

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES  
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS  
ASSOCIADOS AO DECLÍNIO DOS CITROS  
(*CITRUS* SPP.)**

**JOSÉ RENATO DE ABREU**

**2007**

**JOSÉ RENATO DE ABREU**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS  
ASSOCIADOS AO DECLÍNIO DOS CITROS (*CITRUS* SPP.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica/Agrobioquímica, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador  
Prof. Luciano Vilela Paiva

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Abreu, José Renato

Identificação de Genes diferencialmente expressos associados ao declínio dos  
citros (*Citrus Spp.*) / Jose Renato Abreu. -- Lavras : UFLA, 2007.

71 p. : il.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. citros, 2. expressão gênica, 3. hibridação subtrativa. I. Universidade Federal  
de Lavras. II. Título.

CDD-634.30493

**JOSÉ RENATO DE ABREU**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS  
ASSOCIADOS AO DECLÍNIO DOS CITROS (*CITRUS SPP.*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica/Agrobioquímica, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2007

Prof. Antonio Chalfun Junior .....UFLA

Dr. Miguel Angel Dita Rodriguez.....CNPMF - EMBRAPA

Prof. Custódio Donizete dos Santos.....UFLA

Prof. Luciano Vilela Paiva  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

## AGRADECIMENTOS

À Universidade federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudos.

À minha mãe Celeste Maria Patto de Abreu e ao meu pai Ademar Custódio de Abreu, pelo amor, carinho, paciência e incentivo, pois sem eles nada disso teria acontecido.

Ao Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva, pela oportunidade e orientação.

Ao Prof. Dr. Antonio Chalfun Junior, pela orientação, sugestões, auxílio e amizade.

Ao Dr. Miguel Angel Dita Rodriguez, pelas sugestões e auxílio.

Aos meus irmãos, Ademar Júnior e Henrique Patto, pelo apoio constante e amizade.

Ao Guilherme Duarte Rossi, pelo auxílio, amizade, incentivo e companheirismo.

Aos laboratoristas, Anderson Ramos e Xulita, pelo auxílio constante e amizade.

Aos funcionários Michele e Andersom Tadeu, pelo auxílio no Sequenciamento e amizade.

Aos professores, funcionários e todos os amigos do departamento de Química (DQI), pela formação e auxílio.

A todos do Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), por tornarem este um ótimo e agradável local de trabalho.

À minha namorada Ana Luisa, pela paciência e carinho.

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram com esta dissertação e não tiveram o nome mencionados.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE SIGLAS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT .....	viii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Declínio dos Citros .....	5
2.2 Testes Diagnósticos .....	6
2.3 Argumentos contra fatores bióticos como possíveis agentes causais do Declínio dos Citros .....	7
2.4 Argumentos contra fatores abióticos como possíveis agentes causais.....	10
2.5 Bibliotecas subtrativas supressivas (SSH- Suppression Subtractive Hybridization).....	11
2.6 Bibliotecas subtrativas supressivas: Aplicações na interação Planta- Extresse .....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1 Coleta do Material e Plantas Doadoras.....	17
3.2 Extração e Quantificação Protéica .....	19
3.3 Análise Protéica .....	19
3.4 Extração de RNA total .....	20
3.5 Tratamento do RNA total com DNase.....	21
3.6 Purificação do mRNA.....	22
3.7 Construção da Biblioteca Subtrativa Supressiva (SSH) .....	23
3.7.1 Síntese da primeira fita de cDNA .....	24

3.7.2 Síntese da segunda fita de cDNA.....	24
3.7.3 Digestão dos cDNAs com a enzima de restrição Rsa I.....	25
3.7.4 Ligação dos Adaptadores ao cDNA.....	26
3.7.5 Primeira Reação de Hibridação .....	27
3.7.6 Segunda Reação de Hibridação .....	28
3.7.7 Primeira Amplificação do Produto da Hibridação pela Reação em Cadeia da Polymerase.....	29
3.7.8 Segunda Amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase .....	29
3.7.9 Clonagem do produto final da hibridação subtrativa por supressão no vetor .....	31
3.7.10 Transformação Bacteriana .....	31
3.7.11 PCR de Colônia para confirmação da ligação e transformação.....	32
3.7.12 Extração dos plasmídeos contendo insertos dos cDNA obtidos .....	32
3.7.13 Sequenciamento dos plasmídeos.....	34
3.7.14 Análises das Sequências de cDNA em Bancos de Dados.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
4.1 Extração de RNA total de raízes limoeiro “Cravo” ( <i>Citrus limonia</i> L. Osbeck) de plantas saudáveis e com Declínio .....	37
4.2 Obtenção das Bibliotecas Subtrativas Supressivas .....	39
4.3 Transformação bacteriana.....	40
4.4 Extração de plasmídeos, sequenciamento e análise de seqüências .....	41
4.4.1 Biblioteca enriquecida com genes diferencialmente expresso em plantas apresentando declínio (SF) .....	42
4.4.1.1 Genes que codificam para proteínas com provável associada à senescência .....	44
4.4.1.2 Genes que codificam para proteínas LEA (Late Embriogenesis Abundant) do tipo desidrinas. ....	46
4.4.1.3 Genes que codificam para proteínas Citocromo P450 tipo TBP .....	48

4.4.2 Biblioteca enriquecida com genes diferencialmente expresso em plantas sadias (SF) .....	50
4.4.2.1. Genes que codificam para proteínas com provável associação com a germinação “putative germin” .....	52
4.4.2.2 Genes que codificam para hidrolases.....	53
4.4.2.3 Genes que codificam para ubiquitinas .....	54
4.4.2.4 Genes que codificam para proteínas do tipo metalotioneína .....	56
4.4.2.5 Genes que codificam para proteínas 14-3-3.....	57
4.5 Diferenciação dos Perfis Protéicos de Plantas Sadias e Doentes.....	59
5 CONCLUSÕES .....	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
TABELA 1 Identificação e classificação das plantas de laranja “Pera” sob limão “Cravo” amostradas.....	18
TABELA 2 Genes expressos em raízes de plantas doentes e ausentes em plantas saudas, gi: gene index indicando nome da EST, a homologia dessa seqüência com o banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information - <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a> ), Tamanho: tamanho do clone com maior número de nucleotídeos sequenciados, E-value: identidade com seqüências do banco de dados e número de clones. Número de clones identificados com a mesma anotação.....	43
TABELA 3 Genes expressos em raízes de plantas visivelmente saudas e ausentes em plantas doentes. gi: gene index indicando nome da EST, a homologia dessa seqüência com o banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information - <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a> ), Tamanho: tamanho do clone com maior número de nucleotídeos sequenciados, E-value: identidade com seqüências do banco de dados e número de clones. Número de clones identificados com a mesma anotação.....	51

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>	
FIGURA 1	Representação diagramática da hibridação subtrativa por supressão. As linhas sólidas representam os cDNAs <i>tester</i> ou <i>driver</i> ; as caixas sólidas representam a região externa dos adaptadores 1 e 2R que correspondem à seqüência do <i>primer</i> utilizado no PCR (PCR <i>primer</i> 1); as caixas claras representam a região interna do adaptador 1 e da seqüência do <i>Nested</i> PCR <i>primer</i> 1 correspondente; as caixas sombreadas representam a região interna do adaptador 2R e da seqüência do <i>Nested</i> PCR <i>primer</i> 2R correspondente.....	13
FIGURA 2	Representação diagramática visando a identificar genes expressos nos diferentes estágios do Declínio amostrados. As amostras de RNAtotal obtidas foram misturadas proporcionalmente para a construção das bibliotecas SF e SR.....	23
FIGURA 3	. Eletroferograma em gel de agarose (1,2 %) de RNA total na concentração média de 1 µg/µl extraído de raízes de plantas saudas e em diferentes estágios da doença. 1: Padrão peso molecular de DNA de 1kb; 2 e 3: doente inicial; 4 e 5: doente final; 6 e 7: sadia.....	37
FIGURA 4	Eletroferograma em gel de agarose (1,2 %) de RNA total extraído de raízes de plantas saudas e em diferentes estágios da doença, tratados com Deoxyribonuclease I (DNase I) 1: Padrão peso molecular de DNA de 1kb; 2 e 3: doente inicial; 4 e 5: doente final; 6 e 7: sadia.....	38
FIGURA 5	Eletroferograma em gel de agarose (2,0 %) de cDNAs obtidos após hibridação subtrativa por supressão (HSS) e segunda amplificação por PCR, provenientes de plantas de limoeiro “Cravo” sob laranja “Pera” com Declínio e saudas, respectivamente. 1: Padrão peso molecular de DNA de 1kb; SF: biblioteca 1 (cDNAs obtidos após subtração doente menos sadia); SR: biblioteca 2 (cDNAs	

	obtidos após subtração sadia menos doente). Foram aplicados no gel 8 µL do produto da segunda PCR. .....	40
FIGURA 6	Eletoferograma em gel de agarose (1,2 %) da extração de DNA plasmidial para seqüenciamento.1: Padrão peso molecular de DNA de 1kb; canaletas 2 a 20: mini preparação plasmidial para seqüenciamento amostrados aleatoriamente das duas bibliotecas subtrativas supressivas (SR e SF).....	42
FIGURA 7	Genes isolados por hibridação subtrativa por supressão (SSH), a partir de mRNAs de raíz de limoeiro cravo sob laranja-pêra, teoricamente com o Declínio .....	44
FIGURA 8	Genes isolados por hibridação subtrativa por supressão (SSH), a partir de mRNAs de raíz de limoeiro cravo sob laranja-pêra, visualmente sem o Declínio.....	52

## LISTA DE SIGLAS

SSH	Hibridação Subtrativa Supressiva “Supression Subtractive Hybridization”
CTV	Vírus da tristeza dos citros
ABA	Ácido abcísico
RS	Proteína relacionada ao estresse
PR	Proteína relacionada com a patogênese
PCR	Reação em cadeia da polimerase
DNA	Ácido Desoxibonucleico
RNA	Ácido Ribonucléico
mRNA	RNA mensageiro
cDNA	Cópia de DNA a partir do mRNA
RH	Hipersensibilidade
NCBI	Banco de dados genômicos “National Center for Biotechnology Information”
SAR	Resistência Sistêmica Adquirida
UFLA	Universidade Federal de Lavras
LCBM	Laboratório Central de Biologia Molecular
SDS- PAGE	Sodyum dodecyl sulfate-polyacrilamide gel
DEPC	Dietil Pirocarbonato
EtBr	Brometo de etídeo
RsaI	Enzima de restrição
SF	Hibridação Subtrativa Supressiva utilizando-se como amostra <i>tester</i> os cDNAs obtidos de plantas doentes, os quais foram subtraídos com os cDNAs de plantas sadias (cDNAs <i>driver</i> ). (Biblioteca 1)

SR	Hibridação Subtrativa Supressiva inversa utilizando-se como amostra <i>tester</i> os cDNAs obtidos de plantas sadias, os quais foram subtraídos com os cDNAs de plantas doentes (cDNAs <i>driver</i> ). (Biblioteca 2)
LB	Meio de cultura (Luria-Bertani)
EST	“Expressed Sequence Tags”
ASM	Indutor de resistência (acibenzolar-S-metil)
qRT-PCR	técnica de PCR quantitativa em tempo real

## RESUMO

ABREU, José Renato. **Identificação de Genes Diferencialmente Expressos Associados ao Declínio dos Citros (*Citrus Spp.*)**. 2007. 71 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

O Brasil é o maior produtor de citros do mundo, sendo responsável por mais de 20% da produção mundial. No entanto, a produção ainda é baixa devido a muitos problemas fitossanitários, a exemplo do Declínio dos Citros. O Declínio dos Citros é uma anomalia cuja causa ainda não foi determinada. As árvores que começam a declinar não se recuperam, chegam a um estágio de declínio crônico, mas raramente morrem. Embora o Declínio dos Citros tenha sido descrito há mais de 100 anos, sua etiologia ainda é desconhecida. Conseqüentemente, não existem medidas de controle para minimizar as perdas na produção, fato esse que piora, considerando que os sintomas só são detectados após 3 anos, quando as plantas entram em produção. O uso de variedades resistentes é considerada a medida de controle mais adequada. Contudo, pouco se conhece sobre os genes envolvidos na resposta de defesa das plantas a essa anomalia. Considerando que muitas alterações fisiológicas associadas com respostas a estresses em plantas são controladas ao nível transcricional, neste estudo objetivou-se a identificação e caracterização de produtos de expressão gênica expressos diferencialmente na resposta ao Declínio dos Citros. Para isso, foi utilizada a técnica de biblioteca subtrativa supressiva (Suppression Subtractive Hybridization) utilizando de mRNAs isolados de raízes de limoeiro “Cravo” (*Citrus limonia* L. Osbeck) sob laranja “Pera” (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com e sem o Declínio. A identificação da possível função dos genes/ESTs isolados foi realizada por comparação de seqüência com outros genes descritos em bancos de dados de genes. Adicionalmente, a presença da anomalia Declínio foi confirmada mediante análise eletroforética do perfil protéico em gel “SDS-PAGE” (Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide Gel Electrophoresis) das proteínas de raiz de limão “Cravo” (*Citrus limonia* Osbeck). Foram construídas duas bibliotecas subtrativas de cDNAs, uma enriquecida com cDNA diferencialmente de árvores com alto grau do Declínio (forward) e outra enriquecida com genes expressos em plantas amostradas como sadias (reverse). Foram obtidos 129 clones de genes diferencialmente expressos, dos quais 38 representam a biblioteca forward e 91, a biblioteca reverse. Após análise, constatou-se que 45% dos clones da biblioteca subtrativa supressiva vindas de

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Orientador), Antônio Chalfun Junior - UFLA

mRNA isolados de árvores com alto grau do Declínio estavam associados a proteínas de senescência, enquanto somente 20% desses clones foram identificados na biblioteca subtrativa supressiva vindas de mRNA isolados de plantas saudáveis. Outros genes foram isolados, apresentando funções similares relacionadas a proteínas, como: LEA do tipo desidratina, citocromo P450 tipo TBP, provável germina, proteína do tipo metalotioneína, hidrolase, ubiquitina, proteína 14-3-3, que têm a função de responder a uma gama de estímulos e/ou fatores ambientais bióticos ou abióticos e principalmente o de estresse hídrico, também aquelas com funções hipotéticas e as que não tiveram nenhuma similaridade com proteínas depositadas em banco de dados. Pelos resultados obtidos, infere-se que todas as plantas coletadas em Bebedouro, SP, inclusive aquelas coletadas como saudáveis, estavam com Declínio dos Citros, porém, em estágios diferentes da anomalia.

## ABSTRACT

ABREU, José Renato. **Identification of differently expressed genes associated with Citrus Blight (*Citrus Spp.*)**. 2007. 71 p. Dissertation (Master Program in Agrochemistry/Agrobiochemistry) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.<sup>2</sup>

Brazil is the world's greatest citrus grower, its being responsible for over 20% of the world's production. Nevertheless, the production is still poor due to a great deal of phytosanitary problems, for instance Citrus Blight. Citrus Blight is a anomaly the cause of which has been not determined yet. The tree which begin to decliner, do not recover, they reach a chronic Blight stage, but they hardly die. Although, Citrus Blight has been reported for more than 100 years, its etiology is still unknown. Consequently, there are no control measures to minimize the losses in production, a fact that worsens markedly considering that the symptoms only are detected after three years' period, when the plants begin to yield. Use of resistant varieties is regarded as a more adequate control measure. However, little is known about the genes involved in the defense response of the plants to this anomaly. Taken into account that a great deal of physiological alterations associated with stress responses in plants are controlled at the transcriptional level, in this study, the identification and characterization of the products of the gene expression expressed differently in the response to Citrus Blight was intended. So, the Suppression Subtractive Hybridization technique by utilizing mRNAs isolated from lemon tree "Cravo" (*Citrus limonia* L. Osbeck) under orange "Pera" (*Citrus sinensis* L. Osbeck) both with and without Declinio was utilized. The identification of the possible function of genes/ESTs isolated was performed by sequence comparison with other genes reported in gene databanks. In addition, the presence of declinio anomaly was confirmed by means of protein profile electrophoretic analysis on SDS-PAGE gel. (Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide Gel Electrophoresis) of the "Cravo" lemon root proteins (*Citrus limonia* Osbeck). Two cDNAs subtractive libraries were built, one enriched with cDNA differentially from trees with a high degree of Blight (forward) and another enriched with genes expressed in plants sampled as healthy (reverse). 129 clones of differently expressed genes were obtained, 38 genes standing from the forward library and 91 clones the reverse library. After analysis, it was found that 45% 6of the clones of the suppression subtractive library coming from mRNAs isolated from tree with a high degree of Blight were associated with the senescence proteins, while only 20% of these clones were identified in the

---

<sup>2</sup> Guidance Committee: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Major Professor), Antônio Chalfun Junior - UFLA

suppression subtractive library coming from mRNA isolated from healthy plants. Other genes were isolated, presenting similar functions related with proteins such as LEA dehydrin-like, cytochrome P450 like\_TBP, putative germin, metallothionein-like protein, hydrolase, ubiquitin, protein 14-3-3 which have function of responding to a range of stimuli and/or biotic or abiotic environmental factors and mainly the one water stress, also those with hypothetical functions and the ones which had no similarity with proteins deposited in databank. The results obtained suggest that all the plants collected in Bebedouro – SP, including those collected as healthy were with Blight, but at stages different from anomaly.

## 1 INTRODUÇÃO

A fruticultura mundial foi responsável pela produção de aproximadamente 700 milhões de toneladas em 2005, sendo que desse volume, aproximadamente 150 milhões de toneladas são representados pela citricultura, o que faz dos cítricos as frutas mais produzidas no mundo. Nesse contexto, o Brasil destaca-se por ser o maior produtor, com uma média aproximada de 20 milhões de toneladas anuais e, juntamente com Estados Unidos, China, Espanha e México, produzem mais de 50% dos citros consumidos no planeta (FAO, 2006).

Apesar da importância do Brasil como maior produtor mundial de citros, a produtividade dessa cultura no país tem sido muito afetada principalmente por problemas fitossanitários, a exemplo do Declínio dos Citros (Azevedo, 2005).

Os sintomas visuais dessa anomalia, de causa ainda desconhecida, são em geral observados em pomares com mais de cinco anos de idade (Marais, 1990). No entanto, isso não significa que o Declínio somente ocorra em plantas dessa idade.

As plantas afetadas raramente morrem, mas tornam-se economicamente inviáveis devido à baixa quantidade e qualidade dos frutos que produzem. Pomares afetados têm uma redução na produção de frutos/planta em torno de 50 a 60% (Prates et al., 1984). Um dos possíveis motivos é a restrição hídrica decorrente do estrangulamento dos vasos lenhosos que ocorre em plantas afetadas. Esses sintomas podem ser confundidos com os de plantas sob estresse hídrico ou infectadas por nematóides, viróide da exocorte ou ainda pelo vírus da tristeza (Lee et al., 1984).

Os primeiros métodos de diagnóstico para o Declínio utilizados baseiam-se na quantificação de zinco (o caule das plantas afetadas possui

concentração de zinco três vezes maior que o de plantas saudáveis) e na taxa de absorção de água injetada diretamente no caule “teste da seringa”, que consiste em perfurar o tronco da laranjeira a aproximadamente 30 cm acima da região de enxertia com uma broca ou prego de 1/8 de polegadas, a 3-5 cm de profundidade. Nessa perfuração, conecta-se a extremidade de uma seringa de 20 ml, sem agulha, na qual se completam 10 ml de água, a qual é injetada no interior do tronco durante 30 segundos. As árvores saudáveis devem absorver 10 ml de água em 30 segundos, sendo que as árvores que apresentam o declínio não absorvem o mesmo volume (Lee et al., 1984).

Um avanço na diagnose provém do desenvolvimento de um teste sorológico obtido de uma proteína presente em plantas doentes (Derrick et al., 1990). Com esse teste detectam-se plantas afetadas ainda assintomáticas. No entanto, em condições brasileiras, foram identificadas duas proteínas de aproximadamente 23 e 26 kDa, específicas de plantas doentes (Paiva, 1993). Essas proteínas foram identificadas até mesmo em mudas com até 18 meses de idade, demonstrando que a diagnose precoce da anomalia pode ser obtida mediante a utilização de teste sorológico.

Como não existem medidas profiláticas para o controle da anomalia, a única prática recomendada para plantas identificadas com Declínio é a sua remoção, quando encontram-se com produção economicamente inviável, pois até o momento não existem alternativas disponíveis para recuperá-las. Como muitos esforços foram investidos, na tentativa de identificar uma possível causa para essa anomalia e até o presente momento sem sucesso, muitos pesquisadores abandonaram suas pesquisas devido a uma sensação de morte profissional e impotência diante do Declínio dos Citros. Atualmente, novas perspectivas têm sido reavivadas com a possibilidade de aplicação de ferramentas moleculares, com o intuito de obter subsídios que permitam melhor interpretação dos eventos biológicos e moleculares que ocorrem nas plantas sob condição de Declínio.

Uma vez que muitas alterações fisiológicas associadas com respostas a estresses em plantas são controladas em nível transcricional, genes preferencialmente (diferencialmente) expressos em raízes de plantas com Declínio possivelmente possuem uma função associada à resposta ao Declínio. A identificação de genes diferencialmente expressos em plantas afetadas pelo Declínio poderiam gerar informações chaves sobre os processos fisiológicos e moleculares envolvidos na resposta a essa anomalia. Esses conhecimentos poderiam servir como subsídios para desenhar novas estratégias para a controle dessa doença, seja no aprimoramento do diagnóstico precoce ou mesmo pela obtenção de plantas resistentes. Contudo, apesar da importância, estudos deste tipo não foram encontrados no Brasil.

A técnica de biblioteca subtrativa supressiva (SSH – Supression Subtractive Hybridization) permite a obtenção de pequenas bibliotecas de cDNA enriquecidas com transcritos diferencialmente expressos que estão presentes em apenas uma das amostras comparadas (Diatchenko et al., 1996), e tem sido usada de forma eficiente para obter esse tipo de informação em vários patossistemas, como, por exemplo, na identificação de genes induzidos em respostas à infecção de plantas por patógenos, identificação de genes induzidos em resposta a diferentes estresses bióticos e abióticos (Birch et al., 1999; Dellagi et al., 2000; Guzzo, 2004).

O porta-enxerto predominante na citricultura brasileira, principalmente após a entrada do vírus da tristeza dos citros (CTV) na década de 40, é o limão 'Cravo', devido às suas características hortícolas muito favoráveis. É altamente tolerante à seca devido ao sistema radicular vigoroso e profundo (Rossetti, 1991). Mais de 80% das plantas cítricas estão enxertadas sobre esse porta-enxerto, o limão 'Cravo' (*Citrus limonia Osbeck*) (Pompeu Junior, 2001), porém, esse porta-enxerto é susceptível ao Declínio dos Citros. A anomalia afeta praticamente todas as combinações de copa x porta-enxerto.

Também não foram encontrados dados publicados sobre a aplicação de técnicas de biblioteca subtrativa para clonagem e estudo de genes relacionados ao Declínio em plantas de limão ‘Cravo’ sob laranjeira ‘Pêra’, cultivadas no país.

Nesse contexto, objetivo-se com este trabalho realizar estudos de genômica funcional em raízes de limoeiro ‘Cravo’, mediante a construção de biblioteca subtrativa por supressão, visando à identificação de genes diferencialmente expressos associados ao Declínio dos Citros.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Declínio dos Citros

Os primeiros relatos sobre a anomalia Declínio dos Citros foram em 1874, porém, a primeira publicação sobre o tema foi na Flórida, EUA, Underwood (1891), citado por Swingle & Webber (1896). Foi apresentada uma descrição detalhada da anomalia, detectando-se a ocorrência de plantas com ponteiros secos, brotações internas a partir do tronco, baixa produção de frutos, resultando em árvores sem valor econômico. Por terem notado que a disseminação ocorria em áreas adjacentes ao foco inicial, sugeriram uma origem infecciosa para a anomalia e a erradicação das árvores inicialmente afetadas.

O Declínio dos Citros é uma alteração no desenvolvimento normal da planta, caracterizada por perdas acentuadas de folhas, excesso de brotação no tronco e ramificações (pernadas), gradativo secamento de galhos, floradas extemporâneas, deficiências acentuadas de nutrientes, especialmente zinco, mesmo em pomares adequadamente fertilizados, acúmulo de fenóis solúveis no caule, presença de obstruções amorfas e/ou filamentosas nos vasos do xilema e baixa produção (Baldassari, 2003).

Embora o Declínio dos Citros seja conhecido há mais de um século, como é o caso na Flórida, EUA, não há, ainda, o diagnóstico do agente causal. A natureza etiológica do problema é controversa, encontrando-se na literatura citações tanto quanto ao envolvimento de agentes bióticos quanto fatores abióticos. O Declínio dos Citros foi constatado no Brasil na década a de 70 (Rossetti, 2001) e, atualmente, tem presença assinalada em praticamente todas as regiões produtoras do mundo (Wutscher, 1989). Nos EUA, é chamado de “Blight” e tem sido considerado um dos maiores problemas fitopatológicos na Flórida (Derrick et al., 1990). Na Argentina, é chamada de “Declinamento”

(Anderson, 1990), e no Uruguai, de “Marchitamiento repentino” (Muller & Biso, 1990).

## **2.2 Testes Diagnósticos**

Sintomas visuais semelhantes aos do Declínio dos Citros podem ser induzidos por outras causas, como o dano causado por déficit hídrico, nematóides, viróide da exocorte, vírus da tristeza e da xiloporose, dificultando a sua identificação (Lee et al., 1984). Para auxiliar a diagnose visual, surgiram metodologias por meio das quais se avaliam características ou sintomas específicos do Declínio dos Citros.

O acúmulo de zinco no lenho constituiu-se como um dos testes-padrões utilizados para diagnosticar o Declínio dos Citros, distinguindo-o de outras doenças, uma vez que plantas afetadas com a anomalia apresentam concentrações, em média, cinco vezes maior que as plantas sadias (Wutscher, 1989). Os autores enfatizaram, no entanto, a importância de se comparar amostras de plantas afetadas e sadias de um mesmo local, visto que há uma certa variação nos teores de zinco no lenho das plantas de um local para outro. Resultados de várias pesquisas confirmaram a observação apresentada por Wutscher et al. (1977), a respeito dessa variação nas concentrações de zinco no tronco das plantas de um local para outro (Giroto, 1990; Lee et al., 1984; Wutscher, 1989).

Baseados no bloqueio do xilema pela ocorrência de obstruções amorfas ou filamentosas, desenvolveu-se um teste de diagnóstico rápido, que passa a avaliar a capacidade da planta em absorver água injetada no tronco.

A princípio realizado, durante um período de 24 horas (Cohen, 1974), no qual a água é injetada pela força gravitacional, as árvores são consideradas afetadas pelo Declínio se absorvem menos de 50 ml de água no período. O método foi modificado para um teste rápido utilizando-se pressão manual e uma

seringa (Lee et al., 1984). Por esse método, árvores sadias absorvem um mínimo de 10 ml em 30 segundos, ao passo que árvores com Declínio normalmente não absorvem água, ou chegam a absorver 1 a 2 mL no mesmo período.

Um avanço na diagnose provém do desenvolvimento de um teste sorológico obtido de uma proteína presente em plantas doentes (Derrick et al., 1990). Neste teste, detectam-se plantas afetadas ainda assintomáticas. No Brasil, foram identificadas duas proteínas de aproximadamente 23 e 26 kDa, específicas de plantas doentes que usavam o limão ‘Cravo’ como porta-enxerto. Essas proteínas também foram identificadas em mudas da cultivar “Cravo” (Paiva, 1993). Isso permite uma diagnose precoce mediante o desenvolvimento de um teste sorológico aplicável até mesmo antes da implantação do pomar.

### **2.3 Argumentos contra fatores bióticos como possíveis agentes causais do Declínio dos Citros**

Várias foram as tentativas de controle ou recuperação de plantas com Declínio, porém, os trabalhos realizados mostram que os sintomas do Declínio dos Citros são irreversíveis. Também foram várias as tentativas de associação do Declínio com agentes patogênicos, todos sem a comprovação.

Segundo Berger (1998), a tentativa de explicar a transmissão de um agente infeccioso por meio da enxertia de raízes pode ser interpretada como uma transferência de ácido abscísico (ABA) de uma raiz para outra, uma vez que esse hormônio ocorre em níveis elevados em raízes de árvores sob estresse. O mesmo autor, revisando o assunto, faz uma ampla abordagem sobre as possíveis causas dessa anomalia, tornando evidente a ausência do envolvimento de um agente biótico. Entre essas evidências, têm-se: 1- Não foi encontrado nenhum patógeno associado à anormalidade, mesmo após exaustivos estudos, amparados com técnicas modernas de investigação e análises, como microscopia eletrônica de transmissão e varredura, sorologia, sondas de DNA, meios seletivos para

isolamento em cultura pura de microorganismos e corantes específicos; 2- Os sintomas do Declínio dos Citros apresentam semelhança àqueles que ocorrem em outras espécies de árvores, como por exemplo, em carvalhos (*Quercus* spp), freixo (*Fraxinus excelsio*), ácer (*Acer* spp), dendezeiro (*Elaeis guineensis*) e mangueira (*Mangifera indica*). O Declínio dessas espécies é tido como causado por fatores de natureza não-patogênica; 3- O perfil de aumento da incidência do Declínio dos Citros, no tempo, é diferente daquele associado a várias epidemias causadas por patógenos de plantas. De acordo com Sonoda et al. (1992) e Yokomi et al. (1984), na Flórida, o progresso do Declínio dos Citros ao longo do tempo dá-se de forma linear, assemelhando-se a vários outros tipos de Declínios, de causa não parasitária. No Brasil, de acordo com Tubelis et al. (1988), o progresso temporal da doença poderia ser descrito como uma função exponencial, divergindo dos resultados obtidos nos EUA. Nesse caso, epidemiologicamente esperava-se um progresso acentuado da doença, ocupando gradativamente todos os pomares, de tal forma que todas as plantas acima de seis anos estariam afetadas, o que não tem ocorrido na realidade. Tal fato suscita e fortalece a idéia da ausência de agentes bióticos associados à doença; 4- De acordo com Sonoda et al. (1992), a distribuição espacial de plantas cítricas com sintomas de Declínio ocorre geralmente ao acaso, cujo perfil enquadra-se mais apropriadamente a problemas de natureza abiótica. Certamente, o envolvimento de um agente patogênico levaria, ao longo do tempo, à ocorrência na forma de agregado, fato esse não observado nas condições do Brasil; 5- Tem-se verificado que tanto na Flórida (Wutscher, 1989) como no Brasil, mesmo após vários anos, a co-existência de plantas sadias ao lado de plantas assintomáticas é fato comum nos pomares cítricos. Tal fato contraria a dinâmica espacial, temporal e espaço-temporal resultante da influência de agentes bióticos; 6- A presença de proteína-RS (RS = relacionada ao estresse), inicialmente designada proteína PR (PR = relacionada com a patogênese), constitui indicação da presença de plantas

sintomáticas e assintomáticas e não do envolvimento de um agente biológico específico na ocorrência da doença. De acordo com Berger (1998), a proteína-RS está associada à presença de um fator responsável por estresse na planta. Segundo esse autor, a causa do Declínio dos Citros é a mesma identificada para o Declínio de outras espécies arbóreas, qual seja: o estresse. Fatores como desfolha, injúrias por baixas temperaturas, índices elevados de salinidade do solo, reduções do sistema radical por atividades de nematóides e insetos do solo e época inadequada de poda são alguns dos vários fatores responsáveis por estresse. Entre esses fatores, o autor cita o envolvimento direto de altas concentrações de sais solúveis no solo, resultante de fertilização ou calagem excessivas e déficit ou excesso de umidade. Segundo Castro (1991), já foi estabelecido associação entre injúria no sistema radical e a incidência do Declínio dos Citros. De acordo com esse autor, há possibilidade de que, nas diferentes fases de formação das mudas, fatores desencadeadores de estresse, como poda de raízes e tratos culturais inadequados predisõem as plantas ao Declínio. Segundo Anderson (1980), poda de raízes de laranjeira 'Valência' enxertada em limoeiro 'Rugoso', com nove anos de idade, causou sintoma de Declínio nas plantas, o que corrobora a hipótese do estresse radical e presença de plantas sintomáticas; 7- As ocorrências de desequilíbrio nutricionais são também fatores capazes de ocasionar estresse nas plantas e, dessa forma, contribuir para a ocorrência de sintomas. De acordo com Wutscher (1989), verificou-se a relação direta entre baixas taxas de capacidade de troca catiônica e maior incidência de plantas sintomáticas. Normalmente, a manifestação dos sintomas tem sido mais evidente em solos com teores limitantes de fósforo e potássio, exibindo, por outro lado, altos níveis de cálcio e magnésio e baixos teores de cloro e enxofre. Segundo Wutscher (1989), nas condições da Flórida, aplicações de grande quantidade de hidróxido de cálcio levou a uma remissão dos sintomas. Sabe-se, entretanto, que dificilmente uma planta afetada por um determinado

agente apresentaria recuperação, o que invalida a hipótese do envolvimento de um patógeno; 8- Solos pouco profundos, de baixa fertilidade, com drenagem deficiente, arenosos e capazes de interferir negativamente no desenvolvimento do sistema radical estão relacionados com maior incidência de Declínio (Castro, 1991). A única prática recomendada até o momento é a eliminação da planta, uma vez que ela passa a produzir em níveis abaixo do economicamente viável. A ausência de medidas profiláticas, etiologia desconhecida e a manifestação tardia dos seus sintomas, que só aparecem após três anos, tornam essa anomalia preocupante para a citricultura mundial, uma vez que essa se encontra disseminada praticamente por todas as regiões cítricas do globo (Wutscher, 1989).

#### **2.4 Argumentos contra fatores abióticos como possíveis agentes causais**

As hipóteses que sustentavam uma origem abiótica para a anomalia, como desordem nutricional ou estresse fisiológico, não puderam ser mantidas após a transmissão do Declínio por enxertia de raízes. Para vários autores, deve existir algum patógeno relacionado ao sistema radicular dos porta-enxertos, uma vez que a anomalia não se transmite por enxertia de ramos (Carlos et al., 1997).

As plantas cítricas raramente são cultivadas na forma de “pé-franco” e o método de propagação mais usual é a enxertia, ou seja, a união da variedade copa com um porta enxerto mais adaptado a condições adversas, resultando em tolerância a estresses diversos, melhoria da qualidade dos frutos e aumento da produção (Grosser & Gmitter Junior, 1990).

Uma estratégia alternativa é a aplicação de novas técnicas de Biologia Molecular, as quais poderão contribuir para adicionar informações e introduzir novas idéias, visando à elucidação do agente causal e medidas de controle para o Declínio dos Citros.

A identificação de genes diferencialmente expressos tem sido usada como uma importante abordagem experimental para conhecer não somente a função gênica, mas também para compreender como os mecanismos moleculares estão relacionados com processos biológicos (Vedoy et al., 1999). No entanto, a análise funcional do genoma de citros sob a condição da anomalia Declínio não foi ainda elucidada completamente.

## **2.5 Bibliotecas subtrativas supressivas (SSH- Suppression Subtractive Hybridization)**

Uma metodologia alternativa para o isolamento de genes diferencialmente expressos foi desenvolvida por Diatchenko et al. (1996). Esse método, denominado Hibridação Subtrativa por Supressão (SSH do inglês “Supression Subtractive Hybridization”), baseia-se na amplificação preferencial, pela reação em cadeia da polimerase (PCR), de seqüências diferencialmente representadas em duas populações de cDNA, ao passo que o fenômeno da supressão impede a amplificação das seqüências comuns. Distintamente de outros métodos de obtenção de genes diferencialmente expressos, que permitem a identificação de pequena quantidade de genes, como a seleção diferencial (“differential display”), por exemplo, a SSH resulta em uma minibiblioteca enriquecida desses genes, fornecendo amplo material para a comparação de populações de mRNAs. Dada à sua eficiência, a SSH vem sendo amplamente empregada para a identificação de genes envolvidos em diferentes tipos de câncer e em processos de diferenciação celular. Ainda são poucos os trabalhos na área vegetal que fizeram uso da SSH, entretanto, já se confirmaram a eficiência dessa técnica (Birch et al., 1999; Guzzo, 2004; Takemoto et al., 2003).

As várias etapas da SSH e seu princípio estão representados de forma esquemática na Figura 1. Para a construção da Biblioteca 1, a população de cDNA das plantas doentes, denominada de *tester*, é ligada separadamente a dois

tipos de adaptadores (adaptador 1 e 2R). A população de cDNA de planta-controle (sadia), denominada *driver*, não é ligada a qualquer adaptador. Após a denaturação dos cDNAs *tester* e *driver*, os cDNAs da planta-controle (*driver*) são adicionados em excesso a cada uma das duas amostras das plantas doentes, para a primeira reação de hibridação. Essa reação resulta na formação de diferentes produtos, como a molécula C, que representa o híbrido formado entre seqüências de cDNA comuns à planta doente e à planta-controle sadia. Para a segunda reação de hibridação, as amostras são misturadas sem denaturação prévia, juntamente com a adição de um excesso de cDNA denaturado proveniente de planta-controle sadia. Ocorre, então, a formação do híbrido E, que representa os cDNAs presentes apenas em plantas doentes, não comuns às plantas-controle sadias. Após o preenchimento das extremidades dos híbridos de cDNAs com os adaptadores, as amostras são submetidas à PCR com *primer* específico para as seqüências dos adaptadores (PCR *primer* 1). Apenas os híbridos de cDNA do tipo E que contêm os dois tipos de adaptadores apresentam os sítios de anelamento para o *primer*. Esse processo permite, portanto, a amplificação exponencial por PCR apenas dos cDNAs que representam os genes expressos diferencialmente em plantas doentes. Em seguida, os produtos da PCR são submetidos a uma segunda reação de amplificação (*Nested PCR*) com os *primers* específicos *Nested PCR primer* 1 e *Nested PCR primer* 2R, correspondentes às regiões mais internas dos adaptadores 1 e 2R, respectivamente. Essa reação possibilita um enriquecimento das seqüências expressas diferencialmente. Para a construção da Biblioteca 2, utiliza-se a mesma técnica anteriormente descrita com a modificação da ligação dos adaptadores usando as plantas sadias *como tester* e as doentes *como driver*.

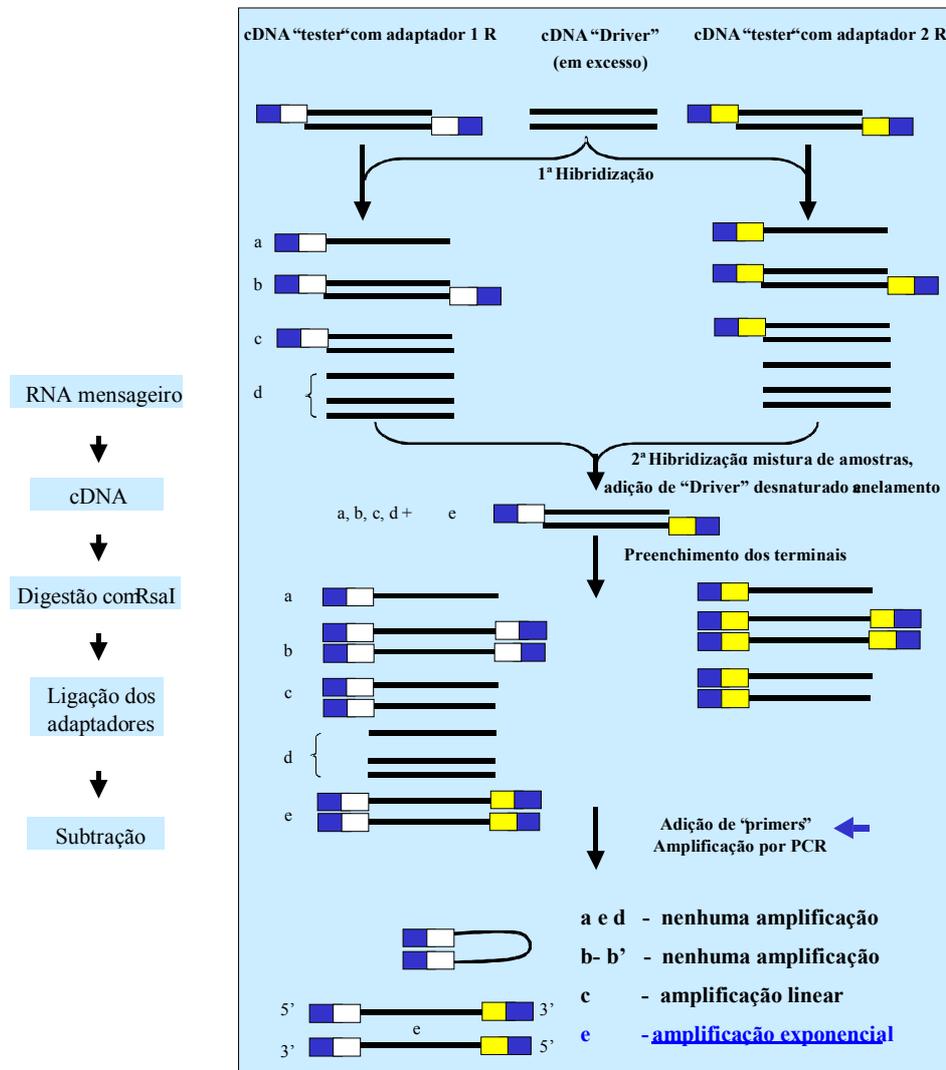


FIGURA 1. Representação diagramática da hibridação subtrativa por supressão. As linhas sólidas representam os cDNAs *tester* ou *driver*; as caixas sólidas representam a região externa dos adaptadores 1 e 2R que correspondem à seqüência do *primer* utilizado no PCR (PCR *primer* 1); as caixas claras representam a região interna do adaptador 1 e da seqüência do *Nested PCR primer* 1 correspondente; as caixas sombreadas representam a região interna do adaptador 2R e da seqüência do *Nested PCR primer* 2R correspondente.

## 2.6 Bibliotecas subtrativas supressivas: Aplicações na interação Planta-Extresse

Birch et al. (1999) isolaram genes de batateira, induzidos nos primeiros estágios da resposta de hipersensibilidade (RH) à *P. infestans*, utilizando a técnica da SSH para gerar uma biblioteca de cDNA enriquecida de seqüências induzidas na RH. As seqüências de cDNA obtidas foram comparadas com aquelas depositadas em bancos de dados internacionais (“*National Center for Biotechnology Information*”, NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os produtos dos genes isolados apresentaram similaridade com moléculas sinalizadoras envolvidas na diferenciação celular, apoptose (morte celular programada) e na transdução de sinal da RH.

Essa técnica também foi utilizada para o isolamento de genes de batata, ativados na interação compatível com a bactéria patogênica *Erwinia carotovora*. Foi identificado, em batata, um importante fator de transcrição da família WRKY, envolvido na indução de genes codificadores de PR-proteínas. A regulação desse gene foi investigada durante as interações compatíveis e incompatíveis de plantas de batata com *Phytophthora infestans* (Dellagi et al., 2000). Em tomateiro, Xiao et al. (2001) empregaram também a SSH, possibilitando o isolamento de 82 clones de cDNAs em plantas de tomate 35S::*Pto* correspondendo a genes envolvidos em diversos mecanismos de defesa, como transdução de sinal, resposta de hipersensibilidade, estresse oxidativo e proteólise. Em cafeeiros, a técnica foi utilizada com o objetivo de identificar genes associados aos mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na resistência sistêmica adquirida (SAR) em plantas suscetíveis contra fitopatógenos (Guzzo, 2004).

A técnica também foi utilizada por Takemoto et al. (2003), para gerar uma biblioteca de cDNA enriquecida de genes induzidos em plantas de fumo, após o tratamento com o elicitor de respostas de defesa, constituído por

componentes da parede celular de hifas de *Phytophthora infestans*. Foram isolados 19 genes, incluindo aqueles codificadores de PR-proteínas, como  $\beta$ -1,3-glucanase, ou de proteínas da parede celular vegetal, como a extensina e uma proteína rica em glicina. Os autores verificaram, também, o padrão de expressão desses genes, em resposta ao tratamento com ácido salicílico e metil jasmonato ou à inoculação com a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, não patogênica à *Nicotiana tabacum*. Pelos resultados obtidos, verificou-se que a ativação da transcrição desses genes é regulada por diferentes moléculas sinalizadoras e que os respectivos produtos estão envolvidos em processos distintos relacionados à resistência.

Além de ser utilizada para identificar genes induzidos em resposta à infecção por patógenos, a técnica SSH também foi utilizada para identificar genes induzidos em resposta a estresses abióticos, como demonstrado em estudo no qual foram identificados genes de *Arabidopsis thaliana* que são diferencialmente expressos em resposta a aplicações de ozônio e moléculas sinalizadoras, como ácido salicílico e jasmônico (Mahalingam et al., 2003), também para o isolamento de genes que podem estar envolvidos na tolerância de frutos de cítrus a condições de variação de temperatura (Sanchez-Ballesta et al., 2003).

A técnica também foi usada para identificar genes ligados à resistência ao alumínio em cana-de-açúcar (Watt, 2003), também no estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de senescência em *Arabidopsis thaliana* (Gepstein et al., 2003).

A vantagem dessa técnica em relação às demais consiste no fato de promover uma normalização dos fragmentos subtraídos, reduzindo a redundância das seqüências diferencialmente expressas abundantes em relação àquelas mais raras na amostra, permitindo o enriquecimento dessas seqüências raras cerca de 1000 vezes. Essa normalização também pode facilitar a clonagem

de genes diferencialmente expressos pouco abundantes, em relação às demais técnicas de análise de expressão gênica diferencial (Diatchenko et al., 1996).

O único relato atual sobre a aplicação de técnicas para o estudo da expressão de genes associados ao Declínio dos Citros refere-se à análise do genoma funcional de plantas de limão ‘Rugoso’ sob laranjeira ‘Valência’, nas condições da Flórida, EUA (Carlos, 2004). Nesse estudo, o autor construiu duas bibliotecas de cDNAs provenientes de mRNAs isolados de raízes de limão ‘Rugoso’ sob laranjeira ‘Valência’ saudáveis, ligeiramente afetadas com o Declínio e completamente afetadas com o Declínio, e mostrou que a SSH foi um modo efetivo para criar uma biblioteca de cDNA enriquecida, e que a regulação de alguns genes dependia do grupo de planta avaliado.

Ainda não existem dados publicados sobre a aplicação de técnicas de biblioteca subtrativa para clonagem e estudo de genes relacionados ao Declínio em plantas de limão ‘Cravo’ sob laranjeira ‘Pêra’, nas condições do cultivo no Brasil.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta do Material e Plantas Doadoras

A coleta das amostras de raízes de limoeiro “Cravo” (*Citrus limonia* L. Osbeck) sob laranja “Pera” (*Citrus sinensis* L. Osbeck) foi efetuada em uma Fazenda pertencente à Empresa Cutrale, localizada na cidade de Bebedouro – SP.

As amostras foram coletadas de árvores com aproximadamente 12 anos de idade, de mesmo talhão e submetidas às mesmas condições de cultivo. Essas foram colhidas ao acaso, com base em sintomas visuais típicos de plantas sadias e com Declínio. As árvores escolhidas foram caracterizadas em diferentes estágios do desenvolvimento da anomalia:

Estágio 0 – Planta Sadia;

Estágio 1 – Planta em estágio inicial de Declínio dos Citros (plantas isentas de brotações novas e folhas com coloração verde fosco;

Estágio 2 – Planta em estágio intermediário do Declínio (plantas isentas de brotações novas, folhas com coloração verde fosco, desfolhamento e seca de ponteiros;

Estágio 3 – Plantas no estágio final de Declínio (plantas isentas de brotações novas, exceto no interior das pernadas, folhas com coloração verde fosco, desfolhamento abundante e seca severa dos galhos na copa da planta.

Após avaliação visual, as plantas escolhida foram submetidas ao teste da seringa para confirmação de sintomas visuais. O teste consiste em perfurar o tronco da laranjeira a aproximadamente 30 cm acima da região de enxertia com uma broca ou prego de 1/8 de polegadas, a 3-5 cm de profundidade; nessa perfuração, conecta-se a extremidade de uma seringa de 20 ml, sem agulha, na qual se completam 10 ml de água, a qual é injetada no interior do tronco durante

30 segundos. As árvores sadias devem absorver 10 ml de água em 30 segundos, as árvores que apresentam o Declínio não absorvem esse volume (Lee et al., 1984).

Após avaliação visual e teste da seringa, de cada árvore, foram coletadas raízes/radicelas superficiais, para extração de RNA, e segmentos de raízes de cerca de 20 cm de comprimento e 1-2 cm de diâmetro, para extração de proteínas, ambas localizadas radialmente ao tronco (60 a 150 cm). Dez árvores foram amostradas, identificadas e classificadas como sadias ou em diferentes estágios da anomalia (Tabela 1).

TABELA 1. Identificação e classificação das plantas de laranja “Pera” sob limão “Cravo” amostradas.

<b>Planta</b>	<b>Estágio</b>
1	
2	
3	Sadia
4	
5	
6	Inicial
7	
8	Intermediária
9	Final
10	

As amostras foram devidamente identificadas e acondicionadas em recipientes adequados. As amostras para extração de RNA foram imediatamente

colocadas em nitrogênio líquido e as para extração de proteína, acondicionadas em gelo seco e transportadas até o Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA (LCBM), Lavras MG, onde foram imediatamente armazenadas em freezer -80 °C e 4 °C, respectivamente, até o momento das análises.

### **3.2 Extração e Quantificação Protéica**

Proteínas solúveis presentes no xilema foram isoladas, conforme metodologia descrita por Paiva (1993), em que as raízes de 1-2 cm de diâmetro foram divididas em pedaços de 10-20 cm de comprimento e tiveram os tecidos da casca das extremidades retirados. Através de uma bomba a vácuo, um quitasato e com auxílio de mangueiras, foi passada pelos vasos do xilema uma solução tampão de Tris 1 mol.L<sup>-1</sup> (pH 7.4).

Cada pedaço de raiz recebeu 5 ml desse tampão; em seguida, foi imediatamente congelada e, ao final, liofilizadas. A quantificação protéica foi feita pelo método descrito por Bradford (1976).

### **3.3 Análise Protéica**

Após a extração, liofilização e quantificação, as amostras foram avaliadas por eletroforese.

As proteínas presentes na fração solúvel do xilema foram analisadas em gel SDS – PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel), contendo 12,5% de poliacrilamida e 0,1% dodecil sulfato de sódio, baseando-se no sistema de eletroforese descrito por (Laemmli, 1970).

Os géis foram polimerizados com 1,5 mm de espessura em sistemas descontínuos, e a corrida se deu com tampão contendo 0,2M Glicina + 0,025M Tris + 0,1% SDS, e submetidos a uma carga elétrica de 200 mA. O período de

corrida foi de aproximadamente 2-3 horas, até o marcador de frente alcançar o final do gel.

Após as corridas, os géis foram revelados utilizando-se solução de coloração, contendo 0,5% do corante Coomassie Blue R-250 + 50% etanol + 10% ácido acético e a descoloração com uma solução contendo 10% ácido acético + 5% etanol.

### **3.4 Extração de RNA total**

O RNA total foi extraído baseando-se no método desenvolvido por Chomczynski & Sacchi (1987), conhecido como o método do TRIZOL. O TRIZOL<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen<sup>™</sup>) é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, que permite a extração de RNA em uma etapa única.

As raízes/radicelas superficiais descritas em 3.1. foram trituradas em almofariz com nitrogênio líquido. Do pó fino resultante, 100-150 mg foram colocados em tubos de 2 mL e misturados com 1 ml de TRIZOL<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen<sup>™</sup>).

Após a adição do reagente a cada amostra e homogeneização sob agitação suave, a mistura permaneceu por 5 minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação do complexo nucleoprotéico. O material insolúvel foi removido por centrifugação (10.000 xg, 10 min, 4°C).

Em seguida, a separação do material solúvel contida no sobrenadante foi feita adicionando-se 0,3 ml de clorofórmio e os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 3 minutos e, logo após, feita uma centrifugação (10.000 xg, 15 min, 4°C), O RNA presente na fase aquosa foi precipitado com 0,3 ml de álcool isopropílico + 0,3 ml tampão citrato (0,8 mol.L<sup>-1</sup> citrato de sódio e 1,2 mol.L<sup>-1</sup> cloreto do sódio), deixando 10 minutos à temperatura ambiente e após centrifugação (10.000 xg, 10 min, 4°C).

No final do procedimento, após lavagem do sedimento com 1 mL de etanol 75% (10.000 xg, 10 min, 4°C), secagem 10 minutos em câmara de fluxo laminar, o RNA extraído foi dissolvido em 50 µL de água livre de RNase.

A concentração de RNA das amostras foi quantificada em espectrofotômetro a 260 nm. O perfil do RNA extraído foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (EtBr), em tampão TAE pH 8,3 (Tris-ácido acético-EDTA; Tris-acetato 40 mmol.L<sup>-1</sup>, EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>). Todas as amostras de RNA foram mantidas em freezer - 80°C.

Toda extração foi realizada da forma mais asséptica possível, usando-se luvas; todo o material (vidraria, ponteiras, tubos, etc) foram tratados com DEPC (1 mL/L) overnight e, posteriormente, autoclavados.

### **3.5 Tratamento do RNA total com DNase**

As amostras de RNA total, após quantificação, foram tratadas com Deoxyribonuclease I Amplification Grade (Invitrogen™), para inativação de possíveis DNAs genômicos remanescentes. Após o tratamento 15 µl (10 µl RNA total + 1 µl DNase + 1,5 µl tampão + 2,5 µl água), foram adicionados 40 µl de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1:1, misturado em vortex por 30 segundos, em seguida as amostras foram deixadas por 10 minutos no gelo e então centrifugadas (12.000 xg, 5 min, 4°C).

Coletada a fase superior, foram adicionados a essa 5 µl de acetato de sódio 3 mol.L<sup>-1</sup> e 0,2 ml de etanol 100%, para precipitar o RNA por uma hora a - 80 °C.

Após centrifugação (12.000 xg, 5 min, 4°C) e lavagem do pellet com 0,5 ml etanol 75%, o RNA foi dissolvido em 10 µl de água livre de RNase.

A concentração de RNA total das amostras tratadas foi determinada em espectrofotômetro a 260 nm e o perfil dos tratamentos foi visualizado por

eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (EtBr), em tampão TAE pH 8,3 (Tris-ácido acético-EDTA; Tris-acetato 40 mmol.L<sup>-1</sup>, EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>). Todas as amostras de RNA foram mantidas em freezer -80 °C.

### **3.6 Purificação do mRNA**

O mRNA foi obtido utilizando-se o kit Oligotex mRNA Spin-Column Protocol (QIAGEN), de acordo com as especificações do fabricante. Para isso, adicionaram-se ao RNA total tratado com DNase descrito em 3.5., 250 µl de água livre de RNase + 250 µl de tampão OBB + 15 µl de oligotex suspension e, em seguida, incubou-se essa mistura por 3 minutos a 70 °C.

As amostras foram removidas da incubação e deixadas por 10 minutos à temperatura ambiente para a hibridação e formação do complexo oligo dt do oligotex + poly A do mRNA e então centrifugadas por 2 minutos a 18.000 g à temperatura ambiente. O pellet de mRNA foi ressuscitado em 0,4 ml do tampão OW2, transferidos para uma coluna de purificação (spin-column) e centrifugados por 1 minuto a 18.000 g à temperatura ambiente. Essa etapa foi repetida novamente, porém, transferindo a coluna para um novo eppendorf. Nessa etapa, o complexo oligo dt/mRNA ficam retidos na coluna, enquanto todo o resto passa por sua resina.

Transferindo-se a coluna contendo a resina + complexo para um novo tubo e adicionando 20 µl de tampão OEB quente (70 °C), centrifugou-se por 1 minuto a 18.000 g à temperatura ambiente, onde este tampão rompe o complexo e somente o mRNA passa pela coluna. Para maior eficiência do método adicionou-se mais 20 µl de tampão OEB quente (70 °C) e centrifugou-se por 1 minuto a 18.000 g à temperatura ambiente.

O perfil do RNA extraído foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (EtBr), em tampão TAE pH 8,3 (Tris-

ácido acético-EDTA; Tris-acetato 40 mmol.L<sup>-1</sup>, EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>). Todas as amostras de RNA foram mantidas em freezer -80 °C.

### 3.7 Construção da Biblioteca Subtrativa Supressiva (SSH)

A construção da biblioteca subtrativa supressiva foi realizada utilizando-se o Kit “PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit” (CLONTECH), segundo as instruções do fabricante “CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit User Manual” (2002).

Foram construídas duas bibliotecas de cDNAs: uma contendo clones da subtração “planta doente menos planta sadia” (Biblioteca 1: Doente – Sadia Figura 2) e outra biblioteca contendo clones da subtração “planta sadia menos planta doente” (Biblioteca 2: Sadia – Doente), de acordo com a Tabela 1.

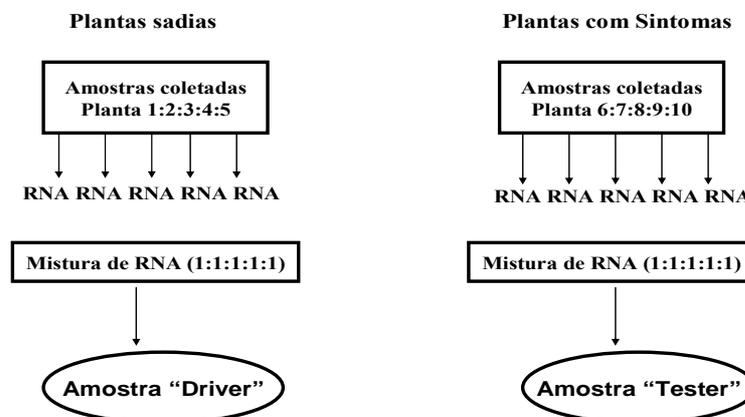


FIGURA 2. Representação diagramática visando a identificar genes expressos nos diferentes estágios do Declínio amostrados. As amostras de RNA total obtidas foram misturadas proporcionalmente para a construção das bibliotecas SF e SR.

### 3.7.1 Síntese da primeira fita de cDNA

Para a síntese da primeira fita de cDNA, 2µg de mRNA purificados no item 3.6. (2-4 µl) foram misturados com 1 µl de cDNA Synthesis Primer (10 µmol.L<sup>-1</sup>) e água estéril para um volume final de 5 µl. Após incubação a 70°C por 2 minutos em termociclador e logo após 2 minutos no gelo, foram acrescentados, a cada mistura, 2 µl de tampão da primeira fita [5x] (250 mmol.L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.5, 40 mmol.L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 150 mmol.L<sup>-1</sup> KCl, 5 mmol.L<sup>-1</sup> Dithiothreitol), 1µl de Mix dNTP 10 mmol.L<sup>-1</sup> [50x] (desoxirribonucleosídeo trifosfato), 1 µl de água estéril e 1µl de AMV Transcriptase reversa [20 U/ µl].

As amostras foram incubadas a 42 °C por 90 minutos em termociclador, depois colocadas em gelo 2 minutos para interromper a síntese da primeira fita de cDNA e então procedeu-se imediatamente à síntese da segunda fita de cDNA.

### 3.7.2 Síntese da segunda fita de cDNA

O tubos de reação de síntese da primeira fita de cDNA foram, resfriados em gelo, sendo adicionados os seguintes compostos: 48,4 µl de água estéril, 16 µl de tampão da segunda fita [5x] (500 mmol.L<sup>-1</sup> KCL, 50 mmol.L<sup>-1</sup> Ammonium sulfato, 25 mmol.L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>, 0,75 mmol.L<sup>-1</sup> de β-NAD, 100 mmol.L<sup>-1</sup> Tris-HCL pH 7.5, 0,25 mg/ml BSA), 1,6 µl Mix dNTP 10 mmol.L<sup>-1</sup> [50x], 4 µl de coquetel da enzima da segunda fita [20x] (DNA polymerase I [6 U/µl], RNase H [0,25 U/µl], E. coli DNA ligase [1,2 U/µl], para um volume final de 80 µl.

As amostras foram incubadas em termociclador a 16 °C por duas horas, e, então, adicionados 2 µl de T4 DNA Polymerase [3 U/µl]. Após 30 minutos, 16 °C em termociclador, adicionaram-se 4 µl da mistura EDTA/Glicogênio [20x] para terminar a síntese da segunda fita de cDNA.

Em seguida, 100 µl de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 25:24:1 foram adicionados, misturados e centrifugados (14000 xg, 10 minutos) à

temperatura ambiente. O mesmo se repetiu com 100 µl de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1.

Para o procedimento de precipitação, adicionaram-se 40 µl de NH<sub>4</sub>Oac [4 mol.L<sup>-1</sup>] e 0,3 ml de etanol 95%, temperatura ambiente, e as amostras foram centrifugadas (14000 xg, 20 minutos à temperatura ambiente), e então o pellet foi lavado com 0,5 ml de etanol 80% (14000 xg, 10 minutos à temperatura ambiente). O sobrenadante foi removido e evaporou-se o resíduo de etanol por 20 minutos em capela de fluxo laminar. O pellet foi ressuscitado em 50 µl de água estéril.

### **3.7.3 Digestão dos cDNAs com a enzima de restrição Rsa I**

Os cDNAs de ambas as amostras *tester* e *driver* foram digeridos com a enzima de restrição *RsaI*, com o objetivo de reduzir a complexidade dos fragmentos de cDNA fita dupla apresentando extremidades abruptas, necessários para a ligação dos adaptadores e de gerar mais representações de cada cDNA para a subtração.

Essa digestão é necessária para se evitar que ocorra, nas etapas posteriores de PCR, amplificação de fragmentos pequenos em detrimento dos grandes. Além disso, a cinética de hibridação de fragmentos desse tamanho é mais homogênea. Outras duas vantagens são: evitar formação de híbridos complexos entre diversos cDNAs diferentes e, ainda, permitir que um mesmo gene seja representado por diversos fragmentos na biblioteca, aumentando sua probabilidade de ser clonado.

Foram adicionados os seguintes reagentes: 43,5 µl de cDNA, 5 µl de tampão da enzima de restrição *Rsa I* [10x] (100 mmol.L<sup>-1</sup> Bis Tris Propane-HCl pH 7.0, 100 mmol.L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol.L<sup>-1</sup> Dithiothreitol) e 1,5 µl de *Rsa I* [10 U/µl]. Após a incubação das amostras a 37°C por 90 minutos foi adicionado a cada mistura, 2,5 µl de EDTA/Glicogênio para interromper a reação. Foram

adicionados 50 µl de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 25:24:1 e centrifugados a 14000 xg por 10 minutos à temperatura ambiente. Após remover o sobrenadante para um novo tubo, repetiu-se esse passo com 50 µl de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1.

A precipitação foi realizada adicionando 25 µl de NH<sub>4</sub>Oac [4 mol.L<sup>-1</sup>] e 187,5 µl de etanol 95%, centrifugação 14000 xg por 20 minutos à temperatura ambiente. A lavagem feita com 200 µl de etanol 80% e centrifugação 14000 xg por 5 minutos à temperatura ambiente, sobrenadante removido e o pellet foi seco em capela de fluxo laminar por 20 minutos. Ao final o pellet foi dissolvido em 5,5 µl de água estéril e armazenado a - 20 °C.

#### **3.7.4 Ligação dos Adaptadores ao cDNA**

Para a ligação dos adaptadores, uma alíquota de 1 µL de amostra de cDNA proveniente de plantas doentes (Biblioteca 1) e plantas saudáveis (Biblioteca 2), obtidas conforme descrito no item 3.7.3. (digerida com *Rsa* I), foi diluída com 5 µL de água esterilizada (cDNA *tester* diluída). Em seguida, a amostra cDNA *tester* diluída foi ligada separadamente aos dois tipos de adaptadores (adaptador 1 e adaptador 2R), preparando-se as seguintes misturas de reação:

Mistura de reação *tester* 1: foram adicionados a 2 µL de amostra cDNA *tester* diluída, 2 µL de adaptador 1 (10 µ mol.L<sup>-1</sup>), 3 µL de água, 2 µL de tampão de ligação [5X] e 1 µL de T4 DNA ligase (400 unidades/µL).

Mistura de reação *tester* 2: foram adicionados a 2 µL de amostra cDNA *tester* diluída, os mesmos componentes, adicionando-se 2 µL de adaptador 2R (10 µ mol.L<sup>-1</sup>) em vez de adaptador 1.

A reação de ligação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler gradiente a 16 °C durante 14 h, sendo então interrompida pela adição de 1 µL de uma mistura de EDTA/glicogênio. As amostras foram aquecidas a 72 °C por 5 min para inativar a enzima ligase. Em seguida, as

amostras *tester1* (ligada ao adaptador 1) e a *tester2* (ligada ao adaptador 2R), foram utilizados na primeira reação de hibridação.

### 3.7.5 Primeira Reação de Hibridação

Para a primeira reação de hibridação, foram utilizadas as amostras *tester1*- ligada ao adaptador 1 e *tester2*-ligada ao adaptador 2R (item 3.7.4.) e as amostras de cDNAs *driver* proveniente de plantas doentes (Biblioteca 1) e plantas saudáveis (Biblioteca 2) digeridas com *Rsa* I. Essa amostra, denominada cDNA *driver* , foi adicionada separadamente às amostras *tester*, preparando-se as seguintes misturas de hibridação: Mistura de hibridação 1: foram misturados 1,5 µL de amostra cDNA *driver* não diluída, 1,5 µL de *tester1*-ligada ao adaptador 1 e 1 µL de tampão de hibridação [4X] .

Mistura de hibridação 2: foram misturados 1,5 µL de amostra cDNA *driver* não diluída, 1,5 µL de *tester2*-ligada ao adaptador 2R e 1 µL de tampão de hibridação [4X] .

As misturas de reação foram aquecidas, separadamente, a 98°C, por 1,5 minutos, para desnaturação das amostras de cDNAs *tester* e *driver*. Em seguida, a primeira reação de hibridação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler gradiente a 68°C por oito horas. Após esse período, os produtos da reação foram imediatamente utilizados para a segunda reação de hibridação.

Nessa etapa, após a denaturação, ocorre o anelamento entre as seqüências similares de cDNA fita simples presentes nas amostras cDNAs *tester* e *driver*. Os cDNAs fita simples remanescentes, disponíveis para a segunda reação de hibridação, representam as seqüências menos abundantes presentes nas duas populações. Dessa forma, ocorre a equalização e enriquecimento das seqüências expressas diferencialmente nas plantas induzidas.

### 3.7.6 Segunda Reação de Hibridação

Na segunda reação de hibridação, as duas amostras provenientes da primeira reação de hibridação foram misturadas e uma alíquota de cDNA *driver* recém-denaturado foi adicionada à mistura, para propiciar um maior enriquecimento das seqüências expressas diferencialmente. As etapas seguintes foram executadas: a) Denaturação do cDNA *driver*: foram misturados 1 µL de amostra cDNA *driver* não diluída, 1 µL de tampão de hibridação [4X] e 2 µL de água esterilizada. Uma alíquota de 1 µL dessa mistura foi incubada em termociclador a 98°C por 1,5 minutos; b) Mistura da segunda reação de hibridação: as amostras de hibridação 1 e 2 provenientes da primeira reação de hibridação foram misturadas sem serem removidas do termociclador e foi adicionada a essa mistura, simultaneamente, o cDNA *driver* desnaturado (a).

Em seguida, a segunda reação de hibridação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler gradient a 68°C por quatorze horas. Após esse período, foi adicionado ao produto da reação de hibridação 200 µL de tampão de diluição (HEPES-HCl 20 mmol.L<sup>-1</sup> pH 8,3, NaCl 50 mmol.L<sup>-1</sup> e EDTA 0,2 mmol.L<sup>-1</sup> pH 8,0). A mistura foi incubada em termociclador Eppendorf Mastercycler gradiente a 68°C por 7 min e utilizada nas reações de PCR.

Nessa etapa, ocorre a formação de novas moléculas híbridas que consistem nos cDNAs expressos diferencialmente nas plantas doentes (Biblioteca 1) e plantas sadias (Biblioteca 2), apresentando os dois tipos de adaptadores em cada extremidade.

### **3.7.7 Primeira Amplificação do Produto da Hibridação pela Reação em Cadeia da Polymerase**

Os cDNAs expressos diferencialmente nas plantas presentes no produto da segunda reação de hibridação foram amplificados seletivamente por PCR. Na primeira reação de amplificação, apenas os cDNAs dupla fita apresentaram em cada extremidade as seqüências distintas de adaptadores amplificadas exponencialmente. A reação de amplificação foi feita com o produto da segunda reação de hibridação constituído pelo cDNA *tester* subtraído. As seguintes misturas de reação foram preparadas:

a) Mistura para amplificação da amostra subtraída: foram misturados 1  $\mu\text{L}$  de cDNA *tester* proveniente da segunda hibridação, 19,5  $\mu\text{L}$  de água esterilizada, 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão de PCR [10X], 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTPs *Mix* (10  $\text{mmol.L}^{-1}$  cada), 1  $\mu\text{L}$  de PCR *primer* 1 (10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e 0,5  $\mu\text{L}$  de Advantage cDNA Polymerase Mix [50X].

As misturas de reação foram incubadas em termociclador Eppendorf Mastercycler gradiente a 75°C por 5 min para a extensão dos adaptadores. Imediatamente foi realizada a amplificação utilizando-se o programa: 94°C por 25 s, seguido de 27 ciclos de 94°C por 10 s, 66°C por 30 s e 72°C durante 1,5 min. Em seguida, 3  $\mu\text{L}$  de cada produto do primeiro PCR foram misturados com 27  $\mu\text{L}$  de água e as amostras assim diluídas foram utilizadas na segunda reação de amplificação (*Nested* PCR) ou, posteriormente, no procedimento da seleção diferencial. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2%/EtBr em tampão TAE [1X] (dados não mostrados).

### **3.7.8 Segunda Amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase**

Para a segunda reação de amplificação, 1  $\mu\text{L}$  do produto do primeiro PCR diluído, obtido para cada amostra conforme descrito no item 3.7.7., foi

misturado com 18,5 µL de água esterilizada, 2,5 µL de tampão de PCR [10X], 1 µL de *Nested PCR primer 1* (10 µmol.L<sup>-1</sup>), 1 µL de *Nested PCR primer 2R* (10 µmol.L<sup>-1</sup>), 0,5 µL de *dNTP mix* (10 mmol.L<sup>-1</sup>) e 0,5 µL de Advantage cDNA Polymerase Mix [50X].

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se o programa: 18 ciclos de 94°C por 10 s, 68°C por 30 s e 72°C durante 1,5 min em termociclador Eppendorf Mastercycler gradiente. Essa etapa possibilitou um enriquecimento das seqüências de cDNAs expressas diferencialmente.

Os produtos do segundo PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2%/EtBr em tampão TAE [1X].

Em seguida, foram submetidos à clonagem para obtenção da mini-biblioteca de cDNA de genes obtidos de plantas doentes (Biblioteca 1) e de plantas sadias (Biblioteca 2).

Essa hibridação subtrativa foi realizada utilizando-se como amostra *tester* os cDNAs obtidos de plantas doentes (Biblioteca1), os quais foram subtraídos com os cDNAs da planta sadias (cDNAs *driver*). Esse tipo de hibridação é denominado de subtração *forward* (SF). Foi realizada, também, uma hibridação inversa (Biblioteca 2), denominada de subtração *reverse* (SR), em que os cDNAs de plantas sadias foram utilizados como amostra *tester*, sendo subtraídos com os cDNAs da planta doentes, os quais foram utilizados como *driver*.

Para a subtração *reverse*, foram seguidas as mesmas etapas descritas a partir do item 3.7.4., sendo realizada simultaneamente com a subtração *forward*. A realização da subtração reversa é necessária para o procedimento da seleção diferencial.

### **3.7.9 Clonagem do produto final da hibridação subtrativa por supressão no vetor**

O produto do segundo PCR proveniente da SSH *forward e reverse* foi submetido à clonagem no vetor pDrive Cloning Vetor (QIAGEN® PCR Cloning Kit)

A reação de ligação de cada uma das bibliotecas ao vetor foi realizada a 10°C por 16 horas, misturando-se 2 µl da biblioteca (1 e 2) diluída cinco vezes, 2 µl de água deionizada, 1 µl de pDrive Cloning Vetor e 5 µl de Ligation Master Mix 2x<sup>t</sup> (contendo a enzima T4 DNA ligase).

### **3.7.10 Transformação Bacteriana**

O produto da reação de ligação item 3.8. foi utilizado para transformar células competentes das bactérias *E. coli* DH5α™ T1 Phage Resistant (Promega), em que 2 µl do produto da ligação do item 3.7.9. foram misturados com 50 µl de células competentes DH5α™ T1 e colocados em gelo por 20 minutos, logo em seguida, 45 segundos a 42°C e, novamente, 2 minutos no gelo. Em seguida, adicionou-se 0,9 ml de meio SOC e incubou-se por uma hora a 37°C. Logo após a incubação, o plaqueamento foi feito utilizando-se alíquotas de 250 µl de ligação por placa de Petri, contendo 20 ml de meio de cultura Luria-Bertani (LB) + Agar, 40 µl ampicilina [100 µg/ml], 25 µl de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo [40 mg/ml]) e 12 µl de IPTG (isopropil-β-Ditiogalactopiranosídeo, indutor do *operon* Lac de *E. coli* [100 mg/ml]).

Após o plaqueamento, as culturas foram mantidas a 37°C durante 16 horas para permitir o crescimento das colônias bacterianas.

Após esse período, as colônias brancas transformadas foram coletadas com auxílio de palitos esterilizados, sendo transferidas individualmente para

tubos Falcons de 15 ml contendo 2 ml de meio Luria-Bertani (LB líquido) com ampicilina (100 µg/mL). Em seguida, os tubos foram mantidos a 37°C sob agitação durante 18 horas, em agitador orbital ajustado para 300 xg, para possibilitar o crescimento das células de *E. coli*. Em seguida, um estoque de glicerol para culturas individuais dos clones foi feito a partir de 300 µl de suspensão bacteriana misturados com 600 µl de glicerol 10% para serem mantidos em freezer -80 °C.

### **3.7.11 PCR de Colônia para confirmação da ligação e transformação**

Para confirmação da ligação, foram realizadas realizadas reações de PCR de colônias transformadas, utilizando-se o primer M13 Fwr e M13 Ver, que são reconhecidos no vetor pDrive Cloning. Cada reação contendo 15 µl de Mix de PCR (9,5 µl de água estéril, 2 µl de tampão de PCR [10X], 0,5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,6 µl de DNTP [10 mmol.L<sup>-1</sup>], 1 µl primer M13 Fwr, 1 µl primer M13 Rev, 0,4 µl de *Taq* DNA Polimerase [5 U/ml]), foi colocada em contato com o resíduo de um palito de madeira estéril encostado na colônia transformada da placa de Petri.

A reação foi submetida à temperatura de 95°C por 4 min para lise inicial das bactérias, seguido de 95°C por 45 s para desnaturação, 55°C por 45 s para anelamento, 72°C por 1,5 min para extensão, por 40 ciclos, e extensão final a 72°C por 5 min em termociclador Eppendorf Mastercycler gradient. Os produtos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1.5%/EtBr em tampão TAE [1X].

### **3.7.12 Extração dos plasmídeos contendo insertos dos cDNA obtidos**

Os plasmídeos foram extraídos das células bacterianas por lise alcalina, baseando-se em método desenvolvido por Birnboim & Doly (1979).

Após o crescimento das colônias por um período de 16 h (item 3.7.10.), foram retirados 300 µl para o armazenamento permanente da biblioteca (estoque de glicerol) item 3.7.10., e, os 1700 µl restantes foram submetidos à centrifugação por 3 min a 20°C, 10.000 xg, para sedimentação das células bacterianas. Em seguida, o meio de cultura foi descartado e os tubos foram invertidos sobre papel absorvente. As células sedimentadas (pellet) foram ressuspensas em 100 µl de solução I (GET: glucose 50 mM, EDTA 10 mmol.L<sup>-1</sup>, Tris-HCl 25 mmol.L<sup>-1</sup> pH 8,0) e mantidas no gelo. Para a lise celular foram adicionados para cada tubo 200 µl de solução II (880 µl de água, 100 µl de SDS 10% e 20 µl de NaOH 10 mol.L<sup>-1</sup>), misturados por inversão e estocados no gelo. Após resfriamento foram adicionados 150 µl de uma solução de acetato de potássio 3 mol.L<sup>-1</sup> em cada tubo e deixados em gelo por 5 minutos. Essa etapa permite a separação entre o DNA genômico e o DNA plasmidial. Enquanto o DNA genômico é desnaturado e retido no sedimento com os resíduos celulares, o DNA plasmidial permanece solúvel no sobrenadante. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 5 minutos a 20°C. Após centrifugação, o sobrenadante contendo o DNA plasmidial foi transferido para um novo tubo e adicionado 0,9 ml de etanol 95%, invertendo-se os tubos várias vezes e deixando à temperatura ambiente, até que a precipitação se torne visível a olho nu (aproximadamente 3 minutos). Logo após essa precipitação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos a 20°C, para a formação de um pellet de DNA plasmidial e descarte do sobrenadante. Adicionou-se 1 ml de etanol 70% para lavagem do pellet que, após agitação, foi centrifugado a 10.000 g por 2 minutos a 20°C. Descartou-se o sobrenadante e o pellet contendo o DNA plasmidial foi seco totalmente em capela de fluxo laminar, e ressuspensado em 104 µl de solução de RNase (100 µl de TE pH 8,0 e 4 µl de RNase A [10 mg/ml]), seguido de incubação a 37°C por 40 minutos. Uma limpeza do produto foi feita adicionando-se 104 µl de fenol:clorofórmio na

proporção 1:1, e após 5 minutos à temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas 10.000 g por 10 minutos e a fase superior recolhida para um novo tubo. A precipitação desse sobrenadante (fase superior) foi realizada adicionando-se 10 µl de acetato de sódio 3 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,5 e 220 µl de etanol 95%. Centrifugação a 10.000 g por 5 minutos a 20°C. Descartado o sobrenadante adicionou-se ao pellet 0,5 ml de etanol 70%, dissolvido o pellet, nova centrifugação a 10.000 g por 5 minutos a 20°C. Ao término descartou-se o sobrenadante e o pellet foi seco totalmente em capela de fluxo laminar por 15 minutos. Após secagem completa, o pellet foi ressuspenso em 35 µl de água estéril, os DNAs plasmidiais foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1.2%/EtBr em tampão TAE [1X] e armazenados a - 20°C até serem submetidos a sequenciamento.

### **3.7.13 Sequenciamento dos plasmídeos**

Os plasmídeos contendo os insertos de cDNA, extraídos dos clones obtidos, conforme descrito no item 3.7.12., foram seqüenciados em aparelho seqüenciador de DNA, Mega Bace 1000 (AMERSHAM BIOSCIENCES). Para o seqüenciamento, foi utilizado o método enzimático baseado na síntese de DNA *in vitro* na presença de nucleosídeos trifosfatados terminadores de cadeia (Sanger et al., 1977).

Os cDNAs purificados foram amplificados por PCR na presença de DNA polimerase, de um *primer* universal que se anela à seqüência do vetor utilizado para a clonagem, de dNTPs em excesso e de uma pequena quantidade de didesoxirribonucleosídeos trifosfatos terminadores de cadeia (ddNTPs), marcados com substância fluorescente (diclororhodamina ligada à fluoresceína). Quando ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddCTP e ddGTP), os quais não apresentam o grupo 3'-OH da desoxirribose presente em nucleotídeos normais, são aleatoriamente incorporados na cadeia de DNA que está sendo sintetizada, a

adição do nucleosídeo seguinte é bloqueada. Dessa forma, a reação enzimática gera fragmentos de DNA marcados com substância fluorescente, os quais são posteriormente separados por eletroforese e detectados, permitindo a determinação da seqüência completa da fita molde de DNA. O seqüenciamento foi realizado com o kit “Big Dye Terminator” (Applied Biosystems).

Para a reação de seqüenciamento, foram adicionados a uma microplaca para PCR contendo 96 cavidades, 1 µl de cada plasmídeo e 4 µl de “Big Dye Terminator” (DNA polimerase/dNTPs/ddNTPs) diluído [4X] no tampão de seqüenciamento (Tris-HCl 50 mmol.L<sup>-1</sup> e cloreto de magnésio 1,25 mmol.L<sup>-1</sup>), acrescido de 5 picomoles de primer *forward* M13. A reação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler gradient, utilizando-se o seguinte programa: 30 ciclos de 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C durante 1 minuto.

Os produtos amplificados da reação de seqüenciamento foram precipitados, adicionando-se 1 µl de acetato de amônio 7,5 mol.L<sup>-1</sup> às amostras em cada cavidade da microplaca de PCR. Em seguida, adicionaram-se duas vezes o volume com etanol 95%. Posteriormente, as placas foram vedadas com adesivo, agitadas manualmente por inversão, permanecendo à temperatura ambiente por 15 min. Após centrifugação por 45 min a 4.000 xg, 20°C, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram lavados com 100 µl de etanol 70%. As placas foram centrifugadas por 15 min a 4.000 xg, 20°C. Os sobrenadantes foram descartados e as microplacas foram novamente centrifugadas de forma invertida sobre papel absorvente (1.000 xg, 1 min) para remover o excesso de etanol, sendo, em seguida, mantidas a 37°C por 10 min para secagem.

Após adicionar 10 µl de loading solution em cada poço da microplaca, essa foi injetada no Mega Base 1000. Os parâmetros de eletroforese utilizados foram: voltagem de injeção: 2 Kv; tempo de injeção: 80 segundos; voltagem de

corrida: 6 Kv; tempo de corrida: 240 minutos. As sequências foram determinadas utilizando-se o programa Sequence Analyzer.

#### **3.7.14 Análises das Sequências de cDNA em Bancos de Dados**

As seqüências de cDNAs de genes isolados de plantas doentes (Biblioteca 1) e plantas sadias (Biblioteca 2) foram comparadas com aquelas presentes em bancos de dados internacionais “*National Center for Biotechnology Information*”, (NCBI), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A função de cada gene foi detectada por comparação com seqüências homólogas do NCBI, utilizando-se o programa BlastX (Altschul et al., 1997). Após cada seqüência de cDNA isolada de limoeiro ter sido submetida à análise, foi avaliada a relação de seqüências mais similares de genes presentes no GenBank, encontradas pelo programa. Foi atribuída para cada clone de cDNA analisado a função associada à seqüência de maior homologia detectada, sendo referida juntamente com a espécie do organismo utilizado para o isolamento do gene e o respectivo número de acesso do GenBank. O valor de E (“expectation value”), o qual representa a probabilidade de que a homologia encontrada seja devida ao acaso, foi utilizado para indicar a significância da similaridade de seqüência encontrada para cada gene. Nelson et al. (1997) estabeleceram três classes para descrever o nível de significância encontrado para as seqüências expressas, isoladas de *Neurospora crassa* (“expressed sequence tags”, ESTs). As classes foram definidas como: altamente significativas,  $P < 10^{-19}$ ; moderadamente significativas,  $P = 10^{-5}$  a  $10^{-19}$ ; e fracamente significativas,  $P = 10^{-2}$  a  $10^{-4}$ .

Utilizou-se da mesma metodologia acima descrita, com os mesmos valores de probabilidade, quando comparados com sequências do banco de dados do Centro de Citricultura de Cordeirópolis (<http://www.centrodecitricultura.br/>).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Extração de RNA total de raízes limoeiro “Cravo” (*Citrus limonia* L. Osbeck) de plantas saudias e com Declínio

O RNA total de raízes de limoeiro “Cravo” de todas das plantas amostradas foram extraídos pelo método do TRIZOL<sup>®</sup>, de acordo com recomendações do fabricante. Como observado na Figura 3, a presença no gel de duas bandas nítidas representando os RNAs ribossômicos 28S e 18S de célula vegetal mostra que o método do Trizol foi eficiente.

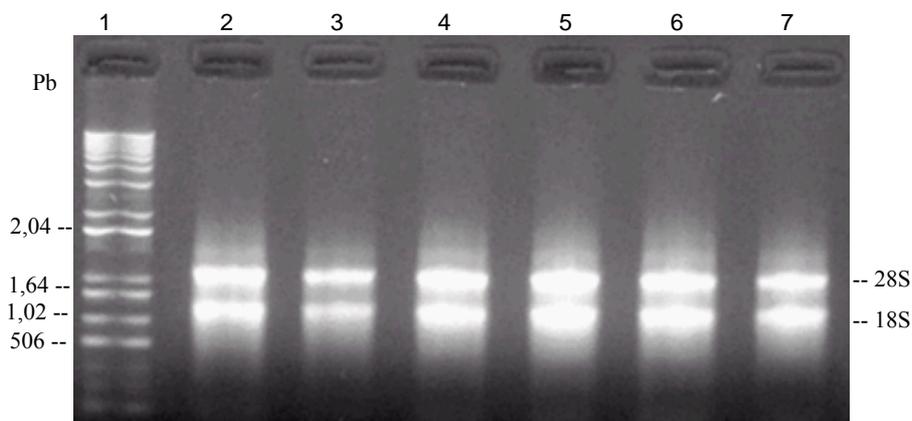


FIGURA 3. Eletroferograma em gel de agarose (1,2 %) de RNA total na concentração média de 1 µg/µl extraído de raízes de plantas saudias e em diferentes estágios da doença. 1: Padrão peso molecular de DNA de 1kb; 2 e 3: doente inicial; 4 e 5: doente final; 6 e 7: sadia

Em seguida, os RNAs foram tratados com Deoxyribonuclease I Amplification Grade (Invitrogen™) para eliminar possíveis contaminações com DNA provenientes do protocolo de extração. Posteriormente, procedeu-se a uma nova corrida eletroforética, para verificar a integridade dos RNAs tratados com DNase (Figura 4).

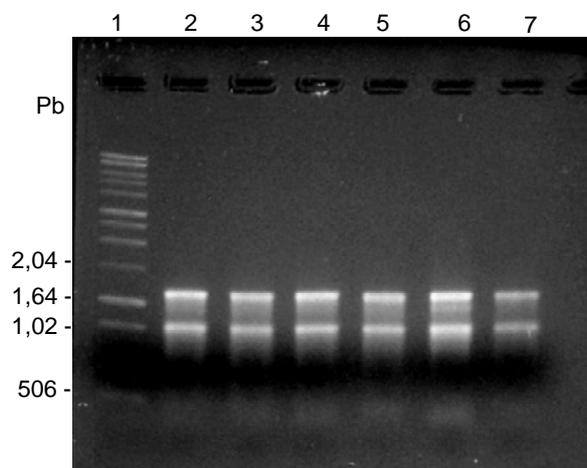


FIGURA 4. Eletroferograma em gel de agarose (1,2 %) de RNA total extraído de raízes de plantas saudáveis e em diferentes estágios da doença, tratados com Deoxyribonuclease I (DNase I) 1: Padrão peso molecular de DNA de 1kb; 2 e 3: doente inicial; 4 e 5: doente final; 6 e 7: saudável.

Após verificar que os RNAs mantiveram sua integridade, procedeu-se ao isolamento da fração mRNA do conteúdo total RNA, utilizando-se o kit Oligotex® Handbook (QIAGEN), de acordo com recomendações do fabricante.

#### **4.2 Obtenção das Bibliotecas Subtrativas Supressivas**

Os mRNAs obtidos foram utilizados na construção de duas bibliotecas Subtrativas Supressiva, em que a primeira biblioteca foi designada como forward (SF) e a segunda, como reverse (SR). Na primeira, utilizaram-se os cDNAs das plantas doentes como tester e os cDNAs das plantas saudáveis como driver, e na segunda biblioteca (SR), o inverso.

Os perfis eletroforéticos dos produtos provenientes da segunda reação da PCR de ambas bibliotecas encontram-se na Figura 5. Foi possível verificar que tanto na subtração forward (SF) quanto na subtração reverse (SR) foram gerados produtos de amplificação, que variaram de tamanho de 100 pb até 1 kb.

Esse resultado era esperado porque os cDNAs dupla-fita sintetizados de ambas as amostras foram digeridos com a enzima de restrição Rsa I, que realiza corte freqüente e geram fragmentos em média, de 500 pb. Isso reduz a complexidade dos fragmentos e gera mais representações de cada cDNA, evitando, dessa forma, que ocorra amplificação de fragmentos pequenos em detrimento dos grandes. Além disso, a cinética de hibridação de fragmentos desse tamanho é mais homogênea. Essa digestão também evita a formação de híbridos complexos entre diversos cDNAs diferentes e, ainda, permite que um mesmo gene seja representado por diversos fragmentos na biblioteca, aumentando a probabilidade de ser clonado.

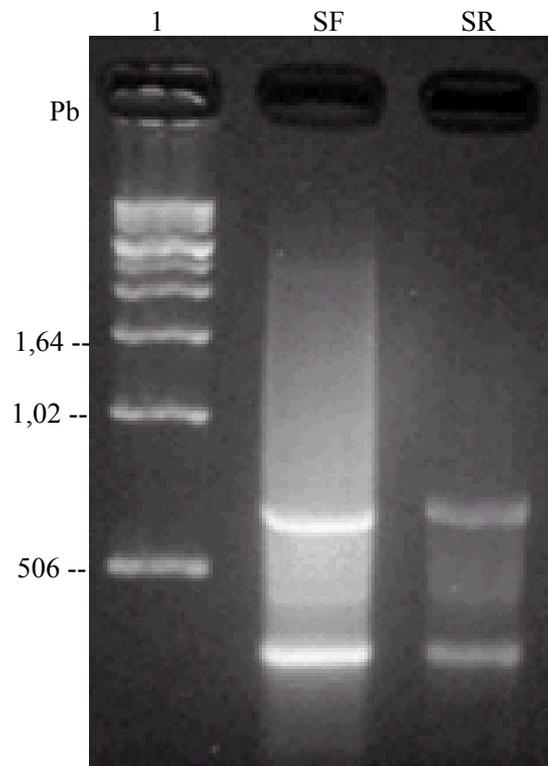


FIGURA 5. Eletroferograma em gel de agarose (2,0 %) de cDNAs obtidos após hibridação subtrativa por supressão (SSH) e segunda amplificação por PCR, provenientes de plantas de limoeiro “Cravo” sob laranja “Pera” com Declínio e sadias, respectivamente. 1: Padrão peso molecular de DNA de 1kb; SF: biblioteca 1 (cDNAs obtidos após subtração doente menos sadia); SR: biblioteca 2 (cDNAs obtidos após subtração sadia menos doente). Foram aplicados no gel 8  $\mu$ L do produto da segunda PCR.

#### 4.3 Transformação bacteriana

Os fragmentos de cDNA obtidos da biblioteca de subtração foram clonados em vetor pDrive Cloning Vetor (QIAGEN<sup>®</sup> PCR Cloning Kit), posteriormente, utilizados para transformar células competentes da bactérias *E.*

*coli* DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> T1 Phage Resistant (Promega). Após plaqueamento em meio seletivo, selecionaram-se 129 clones, sendo 38 clones representando a biblioteca 1 (SF) e 91 clones representando a biblioteca 2 (SR).

A seleção baseou-se na identificação de colônias que apresentaram coloração branca, ou seja, aquelas que possivelmente continham insertos.

As colônias de coloração branca selecionadas da subtração 1 e 2 após plaqueamento foram testadas quanto à presença de inserto utilizando os primers M13 Fwr e M13 Ver, que são reconhecidos no vetor pDrive Cloning.

#### **4.4 Extração de plamideos, sequenciamento e análise de seqüências**

Após verificar em quantificador espectrofotométrico “Gene Quant” AMERSHAM que as amostras apontam DNA, foi realizado eletroforese em gel de agarose para confirmar os resultados; para isso, foram coletados aleatoriamente 9 clones da biblioteca SF e 10 clones da biblioteca SR, como mostrado na Figura 6.

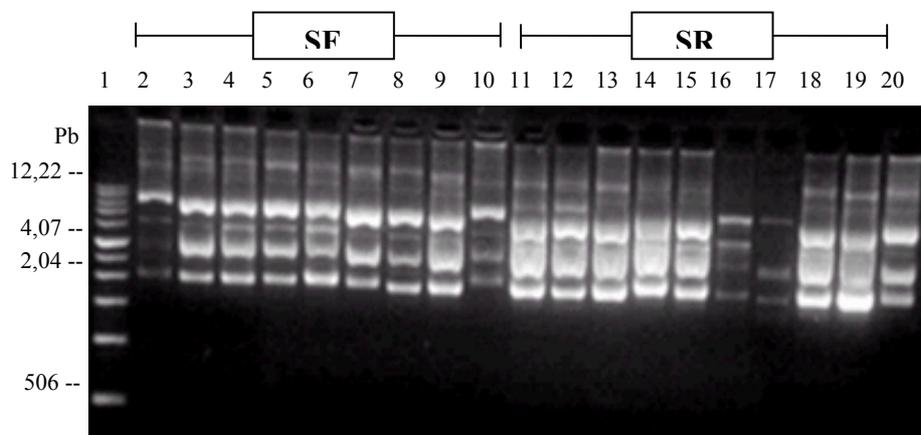


FIGURA 6. Eletroferograma em gel de agarose (1,2 %) da extração de DNA plasmidial para sequenciamento. 1: Padrão peso molecular de DNA de 1kb; canaletas 2 a 20: mini preparação plasmidial para sequenciamento amostrados aleatoriamente das duas bibliotecas subtrativas supressivas (SR e SF).

Foram seqüenciados 129 clones resultantes das duas bibliotecas. Essas seqüências foram analisadas por comparação com sequencias depositadas no banco de dados National Center for Biotechnology Information, (NCBI), utilizando o programa "BLAST X", (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

As seqüências obtidas foram separadas (limpas) do vetor e dos adaptadores usados na subtração e clonagem, utilizando o software VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/>).

#### 4.4.1 Biblioteca enriquecida com genes diferencialmente expresso em plantas apresentando declínio (SF)

Foram obtidos 38 clones, dos quais 16 clones corresponderam a genes cujos produtos apresentam provável associação com a senescência ("putative

senescence-associated proteins”), 7 clones com proteínas LEA (Late Embriogenesis Protein) do tipo deidrina (“LEA dehydrin-like protein”) e 1 clone com a proteína do citocromo P450 tipo TBP (“cytochrome P450 like\_TBP”). Adicionalmente, 6 clones apresentaram similaridade com seqüências depositadas no banco de dados, designadas como proteínas hipotéticas “hypothetical protein”, que correspondem a genes com funções desconhecidas, e 8 clones não apresentaram similaridade com as seqüências presentes nos banco de dados de genes analisados (Tabela 2 e Figura 7)

TABELA 2. Genes expressos em raízes de plantas doentes e ausentes em plantas saudas, gi: gene index indicando nome da EST, a homologia dessa seqüência com o banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Tamanho: tamanho do clone com maior número de nucleotídeos sequenciados, E-value: identidade com seqüências do banco de dados e número de clones. Número de clones identificados com a mesma anotação.

<b>gi</b>	<b>Homologia (NCBI)</b>	<b>Tamanho (bp)</b>	<b>E-value</b>	<b>Nº de ESTs</b>
<a href="#">gi 13359451 dbj BAB33421.1 </a>	proteína provavelmente associada à senescência	861	2e-43	16
<a href="#">gi 82734183 emb CAJ44125.1 </a>	proteína LEA do tipo deidrina	719	1e-06	7
<a href="#">gi 1545805 dbj BAA10929.1 </a>	proteína citocromo P450 tipo TBP	780	9e-20	1
<a href="#">gi 110740129 dbj BAF01964.1 </a>	proteína hipotética	866	3e-15	6
	sem similaridade significativa	643		8

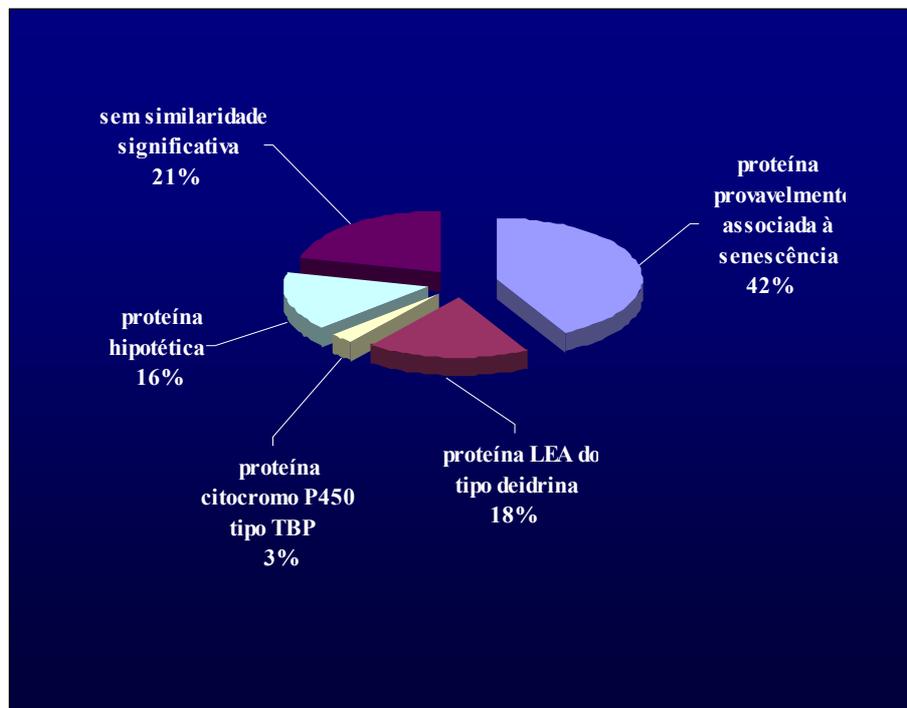


FIGURA 7. Genes isolados por hibridação subtrativa por supressão (SSH), a partir de mRNAs de raiz de limoeiro cravo sob laranja pêra, teoricamente com o Declínio.

#### 4.4.1.1 Genes que codificam para proteínas com provável associada à senescência

Dezesseis clones da biblioteca enriquecida com genes de plantas com declínio apresentaram homologia ou similaridade com proteínas associadas com a senescência. O maior desses clones possui 861 nucleotídeos que, quando traduzidos gera um polipeptídeo de 282 resíduos.

A senescência em plantas está sujeita a ser afetada por uma gama de fatores ambientais e internos, e podem ser mais lenta ou acelerada, dependendo

do fator atuante (Gan & Amasino, 1997; Nooden et al., 1997). Genes que codificam para essas proteínas (“senescence-associated protein”) podem estar envolvidos com a codificação de enzimas de degradação (Drake et al., 1996), com proteínas relacionadas à patogênese (Dopico et al., 1993; Meyer et al., 1996), com proteínas de resposta a estresses (Davies & Robinson, 2000), e/ou estarem envolvidos em translocação de nutrientes (Watanabe et al., 1994).

Pariasca et al. (2001) utilizaram uma biblioteca de cDNA para isolar genes associados com senescência em vagens de ervilha, inclusive o que codifica para as duas enzimas ACC (1-aminociclopropane-1-carboxylate sintase) e ACC oxidase, e mostraram que esses estavam sendo diferencialmente expressos durante o armazenamento das vagens. Nesta biblioteca foi verificado uma mudança dramática na abundância dos níveis deste mRNA durante o armazenamento da vagem. Os mesmos autores sugerem que a progressão de senescência da vagem é provavelmente uma consequência dos efeitos em comuns com os cDNAs senescence-associated diferencialmente expressos.

A síntese de etileno ocorre mediada por duas enzimas: a ACC sintase e ACC oxidase, que catalisam a conversão de etileno. A ACC oxidase (1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase), conhecida previamente como a enzima formadora de etileno, catalisa a última etapa na biossíntese de etileno (Guzzo, 2004).

Segundo alguns autores, o etileno acelera a senescência de frutos não climatéricos (Saltveit, 1999), funcionando como um mediador de resposta para estímulos externos como ferimento e invasão de patógeno (Abeles et al., 1992; Kende, 1993).

Genes de ambas as enzimas foram clonados e caracterizadas de uma gama de tecidos em muitas plantas. A expressão delas foi observada em ervilhas (Peck & Kende, 1998; Peck et al., 1993), em tomate (Barry et al., 1996), melão (Ishiki et al., 2000; Yamamoto et al., 1995) e brócolis, depois da colheita

(Pogson et al., 1995), e toranja, durante o amadurecimento (Davies & Robinson, 2000).

Muitos genes codificadores de proteínas envolvidas com senescência são induzidos nas interações planta-patógeno e são regulados pelo etileno (Guzzo, 2004). A mesma autora, utilizando-se da técnica de hibridação subtrativa supressiva, observou que a expressão de alguns desses genes em determinadas plantas de café, quando tratadas com ácido salicílico para indução de resistência, era independente, mas requeria a ativação da via sinalizadora regulada pelo etileno. Verificou-se também que a síntese desse metabólito poderia ter sido ativada em resposta a inoculação de *H. Vastatrix* um fungo prejudicial à planta.

No caso do Declínio é provável que a expressão diferencial dessas proteínas seja devida ao processo em que ocorre downstream da resposta de defesa, que leva ao próprio Declínio da planta e não como uma resposta inicial a essa anomalia

#### **4.4.1.2 Genes que codificam para proteínas LEA (Late Embriogenesis Abundant) do tipo deidrinas.**

Sete clones da biblioteca SF apresentaram homologia ou similaridade com proteína LEA do tipo desidrina (“LEA dehydrin-like protein”). Dos sete ESTs, o maior clone possui 719 nucleotídeos que, quando traduzidos, gera um polipeptídeo de 239 resíduos. As deidrinas pertencem a uma família de proteínas produzidas em células de plantas em resposta a estímulos ambientais, incluindo estresses abióticos como baixas temperaturas, seca e excesso de salinidade; esse tipo de proteínas é também encontrado em sementes na fase de germinação e maturação do grão de pólen (Close, 1997; Svensson et al., 2002).

Os mesmos autores observaram que seca, resfriamento, salinidade e a aplicação de ABA são alguns fatores que promovem a expressão do gene e a

acumulação de “LEA dehydrin protein”. Segundo Desikan et al. (2000), ferimentos também induzem a expressão desses genes. Plantas transgênicas expressam essas proteínas mostraram-se mais tolerantes ao frio do que os seus tipos selvagens (Hara et al., 2003; Puhakainen et al., 2004).

Algumas deidrinas de citros (Hara et al., 2001), trigo (Houde et al., 1995), e espinafre (Kazuoka & Oeda, 1994) mostraram efeitos crioprotetivos em enzimas sensíveis ao congelamento, como a lactato. Atividade anticongelante também foi demonstrada em deidrina de pêssego (Wisniewski et al., 1999). Neste trabalho, a experiência in vitro indicou que a proteína funcionou como um protetor, reduzindo o grau de dano celular a baixas temperaturas.

Hara et al., (2003) e Hara et al., (2004) informaram que um tabaco transgênico que expressa a proteína LEA do tipo desidrina tem menos peroxidação de lipídeos que o tipo selvagem, quando incubados a baixas temperaturas. Eles também mostraram que essas proteínas tem atividades contra radicais hidroxil e peroxil. Alguns autores sugerem que os radicais hidroxil, que são extremamente citotóxicos, são produzidos durante a resposta das plantas ao estresse hídrico (Iturbe-Ormaetxe et al., 1998).

Um estudo realizado com a proteína de citros LEA do tipo desidrina, obtida através de uma biblioteca de cDNA, concluiu que a atividade antioxidante dessa enzima pode ser discutido de dois aspectos. Uma é o envolvimento na eliminação de radicais que já foram gerados e a outra, na ligação com metais que são fontes para geração desse radical. Os autores relatam que por causa da contração do citoplasma pela falta de água, os metais catalíticos podem produzir mais radicais e, nesse caso, as proteínas cítricas podem reduzir a toxicidade de metais ligando-se a eles, impedindo que formem radicais (Hara et al., 2005).

Essa atividade antioxidante pode ser uma função crucial dessas proteínas porque não só são produzidos pelo resfriamento, mas também por

seca, salinidade e outros estímulos ambientais que geram os radicais em plantas (Iturbe-Ormaetxe et al., 1998; McKersie et al., 1993; Shen et al., 1997).

#### **4.4.1.3 Genes que codificam para proteínas Citocromo P450 tipo TBP**

Um clone da biblioteca SF apresentou homologia ou similaridade com a proteína citocromo P450 tipo TBP “Cytochrome P450 like\_TBP”. Esse EST contendo 780 nucleotídeos parece ser parte de uma ORF (Open Reading Frame) de um gene que codifica para a proteína do tipo citocromo P450 tipo TBP. Essa seqüência parcial foi traduzida em um polipeptídeo de 260 resíduos de aminoácidos de comprimento.

“Cytochrome P450 like\_TBP” está relacionado a proteínas do metabolismo secundário, como manutenção e desenvolvimento celular. Cytochromes P450 incluem uma gama de famílias diferentes, que, por exemplo, podem estar envolvidos na oxidação de diferentes isoflavonóides. Os isoflavonóides representam um grupo de compostos que são produzidos pela maioria das leguminosas em resposta a condições de estresse sofridas pelas plantas. (Dixon & Sumner, 2003).

Liu et al. (2003) reportaram que o citocromo P-450, que funciona como uma hidrolase de isoflavona, teve uma expressão elevada durante a interação de fungos micorrízicos com raízes de plantas. Essas enzimas também têm sido relacionadas à resposta de plantas ao ataque de patógenos e de insetos (Dixon, 1999).

Cytochrome P-450 monooxigenases cataliza reações oxidativas no metabolismo secundário, assim como no metabolismo xenobiótico em plantas superiores (Sugiura et al., 1996). As enzimas monooxigenases do citocromo P450 são as principais enzimas envolvidas na fase inicial (fase I) do metabolismo xenobiótico, muitas vezes referido como uma biotransformação, para distingui-lo do metabolismo intermediário (energia), Além disso, embora o

papel fisiológico dessas enzimas não esteja claro, elas podem ser importantes para remoção de compostos tóxicos endógenos que são gerados durante o metabolismo celular normal. Muitos pesticidas, incluindo os compostos organoclorados e os organofosforados, podem inibir a atividade e/ou alterar a expressão de várias isoformas dessas enzimas (Timbrell, 2000). Sugerindo, assim, que o uso de inseticidas pode inativar essas enzimas, podendo, também, de alguma forma, contribuir para o desenvolvimento de alguma anomalia.

Um xenobiótico é qualquer substância que não tenha sido produzida pelo organismo, tais como os produtos industriais, drogas terapêuticas, aditivos de alimentos, compostos inorgânicos, etc. Ao conjunto de caminhos metabólicos, nos quais os tecidos aumentam a polaridade de um tóxico chama-se biotransformação. Pode-se dizer que a biotransformação de um tóxico consiste fundamentalmente em converter um xenobiótico não-polar em um composto solúvel em água. Esse é o mecanismo mais comum que os organismos usam para eliminar as substâncias tóxicas ambientais. Em alguns casos, a biotransformação resulta na produção de um metabólito que é mais tóxico que o composto original, esse processo denomina-se bioativação. Se estes metabólitos se acumulam e vencem as defesas do organismo, então podem produzir uma lesão que se manifesta por uma resposta tóxica (Timbrell, 2000).

Para estudo dessa proteína, Sugiura et al. (1996) construíram uma biblioteca de cDNA de tabaco. O RNA foi extraído após tratamento das células com 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), que é um indutor de resistência. Foi realizada uma seleção pontual de regiões correspondentes a uma P-450 conhecida (CYP). Seus clones foram designados como cTBP. Pelos resultados, verificou-se que essas proteínas estão relacionadas com a atividade enzimática no metabolismo xenobiótico em plantas superiores.

#### **4.4.2 Biblioteca enriquecida com genes diferencialmente expresso em plantas saudáveis (SF)**

Foram obtidos 91 clones, dos quais 18 clones corresponderam a genes cujos produtos apresentam provável associação com a senescência (“putative senescence-associated proteins”), 13 clones com proteínas LEA (Late Embryogenesis Protein) do tipo desidratina (“LEA dehydrin-like protein”) e 11 clones com a proteína do citocromo P450 tipo TBP (“cytochrome P450 like\_TBP”), 6 clones com a proteína possível germina (“putative germin”), 2 clones com a proteína hidrolase, 2 clones com a proteína ubiquitina, 2 clones com a proteína do tipo metalotioneína (“metallothionein-like”) e 4 clones com a proteína 14-3-3. Adicionalmente, foi verificado também que 8 clones apresentaram similaridade com seqüências depositadas no banco de dados, designadas como proteínas hipotéticas “hypothetical protein”, que correspondem a genes com funções desconhecidas e 25 clones não apresentaram similaridade com as seqüências presentes nos banco de dados de genes analisados (Tabela 3 e Figura 9)

TABELA 3. Genes expressos em raízes de plantas visivelmente saudáveis e ausentes em plantas doentes. gi: gene index indicando nome da EST, a homologia dessa sequência com o banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Tamanho: tamanho do clone com maior número de nucleotídeos sequenciados, E-value: identidade com sequências do banco de dados e número de clones. Número de clones identificados com a mesma anotação.

<b>gi</b>	<b>Homologia (NCBI)</b>	<b>Tamanho (bp)</b>	<b>E-value</b>	<b>Nº de ESTs</b>
<a href="#">gi 13359451 dbj BAB33421.1 </a>	proteína provavelmente associada à senescência	861	2e-42	18
<a href="#">gi 82734183 emb CAJ44125.1 </a>	proteína LEA do tipo deidrina	654	9e-07	13
<a href="#">gi 1545805 dbj BAA10929.1 </a>	proteína citocromo P450 tipo TBP	715	2e-43	11
<a href="#">gi 16225430 gb AAL15887.1 AF417299.1</a>	possível germina	630	1e-06	6
<a href="#">gi 15232958 ref NP_186921.1 </a>	hidrolase	406	4e-08	2
<a href="#">gi 2760345 gb AAB95250.1 </a>	ubiquitina	698	1e-59	2
<a href="#">gi 3308980 dbj BAA31561.1 </a>	proteína do tipo metalotioneína	711	8e-12	2
<a href="#">gi 8099061 gb AAD27824.2 </a>	proteína 14-3-3	611	8e-27	4
<a href="#">gi 89282373 gb EAR81082.1 </a>	proteína hipotética	484	1e-24	8
	sem similaridade significativa	862		25

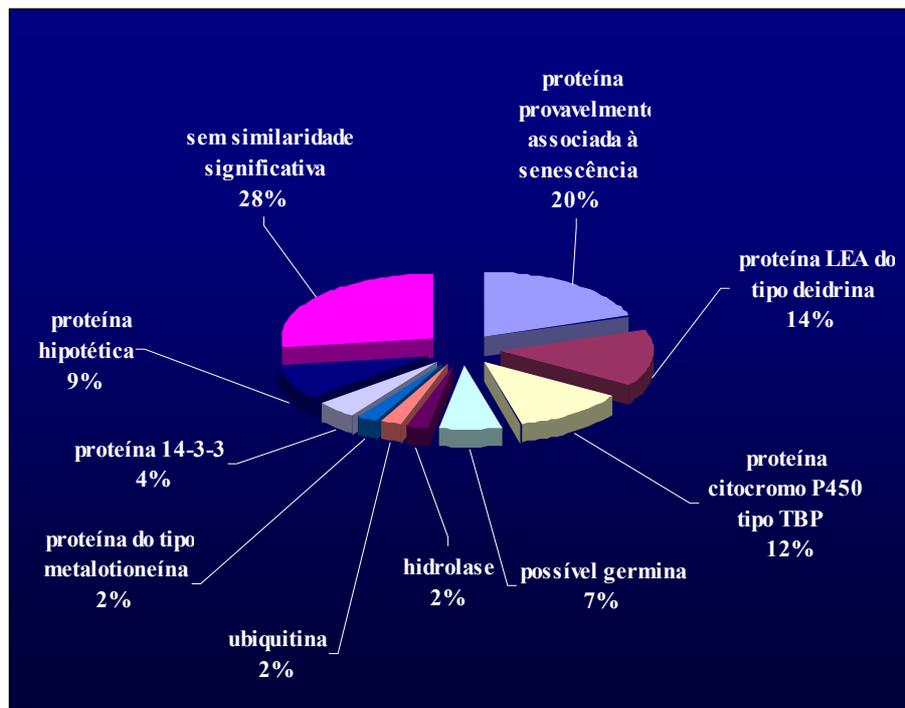


FIGURA 8. Genes isolados por hibridação subtrativa por supressão (SSH), a partir de mRNAs de raiz de limoeiro cravo sob laranja pêra, visualmente sem o Declínio.

#### 4.4.2.1. Genes que codificam para proteínas com provável associação com a germinação “putative germin”

Seis clones da biblioteca SR apresentaram homologia ou similaridade com proteínas cuja provável denominação sejam germininas (“Putative germin”). Dos seis ESTs, o maior clone possui 630 nucleotídeos que, quando traduzidos, resultam em um polipeptídeo de 210 resíduos. Esse tipo de proteínas são altamente encontradas em sementes na fase de germinação .

Em estudo realizado com *Medicago truncatula* colonizadas por micorrizas arbusculares, verificou-se que o gene denominado como MtGlp1 foi altamente induzido em raízes colonizadas pelo fungo *Glomus intraradices*. Embora o gene tenha sido induzido na interação fungo - raiz, nenhum transcrito foi detectado nas raízes não colonizadas ou em raízes infectadas com fungos oomicetos, tipo *Aphanomyces euteiches* ou com *Rhizobium*. Conseqüentemente, indução de MtGlp1 parece ser um fenômeno específico de micorrizas, indicando que a regulação de um membro dessa família de GLP pertencem a um mecanismo conservado dentro em espécies de planta diferentes (Doll et al., 2003).

#### **4.4.2.2 Genes que codificam para hidrolases**

Dois clones da biblioteca SR apresentaram homologia ou similaridade com a proteína hidrolase (“hydrolase”). Dos 2 ESTs, o maior clone possui 406 nucleotídeos e parece ser parte de uma ORF (Open Reading Frame) de um gene que codifica para a proteína do tipo hidrolase. Esta seqüência parcial foi traduzida em um polipeptídeo de 135 resíduos.

Hidrolases são enzimas que promovem a cisão de uma molécula orgânica mediante a utilização de água. As referidas enzimas catalizam também a hidrólise dos polímeros  $\beta$ -1,3-glucana e quitina, componentes principais das paredes celulares de muitos fungos, podendo apresentar atividade antimicrobiana (Guzzo, 2004).

Essas hidrolases detectadas em várias plantas após o contato com patógeno, metabólitos provenientes de microorganismos ou substâncias químicas que agem como indutores de resistência, têm sido associadas aos mecanismos de defesa de planta contra fitopatógenos (Stangarlin & Pascholati, 2000).

Estudo desenvolvido anteriormente com os aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra ferrugem isolou, por meio da construção de uma biblioteca subtrativa supressiva, genes codificadores de proteínas relacionadas ao sistema de resistência adquirida. Pelos resultados, infere-se que o aumento da expressão desses genes e, conseqüentemente, da atividades dessas hidrolases está relacionado com a resistência local e sistêmica, induzida por acibenzolar-S-metil em cafeeiro contra ferrugem (Guzzo, 2004). A mesma autora sugere que o aumento da expressão dessas enzimas com a indução de resistência, observada em diferentes interações hospedeiro-patógeno, indica que essas hidrolases podem desempenhar um papel relevante na restrição do desenvolvimento de fitopatógenos nas plantas previamente tratadas com indutores de resistência.

#### **4.4.2.3 Genes que codificam para ubiquitinas**

Dois clones da biblioteca SR apresentaram homologia ou similaridade com a proteína ubiquitina. Dos 2 ESTs, o maior clone possui 698 nucleotídeos parece ser parte de uma ORF (Open Reading Frame) de um gene que codifica para a proteína do tipo ubiquitina. Esta seqüência parcial foi traduzida em um polipeptídeo de 232 resíduos.

A ubiquitina é uma proteína pequena com apenas 76 aminoácidos, mas extremamente importante, pois age como uma etiqueta pela qual a maquinaria de proteína-transporte transporta uma proteína ao proteossomo visando à degradação (Ciechanover, 2004).

A proteína selecionada para degradação na célula vegetal é ligada à ubiquitina por meio da ação de ubiquitina ligases. A proteína marcada com ubiquitina é, então, reconhecida e degradada no proteossomo. A proteólise dependente de ubiquitina/proteossomo não é necessária apenas para a degradação de proteínas mal formadas ou danificadas e para proteínas funcionais

que não são mais necessárias para a célula, mas também é requerida, em outros processos, como por exemplo, na morte celular e na regulação da expressão gênica através do controle de fatores de transcrição específicos (Guzzo, 2004).

Essa proteína também foi encontrada em estudo realizado na Flórida em plantas com o Declínio dos Citros (Carlos, 2004). Uma biblioteca subtrativa supressiva foi construída, e o autor sugeriu que esta proteína estava relacionada com o processo de ubiquitinação de proteínas e regulação do ciclo da célula, e que o clone encontrado diferencialmente expresso em plantas doentes poderia funcionar no processo de ubiquitinação selecionando as proteínas para a degradação e/ou prejudicando o ciclo normal das células das plantas afetadas.

Em cafeeiro, foram detectados genes que apresentaram similaridade com ubiquitina pela técnica SSH, após induzidos com indutor de resistência ASM (acibenzolar-S-metil) e inoculados com *Hemileia vastatrix*, indicando que pode ter sido ativado na resistência induzida em planta suscetível. Porém o codificador de ubiquitina, envolvida na degradação controlada de proteínas, hibridizaram com a sonda controle proveniente de plantas não inoculadas. O estudo de expressão revelou algumas diferenças, que podem estar relacionadas com mecanismos distintos de resistência ativados nessas interações. O complexo proteossomo/ubiquitina pode desempenhar um papel importante na indução de respostas de defesa e na expressão da SAR em plantas, e genes envolvidos na degradação controlada de proteínas podem exercer um controle na expressão de genes relacionados à resistência, por exemplo, realizando a proteólise de inibidores da ativação de vias sinalizadoras de defesa (Guzzo, 2004).

A ubiquitina foi induzida, também, em cultura de células de soja em suspensão, quando tratadas com elicitor proveniente de fungo ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Levine et al., 1994).

#### **4.4.2.4 Genes que codificam para proteínas do tipo metalotioneína**

Dois clones da biblioteca SR apresentaram homologia ou similaridade com a proteína do tipo metalotioneína (“metallothionein-like”). Dos 2 ESTs, o maior clone possui 711 nucleotídeos e parece ser parte de uma ORF (Open Reading Frame) de um gene que codifica para a proteína do tipo “metallothionein-like”. Esta seqüência parcial foi traduzida em um polipeptídeo de 237 resíduos.

A metalotioneína é uma proteína intracelular não-enzimática, que contém 60 a 68 aminoácidos e apresenta alto conteúdo de cisteína e capacidade de ligação a vários metais pesados, podendo apresentar uma função na destoxificação celular. Todos os 7 átomos de zinco presentes na proteína, estão ligados nestas moléculas de cisteínas. Elas participam na captação, transporte, e regulação de zinco em sistemas biológicos. Metalotioneína também leva íons de zinco (sinais) de uma parte para outra da célula. Quando zinco entra em uma célula, pode ser capturando através da thionein (que se torna "metallothionein") e o levando para outra parte da célula onde é disponibilizado para outra organela ou proteína, deste modo o thionein-metallothionein se torna um componente fundamental do zinco que sinaliza sistemas em células (Maret, 2000).

Metalotioneína desintoxica mercúrio e metais pesados, ligando-se ao metal antes que o mesmo possa causar dano. Forma inclusões subcelulares ou cristais, nos quais estas podem acumular dentro de tecidos (Maret, 2000).

Em um estudo realizado com limão Rugoso sob laranja Valência por Carlos (2004) demonstrou-se, pela construção de uma biblioteca subtrativa supressiva enriquecida com cDNAs de plantas com Declínio dos Cítricos, a expressão diferencial dessa proteína em plantas com alto grau de Declínio.

Já Guzzo (2004), também construindo uma biblioteca subtrativa supressiva de plantas de café tratados com indutor de resistência (acibenzolar-S-metil, ASM), encontrou essa proteína; entretanto, todos os clones encontrados

para essa proteína não foram diferencialmente expressos nas plantas induzidas à resistência com ASM, pois também foram encontrados em plantas não tratadas com ASM.

Segundo Harra (2005), metallothionein não são só proteínas que se ligam a metais, mas também são antioxidantes em plantas, reduzindo a dano de oxidação induzido em plantas por estresses ambientais abióticos.

#### **4.4.2.5 Genes que codificam para proteínas 14-3-3**

Quatro clones da biblioteca SR apresentaram homologia ou similaridade com a proteína 14-3-3 (“14-3-3-like protein”). Dos quatro ESTs, o maior clone possui 611 nucleotídeos parece ser parte de uma ORF (Open Reading Frame) de um gene que codifica para a proteína do tipo 14-3-3. Esta seqüência parcial foi traduzida em um polipeptídeo de 203 resíduos.

Proteínas 14-3-3 são uma família de moléculas reguladoras conservadas, com 9 a 10 domínios do tipo  $\alpha$ -hélice. Expressas em todas as células eucariotas, têm a habilidade de si ligar a uma gama de proteínas sinalizando o funcionamento dessas, por sua natureza anfipática, resultando em várias isoformas. Algumas são induzidas por patógenos, outras por baixas temperaturas e até por altas concentrações salina (Lapointe, 2001). Essa família de proteína está relacionada com rotas de sinais de transdução de sinais em resposta a estresses.

Uma função dessa proteína está na associação com fatores de transcrição que regulam transcrição de um gene. A interação com proteínas quinases é um mecanismo pelo qual proteínas 14-3-3s desenvolvem muitas funções. Igualmente a associação dessas proteínas com o fator de ligação G-box sugere seu provável envolvimento diretamente na regulação transcricional (Kuramae, 2001).

Em estudo realizado em cana-de-açúcar, demonstrou-se que as proteínas 14-3-3 foram expressas em todas as bibliotecas de cDNAs obtidas a partir de órgãos diferentes de plantas (meristema, calo, flor, broto, folhas, raiz, talo, semente) e bem como de plântulas infetadas com bactérias (Kuramae, 2001).

Outro estudo com essa família de genes foi realizado para entender seu papel na defesa da planta contra patógenos. Uma biblioteca de cDNAs de plantas do gênero *Populus* foi construída de folhas cortadas e simuladas com ataques de patógenos. A presença do gene codificador para a proteína da família 14-3-3 foi confirmada. E a expressão deste na folha foi relacionada com a resposta contra patógeno (Lapointe, 2001).

Esses genes também foram encontrados em *Citrus unshiu* uma espécie de citros tolerante ao frio (-10 °C). A técnica de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) foi utilizada para estudo de expressão de estes genes sob condições de baixa temperatura confirmando sua expressão diferencial nestas condições (Lang et al., 2005).

Analisando as duas bibliotecas obtidas no presente trabalho, verificou-se que a maioria dos clones obtidos apresenta homologia com as seqüências depositadas no banco de dados do Centro de Citricultura em Cordeirópolis, SP (<http://citeste.centrodecitricultura.br>). Esses genes apresentaram diferentes níveis homologias com clones de diferentes bibliotecas presentes nesse banco de dados, como por exemplo, bibliotecas obtidas a partir de casca de caule de citros, induzido por fermento (TS27-C2-300-012-D03-CT.F, com identidade de 97% e e-value igual a  $5e^{-38}$ ), do estadio 2 da biblioteca de frutos de tangerina (CR05-C3-702-100-F11-CT.F, com identidade de 95% e e-value de  $3e^{-86}$ ), biblioteca de sementes em papel de germinação de *Poncirus trifoliata* (PT11-C9-005-012-G08-CT.F, com identidade de 90% e e-value de  $5e^{-52}$ ), *C. limonia cravo* biblioteca de raiz sob estresse hídrico (CL06-C4-500-045-G01-CT.F, com identidade de 90% e e-value de  $5e^{-20}$ ).

#### **4.5 Diferenciação dos Perfis Protéicos de Plantas Sadias e Doentes**

A classificação das plantas em termos de nível de incidências da anomalia foi feita baseando-se no teste da seringa, por meio do qual se tentou injetar 10 mL de água durante o período de 30 segundos. Aquelas plantas que conseguiram absorver esse conteúdo no prazo mencionado foram classificadas como sadias. As plantas que absorveram apenas uma pequena quantidade foram classificadas como no estágio inicial e aquelas que não absorveram nada, foram identificadas como no estágio final da anomalia (Tabela 1).

Na análise eletroforética das proteínas totais presentes nos vasos xilemáticos das raízes (dados não mostrados) observou-se a presença das proteínas 23 e 26 KDa no perfil protéico de todas as plantas utilizadas neste experimento. Isto sugeriu que possivelmente todas as plantas amostradas encontravam-se afetadas pela anomalia, divergindo do teste da seringa segundo o qual determinadas plantas testadas estavam na condição de sadias no momento da coleta. Uma possível explicação pelos resultados divergentes entre os dois métodos utilizados reside na precocidade e maior sensibilidade de diagnose possibilitada pela análise do perfil protéico, como relatado em trabalhos anteriores (Barrios et al., 2006; Paiva, 1993; Paiva, 1997).

## 5 CONCLUSÕES

Estudos moleculares que utilizam duas bibliotecas subtraídas contendo um total de 129 clones de cDNA e obtidas pela técnica de hibridação subtrativa por supressão (SSH) permitiram a identificação de genes diferencialmente expressos na resposta ao Declínio dos Citros.

Foram isolados genes apresentando funções similares relacionadas a proteínas denominadas de proteína provavelmente associada à senescência, proteína LEA do tipo deidrina, proteína citocromo P450 tipo TBP, possível germina, proteína do tipo metalotioneína, hidrolase, ubiquitina, proteína 14-3-3 e também aquelas com funções hipotéticas e as que não tiveram nenhuma similaridade com proteínas depositadas em banco de dados

As informações obtidas no presente trabalho constituem um importante subsídio para o melhor entendimento da resposta das plantas ao Declínio dos Citros. Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmar sua expressão diferencial (como, por exemplo, qRT-PCR), bem como para elucidar a possível função desses genes. Com base nessas informações poderão ser realizados estudos mais detalhados usando esses genes como alvos, como, por exemplo, estudos nos quais se objetiva verificar sua expressão temporal (diferentes estágios do Declínio), estudos com diferentes variedades e/ou a associação enxerto - porta-enxerto, bem como estudos mais específicos visando a entender sua função quando silenciados ou superexpressados em plantas.

Adicionalmente, uma vez realizados estudos anteriores, a associação dos genes obtidos os resultados obtidos também podem auxiliar o desenvolvimento de novas estratégias visando ao controle do Declínio, como, por exemplo, o desenvolvimento de métodos de detecção precoce de plantas doentes baseados na expressão de genes, ou o uso dos genes identificados para a obtenção de

plantas mais tolerantes a essa anomalia. Nesse último caso, a seleção assistida por marcadores gerados a partir dos genes identificados e a obtenção de plantas transgênicas superexpressando algum desses genes mostram-se como duas possíveis alternativas.

Também se pode concluir que plantas visivelmente sadias podem, na verdade, estar em estados iniciais do Declínio, e ainda discutir sobre os métodos que são usados para detectar precocemente o Declínio com um possível marcador gerado a partir de resultados como os obtidos neste trabalho.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT, M. E. Ethylene in plant biology. 2. ed. London: Academic Press, 1992.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, Sept. 1997.
- ANDERSON, C. M. A situação dos porta-enxertos na Argentina. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITRUS, 1. 1990, Bebedouro. **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, 1990. p. 23-28.
- ANDERSON, C. A. Effect of trunk girdling, root pruning, and blight on sweet orange fruit quality and leaf mineral composition. **Hortscience**, Alexandria, v. 15, p. 395, 1980.
- AZEVEDO, F. A de. **Transformação genética de citros com os gene bacteriopsina (bO), cecropina e Gus**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2005. 76 p.
- BALDASSARI, R. B.; GOES, A. de; TANNURI, F. Declínio dos citros: algo a ver com o sistema de produção de mudas cítricas?. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 357-360, ago. 2003.
- BARRIOS, S. C. L.; TEIXEIRA, J. E.; AZEVEDO, S. M.; CAMPUS, M. A.; PAIVA, V. L. Obtenção de Anticorpos Policlonais Contra Proteínas Presentes em Plantas Afetadas pela Anomalia Declínio dos Citros. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 1013-1016, set./out. 2006.
- BARRY, C. S.; BLUME, B.; BOUZAYEN, M.; COOPER, W.; HAMILTON, A. J.; GRIERSON, D. Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. **Plant Journal**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 525-535, Apr. 1996.
- BERGUER, R. D. A. Causa e o controle do Declínio dos Citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 19, n. 1, p. 79-90, 1998.

BIRCH, P. R. J.; AVROVA, A. O.; DUNCAN, J. M.; LYON, G. D.; TOTH, R. L. Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 12, n. 4, p. 356-361, Apr. 1999.

BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

CARLOS, E. F. **Transcriptional Profiling On Trees Affected By Citrus Blight And Identification Of An Etiological Contrast Potentially Associated With The Disease**. University Of Florida, 2004. 103 p.

CARLOS, E. F.; STUCHI, E. S.; DONADIO, L. C. **Porta-enxertos para a citricultura paulista** Jaboticabal: Funep, 1997. 47 p. (Boletim citrícola, n. 1).

CASTRO, P. R. C. Declínio: uma anomalia fisiológica dos citros. **Revista Laranja**, Cordeirópolis, v. 12, n. 2, p. 381-400, 1991.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.

CIECHANOVER, A. "The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life". **EMBO Journal**, 17, p. 7151-7160, 2004.

CLOSE, T J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. **Physiologia Plantarum**, Rockville, v. 100, p. 291-296, 1997.

COHEN M. Diagnosis of young tree decline, blight and sand hill decline of citrus by measurement of water uptake using gravity injection. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 58, n. 9, p. 801-805, Sept. 1974.

DAVIES, C.; ROBINSON, S. P. Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grapefruit ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 3, p. 803–812, Mar. 2000.

DELLAGI, A.; HEILBRONN, J.; AVROVA, A. O.; MONTESANO, M.; PALVA, E. T.; STEWART, H. E.; TOTH, I. K.; COOKE, D. E. L.; LYON, G. D.; BIRCH, P. R. J. A potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Phytophthora infestans* and is coregulated with class I endochitinase expression. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 13, n. 10, p. 1092-1101, Oct. 2000.

DERRICK, K. S.; LEE, R. F.; BRLANSKY, R. H.; TIMMER, L. W.; HEWITT, G. G.; BARTHE, G. A. Proteins associated with citrus blight. **Plant Disease**, St. Paul, v. 74, n. 2, p. 168-170, Feb. 1990.

DESIKAN, R.; NEILL, S.J.; HANCOCK J.T. Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v. 28, n. 5, p. 773–778, Mar. 2000.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y. F. C.; CAMPBELL, A. P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E. D.; SIEBERT, P. D. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 12, p. 6025-6030, June 1996.

DIXON, R. A. Isoflavonoids: biochemistry, molecular biology and biological functions. In: SANKAWA, U. (Ed.). **Comprehensive natural products chemistry**. Oxford: Elsevier, 1999. v. 1, p 773-823.

DIXON, R. A.; SUMNER, L. W. Legume natural products. Understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, n. 3, p. 878-885, Mar. 2003.

DOLL, J.; HAUSE, B.; DEMCHENKO, K.; PAWLOWSKI, K.; KRAJINSKI, F. A member of the germin-like protein family is a highly conserved mycorrhiza-specific induced gene. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 44, n.11, p. 1208–1214, Nov. 2003.

DOPICO, B.; LOWE, A. L.; WILSON, I. D.; MERODIO, C.; GRIERSON, D. Cloning and characterization of avocado fruit mRNAs and their expression during ripening and low-temperature storage. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 21, n. 3, p. 437–449, Feb. 1993.

DRAKE, R.; JOHN, I.; FARREL, A.; COOPER, W.; SCHUCH, W.; GRIERSON, D. Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 30, n. 4, p. 755-767, Feb. 1996.

FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION – FAO. **Statistical** – database. 2006. Disponível em: <[www.apps.fao.org](http://www.apps.fao.org)>. Acesso em: 03 nov. 2006.

GAN, S.; AMASINO, R. M. Making sense of senescence –Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, n. 2, p. 313-319, Feb. 1997.

GEPSTEIN, S.; SABEHI, G.; CARP, M.; HAJOUJ, T.; NESHER, M. F. O.; YARIV, L.; DOR, C.; BASSANL, M. Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. **The Plant Journal**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 629-642, Dec. 2003.

GIROTO, E. J. **Correlações de nutrientes em tecidos de laranjeiras (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Valencia) e o declínio dos citros**. 1990. 77 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura de Lavras. Lavras, MG.

GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. Protoplast fusion and *Citrus* improvement. **Plant Breeding Reviews**, New York, v. 8, p. 339-374, 1990.

GUZZO, S. D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. Piracicaba, 2004. 236 p.

HARA, K. T.; ODA, S.; NAITO, K.; NAGATA, M.; SCHULTZ, R. M.; AOKI, F. Cyclin A2–CDK2 regulates embryonic gene activation in 1-cell mouse embryos. **Developmental Biology**, San Diego, v. 286, n. 1, p. 102–113, Oct. 2005.

HARA, M.; FUJINAGAS, M.; KUBOI, T. Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. **Plant Physiology Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 7/8, p. 657-662, July/Aug. 2004.

HARA, M.; TERASHIMA, S.; FUKAYA, T.; KUBOI, T. Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. **Planta**, Berlin, v. 217, n. 2, p. 290-298, June 2003.

HARA, M.; TERASHIMA, S.; KUBOI, T. Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from Citrus unshiu. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 158, n. 10, p. 1333-1339, Oct. 2001.

HOUDE, M.; DANIEL, C.; LACHAPPELLE, M.; ALLARD, F.; LALIBERTE, S.; SARHAN, F. Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. **The Plant Journal**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 583-593, Oct. 1995.

ISHIKI, Y.; ODA, A.; YAEGASHI, Y.; ORIHARA, Y.; ARAI, T.; HIRABAYASHI, T.; NAKAGAWA, H.; SATO, T. Cloning of an auxin-responsive 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (CMe-ACS2) from melon and their expression of ACS genes in etiolated melon seedling and melon fruit. **Plant Science**, Clare, v. 159, n. 2, p. 173-181, Nov. 2000.

ITURBE-ORMAETXE, I.; ESCUREDADO, P. R.; ARRESE-IGOR, C.; BECANA, M. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 1, p. 173-181, Jan. 1998.

KAZUOKA, T.; OEDA, K. Purification and characterization of COR85-oligomeric complex from cold-acclimated spinach. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 35, n. 4, p. 601-611, June 1994.

KENDE, H. Ethylene biosynthesis. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 44, p. 283-307, 1993.

KURAMAE, E. E.; FENILLE, R. C.; R. JR, V. E. Identification of 14-3-3-like protein in sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 1/4, p. 43-48, Dec. 2001

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANG, P.; ZHANG, C.; EBEL, R. C.; DANE, F.; DOZIER, W. A. Identification of cold acclimated genes in leaves of *Citrus unshiu* by mRNA differential display. **Gene**, Amsterdam, v. 359, n. 10, p. 111-118, Oct. 2005.

LAPOINTE, G.; LUCKEVICH, M. D.; CLOUTIER, M.; SÉGUIN, A. 14-3-3 gene family in hybrid poplar and its involvement in tree defence against pathogens. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 359, p. 1331-1338, June 2001.

LEE, R. F.; MARAIS, J. F.; TIMMER, L. W.; GRAHAM, J. H. Syringe injection of water in to the trunk. A rapid diagnostic test for citrus blight. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, n. 6, p. 511-513, June 1984.

LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.; LAMB, C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, Cambridge, v. 79, n. 4, p. 583-593, Nov. 1994.

LIU, J.; BLAYLOCK, L. A.; ENDRE, G.; CHO, J.; TOWN, C. D.; VANDENBOSCH, K. A.; HARRISON, M. J. Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 9, p. 2106–2123, Sept. 2003.

MAHALINGAM, R.; GOMEZ-BUITRAGO, A.; ECKARDT, N.; SHAH, N.; GUEVARA-GARCIA, A.; DAY, P.; RAINA, R.; FEDOROFF, N. Y. Characterization the stress/defense transcriptome of *Arabidopsis*. **Genome Biology**, London, v. 4, n. 3, p. 1-14, 2003.

MARAIS, L. J.; LEE, R. F. Experimental transmission of citrus blight in South Africa. In: **International organization of citrus virologists**. California: University of California, 1990. p. 261-264.

MARET, W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, n. 5, p. 1455-1458, May 2000. Supplement.

MCKERSIE, B.D.; CHEN, Y.; DE BEUS, M.; BOWLEY, S. R.; BOWLER, C.; INZE, D.; D'HALLUIN, K.; BOTTERMAN, J. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, n. 4, p. 1155-1163, Dec. 1993.

MEYER, B.; HOULNE, G.; POZUETA-ROMERO, J.; SCHANTZ, M.; SCHANTZ, R. Fruit-specific expression of a defensin gene family in bell pepper. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, n. 2, p. 615–622, Oct. 1996.

MULLER, I. A.; BISO, L. Situação dos porta-enxertos no Uruguai. SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITRUS-PORTA-ENXERTADOS, 1., 1990, Bebedouro. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1990. p. 29-41.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 2006

NELSON, M. A.; KANG, S.; BRAUN, E. L.; CRAWFORD, M. E.; DOLAN, P. L.; LEONARD, P. M.; MITCHELL, J.; ARMIJO, A. M.; BEAN, L.; BLUEYES, E.; CUSHING, T.; ERRET, A.; FLEHARTY, M.; GORMAN, M.; JUDSON, K.; MILLER, R.; ORTEGA, J.; PAVLOVA, I.; PEREA, J.; TODISCO, S.; TRUJILLO, R.; VALENTINE, J.; WELLS, A.; WERNER-WASHBURNE, M.; YAZZIE, S.; NATVIG, D. Expressed sequences from conidial, mycelial and sexual stages of *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 21, n. 3, p. 348-363, June 1997.

NOODEN, L.; GUIAMET, J. J.; JOHN, I. Senescence mechanisms. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 101, n. 4, p. 746-753, Dec. 1997.

PAIVA, L. V. **Alterações protéicas e nutricionais em tecidos de plantas afetadas pelo declínio dos citros**. 1993. 76 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

PAIVA, L. V. **Marcadores bioquímicos para o declínio dos citros**. 1997. 69 p. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PARIASCA, J. A. T.; SUNAGA, A.; MIYAZAKI, T.; HISAKA, H.; SONODA M.; NAKAGAWA, H.; SATO, T. Cloning of cDNAs encoding senescence-associated genes, ACC synthase and ACC oxidase from stored snow pea pods (*Pisum sativum* L. var. *saccharatum*) and their expression during pod storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 239-247, July 2001.

PECK, S. C.; KENDE, H. Differential regulation of genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase in etiolated pea seedling: effects of indole-3-acetic acid, wounding, and ethylene. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 38, n. 6, p. 977-982, Dec. 1998.

PECK, S. C.; OLSON, D. C.; KENDE, H. A cDNA sequence encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from pea. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, p. 689-690, 1993.

POGSON, B. J.; DOWNS, C. G.; DAVIES, K. M. Differential expression of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes in broccoli after harvest. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, n. 2, p. 651–657, Feb. 1993.

POMPEU JÚNIOR, J. Rootstocks and scions in citriculture of the São Paulo State. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF CITRUS NURSERYMEN, 6., 2001, Ribeirão Preto. **Proceedings...** Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura, 2001. p. 75-82.

PRATES, H. S.; GUIRADO, N.; MÜLLER, G. W.; Declínio dos citros no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, n. 5, p. 195-222, 1984.

PUHAKAINEN, T.; HESS, M. W.; MAKELA, P.; SVENSSON, J.; HEINO, P.; PALVA, E. T. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 54, n. 5, p. 743–753, Mar. 2004.

ROSSETTI, V. Clorose Variegada dos Citros (CVC). In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A. A. (Coord.). **Citricultura brasileira**. Campinas, 1991. v. 2, p. 715-720.

ROSSETTI, V. **Manual ilustrado de doenças dos citros: doenças de causas desconhecidas**. Piracicaba: Fealq/Fundecitrus, 2001. 270 p.

SALTVEIT, M. E. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. **Postharvest Biology Technology**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 279–292, Mar. 1999.

SANCHEZ-BALLESTA, M.; LLUCH, Y.; GOSALBES, M. J.; ZACARIAS, L.; GRANELL, A.; LAFUENTE, M. T. A survey of genes differentially expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in citrus fruit. **Planta**, Berlin, v. 21, n. 1, p. 65-70, Nov. 2003. Supplement.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, June 1977.

SONODA, R. M.; PELOSI, R. R.; HEBB, J. W. Comparing Rio Grande gummosis and citrus blight incidence on grapefruit on Swingle citrumelo rootstock. **Proceeding of the Florida State Horticultural Society**, Winter Haven, v. 105, p. 28-32, 1992.

SHEN B, JENSEN RG, BOHNERT HJ. Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. **Plant Physiology**, Rockville, v. 115, n. 2, p. 527-532, Oct. 1997.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOTATI, S. F. Atividade de ribulose-1, 5-bifosfatocarboxilase-oxigenase (Rubisco), clorofilase,  $\beta$ -1, 3-glucanase e quitinase e conteúdo de clorofila em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) infectados com *Uromyces appendiculatus*. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 34-42, jan./mar. 2000.

SUGIURA, M.; SAKAKI, T.; YABUSAKI, Y.; OHKAWA, H. Cloning and expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* of a novel tobacco cytochrome P-450-like cDNA. **Biochimica et Biophysica Acta**, Paris, v. 1308, n. 3, p. 231-240, Sept. 1996.

SVENSSON, J.; ISMAIL, A. M.; PALVA, E. T.; CLOSE, T. J. Dehydrins. In: STOREY, K. B.; STOREY, J. M. (Ed.). **Sensing, signaling and cell adaptation**. Amsterdam: Elsevier, 2002. p. 155-171.

SWINGLE, W. T.; WEBBER, H. J. **The principal diseases of citrus fruits in Florida**. Washington: USDA. Government Printing Office, 1896. 50 p. (Bulletin, 8).

TAKEMOTO, D.; YOSHIOKA, H.; DOKE, N.; KAWAKITA, K. Disease stress-inducible genes of tobacco: expression profile of elicitor-responsive genes isolated by subtractive hybridization. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 118, n. 4, p. 545-553, Aug. 2003.

TIMBRELL, J. **Principles of biochemical toxicology**. 3. ed. London: Taylor & Francis, 2000.

TUBELIS, A.; PRATES, H. S.; SALIBE, A. A. Comportamento do declínio nos pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 1, n. 9, p. 187-199, 1988.

VEDOY, C. G.; BENGTON, M. H.; SOGAYAR, M. C. Hunting for differentially expressed genes. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 7, p. 877-884, July 1999.

WATANABE, A.; HAMADA, K.; YOKOI, H.; WATANABE, A. Biphasic and differential expression of cytosolic glutamine synthase genes of radish during seed germination and senescence of cotyledons. **Plant Molecular Biology**, Dordrech, v. 26, n. 6, p. 1807-1817, Dec. 1994.

WATT, D. A. Aluminium-responsive genes in sugarcane: identification and analysis of expression under oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 385, p. 1163-1174, Apr. 2003.

WISNIEWSKI, M.; WEBB, R.; BALSAMO, R.; CLOSE, T. J.; YU, X. M.; GRIFFITH, M. Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: a dehydrin from peach (*Prunus persica*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 105, p. 600-608, 1999.

WUTSCHER, H. K.; COHEN, M.; YOUNG, R. H. Zinc and water-soluble phenolic levels in the wood for the diagnosis of citrus blight. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 61, n. 7, p. 572-576, July 1977.

WUTSCHER, H. K. Soil pH and extractable elements under blight-affected and healthy citrus trees on six Florida soils. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 114, n. 4, p. 611-614, June 1989.

XIAO, F.; TANG, X.; ZHOU, J.-M. Expression of 35S::Pto globally activates defense-related genes in tomato plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, p. 1637-1645, 2001.

YAMAMOTO, M.; MIKI, T.; ISHIKI, Y.; FUJINAMI, K.; YANAGISAWA, Y.; NAKAGAWA, H.; OGURA, N.; HIRABAYASHI, T.; SATO, T. The synthesis of ethylene in melon fruit during the early stage of ripening. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 36, n. 4, p. 591-596, June 1995.

YOKOMI, R. K.; GARNSEY, S. M.; YOUNG, R. H.; GRIMM, G. R. Declines of unknown etiology. In: IOCV CONFERENCE, 9. 1984, Riverside. **Proceedings...** Riverside: International Organization of Citrus Virologists, 1984. p. 260-269.