma proteína-alvo da planta deve levar a supressão morte celular programada e outras defesas da planta. Já no caso de CRNs a interação a molécula-alvo na planta deve levar a morte celular da hospedeira e necrose. R-D, efetores de patógenos RXLR-dEER. CRN, proteínas Crinkles. R, produto de gene de resistência da hospedeira que pode detectar um efector. PCD, morte celular programada (TYLER, 2008) .....	25
Figura 3 Cultivo de <i>P. parasitica</i> em meio de cultura cenoura-ágar .....	29
Figura 4 Laranja azeda ( <i>Citrus aurantium</i> ) presente no Horto Florestal do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, em Cuité PB .....	30
Figura 5. Imagem ilustrativa de micélio de <i>P. parasitica</i> crescido em placa de Petri em meio cenoura-ágar após 11 dias de repicagem .....	34
Figura 6. Ilustração da montagem do bioensaio da interação citros- <i>P. parasitica</i> pelo método de isca modificado de acordo com Sousa (2013) .....	35
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 0,8% do RNA isolado a partir de folhas de laranja azeda não inoculada ( <b>A e B</b> ) e inoculada ( <b>B e C</b> ) com <i>P. parasítica</i> , em diferentes tempos. Sequência de amostra no gel: <b>M</b> - marcador de peso molecular AMRESCO 1kb DNA Ladder Norgen; ( <b>A</b> ) 1-5, 0 hora; 6-10, 12 horas; 10-15, 24 horas; 15-20, 36 horas; ( <b>B</b> ) 21-25, 48 horas. Amostras não inoculadas: ( <b>B</b> ) 26-30, 0 hora; 31-35, 12 horas; ( <b>C</b> ) 36-40, 24 horas; 41-45, 36 horas; 46-50, 48 horas .....	36
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 0,8% M. Marcador: LowRanger 100 bp DNA Ladder; 1. Controle positivo DNA de <i>P. parasitica</i> com o primer CRN; I (Inoculada) e NI (Não Inoculada) 3-5 OH NI; 6-8 12H NI; 9-11 24H NI; 12-14 36H NI; 15-17 48H NI; 18-20 OH I; 21-23 12H I; 23-24 24H I; 25-26 36 H I; 27-29 48H I. A seta indica fragmentos amplificados do tamanho esperado .....	42
Figura 9. Gráfico da análise da expressão de genes <i>β-tubulina</i> e <i>RXLR</i> usando os cDNAs de amostras de folhas de citros não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com <i>P.</i>	

*parasitica* nos tempos 0, 12 e 24 horas, por PCR quantitativo em tempo real pelo método de quantificação relativa padrão, usando um termociclador Eco™ Real Time PCR System (illumina), gentilmente testado em colaboração com a Dra. Liziane Maria de Lima, realizado na EMBRAPA Algodão .....

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação de RNA de <i>Citrus aurantium</i> (laranja azeda) não inoculado utilizando espectrofotômetro NanoDrop 2000 .....	38
Tabela 2. Quantificação de RNA de <i>Citrus aurantium</i> inoculado com <i>Phytophthora</i> utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Avr	Avirulência
cDNA	DNA complementar
CES	Centro de Educação e Saúde
CRN	Do inglês, Crinkling and Necrosis-Inducing Protein
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
IAC	Instituto Agrônomo de Campinas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PAMP	Padrão Molecular Associado à Patógeno
PCR	Do inglês, Polimerase Chain Reaction
PP	<i>Phytophthora parasitica</i>
R	Resistência
RNA	Ácido Ribonucléico
T <sub>m</sub>	Temperatura
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	17
2.1 Objetivo Geral: .....	17
2.2 Objetivos Específicos: .....	17
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
3.1 Caracterização e importância dos Citros .....	18
3.2 Caracterização e importância do oomiceto <i>Phytophthora parasitica</i> .....	19
3.3 Interação molecular citros- <i>Phytophthora</i> .....	21
3.4 Efeitos de <i>Phytophthora</i> .....	22
3.4.1 Efeitos extracelulares .....	23
3.4.2 Efeitos intracelulares.....	24
3.5 Estudo da expressão gênica .....	26
3.6 PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	27
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
4.1 Descrição e condição do isolado de <i>P. parasitica</i> .....	29
4.2 Bioensaio da interação <i>P. parasitica</i> com citros.....	30
4.3 Extração de RNA .....	31
4.4 Eletroforese de RNA em gel de agarose .....	32
4.5 Quantificação do RNA extraído .....	32
4.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	32
4.7 Síntese de cDNA.....	33
4.8 Análise da expressão gênica por RT-qPCR .....	33
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	34
5.1 Condições do cultivo para <i>P. parasitica</i> .....	34
5.2 Bioensaio da interação <i>P. parasitica</i> com planta.....	34
5.3 Análise do RNA total purificado .....	35
5.4 Resultado da PCR após digestão com DNase I .....	41
5.5 Análise preliminar de cDNAs por RT-qPCR.....	42
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	44
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	45

## 1. INTRODUÇÃO

Os citros são de grande importância para a economia mundial, sendo que laranjeiras, limoeiros e tangerinas são as espécies cítricas que mais se destacam por serem utilizadas no consumo *in natura* e na industrialização. No Brasil, os citros encontram condições favoráveis para o seu desenvolvimento, e o local de maior cultivo e produção é a região sudeste do país, com ênfase no estado de São Paulo. No entanto, apesar de ser uma das maiores atividades agrícolas do país, a citricultura brasileira é afetada constantemente por problemas ambientais e fitopatogênicos (NEVES et al., 2012).

Dentre as doenças de plantas, as fúngicas são as que causam maiores perdas agronômicas e econômicas no Brasil e no mundo. *P. parasitica* é um oomiceto, organismo do tipo fungo, causador de vários danos da cadeia produtora dos citros, em todo o seu ciclo de desenvolvimento, desde o cultivo até a colheita, é responsável por uma das principais doenças da cultura dos citros, a gomose. Dentre os sintomas na planta estão a murcha e a podridão de plântulas em sementeira, a gomose caracteriza-se por escorrimento de uma goma no tronco da planta, provocando assim rachadura na casca, podridão do tronco, e ainda, a podridão dos frutos durante o armazenamento, transporte e prateleira (BOAVA et al., 2011).

*P. parasitica* é um patógeno presente no solo, que tem como principal fator de condições ambientais de sobrevivência extrema umidade do solo e aeração. Esse patógeno é capaz de penetrar nos tecidos vegetais do seu hospedeiro, romper a resistência da planta, se estabelecer nos tecidos, e promove a infecção. Para conferir resistência a patógenos, durante muito tempo os cientistas se preocuparam apenas em estudar as respostas da planta hospedeira. Entretanto, uma estratégia eficiente e duradoura pode vir da elucidação dos componentes necessários aos patógenos que os tornam capazes de causar doenças em plantas. Neste contexto, se faz necessário elucidar os mecanismos envolvidos na interação patógeno-hospedeiro, tanto os níveis genéticos quanto fisiológicos e bioquímicos.

A infecção causada por Oomicetos em plantas ocorre por meio de secreções liberadas por proteínas efectoras, que são moléculas que manipulam a estrutura e função da célula hospedeira, facilitando a infecção ou levando a resposta de defesa da planta. Essas proteínas efectoras podem ser do tipo efetores extracelulares e efetores intracelulares, de acordo com o local para onde essas moléculas são direcionadas após sua síntese no patógeno, visando exercerem suas funções (KAMOUN, 2006).



Os efetores extracelulares ou apoplásticos são secretados para os espaços extracelulares das plantas e interagem com moléculas presentes nesses espaços e com receptores da superfície, enquanto os efetores citoplasmáticos são direcionados para dentro das células das plantas hospedeiras, onde acabam interagindo com diferentes alvos nos diversos compartimentos subcelulares das mesmas (KAMOUN, 2006).

Em adição aos efetores extracelulares, espécies de *P. parasitica* secretam e translocam outros efetores através da interfase planta hospedeira-patógeno. Esses efetores, conhecidos como intracelulares ou citoplasmáticos, alvejam proteínas da planta hospedeira, tornando-a susceptível ao patógeno. Efetores intracelulares com domínio RXLR têm sido facilmente identificados em espécies de oomiceto, relacionados à avirulência. A translocação requer a presença de um peptídeo sinal, seguido por um motivo N-terminal RXLR conservado. Ao lado dessa classe de efetores, os genomas de *Phytophthora* codificam outra classe de efetores translocados para o interior da hospedeira, denominados CRN (Crinkler and Necrosis). CRNs estão presentes em todas as espécies de oomicetos patogênicos de plantas que têm sido sequenciadas até hoje (STAM, 2013).

Estudos sobre a expressão de genes ao nível de transcritos têm demonstrado ser uma importante ferramenta para o entendimento dos processos biológicos envolvidos na defesa de plantas e na patogenicidade de patógenos (MARTINS, 2011). A análise quantitativa do perfil da expressão de genes efetores intracelulares de *P. parasitica* durante a interação com citros reflete a dinâmica das mudanças ao nível de transcritos e pode contribuir para validar a expressão e função predita desses genes. O entendimento dos mecanismos de patogenicidade de *P. parasitica* pode contribuir para a elaboração de estratégias de controle para este patógeno, que sejam eficazes, duradouras e limpas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral:

Analisar a expressão temporal e comparativa de genes efetores intracelulares de *P. parasitica* durante a interação com citros, por meio de RT- qPCR (*real time quantitative PCR*).

### 2.2 Objetivos Específicos:

- Realizar bioensaios de interação folha de laranja azeda (*Citrus aurantium*) e *P. parasitica*;
- Obter RNA total da mistura de folhas de laranja azeda (*C. aurantium*) e micélio de *P. parasitica* em diferentes tempos após a inoculação;
- Analisar a expressão dos genes efetores intracelulares *RXLR* e *CRN* por meio de RT-qPCR.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

A citricultura se destaca como uma das mais importantes atividades do agronegócio brasileiro, entretanto pragas e doenças são algumas das ameaças à citricultura brasileira que interferem na qualidade e quantidade das frutas cítricas, sendo, portanto, indispensável o uso do controle químico de pragas e doenças para uma melhor produtividade (NEVES et al., 2012). Neste contexto, a gomose ou podridão de raiz causada por *P. parasitica*, é uma das doenças economicamente mais importantes dos citros, por afetar desde a semeadura até o produto comercializado (BOAVA, et al., 2011).

#### 3.1 Caracterização e importância dos Citros

Os citros são plantas dicotiledôneas, pertencentes à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae e subtribo Citrinae, que contém 13 gêneros, incluindo *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus*, distribuídas mundialmente, principalmente em regiões tropicais quentes e temperadas (COSTA et al., 2010). Nesta subtribo, destacam-se as espécies do gênero *Citrus* e *Fortunella*, cultivadas no mundo todo devido à grande importância comercial de seus frutos, laranjas, tangerinas, limões (CORAZZA-NUNES et al., 2005). O gênero *citrus* foi dividido em 16 espécies por Swingle, em 1943 e dentre essas espécies está incluída a laranja azeda (*citrus aurantium*) (WEILER et al., 2010).

O Brasil destaca-se como o principal produtor mundial de laranja e de suco de laranja. Na produção nacional dos citros, cerca de 90,3% é de laranja, 5,1% de lima ácida e limão e 4,9 de tangerina. A região Sudeste se destaca com maior porcentagem da produção de laranja em relação às demais regiões, com maior produção no estado de São Paulo, com cerca de 80%. O Nordeste fica em segundo lugar na produção de laranja, porém ainda é bem menor comparada a região Sudeste, apenas 9%. Na Paraíba a produção de laranja em 2011 chegou a 7.379 toneladas (EQUIPE CITROS DA EMBRAPA MANDIOCA, 2011).

A citricultura é uma atividade agrícola de relevante importância para a economia brasileira (NEVES et al., 2012). No ano de 2011, as exportações do complexo citrícola chegaram ao total de 2,4 milhões de toneladas de produtos ou US\$ 2,7 milhões, representando cerca de 3% das exportações do agronegócio brasileiro. De acordo com dados do IBGE (2013), a previsão da produção de laranja do Brasil para a safra 2012-2013 foi de 18 milhões de toneladas, sendo pouco mais de 80% desse volume somente no estado de São Paulo, tendo em vista que é o maior produtor brasileiro dos citros. No Brasil a produção dos citros, é

designada tanto para o consumo “*in natura*” como também na forma industrializada de sucos concentrados (SILVA et al., 2008).

### 3.2 Caracterização e importância do oomiceto *Phytophthora parasitica*

O gênero *P. parasitica* está atualmente classificado dentro do Reino Stramenopila, Filo Oomycota, Classe Oomycetes, Ordem Pythiales, compreendendo mais de 90 espécies (SASSERON, 2008). As espécies mais importantes presentes no Brasil, causadoras de doenças nos citros são *P. nicotianae* Breda de Haan (*P. parasitica* Dastur) e *P. citrophthora*, mais frequentemente encontradas nas regiões citrícolas do País (BASSAN et al., 2010).

*P. parasitica* é um oomiceto fitopatogênico causador de diversas doenças em espécies vegetais, principalmente nas espécies de citros, sendo um dos problemas atualmente mais sérios fitossanitários, devido afetar drasticamente a citricultura brasileira. São patógenos encontrados em solo comum e em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, em função tolerar temperaturas até 35°C, porém a temperatura ideal para o crescimento desse patógeno é entre 27° a 32°C (BELTRAME, 2010). O rápido desenvolvimento de *P. parasitica* se deve à rápida produção de esporângios e zoósporos nos tecidos das plantas infectadas, isso acontece justamente em condições ambientais altamente favoráveis, dentre essas condições a mais importante é o excesso de umidade (ERWIN & RIBEIRO, 1996).

As espécies de *P. parasitica* produzem algumas estruturas de resistências, como clamidósporo, oósporos e zoósporos encistados. Essas estruturas germinam e produzem esporângios ou microesporângios sob condições de alta umidade e aeração. Os microesporângios germinam e produzem zoóporos, enquanto que os esporângios são formados sobre o solo ou até mesmo na superfície de órgãos atacados (LARANJEIRA, et al., 2005). Outras características marcantes desses patógenos são parede celular composta por  $\beta$ -glucano de celulose, e por não sintetizar esteróis (ERWIN & RIBEIRO, 1996).

O ciclo de vida das espécies de Oomicetos pode ser de dois tipos, reprodução assexual com a produção de zoósporo biflagelados e reprodução sexual com a união da estrutura feminina (oogônio) com a masculina (anterídio) que produz os oósporos. É uma espécie heterotática, ou seja, necessita de tipos de compatibilidade sexual distintos (A<sup>1</sup> e A<sup>2</sup>) em um mesmo local (ERWIN & RIBEIRO, 1996). As espécies de *P. parasitica* podem sobreviver de várias formas por alguns anos no solo, como micélio, esporângio, cisto, clamidósporos e oósporos (BELTRAME, 2010).

Gomose ou podridão de raiz causada por *P. parasitica*, é uma das doenças de solo mais sérias na citricultura, sendo um dos principais motivos de perdas econômicas nesse setor produtivo (BOAVA, et al., 2011). A gomose é caracterizada por se manifestar no hospedeiro, provocando podridão e exsudação de goma, podendo expandir-se para as raízes, sobretudo abaixo do solo e para cima do tronco. (SILVA et al., 2008). A umidade elevada aumenta a produção de esporângios e zoósporos, favorecendo o desenvolvimento da gomose pois os zoósporos produzidos necessitam mover-se na água até a superfície dos órgãos das plantas para promover a infecção (COSTA, 2007).

O controle a doenças causadas por patógenos inclui algumas medidas como tratamento químico, controle biológico e cultural, além de medidas preventivas, como utilização de mudas saudáveis e de porta-enxerto de espécies resistentes tolerantes já existentes ou obtidas por programas de melhoramento genético (BASSAN et al., 2010). Tendo em vista a importância dos danos causados pelos Oomicetos na agricultura, há um grande interesse no desenvolvimento de estudos a fim de analisar a resistência de plantas a patógenos para um melhoramento de práticas de controle (ALVAREZ et al., 2009).



**Figura 1.** Ilustrações de sintomas da gomose dos Citros. Fonte: MEDEIROS, 2010

### 3.3 Interação molecular citros-*Phytophthora*

As plantas estão constantemente sob o ataque de uma grande diversidade de patógenos, dentre os quais se encontram os Oomicetos (PAIS et al., 2013). Esses patógenos são considerados prejudiciais aos citros, por afetarem grande parte da sua produção, tendo influência direta na economia mundial. Diversos patógenos têm a capacidade de sobreviver e se proliferar na superfície da planta, podendo penetrar diretamente na epiderme, através de aberturas naturais ou ferimentos (ZENG et al., 2010). Uma das principais vias de invasão dos patógenos é através dos estômatos, sendo que a maioria tem a capacidade de forçar sua passagem através dos estômatos fechados (TEXEIRA, 2011; CALVACANTE et al., 2013). Fungos e Oomicetos evoluíram ao longo do tempo várias estratégias para infeccionar seus hospedeiros.

É necessário o reconhecimento eficiente dos microrganismos invasores e a rápida indução das respostas de defesa, pois se tornam essenciais para o desenvolvimento da resistência por parte da planta à infecção. Um conjunto de genes coevoluiu, tanto em plantas quanto em patógenos, ao longo de milhares de anos, com a finalidade de facilitar a comunicação e a interação entre eles. Para que a planta consiga defender-se dos patógenos, ela precisa ser capaz de reconhecê-los e os patógenos devem ser capazes de manipular os mecanismos de defesa da planta e superá-los, para conseguir crescer e reproduzir-se (ROSADO, 2013).

As plantas possuem mecanismos de resistência contra patógenos, que podem ser de dois tipos: estruturais e bioquímicos, ambos pré-formados e/ou pós-formados. Os mecanismos estruturais pré-formados, conhecidos também como passivos ou constitutivos constituem-se em barreiras físicas que impedem ou atrasam a entrada do patógeno nos tecidos da planta, dentre as quais podemos citar ceras, cutículas, tricomas e vasos condutores. As substâncias bioquímicas pré-formadas são substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno, tais como flavonoides, fenóis, alcaloides, glicosídeos e inibidores proteicos, que são encontrados em altas concentrações antes da chegada do patógeno. Já os mecanismos de resistência pós-formados, ativos ou induzíveis são aqueles que são ativados ou que aumentam os níveis de compostos pré-existentes após o ataque do patógeno, dentre os quais podemos citar, os estruturais, como papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça, camadas de abscisão e tiloses; e bioquímicos, como fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese e espécies reativas de oxigênio (SCHWAN ESTRADA, 2008).

As interações plantas-patógenos são classificadas em compatível (patógeno virulento e hospedeiro suscetível) e incompatível (patógeno avirulento e hospedeiro resistente). Na interação compatível, o patógeno coloniza o tecido vegetal, se multiplica e provoca a infecção, enquanto que na interação incompatível o patógeno penetra no tecido vegetal e de imediato encontra defesas por parte da planta, que estão rapidamente sendo ativadas para desencadear a resistência. A presença de um gene de resistência, dominante na planta (R) e um gene de avirulência dominante no patógeno (Avr) condiciona a incompatibilidade em interações gene-a-gene (RESENDE et al., 2003).

O sistema de ativação de defesa das plantas atua em dois níveis: o primeiro envolve a ativação das respostas de defesa da planta por meio do reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) que desencadeiam respostas de defesa gerais referidos como PTI (Imunidade desencadeada por PAMP) Em compensação a eficiente sinalização dos patógenos é capaz de suprimir os diferentes componentes da PTI através de determinadas proteínas efetoras. O segundo envolve o reconhecimento de efetores específicos conhecidos como proteínas de avirulência por meio de genes de resistência (R) da planta, ativando respostas de defesa e restringindo o desenvolvimento do patógeno, provocando assim uma resposta de resistência específica e sistemática conhecida como Imunidade Disparada por Efetores (ETI, *Effector Triggered Immunity*) (VLOT et al., 2009; JONES & DANGL, 2006).

A comunicação molecular entre planta-*P.parasitica* é mediada por uma grande magnitude de trocas 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. Estes patógenos produzem proteínas efetoras típicas capazes de atravessar a membrana plasmática e modificar a estrutura e função das células hospedeiras, para facilitar a infecção, chamados de fatores de virulência ou disparando respostas de defesa em plantas resistentes, fatores de avirulência, impedindo ou moderando a infecção. Essas proteínas entram no citoplasma das células vegetais e tem como principal função suprimir as vias de transdução de sinais que mediam as respostas de defesa das plantas (TYLER, 2008; KAMOUN, 2006).

### **3.4 Efetores de *Phytophthora***

Segundo Kamoun (2009), os efetores são definidos como moléculas de patógenos que alteram a estrutura e função de componentes celulares do hospedeiro, facilitando a infecção. Espécies de *P. parasitica*, como muitos outros patógenos, secretam proteínas efetoras que são

capazes de modular a imunidade inata da planta e promover a colonização do hospedeiro (SAUNDERS et al., 2012; BIRCH et al., 2009). As proteínas de oomicetos dividem-se em duas classes de efetores locais distintos na planta hospedeira: efetores apoplásticos que são secretados no espaço extracelular da planta e efetores citoplasmáticos que são translocados diretamente para dentro da célula da planta do hospedeiro, por estruturas especializadas, como vesículas e haustórios (KAMOUN, 2006; HARDHAM, 2010).

### 3.4.1 Efetores extracelulares

Quando os Oomicetos invadem a planta hospedeira, precisam, inicialmente, lidar com barreiras bioquímicas existentes no apoplasto da mesma. Ambos, patógeno e hospedeiro, segregam proteínas e metabólitos no ambiente extracelular. Três tipos de efetores apoplásticos de oomicetos podem interferir com os processos das plantas: inibidores de enzimas da hospedeira; RGD (ácido arginina-glicina-aspartato), contendo proteínas e toxinas, que levam as células da hospedeira à morte. Dentre os inibidores de enzimas da hospedeira, podemos citar, as proteases, quitinases e glucanases; por exemplo, protease C14, presente em *Nicotiana benthamiana* é essencial para sua defesa contra os patógenos; quando os genes dessa protease são silenciados em *Nicotiana benthamiana*, sua suscetibilidade a *P. infestans* aumenta consideravelmente. A protease Rcr3 ajuda na defesa de plantas de tomate contra *P. infestans*, portanto, quando essas enzimas são inibidas pelos inibidores apoplásticos de proteases EPIC1 e EPIC2B, as plantas de tomate tornam-se mais suscetíveis a esse parasita (STASSEN & ACKERVEKEN, 2011).

O segundo tipo de efector apoplástico, RGD, age interferindo nos processos de adesão e sinalização entre a parede celular da hospedeira e a membrana plasmática; podemos citar o motivo-RGD IPI-O de *P. infestans*, que parece agir tanto dentro da célula hospedeira quanto extracelularmente. O terceiro tipo de efetores apoplásticos são as toxinas produzidas pelos oomicetos necrotróficos, como certas espécies de *Pythium* ou hemiotróficos, como a maioria das espécies de *Phytophthora*. Duas famílias de proteínas tóxicas são produzidas pela maioria dos oomicetos: as proteínas PcF/SCR, que são pequenas proteínas contendo hidroxiprolina e proteínas semelhantes a NEP1 (NLPs), que podem induzir a morte celular em dicotiledôneas, agindo do lado de fora da membrana celular da hospedeira (STASSEN & ACKERVEKEN, 2011).

Proteínas Nep 1-like (NLPs) estão largamente distribuídas em bactérias, fungos e oomicetos, particularmente, em espécies associadas a plantas. Nep 1, uma proteína de cerca



de 24 kDa, que causa a necrose e induz à formação de etileno, foi inicialmente purificada a partir do fungo *Fusarium oxysporum*, mas foi posteriormente encontrada em diversas outras espécies, incluindo *Pythium* e *Phytophthora*. Essas proteínas possuem a capacidade de induzir a morte celular em até 20 espécies de plantas dicotiledôneas (KAMOOUN, 2006).

Dentre os efetores produzidos por *P. parasitica* podemos incluir as elicinas, eliciadores indutores de necrose não específicos e ácido araquidônico (AA), um componente das membranas. As elicinas são um grupo de efetores extracelulares, formado por proteínas pequenas, com menos de 150 aminoácidos, que possuem um número certo de resíduos de cisteínas e atuam no processo de infecção do patógeno. Um exemplo de elicina bastante estudada é a transglutaminase, onde se descobriu que um peptídeo N-terminal de 13 aminoácidos, localizado na parede celular dessa enzima é reconhecido por receptores da planta, levando à ativação de uma resposta de defesa (COSTA, 2007).

CBEL (celulose binding, eliciador, like-lectin) é uma glicoproteína de 34 kDa e 268 aminoácidos, presente na parede celular de hifas e zoósporos encistados. Foi isolada, pela primeira vez, a partir de *P. parasitica var. nicotianae*. Essa proteína liga-se à celulose e à superfície das plantas, provocando necrose e eliciando a morte celular e a expressão de genes de defesa em folhas de fumo. Cepas de *P. parasitica* silenciadas para o gene CBEL foram prejudicadas na sua capacidade de se ligar às membranas, embora ainda fossem capazes de infectar plantas de fumo (KAMOOUN, 2006).

### 3.4.2 Efetores intracelulares

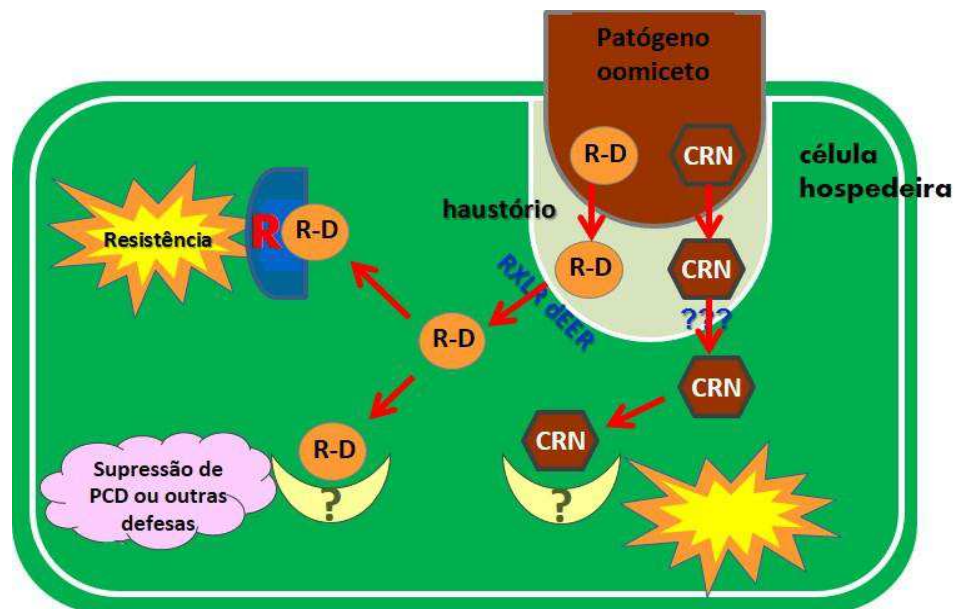
Os oomicetos hemibiotróficos formam haustórios, que possuem uma função dupla: absorvem nutrientes, ao mesmo tempo em que carregam efetores para dentro do hospedeiro. Os haustórios penetram na parede celular da hospedeira, invaginam-se através da membrana e contêm proteínas específicas da membrana, que são necessárias para a patogenicidade. Os efetores são segregados a partir do agente patogênico e aqueles que carregam sinais de translocação através da hospedeira, são transportados para dentro da célula (STASSEN & ACKERVEKEN, 2011).

Genomas de todas as espécies de *Phytophthora* examinados abrigam um grande repertório de genes efetores intracelulares RXLR, e de outra classe de efetores candidatos denominados “Crinkles” (CRNs) (SCHORNACK et al., 2014). Em proteínas RXLR, o X representa qualquer resíduo de aminoácido, e os outros aminoácidos são Arginina, Leucina e Arginina. Esse domínio de aminoácidos é necessário e suficiente para mediar a entrada de

efetores em células do hospedeiro, na ausência do Oomiceto, indicando que a translocação ocorre independentemente de qualquer maquinaria do patógeno (PANSTRUGA & DODDS, 2009). Cerca de 563 efetores RXLR estão previstos para estarem presentes em *P. infestans*.

A família de proteínas “Crinkles” foi identificada após verificar-se uma característica fenotípica de enrugamento da folha causada por proteínas de *P. infestans* segregadas sobre plantas. Proteínas maduras CRN retêm atividade de indução de morte celular. Agroinfiltração com proteínas do tipo CRN induz necrose em folhas de plantas. CRNs estão presentes em todas as espécies de Oomicetos patogênicos de plantas, sequenciados até o momento. Cerca de 196 genes e 255 pseudogenes CRNs têm sido sequenciados a partir do genoma de *P. infestans*, até o momento. Outras espécies que tiveram seus genes CRNs sequenciados foram *P. ramorum*, encontrando-se cerca de 60 genes e 202 para *P. sojae* (STAM et. al., 2013).

A interação molecular envolvendo efetores intracelular de Oomicetos e proteínas de plantas hospedeiras foi bem esquematizada por Tyler (2008), demonstrado na Figura 2. Proteínas efetoras de Oomicetos entram em células vegetais para suprimir as respostas de defesa de plantas por ligação à ‘proteínas alvos de efetores’. Mas, proteínas de resistência de plantas podem detectar um efector e/ou um complexo de ‘efector-proteína alvo’ e induzir mecanismos de resistência (KAMOON, 2006; TYLER, 2008).



**Figura 2.** Interação molecular de efetores intracelulares das classes RXLR-dEER e CRN de Oomicetos e proteínas de plantas hospedeiras. A interação direta de uma proteína RXLR-dEER com uma proteína de resistência leva a resistência da planta. Especula-se que a interação direta de RXLR-dEER com uma proteína-alvo da planta deve levar a supressão da morte celular programada e outras defesas da planta. Já no caso de CRNs a interação a molécula-alvo na planta deve levar a morte celular da hospedeira e necrose. R-D, efetores de patógenos RXLR-dEER. CRN, proteínas Crinkles. R, produto de gene de resistência da hospedeira que pode detectar um efector. PCD, morte celular programada Fonte: Tyler (2008).

### 3.5 Estudo da expressão gênica

Avanços no campo da genômica funcional têm permitido estudos de respostas de plantas em todos os níveis do transcriptoma, ou seja, um conjunto de transcritos em uma célula para um estágio de desenvolvimento específico ou condição fisiológica, revelando repostas multigênicas em plantas (PAYTON et al., 2009; MARTINS, 2011). Com isso, o estudo da expressão gênica tem demonstrado ser uma ferramenta importante para o entendimento dos processos biológicos em nível molecular, podendo este, contribuir para a caracterização da resistência de plantas (SILVA, 2013). O estudo da expressão gênica em eucariotos requer a quantificação precisa de RNAm expressos em diferentes situações ou diferentes tecidos.

Segundo Martins (2011) é importante quantificar a mudança nos níveis de expressão de cada transcrito durante o desenvolvimento do organismo e sob diferentes condições, pois os níveis de expressão relacionam-se com modificações na fisiologia, metabolismo e ao processo de adaptação celular. Podemos identificar genes envolvidos em mecanismos de defesa e tentar identificar em quais vias atuam ou são regulados por esses genes, por meio de expressão gênica diferencial. Os genes podem ser expressos de formas diferentes, caso o organismo apresente-se em condições normais ou submetido a algum tipo de estresse.

A atual hipótese estabelece que quando um gene se expressa, a proteína codificada por ele irá executar uma dada função em uma determinada célula/tecido/órgão do organismo e que a expressão gênica pode acontecer em resposta a alguma condição normal ou de estresse, seja biótico ou abiótico. Portanto, o estudo da expressão de genes gera informações que respondem a questões a respeito das funções biológicas associadas a eles, tais como “quando?” (sob qual condição?), “onde?” (em qual tecido?) e o “quanto?” (números de RNAs transcritos ou de proteínas produzidas?) um determinado gene foi expresso (RODRIGUES, 2013)

Para a realização de estudos moleculares de expressão de genes que codificam proteínas, o primeiro processo envolvido é o da Transcrição do gene em RNA mensageiro (transcrito). Para a detecção de transcritos de interesse em determinado grupo celular, existem técnicas moleculares qualitativas, semi-quantitativas e quantitativas. Uma técnica qualitativa muito utilizada é o Northern blot, que utilizam sondas marcadas que irão hibridizar no RNAm estudado, e que por isso são sequencias homólogas ao gene de interesse. A técnica semi-quantitativa mais conhecida é a RT-PCR, que utiliza a enzima transcriptase reversa (RT) para amplificar por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) uma molécula de DNA complementar

ao RNAm, chamado cDNA. No caso de estudos de expressão gênica global, bibliotecas funcionais de cDNA são construídas e sequenciadas gerando informações sobre os genes expressos na condição em que o RNAm total foi purificado, as quais são depositadas em bancos de dados. A análise qualitativa da expressão gênica global tem sido feita pela técnica de microarranjos, onde centenas de diferentes genes conhecidos são fixos em um microchip e sondados por RNAm totais isolados sob determinadas condições. Porém, a validação de análises qualitativa e semi-quantitativa da expressão de genes deve ser feita pela técnica de análise quantitativa chamada RT-qPCR em tempo real, que é a transcrição reversa seguida por PCR quantitativo, em que a expressão de um determinado transcrito é mensurada durante a amplificação do cDNA por PCR.

Independente do tipo de análise molecular da expressão gênica que se deseja utilizar, seja transcriptase reversa, PCR quantitativo em tempo real, construção de bibliotecas de cDNA ou análise de microarranjos, é fundamental a obtenção de um RNA de boa qualidade e em quantidades adequadas. Devido à presença de grandes variedades, e também da quantidade de compostos secundários em plantas, não existe um método padrão para o isolamento de ácidos nucleicos que possa ser utilizado para todas as espécies. A presença de polissacarídeos e polifenóis influencia no momento da extração, gerando um RNA de baixa qualidade (CARDILLO et al., 2006; PAULA, 2012).

### **3.6 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)**

A técnica quantitativa de PCR em tempo real consiste em um dos métodos mais utilizados atualmente para determinar o número de moléculas alvo em diferentes condições experimentais, que servem de molde para amplificação pela DNA polimerase e para monitorar a expressão gênica em plantas (GACHON et al., 2004). A qPCR se difere da PCR convencional por detectar o produto da reação a cada ciclo, permitindo o acompanhamento da amplificação durante a fase exponencial e uma determinação precisa da quantidade de material presente (GACHON et al., 2004). É uma técnica recente muito utilizada tanto em estudos de detecção de genes em genomas, chamada análise quantitativa absoluta, quanto em estudos de expressão gênica, onde se utiliza a transcrição reversa de RNAm em cDNA, por isso RT-qPCR, muito se utiliza a análise quantitativa relativa. Nesta análise quantitativa relativa, a medida da expressão de um gene de interesse (alvo) é relativa à expressão de um gene referido como controle endógeno, o qual normalmente é um gene constitutivo. O

desenvolvimento da RT-qPCR facilitou a detecção de transcritos, devido sua alta sensibilidade, boa reprodutibilidade, precisão e resultados rápidos.

Existem três estratégias mais conhecidas para detectar os produtos da PCR em tempo real e todas utilizam corantes fluorescentes. O método SyBR Green utiliza corantes fluorescentes que se intercalam às moléculas de DNA fita dupla, enquanto que o Molecular beacon e TaqMan baseia-se na hibridização de sondas fluorescentes que se ligam ao amplicon específico. Os métodos mais utilizados em plantas são o SyBR Green para análise relativa e o TaqMan para análise absoluta (GACHON & SAINDRENAN, 2004). A fluorescência utiliza SyBR Green, um corante que se incorpora no DNA de fita de dupla para detectar o produto da PCR conforme ele se acumula durante os ciclos, por meio da emissão de uma luz verde, captada pelo instrumento de PCR em tempo real (MARTINS, 2011).

A PCR em tempo real combina a amplificação de um alvo específico com métodos de quantificação, por meio de medidas da fluorescência associada à síntese de amplicon ao longo dos ciclos. Esta técnica funciona essencialmente da mesma maneira que a PCR convencional, com ciclos subsequentes em que ocorre a desnaturação do DNA, a hibridização de um par de primers (iniciadores) a sequências específicas e a extensão, mediada por uma DNA polimerase termoestável, de uma fita de DNA complementar, resultando em um aumento exponencial do número de amplicons ao longo dos ciclos da reação. No entanto, na PCR quantitativa em tempo real, esse aumento é registrado em tempo real ao longo da fase exponencial e não somente na reação final (MARTINS, 2011).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Todas as atividades deste trabalho foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Educação e Saúde UFCG, Campus-Cuité PB, exceto a análise de RT-qPCR em tempo real que foi realizada no Laboratório de Biotecnologia da EMBRAPA Algodão, Campina Grande-PB, em colaboração com a Dra. Liziane Maria de Lima.

### 4.1 Descrição e condição do isolado de *P. parasitica*

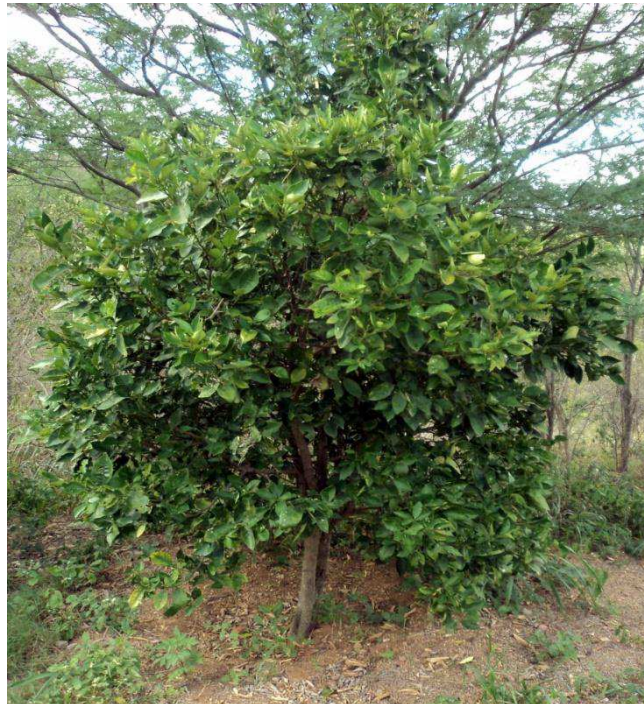
O isolado utilizado neste experimento foi o IAC095 de *P. nicotianae* var. *parasitica* procedente do Centro APTA Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo de Campinas, Cordeirópolis SP, cedido pelo pesquisador Dr. Marcos Antônio Machado. O cultivo do patógeno foi realizado de acordo com as instruções do Laboratório de Fitopatologia do referido Centro. O manuseio do patógeno foi feito sob condições assépticas, onde foi mantido no Laboratório em placas de Petri contendo o meio cenoura-ágar (CA) autoclavado, composto por 500 mL de água destilada, 100 g de cenoura e 10 g de ágar. A cultura foi crescida em luz constante a 25 °C, durante 8-12 dias, até a próxima repicagem.



**Figura 3.** Cultivo de *P. parasitica* em meio de cultura cenoura-ágar.

#### 4.2 Bioensaio da interação *P. parasitica* com citros

O bioensaio para estudo da interação citros-*P. parasitica* foi realizado pelo novo método de isca desenvolvido por Sousa (2013). Os tratamentos estudados foram discos foliares de laranja azeda não-inoculados (NI) *versus* inoculados (I) com micélio de *P. parasitica*. Folhas jovens de laranjeira azeda (*Citrus aurantium*) foram coletadas no CES/UFCG, embrulhadas em papel alumínio e transportadas em gelo até o Laboratório de Biotecnologia (FIGURA 4). Após a coleta, as folhas foram lavadas em água destilada com uma gota de detergente comercial e, em seguida, cortadas com o auxílio de um furador de metal em discos de 3,0 mm de diâmetro. Para o tratamento não-inoculado, em cada repetição experimental utilizou-se 1g de discos foliares de laranja azeda colocados em Becker de 250 mL contendo 100 mL de água destilada autoclavada estéril e, para o tratamento inoculado adicionou-se micélio de *P. parasitica* cultivado durante 8 dias, raspado de duas placas de Petri com o auxílio de pinças metálicas esterilizadas.



**Figura 4.** Laranja azeda (*Citrus aurantium*) presente no Horto Florestal do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, em Cuité PB.

Para a montagem do experimento foram necessários 25 beakers contendo água destilada autoclavada estéril com discos foliares de laranja azeda, e 25 beakers contendo água destilada autoclavada estéril com discos foliares e micélio de *P. parasitica*, totalizando 50

amostras. Posteriormente, as amostras foram mantidas em temperatura controlada de 28° C e sob luz constante até o momento de coleta em diferentes tempos (0, 12, 24, 36 e 48 horas após a inoculação, h.a.i.) para extração de RNA total. Para cada tempo foram preparados 5 repetições experimentais.

### 4.3 Extração de RNA

Para a extração de RNA total, todas as vidrarias e soluções utilizadas foram tratadas de 12 a 16 horas com DEPC (dietilpirocarbonato), um forte inibidor de RNAses, nucleases que degradam o RNA, e posteriormente eliminado por autoclavagem durante 30 minutos. Todo manuseio das amostras e reagentes durante a extração do RNA foi feito utilizando luvas. RNA total foi extraído de laranjeira azeda (*C. aurantium*) de amostras das repetições do tratamento não-inoculado ou a partir da mistura de folhas e micélio de *P. parasitica*, de amostras das repetições do tratamento inoculado, coletadas nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 h.a.i. Em cada tempo foram coletadas 10 amostras, sendo 5 repetições de cada tratamento. No ato da coleta das amostras, para eliminar a água, cada amostra coletada foi transferida para tubos Falcon de 15 mL e centrifugados por 10 min a 6.0000 r.p.m, e imediatamente, armazenados a -20°C até o momento da extração.

O material sedimentado por centrifugação e congelado foi macerado com o auxílio de cadinho e pistilo acondicionados a -20°C. O macerado foi recuperado para tubos de microcentrífuga de 2 mL e adicionados 800 µL de tampão de extração com SDS (NaCl 1/M, Tris-HCl pH 7,5 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 1%). Em capela de exaustão, as estes tubos foram adicionados 700 µL de clorofane (Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico, 25: 24: 1) e 20 µL de β-mercaptoetanol. A mistura foi homogeneizada em vórtex por 30 seg., incubada a temperatura ambiente por 10 min, em seguida foi centrifugada em microcentrífuga refrigerada a 10.000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo microtubo onde foi adicionado igual volume de cloreto de lítio (LiCl<sub>2</sub>) e incubado a 4°C por 3 horas. As amostras foram homogeneizadas no vórtex por 30 seg e centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min a 4°C; em seguida, descartado o fenol e ressuspendido o pellet em 200 µL água milli-Q DEPC. Aos tubos adicionou-se 300 µL de isopropanol (RNase free) e 300 µL de tampão citrato (0,8 M de citrato de sódio e 1,2 M de NaCl), incubou-se por 10 min em temperatura ambiente. Após centrifugação a 12.000 rpm por 15 min à 4°C, o sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de etanol 75% RNase free gelado, misturado em vórtex por 30 segundos e centrifugado por 8.000 rpm por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado



invertendo-se cuidadosamente o tubo, e a secagem do pellet foi realizada a 4°C por 30 min. Ressuspendeu-se o pellet em 20 µL de água milli-Q DEPC, armazenado no freezer a -20° C.

#### **4.4 Eletroforese de RNA em gel de agarose**

A eletroforese foi realizada para identificar a qualidade e concentração do RNA total extraído. Para a preparação do gel utilizou-se agarose em uma concentração de 0,8% em tampão de corrida T.A.E (100 mM de Tris-HCl pH 8.0, 57,1 mL de Ácido acético glacial e 500 mM de EDTA pH 7.5). As amostras foram aplicadas em gel contendo 1 µl de tampão de amostra e 10 µl de RNA isolado. A migração do RNA no gel foi realizada a 150V por 30 minutos e os ácidos nucleicos foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados. Cuba e cama de eletroforese foram lavados com água DEPC, bem como os tampões utilizados foram preparados utilizando água DEPC.

#### **4.5 Quantificação do RNA extraído**

Para quantificação do RNA extraído foi utilizado um espectrofotômetro (NanoDrop), para cada amostra foi usado 1/µL de RNA total. A espectrofotometria foi estimada em absorbância de 260 nm, 280 nm, 230 nm, para avaliar a pureza do RNA.

#### **4.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

A PCR foi utilizada para análise da ausência de DNA genômico contaminante nas amostras de RNA total após digestão com DNase I e para confirmar se os primers específicos para controle endógeno, a serem utilizados na RT-qPCR, estavam funcionando. As reações foram realizadas em volumes de 25 µL, utilizando-se 1X de tampão da Taq DNA Polimerase; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de dNTPs; 1,5µM de cada primer forward e reverse; 75 ng de DNA total de *P. parasitica*, 1 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas). As condições térmicas da reação foram 95 °C/2 min, para uma etapa de desnaturação inicial, seguido por 35 ciclos de desnaturação do DNA/cDNA a 95°C/30 min, anelamento dos primers em cada uma das fitas de DNA/cDNA molde a 49°C/15 seg e extensão a 72 °C/1 min. Em seguida, uma extensão final de 72 °C/5 min.

#### 4.7 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, em uma primeira etapa desnaturou-se 93 ng de RNA total e 500 µg de Random Primers 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, aos tubos foram adicionados 4 µL de tampão Go-Script 5X, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µL de Mix PCR nt 10 mM, 0,5 µL de inibidor RNase 40 U/µL e 1 µL de GoScript-RT (Promega). As reações ocorreram em volume final de 20 µL nas seguintes condições térmicas: 42°C/50min e 70°/15min.

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

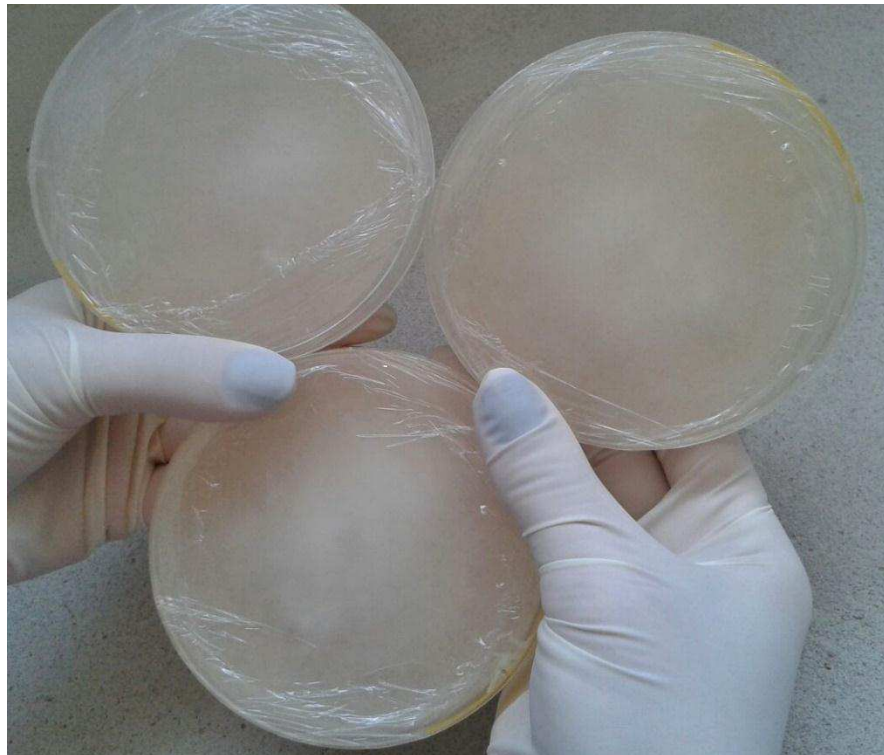
A quantificação relativa da expressão de dois genes efetores foi feita em equipamento Eco™ Real-Time PCR System (Illumina), usando GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega), de acordo com os procedimentos padrões dos fabricantes. Para cada reação utilizou-se 1,5 µM de cada primer e 100 ng cDNA de cada amostra. As condições térmicas da reação foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos para ativação da enzima, seguidos por 40 ciclos de desnaturação à 95° C por 15 segundos e anelamento/extensão à 60° C por 1 minuto. Finalizando, as condições térmicas para a curva de dissociação foram 15 segundos a 95° C e 1 minuto à 60° C, seguidos por 30 segundos a 95° C e 15 segundos à 60° C. Os dados foram coletados e armazenados no software SDS (Sequence Detection Software (Version 1.4) que acompanha o equipamento. Como controle endógeno foram utilizados primers para genes de β – tubulina (Forward: AGGAGATGTTCAAGCGTGTG; Reverse: GATCGTTCATGTTGGACTCG), sintetizados pela Invitrogen, visando normalizar as amostras quanto as possíveis diferenças de quantidade de cDNA adicionadas em cada reação, e como controle negativo o mix sem o cDNA.

Os resultados foram normalizados utilizando Cts obtido para o controle endógeno presente na mesma reação. Para normalização, foi utilizada a equação:  $\Delta Ct = Ct (\text{gene alvo}) - Ct (\text{controle endógeno})$ . A calibração foi determinada para cada tempo estudado, pela fórmula:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{amostra inoculada}) - \Delta Ct (\text{calibrador: amostra não-inoculada})$ . A quantificação relativa foi obtida pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Utilizou-se 3 repetições biológicas para cada tempo, e para cada reação de cada repetição biológica foram ainda utilizadas as réplicas de pipetagem de cada tratamento.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Condições do cultivo para *P. parasitica*

O isolado IAC095 de *P. nicotianae* var. *parasitica*, foi cultivado em meio de cultura cenoura-ágar, por oito dias em temperatura aproximada de 25°C, obtendo-se um excelente rendimento na produção de micélio, sem nenhuma contaminação nas placas, mostrando-se adequado para a inoculação com os discos de folhas de citros.



**Figura 5.** Imagem ilustrativa de micélio de *P. parasitica* crescido em placa de Petri em meio cenoura-ágar após 11 dias de repicagem.

### 5.2 Bioensaio da interação *P. parasitica* com planta

Um novo método para a ativação do patógeno em folhas de laranjeira foi desenvolvido por Sousa (2013), baseado no método de isca descrito por Grimm & Alexander (1972). O método de isca dos autores utilizaram um solo preparado da seguinte forma: três partes de semente, uma parte de vermiculite e uma parte de areia, que tinha sido artificialmente infestada com *P. parasitica* Dastur e usada para inoculação de mudas de citros. Entretanto, Sousa (2013) colocou discos de micélio-cenoura ágar em um becker contendo água destilada autoclavada estéril e adicionou discos de folhas e o patógeno foi recuperado das folhas em

meio seletivo. Posteriormente, Ferreira (2014) realizou este experimento descrito por Sousa (2013), sendo que o micélio de *P. parasitica* foi raspado do meio sólido a partir de 2 placas de Petri e folhas de laranjeira azeda.

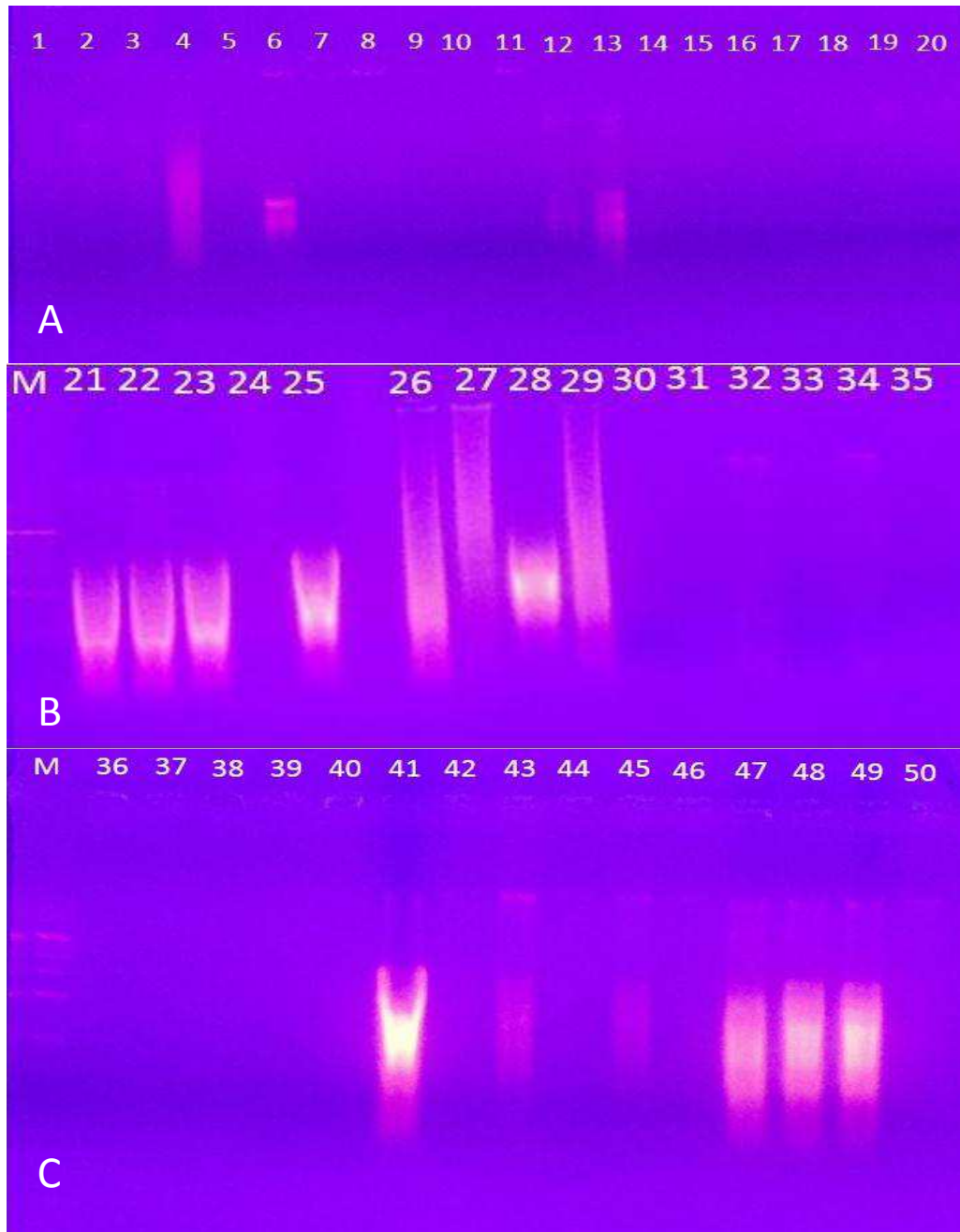
Em seu estudo histológico da interação de discos foliares de laranja azeda com *P. parasitica*, Ferreira (2014) demonstrou uma forte atração imediata do micélio do patógeno, presente na água antes da adição dos discos foliares, provavelmente devido a exsudatos da planta. Esta autora demonstrou ainda a ocorrência de penetração do micélio no tecido foliar em diferentes tempos após a inoculação com este patógeno. Portanto, estes dados representaram forte embasamento da eficiência do método para estudos da interação citros-*P. parasitica* por meio da análise da expressão gênica e, por esta razão, justificou seu uso neste trabalho, conforme demonstrado na Figura 5.



**Figura 6.** Ilustração da montagem do bioensaio da interação citros-*P. parasitica* pelo método de isca modificado de acordo com Sousa (2013).

### 5.3 Análise do RNA total purificado

O RNA total de discos foliares de *C. aurantium* (Laranja azeda) e da mistura de discos foliares de laranja azeda com *P. parasitica* foram extraídos representando os dois tratamentos estudados neste trabalho: não-inoculado (somente folha) e inoculado (folha e *Phytophthora*), em diferentes tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas após a inoculação. A primeira análise do RNA obtido foi a visualização da qualidade em gel de agarose 0,8 %, após eletroforese (Figura 5), etapa fundamental para estudos de expressão gênica.



**FIGURA 7.** Eletroforese em gel de agarose 0,8% do RNA isolado a partir de folhas de laranja azeda não inoculada (**A e B**) e inoculada (**B e C**) com *P. parasitica*, em diferentes tempos. Sequência de amostra no gel: **M**- marcador de peso molecular AMRESCO 1 kb DNA Ladder; (**A**) 1-5, 0 hora; 6-10, 12 horas; 11-15, 24 horas; 16-20, 36 horas; (**B**) 21-25, 48 horas. Amostras não inoculadas: (**B**) 26-30, 0 hora; 31-35, 12 horas; (**C**) 36-40, 24 horas; 41-45, 36 horas; 46-50, 48 horas.

A partir da análise da Figura 5, não foi possível visualizar RNA total extraído em 17 amostras da condição não inoculada e em 14 amostras da condição inoculada. Entretanto, a eletroforese em gel de agarose é muito usada para visualizar RNAs, sendo a eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata mais indicada. Outra desvantagem é que a eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio não permite visualizar baixas concentrações de ácidos nucleicos. Diversos motivos justificariam a pouca concentração de RNA visualizado em algumas amostras, por exemplo, maceração do tecido micelial e vegetal na ausência de nitrogênio líquido, ocasionando rápida degradação do RNA ou lise celular ineficiente. Outro fator importante durante a extração é a total degradação das RNAses, que são enzimas muito resistentes a vários tratamentos, inclusive autoclavagem. Para o sucesso do isolamento do RNA, é necessário impedir ainda que polissacarídeos e polifenóis, encontrados em diferentes quantidades nos diferentes tecidos liguem-se aos ácidos nucleicos, contribuindo na determinação da quantidade, qualidade e integridade do RNA (ZAMBONI et al., 2008).

Ainda na Figura 5 observou-se RNA com qualidade e quantidade elevadas em quase 4 das 5 repetições de ambas as condições estudadas no tempo 48 horas, além de outras. Neste sentido, pode-se considerar RNA total extraído com integridade quando se visualiza as bandas de RNA ribossômico 28S e 18S, e este padrão foi obtido nas amostras identificadas nos poços 6, 13, 21, 22, 23, 25, 28, 41, 47, 48 e 49. Indicativo para contaminação com DNA genômico pode ser visualizado nas amostras como uma banda de alto peso molecular próximo ao poço do gel, acima do RNA, e este padrão foi observado nas amostras 26, 27, 29, 34, 43, 45, 47, 48 e 49. A presença de um rastro acima e em torno dos RNAr podem ser indicativos de RNA mensageiro, porém abaixo destes pode ser indicativo de degradação de RNA.

Em seguida, os RNAs isolados de todas as amostras foram analisados quanto a quantidade e pureza por espectrofotometria (Tabelas 1 e 2). A quantidade de RNA isolado é estimada pela leitura utilizando densidade ótica a 260 nm, multiplicada pelo valor de 40 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) vezes o fator de diluição da amostra. Para análise da pureza em espectrofotômetro são observados valores de absorvância a 280 nm, 260 nm e 230 nm. A relação entre a absorvância  $A_{260}/A_{230}$  indica a contaminação por polissacarídeos ou polifenóis, e o valor da relação  $A_{260}/A_{280}$ , indica a contaminação por proteínas (MANNING, 1991; LOGEMANN et al., 1987). Dessa maneira, quando esses valores estiverem próximos a 1,8 e 2,1, respectivamente, indicam a descontaminação das amostras. Com relação à quantidade o ideal seria uma concentração mínima de 500  $\text{ng}/\mu\text{L}$  (ASIF et al., 2006).

TABELA 1 - Quantificação de RNA de folhas de *aurantium* (laranja azeda) não inoculadas com *P. parasitica*, utilizando espectrofotômetro NanoDrop 2000.

TEMPO DE EXTRAÇÃO NÃO INOCULADA (horas)	AMOSTRA	ng/ $\mu$ L	A260/280	A260/230
0	1	47,9	1,44	0,85
0	2	75,9	1,58	1,08
0	3	44,4	1,44	0,41
0	4	181,9	1,61	0,76
0	5	25,6	1,37	0,48
12	6	114,2	2,06	1,37
12	7	93,7	1,39	0,80
12	8	88,8	1,30	0,54
12	9	21,5	1,36	0,45
12	10	22,5	1,30	0,65
24	11	55,1	1,46	0,65
24	12	49,1	1,78	1,20
24	13	89	1,96	1,66
24	14	27,7	1,60	1,13
24	15	15,9	1,43	0,55
36	16	8,3	1,29	0,50
36	17	7,2	1,49	0,95
36	18	8	1,44	0,78
36	19	24,7	1,66	0,89
36	20	13,1	1,58	1,36
48	21	2.008,6	2,15	2,26
48	22	1.832	2,11	2,17
48	23	1.839,7	2,15	2,27
48	24	70,1	1,14	0,88
48	25	1827,2	2,14	2,26

Fonte: Dados da pesquisa

TABELA 2 - Quantificação de RNA extraído da mistura de *aurantium* inoculada com *P. parasitica*, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000.

TEMPO DE EXTRAÇÃO INOCULADA (h.a.i.)*	AMOSTRA	ng/ $\mu$ L	A260/280	A260/230
0	1	769,9	2,0	1,94
0	2	949,8	1,42	1,38
0	3	1.086,2	2,13	1,74
0	4	336,9	9,50	5,88
12	5	71,9	1,35	0,82
12	6	31,2	1,41	0,60
12	7	73,2	1,61	1,01
12	8	89,7	1,41	1,01
12	9	70	1,52	0,89
24	10	12,4	1,33	0,65
24	11	13,6	1,30	1,64
24	12	14,8	1,36	0,71
24	13	17,7	1,52	0,21
24	14	15,8	1,42	0,16
36	15	3.101,0	2,16	2,24
36	16	13,8	1,63	0,93
36	17	204,2	2,07	1,85
36	18	19,6	1,50	0,81
36	19	176,8	2,09	1,96
48	20	74,1	1,41	0,56
48	21	1.270,3	2,15	2,20
48	22	1.616,4	2,13	2,22
48	23	1.423,6	2,14	2,24
48	24	27,6	1,52	0,72

\* h.a.i., horas após a inoculação. Fonte: Dados da pesquisa.



De acordo com os valores citados na Tabela 1, observou-se que na condição não inoculada, as amostras apresentaram os seguintes resultados detalhados por tempo: em 0 hora, nenhuma das amostras apresentou uma boa quantidade de RNA, com concentrações variando de 44,4 a 181,9 ng/ $\mu$ L e todas apresentaram contaminação por polissacarídeos, polifenóis e proteínas; no tempo 12 horas, as concentrações variaram de 21,5 a 114,2 ng/ $\mu$ L e todas as amostras também estavam contaminadas; no tempo 24 horas, as concentrações variaram de 15,9 a 89 ng/ $\mu$ L, com contaminação na maioria das amostras, exceto nas amostras 12 e 13, com valores A260/280 de 1,78 e 1,96, respectivamente, indicando descontaminação por proteínas; as menores concentrações de RNA foram observadas no tempo 36 horas, com valores variando de 7,2 a 24,7 ng/ $\mu$ L e, de acordo com os valores de absorvância, todas estavam contaminadas; as melhores concentrações de RNA foram observadas no tempo 48 horas, com valores variando de 1.832 a 2.008,6 ng/ $\mu$ L, sendo que todas estavam descontaminadas, exceto a amostra 24, com uma concentração de 70,1 ng/ $\mu$ L, contaminada.

Com relação às amostras na condição inoculada, os resultados foram: no tempo 0 hora, foi obtido um bom rendimento, com concentrações de 769,9 a 1.086,2 ng/ $\mu$ L. Somente a amostra 4 apresentou um baixo rendimento, 336,9 ng/ $\mu$ L, sendo que a amostra 1 apresentou descontaminação por polissacarídeos, polifenóis e proteínas e a amostra 3, descontaminação apenas por proteínas; nos tempos 12 e 24 horas, as amostras apresentaram rendimento baixíssimo, com valores variando de 12,4 a 89,7 ng/ $\mu$ L e todas estavam contaminadas; no tempo 36 horas, somente a amostra 15 apresentou um excelente rendimento, 3.101 ng/ $\mu$ L e todas as outras apresentaram um rendimento variando entre 13,8 e 204,2 ng/ $\mu$ L. Com relação à contaminação, as amostras 15 e 17 estavam descontaminadas; no tempo 48 horas, as amostras 21, 22 e 23 apresentaram uma boa concentração de RNA, com valores de 1.270,3 a 1.616,4 ng/ $\mu$ L e estavam descontaminadas, enquanto as amostras 20 e 24, além de apresentarem um baixo rendimento, estavam contaminadas.

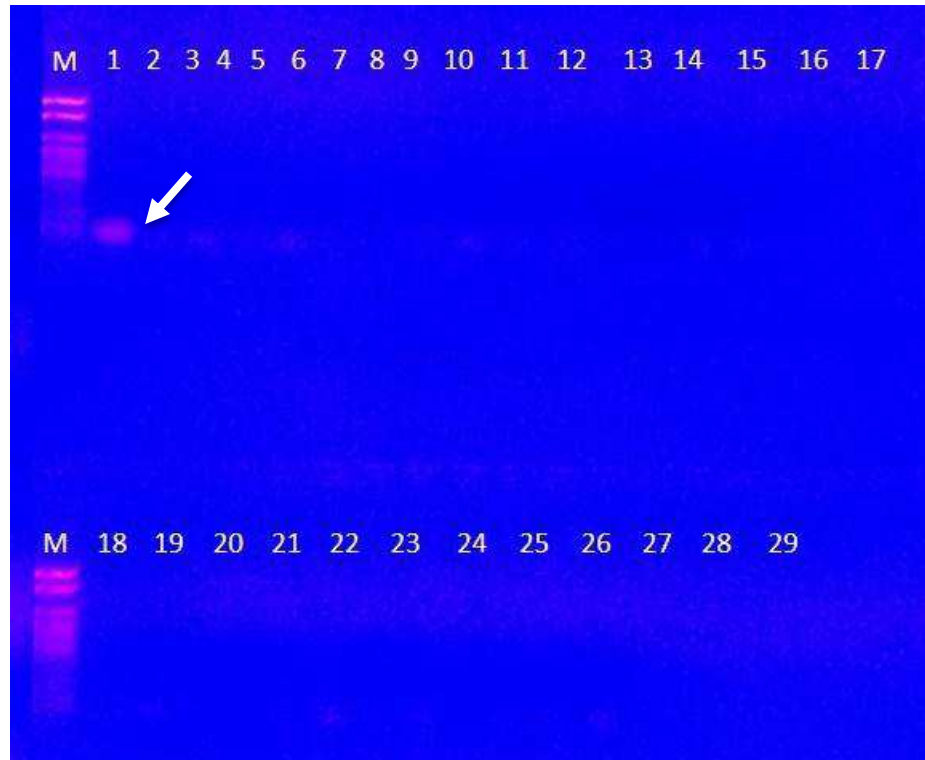
A partir da análise dos resultados obtidos por quantificação e eletroforese, na condição não inoculada nos tempos 0 hora, 12 horas, 24 horas e 36 horas, o resultado do gel de eletroforese foi incompatível com o da quantificação, exceto o tempo 48 horas, que apresentou uma concentração similar em ambas as técnicas. Com relação à condição inoculada nos tempos 12 horas e 24 horas o resultado do gel de eletroforese coincidiu com o da quantificação, ou seja, uma baixa concentração de RNA, no entanto, nos tempos 0 hora, 36 horas e 48 horas os resultados foram compatíveis.

A quantificação do RNA é um passo essencial para ensaios baseados em RNA, análise de expressão de genes e RNA interferente (RNAi), por isso é usado em uma grande

variedades de processos laboratoriais, tornando-se um passo crítico para determinar a expressão de um tipo específico de gene em um determinado tecido. Ao se analisar o perfil de RNA que é específico para um determinado tecido e espécie, pode-se verificar a origem do mesmo. Essa verificação é feita utilizando-se a transcrição reversa seguida pela reação em cadeia polimerase (RT-PCR) (ARANDA et al, 2009).

#### **5.4 Resultado da PCR após digestão com DNase I**

De acordo com os dados da quantificação em espectrofotometria, cerca de 3 µg totais de RNA foram digeridos com a enzima DNase I e, após precipitação, foram testados para amplificação por PCR. Como resultado da PCR diagnóstica da digestão dos RNAs das amostras com DNase I observou-se que somente ocorreu a amplificação do gene *CRN*, com tamanho de banda esperada, na amostra controle positivo (Figura 8, amostra 1), que teve como molde o DNA de *P. parasitica*. A digestão de RNAs com a enzima DNase I é uma etapa importante quando se deseja sintetizar cDNA, uma vez que esta enzima tem a capacidade de digerir DNA genômico que é purificado junto com os RNAs, portanto um contaminante das preparações de RNAs. Uma vez que o cDNA será utilizado para reações quantitativas de amplificação em PCR, especialmente pela utilização de corante fluorescente intercalante de DNA dupla fita, 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). Nesse sentido, a não amplificação dos RNAs após digestão com DNase I representa um critério fundamental para a próxima etapa, que é a reação de síntese da 1ª fita de cDNA, a partir dessas amostras.

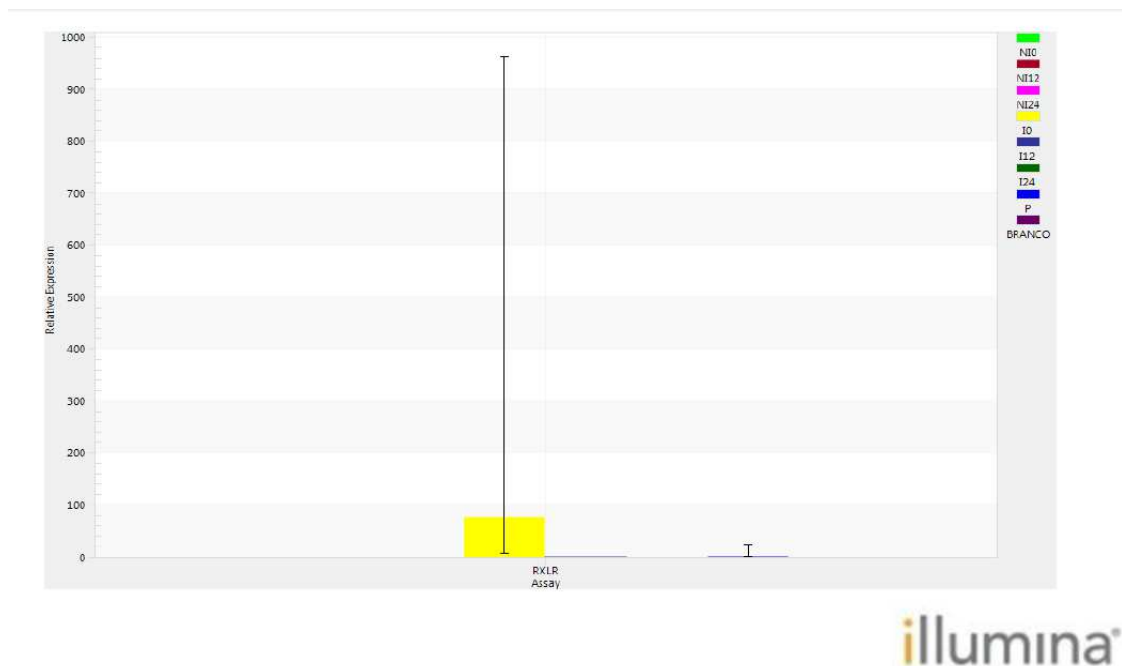


**Figura 8.** Eletroforese em gel de agarose 0,8% diagnóstica da PCR utilizando como molde RNAs de amostras digerido com DNase I e o primer do gene *CRN*. M. Marcador: Low Ranger 100 bp DNA Ladder; 1. Controle positivo, DNA de *P. parasitica*; I (Inoculada) e NI (Não Inoculada) 3-5 0H NI; 6-8 12H NI; 9-11 24H NI; 12-14 36H NI; 15-17 48H NI; 18-20 0H I; 21-23 12H I; 23-24 24H I; 25-26 36 H I; 27-29 48H I. A seta indica fragmentos amplificados do tamanho esperado.

### 5.5 Análise preliminar de cDNAs por RT-qPCR

Para validar a síntese de cDNAs foi realizado um ensaio preliminar da expressão de genes  *$\beta$ -tubulina*, como controle endógeno, *CRN* e *RXLR*, como genes alvos, por estarem envolvido no processo de infecção do Oomiceto, usando os cDNAs de amostras de folhas de citros não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *P. parasitica* nos tempos 0, 12 e 24 horas, por PCR quantitativo em tempo real pelo método de quantificação relativa padrão, usando um termociclador Eco<sup>TM</sup> Real Time PCR System (illumina) (FIGURA 9). Como resultado, não foi possível observar a expressão de genes *CRN* (dados não mostrados) em nenhuma das amostras analisadas, genes  *$\beta$ -tubulina* foram encontrados expressos somente na amostra NI 24horas e genes *RXLR* nas amostras I0h e I24h, com um nível de expressão 104 vezes mais na amostra I0 em relação a I12. Esta informação explica a imediata atração do patógeno pela folha mostrada por Ferreira (2014) e comprova a expressão do gene *RXLR* imediatamente após o contato com patógeno. O baixo nível de expressão encontrado para *RXLR* pode ter uma visualização melhor em escala gráfica de 100 ao invés de 1000, como está na Figura 9.

Outro fator também pode ser que na quantidade total de RNA/cDNA analisada deve-se considerar que existem RNAs de citros e *P. parasitica*, e o protocolo deve ser melhor ajustado para as futuras análises. Vários fatores podem ter contribuído para a não expressão dos genes, incluindo o preparo das amostras, melhor qualidade e quantidade dos RNAs extraídos visualizadas foram nas amostras não analisadas (36 3e 48 horas) e não nos tempos analisados e já era esperado a não amplificação de genes específicos de *P. parasitica* nos tempos não inoculados, onde continham apenas amostras de folhas de citros.



**Figura 9.** Gráfico da análise da expressão de genes  $\beta$ -tubulina e *RXLR* usando os cDNAs de amostras de folhas de citros não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *P. parasitica* nos tempos 0, 12 e 24 horas, por PCR quantitativo em tempo real pelo método de quantificação relativa padrão, usando um termociclador Eco<sup>TM</sup> Real Time PCR System (illumina), gentilmente testado em colaboração com a Dra. Liziane Maria de Lima, realizado na EMBRAPA Algodão.

A técnica quantitativa de PCR em tempo real permitiu analisar a expressão de genes alvos em diferentes condições experimento. No entanto, a análise precisa dos resultados gerados pela RT-qPCR está diretamente relacionada ao gene normalizador utilizado, o qual deve apresentar expressão constitutiva semelhante para as diferentes amostra/tratamentos avaliados no experimento. Uma vez que os cDNAs gerados neste trabalho estão aptos para utilização em RT-qPCR, as análises quantitativas da expressão desses e outros genes efetores usando 3 repetições biológicas e todos os tempos estudados precisam ser continuadas e estão em andamento atualmente.

## 6. CONCLUSÕES

- As condições de cultivo e manuseio do material vegetal e de *P. parasitica* durante o bioensaio são fundamentais para a obtenção de RNAs de qualidade e para as respostas biológicas a serem analisadas;
- O método empregado para o isolamento de RNAs de folhas de citros e mistura de folhas de citros e *P. parasitica* foi bem sucedido;
- A quantidade e qualidade dos RNAs extraídos variam entre as amostras nos diferentes tempos estudados;
- DNA de *P. parasitica* amplificado com o primer CRN é um bom controle positivo para comparar com amostras de RNAs digeridas com DNase I para eliminação de DNAs contaminantes;
- A quantidade dos cDNAs sintetizados estimada por espectrofotometria para DNA fita simples é diagnóstico da presença dos cDNAs nas amostras;
- Genes efetores *RXLR* estão expressos nas amostras I0h e I24h, de acordo com a análise quantitativa.

## 7. REFERÊNCIAS

- 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.
- 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.
- ALVAREZ, L. A. et al. J. Seasonal susceptibility of citrus scions to *Phytophthora citrophthora* and *P. nicotianae* and the influence of environmental and host-linked factors on infection development. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 124, p.621-635, 2009.
- BASSAN, M. M. et al. Reação de híbridos somáticos de citros à infecção por *Phytophthora nicotianae*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 429-435, 2010.
- BELTRAME, A. B. **Interação *Phytophthora nicotianae* – porta-enxerto de citros (tangerina Sunki e citrumelo Swingle): efeito no sistema radicular, aspectos biológicos e bioquímicos**. Tese (Doutorado) –ESALQ/USP, 138p, 2010.
- BIRCH, P. R. J. et al. Towards understanding the virulence functions of RXLR effectors of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. **Journal of Experimental Botany**. P. 1-8, 2009.
- BIRTIC & KRANNER. Isolation of high-quality RNA from polyphenol-polysaccharide-and lipid-rich seeds. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p, 144-148, 2006.
- BOAVA, L. P. et al. Global gene expression of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* and their hybrids under infection of *Phytophthora parasitica*. **BMC Genomics**, v. 12:39, p. 1-13, 2011.
- CARDILLO, A. B. et al. Analysis and sequencing of h6hmRNA, last enzyme in the tropane alkaloids pathway from anthers and hairy root cultures of *Brugmansia candida* (*Solanaceae*). **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, n.3, p.195-198, 2006.
- CAVALCANTE; F. M. L. et al. Interação patógeno planta: respostas frente ao ataque. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.8, n.3, p.90-97, 2013.
- CORAZZA-NUNES M. J. et al. Aurantioideae: Uma revisão da taxonomia e filogenia, com as contribuições da sistemática molecular. *Melhoramento e Biotecnologia, Laranja, Cordeirópolis-SP* v. 26, n. 2, p. 359-374, 2005.
- COSTA, A. F. et al. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. **Revista brasileira de farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 4, p.502-505, 2010.
- COSTA, P. S. C. **Expressão de genes em *Phytophthora nicotianae* que codificam proteínas indutoras de respostas de defesa em planta**. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, MG, p 64, 2007.
- ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. ***Phytophthora* diseases worldwide**. [S.l.]: APS, 1996.

**EQUIPE CITROS DA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA.** Considerações sobre a produção de laranja no Estado de São Paulo. P. 1-22. 2011 Disponível em:< [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br) >Acesso: 02 de junho de 2014.

FERREIRA, L. T. M. F. **Análise histológica temporal de folhas de laranjeira azeda inoculadas com *Phytophthora parasitica*.** Monografia, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, PB, 2014.

GACHON, C. et al. Real-Time PCR what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v.55, n. 402, p. 1445-1454, 2004.

GACHON, C & SAINDRENAN, P. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 5, p. 367-371, 2004.

GRIM, G. R.; ALEXANDER, A. F. Citrus leaf pieces as traps for *Phytophthora parasitica* from slurries. **Phytopathology**, St. Paul, v.63, n.6, p. 540-541, 1973.

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

IBGE: **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola.** v.26, n 2, p.1-84, Rio de Janeiro-RJ, 2013.

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

LOGEMANN, J. et al. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. **Analytical Biochemistry**. v. 163, p. 16-20, 1987.

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

KAMOUN, S. The secretome of plant-associated fungi and oomycetes, **In: Deising, H. & Essey K. *The mycota***, p. 173-180, 2009.

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

LARANJEIRA, F. F. et al. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JÚNIOR, DIRCEU, de NEGRI, J.D.; PIO. R.M; POMPEU JÚNIOR, J. **Citros**, IAC/FUNDAG, p.929 v.1. Campinas, SP, 2005.

MARTINS, A. C. Q. **Prospecção e validação de genes-candidatos envolvidos na resistência de amendoim silvestre (*Arachis stenoperma*) ao *Passalora personata*, o agente causal da macha preta do amendoim.** Dissertação (Mestrado), Departamento de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, 132p, 2011.

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

MEDEIROS, G. D. A. **Identificação e caracterização molecular de efetores do tipo CRN (*Crinkling and Necrosis-Inducing Protein*) de *phytophthora nicotianae* de citros.** Monografia, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, PB, 2010.

NEVES, M.F, Trombin, V.G., Kalaki, R.B., Lopes, F.F. **A Laranja do Campo ao Copo.** São Paulo: Atlas. 218 p, 2012.

PAIS, M. et al. From pathogen genomes to host plant processes: the power of plant parasitic oomycetes. **Genome Biology**, v. 14:211, p. 2-10, 2013.

PANSTRUGA, R & DODDS, P. N. Terrific proteins traffic the mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. **Science**, v. 324, p. 748-750, 2009.

PAYTON, P. et al. Gene expression profiling in peanut using high density oligonucleotide microarrays, **BMC Genomics**, v.10, p. 1-11, 2009.

PAULA, M. F. B. et al. Efficiency of rna extraction protocols in different types of coffee plant tissues. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 3, p. 284-293, 2012.

ROSADO, C. C. G. **Expressão gênica da resposta de defesa de plantas de *Eucalyptus grandis* à infecção por *Puccinia psidii*.** Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, VIÇOSA, MINAS GERAIS, 48p, 2013.

RESENDE, M.L.V. et al. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p. 123-129, 2003.

RESENDE, M. L. V. et al. **Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos RAPP.** V. 14, 70p, 2006.

SASSERON, G. R. **Desenvolvimento e validação de diagnóstico molecular de fungos patogênicos a citros.** Dissertação (Mestrado) Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agrônomo, Campinas-SP, 82p, 2008.

SAUNDERS, D. G.O. et al. Host Protein BSL1 Associates with Phytophthora infestans RXLR Effector AVR2 and the Solanum demissum Immune Receptor R2 to Mediate Disease Resistance. **The Plant Cell**, p. 1-15, 2012.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. F. et al. Mecanismos bioquímicos e defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S. F., LEITE, B., STANGARLIN, J. R., CIA, P. **Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular.** Piracicaba: FEALQ, 2008, cap 6, p. 227-248.

SCHORNACK, S. et al. Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. **PNAS**, v. 107, n 40, 2010. Disponível em: [www.pnas.org](http://www.pnas.org). Acesso em: julho de 2014.



SILVA, K. S. et al. Atividade antagônica in vitro de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 749-754, 2008.

SILVA, A. K **Prospecção e validação de genes-candidatos envolvidos na tolerância ao déficit hídrico em amendoim silvestre**. Monografia, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF 2013.

STASSEN, J. HM. & ACKERVEKEN, G. V. D. How do oomycete effectors interfere with plant life? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, p.407-414, 2011. Disponível em [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com). Acesso em Julho de 2014.

STAM, R. et al. Identification and Characterisation CRN Effectors in *Phytophthora capsici* Shows Modularity and Functional. **PIOS ONE**, v 8, n. 3, 2013.

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

TEIXEIRA, R. A. **Mecanismos de resistência a fitodoenças**. Revisão bibliográfica, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 82p, 2011.

TYLER, B. M. **Enterring and breaking: virulence effector proteins of oomycete plant pathogens**. Blackwell Publishing Ltd, Cellular Microbiology, v. 11, p. 13-20, 2008.

VLOT, A. C.; DEMPSEY, D. A. D.; KLESSIG, D. F. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 47, p. 177–206, 2009.

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

WEILER, R. L. et al. Caracterização molecular de uma progênie de tangerineira “Clementina Fina” e “Montenegrina”. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1523-1529, 2010.

ZENG, W.; MELOTTO & M.; HE, S. Y. Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 599-603, 2010.

ZAMBONI, A et al. Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other woody-plants. **Biogeosciences and Forestry**, v.1, p.122-125, 2008.