

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE – UFCG
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE – CES
Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas

Larissa Thuane Medeiros Furtado Ferreira

**ANÁLISE HISTOLÓGICA TEMPORAL DE FOLHAS DE LARANJEIRA AZEDA
INOCULADAS COM *Phytophthora parasitica*.**

CUITÉ – PB

2014

Larissa Thuane Medeiros Furtado Ferreira

**ANÁLISE HISTOLÓGICA TEMPORAL DE FOLHAS DE LARANJEIRA AZEDA
INOCULADAS COM *Phytophthora parasitica*.**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Centro de Educação e Saúde (CES/UFCG) como um dos requisitos para obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

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

CUITÉ – PB

2014

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

F383a

Ferreira, Larissa Thuane Medeiros Furtado.

Análise histológica temporal de folhas de laranjeira azeda inoculadas com *Phytophthora* parasítica. / Larissa Thuane Medeiros Furtado Ferreira – Cuité: CES, 2014.

42 fl.

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

Orientadora: Magnólia de Araújo Campos.

1. Interação planta - patógeno. 2. Bioensaio. 3. Microscopia da luz. I. Título.

CDU 58

Larissa Thuane Medeiros Furtado Ferreira

**ANÁLISE HISTOLÓGICA TEMPORAL DE FOLHAS DE LARANJEIRA AZEDA
INOCULADAS COM *Phytophthora parasitica*.**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Centro de Educação e Saúde (CES) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) como forma de obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

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

Prof. Dr. Marcus José Conceição Lopes
(Membro Examinador – CES/ UFCG)

Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos
(Membro Examinador – CES/ UFCG)

Cuité, 04 de abril de 2014

À Deus.

Às minhas joias: Geane e Dulce.

Ao meu querido e eterno avô Assis Furtado (in memoriam).

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por ter-me dado força, coragem, sabedoria e oportunidade de chegar até aqui.

Às minha duas queridas mães, Geane de Medeiros Furtado e Dulce de Medeiros Furtado, por seu amor, dedicação, exemplo de vida, compreensão, força, amor e carinho dado a mim em todas as etapas de minha vida, fazendo de mim uma vencedora, pois sem vocês não seria nada. Muito obrigada pela educação que vocês me deram, pois hoje ela faz de mim uma vitoriosa. Não tenho palavras para agradecer o quanto vocês fizeram por mim.

Ao meu querido e saudoso avô (*in memoriam*), pela força espiritual que me deu nessa longa caminhada, pois nas horas em que pensava em desistir de tudo me lembrava das palavras em que ele me dizia quando criança e ao longo de minha vida, lembrando-se de seus sonhos.

Ao meu querido tio Glauco Furtado em que nas horas de angustia e tristezas estava sempre perto de mim dando forças com palavras de amor e carinho.

Ao meu namorado Dayvisson Lima, pelo constante incentivo, pela paciência, pelo amor, pela preocupação e pelo companheirismo tido comigo durante esse período de minha vida.

À minha orientadora Prof^a Dr.^a Magnólia de Araújo Campos, pela paciência e oportunidade, sua colaboração foi essencial para desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada.

À todos meus professores do CES, pelo aprendizado e convivências todos esses anos passados juntos, vocês foram fundamentais na minha formação. Agradeço pela dedicação, apoio e paciência, pois sem vocês nada disso poderia se tornar possível.

Às técnicas do laboratório Jacque e Danila, pelo força, apoio, disponibilidade e amizade.

Ao Dr. Marcos Antônio Machado, pesquisador do Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis-SP por ceder o isolado IAC-095, objeto de estudo do presente trabalho.

Ao laboratório LBiotec, pelo convívio e amizade adquirida, um agradecimento especial a Ana Paula, sua ajuda foi muito importante para realização deste trabalho

e não deixando de agradecer também as minhas queridas amigas do Lab, Ana Luiza e Franciely Negreiros, que nos momentos mais difíceis em que passei estavam do meu lado me dando o maior apoio.

À minha turma de Ciências Biológicas 2008.2, em especial as minhas amigas Klebia Cruz, Luciana Santos, Maraiza Cavalcante e Maria Mislene, pela amizade e pelos momentos maravilhosos vividos juntos, noites mal dormidas estudando juntas, mas cada minuto que passamos só nos edificou, muito obrigado pela amizade de vocês meninas.

Por fim agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, participaram desta importante etapa em minha vida.

"Se cair levante, se deslizar se segure, mas nunca pense em desistir, por que quanto mais amarga for a sua queda mais doce será a sua vitória"

(Autor Desconhecido)

RESUMO

Estudos de interação planta-patógeno ao nível histológico têm sido realizados através de bioensaios, colocando o patógeno em contato com tecidos de plantas e observando estes através de microscopia. Estas observações microscópicas da infecção ou penetração podem ser estudadas através de acompanhamentos em diversos tempos após inoculação ou também podem ser acompanhados ao decorrer da infecção. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar folhas de laranjeira azeda inoculadas com *Phytophthora parasitica*, agente causal da doença gomose, por meio de microscopia de luz em diferentes tempos após a inoculação pelo método de isca modificado. Micélio do isolado IAC095 de *P. parasitica*, proveniente do Centro APTA Sylvio Moreira, foi inoculado em água junto com discos de folhas de laranjeira e a interação planta-patógeno foi acompanhada em oito tempos diferentes, 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 e 96 horas após inoculação. Como resultado observou-se que o patógeno é atraído pelos discos foliares de laranja azeda, imediatamente. O local de maior atração imediata do patógeno é pelos vasos condutores primários e secundários feridos. Após a inoculação, as hifas se fixaram nos vasos condutores 12 horas e ainda não às 0 horas; um aumento na proliferação de hifas ocorre entre 36 e 48 horas; a perda da coloração esverdeada dos discos de folhas para tonalidade verde lodo ocorreu às 60 horas; e às 96 horas foram observadas necrose e presença do patógeno no ambiente intercelular. A visualização de estruturas de reprodução do patógeno ocorre às 12 horas para esporângios e às 60 horas para o aparecimento de clamidósporos. Portanto, o método de isca modificado é viável para estudos de interação citros-*Phytophthora parasitica* ao nível histológico.

Palavras-chaves: interação planta-patógeno; bioensaio; penetração; microscopia de luz.

ABSTRACT

Histological plant-pathogen interaction studies have been achieved through bioassays, by putting the pathogen in contact with the plant tissues and subsequent observations by microscopy. These macroscopically observations of infection or penetration can be studied through accompaniments at different time intervals after inoculation as well as monitored over the course of the infection. In this context, the aim of this work was to analyze sour orange leaves inoculated with *Phytophthora parasitica*, causal agent of the citrus gummosis disease, by using of light microscopy at different times after inoculation and the modified traps method. Mycelium of the *P. parasitica* IAC095 isolate, from the Center APTA Sylvio Moreira, was inoculated in water with citrus leaf discs and plant-pathogen interaction was monitored in eight different times, at 0 , 12 , 24 , 36 , 48 , 60 , 72 and 96 hours after inoculation. As results, it was observed that the pathogen is attracted by the sour orange leaf discs, immediately. The site of greatest immediate attraction of the pathogen is the primary and secondary drivers injured vessels. After inoculation, hyphae fixed on conductor 12 hours vessels and not at 0 hours; an increase in the proliferation of hyphae is between 36 and 48 hours; the loss of green staining of leaf discs to tint green slime occurred at 60 hours; and at 96 hours it were observed necrosis and the presence of the pathogen in the intercellular environment. The visualization of sporangia reproduction structures of the pathogen has occurred at 12 hours, while the appearance of chlamydospores was at 60 hours. Therefore, the modified trap method is practical to study citrus-*Phytophthora parasitica* interaction at histological level.

Keywords: plant-pathogen interaction; bioassay; penetration, light microscopy.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - Imagens do Laboratório de Biotecnologia do CES, onde foi realizada a pesquisa	22
FIGURA 02 - Cultivo de <i>Phytophthora parasitica</i> para realização do experimento	23
FIGURA 03 - Demonstração de perfurações realizadas na nervura central e nervuras laterais de folhas de laranjeira azeda	24
FIGURA 04 - Laranjeira azeda presente no Horto Florestal estudada neste trabalho	25
FIGURA 05 – Imagem demonstrativa de amostragem do bioensaio	26
FIGURA 06 - Primeiro contato do patógeno com os discos de folha de laranjeira azeda	28
FIGURA 07 - Micrografias da atração do patógeno pelos vasos condutores .	30
FIGURA 08 - Micrografias da interação citros- <i>Phytophthora parasitica</i> nos tempos de 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96 horas após inoculação	32
FIGURA 09 - Eletroforese em gel de agarose 1% de RNA total isolado em tempos de 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 e 96 horas	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Valores obtidos em leituras de absorbância em luz ultravioleta para RNA isolado de folhas de laranjeira- <i>Phytophthora parasitica</i> , usando espectrofotômetro Nanodrop. CUITÉ, 2014	35
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Avr	Avirulência
cDNA	DNA complementar
CES	Centro de Educação e Saúde
IAC	Instituto Agrônomo de Campinas
INCT	Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia
PAMP	Padrão Molecular Associado à Patógeno
R	Resistência
RNA	Ácido Ribonucleico
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	17
1.1.1 Objetivo Geral	17
1.1.2 Objetivo Específico	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Interação Planta – Patógeno	18
2.2 Interação Citros – <i>Phytophthora</i>	19
2.3 Estudo histológico da interação planta-patógeno	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Descrição e condição de cultivo do isolado de <i>Phytophthora parasítica</i>	22
3.2 Determinação da região do tecido vegetal que <i>P. parasítica</i> possui maior atração de contato	23
3.3 Bioensaios de interação de folhas de laranjeira-<i>Phytophthora parasítica</i>	25
 Determinação da região do tecido vegetal que <i>P. parasítica</i> possui maior atração de contato	28
3.4 Extração de RNA	28
3.5 Estimativa da quantidade e qualidade do RNA extraído	28
3.5.1 Estimativa por Espectrofotometria	28
3.5.2 Estimativa por eletroforese em gel de agarose	29
4 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	30
4.1 Observações microscópicas para o estudo da região de contato de <i>P. parasítica</i> com folhas de laranjeira azeda na água	31
4.2 Interação folha-<i>Phytophthora</i> a partir de micrografias	33
4.3 Análise do RNA extraído a partir do mix folha-micélio	36
5 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A histologia da interação planta-patógeno é um recurso eficiente que tem permitido estudar os processos de infecção, esclarecendo os eventos de pré-penetração, penetração e colonização dos tecidos do hospedeiro, além de evidenciar possíveis mecanismos estruturais de resistência (ARAÚJO; MATSUOKA, 2004). A interação hospedeiro-patógeno é visualizada como um sistema único e totalmente novo, o qual depende da planta e do patógeno em íntima relação com o meio ambiente (TEXEIRA, 2011).

A citricultura é uma atividade que foi introduzida no Brasil no início da colonização, onde encontrou condições mais adequadas para produção do que na própria região de origem Asiática, expandindo-se por todo o território Nacional. O desenvolvimento de diversas tecnologias voltadas para aplicação no setor cítrico promoveu o avanço e o estabelecimento da atividade, permitindo assim que a citricultura brasileira se expandisse, ganhando grande importância econômica no país e no mundo. O Brasil detém atualmente mais da metade da produção mundial de suco de laranja, exportando 98% da sua produção. No entanto, pragas e doenças causadas por fungos e oomicetos patogênicos são responsáveis pela perda de milhões de árvores na cadeia produtiva de citros.

A doença gomose causada por *Phytophthora parasitica* é ainda um grande desafio encontrado na citricultura, pois predomina na maioria dos viveiros e em todos os pomares comerciais do Brasil, causando grandes perdas na produção, devido afetar severamente o sistema de produção de mudas em extensas áreas de pomares (LARANJEIRA *et al.*, 2005).

Este gênero de patógeno produz proteínas efetoras típicas capazes de atravessar a membrana plasmática do hospedeiro (KAMOUN, 2006). Efetores apoplásticos são secretados no espaço extracelular, onde eles interagem com alvos extracelulares e receptores de superfície. Efetores citoplasmáticos são transloucados para dentro da célula vegetal presumivelmente através de estruturas especializadas como vesículas de infecção e haustórios, que invaginam para dentro das células hospedeiras vivas. Portanto, a determinação de metodologias para o estudo da interação citros-*Phytophthora* e que sejam práticas e rápidas são de grande interesse.

Uma estratégia para detecção da presença de *Phytophthora parasitica* em solo foi descrita por Grimm e Alexander (1973), denominada de método de isca. Este método consiste como armadilhas em suspensões de solo para o isolamento de *Phytophthora* ssp. patogênico para citros. No nosso Laboratório de Biotecnologia – LBiotec, no Centro de Educação e Saúde – CES, Campus Cuité da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Sousa (2013) realizou estudos visando a ativação da patogenicidade e recuperação de *P. parasitica* mantida após sucessivos subcultivos axênicos, os quais incluíram o teste para recuperação do patógeno a partir da inoculação artificial de laranja e a partir de folha de laranjeira azeda inoculada com base no teste de isca modificado. Em ambos os casos, o patógeno foi recuperado com sucesso, indicando que o método de isca modificado pode ser utilizado para estudos de interação citros-*Phytophthora*.

Neste sentido, este trabalho enfoca um estudo temporal da interação citros-*Phytophthora*, através de visualizações microscópicas em oito tempos (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 e 96 horas após a inoculação, h.a.i.) em folhas de laranjeira azeda, utilizando o método de isca modificado de Sousa (2013).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

- Analisar folhas de laranjeira azeda inoculadas com *Phytophthora parasitica*, por meio de microscopia de luz em diferentes tempos após a inoculação.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Obter informações microscópicas sobre a interação de micélio de *P. parasitica* em discos de folhas de laranjeira em diferentes tempos após inoculação.
- Otimizar extração de RNA da mistura de folhas de laranjeira e micélio de *P. parasitica* em diferentes tempos após a inoculação, nas condições do Laboratório de Biotecnologia do CES.

2 REVISÃO DE LITERATURA

No cenário mundial, o Brasil destaca-se como o maior produtor e exportador de suco de laranja, produzindo 80% de todo o suco que é comercializado mundialmente (NEVES et al., 2011; VIANA et al., 2004). O patógeno *Phytophthora parasitica* é um oomiceto, causador da gomose em citros e prevalece na maioria dos viveiros e em todos os pomares comerciais do Brasil, devido atacar severamente o plantio de citrus, e assim trazer diversos prejuízos na economia brasileira se tornando um dos problemas fitossanitários mais sérios da citricultura (FEICHTENBERGER, 2001).

2.1 Interação Planta – Patógeno

As doenças de plantas podem ser caracterizadas como um mal funcionamento das células do hospedeiro e seus tecidos que resulta de uma irritação contínua gerada por um agente patogênico ou pelo ambiente (AGRIOS, 2004). Este desequilíbrio nas funções da planta é prejudicial e leva ao desenvolvimento de sintomas, provocando dano ao hospedeiro com este tipo de interação. As doenças em plantas foram notadas desde a antiguidade, quando o homem passou a se alimentar à base de produtos agrícolas cultivados próximos à sua moradia. Porém, a incidência de doenças em plantas pode ser reduzida por práticas apropriadas de cultivo e pelo uso de pesticidas (QUIRINO; BENT, 2003).

A interação planta-patógeno pode ser entendida como uma luta pela sobrevivência entre dois organismos. Para que haja interação direta entre planta-patógeno, se dá a partir do reconhecimento do hospedeiro, onde compreende-se na detecção do patógeno no tecido vegetal, que se dá por meio de propriedades químicas, elétricas e físicas (TYLER, 2002). De um lado, o patógeno desenvolve armas químicas para atacar o hospedeiro em potencial, enquanto este, através de mecanismos estruturais e/ou bioquímicos, procura se defender do patógeno. A interação hospedeiro-patógeno deve ser visualizada como um sistema único e totalmente novo, o qual depende da planta e do patógeno em íntima relação com o meio ambiente (TEXEIRA, 2011).

De acordo com Flor (1956), o reconhecimento planta-patógeno pode ocorrer por diversos fatores de ambos, ou seja quando a planta possui um gene dominante

de resistência que corresponde a um gene de avirulência em um determinado patógeno. Assim como uma única planta pode conter vários genes de resistência, patógenos também pode ter vários genes de avirulência. As plantas possuem vários mecanismos de defesa, fazendo com que as mesmas sejam capazes de desencadear inúmeras respostas frente ao ataque do patógeno, a fim de evitar a infecção do patógeno em seus tecidos (SCHORNACK et al., 2009).

2.2 Interação Citros-*Phytophthora*

Phytophthora parasitica é um oomiceto, causador da gomose em citrus e prevalece na maioria dos viveiros e em todos os pomares comerciais do Brasil por atacar severamente o plantio de citrus, trazendo diversos prejuízos na agricultura e economia brasileira tornando assim um dos problemas fitossanitários mais sérios da citricultura (KAMOUN, 2006). As espécies mais comuns e importantes encontradas no Brasil são *Phytophthora citrophthora* e *Phytophthora parasitica*, sendo a última mais preocupante, devido atacar severamente os plantios (SIVIERO, 2001). Os principais sintomas de gomose em plantas de citros são: escorrimento de goma do tronco, rachadura na casca e podridão do tronco, podendo afetar e expandir para as raízes. Por ser um patógeno habitante de solo, pode sobreviver por alguns anos na forma de micélio, esporângio, cisto, clamidósporos e oósporos (FEICHTENBERGER, 2001).

Os danos causados por esse patógeno podem chegar a causar diversos prejuízos na citricultura brasileira, pois suas perdas podem ocorrer desde os sistemas de produção de mudas, quanto na quantidade e qualidade das frutas cítricas produzidas, causando grandes perdas na sua economia devido as perdas que ocorrem em todas as fases da cultura de citros, tanto em viveiros como em pomares comerciais do Brasil e do mundo (LARANJEIRA et al., 2005).

A comunicação molecular entre *Phytophthora* e plantas envolve uma magnitude de trocas de sinais. Este gênero de patógeno possui 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 os sintomas da doença (KAMOUN, 2004). Entretanto, ao longo do processo coevolutivo, as plantas desenvolveram um complexo sistema de defesa denominado de proteínas de resistência de plantas

(proteínas R) que podem detectar um efector e/ou um complexo de “efector-proteína alvo” e induzir mecanismos de resistência, ou pela ligação de um eliciador não-específico ou geral denominado Padrão Molecular Associado à Patógeno (PAMP) que estão localizados na membrana plasmática do hospedeiro que podem resultar em uma resposta rápida estimulando numa morte celular localizada chamada de resposta de hipersensibilidade (HR). (TYLER, 2008). Dessa forma, efetores são moléculas que manipulam a estrutura celular do hospedeiro e funcionam facilitando e desempenhando a infecção (fatores de virulência) ou disparando respostas de defesa (fatores de avirulência) (KAMOON, 2006; TYLER, 2008).

De modo geral, efetores de oomicetos podem ser classificados em duas classes baseadas nos seus sítios alvos na planta hospedeira. Efetores apoplásticos são secretados no espaço extracelular, onde eles interagem com alvos extracelulares e receptores de superfície. Efetores citoplasmáticos são translocados para dentro da célula vegetal presumivelmente através de estruturas especializadas como vesículas de infecção e haustórios, que invaginam para dentro das células hospedeiras vivas (KAMOON, 2006) Efetores de patógenos também são potencialmente capazes de reprogramar a célula hospedeira para promover a nutrição do patógeno, através da produção e liberação de nutrientes ou através da formação de estruturas de alimentação especializadas, tais como haustórios nos casos de fungos e oomicetos.

2.3 Estudos histológicos de interação planta-patógeno

Estudos de interação planta-patógeno ao nível histológico têm sido realizados através de bioensaios, colocando o patógeno em contato com tecidos de plantas e observando estes através de microscopia. Estas observações microscópicas da infecção ou penetração podem ser estudadas através de acompanhamentos em diversos tempos após inoculação ou também podem ser acompanhados ao decorrer da infecção. Estudos desse nível têm sido realizados utilizando microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia confocal, ou seja, desde as mais simples até as mais sofisticadas.

Por exemplo, estudos histológicos da interação planta-patógeno foram realizados por Vaz et al. (2011), através de microscopia eletrônica de varredura para entendimento de infecção e penetração de *Phytophthora palmivora* com pupunheira

realizado em diferentes tempos. Estes autores observaram que a partir de 6 horas após inoculação o processo de colonização do hospedeiro já encontrava-se em andamento e que tanto em 6 quanto 12 horas após inoculação foi observado zoósporos encistados e esporângios aderidos à epiderme das plantas.

Graça (2007), em estudos de penetração e condições favoráveis a infecção, demonstrou que a penetração de *Cylindrocladium pteridis* em folhas de eucalipto ocorre tipicamente por estômatos e que não houve diferença na penetração do patógeno entre folhas jovens e velhas, embora a severidade da doença aconteça de forma mais elevada em folhas mais velhas.

Estudos histológicos também têm sido realizados visando analisar a penetração de patógeno em plantas susceptíveis e resistentes. Neste sentido, Escanferla (2011) analisou o ataque de *Phytophthora nicotianae* em citros e acompanhou a penetração e formação da doença. Assim, aspectos relacionados a histologia e bioquímica de plantas susceptíveis e resistentes foram descritos através de visualizações em diversos tipos de microscopia. Este pesquisador relata que, após a inoculação em citros, *Phytophthora nicotianae* apresentou pouca quantidade de hifas no tecido do hospedeiro citrumeleiro Swinge (resistente), indicaram que a diferença na interação entre *Phytophthora nicotianae* com planta citrumeleiro Swinge (resistente) e tangerina Sunk (susceptível). Já em estudos realizados com tomateiro, Araújo e Matsuoka (2004) avaliaram, por meio de microscopia eletrônica de varredura, eventos de pré-penetração, penetração e colonização do fungo *Alternaria solani* nos tecidos, visando compreender o processo de infecção em planta resistente e susceptível e observou que o trabalho não mostrou diferenças morfológicas entre a superfície foliar dos dois genótipos de tomateiro, devido ambos terem se mostrado semelhantes tanto em microscopia de luz quanto em microscopia eletrônica de varredura.

Portanto, a histologia da interação planta-patógeno é um recurso eficiente que tem permitido visualizar, comprovar ou determinar os processos de infecção, esclarecendo os eventos de pré-penetração, penetração e colonização de patógenos nos tecidos do hospedeiro, além de evidenciar possíveis mecanismos estruturais de resistência (ARAÚJO; MATSUOKA 2004).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizadas nos Laboratório de Biotecnologia (LBiotec) do Centro de Educação e Saúde – Universidade Federal de Campina Grande, localizada na cidade de Cuité, estado da Paraíba (FIGURA 1).

Figura 1 – Imagens do Laboratório de Biotecnologia do CES, onde foi realizada a pesquisa



Fonte: Arquivo pessoal

3.1 Descrição e condições de cultivo do isolado de *Phytophthora parasitica*

O isolado utilizado neste trabalho é o IAC095 de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*, proveniente do Centro APTA Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo de Campinas, Cordeirópolis SP. O cultivo do patógeno foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Educação e Saúde – CES, da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Campus Cuité, de acordo com instruções do Laboratório de Fitopatologia do referido Centro. Todo manuseio do patógeno foi realizado sob

condições assépticas, sob capela de fluxo laminar vertical e cultivado em placas de Petri contendo o meio cenoura-ágar (CA) (500 ml de água destilada, 100g de cenoura e 10g de ágar) autoclavado. Para a realização do experimento, a cultura foi crescida sob luz constante à 25 °C, durante 8 dias (FIGURA 2).

Figura 2 – Cultivo de *Phytophthora parasitica* para realização do experimento

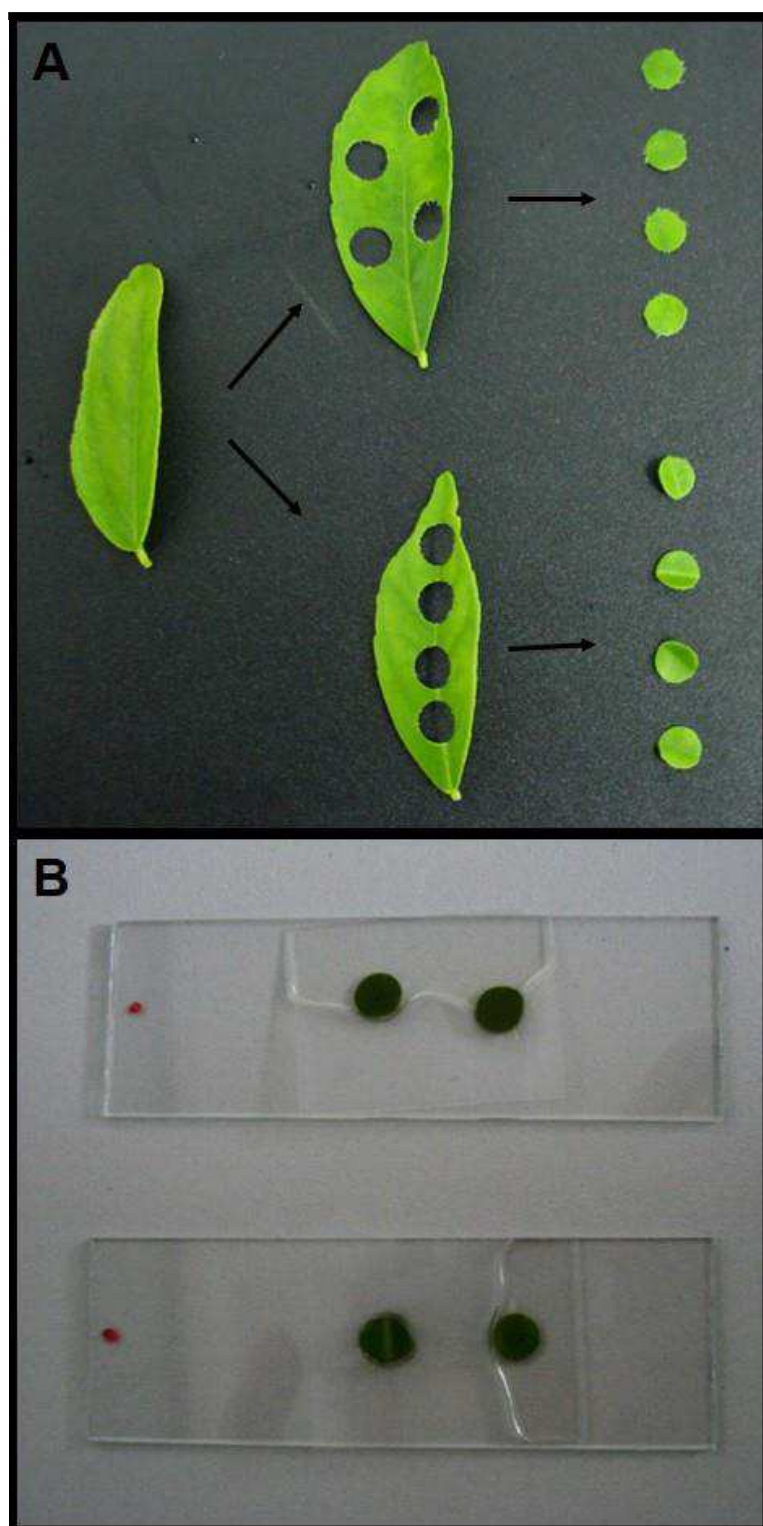


Fonte: Arquivo pessoal

3.2 Determinação da região do tecido vegetal que *P. parasitica* possui maior atração de contato

Para verificar se o patógeno era atraído por determinadas regiões dos discos de folhas de laranjeira azeda, foi realizado um novo bioensaio, utilizando o mesmo método descrito no item 3.2, diferenciando apenas nas identificações das regiões de perfuração no tecido foliar. As perfurações foram feitas na nervura central (vaso condutor primário) e nas nervuras laterais (vasos condutores secundários), como demonstrado na Figura 5. As coletas dos discos foliares para análises microscópicas foram realizadas nos tempos 0 e 12 horas após a inoculação.

Figura 3 – Demonstração de perfurações realizadas na nervura central e nervuras laterais de folhas de laranjeira azeda



Fonte: Arquivo pessoal

3.3 Bioensaios de interação de folhas de laranjeira-*Phytophthora parasitica*

O bioensaio para estudo da interação e penetração temporal de *Phytophthora parasitica* em folhas de laranjeira azeda foi realizado pelo método de isca modificado, conforme adaptado por (SOUSA, 2013). Os tempos estudados foram 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, e 96 horas após inoculação (h.a.i.), com 5 repetições por cada amostra. As folhas jovens foram coletadas de uma planta de laranjeira azeda presente no Horto Florestal Olho d'água da Bica, localizado nas imediações do CES/UFCG (FIGURA 3).

Figura 4 - Laranjeira azeda presente no Horto Florestal estudada neste trabalho



Fonte: Arquivo pessoal

Discos foliares de laranjeira azeda, com 3,0 mm de diâmetro, foram obtidos com o auxílio de um furador de metal. Cada amostra de 1g de discos foliares foi inoculada com micélio raspado a partir de duas placas, cultivadas de acordo com a descrição do item 3.1. O micélio foi raspado com ajuda de pinças e transferido para

um Becker contendo 100 mL de água destilada estéril. A montagem do bioensaio foi totalizada em 40 amostras (FIGURA 4), contendo água estéril, micélio e discos de folhas de laranja/cada. Em seguida, as amostras foram mantidas à temperatura de 28° C, sob luz constante, até o momento da coleta, de acordo com os tempos estudados. Imediatamente após a coleta nos referidos tempos, as amostras foram observadas e fotografadas sob microscópio de luz e o RNA total foi extraído do mix folha-*Phytophthora* de todas as repetições.

Figura 5 - Imagem demonstrativa de amostragem do bioensaio



Fonte: Arquivo pessoal

3.4 Extração de RNA

O RNA total foi extraído do mix folha-*Phytophthora* de todas as repetições, nos tempos de 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 e 96 h.a.i., com cinco repetições/cada, usando o RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) adaptado para as condições do Laboratório de Biotecnologia do CES.

Para obtenção da eliminação das ribonucleases foi feita uma solução de DEPC (dietil pirocarbonato), onde todo material utilizado na extração foi tratado no DEPC por um período de 12 horas e, em seguida, foram autoclavados a 120°C por 30 minutos, para eliminação do mesmo. A mistura de tecido vegetal e micelial e água foi transferida para tubos de polipropileno de 15 mL (Falcon) e centrifugada por 10 minutos à 4.000 r.p.m. para eliminação de água. O tecido vegetal e micelial de cada amostra, recuperados por centrifugação, foram macerados, utilizando cadinho e pistilo, em solução tampão de extração Buffer RLC (QIAGEN) e tampão de maceração (0,5 M de NaCl, 100 mM de Tris-HCL pH 7,5, 10 mM de EDTA, 1 U de

inibidor de proteinase). O macerado foi homogeneizado em agitador vortex, incubado por 2 minutos até obter 56°C em banho maria. Logo após a amostra contendo o lisado foi passada para a coluna QiaShedder e centrifugado por 2 minutos a 12.000 r.p.m em seguida foi adicionado 0,5 volume de etanol absoluto no filtrado. Posteriormente, aplicou-se a amostra em coluna RNeasy e centrifugou durante 15 segundos a 10.000 r.p.m. Em seguida, o RNA preso a coluna foi lavado 1X com 700 µL do tampão RW1 (QIAGEN) e duas vezes com 500 µL de tampão RPE (QIAGEN) por centrifugação durante 15 segundos a 12.000 r.p.m./cada. Após centrifugações, o RNA foi eluído da coluna usando 30 µL de água livre de RNase e centrifugação por 1 minuto a 12.000 r.p.m.

3.5 Estimativa da quantidade e qualidade do RNA extraído

3.5.1. Estimativa por Espectrofotometria

Os RNAs extraídos foram analisados quanto a quantidade e pureza por espectrofotômetro (NanoDrop). Uma alíquota de 1µL de cada amostra foi usada sem diluição para leituras sob absorvâncias de 230 nm, 260 nm e de 280 nm. As proporções A260/280 nm e A260/230 foram utilizadas para avaliar a pureza do RNA.

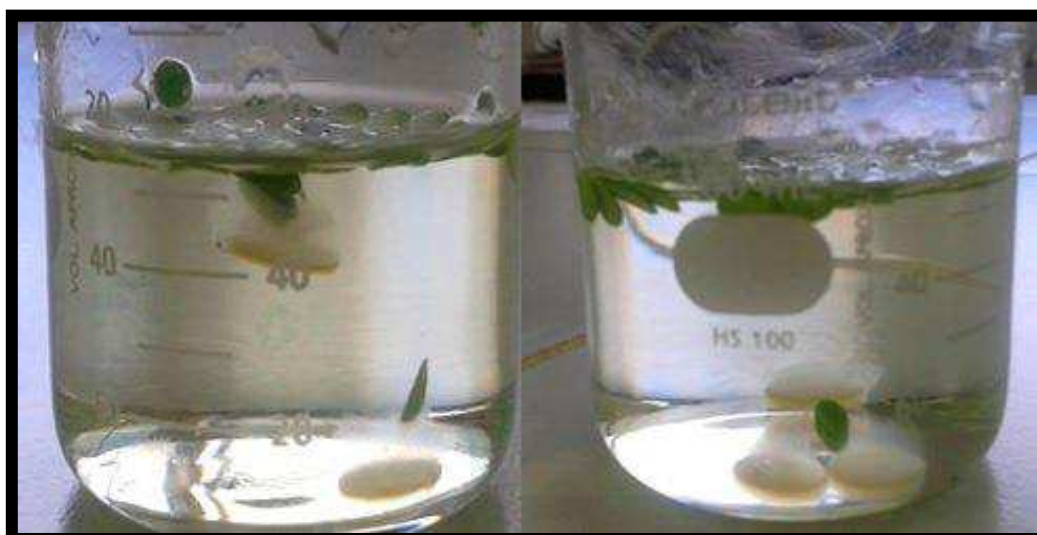
3.5.2 Estimativa por eletroforese em gel de agarose

Eletroforese em gel de agarose foi realizada para visualizar a qualidade do RNA extraído. Na preparação do gel utilizou-se 1% de agarose em tampão de corrida T.A.E 1X (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 no gel contendo 1X de solução tampão de amostra (Ficoll tipo 400 - EDTA 500 mM, pH 8,0 – Azul de Bromofenol – Xileno Cianol FF – H₂O) e 5 µL de RNA isolado. A migração do RNA no gel foi realizada a 150 V por 30 minutos e, em seguida, visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador (AAKER).

4 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Este trabalho descreve as observações microscópicas realizadas após o contato do patógeno de citros, *Phytophthora parasitica*, com discos foliares de laranjeira azeda em água destilada, durante o período de 96 horas, em intervalos de tempo de 12 em 12 horas. A primeira observação do contato de *P. parasitica* com discos foliares de laranjeira azeda na água foi o posicionamento dos discos foliares na superfície da água, enquanto que os discos de micélio-ágar afundaram (FIGURA 6).

Figura 6 - Primeiro contato do patógeno com os discos de folha de laranja azeda



Fonte: Arquivo pessoal

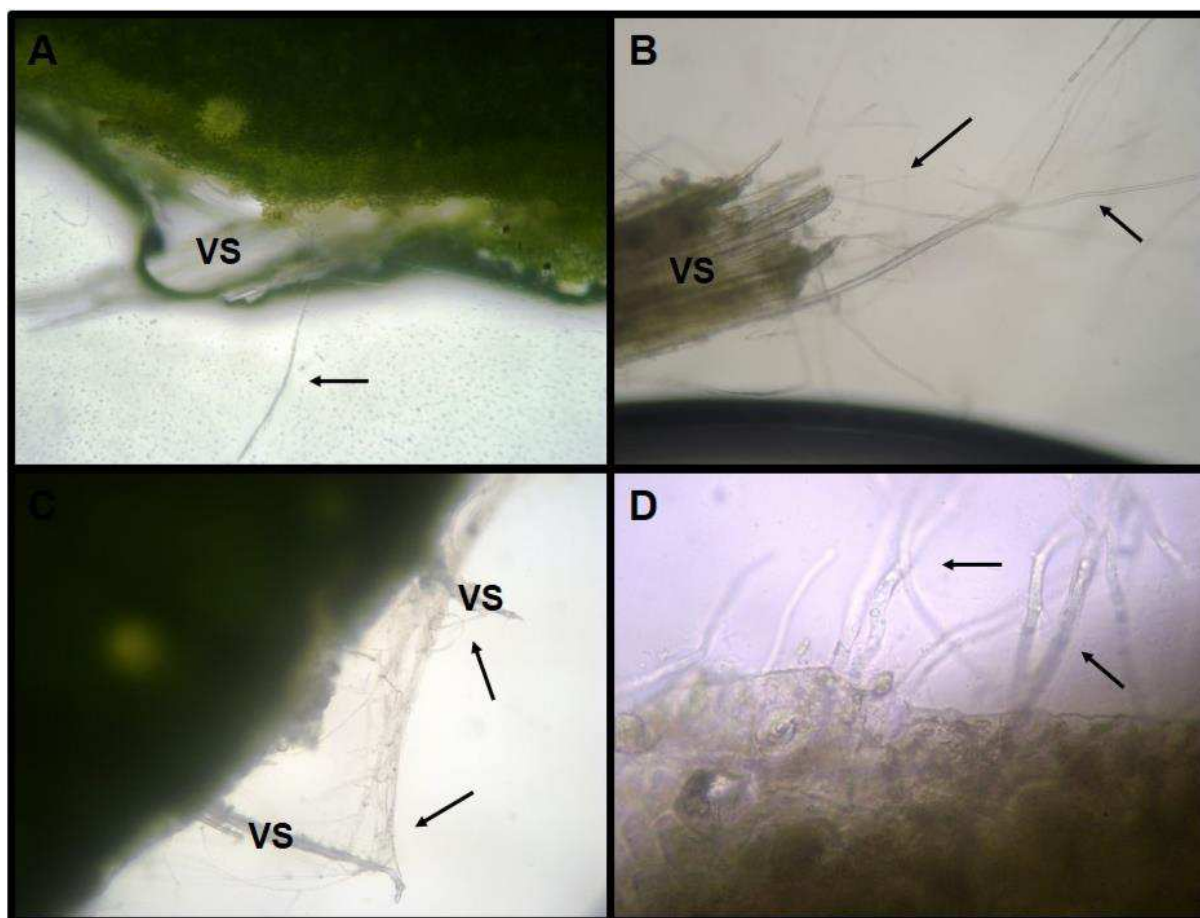
No momento em que o patógeno entrou em contato com os discos de folhas de laranja feridos, a visualização da forte atração do patógeno pelos discos de folha de laranja foi imediata e notável (FIGURA 6). A atração observada foi tão forte que levou discos de micélio-ágar a flutuarem ligados pelos discos foliares, assim como discos foliares afundarem ligados aos discos de micélio-ágar. Em virtude desta descoberta foi realizado um estudo da determinação de qual região do disco foliar era responsável pela maior atração do patógeno.

4.1 Observações microscópicas para o estudo da região de contato de *P. parasitica* com folhas de laranjeira azeda na água

Para a determinação da região de maior atração do patógeno pelos discos foliares, as observações foram conduzidas somente as 0 e 12 horas h.a.i. A atração instantânea do patógeno pelos discos foliares não foi preferencialmente pelos ferimentos provocados nas folhas, mais sim pelos vasos condutores primários e secundários, conforme mostra a Figura 7. Provavelmente, isto se deve aos exsudatos liberados pelas células e vasos condutores feridos. Particularmente, os vasos condutores apresentam maior quantidade de nutrientes (seiva), os quais são necessários para o desenvolvimento e infecção do patógeno nos tecidos da planta.

De acordo com Michereff, Peruch e Andrade (2001), os exsudatos de plantas podem influenciar na germinação de esporos, no crescimento micelial, quimiotaxia de zoósporos e outros processos patogênicos envolvidos no reconhecimento inicial e infecção de tecidos do hospedeiro. Padrões de exsudação são hospedeiro-específico e, algumas vezes, cultivar-específicos.

Figura 7 – Micrografias da atração do patógeno pelos vasos condutores



(A e B) Atração do patógeno pelos vasos condutores obtida a partir do contato imediato (0 hora). Seta indicando a atração da hifa pelo vaso condutor. (C) Fixação do micélio nos vasos condutores em 12 horas após inoculação, indicado pelas setas. (D) Hifas sobre ou sob a borda do disco, indicado pelas setas. VS= Vaso condutor.

Fonte: Arquivo pessoal

A atração do patógeno em 0 hora foi iniciada pelos vasos condutores, conforme mostrado na Figura 7 A e B. Entretanto, no momento em que o disco foliar foi coletado para análise, o micélio se despreendeu do disco fazendo com que o patógeno permanecesse na água. Dessa forma, a partir das imagens pode-se especular que não houve fixação do patógeno nos discos foliares no tempo 0 h.a.i. A comprovação da atração e fixação do micélio aos vasos condutores foi obtida a partir da visualização as 12 h.a.i. (Figura 7 C). Neste mesmo tempo (12 h.a.i.) foi possível observar “poucas” hifas sobre ou sob a borda do disco foliar, como mostra a Figura 7 D, revelando que o micélio do patógeno também foi atraído pelos ferimentos das bordas do disco foliar.

4.2 Interação folha-*Phytophthora* a partir de micrografias

Com base nas observações realizadas sob o microscópio de luz, sobre a atração e fixação de micélio de *P. parasitica* em discos foliares de laranja azeda, a visualização da interação do patógeno com esta variedade de citros foi realizada nos tempos de 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 e 96 h.a.i.

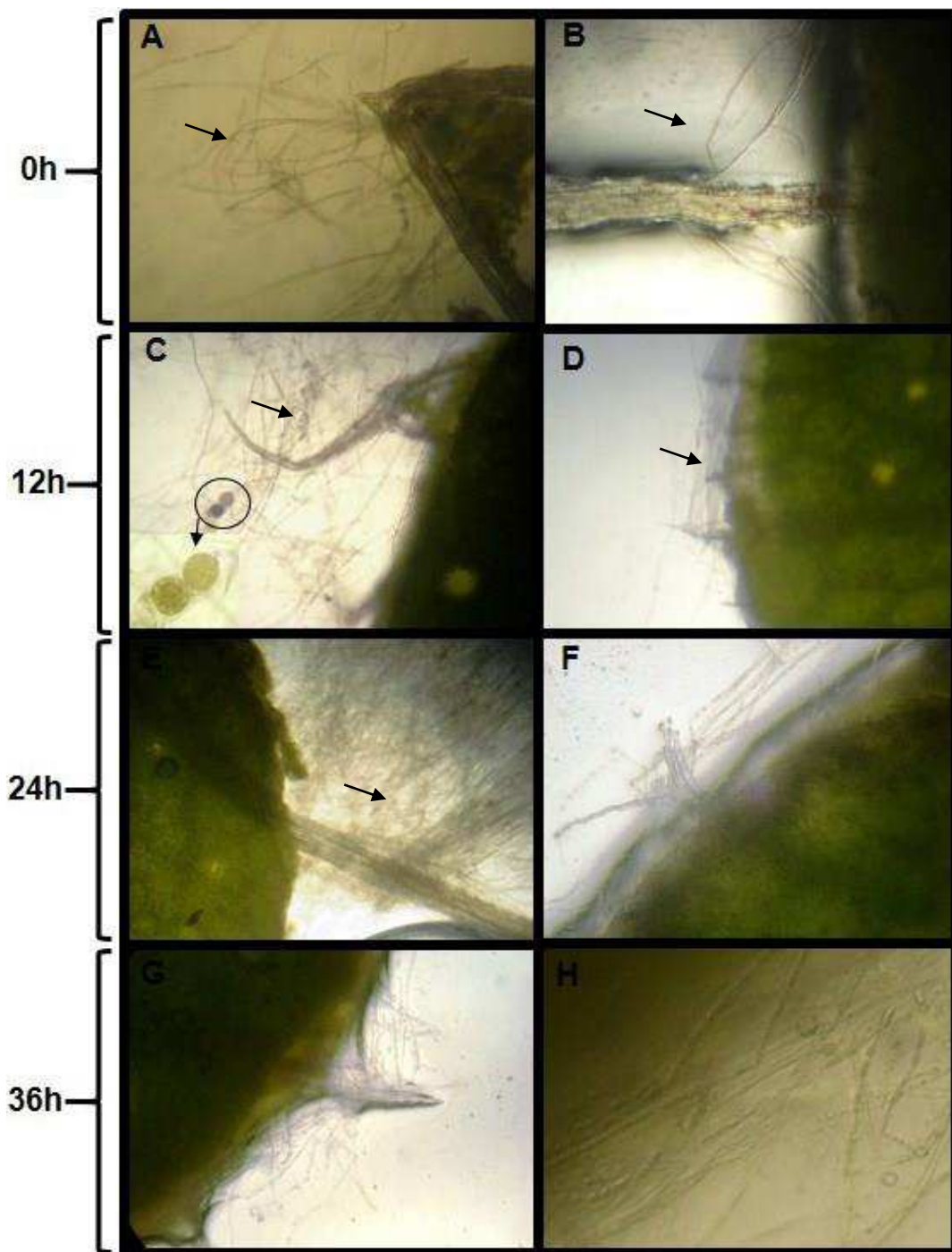
Neste bioensaio, a observação a 0 h.a.i. validou os dados apresentados no item anterior (FIGURA 8A e B). Às 12 h.a.i. foi possível visualizar hifas em pouca quantidade, mas já fixadas nos vasos condutores, começando a se fixar também na borda do disco foliar (FIGURA 8C e D). Notou-se pela microscopia que a partir de 12 h.a.i. foi possível observar o aparecimento e proliferação de esporângios próximos as bordas dos discos foliares (FIGURA 8C), mostrando que o patógeno encontrava-se em condições favoráveis para seu desenvolvimento. De acordo com Mitchell e Kannwischer-Mitchel (1993), a produção de esporângios acontece devido a três estímulos, que são: ambiente favorável, temperatura e nutrição, para que assim o patógeno estimule condições de reprodução para assim desenvolver-se.

Às 24 h.a.i., a presença de micélio foi superior aos tempos anteriores, mostrando a presença de hifas fixadas no vaso condutor, na borda do disco foliar, e próximas a borda (FIGURA 8E e F). Tanto as 36 como 48 h.a.i., o aumento das hifas foi se intensificando tanto na água quanto nas bordas do tecido foliar, indicando a tentativa do patógeno penetrar ou penetrando o tecido ferido dos discos foliares, o que já demonstrava início da perda de sua pigmentação (FIGURA 8I e J).

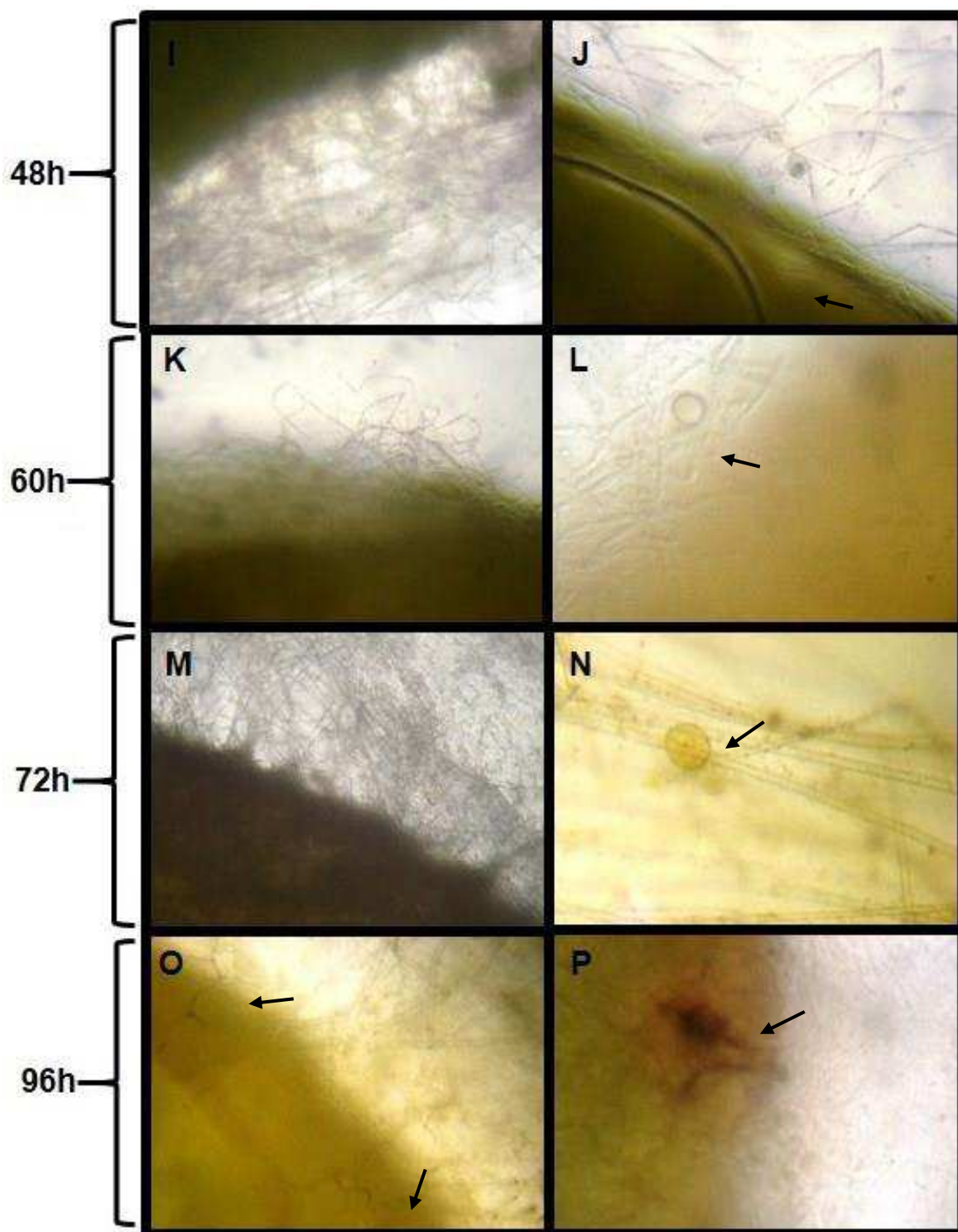
Os sintomas mais fortes de necrose começaram a aparecer as 60 h.a.i., além da perda da coloração esverdeada dos discos de folhas para tonalidade verde lodo (FIGURA 8K). Neste mesmo tempo foi visualizado o aparecimento de clamidósporos, mostrando que o patógeno encontrava-se em condições desfavoráveis como, empobrecimento nutricional, pouca água disponível dentre outros fatores.

O desenvolvimento da necrose foi visualizado as 96 h.a.i. (FIGURA 8P) mostrando sintomas mais graves como morte celular. Em 96 horas foi possível observar pela micrografia o patógeno dentro/penetrado na célula (FIGURA 8O)

Figura 8 - Micrografias da interação citros-*Phytophthora parasitica* nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96 horas após a inoculação



(A e B) Setas indicando a atração do patógeno pelos vasos condutores. (C) Seta indicando o aparecimento de esporângio e atração do patógeno pelos vasos condutores. (D) Seta indicando a fixação do patógeno nos vasos condutores. (E) Seta indicando o aumento de hifas. (G e H) Os discos de folhas de laranjeira começando a perder a sua pigmentação.



(I) Aumento de hifas. (J) Seta indicando a perda da coloração para verde lodo. (L) Seta indicando o aparecimento de clamidósporo. (N) Seta indicando a continuação do aparecimento de clamidósporo. (O) Setas indicando a penetração do patógeno no meio intercelular. (P) Seta indicando uma necrose.

Fonte: Arquivo pessoal

No presente trabalho verificou-se que, com o passar das horas, a produção de hifas foi crescendo e que a cada 12 horas pôde-se observar o aumento de hifas fixadas nos vasos condutores e nas bordas dos discos de folhas, como também o aparecimento de esporângios logo no segundo tempo estudado. Estas são indicações de que o patógeno se encontrava em condições adequadas para o seu desenvolvimento, e já no final dos tempos, a partir de 60 h.a.i., tanto a planta quanto o patógeno começaram a apresentar condições desfavoráveis de viabilidade, como o aparecimento de clamidósporos, mostrando que o patógeno já se apresentava em condições desfavoráveis podendo ser devido a pouco nutriente disponível, dentre outros fatores que impediram seu desenvolvimento vegetativo como micélio. Por outro lado, observou-se a perda da coloração dos discos de folha, além do aparecimento de necroses.

4.3 Análise do RNA extraído a partir do mix folha-micélio

Os RNAs extraídos da mistura de folha-micélio de *P. parasitica* foram analisados quanto à concentração e pureza pela obtenção do espectro de absorbância e taxas de pureza de cada amostra em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific), por meio da densidade ótica (D.O.). Esta análise se baseia no fato de que ácidos nucleicos, DNA e/ou RNA, absorvem luz no comprimento de onda à 260 nm, assim a leitura em absorbância (A) 260 nm na luz UV indica a presença dessas moléculas, enquanto que as proteínas e outros contaminantes absorvem luz à 280 nm. Então, enquanto que para a estimativa da quantidade de RNA fita simples utiliza-se a proporção de que 1 D.O.260 é igual a 40 µg de RNA, a relação das leituras A260/280nm e A260/230nm são utilizadas como parâmetros para avaliar a pureza das preparações de ácidos nucleicos.

Como resultado, a concentração de RNA nas amostras variou de 28,4 a 1455,1 ng/µL com base nas leituras a D.O.260nm. Por outro lado, a proporção de A260/280nm variou de 1,32 a 2,08 entre as amostras, enquanto que a proporção A260/230nm variou de 0,09 a 0,81 (TABELA 1). De acordo com instruções da Thermo Scientific, o resultado da proporção A260/280nm é estimado entre 1,8 para DNA e 2,0 para RNA indica a pureza dos ácidos nucleicos. Já se a proporção for significativamente mais baixa do que estes valores, isso pode indicar contaminação

por proteínas. De acordo com essa afirmação, somente as amostras 36 e 38 (96 h.a.i.) podem ser estimadas como livres de proteínas.

TABELA 1 – Valores obtidos em leituras de absorvância em luz ultravioleta para RNA isolado de folha de laranjeira-*Phytophthora parasitica*, usando espectrofotômetro Nanodrop. CUITÉ, 2014

TEMPO COLETADO	AMOSTRA	ng/ μ L	A260/280	A260/230
0 hora	1	175,7	1,73	0,36
0 hora	2	49,2	1,47	0,29
0 hora	3	778,9	1,73	0,58
0 hora	4	933,5	1,67	0,33
0 hora	5	1455,1	1,54	0,60
12 horas	6	319,9	1,32	0,19
12 horas	7	764,7	1,46	0,34
12 horas	8	-14,2	1,85	0,27
12 horas	9	174,9	1,76	0,31
12 horas	10	263,1	3,59	0,13
24 horas	11	96,4	1,71	0,38
24 horas	12	528,3	1,93	0,72
24 horas	13	614,5	1,75	0,42
24 horas	14	194,1	1,63	0,27
24 horas	15	199,5	1,50	0,40
36 horas	16	591,5	1,86	0,73
36 horas	17	157,9	1,70	0,39
36 horas	18	253,6	1,41	0,19
36 horas	19	211,5	1,43	0,33
36 horas	20	311,5	1,62	0,45
48 horas	21	492,2	1,83	0,81
48 horas	22	125,4	1,94	0,55
48 horas	23	516,7	1,67	0,52
48 horas	24	246,3	1,68	0,48
48 horas	25	244,6	1,38	0,53
60 horas	26	99,1	1,59	0,26

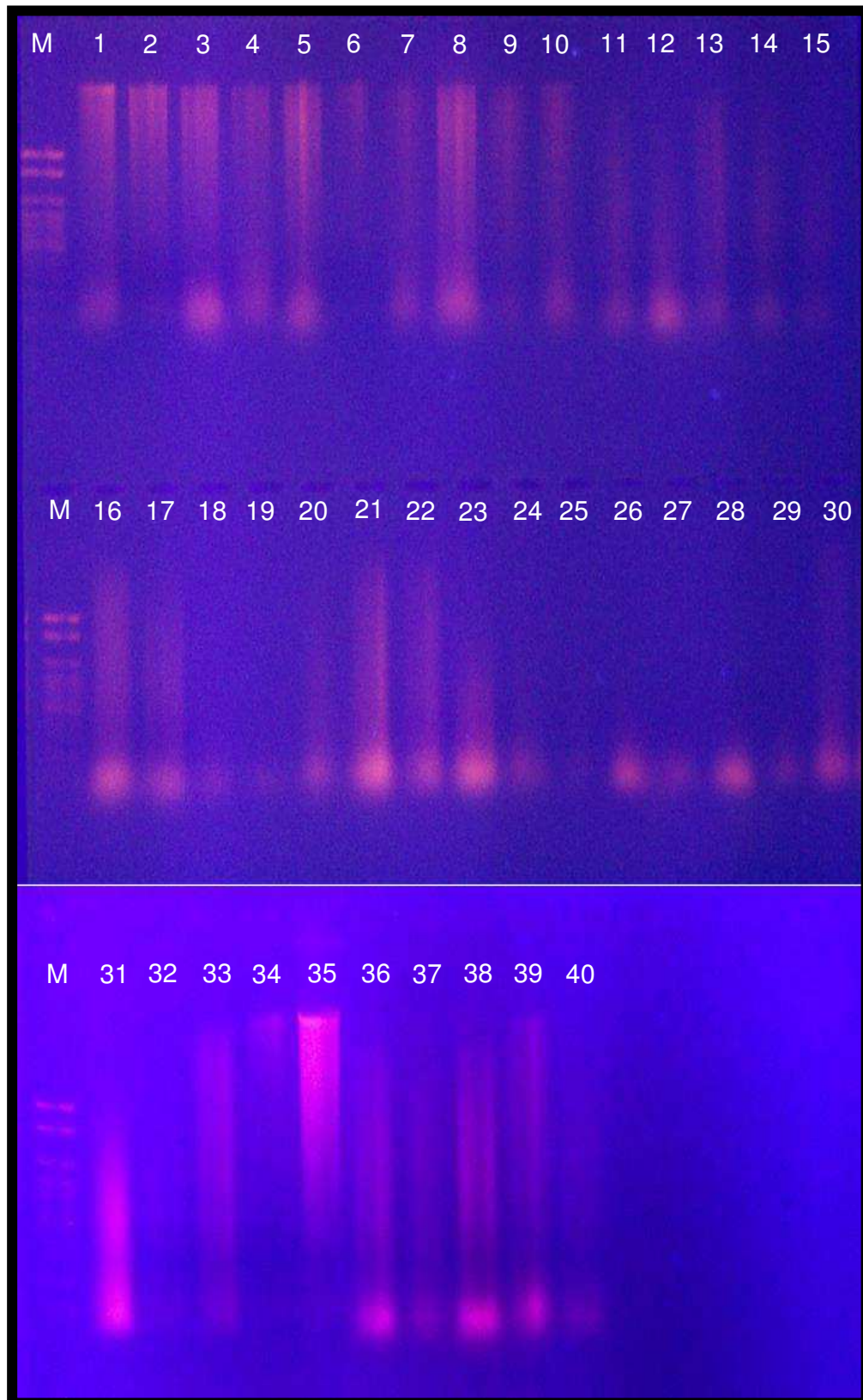
60 horas	27	163,1	1,40	0,34
60 horas	28	349,0	1,52	0,23
60 horas	29	192,8	1,46	0,29
60 horas	30	141,0	1,42	0,47
72 horas	31	172,8	1,64	1,05
72 horas	32	28,4	1,57	0,42
72 horas	33	125,6	1,72	0,61
72 horas	34	34,6	1,69	0,09
72 horas	35	235,8	1,74	0,33
96 horas	36	567,9	2,04	0,75
96 horas	37	158,2	1,76	0,21
96 horas	38	554,6	2,08	0,31
96 horas	39	257,7	1,65	0,48
96 horas	40	174,3	1,55	0,24

Fonte: Dados da pesquisa

As especificações do fabricante do Nanodrop indicam ainda que alguns contaminantes são detectados à A280 nm, tais como carboidratos e fenol, por exemplo. Assim, a relação A260/230 também indica a pureza dos ácidos nucleicos com valores aceitos para 2.0 - 2,2, enquanto que valores menores que estes são considerados contaminantes que absorvem à A230 nm. Com base nesta informação, todas as amostras de RNA deste trabalho podem conter contaminações com estes tipos de compostos.

Para verificar a integridade do RNA isolado utilizou-se eletroforese em gel de agarose 1%. Neste caso, a intensidade luminosa a partir da coloração de brometo de etídeo, sob luz ultravioleta, tem sido frequentemente utilizada para estimar a qualidade e quantidade do RNA extraído. Neste trabalho, de modo geral, foi possível visualizar uma arraste de RNA e nenhuma banda de RNA ribossomal esperada foi observada (FIGURA 9). Estes são indicativos de que os RNAs purificados devem estar degradados.

FIGURA 9 - Eletroforese em gel de agarose 1% de RNA total isolado em tempos de 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 e 96 horas



Fonte: Dados da pesquisa

Alguns fatores podem ter contribuído para a pouca quantidade e degradação do RNA observadas neste trabalho, tais como a ausência de nitrogênio líquido durante o processo de maceração do tecido foliar e micelial, levando a uma lise celular ineficiente, elevada temperatura do Laboratório pela ausência de ar condicionado funcional, entre outros.

A importância de estudos para a obtenção de RNA purificado está na necessidade de obtenção e disponibilização de 1 µg RNA total para ser utilizado em metodologias de síntese cDNA, as quais são fundamentais na construção de bibliotecas de genoma funcional e na análise de PCR em tempo real de RNAs transcritos tanto em disco foliar de laranjeira azeda quanto em *Phytophthora parasitica* durante a interação na água. A realização destas análises futuras trarão informações, do lado da planta, sobre respostas da planta ao ferimento realizado na folha bem como respostas a presença do patógeno e, do lado de *P. parasitica*, sobre respostas do patógeno durante a infecção da planta. Por esta razão, metodologias para a obtenção de RNA total em quantidade e qualidade precisam ser ajustadas no Laboratório de Biotecnologia do CES, visando estudos da interação citros-*P. parasitica* pelo bioensaio determinado neste trabalho.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados, foi possível concluir que:

- O método de isca modificado é viável para estudos de interação citros-*Phytophthora parasitica* ao nível histológico;
- O patógeno é atraído pelos discos foliares de laranja azeda, imediatamente após o contato entre eles;
- O local de maior atração imediata do patógeno é pelos vasos condutores (primário e secundário) feridos;
- Após a inoculação, às 12 horas as hifas ainda não estão fixadas nos vasos condutores; às 24 horas a presença de fixadas no vaso condutor, entre 36 e 48 horas ocorre o aumento na proliferação de hifas; às 60 horas visualiza-se a perda da coloração esverdeada dos discos de folhas para tonalidade verde lodo; e às 96 horas visualiza-se necrose e presença do patógeno no ambiente intercelular;
- A visualização de estruturas de reprodução do patógeno ocorre às 12 horas para esporângios e às 60 horas para o aparecimento de clamidósporos;
- É necessário otimizar as condições para a extração de RNA em quantidade e qualidade a partir do mix folha-micélio de *Phytophthora parasitica* no Laboratório de Biotecnologia do CES.

5 REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. 5 ed. San Diego: Academic Press, p. 922, 2004.

ARAÚJO, J.C.A.; MATSUOKA, K. Histopatologia da interação *Alternaria solani* e tomateiros resistente e suscetível. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 29, p. 268-275, 2004.

ESCANFERLA, M. E. **Histologia e bioquímica da interação entre porta-enxertos de citros resistente e susceptível a *Phytophthora nicotianae***. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiros, Universidade de São Paulo, p. 101, 2011.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In.:LUZ, E.D.M.N.; MATSUOKA, K. & SANTOS, A.F. (Eds.) **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria Rural, p. 283-342, 2001.

FLOR, H.H. The complementary genic systems in flax and flax rusts. **Advance Genetic**, New York, v. 8, p. 29-54, 1956.

GRAÇA, R. N. **Penetração e condições favoráveis à infecção de *Cylindrocladium pteridis* em eucalipto**. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, p. 38, 2007.

GRIMM, 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.

KAMOUN, S. Molecular genetics of pathogenic oomycetes. **Eukaryotic Cell**, v. 2, p. 191-199, 2004.

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

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, 2005.

MICHEREFF, S. J.; PERUCH, L. A. M.; ANDRADE, D. E. G. T. Sustentável de Doenças Radiculares em Solos Tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. **Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável**, Recife-PE, 2001, c. 2, p.15-69.

MITCHELL, D. J; KANNWISCHER-MITCHELL, M. E. *Phytophthora*. In: SINGLETON, L. L. MIHAIL, J. D. & RUSH, C. M. (Eds.) **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. S t. Paul: Amer icam Phytopathological Society, p. 31-38, 1993.

NEVES, M. F. *et al.* **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: Centro de Pesquisas e Projetos em Marketing e Estratégia (Markestrat), p. 137, 2011.

TEXEIRA, R. A. **Mecanismos de resistência a fitodoenças**. Tese (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento De Plantas, Universidade Federal de Goiás, 2011.

TYLER, B. M. Molecular basic of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. **Anual Review of Phytopathology**, Palo Alvo, v. 40, p. 137-167, 2002.

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

SCHORNACK, S. *et al.* Ten things to know about oomycete effectors. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 10, n. 6, p. 795-803, 2009.

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

SOUSA, 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.

VAZ, A. B. *et al.* Aspectos histopatológicos da interação *Phytophthora palmivora* com a pupunheira. **Tropical Plant Pathology**, vol. 36, 4, 259-263, 2011.

VIANA, F. M. P. *et al.* Influência da Variedade da Copa na Incidência da Gomose – de- *Phytophthora* em Porta-Enxerto de Limoeiro ‘Cravo’ no Estado do Piauí. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 103-103, 2004.

QUIRINO, B. F.; BENT, A. F. Deciphering host resistance and pathogen virulence: the Arabidopsis/ *Pseudomonas* interaction as a model. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 6, p. 517-530, 2003.