



**EXPRESSÃO DE GENES EM *Phytophthora
nicotianae* QUE CODIFICAM PROTEÍNAS
INDUTORAS DE RESPOSTAS DE DEFESA EM
PLANTAS**

PAULA DE SOUZA CABRAL COSTA

2007

PAULA DE SOUZA CABRAL COSTA

EXPRESSÃO DE GENES EM *Phytophthora nicotianae* QUE CODIFICAM
PROTEÍNAS INDUTORAS DE RESPOSTAS DE DEFESA EM PLANTAS

Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia
Vegetal, área de concentração Biologia
Molecular, para obtenção do título de doutor.

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
UFLA
(Orientador)

LAVRAS-MG
2007

PAULA DE SOUZA CABRAL COSTA

**EXPRESSÃO DE GENES EM *Phytophthora nicotianae* QUE CODIFICAM
PROTEÍNAS INDUTORAS DE RESPOSTAS DE DEFESA EM PLANTAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, área de concentração Biologia Molecular, para obtenção do título de doutor.

APROVADA EM: 11 de outubro de 2007.

Dr. Luciano Vilela Paiva	UFLA
Dr. ^a Magnólia Araújo Campos	UFLA
Dr. ^a . Alessandra Alves de Souza	Centro APTA Sylvio Moreira
Dr. Ludwig H. Pfenning	UFLA
Dr. Mario Lúcio Vilela Resende	UFLA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Ao papai e a mamãe. A eles eu devo a educação que eu tive, a eles eu devo cada não que eu recebi, que permitiu que eu hoje, colhendo os frutos disso, fosse uma pessoa digna, feliz e realizada, pessoal e profissionalmente. Eles sempre estiveram presentes em todos os momentos da minha vida, de alegria, de sucesso e no meu sofrimento. E continuam até hoje, papai em espírito, ao meu lado, e mamãe presente comigo no dia-a-dia. Só quero dizer pra vocês obrigada, pela educação e pelo amor, e que meu sonho de ser orgulho pra vocês não parou por aqui...

DEDICO.

Ao Lélío, primeiro e único amor da minha vida. Tudo que fiz, tudo que faço, tudo que realizo em minha vida é pensando em ser mais e mais pra você. Obrigada pelo talento que você tem de me fazer feliz, por fazer parte da minha vida e pelo gostoso desejo que você tem de nunca mais dela sair.

Ao Helinho, meu irmão único e tão amado, assim como me orgulho tanto de você, do homem e do profissional que você é, quero ser um orgulho pra você também, como profissional e como mulher. Obrigada por fazer parte de mim.

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro e majestoso lugar agradeço a Deus. A Ele eu atribuo toda a força, toda coragem, esperança e capacidade de superação que me foram concedidas em vários momentos durante a execução desse trabalho. Sinto que fui amparada em cada passo, em cada decisão que tive que tomar. Todos os caminhos que percorri foram abertos e iluminados pelo Espírito Santo de Deus.

A Universidade Federal de Lavras. Durante 11 anos vivi dentro desta universidade, e hoje eu agradeço imensamente, pelas inúmeras portas abertas pra mim, pelo respeito e pelo caloroso acolhimento durante todo esse período.

A Fapemig pela aprovação e concessão da minha bolsa de estudos.

Ao CNPq pela concessão de apoio financeiro de custeio do projeto.

Ao meu orientador, professor Luciano Vilela Paiva. Obrigada Luciano pela oportunidade de crescimento e de ampliação dos meus conhecimentos que me foi concedida quando comecei a fazer parte do grupo LCBM. Que sua inteligência, sua determinação e vontade de vencer sejam guiadas somente pelo amor ao seu trabalho, à ciência e a quem cresce junto com você.

A Magnólia de Araújo Campos. Qualquer frase de agradecimento a você sempre será incompleta. Obrigada Mag, de todo meu coração, pelo carinho, pela paciência, pela disponibilidade, por acreditar em mim, acreditar que eu era capaz, porque isso me impulsionou ainda mais pra eu conseguir chegar hoje aqui. Você é um exemplo pra mim, um exemplo de profissionalismo, de fé e de força, uma força tão grande, e ao mesmo tempo tão delicada, tão feminina. O que você fez por mim estará guardado por toda a minha vida.

Ao pesquisador Miguel Angel Dita Rodriguez, peça fundamental e indispensável na execução do nosso trabalho. Miguel, obrigada pela ilustre e expressiva colaboração, por acrescentar tanto a mim e ao LCBM com seus conhecimentos e sua preciosa amizade.

Ao pesquisador Leonardo Zebral, pela colaboração em nossos experimentos, pela paciência, compreensão e amizade durante esse processo.

À mestrande Janine Mendes de Oliveira, pelo amparo nos experimentos de Phytophthora, pela dedicação impecável a esse trabalho, que também é seu. Você hoje é uma grande amiga.

Ao professor Magno Antonio Patto Ramalho, à pesquisadora Ângela Barbosa Abreu e à estudante Flavia Barbosa, do departamento de Biologia da UFLA, que sem medirem esforços gentilmente instruíram e participaram da realização das análises estatísticas.

A toda a equipe do Laboratório Central de Biologia Molecular, Anderson Ramos, Anderson Tadeu, Anderson José e Michele, ao Prof. Chalfun e a amizade, carinho e colaboração de todos os estudantes.

A todos do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, agradeço na pessoa do Prof. Ludwig, ao Edinho e todos os estudantes e funcionários pela gentileza e auxílio na execução dos experimentos.

Ao Centro APTA Sylvio Moreira, agradeço na pessoa do Dr. Marcos Machado pela parceria, colaboração e assistência de toda sua equipe, sem distinção. A pesquisadora Alessandra Alves de Souza e ao Adriano, que com tanto carinho acompanharam e instruíram incansavelmente nossos trabalhos.

Ao Setor de Fisiologia Vegetal, por tudo que vocês agregaram á minha vida, à minha profissão, pela amizade e carinho. Aos professores, estudantes e funcionários, meu muito obrigada.

Foram muitas as pessoas que contribuíram de uma maneira ou outra para que esse trabalho se tornasse possível. Gostaria muito de agradecer longamente aqui nesse espaço a todos, um a um, mas tão importante quanto a gratidão é o reconhecimento. Obrigada a todos, a toda e qualquer tipo de contribuição, pelo ensinamento, pelo respeito, pelo amparo, pela amizade e por cada sorriso que confortou meu coração.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1. Importância de <i>Phytophthora</i> spp. sobre Citros	3
2.2. <i>Phytophthora nicotianae</i> var. <i>parasitica</i>	6
2.3. Gomose dos citros	12
2.4. O reconhecimento de patógenos e respostas de defesa de plantas	14
2.5. Moléculas de microorganismos que são reconhecidas por plantas	16
2.5.1. Efeitos de <i>Phytophthora</i>	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Material utilizado e condições de cultivo	23
3.2. Separação de fases do ciclo de vida	24
3.3. Extração de RNA	24
3.4. Síntese de cDNA	25
3.5. Seleção de genes candidatos	25
3.6. Primers	26
3.7. Transcrição reversa PCR quantitativo (qRT-PCR)	27
3.8. Análise estatística	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5. CONCLUSÕES	46
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

RESUMO

COSTA, Paula de Souza Cabral. **Expressão de genes em *Phytophthora nicotianae* que codificam proteínas indutoras de respostas de defesa em plantas.** 2007. 56p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

O estudo da interação citros-*Phytophthora nicotianae* foi focalizado dentro do projeto Milênio de Citros, tendo sido gerado um banco de ESTs de *Phytophthora nicotianae* isolado IAC 095 (PP/CitEST) após indução *in planta* e subcultivo *in vitro* por 40 vezes. Os objetivos deste trabalho foram adequar metodologia para cultivo e separação de fases do ciclo de vida de *Phytophthora nicotianae* de citros e analisar a expressão de seus genes que codificam proteínas extracelulares indutoras de respostas de defesa em plantas, usando PCR quantitativo (qRT-PCR). Frutos de laranja foram inoculados com discos contendo micélio de *P. nicotianae*. Após a infecção, o patógeno foi purificado em meio de cultura contendo antibióticos e 4 fases do seu ciclo de vida foram obtidas: Zoósporos, Hifa, Hifa com os esporângios cheios e Hifa com os esporângios vazios. cDNA foi sintetizado a partir de mRNA obtido das fases e a expressão gênica foi analisada por meio de qRT-PCR. A condição adequada para o cultivo de *P. nicotianae* de citros *in vitro*, visando à separação de fases do seu ciclo de vida, é em meio de cenoura líquido distribuído em erlenmeyers, a 25° C sob luz constante. Para cinco dos oito genes estudados (*CBEL*, *Ric1*, *Bip*, *Car* e *Transglutaminase*) o perfil de expressão foi similar, apresentando maior expressão nas fases de hifa e hifa com esporângios vazios. A proteína Megaspermina foi mais expressa em zoósporos do que em hifa, esporângios cheios e vazios. Por outro lado, as proteínas 14-3-3 e Sintaxina foram mais expressos em hifa do que nas outras fases estudadas.

* Comitê Orientador: Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva – UFLA (Orientador), Dr^a Magnólia de Araújo Campos – UFLA

ABSTRACT

COSTA, Paula de Souza Cabral. ***Phytophthora nicotianae* genes expression that encode induced-protein response defense in plants**. 2007. 56p. Thesis (Doctor Science in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*.

The study of the Citros-*Phytophthora nicotianae* interaction was focused into the Citros Milenium project, and it has generated an ESTs database of *Phytophthora nicotianae* IAC 095 strain (PP/CitEST) after in planta induction and in vitro subculture for 40 times. The objectives of this study were to adequate the methodology to growth and citros *Phytophthora nicotianae* separation of life cycle phases and analyze its genes expression that codify extracellular proteins inductors of defense response in plants, using a quantitative PCR (RT-PCR). Orange fruits were inoculated with discs containing *P. nicotianae* mycelia. After infection, the pathogen was purified during the culture containing antibiotics and 4 phases of its life cycle it was obtained: Zoospores, mycelia, mycelia with empty sporangium. cDNA was synthesized from the mRNA obtained from the phases and the gene expression was analyzed by the qRT-PCR. The adequate condition to cultivate the citros *P. nicotianae* in vitro, aiming the phases separation of its life cycle, is among liquid carrot distributed in erlenmeyers, a 25° C under a constant light. For five out of the eight studied genes (CBEL, Ric1, Bip, Car and Transglutaminase) the expression profile was similar, presenting a higher expression in mycelia and mycelia with empty sporangium phases. The Megaspermina protein was more expressed in zoosporos than in mycelia, empty and full sporangium. On the other hand, the proteins 14-3-3 and Sintaxina were more expressed in mycelia than the other studied phases.

* Guidance Committee: Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva – UFLA (Orientador), Dr^a Magnólia de Araújo Campos – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A gomose, ou podridão-do-pé, causada por *Phytophthora nicotianae* constitui-se na mais importante doença fúngica da cultura de citros no Brasil, sendo um dos principais problemas na fase de implantação dos pomares. A doença afeta mudas e extensas áreas de pomares, podendo causar a morte da planta, provocar danos de 10% a 30% da produção mundial, com prejuízos de milhões de dólares por ano.

Os citros compreendem um grande grupo de plantas do gênero *Citrus*. No Brasil, a produção ocorre principalmente no Estado de São Paulo, onde se encontram cerca de 70% da produção brasileira de laranjas (Mattos Junior et al., 1995; Abecitrus, 2007). Isso representa 804 mil hectares plantados (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE, 2007), perfazendo 53% da produção mundial de suco, 49% de toda a produção brasileira de frutas, e 80% do comércio internacional desse produto (Abecitrus, 2007).

Phytophthora vive no solo, provocando a doença no colo e nas raízes das plantas. Assim, o principal meio de evitar a doença é a utilização de porta-enxertos resistentes (Feichtenberger, 2001; Siviero et al., 2002). A interação entre *Phytophthora* e plantas envolve uma gama de troca de sinais, nos quais se incluem defesa por parte da planta, ataque por parte do patógeno e inibição de uma ou mais ações dos componentes envolvidos. Existem poucos relatos sobre os processos moleculares que envolvem interações citros-*Phytophthora nicotianae*. Por meio da análise da expressão, constitutiva e induzida por *P. nicotianae* de genes de defesa em porta-enxertos, confirmaram-se a resistência de *Poncirus trifoliata* e a suscetibilidade de *Citrus sunki* a esse patógeno.

Entretanto, o estudo de moléculas do patógeno, que são responsáveis pela indução de cascatas de defesa em citros, ainda não foi relatado.

Elicidores de patógenos são uma classe de moléculas sinalizadoras que desempenham importante papel nessa troca de sinais entre planta e patógenos (Kamoun, 2006). A maioria dos eliciadores isolados de espécies de *Phytophthora* é de natureza protéica ou glicoprotéica, alguns induzindo a produção de fitoalexinas, outros induzindo necrose. O conhecimento da estrutura, função e modo de ação desses eliciadores pode ser uma ferramenta para melhor entendimento dos mecanismos pelos quais patógenos interagem com plantas, compatível ou incompativelmente. Genes com características de eliciadores devem apresentar padrão de expressão diferencial entre diferentes fases do ciclo de vida de *Phytophthora nicotianae*

Em face disso, objetivou-se neste trabalho foram: otimizar metodologias para separação de fases do ciclo de vida de *Phytophthora nicotianae* de citros; analisar a expressão de seus genes que codificam proteínas extracelulares indutoras de respostas de defesa em plantas, usando PCR quantitativo. A obtenção e a correlação da expressão dos genes dentro de estádios do desenvolvimento desse patógeno de citros irão contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na interação planta-*P. nicotianae*, que levam a resposta de resistência ou doença.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância de *Phytophthora* spp. sobre Citros

Os citros englobam um grande grupo de plantas do gênero *Citrus* e outros gêneros ou híbridos da família Rutaceae, no qual se encontram as laranjas doces - Laranja Lima, Piralima, Hamlim, Baía, Baianinha, Rubi, Westin, Pera, Natal, Valencia e outras (*Citrus sinensis*), tangerinas (*Citrus reticulata* e *Citrus deliciosa*), limão siciliano (*Citrus limon*), limas ácidas, como o Tahiti (*Citrus latifolia*) e o Galego (*Citrus aurantiifolia*), e doces, como a lima da Pérsia (*Citrus limettioides*), pomelo (*Citrus paradisi*), cidra (*Citrus medica*), laranja-azedada (*Citrus aurantium*) e toranjas (*Citrus grandis*) (Abecitrus, 2007).

O Brasil, impulsionado pelo crescimento das exportações e pelo desenvolvimento da indústria citrícola, é atualmente o maior produtor mundial de laranjas e o estado de São Paulo é responsável por 70% da produção nacional de laranjas e 98% da produção de suco. Essa cultura gera divisas da ordem de US\$ 2 bilhões por ano e responde por 53% do suco de laranja produzido no mundo e por 80% do suco que transita pelo mercado internacional. A Flórida produz outros 37%, totalizando, junto com o Brasil, 90% da oferta mundial (IBGE, 2007; Abecitrus, 2007).

Em razão do uso da enxertia, que visa utilizar as características do porta-enxerto (contribui com o sistema radicular) para melhorar a produção e a qualidade dos frutos, aumentar a longevidade das plantas, reduzir a altura das árvores e o tempo necessário para o início da produção (espécie copa), a planta de citros comercializada é composta por duas espécies (IAC, 2007). Por isso, com o intuito de prevenir doenças de fungos e bactérias de solo, como a gomose, e aquelas causadas por nematóides, o uso de porta-enxertos resistentes tem sido o método mais viável e econômico utilizado.

Phytophthora nicotianae é um patógeno de solo e infecta principalmente o córtex das raízes e o colo da haste ou tronco de espécies de citros suscetíveis à gomose, como é o caso do limão-cravo, o porta-enxerto mais plantado em pomares do Brasil. Em situações eventuais, com respingos de água vinda do solo infectado que contém zoósporos que são liberados pela água da chuva, pode ocorrer infecção de folhas e frutos de espécies de citros. A infecção do porta-enxerto das plantas é, portanto, o modo mais comum de ataque por *P. nicotianae*.

Em virtude da importância dos citros como commodity e dos danos e perdas causados pela infecção de todos os estádios e partes das plantas de citros por espécies de *Phytophthora*, as principais espécies e variedades de porta-enxertos de citros foram separadas em cinco classes de comportamento, em função de sua suscetibilidade às infecções de tronco pelas principais espécies presentes no Brasil, *Phytophthora nicotianae* e *Phytophthora citrophthora*. Na classe de suscetibilidade muito alta, enquadram-se os limões verdadeiros, e como suscetibilidade alta, citam-se as laranjas doces, limas ácidas, limões rugosos e pomelos. A classe de suscetibilidade moderada traz as tangerinas Sunki e Cleópatra, o limão Cravo, Volkameriano e citranges Trover e Carrizo. A laranja azeda e a *Macrophylla* são da classe de suscetibilidade baixa e o Citrumelo Swingle e a trifoliata, de suscetibilidade muito baixa, ou seja, são as mais resistentes (Colburn, 2004; Fundecitrus, 2007).

Embora o estudo da interação planta-*Phytophthora* esteja avançado em vários patossistemas, especialmente batata-*P. infestans*, existem poucos relatos sobre os mecanismos envolvidos na interação citros-*Phytophthora*. Sabe-se, portanto, que a interação citros-*Phytophthora nicotianae* é do tipo reconhecimento não específico. Recentemente, Teixeira (2005), estudando a expressão de genes de defesa em plantas de citros, observou que *Poncirus trifoliata* expressa um padrão de genes de defesa característico de uma planta

resistente, numa interação incompatível com *Phytophthora nicotianae*. *Citrus sunki*, no entanto, expressou um padrão de genes de defesa característico de planta suscetível, numa interação compatível. Teixeira demonstrou ainda que a expressão constitutiva (basal) de genes PR-5 é maior em *Poncirus trifoliata* e em híbridos resistentes a *P. nicotianae* do que em *Citrus sunki* (Teixeira, 2005).

De modo geral, as plantas podem secretar enzimas que são capazes de degradar a parede celular dos patógenos invasores. Essas enzimas são classificadas como proteínas relacionadas com a patogênese (PR), e algumas são hidrolíticas, como glucanases, quitinases e protease. Patógenos de plantas, fúngicos e bacterianos, têm envolvimento em diversos mecanismos de proteção contra as atividades das proteínas PR (Van West et al., 2003; Abramovitch & Martin, 2004).

Oomicetos patogênicos a plantas, tais como *Phytophthora*, contêm pouca quitina em sua parede celular e são, portanto, resistentes às quitinases de plantas. Enzimas β -1,3-glucanases são componentes da parede celular de hifa do oomiceto *P. parasitica*. 1,3-glucanases são induzidas em planta após o ataque do patógeno e à exposição a vários eliciadores bióticos e abióticos, e normalmente elas agem em sinergia com as quitinases. Quitinases e β -1,3-glucanases têm um padrão isoenzimático complexo, com isoformas diferindo em suas características bioquímicas, estrutura primária, atividade enzimática, localização subcelular e propriedades antifúngicas. Fumo transgênico expressando β -1,3-glucanase mostrou-se resistente a *P. parasitica* var. *nicotianae*. Com isso, foi demonstrado que elas exercem um importante papel nas respostas de defesa das plantas contra patógenos fúngicos, cujo principal componente da parede celular é a β -1,3-glucana (Pozo et al., 1999).

Phytophthora também produz mecanismos de defesa ativos que envolvem secreção de proteínas inibidoras de glucanases e proteases do hospedeiro (Kamoun, 2005). Da mesma maneira, as plantas adaptam-se ao

estresse causado por patógenos por meio da formação de barreiras de defesa, para reforçar a estrutura da célula pelas enzimas relacionadas à lignificação. Por outro lado, o decréscimo na atividade dessas enzimas relacionadas com a lignificação, particularmente a atividade da polifenoloxidase, pode ser o resultado de um estresse patogênico prolongado (Zheng et al., 2005). EPIC1 e EPIC2 formam uma classe de inibidores de protease extracelulares de *P. infestans*. Esses dois inibidores agem sobre a protease apoplástica do tomate. Isso sugere inibições de proteases do tomate pelos efetores secretados de *P. infestans* e uma hipótese de não atuação das enzimas relacionadas à lignificação.

As poligaracturonases (PGs) são enzimas pécticas de degradação que estão envolvidas na invasão do tecido hospedeiro pelos patógenos oomicetos de plantas. Em *Phytophthora cinnamomi*, cerca de 17 diferentes enzimas PGs foram encontradas (Gotesson et al., 2002).

2.2 *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*

Phytophthora nicotianae Breda de Hann var. *parasitica* (Dastur), também chamada de *Phytophthora parasítica*, causa doenças em um grande número de famílias de plantas, dentre as quais, além dos citros, tomate, fumo, mandioca, cebola, gergelim, ervilha, violeta, e alguns isolados são especificamente patogênicos a um único hospedeiro.

A palavra *Phytophthora* deriva do grego e significa destruidor de plantas. O gênero *Phytophthora*, até pouco tempo, estava classificado dentro do reino Fungi, reino dos fungos verdadeiros. No entanto, *Phytophthora* e outros oomicetos têm um número de características que são relativamente incomuns em outros fungos (Erwin & Ribeiro, 1996). Os oomicetos são, então, um grupo de organismos do tipo fungo que atualmente pertencem ao reino Stramenopila, por serem filogeneticamente distantes dos fungos verdadeiros (Erwin & Ribeiro,

1996). Grande parte dos oomicetos patogênicos a plantas pertencem aos gêneros *Pythium* e *Phytophthora* (Cvitanich & Judelson, 2003).

Algumas características levaram a taxonomia a enquadrar as *Phytophthoras* no reino Stramenopila. Diferentemente dos fungos verdadeiros, os zoósporos de oomicetos são biflagelados. As espécies de *Phytophthora* não sintetizam esteróis, embora requeiram um suprimento exógeno de β -hidroxi esteróis para a esporulação. Além de serem dispersas via zoósporos e de gerarem oósporos sexuais de paredes espessas, eles possuem celulose em sua parede celular (β -1,4-glucanas), órgãos vegetativos diplóides (Erwin & Ribeiro, 1996). Filogeneticamente, os oomicetos estão mais relacionados a características de algas como as diatomáceas do que a características de fungos verdadeiros (Van West et al., 2003).

Os polissacarídeos constituem uma importante porcentagem da biomassa fúngica; a parede da hifa contém mais de 75% desse tipo de biomolécula. Além de atuarem como elemento de suporte para as hifas, alguns polissacarídeos formam uma capa extracelular ao redor do micélio, proporcionando um suporte para adesão das enzimas excretadas e participando na degradação da lignina, como uma fonte indireta de peróxido de hidrogênio. Exopolissacarídeos são polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias. No ambiente natural em que os microrganismos são encontrados, tais polímeros podem estar associados à virulência, como no caso de patógenos e sua interação com plantas, e à proteção da célula microbiana contra dessecação (Silva et al., 2006).

As espécies de *Phytophthora* podem sobreviver por alguns anos no solo na forma de micélio, esporângio, cistos, clamidósporos e oósporos. Os zoósporos produzidos sobre os tecidos doentes necessitam de água livre para se locomoverem e infectar a planta. Portanto, umidade elevada do solo, assim como

temperatura entre 21° C e 30°C, são fatores que favorecem o desenvolvimento da doença.

Phytophthora causa doenças nos frutos, folhagens, copa e raízes de espécies, como citros, pimenta, eucalipto, cacau, fumo, batata, soja e morango, entre outras. O rápido crescimento de *Phytophthora* spp. é causado pela rápida produção de esporângios e zoósporos em tecidos de plantas infectadas, quando as condições ambientais são favoráveis. Dessas condições, a mais importante é o excesso de umidade (Erwin & Ribeiro, 1996).

Phytophthora nicotianae produz esporângios com papila proeminente, ovóides, elipsóides ou piriformes formados em esporangióforos ramificados irregularmente. Os esporângios têm pedicelo curto e não são caducos, com tamanhos que variam entre os diferentes isolados (27 a 60 µm X 18,7 a 40 µm) (Luz et al., 2001).

Os clamidósporos, esporos de resistência, são abundantes e são formados depois de alguns dias e têm entre 22 µm e 30 µm de diâmetro com paredes espessas (3 µm a 4 µm). A produção de clamidósporos ocorre quando as condições são desfavoráveis ao seu crescimento micelial, ou seja, quando a disponibilidade de oxigênio e nutrientes é baixa, os níveis de dióxido de carbono são elevados, as temperaturas baixas e o desenvolvimento das raízes é reduzido ou nulo, não contribuindo para uma suficiente produção de tecidos suscetíveis a serem infectados pelos patógenos. Sob condições favoráveis, os clamidósporos germinam indiretamente, produzindo esporângios e zoósporos, ou diretamente, formando micélio (Erwin & Ribeiro, 1996; Luz et al., 2001).

As fases dos ciclos de vida de muitos oomicetos que infectam raízes são similares e consistem de dois ciclos que são usualmente estimulados por diferentes condições ambientais (Figura 1). O ciclo assexual é caracterizado pela produção de esporângios, que podem germinar diretamente em líquido ou numa superfície para produzir um tubo germinativo (germinação direta), ou podem

diferenciar-se por um processo de clivagem citoplasmática, para formar zoósporos uninucleares, biflagelados (germinação indireta). Em oomicetos patogênicos a raízes, os zoósporos são geralmente retidos numa vesícula de descarga que evagina dos poros do esporângio antes de ser liberado pela ruptura da vesícula. A aeração é essencial para a produção de esporângios. Cada esporângio pode produzir até 50 zoósporos em seu interior. Sua produção é estimulada por quedas bruscas de temperatura e a presença de água livre é fundamental para a produção e liberação dos zoósporos (Santos et al., 2005). Os zoósporos liberados nadam em água à procura dos tecidos do hospedeiro, onde eles se fixam e encistam. Esse rápido processo leva minutos e ancora os zoósporos à superfície da planta via adesinas, que são descarregadas da superfície do zoósporo.

Zoósporos são propágulos móveis que são liberados do esporângio durante condições úmidas. Os esporângios são multinucleados e permanecem assim até que a citocinese seja iniciada por um choque frio que compartimentaliza os núcleos simples em 6 a 12 zoósporos mononucleados e desprovidos de parede celular (Cvitanich & Judelson, 2003). Em *Phytophthora nicotianae*, os zoósporos nadam em direção à região da extremidade de radículas ou de raízes com ferimentos graças à ação estimulatória de substâncias exsudadas por esses órgãos que atraem os zoósporos (quimiotaxia).

O encistamento dos zoósporos é um processo rápido que envolve a perda dos dois flagelos, e secreção de glicoproteínas e outras moléculas, para formar a parede celular primária. Os zoósporos orientam-se em com a abertura em direção à superfície da raiz, como eles encistam. Os cistos se tornam aderidos firmemente à superfície da raiz devido à liberação de moléculas adesivas, os apressórios (Fabritius & Judelson, 2003; Van West et al., 2003). O encistamento de zoósporos de *P. parasitica* está correlacionado com um influxo inicial de Ca^{+2} , seguido por um efluxo maior desse cátion. Os efluxos

intracelulares de Ca^{+2} mais tardios correlacionam-se com a germinação dos cistos (Luz et al., 2001). O encistamento e a adesão estão intimamente relacionados. A queda gradual de temperatura leva os zoósporos a se tornarem adesivos e a iniciarem a formação da parede (Sing & Bartnicki-Garcia, 1975).

O cisto germina pelo desenvolvimento de um tubo germinativo que pode penetrar o hospedeiro diretamente ou via apressório. Com a germinação dos cistos, um complexo programa de expressão diferencial dos genes é iniciado que pode controlar o desenvolvimento das estruturas de infecção e invasão do hospedeiro, podendo, portanto, determinar a patogenicidade (Gönhardt et al., 2000). Utilizando os nutrientes adquiridos do hospedeiro suscetível, a hifa intracelular asseptada ramifica pelo tecido da planta desenvolvendo uma massa de micélio absorvente, de onde ocorre a esporulação na plântula doente e o ciclo da doença é repetido. A rapidez desse ciclo permite que o estágio assexual se repita muitas vezes durante o período de crescimento da planta.

Esse patógeno pode permanecer no solo ou em tecidos infectados por longo tempo, sendo isso provavelmente o resultado da abundante produção de clamidósporos. O ciclo sexual gera oósporos de parede espessa que são adaptados a baixas temperaturas e sobrevivem a condições severas do meio ambiente. Oosporogênese envolve a produção de oogônio feminino e de anterídio masculino, por meio de meioses sucessivas nos gametângios. O anterídio cresce e se funde como oogônio para formar um zigoto, que se desenvolve em oósporo. A fertilização leva ao desenvolvimento de um oósporo, que tem uma parede interna espessa. A parede aparece delimitando o gametângio de uma hifa asseptada, e o oósporo torna-se dormente.

O esporo pode apresentar dormência e pode permanecer no solo pelo inverno e, então, germinar sob condições favoráveis para produzir tubos germinativos simples ou múltiplos. Esses tubos germinativos podem, então,

formar esporângios, retornando assim ao ciclo assexual do patógeno (Cvitanich & Judelson, 2003).

A temperatura influencia a germinação dos esporos, determinando se ela ocorre pela liberação dos zoósporos ou diretamente pela elaboração de tubos germinativos pela parede do esporângio. A temperaturas mais baixas, o citoplasma do esporângio é condicionado a se clivar em zoósporos, que nadam à procura do hospedeiro. Acredita-se que a contribuição dos zoósporos para a doença seja maior que a germinação direta do esporângio, exceto a altas temperaturas, quando a parede do zoósporo é mais propensa à desidratação (Tani & Judelson, 2006).

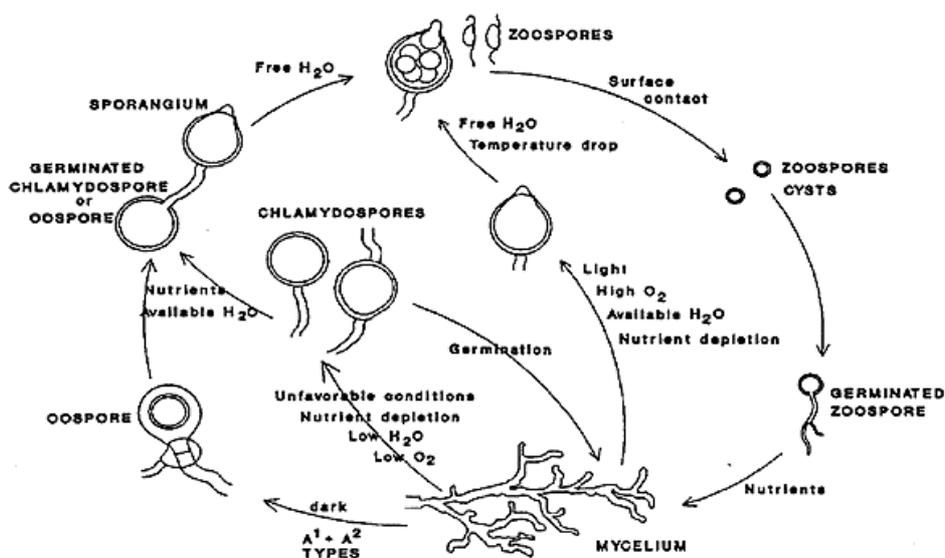


Figura 1 – Ciclo de vida de *Phytophthora nicotianae* de citros.

Esses patógenos causam danos de bilhões de dólares nas espécies de plantas que são suas hospedeiras. Encontrando condições favoráveis ao seu

desenvolvimento, são capazes de causar danos irreversíveis (Fundecitrus, 2007). A fisiologia de *Phytophthora* precisa ser compreendida, assim como seus mecanismos genéticos e bioquímicos utilizados na interação com as plantas, porque essas informações podem ser fundamentais para o desenvolvimento de melhores práticas de controle e no entendimento de como esses métodos de controle atuam, tanto na redução como na erradicação da incidência da gomose em plantas de citros (Luz et al., 2001).

2.3 Gomose dos citros

No Brasil, *P. nicotianae* var. *parasitica* e *P. citrophthora* (Sm. & Sm.) Leonian são os principais causadores da gomose dos citros, sendo que *P. nicotianae* predomina na grande maioria de viveiros e pomares comerciais, embora outras espécies de *Phytophthora* já tenham sido descritas como causadoras de gomose no Brasil (Siviero et al., 2002).

Em levantamentos conduzidos no Brasil por Santos (2001), verificou-se que a maior severidade da gomose ocorre na porção do tronco que vai do colo até 0,50 m de altura e, à medida que se distancia do solo, há uma redução significativa na sua severidade. O patógeno também pode causar doença em sementes, sementeiras, folhas, brotos novos e frutos. O micélio invade as raízes e caules, produzindo uma deterioração da planta (Boissy et al., 1999).

A irrigação ou a água da chuva favorece a produção de esporângios em poucas horas. Os zoósporos movem-se no líquido para a superfície dos órgãos das plantas. A infecção acontece se os tecidos hospedeiros estão apropriadamente receptivos. Isso causa desidratação e necrose da zona cortical do caule ou da raiz, levando rapidamente ao aparecimento dos sintomas da gomose. Irrigação ou chuva intensas em intervalos superiores a 20–25 dias cria uma alteração entre períodos secos de 2-3 semanas e alta umidade no solo por 3

a 4 dias. Quando as temperaturas estão amenas durante o dia e à noite (14–22°C), tem-se uma condição que favorece o aumento do inóculo.

O sintoma característico da doença é a exsudação de goma em lesões de tronco e colo em porta-enxertos suscetíveis. A exsudação também pode ocorrer na região do tronco acima do ponto de enxertia, quando a copa é de variedade suscetível. As lesões de tronco, que produzem goma, são mais freqüentes em plantas muito enterradas, ou quando o tronco é ferido durante a realização de tratos culturais. Raramente, em nossas condições, as lesões ocorrem em ramos.

Em troncos e ramos, os tecidos infectados da casca permanecem firmes até secarem completamente, quando começam a apresentar rachaduras e fendas longitudinais. A morte do tecido pelas lesões pode levar ao anelamento na região do tronco ou das raízes principais, impedindo o fluxo da seiva elaborada para o sistema radicular (Graham & Timmer, 2007).

Os sintomas nas folhas caracterizam-se pela descoloração de nervuras e amarelecimento do limbo, levando à murcha, seca e queda. Os florescimentos e frutificações tornam-se freqüentes e fora da época normal. Os frutos produzidos ficam pequenos, de casca fina e maturação precoce. Também há seca e morte progressiva de ramos ponteiros. Há correspondência entre a face da copa onde esses sintomas se manifestam e a face do tronco ou das raízes onde as lesões ocorrem. A deterioração progressiva da copa, desfolhas e seca de ramos podem levar a planta à morte (Graham & Timmer, 2007).

Vários métodos de controle classificados como regulatórios, culturais, biológicos, físicos, químicos, dependendo da natureza dos agentes envolvidos, tem sido usados no controle de doenças. Esses métodos, quando usados num manejo de controle integrado, tem reduzido significativamente ou erradicado a doenças em plantas e campos de produção (Fokunang et al., 2004).

O controle químico com produtos sistêmicos é o método que apresenta comprovada eficácia no controle preventivo e curativo da doença (Graham &

Timmer, 2007). Os tratamentos químicos objetivam a prevenção da fixação e germinação dos zoósporos na parte basal do tronco e em uma zona limitada das raízes, ou paralisando o desenvolvimento do micélio no córtex (OEPP/EPPO, 2004). Aplicações de fosetil e metalaxil têm sido altamente efetivas no manejo de árvores jovens de citros em viveiro. Múltiplas aplicações desses fungicidas durante o ano no pomar de citros preservaram a sanidade das árvores e aumentaram a densidade de raízes, comparado com as árvores não tratadas; embora os níveis de propágulos de *P. citrophthora* e *P. parasitica* não sejam afetados (Matheron et al., 1997; OEPP/EPPO, 2004).

Um outro método de controle da gomose é o controle biológico. O fungo *Myrothecium roridum*, um fungo cosmopolita com alta atividade celulolítica, tem sido proposto como um agente para controle de *Phytophthora* spp (OEPP/EPPO, 2004). Amorim & Melo (2002) verificaram que *Pseudomonas putida*, biovars A e B, *Flavobacterium* sp. e *Bacillus subtilis*, aplicados como tratamento de sementes, são capazes de controlar *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e promover o desenvolvimento de plântulas de citros. Já em plantas de pimenta, a co-inoculação de *G. intraradices* com *P. capsici* aliviou os sintomas fisiológicos causados pelo patógeno, provando que *G. intraradices* pode agir como um agente de proteção contra *P. capsici* (Zheng et al., 2005).

2.4 O reconhecimento de patógenos e respostas de defesa de plantas

As reações provocadas na planta pela infecção de um patógeno produzem sintomas que variam em tipo e intensidade, entre espécies e dentro de uma mesma espécie. Esses sintomas são uma alteração do fenótipo da planta, provocados por processos bioquímicos e fisiológicos. A ativação de respostas de defesa é iniciada logo após o reconhecimento do patógeno pela planta, que é mediado por uma interação gene-a-gene entre o produto do gene de resistência da planta (R) e o produto do gene de avirulência do patógeno (Avr), ou pela

ligação de um eliciador não-específico ou geral denominado padrão molecular associado a patógeno (PAMP) ao receptor de reconhecimento padrão (PRR), podendo culminar numa morte celular localizada programada chamada de resposta de hipersensibilidade (HR) (Armstrong et al., 2005). Esses são, portanto, componentes de sistema imune inato de plantas cujos fenótipos são resistência específica de hospedeira (interação Avr-R) e resistência basal ou de não-hospedeira (interação PAMP-PRR).

O reconhecimento inicial de eliciadores de patógenos por receptor(es) de plantas ativa uma cascata de transdução de sinais que envolve a translocação de Ca^{+2} e prótons pela membrana plasmática até o citossol, fosforilação e desfosforilação protéicas, ativação de quinases no citoplasma, a ativação do complexo NADPH-oxidase, produção de espécies ativas de oxigênio, ativação de compostos como ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno, ativação de fatores de transcrição de genes de defesa (proteínas PR, fitoalexinas), lignificação de tecidos e outros, resistência local (HR) e, subsequentemente, 'imunidade' sistêmica (do tipo resistência sistêmica adquirida ou do tipo resistência sistêmica induzida) (Iakimova et al., 2005; Resende et al., 2007).

As plantas respondem muito rapidamente a infecções causadas por oomicetos e patógenos fúngicos (Hardham, 2007). Mudanças rápidas na estrutura, incluindo acúmulo de resíduos citoplasmáticos no local da infecção e reorganização do citoesqueleto da planta. Em plantas de *Arabidopsis* infectadas por oomicetos, microfilamentos de actina são responsáveis por mover os componentes citoplasmáticos para o local da infecção.

O estudo de eliciadores específicos (avirulência) e gerais (PAMPs) de patógenos de plantas e sua percepção pelas plantas é fundamental para o entendimento da base molecular da resistência a doenças num dado patossistema. A identificação e caracterização das interações do eliciador do

patógenos com o receptor da planta podem também levar a novas estratégias para a criação da resistência a doenças (Vleeshouwers et al., 2006).

2.5. Moléculas de microorganismos que são reconhecidas por plantas

Moléculas sinais que são reconhecidas por receptores e disparam respostas de defesa em plantas são chamadas eliciadores. Os eliciadores podem ser liberados pela própria planta, chamados endógenos. Os eliciadores provenientes do patógeno são eliciadores exógenos e podem ser específicos ou inespecíficos. Os específicos são ativos somente em cultivares que possuem os correspondentes genes de resistência a doenças e são produtos da expressão de genes de avirulência, enquanto os inespecíficos não apresentam níveis diferentes de sensibilidade em cultivares de uma mesma espécie de planta, e podem ser proteicos ou não-proteicos, tais como componentes da parede celular dos patógenos, lipopolissacarídeos, entre outros (Resende et al., 2007). A natureza química dos eliciadores é variada e não há uma característica estrutural única que determine sua atividade (Bonaldo et al., 2004).

Proteínas e outras moléculas envolvidas na deprecação de barreiras químicas e físicas (cutinases ou enzimas que degradam parede celular de plantas), detoxificação de substâncias de plantas (fitoalexinas), produção de toxinas e a formação de estruturas de infecção são consideradas determinantes potenciais da patogenicidade (Van West et al., 2003; Zheng et al., 2005).

Moléculas derivadas de microorganismos patogênicos ou não são efetores, cujas atividades intrínsecas são interagir com o hospedeiro e assim infectar suas células. Patógenos de plantas secretam uma vasta quantidade de efetores que coletivamente promovem sua virulência em hospedeiros suscetíveis. Alguns efetores, tais como toxinas, podem difundir para seu sítio alvo, enquanto outros efetores, tais como proteínas secretadas, atuam ou na zona de infecção, do lado de fora do patógeno e fora das células hospedeiras

(apoplasto), ou dentro das células hospedeiras (citossol) (Mackey & McFall, 2006). Esses efetores manipulam a estrutura e função da célula hospedeira, facilitando a infecção (fatores de virulência ou infecção) e/ou induzindo respostas de defesa (fatores de avirulência) (Kamoun, 2006).

Um efetor que desencadeia uma resposta necrótica pode funcionar como um eliciador que limita a infecção por um patógeno biotrófico, já que esse necessita das células vivas para se desenvolver. Por outro lado, isso pode facilitar a infecção por um patógeno necrotrófico, e então funcionar como uma toxina. Em hemibiotróficos como *Phytophthora*, um efetor pode ter diferentes efeitos na interação, dependendo se ele é expresso durante a fase biotrófica mais precoce ou no estágio necrotrófico mais tardio da doença (Kamoun, 2007).

2.5.1 Efetores de *Phytophthora*

Apesar de serem totalmente divergentes em suas seqüências primárias, proteínas de oomicetos estão agrupadas em diferentes classes de efetores: efetores apoplásticos, secretados nos espaços extracelulares, onde eles interagem com alvos extracelulares e receptores de superfície; e efetores citoplasmáticos, que são translocados para dentro da célula da planta por estruturas como vesículas e haustórios que evaginam para dentro da célula do hospedeiro (Kamoun, 2005). Moléculas efetoras identificadas em espécies de *Phytophthora* incluem elicinas, eliciadores indutores de necrose não-específicos de cultivar, e o ácido graxo poliinsaturado ácido araquidônico (AA), que é um componente de membranas de Oomicetos.

As elicinas são um grupo de efetores, formado por proteínas pequenas (<150 aminoácidos) conservadas e extracelulares (secretadas), com um número certo de resíduos de cisteínas, com função biológica no processo de infecção por espécies de *Phytophthora*. As pontes dissulfeto devem proporcionar estabilidade no apoplasto da planta, que é rico em proteases degradativas (Lauge & De Wit,

1998). Elicitinas interagem com um sítio de ligação de alta afinidade na membrana plasmática do fumo (Vleeshouwers et al., 2006), onde induzem a uma resposta de hipersensibilidade e conferem proteção contra infecções subseqüentes desses patógenos (Zhang et al., 1998).

A patogenicidade de *P. parasitica* var. *nicotianae* no fumo está correlacionada com a secreção de elicitininas. Elicitininas ácidas e básicas são carreadoras de esteróis, pois estão prontas para se ligar a eles e para mediar sua transferência entre membranas fosfolipídicas artificiais, visto que oomicetos do gênero *Phytophthora* não sintetizam esteróis, o esterol é capturado de membranas celulares de plantas invadidas e transportado de volta para os fungos para satisfazer à demanda para seu crescimento (Mikes et al., 1998).

Para nomear as elicitininas por uma ordem sistemática e consistente, foi proposto um novo sistema de classificação e uma abreviação de três letras para proteínas individuais. Elas são nomeadas com as três ou quatro primeiras letras do nome da espécie seguido pelo número, como INF1 (*Phytophthora infestans*), SOJ1 (*Phytophthora sojae*), e RAM1 (*Phytophthora ramorum*) (Jiang et al., 2006). Sabe-se que INF1 e outras elicitininas induzem à hipersensibilidade e à produção de vários marcadores bioquímicos de respostas de defesa das plantas. Em algumas interações, existe a evidência para um papel da percepção da elicitina em restringir a colonização dos patógenos, sugerindo que os INFs agem como eliciadores específicos. *P. infestans* pode secretar efetores que suprimem a morte celular induzida pelo INF1 e, conseqüentemente, livram-se da resposta da planta a esse eliciador (Vleeshouwers et al., 2006).

As elicitininas estão agrupadas em três diferentes classes. Na Classe I, contém aquelas com resíduos conservados 6 Cys, 3 Met, 2 Phe e 3 Gly. Resíduos Leu, Ile, Pro e Thr estão sempre localizados nas posições altamente conservadas. Existe um grupo de elicitininas que são divergentes da classe I, pois apesar de derivadas de cDNA, genes expressos, eles codificam proteínas não

funcionais e apresentam outras características, como sítios de glicosilação do Asn. Muitas das seqüências de elicinas identificadas em espécies de *Pythium* pertencem a essa classe.

A Classe II contém seqüências de HAE (hyperacidic elicitin) que podem corresponder, se expressas, a proteínas muito ácidas. A Classe III contém duas seqüências codificando elicinas de *P. infestans*, que podem codificar peptídeos de 165–170 aminoácidos, que consistem em elicinas com 98 aminoácidos conservados, seguido pelo domínio C terminal com 70 aminoácidos. Essa região, que dispõe de aminoácidos como Ser, Thr e Ala, compreende a 75% da região, podendo representar um domínio O-glicosilado (Kamoun et al., 1997; Panabières et al., 1998, Ponchet et al., 1999).

As glicoproteínas α - e β -megasperminas de *Phytophthora megasperma* são elicinas classe III; já a glicoproteína γ -megaspermina (PmH2) é uma elicina da classe II. β -megaspermina infiltrada em folhas de fumo induz uma forte necrose, ao passo que folhas tratadas com α - e γ -megaspermina continuam sem sintomas de necrose. Infiltração de folhas de fumo com 50 nM de cada proteína induziu necrose limitada ao local da infiltração. Diferenças na indução de HR tornaram-se visíveis quando a concentração das elicinas infiltradas foi diminuída. Uma quantidade limitada a 5 nM de α - ou γ -megaspermina desencadeia uma necrose parcial, e 5 nM da β -megaspermina causou necrose em todo o tecido infiltrado (Baillieul et al., 2003).

Outra elicina bem estudada é a transglutaminase, enzima que catalisa as reações aciltransferase dependentes de cálcio, entre um grupo γ -carboxiamida da glutamina e o grupo ϵ -amino da lisina ou outras aminas primárias, promovendo pontes de cadeias protéicas intra ou intermoleculares. Genes que codificam para transglutaminase já foram isolados de três espécies de *Phytophthora*: *Phytophthora sojae* (codifica uma proteína de 529 aminoácidos); *Phytophthora infestans*, (proteína de 737 aminoácidos) e de *Phytophthora*

megasperma (proteína de 174 aminoácidos), às quais foi atribuída a função de eliciador da resposta de hipersensibilidade em fumo.

No entanto, o peptídeo N-terminal de 13 aminoácidos derivado da transglutaminase (Pep-13), localizado na superfície da parede celular, é que é reconhecido por receptores da planta, levando à ativação de respostas de defesa durante a interação com espécies de *Phytophthora*. Esse peptídeo invoca resposta imune inata também em vertebrados e insetos, com papel similar ao da interação entre plantas e espécies fitopatogênicas de *Phytophthora*. Em *Phytophthora sojae*, a transglutaminase é uma glicoproteína que aumenta as expressões de genes de defesa e síntese de fitoalexinas. O papel das transglutaminases no crescimento e desenvolvimento de *Phytophthora* spp. é secundário em relação ao seu papel como sinalizador na invasão do patógeno, em lugar e hora apropriados (Makarova et al., 1999; Brunner et al., 2002).

As proteínas CRN ('Crinkler') constituem uma outra classe de efetores citoplasmáticos secretados por oomicetos, que alteram respostas de hospedeiros e podem ter importantes funções. A expressão desse gene em *Nicotiana* spp. e em plantas hospedeiras de tomate resulta em encarquilhamento e morte celular, acompanhados pela indução dos genes relacionados à defesa (Kamoun, 2007).

NLPs (Nep1-like proteins) são proteínas que estão em bactérias, fungos e oomicetos, especialmente as espécies que se associam a plantas. Muitos membros da família NLPs têm a habilidade de induzir a morte celular em muitas plantas dicotiledôneas (Pemberton & Salmond, 2004). A conservação filogenética e o amplo espectro de atividades das NLPs distinguem-nas da maior parte dos eliciadores que induzem à morte celular e sugerem que a atividade que induz a necrose é funcionalmente importante. Em oomicetos, NLPs estão amplamente distribuídas em *Phytophthora* e *Pythium*. Elas induzem respostas de defesa em plantas suscetíveis e resistentes. Em *P. sojae* e *P. infestans*, os genes NLP foram expressos tardiamente durante a infecção do hospedeiro e poderiam,

então, funcionar aumentando as necroses do tecido hospedeiro durante a fase necrotrófica da infecção, facilitando a colonização (Kamoun, 2005).

CBEL (Cellulose Binding, Elicidor, e Lectin-like) é uma glicoproteína de 34-kDa e 268 aminoácidos, presente na parede celular hifa e zoósporos encistados de *Phytophthora parasitica* var. *nicotiana*. Essa proteína se liga à celulose e à superfície de plantas, elicitando a morte celular e a expressão de genes de defesa em folhas de fumo (Haldar et al., 2006). Pela caracterização fenotípica de isolados de *Phytophthora nicotianae* suprimidos da expressão do CBEL, revelou-se que essa glicoproteína está envolvida na atividade da lipoxigenase e deposição organizada de polissacarídeos na parede celular das suas plantas hospedeiras (Villalba-Mateos et al., 1997).

Proteínas Car (Cyst Germination) secretadas foram isoladas de cistos de *Phytophthora infestans* durante a germinação e o desenvolvimento na superfície foliar (Gönhardt et al., 2000). A proteína Car contém 561 aminoácidos e baseando-se na extrema hidrofiliçidade, estrutura flexível e a presença de um número conservado de resíduos de cisteínas em partes, N e C terminais sugerem que proteínas Car são homólogas às mucinas de mamíferos (Gönhardt et al., 2000). Essas proteínas adesivas podem ser importantes componentes da camada mucosa que protege os cistos germinados da desidratação, danos físicos ou efeitos adversos da resposta de defesa da planta. Devido à sua viscosidade e consistência, proteínas Car podem participar na adesão à superfície foliar. É uma característica comum das estruturas de infecção de *Phytophthoras* e que é requerida para permitir a penetração da superfície do hospedeiro (Van West et al., 2003).

É provável que proteínas extracelulares estejam relacionadas com a ação de outras proteínas envolvidas em mecanismos, como empacotamento protéico e transporte de vesículas no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. Entre essas proteínas, Syntaxina, 14-3-3 e Bip devem possuir função relevante no

desenvolvimento de fases do ciclo de vida de *P. nicotianae*: syntaxina relacionada à fusão e transporte de vesículas do complexo de Golgi, 14-3-3 no acúmulo de biomassa ao longo do crescimento do patógeno e BiP relacionada à secreção de proteínas.

A genômica funcional tem sido usada com sucesso para identificar seqüências de efetores de *Phytophthora* spp. em bancos de dados específicos. Para isso, são necessárias duas etapas fundamentais: primeira, a utilização de ferramentas computacionais para identificação de genes candidatos que preencham uma lista de critérios específicos, seguida pela análise e validação desses genes candidatos por ensaios funcionais, tais como expressão *in planta* e avaliação da atividade dos eliciadores. Com a elaboração de bibliotecas de cDNA de oomicetos e seqüências genômicas, as listas de proteínas candidatas secretadas estão sendo geradas com o uso de usando ferramentas de bioinformática, denominadas de Secretoma. Dessa forma, pedaços de seqüências expressas (ESTs) que possuam homologia e/ou codificam proteínas com peptídeos sinais na região N-terminal, por exemplo, são candidatos a efetores (Kamoun, 2006).

A elucidação estrutural de um dado eliciador tem uma importância primária no entendimento dos eventos iniciais da interação parasita-hospedeiro, levando a respostas de defesa da planta (Okinara et al., 1995). O conhecimento da estrutura e função dos efetores de patógenos e os danos que eles causam nas plantas é uma condição para o entendimento da base molecular da patogenicidade e da doença. Assim, com análises moleculares mais detalhadas, as novas estratégias para manipulação de plantas, levando-as à resistência a patógenos oomicetos, tornar-se-ão indubitavelmente aparentes (Kamoun, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolado de *Phytophthora* e condições de cultivo

O cultivo e separação de fases do ciclo de vida do patógeno foram realizados no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras. O isolado utilizado foi o IAC095 de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* proveniente do Centro APTA Citrus Sylvio Moreira do Instituto Agronômico de Campinas. O patógeno foi inoculado em Laranja “Pêra”, em vários pontos na região do albedo do fruto, que foi mantido em câmara úmida, sob temperatura ambiente, até que $\frac{3}{4}$ do fruto estivessem com sintomas (Figura 2). Pedacos da casca do fruto infectada com o patógeno foram tratados assepticamente, por 30” em álcool absoluto e, por mais 30” em hipoclorito de sódio 2%, e posteriormente lavados em água destilada e autoclavada, na câmara de fluxo laminar. Os pedacos foram transferidos para meio de cultura cenoura-ágar contendo os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e rifampicina (50 µg/mL), em placas de Petri, e incubados em BOD a 25 °C por aproximadamente 96 horas. Após esse período, o material foi transferido para meio líquido de cenoura, colocando-se, em erlenmeyers, 5 discos de micélio já purificado. Após 10-12 dias, o material já estava pronto para ser utilizado para realização de experimentos.



Figura 2 – Laranjas “Pêra” com sintomas aos 4 (A) e 10 (B) dias após a inoculação com *Phytophthora nicotianae*. Lavras, UFLA/DFP, 2007.

3.2 Separação de fases do ciclo de vida

O micélio puro do patógeno foi retirado do meio líquido após 12 dias de cultivo, antes que começasse a produzir esporângios. O meio de cultura foi eliminado e o micélio armazenado em embalagens de papel-alumínio e colocado em N₂ líquido, para, posteriormente ser armazenado a -80° C.

A hifa coletada juntamente com os esporângios cheios permaneceu em meio líquido por aproximadamente 25 dias, de maneira que produzisse o maior número de esporângios e não liberassem os zoósporos. O material foi coletado da mesma maneira como citado para o micélio antes de produzir esporângios.

Para coletar a fase de hifa com os esporângios vazios, retirou-se o meio de cultura com aproximadamente 25 dias de cultivo e acrescentou-se água destilada e autoclavada, a 4° C, até que cobrisse toda a superfície do micélio. O material foi levado à geladeira por 2 horas, e a partir desse período, foi monitorada a liberação dos zoósporos. Após a liberação dos zoósporos, o micélio contendo os esporângios já vazios foi retirado e colocado em N₂, sendo imediatamente levado a -80° C. A água gelada foi centrifugada a 12000 g, por 10' em tubos falcon. O sobrenadante foi descartado e o pellet, contendo zoósporos, levado a N₂ líquido e, posteriormente, a -80° C.

3.3 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada no Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras. O RNA total das fases hifa, hifa com esporângio cheio e hifa com esporângio vazio foi extraído em solução de Trizol – fenol guanidina isotiocianato - (Life Technologies/Invitrogen), e o RNA total de zoósporos foi extraído por meio do RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Os RNAs foram tratados com DNase (Invitrogen) para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico e, posteriormente, purificados com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e fenol, precipitados em etanol e mantidos em água tratada com DEPC.

3.4 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, utilizaram-se 5 µg de RNA total, 3 µg de Random Primers (Invitrogen) por reação e 1 µL da SuperScript Reverse Transcriptase (Invitrogen) (200U).

3.5. Seleção de genes candidatos

ESTs (*Expressed Sequence Tags*) que codificam para proteínas extracelulares usadas nesse trabalho são provenientes do banco de dados CitEST/PP (www.citest.centrodecitricultura.br) de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* de citros, isolado virulento IAC095, Centro APTA Sylvio Moreira, em Cordeirópolis-SP. As ESTs foram isoladas por meio de duas bibliotecas de cDNA, construídas após indução de *P. nicotianae* *in planta* e subcultivo *in vitro* por 40 repicagens (40X), as quais compõem o CitEST/PP. Oito genes foram selecionados usando o programa BLAST (Altschul et al., 1997) e seqüências homólogas de *Phytophthora* spp. que codificam proteínas extracelulares disponíveis no GenBank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). As seqüências obtidas

nessa busca por comparação e palavras-chave foram clusterizadas usando o programa CAP3 (Huang & Madan, 1999) dentro do Gene Project CitEST.

3.6 Primers

Com o programa Primer Express (Applied Biosystems) para PCR quantitativo em tempo real, primers específicos para oito genes do tipo *14-3-3*, *BiP*, *Car* (Cyst Germination), *Cbel* (Cellulose Binding Elicitor Lypoprotein), *Megaspermina*, *Transglutaminase*, *Ric1* (Randomly Isolated cDNA) e *Synthaxin6*, foram desenhados dentro das ORFs (open reading frame), presentes em seqüências consenso geradas pela clusterização usando CAP3 (Huang & Madan, 1999), via Gene Project no banco de dados CitEST. A síntese de primers foi feita pela Integrated DNA Technologies, Inc. e as seqüências estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Seqüências dos *primers* utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real para os oito genes analisados. Lavras, UFLA, 2007.

<i>Gene</i>	<i>Seqüência</i>	<i>Tamanho do fragmento</i>
<i>14-3-3</i>	F-CCCCACGCACCCCATT R-CGGGCGAGTTCAGGATCTC	76pb
<i>BiP</i>	F - TGTGCTGGTTGGTGGCTCTA R - GCCGTTGAAGTAGTCCTTGATCA	67pb
<i>Car</i>	F - CGGCTGACTGCCACTCGTA R - TGCATTTCGGCGTTTTTCCT	72pb
<i>Cbel</i>	F - ACTTCAATGGAGACGACATCCA R - CAGCGCGTGCAGCATTC	64pb
<i>Megaspermina</i>	F - AGCGGTGCCGTCATGAAC R - GAGTCGAGGACGAGCATCCA	67pb
<i>Transglutaminase</i>	F - CCGGCAGCCATTTTGG R - CTGGAACGTCACACGGTTGT	63pb
<i>Ric1</i>	F - CCGTCGGTGTGTTCTTCCA R - AACGGTGAGCAGGCAGTTG	65pb
<i>Syntaxin6</i>	F - CGACCGACGCTGTCAAGAC R - CGATTCGCTGACTGCATCA	65pb

3.7 Transcrição Reversa PCR Quantitativo (qRT-PCR)

A quantificação dos genes foi feita num equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) usando Syber Green qPCR Super Mix UDG com ROX (Applied Biosystems), de acordo com os procedimentos padrões dos fabricantes. Para cada reação, utilizaram-se 1,5 μ M de cada primer e 80 ng cDNA de cada amostra. As condições térmicas da reação foram 2 minutos a 50° C, seguidos por 10 minutos a 95° C, 40 ciclos de 15 segundos a 95° C e 1 minuto a 60° C e, finalizando com 15 segundos a 95° C. Os dados foram coletados e armazenados no software (Sequence Detection Software (Version 1.4) que acompanha o equipamento. Como controle endógeno foi utilizado o primer 18S (1- CCTCCAATGGATCCTCGTTA; 2 - TGACGGAGAATTAGGGTTCG (Invitrogen)), visando normalizar as amostras quanto as possíveis diferenças de quantidade de cDNA adicionadas em cada reação, e como controle negativo o mix sem o cDNA. Os resultados foram normalizados utilizando C_t s obtido para o controle endógeno presente na mesma reação. Para normalização, foi utilizada a equação: $\Delta C_t = C_t$ (gene alvo) - C_t (controle endógeno). A calibração foi determinada pela fórmula: $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (amostra) - ΔC_t (calibrador). A quantificação relativa foi obtida pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Utilizou-se 3 repetições biológicas, e para cada reação de cada repetição biológicas foram ainda utilizadas as réplicas de cada tratamento.

3.8 Análise estatística

A análise de expressão gênica foi avaliada por meio do teste de média Scott-Knott 5% de probabilidade, com um delineamento inteiramente casualizado (DIC) (Scott & Knott, 1974).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção de genes que codificam proteínas extracelulares em *P. nicotianae* de citros

Oito genes foram selecionados no banco de dados CitEST/PP (www.citest.centrodecitricultura.br) de *Phytophthora nicotianae* de citros, usando o programa BLAST (Altschul et al., 1997) e seqüências de *Phytophthora* spp., que codificam proteínas extracelulares disponíveis no GenBank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Os oito genes do tipo *14-3-3*, *BiP*, *Car* (Cyst Germination), *CBEL* (Cellulose Binding Elicitor Lypoprotein), *Megaspermina*, *Transglutaminase*, *Ric1* (Randomly Isolated cDNA) e *Synthaxin6* foram caracterizados e primers para PCR quantitativo foram desenhados dentro de ORFs presentes em seqüências consensus (Figura 3).

Usando essa estratégia de busca por comparação, 14 ESTs do tipo *CBEL* foram encontradas no CitEST/PP, as quais foram agrupadas usando o programa CAP3 (Huang & Madan, 1999) em 2 contigs, contendo 6 ESTs/cada, e 2 singlets. A seqüência consenso do contig 1 contém uma ORF completa com 777 pb de comprimento (Figura 3). Esta ORF provavelmente codifica uma proteína *CBEL*, que compartilha 93% de identidade da seqüência de aminoácidos com a proteína *CBEL*, anteriormente chamada GP34 de *P. parasitica* (CAA65843) e 81% com uma proteína *CBEL* de *P. ramorum* (ABL11548). Os 18 primeiros aminoácidos localizados na região N-terminal dessa proteína contêm um peptídeo sinal predito pelo programa SignalP (Gasteiger et al., 2003).

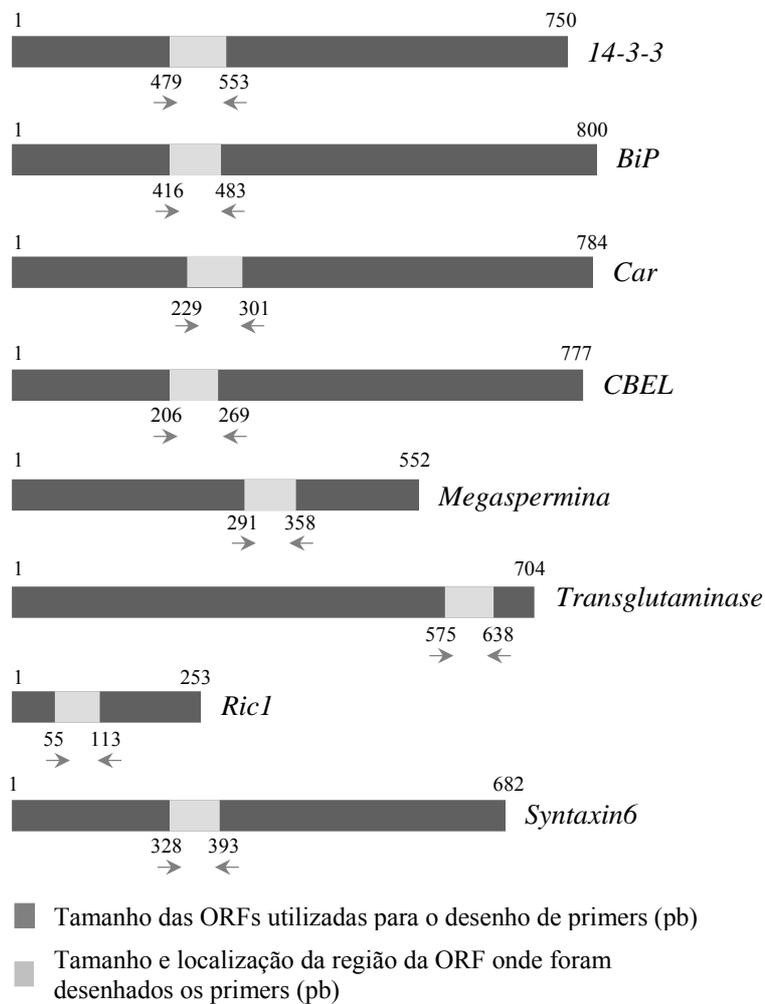


Figura 3 – Representação esquemática dos oito genes de *P. nicotianae* de citros obtidos no banco de dados CitEST, indicando o tamanho das prováveis ORFs (pb) e a localização dos *primers* e fragmentos amplificados por RT-qPCR. Lavras, UFLA, 2007.

Utilizando a palavra-chave Cyst Germination e Car, que designa o gene *car*, foi encontrada no mesmo banco CitEST/PP apenas 1 EST. Essa seqüência tem 784 pb e codifica provavelmente uma proteína do tipo CAR, que

possui 42% de identidade de aminoácidos com proteínas do tipo mucin de *Heterodera glycines* (AAC62109) e com proteínas CAR de *P. infestans* (AAC72308) (Gonhardt et al., 2000).

Duas ESTs do tipo elicinas foram selecionadas no CitEST/PP. Uma delas contém uma ORF de 552 pb que, provavelmente, codifica uma proteína do tipo Megaspermina, com 96% de identidade de aminoácidos com uma proteína megaspermina de *P. megasperma* (CAD38503), e 92% de identidade com uma proteína elicin-like INF5 de *Phytophthora infestans*. Os 20 primeiros aminoácidos localizados na região N-terminal dessa proteína contêm um peptídeo sinal predito pelo programa SignalP (Gasteiger et al., 2003).

A outra seqüência contém uma ORF de 704 pb que, provavelmente, codifica uma proteína do tipo Transglutaminase, que compartilha 89% de identidade com a seqüência de aminoácidos de uma proteína transglutaminase elicitor M81D de *Phytophthora infestans* (AAP70478). A caracterização de todas as elicinas presentes no banco de dados CitEST/PP foi recentemente realizada por Rosa et al. (2007).

Uma EST do tipo *BiP* foi encontrada no CitEST/PP, a qual possui uma ORF de 800 pb. Essa ORF provavelmente codifica uma proteína BiP, que compartilha 96% de identidade da seqüência de aminoácidos com a proteína BiP GRP78 de *P. cinnamomi* (CAA53369).

Dentro do banco de dados CitEST/PP, foram ainda encontradas 42 ESTs no CitEST/PP, as quais foram agrupadas usando o programa CAP3 (Huang & Madan, 1999) em 1 contig, contendo 39 ESTs, e 3 singlets. A seqüência consenso do contig contém uma ORF completa de 750 pb que, provavelmente codifica uma proteína do tipo 14-3-3 que compartilha 100% de identidade da seqüência de aminoácidos com a proteína 14-3-3 anteriormente chamada GP34 de *P. infestans* (AAN31465) (Torto et al., 2003).

Outras seis ESTs do tipo *Syntaxin 6* foram encontradas no banco de dados CitEST/PP, as quais foram agrupadas por clusterização usando o programa CAP3 (Huang & Madan, 1999) em 2 contigs, contendo 2 ESTs/cada e 2 singlets. A seqüência consenso do contig 1 contém uma ORF completa de 682 pb. Provavelmente a ORF codifica uma proteína Syntaxin6, que compartilha 69% de identidade da seqüência de aminoácidos com a proteína Syntaxin 6 de *P. infestans* (AAM12665) (Dacks & Doolittle, 2002).

Cinco ESTs do tipo *Ric1* foram encontradas no banco CitEST/PP, as quais foram agrupadas em 1 contig e 1 singlet usando o programa CAP3 (Huang & Madan, 1999). A seqüência consenso desse contig contém uma ORF completa de 253 pb, que provavelmente codifica uma proteína RIC1, que compartilha 95% de identidade com a seqüência de aminoácidos com a proteína RIC1 de *P. infestans* (Q9Y068) (Van West et al., 1999).

4.2 Estabelecimento das condições de cultivo *in vitro* e obtenção de fases do ciclo de vida de *Phytophthora nicotianae* de citros

4.2.1. Condições de cultivo para *Phytophthora nicotianae*

Em todos os ensaios, o isolado IAC095 de *P. nicotianae* de citros foi inoculado em frutos de laranja, visando à indução *in planta* de genes relacionados à patogenicidade e virulência. As condições adequadas para o cultivo e separação de fases do ciclo de vida do patógeno no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos (UFLA/DFP) foram estabelecidas após a etapa purificação do isolado a partir dos frutos de laranja previamente inoculados. Ainda, em todos os ensaios e na obtenção de fases, o crescimento do patógeno foi monitorado por análises microscópicas, visando monitorar a pureza do inóculo e a presença das fases em estudo.

As condições mais adequadas de cultivo do oomiceto *Phytophthora nicotianae* visando à separação de fases do seu ciclo de vida foram em meio de

cultura líquido distribuído em erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura, onde foram colocados 5 discos de meio de cultura contendo o patógeno. As condições foram as mesmas usadas na etapa de purificação (BOD com luz e temperatura (25° C) constantes). O uso de erlenmeyers propiciou um crescimento de um material puro e mais abundante. Anteriormente, foi testada a possibilidade do cultivo em meio de cultura sólido (cenoura-ágar) distribuído em placas de Petri para a separação fases, sem sucesso. O crescimento do micélio ocorreu por dentro do meio de cultura, e não em sua superfície, dificultando a remoção desse meio de cultura para a obtenção do material isento de resíduos. Além disso, em placas de Petri, o índice de contaminação foi alto e apresentou um baixo rendimento do material coletado. Esses problemas foram contornados com o cultivo em erlenmeyers.

4.2.1 Hifa

Os discos de micélio contendo *Phytophthora nicotianae* cultivados em meio cenoura líquido dentro de erlenmeyers foram crescidos em BOD (25° C) com luz constante, permanecendo por aproximadamente 10 dias, tempo suficiente para o crescimento do micélio, sem que se iniciasse a produção de esporângios.

4.2.2 Hifa com esporângios contendo zoósporos

A produção de esporângios cheios de zoósporos ocorreu somente em crescimento micelial sob meio de cultura líquido após 25 dias de cultivo in vitro. Após 12 dias de cultivo, foi feito o monitoramento pela observação de amostras de micélio no microscópio, tentando a obtenção do maior número possível de esporângios, sem que fosse iniciada a liberação de zoósporos.

No entanto, várias tentativas foram anteriormente realizadas para induzir a produção de esporângios, sem sucesso. O micélio foi submetido a três tipos de

estresse: o choque térmico, estresse salino e estresse nutricional. Para o choque térmico, o micélio foi submerso em água gelada (4° C) por intervalos de tempo que variaram de 30 min. a 2 horas. Após esses períodos de tempo, a água foi escorrida e o material retornou às condições iniciais de cultivo e de monitoramento. No estresse salino, o micélio foi submerso em solução de KNO₃ 0,001M pH 6,0, conforme realizado por Santos et al. (2005). No estresse nutricional, foi feita a remoção total do meio de cultura após o crescimento do micélio. Além disso, foi feita também a redução da disponibilidade do meio de cultura, com monitoramento das amostras em cada uma dessas tentativas. Não foi observado o crescimento de esporângios sob nenhuma dessas condições de estresse.

4.2.3 Hifa com esporângios vazios

Foi repetido, para essa fase, o mesmo procedimento realizado para a fase hifa com esporângios cheios. Por pressão de água, foi feita a tentativa de separar os esporângios da hifa, sem sucesso. Portanto, o trabalho foi direcionado no intuito de induzir a liberação dos zoósporos e armazenar o micélio contendo os esporângios vazios. Segundo Graham et al. (1998), os esporângios de *P. nicotianae* não são caducos, entrando em contradição com Colburn (2004). Excepcionalmente, em cultivos mais velhos (~25 dias), observaram-se alguns esporângios não conectados à hifa (Figura 4). Assim, é possível que existam condições adequadas para que se separe a hifa de esporângios em *Phytophthora nicotianae* de citros.

Para a liberação dos zoósporos, foi dado o choque térmico sobre o micélio com os esporângios cheios.

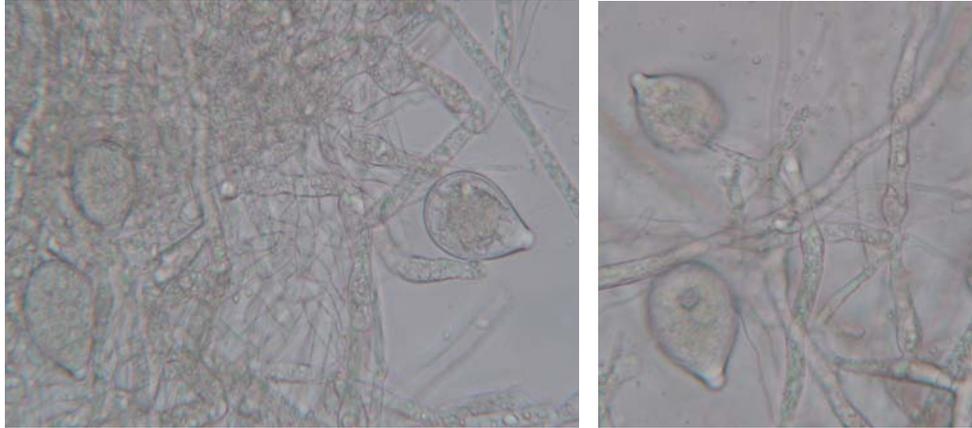


Figura 4 – Micélio de *Phytophthora nicotianae* de citros observado ao microscópio com alguns esporângios não conectados à hifa. Fonte: dados da pesquisa.

4.2.4 Zoósporos

A água gelada usada para induzir a obtenção da hifa com esporângios vazios continha os zoósporos liberados com o choque térmico. Após a centrifugação da solução que continha os zoósporos, os tubos Falcon foram armazenados a -80°C , como para as demais fases.

4.3 Expressão dos genes que codificam proteínas extracelulares em *Phytophthora nicotianae* de citros

O controle endógeno foi testado em todas as condições e revelou que não houve diferença entre os valores de Ct. Valores estatisticamente significativos foram usados para determinar se cada gene, foi diferencialmente expresso nas diferentes fases do ciclo de vida de *P. nicotianae*. De acordo com o perfil de expressão relativa exibido por cada gene foi possível separá-los em três grupos. Os genes do tipo *BiP*, *Transglutaminase*, *Car*, *Cbel* e *Ric1* compõem o maior grupo e o que apresenta também maior similaridade entre o padrão de expressão de cada gene. Genes do tipo *14-3-3* e *Syntaxin 6* apresentam particularidades que os inseriram em um grupo distinto. O gene *Megaspermina*

apresenta-se como componente único de um grupo, pois, além de outro gene não ter apresentado perfil similar, foi também o grupo com características qualitativa e quantitativamente mais divergentes dos demais grupos.

4.3.1 Expressão dos genes *BiP*, *Transglutaminase*, *Car*, *Cbel* e *Ric1*

Os genes *BiP*, *Transglutaminase*, *Car*, *Cbel* e *Ric1* apresentaram um padrão de expressão bem similar, diferindo apenas no nível da expressão de cada fase entre os genes. A característica que reúne esses genes em um grupo consiste no fato de que eles apresentaram maior expressão nas fases de hifa (H) e esporângios vazios (HEv) (Figura 5).

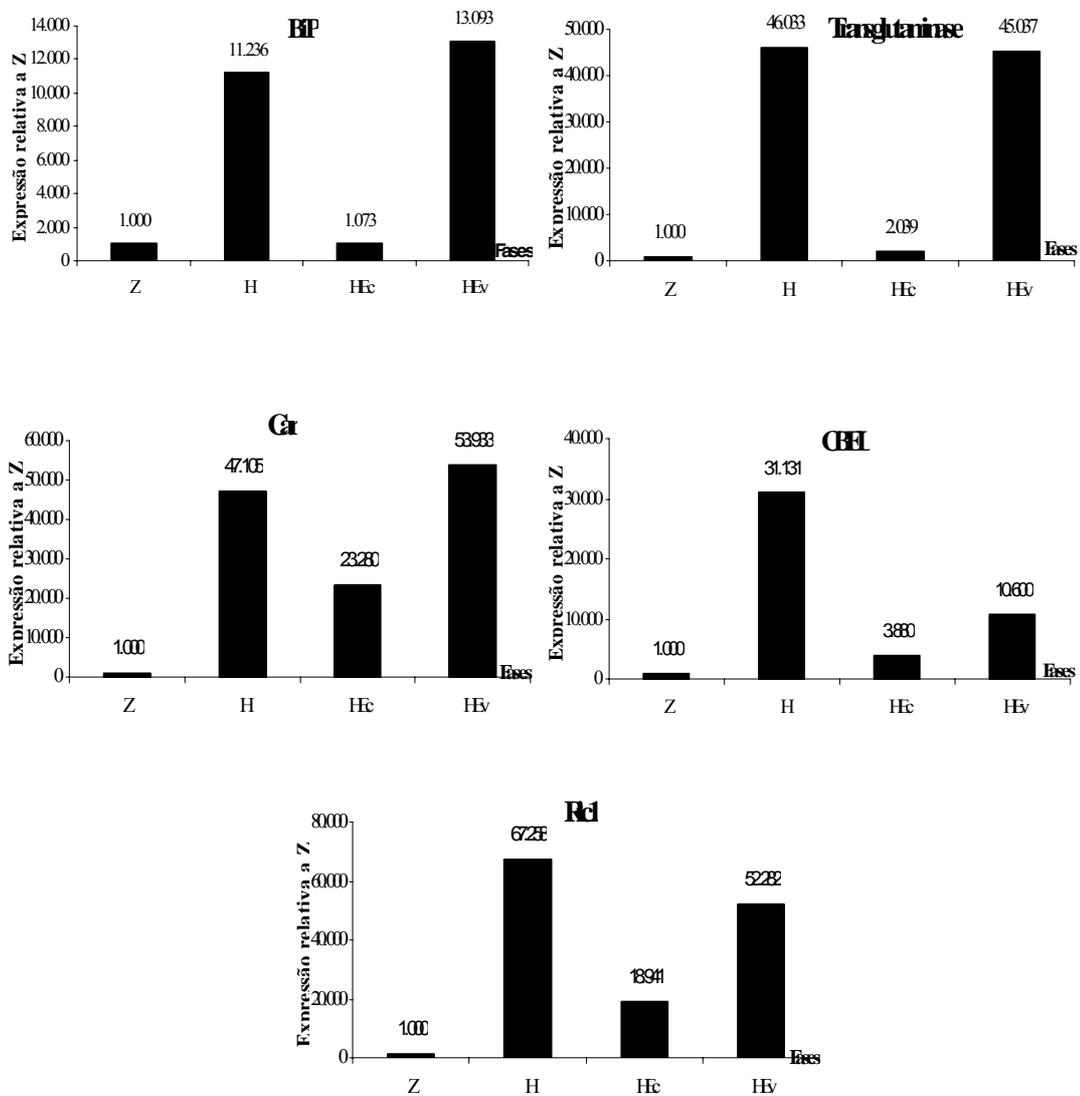


Figura 5 - Expressão genes *Bip*, *Transglutaminase*, *Car*, *Cbel*, e *Ric1* nas 4 fases do ciclo de vida de *Phytophthora nicotianae*: Zoósporo (Z), Hifa (H), Hifa com os Esporângios cheios (HEc) e Hifa com os Esporângios vazios (HEv). A expressão das fases foi analisada em relação à fase Zoósporos (Z). Fonte: dados da pesquisa.

A expressão relativa de genes *Bip* foi 11,236 vezes mais elevada em H do que em Z, e em HEv, 13,093 vezes mais, embora a diferença na expressão de *Bip* entre fases não tenha sido estatisticamente significativa. A expressão de *Bip* em HEc foi 1,073 vezes mais elevada que em Z, não representando também uma diferença estatística significativa (Tabela 2).

BiP é uma proteína presente no retículo endoplasmático, onde exerce um importante papel na translocação de proteínas pela membrana do retículo e na manutenção da permeabilidade dessa membrana (Gülow et al., 2002; Haigh & Johnson, 2002). É uma proteína codificada por um gene constitutivamente expresso, mas que é induzido por algumas condições de estresse, como choque térmico, ausência ou limitação de nutrientes, especialmente glicose, e por outras condições que afetem o transporte de proteína e maturação (Stedman & Buck, 1996). Quando uma quantidade de BiP suficiente está presente no retículo endoplasmático, a célula evita a transcrição desnecessária do gene *Bip* (Leborgne-Castel et al., 1999). Segundo Gülow et al. (2002), um mecanismo de controle transducional para a expressão de *Bip* poderia aumentar a eficiência da resposta do retículo endoplasmático ao estresse.

BiP liga-se a proteínas incompletas, imaturas destinadas à secreção, proteínas envolvidas em rotas secretoras e previne também a formação de agregados de moléculas protéicas no interior do retículo endoplasmático. Em *Pneumocystis carini*, BiP é uma proteína responsável pelo transporte, maturação e secreção de proteínas (Stedman & Buck, 1996). BiP parece ter funções relacionadas às fases vegetativas do ciclo de vida de *Phytophthora nicotianae*, contribuindo com a secreção de outras proteínas extracelulares mais nas fases vegetativas do que propagativas.

O gene *Transglutaminase* teve a expressão nas fases H e HEv de 46,033 e 45,037 vezes respectivamente maior que a expressão na fase Z. Na fase HEc, a expressão foi de 2,039 vezes maior que na fase Z, inferindo-se que a expressão

difere estatisticamente entre as fases H e HEv, e Z e HEc (Tabela 2). Em *P. infestans*, essa proteína é expressa em todos os estádios do seu ciclo de vida, incluindo o processo de infecção na planta (Fabritius & Judelson, 2003). Neste trabalho, a expressão relativa mais elevada em H e HEv indica uma expressão diferencial no padrão entre as fases de desenvolvimento de *P. nicotianae*, podendo ter um papel maior nas fases vegetativas do que propagativas analisadas, ou seja, no crescimento e acúmulo de biomassa do patógeno.

A expressão relativa do gene *Car* não diferiu estatisticamente entre as fases do ciclo de vida do patógeno. Os níveis de expressão nas fases H, HEc, e HEv foram de 47, 105; 23,28 e 53,933 vezes maiores do que a expressão na fase Z. A expressão de genes *Car* avaliada em *P. infestans* foi encontrada especificamente durante a germinação dos cistos e os estádios apressórios (Van West et al., 2003). Apesar de Görnhardt et al. (2000) atentarem para o fato de que seu período de expressão é curto, e que se encerra quando *Phytophthora* invade a primeira célula hospedeira, a expressão de genes *Car* parece estar associada também ao desenvolvimento do patógeno no tecido hospedeiro, até que a fase propagativa seja iniciada, e ao seu controle metabólico.

As proteínas *Car* são homólogas às mucinas de mamíferos e estão localizadas na superfície das estruturas pré-infectivas. São proteínas hidrofílicas e de estrutura flexível, que possuem um sinal de secreção. Essas proteínas adesivas podem ser componentes importantes da mucosa que protege o cisto germinado da dessecação, dano físico ou efeitos adversos da resposta de defesa das plantas. Uma vez que a expressão relativa dos genes *Car* de *P. nicotianae* estudado nesse trabalho não revelou elevados níveis em zoósporos, sua possível função associada à adesão na superfície foliar talvez esteja mais diretamente relacionada ao cisto do que mesmo a zoósporos.

A expressão de genes *Cbel* foi 31,131 vezes mais em H do que em Z, diferindo essa fase das demais. Similarmente, a expressão de genes *Cbel* em

HEc foi 10,6 vezes maior do que em Z, diferindo essa fase também das demais. Entretanto, a expressão de genes *Cbel* nas fases Z e HEc não foi estatisticamente diferente entre si, diferindo, porém, das demais fases (Tabela 2).

CBEL é uma proteína de ligação à celulose, isolada de *P. nicotianae*. CBEL está presente na superfície de fungos durante a invasão da planta hospedeira, ligando-se à celulose da parede celular de plantas. Por isso, sugere-se que CBEL seja uma glicoproteína que tem papel no ataque de fungos à superfície de células hospedeiras. Ela exerce uma função na sinalização, já que induz resposta de defesa em plantas de fumo, quando numa concentração de 150 nM (Villalba Mateos et al., 1997). Uma função atribuída a CBEL é sua participação na morfogênese de agregados de hifa, o que pode explicar sua maior expressão nessa fase, e na deposição de parede celular em *Phytophthora*. Seu peptídeo sinal é funcional no direcionamento das proteínas para espaços extracelulares (Gaulin et al., 2006).

A expressão do gene *Ric1* foi significativamente maior nas fases H e HEv (67,258 e 52,282 vezes, respectivamente maiores em relação a Z) (Tabela 2). A expressão dessas duas fases diferiram-se da expressão da fase HEc (18,941 vezes maior que em Z) que, por sua vez, diferiu-se também da fase Z. Esses resultados são coincidentes com os resultados de Van West et al. (1999), que encontraram expressão de *Ric1* em todas as fases do ciclo de vida de *P. infestans*, porém, com maior expressão de *Ric1* no micélio do patógeno. Além disso, os autores afirmaram que RIC1 é uma proteína componente da membrana do patógeno, responsável pela manutenção da integridade dessa membrana, especialmente sob condições desfavoráveis. Os maiores níveis de expressão de *Ric1* nas fases vegetativas de *P. nicotianae* podem ser explicados pelo grande acúmulo de biomassa observado nessa fase, já que é uma proteína relacionada à manutenção da integridade de membranas.

Tabela 2 - Expressão média dos genes *BiP*, *Transglutaminase*, *Car*, *Cbel* e *Ric1* em 4 fases do ciclo de vida de *P. nicotianae*: Zoósporos (Z), Hifa (H), Hifa com os Esporângios cheios (HEc) e Hifa com os Esporângios vazios (HEv), pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. A expressão foi relativa à fase Zoósporos (Z). Fonte: dados da pesquisa.

Fases	Genes				
	<i>BiP</i>	<i>Transglut.</i>	<i>Car</i>	<i>Cbel</i>	<i>Ric1</i>
Z	1 b	1 b	1 a	1 c	1 c
H	11,236 a	46,033 a	47,105 a	31,131 a	67,258 a
HEc	1,073 b	2,039 b	23,28 a	3,81 c	18,941 b
HEv	13,093 a	45,037 a	53,933 a	10,6 b	52,282 a

* Médias da mesma coluna não seguidas por mesma letra diferem pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os dados são médias de três repetições.

4.3.2 Expressão dos genes 14-3-3 e Syntaxin6

O perfil de expressão desses dois genes destaca-se por ter havido uma expressão maior na fase hifa (H) do que nas demais fases. Ao contrário do que aconteceu para o grupo anterior de genes (item 4.3.2.), o perfil de expressão na fase HEv não acompanhou os padrões alcançados na fase H (Figura 6).

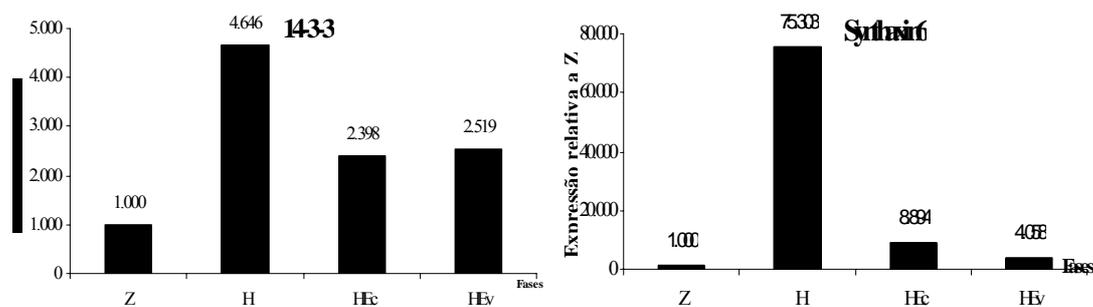


Figura 6 – Expressão dos genes *14-3-3* e *Syntaxin6* nas 4 fases do ciclo de vida de *Phytophthora nicotianae*: Zoósporo (Z), Hifa (H), Hifa com os Esporângios cheios (HEc) e Hifa com os Esporângios vazios (HEv). A expressão das fases foi analisada em relação à fase Zoósporos (Z). Fonte: dados da pesquisa.

A expressão de genes do tipo *14-3-3* apresentou níveis estatisticamente iguais em todas as fases avaliadas. A expressão de *14-3-3* nas fases H, HEc e HEv foi de 4,646, 2,398 e 2,519, respectivamente maior do que em Z (Tabela 3).

Segundo Sehnke et al. (2002), mudanças no estado de ativação de proteínas induzidas por fosforilação necessitam de associação com a proteína 14-3-3, o que contribui na transição para a mudança da atividade protéica, completando uma etapa importante em cascatas de transdução de sinais. A proteína 14-3-3 é, portanto, uma proteína regulatória que se liga fisicamente a proteínas fosforiladas ou não, influenciando na transição da mudança para o estado ativo da proteína fosforilada, completando as vias de transdução de sinais.

Proteínas que interagem com isoformas de 14-3-3 estão envolvidas na regulação do ciclo celular, atuando no tráfico intracelular, secreção, transdução de sinais, estrutura do citoesqueleto e transcrição (Aitken et al., 2002). Dentre as proteínas às quais 14-3-3 se liga, estão a quinases, fosfatases e outras proteínas de sinalização.

Em vários organismos, as 14-3-3 tem um papel pivotal no crescimento e desenvolvimento das células, incluindo, por exemplo, *Saccharomices cerevisiae* e *Drosophila melanogaster*. Em *Saccharomices cerevisiae*, essas proteínas são essenciais para a cascata de sinalização durante a diferenciação pseudohifa (Roberts et al., 1997). É possível que essa proteína 14-3-3 exerça um importante papel no crescimento de *P. nicotianae*. O pico de expressão na fase de hifa sugere uma atuação na cascata de fosforilação, podendo estar contribuindo tanto para a transdução de sinais como para a secreção de proteínas efectoras nesse patógeno.

Já o gene *Syntaxin6*, a expressão na fase H foi 75,3 vezes maior que em Z, e na fase HEv, ele se expressou apenas 4,05 vezes mais que em Z. Em HEc, a

expressão foi 8,894 vezes maior que em Z, e em HEv, esse valor foi de 4,058. No entanto, apenas a fase H diferiu-se estatisticamente das demais (Tabela 3).

As syntaxinas são proteínas-membros da superfamília de proteínas SNARE (soluble NSF attachment receptors), presentes em eucariotos e que desempenham uma relevante função no tráfico através da membrana. As syntaxinas podem representar uma valiosa ferramenta como marcador para estudos de sistemas de endomembranas de microorganismos causadores de doenças em animais e plantas (Teng et al., 2001). Elas desempenham funções na neurotransmissão, transporte de vesículas, fusão de membranas e na reconstrução de compartimentos internos da membrana, em organismos como mamíferos, leveduras, protistas e algas (Dacks & Doolittle, 2002). Teng et al. (2001), estudando syntaxinas de mamíferos, encontraram moléculas de syntaxina6 em alguns compartimentos do complexo de Golgi, exercendo a função de se fundirem a grânulos de secreção que ainda estejam imaturos.

Tabela 3 - Expressão média dos genes *14-3-3* e *Syntaxin6* em 4 fases do ciclo de vida de *P. nicotianae*: Zoósporos (Z), Hifa (H), Hifa com os Esporângios cheios (HEc) e Hifa com os Esporângios vazios (HEv), pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. A expressão é relativa à fase Zoósporos (Z). Fonte: dados da pesquisa.

Fases	Genes	
	14-3-3	Syntaxin6
Z	1 a	1 b
H	4,646 a	75,303 a
HEc	2,398 a	8,894 b
HEv	2,519 a	4,058 b

* Médias da mesma coluna não seguidas por mesma letra diferem pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os dados são médias de três repetições

4.2.3 Expressão do gene Megaspermina

O gene Megaspermina apresentou um padrão de expressão mais diferenciado dos demais. Sua expressão foi maior na fase Z do que nas outras fases (Figura 7).

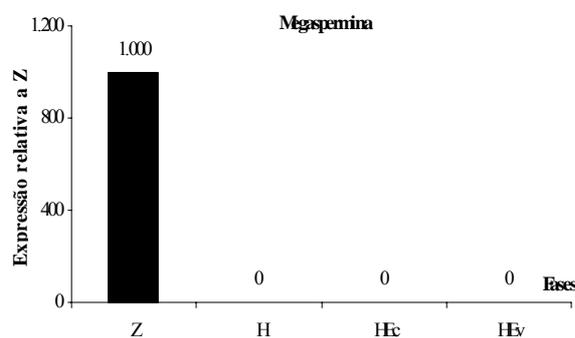


Figura 7 - Expressão do gene Megaspermina nas 4 fases do ciclo de vida de *Phytophthora nicotianae*: Zoósporo (Z), Hifa (H), Hifa com os Esporângios cheios (HEc) e Hifa com os Esporângios vazios (HEv). A expressão das fases foi analisada em relação à fase Zoósporos (Z). Fonte: dados da pesquisa.

Os níveis de expressão do gene *megaspermina* para as fases H, HEc e HEv, em relação à fase Z, foram respectivamente de 0,48, 0,58 e 0,32, não diferindo estatisticamente entre si (Tabela 4). A proteína megaspermina é uma elicítina isolada de *Phytophthora megasperma*, que possui um peptídeo sinal de 20 aminoácidos. Essa proteína, pela sua função, provavelmente causa necrose nas plantas de citros como resposta de defesa. No entanto, nas condições testadas neste trabalho, megaspermina não foi expressa em nenhuma das fases vegetativas e propagativas do ciclo de vida de *P. nicotianae*.

Tabela 4 - Expressão média do gene *Megaspermina* em 4 fases do ciclo de vida de *P. nicotianae*: Zoósporos (Z), Hifa (H), Hifa com os Esporângios cheios (HEc) e Hifa com os Esporângios vazios (HEv), pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. A expressão é relativa à fase Zoósporos (Z).
Fonte: dados da pesquisa.

Fases	Gene
	<i>Megaspermina</i>
Z	1 a
H	0,482 a
HEc	0,584 a
HEv	0,325 a

* Médias da mesma coluna não seguidas por mesma letra diferem pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os dados são médias de três repetições.

5 CONCLUSÕES

- A condição adequada para o cultivo de *P. nicotianae* de citros *in vitro*, visando à separação de fases do seu ciclo de vida, é em meio de cenoura líquido distribuído em erlenmeyers, a 25° C sob luz constante;
- A condição adequada para induzir a produção de esporângios de *P. nicotianae in vitro* é o cultivo ininterrupto do patógeno em meio cenoura líquido em erlenmeyers, a 25° C sob luz constante, por 25 dias;
- Esporângios de *P. nicotianae* não são caducos como descritos na literatura, e é possível que existam condições adequadas *in vitro* para separá-los da hifa;
- O perfil de expressão dos genes *BiP*, *Transglutaminase*, *Car*, *Cbel* e *Ric1* é similar, com maior expressão nas fases de hifa e hifa com esporângios vazios, entre as fases do ciclo de vida de *P. nicotianae* de citros estudadas;
- Genes do tipo *Megaspermina* são mais expressos em zoósporos do que em hifa, esporângios cheios e vazios;
- Genes do tipo 14-3-3 e Sintaxina são mais expressos em hifa do que nas outras fases estudadas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelos resultados alcançados nesta tese, pôde-se determinar que genes que codificam proteínas extracelulares de *P. nicotianae* são relativamente expressos na fase propagativa assexual hifa e hifa com esporângios vazios e na fase reprodutiva zoósporos. Para proteínas do tipo Car, CBEL, Transglutaminase, Megaspermina e Ric1 de *Phytophthora nicotianae* aqui estudados, devem ser testados quanto a essa resposta em plantas de citros. Por outro lado, genes do tipo BiP, 14-3-3 e Sintaxina devem participar dos processos de secreção dessas proteínas, contribuindo com a secreção de proteínas efetoras e indiretamente com o processo de infecção da planta por *Phytophthora nicotianae*. Este trabalho é parte substancial de um projeto maior que visa à exploração do banco de dados CitEST/PP por ESTs de *P. nicotianae* de citros que codificam proteínas extracelulares. Isso porque proteínas que são secretadas em diferentes fases do ciclo de vida do patógeno tanto podem participar do processo de patogenicidade e aumentar sintomas de doença em plantas suscetíveis quanto podem ser reconhecidas pela planta (molécula PAMP ou AVR) levando à indução de respostas de defesa em plantas resistentes.

Os avanços em diversas áreas da biotecnologia, especialmente engenharia genética e genômica funcional, têm proporcionado o estabelecimento de inúmeros processos visando à melhoria das características agrônômicas de culturas de interesse econômico e à geração de moléculas que serão moldes para a criação de produtos comerciais indutores de resistência de plantas a pragas agrícolas e doenças, que sejam saudáveis para o homem e para o meio ambiente.

Portanto, o estudo dessas moléculas protéicas pode contribuir para a futura obtenção de indutores comerciais de resistência de plantas de citros. Para isso, será necessária ainda a realização de ensaios para selecionar as proteínas

que, em contato com a célula hospedeira, irão desencadear uma resposta de defesa por parte da planta. Uma estratégia importante a ser empregada nesse processo é a agroinfiltração de moléculas efetoras de *P. nicotianae* candidatas, identificadas no banco de dados CitEST/PP, em plantas de citros.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Associação Brasileira dos Exportadores de Citros. **Exportações de suco concentrado de laranja**. Disponível em: <http://www.abecitrus.com.br/exporta_br.html>. Acesso em: 20 ago. 2007.
- ABRAMOVITCH, R.B.; MARTIN, G.B. Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. **Curr. Opin. Plant Biology**, v.7, p.356–364, 2004.
- AITKEN, A.; BAXTER, H.; DUBOIS, T.; CLOKIE, S.; MACKIE, S.; MITCHELL, K.; PEDEN, A.; ZEMLICKOVA, E. 14-3-3 Proteins in Cell Regulation. **Biochemical Society Transactions**, v.30, part 4, 2002.
- ALTSCHUL, STEPHEN 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 Res.**, v.25, p.3389-3402, 1997.
- AMORIM, E.P.R.; MELO, I.S. Ação antagonística de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v.24, n.2, p.565-568, ago. 2002.
- ARMSTRONG, M.R.; WHISSON, S.C.; PRITCHARD, L.; BOS, J.I.B.; VENTER, E.; AVROVA, A.O.; REHMANY, A.P.; BÖHME, U.; BROOKS, K.; CHEREVACH, I.; HAMLIN, N.; WHITE, B.; FRASER, A.; LORD, A.; QUAIL, M.A.; CHURCHER, C.; HALL, N.; BERRIMAN, M.; HUANG, S.; KAMOUN, S.; BEYNON, J.L.; BIRCH, P.R.J. An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene Avr3a, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. **PNAS**, v.102, n.21, p.7766–7771, May, 2005.
- BAILLIEUL, F.; RUFFRAY, P.; KAUFFMANN, S. Molecular cloning and biological activity of α , β , and γ megaspermin, three elicitors secreted by *Phytophthora megasperma* H20. **Plant Physiology**, v.131, p.155–166, Jan. 2003.
- BOISSY, G.; O'DONOHUE, M.; GAUDEMER, O.; PEREZ, V.; PERNOLLET, J.C.; BRUNI, S. A structure of an elicitor-ergosterol complex: a recent addition to the sterol carrier protein family. **Protein Science**, Cambridge, v.8, p.1191–1199, 1999.

BONALDO, S.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; TESSMANN, D.J.; SCAPIM, C.A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.128-134, 2004.

BRUNNER, F.; ROSAHL, S.; LEE, J.; RUDD, N. J.; GEILER, C.; KAUPPINEN, S.; RASMUSSEN, G.; SCHEEL, D.; NÜRNBERGER, T. Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases **The EMBO Journal**, v.21, v.24, p.6681-6688, 2002.

COLBURN, G.C. **Biological and molecular characterization of a hypovirulent isolate of *Phytophthora nicotianae* on citrus**. Florida: University of Florida, 2004. 113p.

CVITANICH, C.; JUDELSON, H. S. A gene expressed during sexual and asexual sporulation in *Phytophthora infestans* is a member of the puf family of translational regulators. **Eukaryotic Cell**, v.2, n.3, p.465-473, June 2003.

DACKS, J.B.; DOOLITTLE, W.F. Novel syntaxin gene sequences from *Giardia*, *Trypanosoma* and algae: implications for the ancient evolution of the eukaryotic endomembrane system. **Journal of Cell Science**, v.115m n.8, p.1635-1642, 2002.

ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. **Phytophthora diseases worldwide**. [S.l.]: APS, 1996.

FABRITIUS, A.L.; JUDELSON, H. S. A mating-induced protein of *Phytophthora infestans* is a member of a family of elicitors with divergent structures and stage-specific patterns of expression. **MPMI**, v.16, n.10, p.926-935, 2003.

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

FOKUNANG, C.N.; BEYNON, J.L.; WATSON, K.A.; BATTEY, N.H.; DUNWELL, J.M.; TEMBE-FOKUNANG, E.A. Advancement in genetic modification technologies towards disease resistance and food crop production. **Biotechnology**, v.3, n.1, p.1-20, 2004

Fundo de Defesa da Citricultura. **Viveiros e mudas**. Disponível em:
<http://www.fundecitrus.com.br/menu_br.html>. Acesso em: 22 ago. 2007.

GASTEIGER, E.; GATTIKER, A.; HOOGLAND, C.; IVANYI, I.; APPEL R.D.; BAIROCH, A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Res.**, v.31, p.3784-3788, 2003.

GAULIN, E.; DRAMÉ, N.; LAFITTE, C.; TORTO-ALALIBO, T.; MARTINEZ, Y.; AMELINE-TORREGROSA, C.; KHATIB, M.; MAZARGUIL, H.; VILLALBA-MATEOS, F.; KAMOUN, S.; MAZARS, C.; DUMAS, B.; BOTTIN, A.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T.; RICKAUER, M. Cellulose binding domains of a phytophthora cell wall protein are novel pathogen-associated molecular patterns. **The Plant Cell**, v.18, p.1766–1777, July 2006.

GÖRNHARDT, B.; ROUHARA, I.; SCHMELZER, E. Cyst Germination Proteins of the Potato Pathogen *Phytophthora infestans* Share Homology with Human Mucins. **MPMI**, v.13, n.1, p.32–42, 2000.

GOTESSON, A.; MARSHALL, J. S.; JONES, D.A.; HARDHAM, A.R. Characterization and evolutionary analysis of a large polygalacturonase gene family in the oomycete plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, v.15, 907–921, 2002.

GRAHAM, J.H.; TIMMER, L.W. **Florida citrus pest management guide: Phytophthora foot rot and root rot**. [S. l.: s.n], 2007. 6p.

GRAHAM, J.H.; TIMMER, L.W.; DROUILLARD, D.L.; PEEVER, D.T.L. Characterization of *Phytophthora* spp. causing outbreaks of citrus brown rot in Florida. **Phytopathology**, v.88, n.7, p.724-729, 1998.

GÜLOW, K.; BIENERT, D.; HAAS, I.G. BiP is feed-back regulated by control of protein translation efficiency. **Journal of Cell Science**, v.115, p.2443-2452, 2002.

HALDAR, K.; KAMOUN, S.; HILLER, N.L.; BHATTACHARJE, S.; VAN OOIJ, C. Common infection strategies of pathogenic eukaryotes. **Microbiology**, v.4, p.922-931, Dec. 2006.

HARDHAM, A.R. Cell biology of plant–oomycete interactions. **Cellular Microbiology**, v.9, n.1, p.31–39, 2007.

HAIGH, N. G.; JOHNSON, A. E. A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane. **The Journal of Cell Biology**, Volume 156, Number 2, January 21, 2002 261–270

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. **Genome Res.**, v.9, p.868-877, 1999.

Instituto Agronômico de Campinas. **Citros: principais informações e recomendações de cultivo**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Citros/Citros.htm>>. Acesso em: 22 ago. 2007.

IAKIMOVA, E.T.; MICHALCZUK, L.; WOLTERING, E.J. Hypersensitive cell death in plants – its mechanisms and role in plant defence against pathogens. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v.13, p.135-158, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>>. Acesso em: 20 ago. 2007.

JIANG, R.H.Y.; TYLER, B.M.; WHISSON, S.C.; HARDHAM, A.R.; GOVERS, F. Ancient origin of elicitor gene clusters in phytophthora genomes. **Mol. Biology Evol.**, v.23, n.2, p.338–351, 2006.

KAMOUN, S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. **Annual Rev. Phytopathol.**, v.44, p.2.1–2.20, 2005.

KAMOUN, S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. **Annual Rev. Phytopathol.**, v.44, p.41–60, 2006.

KAMOUN, S. Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, p.1–8, 2007.

KAMOUN, S.; LINDQVIST, H.; GOVERS, F. A novel class of elicitor-like genes from *Phytophthora infestans*. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v.10, p.1028–1030, 1997.

LAUGE, R.; DE WIT, P. J. Fungal avirulence genes: structure and possible functions. **Fungal Genetic Biology**, v.24, p.285–297, 1998.

LEBORGNE-CASTEL, N.; JELITTO-VAN DOOREN, E.P.W.M.; CROFTS, A.J.; DENECKE, J. Overexpression of bip in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. **The Plant Cell**, v.11, p.459–469, Mar. 1999.

LUZ, E.D.M.N.; SANTOS, A.F.; MATUOSKA, K.; BEZERRA, J.L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Editora Rural, 2001. 754p.

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

MAKAROVA, K.S.; WOLF, Y.I.; WHITE, O.; MINTON, K.; DALY, M.J. Short repeats and IS elements in the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* and comparison to other bacterial species. **Res. Microbiol.**, v.150, p.711–724, 1999.

MATHERON, M.E.; PORCHAS, M.; MATEJKA, J.C. Distribution and seasonal population dynamics of *Phytophthora citrophthora* and *P. parasitica* in Arizona citrus orchards and effect of fungicides on tree health. **Plant Disease**, v.81, p.1384-1390, 1997.

MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; FIGUEIREDO, J.O.; POMPEU JUNIOR, J. 1995. **CITROS**: principais informações e recomendações de cultivo. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Citros/Citros.htm>>. Acesso em: 20 ago. 2007.

MIKES, V.; MILAT, M.L.; PONCHET, M.; PANABIÈRES, F.; RICCI, P.; BLEIN, J.P. Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.245, p.133–139, 1998.

OEPP/EPP. **Bulletin OEPP/EPP Bulletin** 34, p.43–56, 2004.

PANABIÈRES, F.; BIRCHP, R.J.; UNKLES, S.E.; PONCHET, M.; LACOURT, I.; VENARD, P. Heterologous expression of a basic elicitor from *Phytophthora cryptogea* in *Phytophthora infestans* increases its ability to cause leaf necrosis in tobacco. **Microbiology**, v.144, p. 3343–3349, 1998.

PEMBERTON, C.L.; SALMOND, G.P.C. The Nep1-like proteins a growing family of microbial elicitors of plant necrosis. **Mol. Plant Pathology**, v.5, p.353–359, 2004.

PONCHET, M.; PANABIÈRES, F.; MILAT, M.L.; MIKES, V.; MONTILLET, J.L.; SUTY, L.; TRIANTAPHYLIDES, C.; TIRILLY, Y.; BLEIN, J.P. Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? **Cell. Mol. Life Science**, v.56, p.1020–1047, 1999.

POZO, M.J.; AZCÓN-AGUILAR, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; BAREA, J.M. β -1,3-Glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. **Plant Science**, v.141, p.149–157, 1999.

RESENDE, M.L.V.; BARRETTI, P.B.; MEDEIROS, F.C.L.; SILVA, D.D.; PEREIRA, R.B.; LINS, S.R.O.; PEREIRA, L.M.; CAMPOS, M.A. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **RAPP**, v.15, 2007. 70p. Paper.

ROBERTS, R.; H.-U. MÖSCH, H.U.; FINK, G.R. 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. **Cell**, v.89, p.1055–1065, 1997.

ROSA, D.D.; CAMPOS, M.A.; TARGON, M.L.P.N.; SOUZA, A.A. *Phytophthora parasitica* transcriptome, a new concept in the understanding of the citrus gummosis. **Genetics and Molecular Biology**, 2007. In press.

SANTOS, A.F. Comportamento diferenciado da gomose de *Phytophthora* em diferentes alturas ao longo de troncos de acácia-negra em Piratini-RS. **Biology Pesq. FI**, Colombo, n.43, p.145-150 jul./dez. 2001.

SANTOS, A.F. dos, LUZ, E.D.M.N.; SOUZA, J.T. de. *Phytophthora nicotianae*: agente etiológico da gomose da acácia negra no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.81-84, 2005.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Raleigh, v.30, n.3, p.507-512, 1974.

SEHNKE, P.C.; DELILLE, J.M.; FERL, R.J. Consummating signal transduction: the role of 14-3-3 proteins in the completion of signal-induced transitions in protein activity. **The Plant Cell**, S339–S354, 2002. Supplement.

SILVA, M.L.C.; MARTINEZ, P.F.; IZELI, N.L.; SILVA, I.R.; VASCONCELOS, A.F.D.; CARDOSO, M.S.; STELUTTI, R.M.; GIESE, E.C.;

SING, V.O.; BARTNICKI-GARCIA, S. Adhesion of *Phytophthora palmivora* zoospores: electron microscopy of cell attachment and cyst wall fibril formation. **Journal Cell Science**, v.18, p.123-132, 1975.

SIVIERO, A.; FURTADO, E.L.; BOAVA, L.P.; BARBASSO, D.V.; MACHADO, M.A. Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* em plântulas e plantas jovens de citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.6, nov./dez. 2002.

STEDMAN, T.T.; BUCK, G.A. Identification, characterization, and expression of the bip endoplasmic reticulum resident chaperonins in *Pneumocystis carinii*. **Infection And Immunity**, v.64, n.11, p.4463–4471, nov. 1996.

TANI, S.; JUDELSON, H. Activation of Zoosporogenesis-specific genes in *Phytophthora infestans* involves a 7-nucleotide promoter motif and cold-induced membrane rigidity. **Eukaryotic Cell**, v.5, n.4. p.745–752, Apr. 2006.

TEIXEIRA, J.E.C. **Genes de defesa de Citrus sunki e Poncirus trifoliata: expressão constitutiva e induzida por *Phytophthora parasitica***. Lavras: UFLA, 2005. 105p.

TENG, F.Y.H.; WANG, Y.; TANG, B.L. The syntaxins. **Genome Biology**, v.2, n.11, 2001.

TORTO, T.A.; LI, S.; STYER, A.; HUITEMA, E.; TESTA, A.; GOW, N.A.R.; VAN WEST, P.; KAMOUN, S. EST Mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. **Genome Research**, v.13, p.1675–1685, 2003.

VAN WEST, P.; APPIAH, A. A.; GOW, N.A.R. Advances in research on oomycete root pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.62, p.99–113, 2003.

VAN WEST, P.; KAMOUN, S.; VAN'T KLOOSTER, J. W.; GOVERS, F. Ric1, a *Phytophthora infestans* gene with homology to stress-induced genes. **Curr Genet.**, v.36, p.310-315, 1999.

VILLALBA MATEOS, F.; RICKAUER, M.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T.
Cloning and characterization of a cDNA encoding an elicitor of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* that shows cellulose-binding and lectin-like activities. **MPMI**, v.10, n.9, p.1045–1053, 1997.

VLEESHOUWERS, V.G.A.A.; DRIESPRONG, J.D.; KAMPHUIS, L.G.;
TORTO-ALALIBO, T.; VAN'T SLOT, K.A.E.; GOVERS, F.; VISSER,
R.G.F.; JACOBSEN, E.; KAMOUN, S. Agroinfection-based high-throughput
screening reveals specific recognition of INF elicitors in Solanum. **Molecular
Plant Pathology**, v.7, n.6, p.499-510, 2006.

ZHANG, S.; DU, H.; KLESSIG, D.F. Activation of the Tobacco SIP Kinase by
Both a Cell Wall-Derived Carbohydrate Elicitor and Purified Proteinaceous
Elicitins from *Phytophthora* spp. **The Plant Cell**, v.10, p.435–449, Mar.1998.

ZHENG, H.; CUI, C.L.; ZHANG, Y.T.; WANG, D.; JING, Y.; KIM, K.Y.
Active changes of lignification-related enzymes in pepper response to *Glomus intraradices* and/or *Phytophthora capsici*. Univ SCI: **Journal of Zhejiang
University Science**, v.6B, n.8, p.778-786, 2005.