

GENES DE DEFESA DE *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*: EXPRESSÃO CONSTITUTIVA E INDUZIDA POR *Phytophthora parasitica*

JULIANA ERIKA DE CARVALHO TEIXEIRA

2005

JULIANA ERIKA DE CARVALHO TEIXEIRA

**GENES DE DEFESA DE *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*: EXPRESSÃO
CONSTITUTIVA E INDUZIDA POR *Phytophthora parasitica***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Luciano Vilela Paiva

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

JULIANA ERIKA DE CARVALHO TEIXEIRA

**GENES DE DEFESA DE *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*: EXPRESSÃO
CONSTITUTIVA E INDUZIDA POR *Phytophthora parasitica***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 11 de fevereiro de 2005

Dr. Marcos Antonio Machado

Centro APTA Citros Sylvio Moreira

Prof Dr. Mário Lúcio V. de Resende

UFLA

Dr^a. Magnólia Araújo Campos

RD-CAPTACSM/LCBM – UFLA

Prof. Luciano Vilela Paiva
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

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

Teixeira, Juliana Erika de Carvalho

Genes de defesa de *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*: expressão constitutiva e induzida por *Phytophthora parasitica* / Juliana Erika de Carvalho Teixeira. --
Lavras : UFLA, 2005.

105 p. : il.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Citros. 2. Genes de defesa. 3. Expressão diferencial. 4. PCR quantitativo em tempo real. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.30423

“ ... Em tudo daí graças ao SENHOR.

Obrigada Senhor, porque debaixo do Sol existe um tempo para tudo,
tempo para plantar, tempo para colher, tempo para sorrir, tempo para chorar...
...tu me ensinas que tudo acontece no tempo certo, no Seu tempo certo e não
no meu tempo certo...”

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Júlio e Marília, por me inserir na vida acadêmica desde cedo e proporcionarem condições para chegar até aqui; aos meus irmãos, pelos quais sempre busco melhorar e servir de exemplo; aos meus avós, pelo exemplo de luta e sabedoria; ao Fabrício, pelo amor e carinho nos anos em que passamos juntos; e a toda minha família, principalmente a família Teixeira, por me ensinar o verdadeiro significado de família, pois por mais que existam desavenças e desentendimentos, estamos sempre unidos nos momentos mais importantes de nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, por meio do Departamento de Biologia, pela oportunidade de realização do curso de mestrado;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Prof. Dr. Luciano Vilela pela confiança em aceitar-me como sua primeira orientada, pela amizade e ensinamentos durante os anos em que trabalhamos juntos;

Ao Dr. Marcos A. Machado por abrir as portas do Centro APTA Citros Sylvio Moreira e permitir a realização deste trabalho, pelas valiosas sugestões e correções que, sem dúvida, ajudaram a enriquecer este trabalho.

À Dra. Magnólia A. Campos, pesquisadora e pessoa maravilhosa, pela amizade, orientação e por me ensinar não apenas biologia molecular, mas também pelo auxílio em todos os momentos da minha vida, e ao seu marido Ludwig por suportar sua ausência durante nossas viagens a Cordeirópolis;

À Dra. Alessandra A. Souza, um exemplo de pesquisadora, pela sua amizade, pela ajuda nos experimentos e sugestões, sempre me incentivando e apoiando;

Aos meus tios, Dr.Sérgio e Dra.Valdenice, por tudo que fizeram e fazem por mim, me acolhendo como uma filha em sua casa e por não medirem esforços em ajudar-me em tudo o que for preciso;

Ao Prof. Dr. Mário Lúcio V. de Resende por aceitar fazer parte da banca e pelas valiosas sugestões;

Aos Profs. Magno, César , João Bosco e Elaine pelos conhecimentos transmitidos durante o curso;

À amiga Marciane pelo auxílio nas análises estatísticas e na finalização deste trabalho;

Aos amigos de curso, Mansuêmia, Wel, Breno, Airton, Marcelo, Diogo, Dedé, Patrícia, Willian, Wila e Matheus, pelos anos de convivência e pelos agradáveis momentos de estudo em grupo;

A todos colegas e amigos da genética, especialmente Livia, Jacaré, Helton, Léo, Alex e Marcus, pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos;

Aos amigos do LCBM, Pedro, Nilson, Daniela, Paula, Sanzio e Anderson pela superação das dificuldades enfrentadas, as quais com certeza, nos ajudarão muito ao longo do nosso caminho;

Aos pesquisadores, funcionários e estagiários do Centro de Citricultura, em especial ao Dr. Gustavo Astua, pela colaboração e orientação e a Luís Fernando, Fabiana e Chica, pela ajuda nos experimentos e pela convivência agradável;

À secretária Elaine por sempre estar disposta a nos ajudar;

As minhas queridas amigas, Débora, Ju Campos, Aninha e Debinha, com as quais, apesar da distância, sempre pude contar em todos os momentos importantes da minha vida.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL	i
GENERAL ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1 – Mecanismos de resistência de citros a <i>Phytophthora parasitica</i>	01
1 INTRODUÇÃO GERAL	02
2 REFERENCIAL TEÓRICO	04
2.1 Importância das doenças causadas por <i>Phytophthora</i> spp. em citros.....	04
2.2 Medidas para controlar <i>Phytophthora</i> spp. em citros	08
2.3 Melhoramento dos Citros.....	09
2.3.1 Melhoramento dos citros visando resistência a <i>Phytophthora</i> spp.	12
2.4 Interações Planta-Patógeno	14
2.4.1 Interação Citros - <i>Phytophthora</i>	23
2.5 Técnicas utilizadas no estudo da expressão gênica	27
2.5.1 PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR)	30
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
CAPÍTULO 2 – Expressão diferencial de genes de defesa de citros e seu papel na resistência induzida por <i>Phytophthora parasitica</i>	43
RESUMO	44
ABSTRACT	45
1 INTRODUÇÃO	46
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1 Material Genético.....	48
2.2 Preparo do inóculo de <i>Phytophthora parasitica</i>	48
2.3 Bioensaio de inoculação de <i>Phytophthora parasitica</i>	49
2.4 Extração de RNA e síntese de cDNA	50

2.5 Síntese dos <i>primers</i> específicos	51
2.6 RT-PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	52
2.7 Confirmação dos dados de RT-qPCR	53
2.8 Análise e validação dos dados	54
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.1 Expressão diferencial de genes de defesa induzidos em plantas de citros por <i>Phytophthora parasitica</i>	55
3.1.1 Validação dos dados de RT-qPCR	57
3.1.2 Expressão de genes do tipo <i>PAL</i>	62
3.1.3 Expressão de genes do tipo <i>POX</i>	63
3.1.4 Expressão de genes do tipo <i>LOX</i>	65
3.1.5 Expressão de genes do tipo <i>PR-2</i>	67
3.1.6 Expressão de genes do tipo <i>PR-5</i>	68
3.2 Expressão diferencial de genes de defesa induzidos em plantas de citros por ferimento.....	70
4 CONCLUSÕES.....	76
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
CAPÍTULO 3 – A expressão constitutiva de genes do tipo <i>PR</i> pode ser usada para monitorar a resistência de citros a <i>Phytophthora</i> spp. ?.....	81
RESUMO	82
ABSTRACT	83
1 INTRODUÇÃO	84
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	85
2.1 Material Genético	85
2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA	85
2.3 RT-PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	86
2.4 Preparo e marcação das sondas com digoxigenina	86
2.5 <i>Southern blot</i>	87

2.6 Análise dos dados	88
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
3.1 Expressão constitutiva de genes do tipo <i>Glucanase</i> (<i>PR-2</i>) e <i>Osmotina</i> (<i>PR-5</i>)	89
3.2 Ocorrência de genes do tipo <i>Glucanase</i> (<i>PR-2</i>) e <i>Osmotina</i> (<i>PR-5</i>) no genoma de citros	94
4 CONCLUSÕES	97
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
ANEXOS	101

RESUMO

TEIXEIRA, J.E.C. **Genes de defesa de *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*: expressão constitutiva e induzida por *Phytophthora parasitica*.** 2005. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.*

A gomose dos citros, causada principalmente por *Phytophthora parasitica*, é uma das principais doenças em citros porque afeta todas as fases do desenvolvimento da planta. A melhor estratégia para o controle de *P. parasitica* de maneira sustentável é a utilização da resistência genética. O entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na interação citros-*Phytophthora* spp, que ainda permanecem desconhecidos, pode levar à elaboração de estratégias mais duradouras e eficientes para o controle deste oomiceto. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi quantificar a expressão constitutiva e induzida por *P. parasitica* de genes de defesa em citros, através de RT-PCR quantitativo em tempo real. A expressão induzida local e sistêmica de genes do tipo *PAL* (*Fenilalanina amonia liase*), *POX* (*Peroxidase*), *LOX* (*Lipoxigenase*), *PR-2* (β 1,3-*Glucanase*) e *PR-5* (*Osmotina*), envolvidos na defesa de plantas a patógenos, foi quantificada em plantas resistentes (*Poncirus trifoliata*) e suscetíveis (*Citrus sunki*) durante diferentes tempos após a inoculação com *P. parasitica*. A expressão constitutiva de genes do tipo *PR-2* e *PR-5* foi quantificada em *P. trifoliata*, *C. sunki* e híbridos entre eles. A expressão dos genes do tipo *PAL*, *POX*, *PR-5* foi mais rápida e em maior intensidade em *P. trifoliata* quando comparada a *C. sunki*. A expressão local de genes do tipo *PAL*, *POX*, *PR-2* e *PR-5* foi mais rápida e mais intensa, do que a expressão sistêmica em *P. trifoliata* e *C. sunki* e para genes do tipo *LOX* apenas em *C. sunki*. Somente o ferimento no caule, realizado no momento da inoculação, induziu um alto nível de expressão de todos os genes estudados, principalmente em *P. trifoliata*. No entanto, a presença do patógeno potencializou significativamente o padrão de expressão, com exceção dos genes que codificam Peroxidases. Estes resultados são evidências de que *P. trifoliata* apresenta padrões de expressão de genes de defesa característicos de planta resistente, durante interação do tipo incompatível, enquanto que *C. sunki*, de planta suscetível, durante interação compatível. A presença de genes do tipo *PR-2* e *PR-5* no genoma de *C. sunki*, *P. trifoliata*, *C. sinensi* e *C. limonia* foi confirmada por análise de *Southern blot*. Os vários

* Comitê de Orientação: Dr. Luciano Vilela Paiva– UFLA (Orientador), Dra. Magnólia Araújo Campos (Co-Orientadora) – RD-Centro APTA Citros Sylvio MoreiraLCBM – UFLA.

sinais de hibridização revelados são indicativos da ocorrência destes genes como famílias multigênicas no genoma destas espécies. O alto nível de expressão constitutiva de genes do tipo *PR-5* nestas plantas foi associado com a resistência de citros a *P. parasitica*. Portanto, os níveis basais de genes do tipo *PR-5* poderiam funcionar como biomarcadores para monitorar a resistência de citros a *P. parasitica* na seleção de materiais promissores em programas de melhoramento de citros.

ABSTRACT

TEIXEIRA, J. E. C. **Defence genes in *Citrus sunki* and *Poncirus trifoliata*: expression constitutive and induced by *Phytophthora parasitica*.** 2005. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.*

Citrus gummosis, caused mainly by *Phytophthora parasitica*, is one of the most important citrus diseases affecting all production phases. The use of genetic resistance is the best strategy for controlling *P. parasitica* having a lower impact on the environment. A better understanding of the molecular mechanisms involved in the interaction citrus-*Phytophthora* spp. would contribute to the elaboration of long term and efficient strategies for the control of this oomycete. The objective of this work was to quantify the constitutive and induced expression of citrus defense genes in response to *P. parasitica* using real time quantitative RT-PCR. The local and systemic induced expression of the *PAL* (*Phenylalanine ammonia-lyase*), *POX* (*Peroxidase*), *LOX* (*Lipoxigenase*), *PR-2* (β 1,3-*Glucanase*) and *PR-5* (*Osmotin*) like genes, involved in the plant pathogen defense, were monitored throughout time in resistant (*Poncirus trifoliata*) and susceptible (*Citrus sunki*) plants inoculated with the pathogen. The constitutive expression of *PR-2*- and *PR-5*-like genes was quantified in *P. trifoliata*, *C. sunki* and *C. sunki* x *P. trifoliata* hybrids. The expression of *PAL*, *POX*, *PR-5* like genes was quicker and higher in *P. trifoliata* than in *C. sunki*. The local expression of *PAL*, *POX*, *PR-2* and *PR-5* was quicker and higher than the systemic expression for *P. trifoliata* and *C. sunki* and for the *LOX* like gene just in *C. sunki*. The wounding caused during inoculation induced a high level of expression of all the studied genes, mainly in *P. trifoliata*. However, the presence of *P. parasitica* had a significant additive effect on the expression levels of the studied genes, except for the Peroxidase-encoded genes. The results suggest that *P. trifoliata* could be characterized as resistant to *P. parasitica* and *C. sunki* as susceptible by presenting patterns of defense genes expression typically of incompatible and compatible interactions, respectively. The presence of *PR-2* and *PR-5* genes in the genome the *C. sunki*, *P. trifoliata*, *C. sinensis*, *C. limonia* was confirmed by Southern blot analysis. The multiple hybridization signals obtained are indicative of the occurrence of these genes as a gene family

* Comitê de Orientação: Dr. Luciano Vilela Paiva- UFLA (Orientador), Dra. Magnólia Araújo Campos (Co-Orientadora) – RD-Centro APTA Citros Sylvio Moreira/LCBM- UFLA.

in the genome of these citrus species. The high constitutive expression of the *PR-5*-like genes was associated with the citrus resistance to *P. parasitica* and could be, therefore, used to monitor citrus resistance to *P. parasitica*, working as a biomarker for the selection of promising materials in citrus breeding programs.

CAPÍTULO 1

Mecanismos de resistência de citros a *Phytophthora* *parasitica*

1 INTRODUÇÃO GERAL

Tendo em vista a importância da cultura dos citros na economia e produção agrícola brasileira, um dos principais objetivos da pesquisa com citros é o estudo dos fatores que levam à redução desta produção. Entre eles merecem destaque as doenças, por provocarem sérios prejuízos à produção e demandarem recursos para proteção e controle em viveiros e pomares. Entre as principais doenças que afetam a citricultura estão aquelas causadas por *Phytophthora* spp., destacando-se a gomose, causada principalmente por *Phytophthora parasitica*, que além de provocar sérios danos e prejuízos a produção, causando doenças no colo, raízes e radículas no porta-enxerto, pode levar a planta à morte (Feichtenberger, 2001).

Para controlar a doença, em viveiros são erradicadas mudas infectadas e em condições de campo, é usado o controle químico, embora este tenha custo elevado e possa mascarar a evolução de sintomas. A utilização de variedades resistentes é o método mais econômico e eficiente. No entanto, o uso de porta-enxertos resistentes é limitado. Muitos deles são suscetíveis a outras importantes doenças dos citros, enquanto outros apresentam problemas de incompatibilidade com importantes cultivares-copas, como é o caso do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* e seus híbridos com citros.

O melhoramento tradicional para a obtenção de plantas de citros com resistência combinada a diferentes patógenos é demorado e tem sido dificultado por caracteres de ordem botânica e genética dentro do grupo dos citros. Novas estratégias efetivas e duradouras para controlar doenças causadas por patógenos em citros poderão surgir a partir do entendimento das relações planta-patógenos. Nesse contexto, o estudo do genoma comparativo e funcional de plantas de citros com resistência a gomose, com base em genes diferencialmente expressos

em porta-enxertos resistentes e suscetíveis, quando inoculados ou não com *Phytophthora parasitica*, poderá contribuir para a elucidação dos mecanismos de resistência de citros a esse oomiceto. Um incremento nestes estudos pode ser dado pelo monitoramento da expressão de genes que desempenham um papel fundamental na resposta de defesa do hospedeiro. Entre eles se destacam genes envolvidos nas diferentes rotas de sinalização de defesa, como os que codificam para as enzimas Fenilalanina amônia-liase, Lipoxigenase e Peroxidase, e genes que codificam para proteínas PR (*Pathogenesis-Related*), usados como marcadores da resposta de resistência do tipo HR (*Hypersensitive Response*) e SAR (*Systemic Acquired Resistance*).

Recentemente tem sido demonstrado que um alto nível de expressão constitutiva de genes PR é correlacionado com a resistência não específica de cultivares e híbridos de algumas espécies de plantas a oomicetos (Vleeshouwers et al., 2000). A investigação da expressão constitutiva de genes PR pode contribuir para elucidar o possível efeito destes genes na resistência de citros e seus híbridos a *P. parasitica*, bem como seu potencial uso como biomarcadores em programas de melhoramento de citros.

O objetivo geral deste trabalho foi analisar a expressão constitutiva e induzida por *Phytophthora parasitica* de genes de defesa em citros, através de RT-PCR quantitativo em tempo real. Para alcançar este objetivo, a estratégia utilizada envolveu a inoculação de plantas resistente (*P. trifoliata* (L.) Rafinesque) e suscetível (*C. sunki* Hort. Ex. Tanaka) com *Phytophthora parasitica* e a quantificação da expressão de genes do tipo PAL, POX, LOX, PR-2 e PR-5 durante diferentes tempos após indução. A caracterização da expressão destes genes sob o aspecto de interações Citros-*P. parasitica* está discutida no Capítulo 2. A análise da expressão constitutiva de genes do tipo PR-2 e PR-5 nestas plantas e em híbridos *C. sunki* x *P. trifoliata* está discutida no Capítulo 3, com enfoque para aplicação no melhoramento de citros.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância das doenças causadas por *Phytophthora* spp. em citros

A citricultura brasileira ocupa lugar de destaque no agronegócio mundial, posicionando o país como maior exportador de suco de laranja concentrado e principal produtor de citros, com faturamento em exportações estimado em 700 milhões de dólares em 2003/2004, centralizado principalmente em suco concentrado e subprodutos (FNP Consultoria & Comércio, 2004). O Estado de São Paulo é o principal produtor, seguido por Bahia, Sergipe e Minas Gerais. A produção paulista foi representada por 360 milhões de caixas na safra 2004/2005, aproximadamente 85% da produção brasileira (<http://www.financeone.com.br/>).

Embora a citricultura seja amplamente competitiva em âmbito mundial, a produtividade ainda é considerada baixa, com média de produção de 2,0 caixas/planta contra 6,0 caixas/planta obtidas pelos EUA, nosso principal concorrente (FNP Consultoria & Comércio, 2004). Um dos fatores que contribuem para esta baixa produtividade são os constantes ataques de patógenos relatados nos últimos anos. O impacto provocado pela CVC (Clorose Variegada dos Citros) e o cancro cítrico no começo da década de noventa, com a MSC (Morte Súbita dos Citros) a partir de 1999/2000 e, mais recentemente, com o aparecimento do Huanglongbing (HLB), trouxe mudanças para o sistema de produção de citros, além de reduzir a produtividade das plantas, cujo controle é difícil quando existe. Estes freqüentes ataques de patógenos são o resultado de uma citricultura que, além de ser monocultura, está fundamentada em poucas espécies de porta-enxertos e copas, possuindo 80% de suas plantas enxertadas em apenas uma variedade de porta-enxerto, o limoeiro ‘Cravo’ (Soares Filho et al., 2003).

Além destas doenças recentes, outras já bem conhecidas pelos citricultores continuam causando perdas todos os anos. *Phytophthora* spp. é um dos principais patógenos encontrados causando doenças em citros em todas as áreas produtoras do mundo. Os danos provocados por *Phytophthora* spp. em citros são estimados em 10 a 30% da produção mundial, causando prejuízos de milhões de dólares, uma vez que afeta todas as fases de desenvolvimento dos citros, e portanto, sua produção (Timmer et al., 2000; Soares Filho et al., 2003).

O gênero *Phytophthora*, hoje classificado como um oomiceto no reino cromista, um grupo diversificado de microorganismos heterotróficos que morfológica e fisiologicamente lembram fungos, mas que são filogeneticamente distantes deles, engloba várias espécies (Tyler, 2002). Dentre elas, onze estão associadas ao complexo de doenças causadas por *Phytophthora* em citros, *P. nicotiana* B. de Haan var. *parasitica* (Dast) Waterh (= *P. parasitica* Dast.), *P. citrophthora*, *P. citricola*, *P. syringae*, *P. hibernalis*, *P. palmivora*, *P. dreschleri*, *P. cinnamomi*, *P. megasperma*, *P. boehmeriae* e *P. cactorum*, distribuídas em todas as regiões produtoras de acordo com as condições climáticas. Cinco já foram descritas na América do Sul, mas apenas duas, *P. parasitica* e *P. citrophthora*, estão associadas às doenças presentes no Brasil (Rossetti, 2001). *P. parasitica* ataca principalmente as raízes e radículas, sendo menos freqüente na parte aérea das plantas. Predomina na maioria dos viveiros e pomares comerciais, ocorrendo mais freqüentemente em regiões quentes e subtropicais. É descrita atacando mais de 400 espécies de plantas. *P. citrophthora* ataca principalmente raízes e parte aérea, sendo mais adaptada a regiões de clima frio. É patogênica a mais de 83 plantas e tem como principal hospedeiro os citros (Erwin & Ribeiro, 1996; Feichtenberger, 2001).

As espécies *P. parasitica* e *P. citrophthora* possuem características em comum. A fase vegetativa é diplóide, e a haplóide é efêmera. Possuem micélio cenocítico, em geral heterotálicas; produzem esporângios apical e papilado,

normalmente persistentes e ocorre ausência de vesículas de liberação de zoósporos (esporo assexual móvel). Estruturas sexuais femininas (oogônia) e masculinas (anterídeo), que dão origem aos oósporos (esporo sexual), têm sido encontradas apenas em *P. parasitica*. Muitos isolados formam clamidósporos, estrutura vegetativa que permite a sobrevivência do oomiceto em períodos menos favoráveis no solo e matéria orgânica em decomposição (Erwin & Ribeiro, 1996).

A formação de esporângios pode ser repetida várias vezes durante o período chuvoso. Os esporângios podem germinar diretamente, formando um tubo germinativo, ou soltando os zoósporos, biflagelados, que nadam nas gotas de água, fixando-se nos tecidos das plantas e atacando-os. Um dos flagelos dos zoósporos é curto e lhe dá a direção (tinsel); o outro é longo (splash) e lhe dá o movimento. A infecção geralmente se dá pelos zoósporos quando há muita umidade. O ataque severo está associado a períodos prolongados de tempo chuvoso ou úmido. Os zoósporos são atraídos para as partes machucadas das plantas, por onde penetram diretamente, por exudados das raízes e radículas, e podem também penetrar em tecidos de folhas novas, ramos verdes e pela casca do tronco, onde encistam, germinam e penetram diretamente (Rossetti, 2001).

Várias doenças são causadas por *Phytophthora* em citros. Em viveiros de citros, um dos sintomas comumente observados é o tombamento de plantas, que pode ser causado por vários patógenos como *Phytophthora* spp., *Pythium* spp. e *Rhizoctonia solani*, que afetam a região do colo das mudas (Rossetti, 2001; Feichtenberger, 2001).

A podridão de radículas pode ser causada por *P. parasitica* e *P. citrophthora*, na superfície ou imediatamente abaixo da superfície do solo. O principal sintoma é a redução significativa no número de radículas, que ficam escuras e podem provocar amarelecimento e morte na planta atacada (Feichtenberger, 2001; Rossetti, 2001).

Diversas espécies de *Phytophthora* podem provocar a podridão parda dos frutos localizados no terço inferior da planta. A infecção se dá por esporos móveis (zoósporos) do patógeno, que são carregados do solo para a parte aérea das plantas via respingos de água. Os frutos contaminados apresentam uma podridão seca e odor característico, inicialmente com pequenas lesões de cor marrom, que podem atingir grandes áreas do fruto (Feichtenberger, 2001; Rossetti, 2001).

A gomose é o principal sintoma que ocorre no campo. É caracterizada pela morte de tecidos internos na casca e do lenho, visível quando removida a casca na região do tronco da planta, com exudação de goma, seca e fendilhamento da casca. Pode levar à podridão de raízes e radículas e provocar a morte da planta (Timmer et al., 2000). Apenas exsudação da goma pode não ser indício de *Phytophthora* spp., pois outros fungos patogênicos, como *Dothiorella gregária*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rosellinia* spp., *Macrophomina* sp., *Botrytis cinerea*, o viróide da exocorte ou ainda ferimentos provocados por nematóides, áfideos, insetos, produtos químicos e pelo homem, via ferramentas e equipamentos, podem provocar este sintoma (Feichtenberger, 2001).

Condições de alta temperatura e umidade relativa do ar e solo são favoráveis ao desenvolvimento da gomose. Práticas culturais mal realizadas, como falta de aeração no solo, drenagem e excesso de irrigação, além da presença de outros patógenos como vírus, estado de vegetação da planta e cultivar copa podem favorecer o seu desenvolvimento (Siviero, 2001).

Todas estas características fazem de *Phytophthora* um patógeno potencialmente destrutivo e epidêmico, especialmente *P. parasitica*, que possui estruturas sexuais, podendo ocorrer *mating types*, e estruturas capazes de resistir a condições adversas de temperatura e seca, presentes nos viveiros e no campo durante o ano inteiro. Assim, medidas de controle precisam ser tomadas para evitar que a doença leve à morte de plantas no viveiro e no campo.

2.2 Medidas para controlar *Phytophthora* spp. em citros

Várias medidas de controle são recomendadas para gomose. Práticas culturais como plantio de mudas saudáveis e em locais onde a umidade não seja alta, manejo adequado do mato, cirurgia e evitar ferimentos na planta são recomendadas para evitar o aparecimento dos sintomas (Feichtenberger, 2001). A utilização de fontes de matéria orgânica em substratos comerciais de mudas e no campo tem sido muito pesquisada nos últimos anos, pois favorece a microflora do solo antagonista a *Phytophthora* spp. (Velazco, 2002).

O controle químico visa reduzir a população do patógeno via aplicação de produtos sistêmicos como metalaxyl, que mata diretamente o patógeno, e o fosetyl-Al, que tem ação fungistática. Em baixas concentrações o fosetyl-Al estimula os mecanismos de defesa da planta, via produção de fitoalexinas, e quando presente em altas concentrações, degrada-se em ácido fosfórico, que é altamente tóxico a *Phytophthora* spp. (Afek & Sztejber, 1989). A pulverização e pincelamento de ramos e troncos com produtos à base de cobre também têm sido recomendados.

Práticas de controle alternativas que visem diminuir os danos ao meio ambiente têm sido alvo de várias pesquisas nos últimos anos. O fungo *Trichoderma* spp pode ser utilizado no controle biológico, pois apresentou hiperparasitismo *in vitro* e foi efetivo na erradicação de *P. parasitica* em substratos usados para a produção de mudas (Amorim, 1997). A utilização de compostos que induzem a resistência de plantas também têm sido testada em pós-colheita de citros (Cardoso Filho, 2003), porém poucos resultados foram ainda obtidos.

O controle genético da gomose, via utilização de porta-enxertos resistentes ou tolerantes ao patógeno, é a medida mais eficiente e indicada, por ser de menor custo, facilmente exequível e por reduzir o impacto de produtos

químicos no ambiente (Feichtenberg, 2001). Os principais porta-enxertos utilizados atualmente apresentam suscetibilidade a *Phytophthora* spp.

2.3 Melhoramento dos Citros

Os citros são classificados na família *Rutaceae*, subtribo *Citrinae* e possuem três gêneros com importância econômica: *Citrus*, que compreende as laranjas doces, laranjas azedas, limões, tangerinas, limas ácidas, limas doces, pomelos e cidras, *Fortunella* e *Poncirus*. Entre eles é possível a polinização com a produção de híbridos, algumas vezes de interesse comercial (Moreira & Pio, 1991).

O melhoramento dos citros para variedades porta-enxerto ou copa pode ser realizado por seleção de genótipos superiores ou por cruzamentos controlados (hibridação). O fato de os *Citrus* e gêneros relacionados formarem híbridos com certa facilidade tem criado um grupo de plantas com boas características para o melhoramento. Visando explorar a variabilidade existente nas diferentes espécies dos citros, via cruzamentos, novas combinações de cultivares copas e porta-enxertos vêm sendo utilizadas (Cristofani, 1997; Siviero, 2001; Soares Filho, et al., 2003).

Apesar da facilidade de cruzamento, a obtenção de novas variedades em *Citrus* tem sido prejudicada por uma série de fatores relacionados às características biológicas de suas espécies. O longo ciclo reprodutivo, a alta heterozigosidade, esterilidade, apomixia, juvenilidade prolongada e depressão por endogamia limitam o melhoramento de citros pelos métodos convencionais bem como seus estudos genéticos (Cristofani & Machado, 1999; Amaral et al., 2001). Mutações espontâneas ocorrem com frequência em citros e tiveram um papel muito importante no seu processo evolutivo. Práticas como enxertia e estaquia, comumente utilizadas na cultura, facilitaram a conservação e o

acúmulo destas mutações, as quais foram as principais responsáveis pelo desenvolvimento de grande parte da variabilidade existente hoje (Dantas et al., 2001).

Outro problema que dificulta os trabalhos de melhoramento é o desconhecimento do modo de herança das características desejadas (Cristofani, 1997). Apenas algumas características monogênicas como resistência ao nematóide *Tylenchulus semipenetrans*, resistência ao vírus da tristeza dos citros (CTV), embrião nucelar e folha trilobada de *Poncirus trifoliata* e características quantitativas, como tamanho do fruto, cor, níveis de acidez e tolerância a *P. parasitica*, são conhecidas (Cristofani, 1997). Parte das limitações do melhoramento clássico de citros tem sido superada através da utilização de marcadores moleculares, que passaram a ser ferramentas essenciais na seleção de híbridos sexuais e na ampliação das combinações genéticas através de cruzamentos (Cristofani & Machado, 1999).

Os principais enfoques do melhoramento de citros têm sido direcionados para a busca de plantas, principalmente os porta-enxertos, com maior resistência a pragas e doenças e tolerância ao estresse ambiental (frio, seca, salinidade, acidez). Nas variedades copas buscam-se facilidade de descascamento e melhor coloração dos frutos, sem comprometer seu valor para o mercado *in natura* ou indústria, ampliação do período de safra, menor número de sementes, porte menor e efeito ornamental das plantas (Moreira & Pio, 1991; Machado, 1997).

Entre as combinações parentais interespecíficas, o cruzamento entre *C. sunki* e *P. trifoliata* é uma das mais exploradas devido às suas características contrastantes, principalmente resistência a doenças (Cristofani, 1997; Carvalho, 2000). Historicamente, o melhoramento de porta-enxertos no Brasil foi realizado a partir da seleção de plantas existentes nos bancos de germoplasma e de genótipos provenientes de programas de melhoramento conduzidos no exterior, principalmente nos EUA. O desenvolvimento de híbridos de citros para copas e

porta-enxertos no Brasil é recente e teve um grande impulso na década de 90, com contribuição significativa do Instituto Agronômico de Campinas – IAC e CNPME/Embrapa (Machado, 1997; Soares Filho et al., 2003).

A tangerina ‘Sunki’ tem origem no sudeste da China. Indicado como porta-enxerto para laranjas, tangerinas e pomelos, possui diversas características desejáveis como comportamento semelhante ao da tangerina ‘Cleópatra’ (*C. reshni* Hort. ex. Tanaka) na formação de copa, tolerância ao CTV, xiloporose, sorose, declínio, tolerância a solos salinos e à seca. Possui porte médio, folha lisa e pecíolo não alado, espinhos curtos e é bastante produtiva. Os frutos são pequenos, de coloração laranja intenso, odor característico, casca fina, não são comestíveis devido à alta acidez, possuem sementes pequenas, de bom poder germinativo e poliembriônicas com cotilédones verdes. No entanto, apresentam características indesejáveis como suscetibilidade a gomose e pequeno número de sementes viáveis por fruto (Pompeu Jr., 1991; Cristofani, 1997).

O porta-enxerto *Poncirus trifoliata* é a única espécie deste gênero. É um porta-enxerto muito utilizado no Japão, Uruguai e em países de clima temperado, sendo indicado para combinações com laranjas, limas ácidas e tangerinas. Induz excelente qualidade de suco, sendo ideal para regiões frias e úmidas, induz baixo vigor na planta, reduzindo o porte da copa e facilitando a colheita e o adensamento do pomar. Apresenta porte pequeno a médio e folhas trilobadas, caráter usado como marcador genético em programas de melhoramento. Os frutos possuem casca rugosa e sementes poliembriônicas de tamanho grande. Esta variedade apresenta boas características fitossanitárias, como alta resistência a gomose, a nematóides (*Tylenchulus semipenetrans* e *Pratylenchulus coffeae*), ao CTV e a xiloporose. No entanto, possui aspectos negativos, como suscetibilidade a exocorte, intolerância ao declínio, baixo desenvolvimento no viveiro, intolerante à seca, alta exigência quanto à fertilidade do solo e apresenta incompatibilidade com laranja ‘Pêra’, limões

verdadeiros e tangor ‘Murcott’ (Pompeu Jr., 1991; Cristofani, 1997; Feichtenberg, 2001).

2.3.1 Melhoramento de citros visando resistência a *Phytophthora* spp.

O controle de doenças dos citros através de resistência genética é a forma mais econômica e eficaz. Porém, para a maioria das doenças, a resistência genética não existe, tem sido observada em baixo nível ou é quebrada pela variabilidade genética do agente causal. Com isso, para um controle duradouro é necessária a participação de práticas culturais que visem diminuir a população do patógeno.

Tanto o melhoramento convencional quanto a biotecnologia têm sido muito utilizados visando obtenção de variedades resistentes. Os marcadores moleculares contribuem na localização de genes responsáveis pela resistência monogênica ou de regiões genômicas responsáveis pela resistência multigênica (QTL ou QRL). Alguns destes genes já foram identificados em citros, como aqueles responsáveis pela resistência ao nematóide *Tylenchulus semipenetrans* (Timmer et al., 2000), ao CTV (Deng, et al., 1997; Cristofani et al., 1999) e a *P. parasitica* (Siviero, 2001; Boava, 2004).

Uma grande variabilidade na resistência a gomose tem sido observada entre genótipos usados como porta-enxertos, tanto em condições de infecção natural como sob inoculação artificial (Rossetti, 2001). Em vários trabalhos pode-se notar diferenças na classificação de genótipos quanto à resistência a *Phytophthora* spp. Um mesmo genótipo pode ser classificado em mais de uma categoria de resistência/suscetibilidade, fato que pode estar relacionado a diversos fatores bióticos e abióticos envolvidos no patossistema citros-*Phytophthora* (Siviero, 2001).

Siviero (2001) relata que muitos fatores estão envolvidos na expressão da resistência de um dado genótipo a *Phytophthora* spp., dentre os quais destacam-se ambiente, espécie e isolado do patógeno, patogenicidade do isolado, presença ou ausência de outros patógenos na planta, método de inoculação e avaliação empregados, estado de vegetação do hospedeiro, idade da planta e aspecto nutricional, salinidade e pH do solo, grau de dormência da planta, suculência e vigor dos tecidos e o tipo de doença em estudo. Além disso, resultados obtidos sobre a resistência de genótipos a *Phytophthora* spp. em testes artificiais nem sempre correspondem à resistência de genótipos no campo.

A resistência de um dado genótipo a um dos tipos de sintomas causados por *Phytophthora* spp. não é garantia de resistência a outro tipo de sintoma. Os porta-enxertos limão ‘Cravo’ (*C. limonia*), laranja ‘Azeda’, tangerinas ‘Sunki’ e ‘Cleópatra’ e citrange ‘Carrizo’ (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *C. paradisi* Macfad.) são classificadas como moderadamente tolerantes ou intolerantes à podridão das radículas e raízes. No entanto, citrange ‘Carrizo’, laranja ‘Azeda’ e limão ‘Cravo’ são classificados como resistentes e/ou moderadamente resistentes a gomose (Carvalho, 2000; Feichtenberg, 2001).

Alguns porta-enxertos apresentam elevada resistência a *Phytophthora*, como o *P. trifoliata* e seus híbridos e laranja ‘Azeda’. Carvalho (2000) detectou que *P. trifoliata* é resistente às infecções de tronco e tolerante às infecções de raízes provocadas por *P. parasitica*. Este genótipo transmite mais acentuadamente a característica de resistência a gomose e a tolerância à podridão de radículas aos descendentes do que a laranja ‘Azeda’, constituindo um fator de grande importância para programas de melhoramento da cultura. No entanto, os porta-enxertos *P. trifoliata* e seus híbridos são menos difundidos no Brasil devido a problemas de incompatibilidade com a cultivar mais comum no país, a laranja ‘Pêra’. A laranja ‘Azeda’ apresenta o problema de suscetibilidade ao CTV, o que limita seu uso no Brasil.

Estudos realizados por inoculação de *Phytophthora* spp. na região de alongação das radículas apontam que genótipos resistentes e suscetíveis são igualmente infectados. Porém, quando se utiliza inoculação no colo da planta, mesmo em plântulas jovens, é possível diferenciar diferentes genótipos quanto à resistência a *Phytophthora* spp. (Siviero et al., 2004).

Trabalhos desenvolvidos em diversos centros de pesquisas em citros apontam ser a resistência a *Phytophthora* de natureza quantitativa, herança complexa e governada por múltiplos genes (Hutchison, 1985; Granam & Castle, 1993). No entanto, Laville (1975), analisando diversos trabalhos de resistência a doenças em citros, sugere que há uma sobreposição de mecanismos de resistência a *Phytophthora* spp., relatando haver duas categorias de herança de resistência uma do tipo oligogênica e outra do tipo poligênica. Siviero (2001), utilizando marcadores moleculares RAPD, encontrou 3 locos controladores para características quantitativas (QTL) associados a resistência a gomose de *Phytophthora* spp. em *P. trifoliata*, e 5 locos foram encontrados por Boava (2004). A resistência múltipla de porta-enxerto de citros às doenças causadas por *Phytophthora* spp., aos nematóides dos citros e ao CTV pode ser encontrada em *P. trifoliata*. No entanto, a herança da resistência pode se dar de forma independente para outros patógenos (Cristofani, 1997; Siviero, 2001).

2.4 Interações Planta-Patógeno

Em seu habitat natural as plantas estão constantemente sendo desafiadas por vários inimigos potenciais, pois quase todos os ecossistemas contêm uma enorme variedade de fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos. Como não podem se movimentar para fugir destes ataques e não possuem sistema imune complexo como os mamíferos, elas precisam desenvolver mecanismos elaborados para se protegerem. Assim, as plantas produzem uma enorme

diversidade de substâncias, que aparentemente não têm função no crescimento e desenvolvimento, mas as protegem de predadores e patógenos (Taiz & Zeiger, 2002). Embora plantas e mamíferos possuam mecanismos de defesa distintos apresentam similaridades em nível molecular (Beutler, 2004; Jones e Takemoto, 2004).

As plantas possuem mecanismos de defesa constitutivos ou pré-formados e induzíveis ou pós-formados. Os mecanismos constitutivos estão presentes nas plantas antes do contato com o patógeno, entre eles cutícula, tricomas, estômatos, compostos fenólicos, alcalóides e terpenóides. Os mecanismos induzíveis estão ausentes ou presentes em baixos níveis nas plantas antes da infecção. A síntese de fitoalexinas, o fortalecimento da parede celular pelo depósito de calose e lignina, a produção de enzimas líticas como Glucanases e Quitinases, e a reação de hipersensibilidade são exemplos deste tipo de mecanismo (Pascholati & Leite, 1995). A resistência induzida envolve a ativação de mecanismos latentes de resistência de uma planta através do tratamento com agentes eliciadores bióticos ou abióticos (Pascholati & Leite, 1995). A possibilidade de ativação dos genes responsáveis por este mecanismo de resistência, sob condições especiais, tornando as plantas mais resistentes abriu as portas para os estudos sobre resistência induzida em plantas. Nos últimos anos a quantidade de trabalhos científicos envolvendo o fenômeno da resistência induzida tem crescido enormemente (Pascholati et al., 2004).

Uma interação é dita compatível quando a planta não consegue se defender do ataque de patógenos, manifestando sintomas típicos da doença. Esta situação ocorre porque as defesas pré-formadas da planta são inapropriadas, não conseguindo detectar a presença do patógeno ou ativar os mecanismos de defesa em tempo hábil. Neste caso o patógeno é considerado virulento e a planta, suscetível (Hammond-Kosack & Jones, 2000). Numa interação incompatível o patógeno não consegue se instalar na planta hospedeira e provocar doença.

Assim, a planta é considerada resistente e o patógeno, avirulento, e ocorre um rápido reconhecimento molecular, seguido de várias reações de defesa do hospedeiro a tempo de impedir que o patógeno se estabeleça (Hammond-Kosack & Jones, 2000).

A diferença entre resistência e suscetibilidade está na capacidade da planta em reconhecer o patógeno invasor e ativar de maneira rápida e efetiva seus mecanismos de defesa (Guzzo, 2004). A ativação rápida e coordenada de genes que governam estes mecanismos possibilita a expressão da resistência através da restrição do crescimento do patógeno, confinando-o a uma pequena área ao redor do local de penetração.

Para que haja uma resposta de defesa por parte da planta é necessário que ela reconheça o patógeno. Este reconhecimento se dá pelo contato físico através de uma interação entre um receptor da planta e um eliciador do patógeno, de forma direta ou indireta. Esta ligação alerta a planta da presença do patógeno. Geralmente os receptores são moléculas codificadas por genes de resistência da planta e os eliciadores, moléculas codificadas por genes de avirulência do patógeno. Vários genes de resistência têm sido descobertos nos últimos anos (Hammond-Kosack & Parker, 2003). Estes genes são agrupados em classes e são muito conservados, possuindo alta similaridade com genes de outros organismos, incluindo os mamíferos. Constituem uma das grandes famílias de genes em plantas, estando freqüentemente juntos em cluster no genoma (Hammond-Kosack & Parker, 2003). Estas características apresentadas pelos receptores têm sugerido que as plantas, assim como os mamíferos, possuem uma resistência do tipo imunidade inata. Recentemente vários estudos têm sido realizados buscando entender melhor este tipo de resistência, através da identificação das moléculas envolvidas (Beutler, 2004; Jones & Takemoto, 2004).

Os eliciadores podem ser de origem biótica ou abiótica, derivados de um microrganismo, de uma planta, de moléculas químicas ou produzidas por fermentos, por exemplo. Podem ser utilizados em estudos de sinalização e também como indutores das respostas de defesa, simulando o reconhecimento do patógeno pela planta (Pascholati & Leite, 1994; Resende et al., 2002).

Poucos minutos depois de os eliciadores do patógeno terem sido reconhecidos pelos receptores da planta, uma complexa via de sinalização que leva a respostas de defesa é ativada. Os sinais produzidos como resultado da ligação do eliciador ao sítio de ligação da proteína de resistência desencadeiam uma complexa resposta com múltiplos componentes de defesa na planta, inicialmente de forma localizada, mas que alerta toda a planta sobre a invasão do patógeno conduzindo a uma resistência sistêmica (Hammond-Kosack & Jones, 2000).

A proteção ou resistência pode ser localizada, no sítio de infecção ou sistêmica. A resistência sistêmica pode ser ainda dividida em resistência sistêmica adquirida (SAR) (Dong, 2001; Gozzo, 2003) e resistência sistêmica induzida (ISR) (Van Loon et al., 1998). Estabelecem-se em um certo tempo após a indução, são dependentes da temperatura e afetadas pela luz, persistem depois de serem ativadas, são não específicas, podem ser induzidas por fatores bióticos, como patógenos ativos ou inativos, raças avirulentas, metabólitos de origem microbiano, ou fatores abióticos, como compostos químicos (Hammerschmidt & Becker, 1997).

Um dos eventos iniciais nesta cascata é a mudança na permeabilidade de íons na membrana plasmática. A ativação de genes de resistência estimula o influxo de Ca^{2+} e H^+ e o efluxo de K^+ e Cl^- , através da membrana, levando à acidificação do citoplasma. O influxo de Ca^{2+} ativa a explosão oxidativa que pode agir diretamente sobre o patógeno ou como sinalizador desencadeando outras reações de defesa. Peroxidação de lipídeos, ocasionando a produção de

Espécies Ativas de Oxigênio (EAO), também é observada. Acumulados nas formas de ânion superóxido (O_2^-), radical hidroperoxil ($HO_2^\bullet$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($OH^\bullet$), essas EAO formam, em poucos minutos, a chamada explosão oxidativa. Estas reações provocam alterações na parede celular, pelo depósito de calose e lignina, e conduzem ao imediato fortalecimento da parede celular da planta, além de estimular outras repostas de defesa (Resende et al., 2003).

A indução de SAR resulta na ativação de diferentes mecanismos bioquímicos de resistência, entre eles alterações na parede celular, provocadas pelo depósito de calose e lignina (Hammond-Kosack & Jones, 2001), aumento na atividade de enzimas, tais como Fenilalanina amônia-liase (Jones, 1984; Kohler et al., 2002; Standnek & Buchenauer, 2000), Chalcona isomerase (Latunde-Dada & Lucas, 2001), Lipoxigenase (Buzi et al., 2004), Peroxidases (Resende et al. 2002; Baysal et al., 2003), Pectato liase e Catalase (Schenk et al., 2003), ou ainda acúmulo de peróxido de hidrogênio (Iriti & Faoro, 2003), proteínas relacionadas a patogêneses e fitoalexinas (Latunde-Dada & Lucas, 2001).

O fortalecimento da parede celular diminui a suscetibilidade a enzimas microbianas que a degradam, possivelmente restringindo a difusão de toxinas derivadas do patógeno, e em casos de patógenos fúngicos, age como um abarreira mecânica a penetração física no protoplasto (Taiz & Zeiger, 2002).

Moléculas sinalizadoras, como ácido salicílico, ácido jasmônico, etileno, óxido nítrico, EAO e ácido abscísico, também participam desta etapa. As funções destas moléculas sinalizadoras foram caracterizadas principalmente em estudos envolvendo mutantes de *Arabidopsis*, para um ou mais destes genes, e têm como consequência a transcrição de genes de defesa e o consequente estabelecimento da resposta de defesa (Leite et al., 1997).

A partir da década de 90, através da biologia molecular, um grande avanço tem sido obtido no entendimento da resistência induzida, principalmente com a utilização de mutantes de *Arabidopsis*, possibilitando elucidar rotas de sinalização, sinais envolvidos na resistência induzida e mecanismo de defesa ativado (Hammond-Kosack & Parker, 2003). Uma das estratégias que podem ser utilizadas para estudar as bases moleculares da resistência induzida envolve o estudo da expressão de genes de plantas, após o tratamento com patógenos, eliciadores ou indutores químicos ativadores de SAR. Para estudar qual o momento da expressão da resposta é estabelecido um *time course* da doença após a inoculação com o eliciador (Morris, 1998). Estes estudos estão focalizados principalmente em plantas anuais e poucos relatos são encontrados para espécies perenes.

A manifestação das respostas de defesa através da conversão do sinal em repostas celulares específicas como ativação de genes de defesa e de mecanismos de resistência ocorre após esta transdução de sinais. Dois grupos de genes podem estar envolvidos nesta fase: os que são ativados precocemente, como é o caso dos genes que codificam para as enzimas Fenilalanina amônia-liase (PAL) e Chalcona sintase (CHS), que estão relacionados com a síntese de fitoalexinas, e os que são ativados tardiamente. Neste último grupo podem ser citados os genes que codificam para a síntese de lignina e calose, responsáveis pelo fortalecimento da parede celular e também de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR) (Cordeiro & Sá, 1999). As respostas de defesa geralmente são divididas em barreiras estruturais e barreiras químicas, podendo ser resultantes da ativação de genes de defesa ou do aumento da atividade de determinadas enzimas (Pascholati & Leite, 1994).

Uma das enzimas mais bem estudadas em interações planta-patógeno é a PAL, que participa da rota dos fenilpropanóides convertendo o aminoácido fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico, um passo regulatório importante na

formação de muitos compostos fenólicos, entre eles fitoalexinas (Taiz & Zeiger, 2002). A regulação da atividade da PAL é complexa, pois como é constituída por uma família multigênica, alguns genes são expressos somente em tecidos específicos ou acima de certas condições ambientais. A atividade da PAL é influenciada por diversos fatores ambientais, tais como baixo nível de nutrientes e luz e, principalmente, infecções por patógenos. Um dos produtos da rota da PAL é o ácido benzóico, que através da enzima Ácido benzóico 2-hidrolase é convertido em ácido salicílico, um importante sinalizador da SAR. Um outro produto desta rota é a lignina, responsável pelo fortalecimento da parede celular, resposta freqüente à infecção por patógeno ou ferimento (Jones, 1984).

As enzimas Peroxidasas (POX) existem como isoformas e estão amplamente distribuídas no ambiente intra e extracelular. Cada isoforma possui seqüência de aminoácidos variável e apresenta diversos padrões de expressão, indicando seu envolvimento em diversos processos fisiológicos (Guzzo, 2003). Além de participarem da explosão oxidativa, suberização, catabolismo de auxinas e cicatrização de ferimentos, são requeridas para a polimerização final de derivados fenólicos em lignina, a qual é responsável pelo fortalecimento da parede celular (Resende et al., 2003). A isoenzima peroxidase responsável por este processo é classificada como uma proteína PR da família PR-9.

O papel da enzima Lipoxigenase (LOX) em muitos processos da planta tem sido evidenciado (Bell & Mullet, 1993). Esta enzima é induzida em resposta ao ataque de patógenos e ferimentos, bem como na produção de reguladores da planta. Uma das funções mais importantes atribuídas a esta enzima é a catálise da hidroperoxidação de lipídeos, principalmente os da membrana plasmática, levando à produção de ácido abscísico e ácido jasmônico, importantes sinalizadores da resposta de defesa. Está envolvida também na formação de hidroperóxidos e radicais livres, que podem estar relacionados à explosão oxidativa, à morte celular localizada, HR e na formação de compostos

antimicrobianos como o 2-*trans*-hexenal, constituindo uma defesa direta contra o ataque de patógenos. Estas funções podem ser desempenhadas por mais de uma LOX e nas respostas local e sistêmica, podem estar envolvidas distintas LOX (Jalloul et al., 2002).

Os eventos que levam ao estabelecimento das respostas de defesa ocorrem de modo cronológico e sincronizado. O primeiro efeito das EAO's é a toxicidade direta sobre o patógeno. Caso este efeito não seja capaz de conter a invasão, poderá retardá-la e permitir a formação de outras barreiras, como o fortalecimento da parede celular, que ocorre algum tempo após o início da explosão oxidativa. O patógeno que conseguir vencer estas barreiras poderá ser cercado por uma camada de células mortas, o que é conhecido como reação de hipersensibilidade ou HR (Hammond-Kosack & Jones, 2000). No local da HR são acumuladas várias substâncias com atividade antimicrobiana, como as fitoalexinas (Dong, 2001).

As fitoalexinas talvez sejam o grupo de substâncias de resposta de defesa mais bem estudado em plantas. São um grupo quimicamente diverso de metabólitos secundários com forte atividade antimicrobiana e que se acumulam ao redor do local de infecção (Pascholati & Leite, 1995). A produção de fitoalexinas parece ser um mecanismo comum de resistência de plantas a patógenos. Entretanto, diferentes famílias de plantas usam diferentes tipos de produtos secundários como fitoalexinas. Estas substâncias geralmente estão ausentes em plantas antes da infecção, mas são rapidamente sintetizadas depois do ataque microbiano (Taiz & Zeiger, 2002).

Outra resposta de defesa à infecção é a formação de enzimas líticas que atacam a parede celular do patógeno (Van Loon & Van Strien, 1999). Estas proteínas, conhecidas como proteínas relacionadas com a patogênese (proteínas PR), são também sintetizadas em resposta a outras situações de estresse.

Atualmente estão agrupadas em 17 famílias, sendo que algumas têm atividade conhecida e outras não (Van Loon & Van Strien, 1999; Guzzo, 2003)

As proteínas PR têm sido agrupadas com base em sua estrutura primária, serologia, atividade biológica e/ou enzimática em fornecer proteção contra patógenos (Van Loon & Van Strien, 1999). A ação antimicrobiana é devido à capacidade que elas têm de inibir o crescimento e multiplicação do patógeno, provocar lise de esporângios e esporos e inibir o crescimento da hifa de fungos (Guzzo, 2004). Estas proteínas são codificadas pela planta hospedeira, mas são induzidas especificamente em situações patológicas, não somente acumuladas no local da infecção, mas também induzidas sistemicamente, e estão associadas com o desenvolvimento da SAR contra futuras infecções por fungos, oomicetos, bactérias e vírus. Entre as proteínas PR mais estudadas estão as Quitinases e β -1,3-Glucanases (PR-2) (Moraes, 1998). Estas duas enzimas têm atividade hidrolítica, quebrando polímeros estruturais presentes na parede celular de patógenos. Glucanases hidrolisam polímeros da parede celular de fungos e também oomicetos. São enzimas abundantes, altamente reguladas e amplamente distribuídas em espécies de plantas. As várias isoformas diferem em tamanho, ponto isoelétrico, estrutura primária, localização celular e padrão de regulação, podendo ser ácidas ou básicas (Guzzo, 2003). Com base nas evidências de que glucanas são importantes componentes da parede celular de fungos e oomicetos, além de serem coordenadamente induzidos como parte da HR, especula-se que estas enzimas possuam ação fungicida e anti-oomicetos, através da atividade *in vitro* e pela proteção mediada pela superexpressão constitutiva em plantas transgênicas. O efeito indireto pode ser observado através da liberação de oligômeros de glucana, que são eficientes eliciadores da resposta de resistência, tais como HR, biossíntese de lignina e fitoalexinas (Campos, 2002). Em citros foram identificadas várias hidrolases, entre elas Glucanases, com atividade antifúngica *in vitro* comprovada (Porat et al., 1999).

Uma outra família de proteínas PR importantes principalmente contra oomicetos, é a família de proteínas antimicrobianas PR-5, constituída por proteínas que desempenham diversas funções no desenvolvimento, proteção contra estresse osmótico, tolerância ao frio e permeabilização da membrana plasmática de fungos e oomicetos. A atividade antifúngica é desempenhada por Permatinas e Osmotinas, principalmente contra *P. parasitica*, inibindo o crescimento da hifa e a germinação de esporos (Guzzo, 2003; Campos, 2002).

Recentemente, novos conceitos sobre resistência induzida têm sido propostos. A resistência induzida pode ser classificada em resistência induzida de hospedeiro e resistência induzida de não-hospedeiro. A resistência induzida de hospedeiro é ainda dividida em raça-específica, com interação gene-a-gene e envolvimento da HR, e raça não-específica, ou resistência horizontal ou ainda imunidade inata, que é derivada da imunidade inata em animais e envolve a percepção de PAMP's (padrão molecular associado a patógeno). Pode ser expressa no local da infecção ou de forma sistêmica (SAR), com a participação de fitoalexinas, proteínas tóxicas e enzimas de detoxificação, e o estado de resistência constitutiva é alto. A resistência induzida de não-hospedeiro ou resistência espécie-específica também pode ser considerada como imunidade inata (Beutler, 2004; Jones & Takemoto, 2004).

2.4.1 Interação Citros-*Phytophthora*

A comunicação molecular entre *Phytophthora* e plantas tem sido recentemente muito estudada. Patossistemas modelos envolvendo várias espécies de *Phytophthora* e plantas como *Arabidopsis*, soja, tomate e batata têm fornecido elegantes esclarecimentos na interação planta-*Phytophthora*. Estas interações envolvem uma magnitude de trocas de sinais. O patógeno produz efetores, que são moléculas que manipulam a estrutura celular do hospedeiro e funcionam facilitando a infecção (fatores de virulência) ou disparando respostas

de defesa (fatores de virulência ou eliciadores específicos). Estes efetores interagem direta ou indiretamente com componentes da resposta da defesa de plantas a patógenos, que podem ser proteínas de resistência ou várias moléculas de plantas, denominados alvos de virulência (Huitema et al., 2003; Huitema et al., 2004).

Os processos moleculares, bem como os mecanismos estruturais e bioquímicos, de resistência de genótipos de citros a *Phytophthora*, são ainda pouco conhecidos. A camada de suberização dos tecidos da casca dos citros é o mais importante mecanismo de resistência natural de plantas à infecção por *Phytophthora* spp. e, uma vez rompida a barreira estrutural, via ferimento físico ou químico, a resistência é automaticamente quebrada. Alguns trabalhos relatam que o patógeno necessita de ferimento para penetrar na planta e provocar infecção (Whiteside, 1971). No entanto, através de análise de dados de genes de *P. parasitica* já seqüenciados verifica-se que este patógeno possui genes expressos que possibilitariam sua penetração na planta mesmo na ausência de ferimentos (Campos et al., 2004).

Algumas substâncias com propriedades semelhantes a fitoalexinas foram encontradas em citros. Vernenghi et al. (1987) reportaram que a substância do grupo das coumarinas, derivada de compostos de ácidos fenólicos, denominada sesalina, foi sintetizada em raízes de limoeiro rugoso em resposta a infecção por *Phytophthora* e inibiu o desenvolvimento do patógeno. Desta forma, sesalina comportou-se como uma fitoalexina. Outra substância também do grupo das coumarinas, a escoporone, foi encontrada associada à resposta de citros a *Phytophthora* spp. acumulando-se em maior quantidade em tecidos de variedades resistentes e tem sido estudada por vários pesquisadores (Afek & Szejber, 1989; Ortuño et al., 1997).

A participação de proteínas PR na defesa de plantas tem sua importância como moléculas que podem indiretamente eliciar respostas mais complexas, tais

como HR e SAR, e por possuírem uma atividade antimicrobiana direta sob diferentes patógenos. Dentre as 17 famílias de proteínas PR (PR-1 a PR-17) já descritas, aquelas que constituem as famílias PR-1 e PR-5 possuem atividade contra oomicetos, com demonstrada eficiência *in vitro* e *in planta* contra *P. infestans* e *P. parasitica*. Em citros foram identificadas Glucanases (PR-2) e Quitinases (PR-3, PR-4, PR-8 e PR-11) com atividade antifúngica *in vitro* comprovada (Porat et al., 1999).

Muitos melhoristas têm recorrido à resistência quantitativa a doenças por esta ser de amplo espectro. Entretanto, por causa de sua natureza multigênica, o caminho e a seleção para características quantitativas tornam-se difíceis. Assim, a estratégia de plantas transgênicas permite obter plantas com maior resistência a doenças e fornece subsídios para um melhor entendimento das bases moleculares da defesa de plantas.

Entre as estratégias de plantas transgênicas inclui-se a introdução ou modificação de genes que ativam (genes *R*), regulam (*NPR1*) ou contribuem diretamente (*PRs*) para a defesa antimicrobiana das plantas (Leach & Shah, 2002). Por exemplo, múltiplos genes de resistência podem ser introduzidos para gerar variedades com piramidamento de genes, que irão expandir a extensão de patógenos reconhecidos. Genes que codificam para proteínas antimicrobianas podem ser introduzidos sozinhos ou em combinação para amparar a resistência não específica, de amplo espectro. Expressão de genes regulatórios que estão *upstream* destes genes antimicrobianos pode ser modulada por superexpressão ou através do silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) para, potencialmente, aumentar a SAR.

Possivelmente, o gene de *PR* mais utilizado para obtenção de plantas transgênicas seja a Quitinase, cujo produto catalisa a hidrólise de quitina, o principal componente da parede celular de muitos fungos filamentosos (Tyler, 2002). Entretanto, esta estratégia parece não ser usada contra oomicetos, tais

como *Phytophthora* spp e outros. Em contraste a fungos filamentosos, oomicetos têm sido descritos como insensíveis a uma mistura de enzimas hidrolíticas como β -1,3-Glucanase e Quitinases (Fagoaga et al., 2001). Estes contêm pouca ou nenhuma quitina em sua parede celular e, assim, não são afetados por plantas transgênicas expressando Quitinases.

Plantas transgênicas de citros resistentes a *Phytophthora* spp, superexpressando o gene que codifica uma proteína da família PR-5 de planta, forneceram evidências da atividade *in vivo* da proteína PR-5 contra *P. citrophthora* (Fagoaga et al., 2001). Nestas plantas foi observada uma redução no tamanho da lesão, provocada por este patógeno, sugerindo que esta estratégia possa ser empregada na obtenção de variedades de citros resistentes às doenças causadas por *Phytophthora*.

Embora aparentemente essas respostas de defesa sejam conservadas no reino vegetal, pouco se sabe sobre a expressão de genes de proteínas PR em citros, especialmente durante infecção com *P. parasitica*. Apesar de o papel das PR ser considerado parte do sistema de defesa induzido, não há sempre uma clara distinção entre ele e a defesa constitutiva. Foi mostrado, em batata, que a expressão constitutiva de transcritos de genes *PR* está associada à resistência de não hospedeira em linhagens e variedades de batata e outras espécies de *Solanum* a *P. infestans* (Vleeshouwers et al., 2000).

O estudo do genoma funcional de citros, recém concluído, promete gerar impactos no entendimento das respostas de citros a vários fatores bióticos e abióticos e poderá ser um instrumento no desenvolvimento de estratégias de proteção de plantas de maneira sustentável.

2.5 Técnicas utilizadas no estudo da expressão gênica

Muitos eventos relacionados ao crescimento, desenvolvimento de plantas ou até mesmo em resposta a vários estímulos são resultantes da alteração na expressão gênica. A determinação qualitativa e quantitativa dos níveis de transcritos de células vegetais permite que genes, diferencialmente expressos, possam ser identificados, e, conseqüentemente, sua função metabólica pode ser investigada (Kuhn, 2001).

A expressão gênica pode ser estudada em nível protéico ou de transcritos das células. A eletroforese bidimensional (2D), que fornece um mapa com todas as proteínas presentes nas células naquele momento, auxiliado pela espectrometria de massa, têm permitido separar, quantificar e identificar grupos de proteínas associadas a situações específicas (Silva, 2002).

Com a emergência da biologia molecular, várias técnicas capazes de quantificar de forma qualitativa e/ou quantitativa os níveis de RNAm têm sido desenvolvidas. A análise de *Northern blot* é a técnica mais utilizada por ser simples e barata. Porém, somente fornece informações acerca do tamanho do RNAm, *splicing* alternativo e integridade das amostras de RNA (Bustin, 2000). Este é mais um método qualitativo, podendo se tornar quantitativo quando usado algum controle endógeno. Requer grande quantidade de RNAm e não é tão sensível, em termos qualitativos, na detecção de baixa abundância de RNAm (Dellias, 2003).

A técnica de DDRT-PCR (*Differential Display Reverse Transcription*) proporciona a análise simultânea de vários transcritos do RNA total e, ainda, a quantificação de RNAm, além de ser mais sensível que as técnicas de *Northern Blot*, *Nuclease Protection Assay* e Hibridização *in vitro*. Outra vantagem da técnica é sua sensibilidade na detecção de transcritos presentes em pequenas quantidades e a possibilidade de diferenciação entre transcritos pouco

abundantes (Silva, 2002). Dentre as desvantagens da técnica de DDRT-PCR estão as altas taxas de falsos positivos, cerca de 30%, e a baixa sensibilidade em relação aos mRNAs raros (Kuhn, 2001).

Uma outra técnica que tem sido comumente utilizada para detectar e medir a expressão gênica é o RT-PCR (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*), que é uma adaptação do PCR convencional e se baseia na amplificação enzimática de seqüências específicas de RNAm após um passo inicial de transcrição reversa (Freeman et al., 1999). Permite a análise de diferentes amostras utilizando pequenas quantidades de RNA. Este é o método mais sensível e mais flexível de quantificação e pode ser usado para comparar níveis de RNAm de diferentes amostras, caracterizar a expressão de RNAm, discriminar RNAm intimamente relacionados e analisar a estrutura de RNA (Bustin, 2000). RT-PCR é uma técnica complexa e todos os componentes físicos e químicos da reação devem ser considerados cuidadosamente na otimização da especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade e fidelidade da reação.

Como o RNAm não pode servir de molde para a reação de PCR, o primeiro passo na técnica de RT-PCR é a transcrição reversa da amostra de RNA em cDNA (Bustin, 2000). Fitas simples de DNA são sintetizadas a partir de um RNAm pela ação de enzimas de transcrição reversa (pertencentes a retrovírus), resultando no chamado DNA complementar (cDNA), seguida por uma amplificação exponencial em reação de PCR (Dellias, 2003). A quantificação de RNAm pode ser feita por métodos semi-quantitativos ou quantitativos (Bustin, 2000). O procedimento do semi-quantitativo utiliza vários ciclos de amplificações de RT-PCR, seguidos de análise de *dot-blot* (Marone, et al. 2001).

A técnica de cDNA-AFLP (*cDNA Amplified Fragment Length Polymorphism*) baseia-se na amplificação seletiva de fragmentos de cDNA ligados a adaptadores, clonagem e sequenciamento dos fragmentos amplificados

diferencialmente. A técnica SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) tem como princípio a identificação de vários genes de uma única vez, pois vários fragmentos de cDNA são unidos, clonados e seqüenciados (Velculescu et al., 1995).

Através da técnica de arranjos de cDNA é possível analisar a expressão diferencial de milhares de genes de uma só vez. cDNAs de fita simples de genes de interesse são fixados em uma lâmina de vidro, e posteriormente hibridizados com sondas fluorescentes presentes nas amostras das condições estudadas (Schena et al., 1995). Todavia este é um método caro.

Bibliotecas de cDNA possuem grande utilidade atualmente, pois permitem que muitos genes expressos diferencialmente possam ser detectados. Entretanto, na prática, essa informação só é considerada verdadeira se o RNAm de interesse compreender mais de 0,05% do RNAm total do material em estudo, e menos que 0,01% no material contrastante (Silva, 2002). Outra técnica bastante utilizada é a hibridização subtrativa, baseada em biblioteca de cDNA enriquecida pela fração de RNAm's raros, que são subtraídos e detectados de maneira diferencial (Kuhn, 2001).

A maximização da sensibilidade dos métodos de quantificação tem levado ao desenvolvimento de técnicas cada vez mais complexas, dentre elas o PCR Quantitativo em Tempo Real, que já é usado há bastante tempo na área médica, mas apenas recentemente tem sido utilizado como ferramenta nos estudos de expressão gênica e quantificação de seqüências específicas em planta (Gachon et al., 2004).

Todas as técnicas disponíveis apresentam limites de resolução e também desvantagens que devem ser consideradas. De modo geral, a investigação da expressão gênica em plantas, tem facilitado o conhecimento e o entendimento de genes e vias metabólicas. Investigações desta natureza são mais fáceis de conduzir quando se tem o genoma totalmente seqüenciado, o que não é o caso

do gênero *Citrus*. Entretanto, a expressão gênica deste gênero vem sendo muito estudada (Silva, 2002; Dellias, 2003).

2.5.1 PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR)

Böhm e colaboradores (1999) foram os primeiros a empregar a técnica de PCR quantitativo em tempo real em plantas, monitorando a presença de patógenos em plantas hospedeiras. A partir deste trabalho vários outros têm sido publicados empregando a técnica de qPCR para várias finalidades em plantas (Gachon et. al., 2004).

O qPCR difere do PCR clássico pela mensuração do produto de PCR amplificado em cada ciclo da reação de PCR. Na prática, uma câmera de vídeo grava a luz emitida por um fluoróforo que é incorporado dentro dos novos produtos amplificados. Assim, o qPCR permite que a amplificação seja acompanhada em tempo real, durante a fase exponencial da corrida, fazendo com que a quantidade de material inicial seja determinada precisamente. Ao contrário do PCR clássico, o resultado é independente do platô, que corresponde à fase de saturação da reação e que pode levar a uma inacurácia na quantificação. Comparado com outras técnicas de avaliação existentes, esta permite uma detecção de um dado ácido nucléico alvo de maneira rápida, específica e muito sensível (Gachon et al., 2004). Permite também a quantificação absoluta inicial do material alvo. Até a presente data, a confiabilidade do PCR tempo real nunca foi questionada (Bustin, 2000).

Comparada com o PCR clássico, uma das principais vantagens do qPCR é a rapidez em fornecer dados confiáveis. O qPCR é altamente sensível na detecção de DNA ou RNA devido à combinação de amplificação realizada pelo passo de PCR e o sistema de detecção. Em qualquer caso a especificidade do processo pode ser checada depois da completa corrida de PCR, por gel de

eletroforese, curva de dissociação e dados de sequenciamento. É uma técnica muito conveniente para estudos com limitada quantidade de material inicial ou para avaliar a expressão de um grande número de genes com quantidades mínimas de RNA (Freeman et al., 1999).

A quantificação é a característica mais importante do qPCR. A quantificação absoluta é calculada com auxílio de uma curva padrão. A quantificação relativa pode ser deduzida considerando diferenças de C_t entre as amostras e padrões de expressão constitutiva (Bustin, 2000).

Existem basicamente quatro estratégias capazes de detectar os produtos amplificados por qPCR (Bustin, 2000). Todas usam corantes fluorescentes e o processo combina amplificação e detecção dos produtos amplificados pela mensuração da fluorescência. Agentes intercalantes e sondas fluorogênicas são os dois principais tipos de moléculas usadas para detectar produtos de amplificados por qPCR (Bustin, 2000). A estratégia SYBR green utiliza corantes fluorescentes que se ligam às moléculas de DNA de fita dupla. As outras três se baseiam na hibridização de sondas fluorescentes que se ligam ao amplicon específico através de hibridização ou hidrólise (Molecular beacon; Taqman) (Bustin, 2000, Gachon et. al., 2004). Em plantas, as estratégias mais utilizadas têm sido o SYBR green e o Taqman (Böhm et al., 1999; Souza et.al., 2003; Brouwer et al., 2003; Schenk et al., 2003; Gachon & Saindrenan, 2004, Czechowski et al., 2004).

Como o agente intercalante se liga a qualquer fita dupla de nucleotídeo, ele pode ser usado para qualquer tipo de seqüência. Esta é uma vantagem econômica do SYBR green, pois permite que vários genes possam ser detectados em uma mesma amostra. Entretanto, é uma desvantagem, pois é igualmente incorporado em todos amplicons e, se seqüências inespecíficas forem amplificadas, o sinal emitido irá corresponder a ambos, seqüências específicas e não específicas, comprometendo a acurácia da quantificação. Para resolver este

problema os agentes intercalantes podem ser substituídos por sondas que se ligam especificamente a seqüências alvo (Bustin, 2000).

As principais aplicações do qPCR em estudos com plantas têm sido na detecção e quantificação de DNA exógeno, principalmente no diagnóstico de doenças e na quantificação de patógenos ou microorganismos simbiotes associados com planta. A detecção de contaminação em alimentos por micotoxinas que podem ser cancerígenas e não são facilmente removidas durante o processamento do alimento é de grande interesse, todavia o qPCR ainda tem sido pouco utilizado devido aos altos custos (Mayer et al., 2003). No caso da detecção de organismos geneticamente modificados, pode-se ainda quantificar número de cópias de um transgene inseridas (Ingham, 2001; Hohne 2002; Windels, 2003). Na ciência básica, o qPCR tem sido amplamente empregado na quantificação de transcritos específicos (RT-qPCR), na análise da expressão integrada para quantificar a expressão de vários genes de uma rota metabólica específica e na análise de famílias multigênicas. No entanto, um dos mais rápidos objetivos que tem expandido o uso do qPCR é para confirmar dados obtidos por estudos de microarray (Schenk et al., 2003; Gachon et al., 2004).

As principais limitações do qPCR, por analisar pequenas quantidades de material, são a falha em detectar processos biológicos relevantes, como *splicing* alternativo ou degradação de transcritos parcial, que ocorre durante eventos de silenciamento gênico pós transcricional. Entretanto, a realização de um *Northern blot* em paralelo pode ajudar a resolver este problema (Montrichard et al., 2003).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFEK, U.; SZTEJNBERG, A. Effects of Fosetyl-Al and phosphorus acid on scaparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 79, n. 7, p. 736-739, July 1989.
- AMARAL, A. M.; MACHADO, M. A.; PAIVA, L. V. Uso prático da biotecnologia na citricultura. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 22, n. 209, p. 95-100, 2001.
- AMORIM, E. P. D. **Controle biológico de *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* Dastur e *Phytophthora citrophthora* (Sm. & Sm.) Leonian em plântulas de citros**. 1997. 111 p. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- BAYSAL, Ö.; SOYLU, E. M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, n. 6, p. 747-753, Dec. 2003.
- BELL, E.; MULLET, J. E. Characterization of an *Arabidopsis* *Lipoxygenase* Gene Responsive to Methyl Jasmonate and Wounding. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, n. 4, p. 1133-1137, Dec. 1993.
- BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 40, n. 12, p. 845-859, Feb. 2004.
- BOAVA, L. P. **Estabilidade de QTLs ligados à resistência dos citros a gomose, causada por *Phytophthora parasitica***. 2004. 67 p. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu.
- BÖHM, J.; HAHN, A.; SCHUBERT, R.; BAHNWEG, G.; ADLER, N.; NECHWATAL, J.; OEHLMANN, R.; OBWALD, W. Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* their respective host plants. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 147, n. 7/8, p. 409-416, Aug. 1999.

BROUWER, M.; LIEVENS, B.; VAN HEMLRIJCK, W.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.; CAMMUE, B. P. A.; THOMMA, B. P. H. J. Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR. **FEMS Microbiology Letter**, Amsterdam, v. 228, n. 2, p. 241-248, Nov. 2003.

BUSI, A.; CHILOSI, G.; DE SILLO, D.; MAGRO, P. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 1, p. 34-42, Jan. 2004.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 25, n. 2, p. 169-193, Oct. 2000. Review.

CAMPOS, M. A.; SÁ, M. F. G. Resistência mediada pela expressão de proteínas e peptídeos antimicrobianos. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS: Aplicações no manejo integrado de fitodoenças, 1., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2002. p. 127-155.

CAMPOS, M. A.; TARGON, M. L. N. P.; MONGE, G. A.; TAKITA, M. A.; SOUZA, A. A.; TEIXEIRA, J. E. C.; PAIVA, L. V.; MACHADO, M. A. Genes relacionados com a defesa regulados em citros durante interação com *Phytophthora parasitica*. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS, 2.; SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004. p. 70-72.

CARDOSO FILHO, J. A. **Efeito do extrato de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) dos indutores de resistência ácido salicílico, acibenzolar-S-metil e *Saccharomices cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (Teleomorfo: *Guignardia citricarpa*)**. 2003. 125 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CARVALHO, M. L. T. **Reação de porta-enxertos híbridos de citros à infecção de tronco e raízes por *Phytophthora parasitica***. 2000. 82 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular/ Genética Vegetal e Melhoramento) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CORDEIRO, M. C. R.; SÁ, M. F. G. Biotecnologia e resistência a patógenos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 2, n. 10, p. 34-40, set./out. 1999.

CRISTOFANI, M. **Mapas de ligação de *Citrus sunki* Hort. Ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Cv 'Rubidou' e localização do gene de resistência ao vírus da tristeza.** 1997. 140 p. Tese (Doutorado em Genética e melhoramento de plantas) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'- Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Uso de técnicas moleculares na taxonomia, na genética e no melhoramento de citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 20, n. 1, p. 205-232, 1999.

CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. Ex. Tan. And *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. And mapping of citrus tristeza virus resistance gene. **Euphytica**, Wageningen, v. 109, n. 1, p. 25-32, 1999.

CZECHOWSKI, T.; BARI, R. P.; STITT, M.; SCHEIBLE W. R.; UDVARDI, M. K. Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root-and shoot-specific genes. **The Plant Journal**, Oxford, v. 38, n. 2, p. 366-379, Apr. 2004.

DANTAS, J. L. L.; SOARES FILHO, W. S.; OLIVEIRA, J. R. P.; CABRAL, J. R. S.; BARBOSA, L. V.; CUNHA, M. A. P.; RITZINGER, R.; SILVA, S. O. Melhoramento de fruteiras de clima tropical. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas.** Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 549-602.

DELLIAS, M. T. F. **Detecção da expressão do gene *pal* em calos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv 'Pêra' após co-cultivo com *Xylella fastidiosa*.** 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba.

DENG, Z.; HUANG, S. Y.; XIAO, S.; GMITTER, C. M. Development and characterization of SCAR markers linked to the citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Genome**, v. 40, p. 697-704, 1997.

DONG, X. Genetic dissection of systemic acquired resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 309-314, 2001.

ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. **Phytophthora diseases worldwide**. St. Paul: APS Press, 1996. 562 p.

FAGOAGA, C.; RODRIGO, I.; CONEJERO, V.; HINAREJOS, C.; TUSET, J. J.; ARNAU, J.; PINA, J. A.; NAVARRO, L. PENA, L. Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 7, n. 2, p. 175-185, 2001.

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

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2004**: Anuário de agricultura brasileira. São Paulo, 2004. p. 241-283.

FREEMAN, W. M.; WALKER, S. J.; VRANA, K. E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **BioTechniques**, Natick, v. 26, n. 1, p. 112-125, 1999.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real Time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 55, n. 402, p. 1445-1454, July 2004.

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

GRAHAN, J. H.; CASTLE, W. S. Screening citrus genotypes for tolerance to Phytophthora root rot on chlamydospore infected soil. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL CITRUS NURSEYMEN - ISCN, 4., 1993, Johannesburg. **Proceedings...** Johannesburg: ISCN, 1993. p. 307-315.

GOZZO, F. Systemic Acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 16, p. 4487-4503, July 2003.

GUZZO, S. D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2004. 236 p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

GUZZO, S. D. Proteínas relacionadas à patogênese. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, p. 283-332, 2003.

HAMMERSCHMIDT, R.; BECKER, S. J. Acquired resistence to disease in plants. **Horticultural Reviews**, New York, v. 18, p. 247-289, 1997.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Response to plant pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W. JONES, R. L. (ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: ASPP, 2000. p. 1102-1156.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; PARKER, J. E. Deciphrring plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, n. 2, p. 177-193, Apr. 2003.

HOHNE, M.; SANTISI, C. R.; MEYER, R. Real-time multiplex PCR: an acuurate method for the detection and quantification of 35S-CaMV promoter in genetically modified maize-containig food. **European Food Research and Technology**, New York, v. 215, n. 1, p. 59-64, July 2002.

HUITEMA, E.; BOS, J. I. B.; TIAN, M.; WIN, J.; WAUGH, M. E.; KAMOUN, S. Linking sequence to phenotype in *Phytophthora*-plant interactions. **Trends in Microbiology**, London, v. 12, n. 4, p. 193-200, Apr. 2004.

HUITEMA, E.; VLEESHOUWEERS, V. G. A. A.; FRANCIS, D. M.; KAMOUN, S. Active defence responses associated wuth non-host resistance of *Arabidopsis thaliana* to the oomycete pathogn *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 487-500, Nov. 2003.

HUTCHISON, D. J. Rootstocks developement screening and selection for disease tolerance and horticultural characteristics. **Fruit Varieties Journal**, Tyson Building, v. 39, n. 3, p. 21-25, 1985.

INGHAN, D. J.; BEER, S.; MONEY, S.; HANSEN, G. Quanitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transfomed plants. **Biotechniques**, Natick, v. 31, n. 1, p. 132-136, July 2001.

IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BTH) induced cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, n. 3, p. 171-180, Mar. 2003.

JALLOUL, A.; MONTILLET, J. L.; ASSIGBETSÉ, K.; AGNEL, J. P.; DELANNOY, E.; TRIANTAPHYLIDÈS, C.; DANIEL, J. F.; MARMEY, P.; GEIGER, J. P.; NICOLE, M. Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction. **The Plant Journal**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 1-12, Feb. 2002.

JONES, D. H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. **Phytochemistry**, Oxford, v. 23, n. 7, p. 1349-1359, July 1984.

JONES, D. A.; TAKEMOTO, D. Plant innate immunity – direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 16, n. 1, p. 48-62, Feb. 2004.

KOHLER, A.; SCHWINDLING, S.; CONRATH, U. Benzothiadiazole-induced priming of potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the *NPRI/NIMI* gene in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 128, n. 3, p. 1046-1056, Mar. 2002.

KUHN, H.; DEMIDOV, V. V.; GILDEA, B. D.; FIANDACA, M. J.; COULL, J. C.; FRANK-KAMENETSKII, M. D. PNA beacons for duplex DNA. **Antisense Nucleic Acid Drug Development**, Larchmont, v. 11, n. 4, p. 265-270, Aug. 2001.

LATUNDE-DADA, A. O.; LUCAS, J. A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 58, n. 5, p. 199-208, May 2001.

LAVILLE, E. Reflexions sur la nature des relations hôte-parasite dans couple agrumes – *Phytophthora* spp. **Fruits**, Paris, v. 30, n. 1, p. 19-22, Jan. 1975.

LEACH, J.; SHAH, J. Future prospects for developing disease resistant plants. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 11, n. 6, p. 597-598, Dec. 2002.

LEITE, B.; RONCATO, L. D. B.; PASCHOLATI, S. F. LAMBAIS, M. R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos fitopatogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 5, p. 235-280, 1997.

MACHADO, M. A. **Melhoramento de citros**. In: SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E EMELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., 1997, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1997. p. 199-207.

MARONE, M.; MOZZETTI, S.; RITIS, D.; PIERELLI, L.; SCAMBIA, G. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. **Biological Procedures Online**, v. 3, n. 1, p. 19-25, 2001.

MAYER, Z.; BAGNARA, A.; FARBER, P.; GEISEN, R. Quantification of the copy number of *nor-1*, a gene of the aflatoxin biosynthetic pathway by real-time PCR, and its correlation to the cfu of *Aspergillus flavus* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam. v. 82, n. 2, p. 143-151, Apr. 2003.

MONTRICHARD, F.; RENARD, M.; ALKHALFIOUI, F.; DUVAL, F. D.; MACHEREL, D. Identification and differential expression of two thioredoxin h isoforms in germinating seeds from pea. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 3, p. 1707-1715, July 2003.

MORAES, M. G. Mecanismos de resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 261-284, 1998.

MOREIRA, C. S.; PIO, R. M. Melhoramento dos citros. In: RODRIGUES, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JR, J.; AMARO, A. A. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1, p. 116-152.

MORRIS, S. W.; VERNOOIJ, B.; TITATARN, S.; STARETT, M.; THOMAS, S.; WILTSE, C. C.; FREDERIKSEN, R. A.; BHANDHUFALCK, A.; HULBERT, S.; UKNES, S. Induced Resistance Responses in Maize. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v. 11. n. 7, p. 643-658, July 1998.

ORTUÑO, A.; BOTIA, J. M.; FUSTER, M. D.; PORRAS, I.; DELRIO, J. A. Effect of scaparonone (6,7 Dimethoxycoumarin) biosynthesis on the resistance of tangelo nova, *Citrus paradisi* and *Citrus aurantium* fruits against *Phytophthora parasitica*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washinton, v. 45, n. 7, p. 2740-2743, July 1997.

PASCHOLATI, S. F.; CIA, P.; BENTO, E. A.; CAMILI, E. C. O fenômeno da indução de resistência e o controle de doenças pós colheita. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS, 2.; SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004. p. 70-72.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência a doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 1-51, 1994.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, D. Hospedeiro: mecanismo de resistencia. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. V. 1, cap. 22, p. 418-453.

POMPEU JR, J. Porta-enxerto. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JR, J.; AMARO, A. A. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991, v. 1, p. 116-152.

PORAT, R.; WEISS, B.; COHEN, L.; DROBY, S.; JACOB-WILK, D.; HOLLAND, D. Identification of chitinase and β -1,3-glucanase cDNAs from citrus fruit. **Acta Horticulture**, Amsterdam, v. 535, p. 133-135, 2000.

RESENDE, M. L. V.; BARRETTI, P. B.; PEREIRA, W. Percepção, transdução e tradução de sinais para respostas de defesa contra patógenos em plantas. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS: aplicações no manejo integrado de fitodoenças, 1., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2002. p. 9-35.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, mar./abr. 2003.

ROSSETI, V. V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Piracicaba: Fealq/Fundecitrus, 2001. 207 p.

SCHENK, P. M.; KAZAN, K.; MANNERS, J. M. ; ANDERSON, J. P.; SIMPSON, R. S.; WILSON, I. W.; SOMERVILLE, S. C.; MACLEAN, D. J. Systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana* during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 2, p. 999-1010, June 2003.

SILVA, C. L. S. **Apoximia em citros: expressão diferencial de mRNA e proteínas em plântulas e embriões sigóticos e apomíticos**. 2002. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SIVIERO, A. **Avaliação de Métodos de Inoculação de *Phytophthora parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata* à gomose**. 2001. 117 p. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu.

SIVIERO, A.; SANTOS F. A.; CRISTOFANI, M.; FURTADO, E.; MACHADO, M. A. Avaliação *in vitro* de genótipos de citros a *Phytophthora parasitica* **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 300-302, maio/jun. 2004.

SOARES FILHO, W. S.; VILARINHOS, A. D.; ALVES, AL. A. C.; SOBRINHO, A. P. C.; OLIVEIRA, A. A. R.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; CRUZ, J. L.; CASTRO NETO, M. T.; GUERRA FILHO, M. S.; PASSOS, °S.; MEISSNER FILHO, P. E. **Programa de melhoramento genético de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura: obtenção de híbridos**. Embrapa, 2003. 37 p. (EMBRAPA. Documentos, 106).

SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; COLETTA-FILHO, H. D.; CALDANA, C.; GOLDMAN, G. H.; YANAI, G. M.; MUTO, N. H.; OLIVEIRA, R. C.; NUNES, L. R. MACHADO, M. A. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v. 16, n. 10, p. 867-875, Oct. 2003.

STANDNEK, M. J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase supresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* **Physiological an Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, n. 1, p. 25-34, July 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3. ed. Sunderland, 2002. 690 p.

TIMMER, L. W.; GARNSEY, S. M.; GRAHAM, J. M. **Compedium of citrus diseases**. St. Paul: APS Press, 2000. 80 p.

TYLER, B. M. Molecular basis of recognition between *Phytophthora Pathogens* and their hosts. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 137-67, 2002.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 453-483, 1998.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 55, p. 85-97, 1999.

VELAZCO, C. L. **Indução de supressividade a *Phytophthora nicotianae* em mudas de limão cravo com lodo de esgoto**. 2002. 66 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

VELCULESCU, V. E.; ZIANG, L.; VOGELSTEIN, B. KINZLER, K. W. Serial analysis of gene expression. **Science**, Washington, v. 270, n. 5235, p. 484-487, Oct. 1995.

VERNENGHI, A.; RAMIANDRASOA, F.; CHUILON, S.; RAVISE, A. Phytoalexines des citrus: seseline propriétés inhibitrices et nodulation de synthèse. **Fruits**, Paris, v. 42, p. 103-111, Feb. 1987.

VLEESHOUWERS, V. G. A. A.; VAN OOIJEWEERT, W.; GOVERS, F.; KAMOUN, S.; COLON, L. T. Does basal *PR* gene expression in *Solanum* species contribute to non-specific resistance to *Phytophthora infestans*? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, n. 1, p. 35-42, July 2000.

WHITESIDE, J. O. Some factors affecting the occurrence and development of foot rot on citrus trees. **Phytopathology**, St. Paul, v. 61, n. 11, p. 1233-1238, Nov. 1971.

WINDELS, P.; BERTRAND, S.; DEPICKER, A.; MOENS, W.; VAN BOCKSTAELE, E.; LOOSE, M. Qualitative and events-specific PCR real-time detection methods for StarLink maize. **European Food Research and Technology**, New York, v. 216, n. 3, p. 259-263, Mar. 2003.

CAPÍTULO 2

Expressão diferencial de genes de defesa de citros e seu papel na resistência induzida por *Phytophthora parasitica*

RESUMO

TEIXEIRA, J.E.C. **Expressão diferencial de genes de defesa de citros e seu papel na resistência induzida por *Phytophthora parasitica***. 2005. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.*

As plantas têm desenvolvido numerosas estratégias de defesa para se protegerem do ataque de patógenos que, em muitos casos, não ficam confinadas apenas ao local de infecção, mas se propagam de maneira sistêmica para diversas partes da planta. Estes tipos de respostas de defesa, local e sistêmica, são acompanhados pela ativação de vários genes na planta, entre eles genes que codificam para as enzimas *Fenilalanina amônia-liase (PAL)*, *Peroxidase (POX)*, *Lipoxigenase (LOX)*, envolvidos na sinalização, e para proteínas antimicrobianas como *PR-2* (β 1,3-*Glucanases*) e *PR-5* (*Osmotina*), que funcionam como marcadores desta resposta de resistência. Os mecanismos moleculares envolvidos na interação Citros-*Phytophthora* spp. ainda permanecem desconhecidos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a expressão local e sistêmica de genes do tipo *PAL*, *POX*, *LOX*, *PR-2* e *PR-5*, em *P. trifoliata* e *C. sunki*, inoculadas com *P. parasitica*, usando RT-PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). A expressão de genes tipo *PAL*, *POX* e *PR-5* foi mais rápida e de maior intensidade em *P. trifoliata* quando comparada a *C. sunki*. A expressão local de genes do tipo *PAL*, *POX*, *PR-2* e *PR-5* foi mais rápida e mais intensa do que a expressão sistêmica em *P. trifoliata* e *C. sunki*, e para genes do tipo *LOX*, apenas em *C. sunki*. O ferimento no caule, realizado no momento da inoculação, induziu um alto nível de expressão de todos os genes estudados, principalmente em *P. trifoliata*. No entanto, a presença de *P. parasitica* potencializou significativamente o padrão de expressão dos genes estudados, exceto de genes que codificam Peroxidases. Estes resultados são evidências de que *P. trifoliata* apresenta padrões de expressão de genes de defesa característicos de planta resistente, durante interação do tipo incompatível, enquanto que *C. sunki*, de planta suscetível, durante interação compatível.

* Comitê de Orientação: Dr. Luciano Vilela Paiva– UFLA (Orientador), Dra. Magnólia Araújo Campos (Co-Orientadora) – RD-Centro APTA Citros Sylvio Moreira/LCBM–UFLA.

ABSTRACT

TEIXEIRA, J.E.C. **Differential expression of citrus defence genes and their function in induced resistance of *Phytophthora parasitica***. 2005. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.*

Plants have developed many defence strategies to protect themselves against pathogens attack, which do not only concentrate on the local of the infection, but it is extended to the whole plant in a systemic manner. This type of local and systemic defence is followed by the activation of many genes, including *Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)*, *Peroxidase (POX)*, *Lipoxygenase (LOX)*, which are all involved in signalling. And the ones which are antimicrobial proteins such as *PR-2* (β 1,3-*Glucanase*) and *PR-5 (Osmotin)*, that are markers of this type of resistance. The molecular mechanisms involved in the interaction *Citrus-Phytophthora* are still unknown. The objective of this work was to quantify the local and systemic expression of *PAL*, *POX*, *LOX*, *PR-2* and *PR-5*-like genes, in *P. trifoliata* and *C. sunki*, induced by *P. parasitica*, using real time quantitative RT-PCR (RT-qPCR). The expression of *PAL*, *POX*, and *PR-5* like-genes was quicker and higher in *P. trifoliata* than in *C. sunki*. Local expression was quicker and higher for *PAL*, *POX*, *PR-2* and *PR-5*-like gene than systemic expression in *P. trifoliata* and *C. sunki*. In addition, the *LOX*-like gene expression was only in *C. sunki*. The wounding caused during inoculation induced high level of expression of all the studied genes, mainly in *P. trifoliata*. However, the presence of *P. parasitica* had a significant additive effect on the expression levels of the studied genes, except for the Peroxidase encoded genes. The results suggest that *P. trifoliata* could be characterized as resistant to *P. parasitica* and *C. sunki* as susceptible by presenting patterns of defense genes expression typical of incompatible and compatible interactions, respectively.

* Comitê de Orientação: Dr. Luciano Vilela Paiva- UFLA (Orientador), Dra. Magnólia Araújo Campos (Co-Orientadora) – RD-Centro APTA Citros Sylvio Moreira/LCBM-UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Numerosas estratégias de defesa têm sido desenvolvidas pelas plantas para se protegerem do ataque de patógenos. Em muitos casos, uma resposta de defesa não somente no local de infecção, mas também em partes distantes, de maneira sistêmica, é desencadeada. Esta resposta, conhecida como resistência sistêmica adquirida (SAR) é acompanhada pela ativação de muitos genes na planta. Atualmente, várias moléculas sinalizadoras têm sido descobertas, desencadeando uma expressão coordenada de grupos específicos de genes de defesa, que são acumulados em tecidos próximos e distantes do local de infecção.

A molécula sinalizadora mais conhecida é o ácido salicílico, que desencadeia a expressão de genes relacionados à resistência sistêmica adquirida, tais como genes que codificam para as enzimas Fenilalanina amônia-liase e Peroxidase, e diversas proteínas PR, entre elas PR-2 e PR-5. Outras moléculas sinais, como o ácido jasmônico e o etileno, induzem a expressão de um outro grupo de genes, entre eles genes que codificam para a enzima Lipoxigenase, e também genes *PR*. Estas moléculas sinalizadoras são responsáveis por vias distintas de respostas, mas que podem interagir em determinados patossistemas.

Um dos patossistemas de grande importância na produção agrícola brasileira é o constituído por Citros-*Phytophthora*. Merece destaque por afetar severamente o sistema de produção de mudas e extensas áreas de pomares, podendo até levar a planta à morte. A estratégia de controle mais eficiente e indicada para *Phytophthora* spp. em citros é a utilização da resistência genética, através da utilização de porta-enxertos resistentes ou tolerantes a *P. parasitica*. No entanto, a maioria das variedades de porta-enxertos utilizadas atualmente é suscetível. Como o melhoramento clássico de citros apresenta limitações, tanto

de ordem biológica quanto genética, estratégias mais efetivas e duradouras que levem ao controle de doenças, por meio de plantas resistentes, poderão surgir a partir do entendimento das relações planta patógenos. Neste sentido, a análise da expressão local e sistêmica de genes de defesa de citros em espécies resistentes, como *P. trifoliata*, e suscetíveis, como a tangerina Sunki, poderão fornecer importantes informações para a busca de novas estratégias de controle das doenças causadas por *Phytophthora* em citros.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os trabalhos de casa de vegetação e laboratório foram desenvolvidos no Centro APTA Citros Sylvio Moreira, em Cordeirópolis, SP.

Com o objetivo de detectar a expressão diferencial de alguns genes relacionados com a defesa na interação citros x *P. parasitica*, um experimento inteiramente casualizado foi realizado, com plantas de porta-enxertos *Poncirus trifoliata* ‘Rubidoux’ (resistente ao patógeno) e *Citrus sunki* (suscetível). Foram utilizadas três repetições para cada amostra, de cada espécie. As amostras foram divididas em tratamentos, conforme as datas de coletas, sendo 0, 12, 24, 48 e 72 horas após inoculação com patógeno. A expressão gênica local, avaliada em tecidos ao redor do local da inoculação, e sistêmica, avaliada nas folhas, foram analisadas em plantas inoculadas e não inoculadas com *P. parasitica*.

2.1 Material Genético

Sementes de *P.trifoliata* (L.) Rafinesque cultivar ‘Rubidoux’ e *C. sunki* Hort. Ex. Tanaka, colhidas do Banco Ativo de Germoplasma do Centro APTA Citros Sylvio Moreira, foram semeadas em tubetes de plástico e crescidas em estufa. Três meses após a semeadura as plantas foram utilizadas no bioensaio.

2.2 Preparo do inóculo de *Phytophthora parasitica*

Isolado virulento de *Phytophthora parasitica*, IAC 0195, foi obtido de frutos de laranja ‘Pêra’ artificialmente infectados com o patógeno na região do albedo do fruto. O fruto foi mantido em câmara úmida, sob temperatura ambiente, até que $\frac{3}{4}$ do fruto estivesse com sintomas, tempo suficiente para que

o patógeno atingisse as sementes. As sementes contaminadas foram assepticamente seccionadas em pedaços, transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura cenoura-agar e colocadas em BOD a 25°C. Após 24-72 horas observou-se o micélio do patógeno colonizando o meio de cultura. Foi feita uma única repicagem do oomiceto em meio cenoura-ágar e, após sete dias, o material foi utilizado para inocular plantas de citros.

2.3 Bioensaio de Inoculação de *P. parasitica*

Para o bioensaio de expressão de genes induzidos por *P. parasitica* e por ferimento foram utilizadas 51 plantas de *P. trifoliata* ‘Rubidoux’ e 51 plantas de *C. sunki*, que foram inoculadas ou não aos 90 dias após semeadura.

A inoculação foi realizada através de agulha de metal, descrita por Siviero (2001). Três inoculações foram feitas sob a haste das plantas com auxílio de agulha de metal infestada com micélio de *P. parasitica*. Posteriormente, os locais de inoculação foram cobertos com algodão umedecido e vedados com esparadrapo, formando uma câmara úmida. Nas plantas não inoculadas o procedimento foi o mesmo, porém as plantas apenas sofreram ferimento com a agulha não infestada pelo micélio do patógeno, simulando a inoculação. Após inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento sob 70% de UR e temperatura de 25°C até a data da coleta do material.

Tecidos ao redor dos locais de inoculação e de folhas de cada planta foram coletados para extração de RNA total nos seguintes tempos: 0, 12, 24, 48 e 72 horas. Para cada tempo foram utilizadas seis plantas de cada espécie sendo que três foram inoculadas com o patógeno e três não inoculadas, exceto para o tempo 0 hora, quando apenas 3 plantas foram utilizadas e não houve o contato com o patógeno. No momento da coleta, a câmara úmida foi retirada e o local da inoculação, desinfestado com etanol 70%. Os tecidos adjacentes aos locais das

inoculações foram retirados com auxílio de uma lâmina de bisturi e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. As folhas também foram desinfestadas com etanol 70%, coletadas e, rapidamente, congeladas em nitrogênio líquido. Os tecidos coletados e congelados foram mantidos a -80°C até o momento da extração de RNA.

2.4 Extração de RNA e síntese de cDNA

Aproximadamente 100 mg de cada amostra coletada foram triturados em almofariz com nitrogênio líquido. O pó fino resultante foi misturado com 1mL do reagente TRIZOL (Invitrogen - Life Technologies, Grand Island, New York) para extração de RNA total, seguindo o procedimento descrito pelo manual do fabricante.

Após a adição do reagente a cada amostra e homogeneização, a mistura permaneceu por 5 min à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação do complexo núcleo-protéico. Após incubação, as amostras foram centrifugadas (12.000 x g, por 10 min, a 4°C), sendo o sobrenadante transferido para novo tubo. Em seguida, o RNA foi extraído do sobrenadante pela adição de 200 µL de clorofórmio, que foram misturados vigorosamente. Após incubação de 3 min à temperatura ambiente, as amostras foram novamente centrifugadas (12.000 x g, 10 min, 4°C) e a fase aquosa, transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 500 µL de isopropanol para precipitação do RNA. Os tubos foram incubados por 10 min à temperatura ambiente e novamente centrifugados (12.000 x g por 10 min, a 4°C). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 75%, seco a vácuo por 5 min, dissolvido em 30 µL de água Mili-Q tratada com 0,1% de DEPC (Diethyl Pirocarbonato–Sigma) e armazenado a -80°C.

A quantificação de RNA das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 260 nm. A integridade dos RNAs foi verificada em gel de agarose 1%, através de corrida eletroforética a 200 V por 15 minutos, em tampão TAE 1X (4,84 g tris-base; 1,142g de ácido acético glacial e 1mM de EDTA 0,5M pH 8,0 para 1 L), feito com água Mili-Q tratada com 0,1% de DEPC.

Antes da síntese do DNA complementar, as amostras de RNA foram digeridas com DNase-I para eliminar qualquer contaminação por DNA. Após este tratamento foi realizada uma PCR (reação em cadeia da polimerase), usando RNA tratado como molde para verificar se ainda havia contaminação por DNA.

Para a reação de transcrição reversa, as três repetições biológicas foram misturadas, formando uma amostra única (*pool*). Para cada amostra foram utilizados 1 µg de RNA total, que foram adicionados a 1,5 µg de random primer e 0,4 µM de dNTP e colocados a 68 °C por 15 min. Posteriormente, a cada amostra foram adicionados 0,8 X de 5X First-Strand Buffer, 8 mM de DDT, 20 U de RNase out e 200 U da enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) e foram incubadas a 37°C por 1 hora. Após este tempo, as amostras de cDNA de fita simples foram armazenadas em congelador – 20 °C.

2.5 Síntese dos *primers* específicos

Os *primers* usados neste estudo estão apresentados na Tabela 1. Oligonucleotídeos foram desenhados para alguns genes envolvidos no processo de sinalização da resposta de defesa de plantas a patógenos, com base em alinhamentos de pelo menos 5 a 10 EST's (*expressed sequence tags*) homólogos a cada gene estudado, disponíveis no banco de dados CitEST/CAPTACSM (<http://citest.centrodecitricultura.br>), utilizando o software Primer 3. Estes genes codificam para as enzimas Peroxidase (POX), Lipoxigenase (LOX), Fenilalanina

amônia-liase (PAL) e proteínas PR, Glucanase (PR-2) e Osmotina (PR-5). A proteína β - tubulina foi escolhida como controle endógeno por apresentar expressão constitutiva (Brunner *et al.*, 2004). O tamanho das seqüências amplificadas por estes *primers* foi de aproximadamente 150 pb, exceto para β -tubulina, cujo fragmento possui 80 pb.

TABELA 1. Seqüências dos *primers* utilizados nas análises de PCR quantitativo em tempo real.

Nome do Gene	Seqüência do <i>Primer</i>
β - tubulina	F – 5' GGA TCT TGA ACC TAC CA 3' R – 5' ATC AAT TCG GCG CCT TCA G 3'
<i>POX</i>	F – 5' CAT CAC AGT GTG GCT TGA CC 3' R – 5' CTC AGC CTT AAA GCG AGT GC 3'
<i>LOX</i>	F – 5' TTG CCT ATG ACA AGC AAT GG 3' R – 5' GAG ATC AAG GCC ATC ATT GG 3'
<i>PAL</i>	F – 5' CAC AAA TTG AAG CAC CAT CC 3' R – 5' TTC TCA GGG CAT AAC GAT CC 3'
<i>Glucanase</i> (PR-2)	F – 5' GAC GTC GTC GTA TCT CAT GG 3' R – 5' GAG TTG GGC GTC AAA AAG G 3'
<i>Osmotina</i> (PR-5)	F – 5' GTC CGT TGC ATT CCA AGC 3' R – 5' GCG GCT TCT ATC TCC ATA GC 3'

2.6 RT-PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)

A análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foi realizada em sistema de detecção de seqüências ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). O sistema de detecção utilizado foi o SYBR green,

que se baseia na capacidade do fluoróforo se ligar às fitas duplas de cDNA. As condições térmicas da PCR foram 50°C por 2 min, 10 min a 94 °C, e 40 ciclos, de 15 seg a 95 °C e 1 min a 60 °C, cada ciclo.

Para o RT-qPCR foram utilizados 1 µg de cDNA de cada amostra, 12,5 µL de Master Mix (Applied Biosystems) e 0,2 µM de cada *primer* direto e reverso (1µM), para um volume final de 25µL. As amostras foram processadas em duplicatas. O gene de *β-tubulina* foi utilizado como controle endógeno. Os resultados foram normalizados utilizando C_t s obtido para o controle endógeno presente na mesma reação. C_t é definido como o primeiro ciclo de amplificação no qual a fluorescência indica que um produto de PCR é detectado acima do limiar. Para normalização foi utilizada a equação $\Delta C_t = C_t (\text{gene alvo}) - C_t (\text{controle endógeno})$. A calibração foi determinada pela fórmula $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t (\text{amostra}) - \Delta C_t (\text{calibrador})$. O calibrador é um valor obtido para uma amostra específica. A quantificação relativa foi obtida pela fórmula $2^{-\Delta \Delta C_t}$.

Para verificar se a presença do patógeno iria induzir a expressão dos genes estudados, nos mesmos tempos de coleta, para os cálculos de quantificação relativa, os dados obtidos a partir das plantas em que apenas o ferimento foi realizado foram utilizados como calibrador. O efeito do ferimento foi verificado usando como calibrador plantas que não foram submetidas ao ferimento nem colocadas em contato com o patógeno.

2.7 Confirmação dos dados de RT-qPCR

Para confirmar os dados obtidos pela técnica de RT-qPCR, uma segunda reação foi realizada, para algumas amostras, utilizando cDNAs novamente sintetizados. Além disso, uma segunda confirmação foi realizada, utilizando três repetições biológicas isoladas para expressão de genes do tipo *PAL*, nas mesmas

condições descritas anteriormente, para confirmar a possível utilização do *pool* das amostras.

2.8 Análise e validação dos dados

As amostras foram avaliadas quanto à expressão gênica induzida pelo patógeno *P. parasitica* e pelo ferimento provocado pela inoculação. Análise de variância em esquema fatorial, utilizando os dados normalizados, foi realizada para validar os dados obtidos pelos cálculos de quantificação relativa. Para verificar o efeito do patógeno em induzir a expressão dos genes estudados, os fatores utilizados foram espécie, tempo de coleta das amostras, inoculação do patógeno e local de expressão destes genes. Os fatores envolvidos no efeito do ferimento foram espécie, tempo de coleta das amostras e local de expressão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Expressão diferencial de genes de defesa induzidos em plantas de citros por *Phytophthora parasitica*

Este é o primeiro relato da quantificação da expressão de genes de defesa em citros envolvendo o patossistema Citros-*Phytophthora*. Este trabalho é parte relevante da validação do genoma funcional de citros, recém concluído por iniciativa do Centro APTA citros Sylvio Moreira/IAC/MCT/CNPq/Institutos do Milênio, intitulado “CitEST – Integração melhoramento genético, genoma funcional e comparativo de citros”.

Usando RT-PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), a expressão de alguns genes induzidos em resposta ao ataque de *P. parasitica* foi analisada em tecidos vegetais próximos a lesão (expressão local) e em tecidos distantes (expressão sistêmica) em *P. trifoliata* e *C. sunki*.

Numa primeira etapa, um experimento preliminar foi realizado para a determinação do *time course* da expressão dos genes de defesa estudados neste trabalho. Neste experimento, mudas de *P. trifoliata* e *C. sunki* com um ano de idade foram inoculadas com *P. parasitica*. Tecido foliar e da casca próximos ao local da inoculação foram coletados nos tempos 12, 24, 48, 72, 120 e 240 horas após a inoculação (a.i.) e cDNA foi produzido. Com base em análise de *dot blot*, usando sondas de genes do tipo *PR-2* e *PR-5* de laranja ‘Pêra IAC’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck), obtidos no banco de dados CitEST/CAPTACSM, foi possível observar que o padrão de expressão destes genes em citros foi similar ao já determinado para plantas anuais, ou seja, entre 12 e 48 horas, principalmente (dados não mostrados). Em virtude da dificuldade encontrada em

macerar e extrair RNA de tecido de caule, por se apresentar bastante lignificado, este experimento também serviu para determinar a utilização de plantas de citros mais jovens, com apenas três meses de idade.

Os genes estudados nesse trabalho foram escolhidos por estarem envolvidos na cascata de defesa de plantas a vários patógenos. A descrição de várias isoformas para todos eles tem sido indicativo de que estes genes podem estar organizados nos genomas de plantas como famílias multigênicas. Portanto, a detecção da expressão estudada pode-se referir a um ou mais genes de cada família, uma vez que os *primers* utilizados foram desenhados a partir de regiões conservadas dentro dessas ORF's.

Foi possível visualizar, em plantas de *C. sunki*, 24 horas a.i., que o tecido próximo ao local da inoculação apresentava uma coloração amarela escura, alteração que não foi verificada em *P. trifoliata*, na qual o tecido ficou apenas levemente amarelado. Nas plantas em que apenas o ferimento foi realizado não foram observadas alterações na coloração do tecido (Figura 1).



FIGURA 1 Detalhe da haste de plantas de *C. sunki* (esquerda) e *P. trifoliata* (direita) 24 horas após inoculação com *P. parasitica*.

3.1.1 Validação dos dados de RT-qPCR

A técnica de RT-qPCR foi validada através de uma nova reação utilizando amostras de tecido local de *P.trifoliata* e *C. sunki*, para genes do tipo *PAL*, *POX* e *LOX*. O padrão de expressão local foi similar nos dois eventos de RT-qPCR, como observado nas Figuras 2, 3, 4, 5, 6, e 7. Estes dados confirmam os resultados gerados pela técnica de RT-qPCR, uma vez que o padrão de expressão foi o mesmo em duas reações independentes, com duas repetições por amostra.

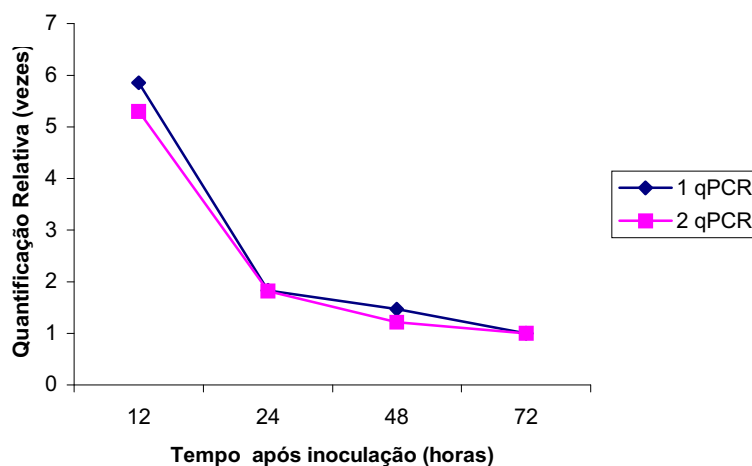


FIGURA 2. Comparação da expressão local de genes do tipo *PAL* induzida por *P. parasitica* em *P. trifoliata* com três meses de idade, por 2 eventos independentes de RT-qPCR.

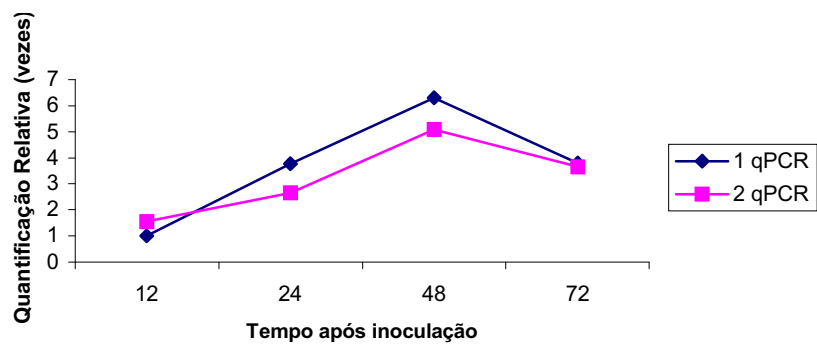


FIGURA 3. Comparação da expressão local de genes do tipo *PAL* induzida por *P. parasitica* em *C. sunki* com três meses de idade, por 2 eventos independentes de RT-qPCR.

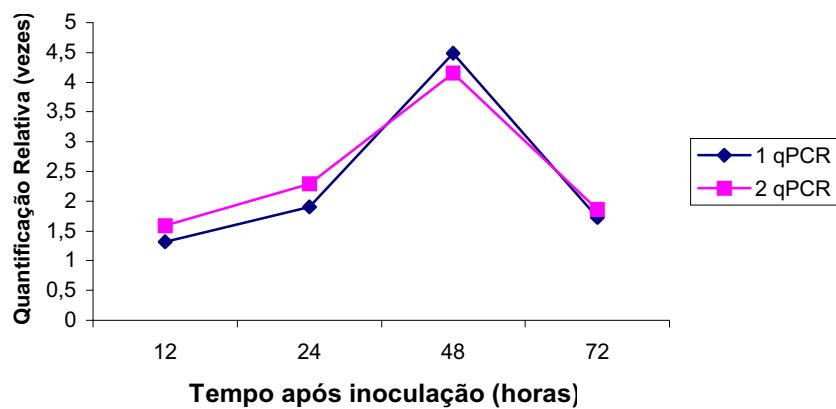


FIGURA 4. Comparação da expressão local de genes do tipo *POX* induzida por *P. parasitica* em *P. trifoliata* com três meses de idade, por 2 eventos independentes de RT-qPCR.

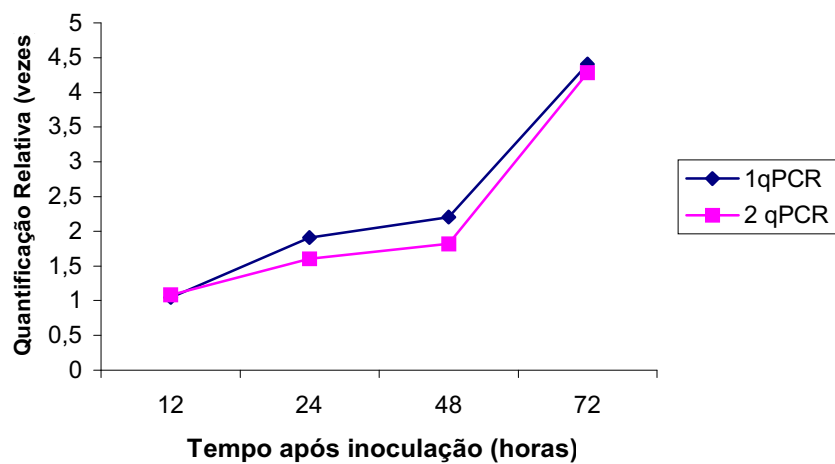


FIGURA 5. Comparação da expressão local e genes do tipo *POX* induzida por *P. parasitica* em *C. sunki* com três meses de idade, por 2 eventos independentes de RT-qPCR.

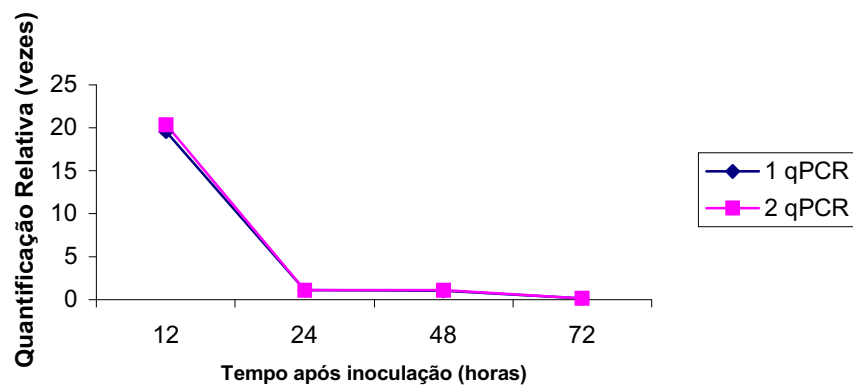


FIGURA 6. Comparação da expressão local de genes do tipo *LOX* induzida por *P. parasitica* em *P. trifoliata* com três meses de idade, por 2 eventos independentes de RT-qPCR.

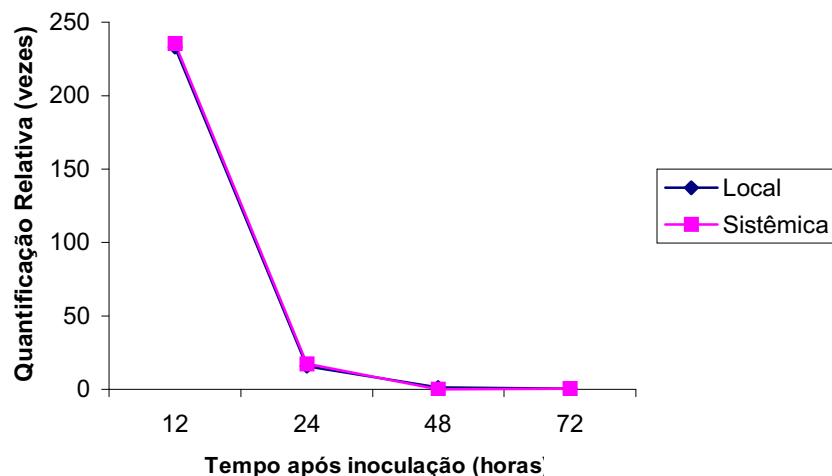


FIGURA 7. Comparação da expressão local de genes do tipo gene *LOX* induzida por *P. parasitica* em *C. sunki* com três meses de idade, por 2 eventos independentes de RT-qPCR.

Para confirmar se o padrão de expressão das plantas individuais (repetições biológicas) das amostras utilizadas, que formavam um *pool*, apresentavam padrões similares, foi realizado um outro evento de RT-qPCR, com todas as três repetições biológicas isoladamente, em todos os tempos de coleta, para as duas espécies. Para esta validação foi utilizado o gene *PAL*. Os resultados apresentados nas Figuras 8 e 9 e Tabela 1A (ANEXO) revelam que o padrão de expressão para genes do tipo *PAL*, obtido nas três repetições biológicas, não difere do padrão de expressão encontrado para as amostras formadas pelo *pool* das repetições biológicas. Estes resultados validam a utilização do *pool* das repetições biológicas como amostras representativas para o estudo da expressão gênica, nas condições realizadas neste trabalho.

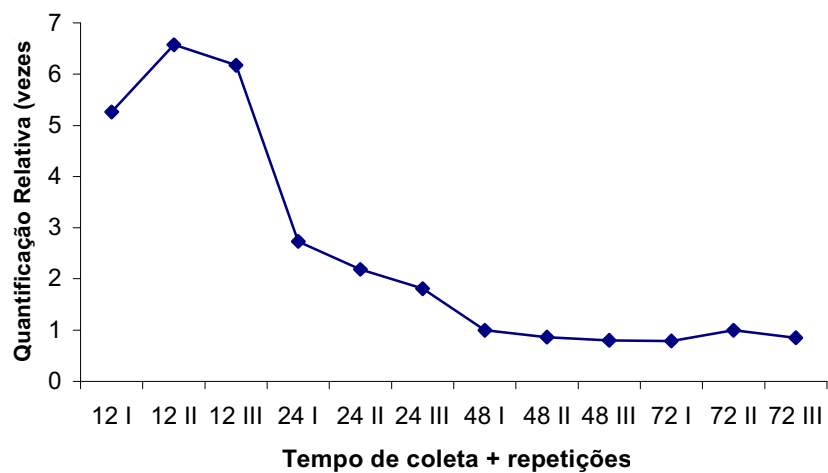


FIGURA 8. Comparação da expressão local de genes do tipo *PAL* induzida por *P. parasitica* em três repetições biológicas de *P. trifoliata*.

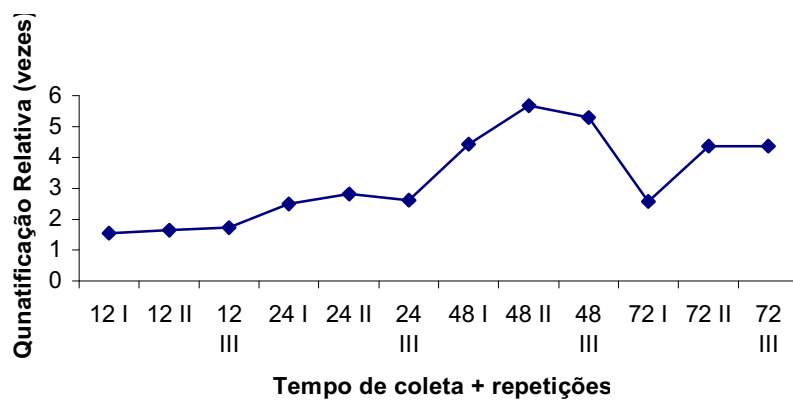


FIGURA 9. Comparação da expressão local de genes do tipo *POX* induzida por *P. parasitica* em três repetições biológicas de *C. sunki*.

3.1.2 Expressão de genes do tipo *PAL*

A expressão de genes do tipo *PAL*, que codificam para a enzima Fenilalanina amônia-liase, foi induzida pelo patógeno, e este efeito foi diferente entre as espécies estudadas, tempos de coleta e local de expressão (Tabela 2A). As interações, cultivar x tempo e tratamento x local foram significativas, indicando que o padrão de expressão foi diferente nos tempos estudados e que o patógeno induziu a expressão deste gene, diferentemente, nos locais estudados.

A indução local de genes do tipo *PAL*, em *P. trifoliata* ocorre rapidamente logo após o contato do patógeno com a planta, pois a expressão máxima observada no *time course* utilizado foi às 12 horas a.i. Após este tempo a expressão declinou fortemente até atingir valores menores que 1 às 72 horas a.i. (Figura 10). Este fato evidencia que, para esta situação, um tempo de coleta mais precoce poderia ser usado para detectar a indução inicial de genes do tipo *PAL* em *P. trifoliata*. Ao contrário de *P. trifoliata*, em *C. sunki* a expressão foi induzida a partir de 12 horas a.i., atingindo um valor máximo às 48 horas (Figura 10). Neste caso, o tempo de coleta das amostras utilizado foi adequado. A indução sistêmica em *P. trifoliata* atinge valores máximos em 48 horas a.i., e em *C. sunki* o máximo só é observado às 72 horas a.i., nos tempos estudados. Apesar de o efeito sistêmico de genes do tipo *PAL* ter sido observado, a expressão deste gene monitorando este tipo de resposta não tem sido relatada na literatura. Foi possível observar que a expressão local foi mais rápida e em maior intensidade, independentemente da espécie.

O padrão de expressão de genes do tipo *PAL* observado nestas duas situações está de acordo com vários trabalhos encontrados na literatura (Kohler et al., 2002; Standbek e Buchenauer, 2000.), que mostram que esta enzima desempenha um papel importante na resposta de defesa de plantas a patógenos, uma vez que é induzida após contato com o patógeno e sua expressão é mais

rápida e com maior intensidade em plantas resistentes, comparadas a plantas suscetíveis.

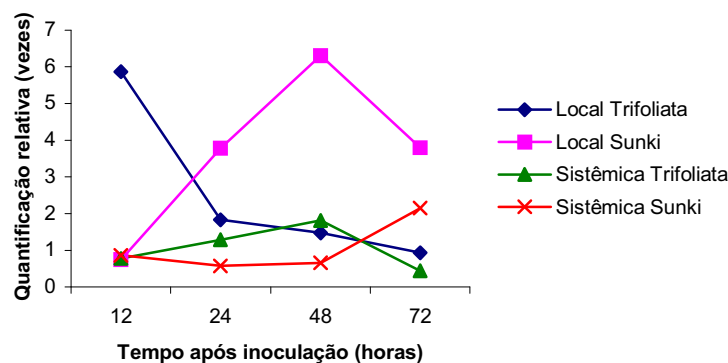


FIGURA 10. Comparação da expressão local e sistêmica de genes do tipo *PAL* induzida por *P. parasitica* em *P. trifoliata* e *C. sunki* com três meses de idade.

3.1.3 Expressão de genes do tipo *POX*

Para genes do tipo *POX*, que codificam enzimas Peroxidases, não houve efeito do patógeno em induzir a expressão deste gene e nenhuma diferença foi estatisticamente detectada nos tempos estudados (Tabela 2A). Existem diferenças na expressão deste gene entre as duas espécies estudadas e entre os locais de expressão. O padrão de expressão não foi coincidente nos tempos, locais e espécies analisados (Tabela 2A). A expressão local de genes do tipo *POX* em *P. trifoliata* foi induzida a partir de 12 horas a.i., atingindo um valor máximo em 48 horas e declinando em seguida (Figura 11). Neste caso, o tempo de coleta escolhido também foi adequado, pois foi possível verificar o padrão de expressão desde o início da indução, seu pico e declínio. Em *C. sunki*, no

primeiro tempo de coleta, também foi possível notar que a indução na expressão local de genes do tipo *POX* inicia e aumenta mais lentamente do que em *P. trifoliata*. Nesta espécie, a expressão local só atinge seu máximo 72 horas a.i. A indução sistêmica atinge valores máximos 48 horas a.i. em *P. trifoliatae* 72 horas a.i. em *C. sunki*. O efeito sistêmico de genes do tipo *POX* também não tem sido reportado na literatura.

O padrão de expressão deste gene, quando comparado nas duas espécies também está correlacionado com dados encontrados na literatura, que mostram que após contato com o patógeno sua expressão é mais rápida em plantas resistentes do que em plantas suscetíveis a patógenos (Ward et al., 1991; Sasaki et al, 2004).

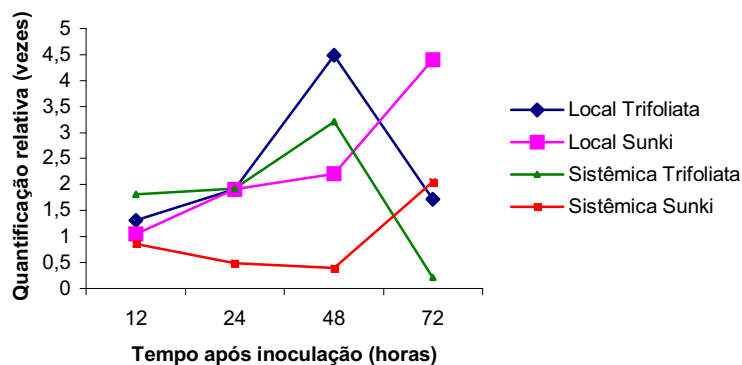


FIGURA 11. Comparação da expressão local e sistêmica de genes do tipo *POX* induzida por *P. parasitica* em *P. trifoliata* e *C. sunki* com três meses de idade.

3.1.4 Expressão de genes do tipo *LOX*

A presença do patógeno induziu a expressão de genes do tipo *LOX*, que codificam enzimas Lipoxigenases, sendo esta indução diferente nas duas espécies e tempos estudados, não diferindo entre o local da expressão (Tabela 2A). Observa-se também que este padrão de expressão não é coincidente entre as espécies, tempo e local estudados.

A indução na expressão de genes do tipo *LOX* foi observada tanto em *C. sunki* quanto em *P. trifoliata*, logo no primeiro tempo de coleta, declinando rapidamente nas duas espécies estudadas. A magnitude de expressão de genes do tipo *LOX* foi maior em *C. sunki* do que em *P. trifoliata* em todos os tempos estudados (Figura 12). Este padrão de expressão difere dos encontrados na literatura.

Jalloul e colaboradores (2002), trabalhando com o patossistema Algodão-*Xanthomonas*, relatam que a atividade da enzima LOX foi mais rápida e mais intensa em interações incompatíveis. Nesta interação, o máximo de atividade foi observado 8 horas a.i., e ocorreu apenas entre 24-48 horas a.i. na interação compatível. Se em 8 horas já foi possível detectar um máximo de atividade de LOX, o nível de transcritos de genes do tipo *LOX* deve ter sido observado muito antes. Bell & Mullet (1993), relatam que o acúmulo de transcritos de genes do tipo *LOX* é rápido, cerca de 2 horas e tecido específico.

O fato de que uma maior expressão de genes do tipo *LOX* ter sido observado em *C. sunki* e não em *P. trifoliata* pode estar relacionado à ocorrência de necrose nos tecidos próximos ao local da inoculação em *C. sunki*. A enzima codificada por este gene pode estar envolvida na produção de hidroperóxidos e radicais livres, relacionados à explosão oxidativa e morte celular (Bell & Mullet, 1993), o que poderia explicar seus altos valores de expressão obtidos nesta espécie.

A indução sistêmica de genes do tipo *LOX* também foi observada nas duas espécies, porém de modo contrastante em relação à expressão local. Em *P. trifoliata*, a expressão sistêmica ocorreu rapidamente, pois atingiu um pico no primeiro tempo de coleta, declinando em seguida. Em *C. sunki*, a expressão sistêmica só foi detectada a partir de 24 horas a.i., e em menor intensidade do que em *P. trifoliata*, que atingiu valor máximo às 12 horas a.i. (Figura 12). Em *P. trifoliata*, a expressão sistêmica de genes do tipo *LOX* foi mais intensa do que a expressão local, independentemente do tempo de coleta das amostras. Em *C. sunki*, a expressão local apresentou um pico de indução 12 horas a.i. com posterior declínio. A expressão sistêmica foi pouco pronunciada, sendo detectada apenas 48 horas a.i. (Figura 12).

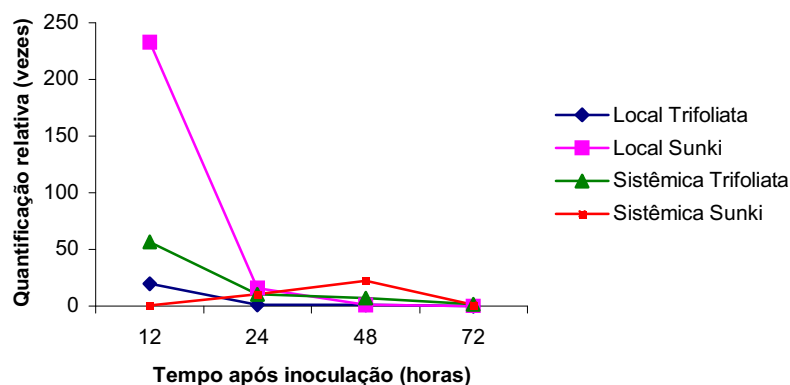


FIGURA 12. Comparação da expressão local e sistêmica de genes do tipo *LOX* induzida por *P. parasitica* em *P. trifoliata* e *C. sunki* com três meses de idade.

3.1.5 Expressão de genes do tipo *PR-2*

A expressão de genes que codificam para proteínas antimicrobianas do tipo β 1,3-glucanases, uma proteína PR do grupo 2, foi induzida por *P. parasitica*. Esta expressão foi diferente entre os tempos e locais estudados, porém as duas espécies não apresentaram diferenças no padrão de expressão deste gene, nos tempos estudados (Tabela 2A; Figura 13).

A expressão local de genes do tipo *PR-2*, nas duas espécies, foi observada e o padrão encontrado não indica quando a expressão começa ou atinge o valor máximo, mas apenas quando a expressão já está declinando. Estes resultados não coincidem com os encontrados na literatura, uma vez que é relatado que a expressão de genes do tipo β 1,3 *glucanases* é mais rápida e de maior intensidade em interações incompatíveis (Anand et al., 2003), nas quais o máximo de indução foi observado entre 6-12 horas a.i.

Lawrence e colaboradores (1996) reportaram que atividade de Glucanase foi observada em vários genótipos de tomate induzidos por *Alternaria solani*. Os genótipos resistentes apresentaram maior atividade desta enzima do que genótipos suscetíveis. Análises de *Western blot* revelaram que o número de isoformas de Glucanases nos genótipos resistentes foi maior, indicando que a resistência observada pode ser devida a um maior número de enzimas se expressando, contribuindo para maior atividade e maior efeito sobre o patógeno. Depois de 4 dias a.i., nenhuma diferença foi detectada em função de atividade de Glucanases entre os dois genótipos, indicando que o genótipo suscetível também possui alta atividade desta enzima, porém a resposta é atrasada.

O estudo da indução sistêmica de genes do tipo *PR-2* em *P. trifoliata* e *C. sunki* revelou que em *P. trifoliata*, a expressão foi detectada a partir de 24 horas a.i., atingindo um valor máximo 72 horas a.i.. Enquanto que somente a partir de 48 horas a.i. em *C. sunki* a expressão foi detectada e os valores obtidos,

menores (Figura 13). Van Loon & Van Strien (1999) também demonstraram que genes do tipo *PR-2* possuem expressão sistêmica e esta é maior e mais rápida em cultivares resistentes do que em suscetíveis.

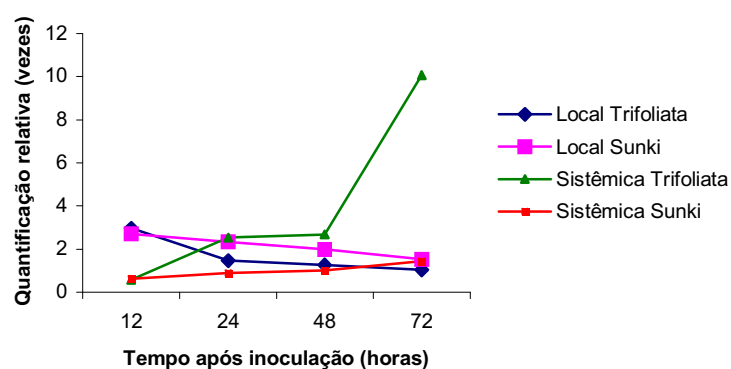


FIGURA 13. Comparação da expressão local e sistêmica de genes do tipo *PR-2* induzida por *P. parasitica* em *P. trifoliata* e *C. sunki* com três meses de idade.

3.1.6 Expressão de genes do tipo *PR-5*

Genes do tipo *PR-5*, que codificam proteínas antimicrobianas do tipo Osmotinas, uma proteína PR do grupo 5, foram induzidos por *P. parasitica* nas duas espécies estudadas neste experimento. O padrão de expressão encontrado foi diferente e não coincidentes entre as espécies, tempo e local de expressão (Tabela 2A).

Em *P. trifoliata*, a indução local de genes do tipo *PR-5* foi observada no primeiro tempo de coleta, no qual atinge valor máximo, com posterior declínio. Este fato evidencia que, para esta situação, o tempo de coleta escolhido não

permitiu verificar a partir de que momento ocorreu à indução deste gene em *P. trifoliata*. Em relação à *C. sunki*, a expressão local foi induzida a partir de 48 horas a.i., atingindo um valor máximo às 72 horas a.i. Não foi possível observar quando a expressão começou a declinar (Figura 14).

A indução na expressão sistêmica de genes do tipo *PR-5* foi observada nas duas espécies sendo que em *P. trifoliata* atinge o máximo em 24 horas a.i. e em *C. sunki*, apenas 48 horas a.i. A demonstração de que a expressão de genes *PR-5* é mais rápida e de intensidade maior em plantas resistentes, quando comparadas com plantas suscetíveis já foi relatada anteriormente (Ward et al., 1991; Morris et al., 1998; Vleeshouwers et al., 2000; Schenk et al., 2003).

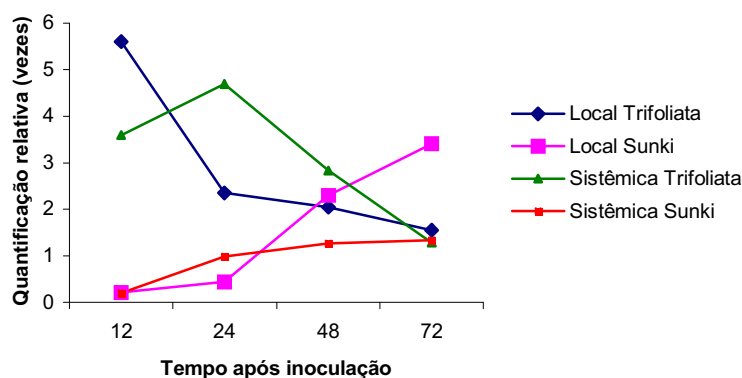


FIGURA 14. Comparação da expressão local e sistêmica de genes do tipo *PR-5* induzida por *P. parasitica* em *P. trifoliata* e *C. sunki* com três meses de idade.

Em geral, a expressão dos genes estudados induzidos por *P. parasitica* foi maior e mais rápida em *P. trifoliata* do que em *C. sunki*, tanto no local de contato com o patógeno quanto sistêmica, com exceção da expressão local de *LOX* e *PR-2*. A expressão local também foi mais rápida e em maior intensidade quando comparada com a expressão sistêmica, exceto para genes do tipo *LOX*

em *P. trifoliata*. Estes dados corroboram com os encontrados na literatura, que mostram que a expressão de genes de defesa em interações incompatíveis é mais rápida e de maior intensidade do que em interações compatíveis (Veronesi et al., 1996; Morris et al., 1998; Jalloul et al., 2002; Sasaki et al., 2004) e que a expressão local também é mais rápida e em maior intensidade que a sistêmica (Schenk et al., 2003).

O *time course* escolhido para estudar a expressão destes genes foi mais adequado para o estudo da expressão sistêmica do que da local, principalmente em *P. trifoliata*, na qual, para a maioria dos genes estudados, não foi possível detectar quando a expressão inicia, atinge um valor máximo e declina. Isto porque especula-se que a expressão de genes de defesa em plantas resistentes deva ocorrer rapidamente, logo após o contato com o patógeno.

Genes do tipo *PR-2* e *PR-5* não foram expressos de maneira coordenada, ou seja, simultaneamente. Frequentemente tem sido reportado que o acúmulo de proteínas Glucanases e Quitinases ocorre simultaneamente, em muitas plantas, apresentando atividade sinérgica (Mauch, et al., 1988; Zhu et al., 1996; Tornero et al. 1997). Vleeshouwers e colaboradores (2000) demonstraram que a ausência de regulação coordenada entre diferentes genes *PR* foi observada em solanáceas.

3.2 Expressão diferencial de genes de defesa induzidos em plantas de citros por ferimento

No método de inoculação das plantas com *P. parasitica* usado neste trabalho é necessário realizar um ferimento no local da inoculação para facilitar o contato do patógeno com a planta. De modo geral, o ferimento induz a expressão dos genes estudados (Gardner, 1991). Para verificar se eles estavam sendo eliciados pelo ferimento provocado pelo método de inoculação, a

quantificação relativa da expressão destes genes foi calculada em plantas em que apenas o ferimento foi realizado, usando como calibrador plantas que não foram submetidas ao ferimento nem foram colocadas em contato com o patógeno.

A expressão de genes do tipo *PAL* foi diferente nas duas espécies e tempos estudados, não diferindo em relação ao local de expressão (Tabela 3A). A indução local da expressão de genes do tipo *PAL* só foi verificada em plantas de *P. trifoliata* em todos os tempos de coleta (Figura 15), enquanto a indução sistêmica foi observada nas duas espécies, com nível de expressão similar. A expressão máxima foi detectada 48 horas a.i. (Figura 15).

A indução na expressão de genes do tipo *POX* eliciada por ferimento foi diferente nas duas espécies estudadas (Tabela 3A). *P. trifoliata* apresentou maiores valores de expressão em todos os tempos de coleta estudados, quando comparada com *C. sunki*, sendo que a expressão foi diferente entre os tempos e locais estudados (Figura 16).

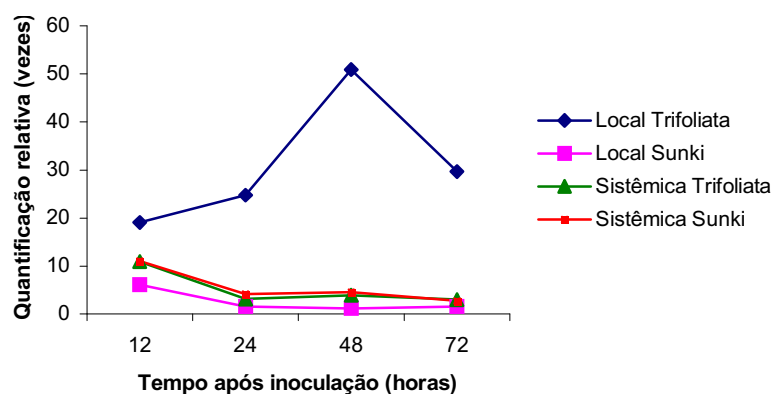


FIGURA 15. Comparação da expressão local e sistêmica de genes do tipo *PAL* induzida por ferimento em *P. trifoliata* e *C. sunki*, com três meses de idade.

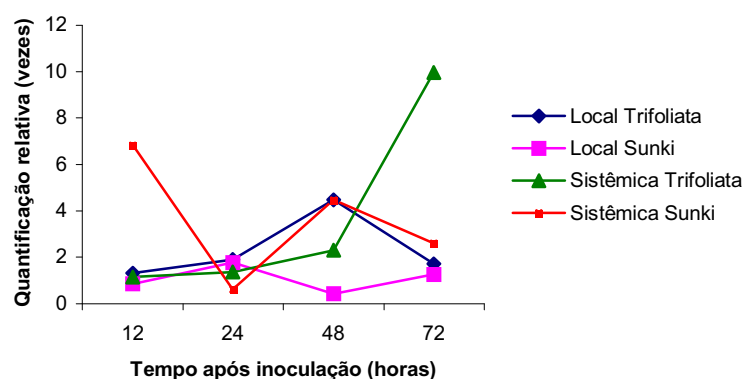


FIGURA 16. Comparação da expressão local e sistêmica de genes do tipo *POX* induzida por ferimento em *P. trifoliata* e *C. sunki*, com três meses de idade.

A expressão de genes do tipo *LOX* não foi detectada em plantas de *C. sunki*, na qual o ferimento não foi realizado. Possivelmente, genes do tipo *LOX* não estejam sendo constitutivamente expressos nestas plantas. Esta ausência de expressão constitutiva de genes do tipo *LOX* tem sido encontrada em outras plantas (Veronesi et al., 1996; Jalloul et al., 2002). Assim, não foi possível calcular o efeito do ferimento na indução local deste gene em *C. sunki*, nem realizar a análise de variância. Em *P. trifoliata*, houve indução local de genes do tipo *LOX* em todos os tempos estudados, indicando que esta espécie responde ao efeito do ferimento expressando este gene (Figura 17).

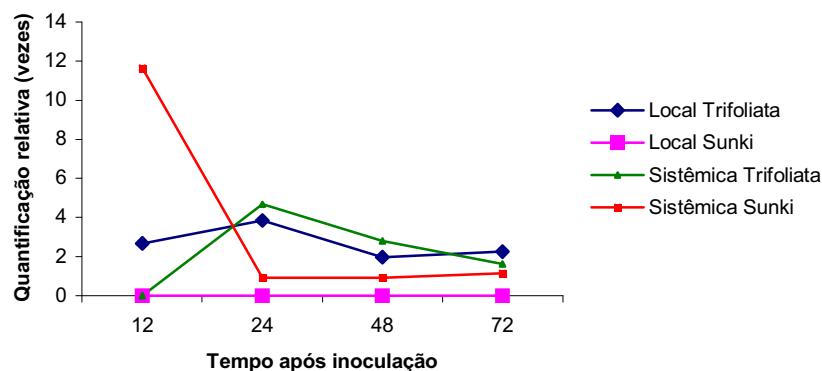


FIGURA 17. Comparação da expressão local e sistêmica de genes do tipo *LOX* induzida por ferimento em *P. trifoliata* e *C. sunki*, com três meses de idade.

Apesar de a expressão local de genes do tipo *LOX* não ter sido detectada em *C. sunki*, houve indução na expressão sistêmica 12 horas a.i. Em *P. trifoliata* ocorreu o contrário, no primeiro tempo de coleta não houve indução na expressão de genes do tipo *LOX*, a qual só foi detectada a partir de 24 horas a.i. (Figura 17).

A indução na expressão local de genes do tipo *PR-2* eliciada por ferimento foi verificada nas duas espécies estudadas. Em *P. trifoliata*, a indução na expressão de genes do tipo *PR-2* gerou valores de expressão maiores em todos os tempos de coleta estudados, quando comparados com os de *C. sunki* (Figura 18), porém esta diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 3A). Os valores de expressão nos tempos de coleta e local estudados foram diferentes. A indução sistêmica de genes do tipo *PR-2* foi verificada nas duas espécies e o padrão da expressão foi similar ao dos locais estudados, sendo a expressão máxima detectada 12 horas a.i. (Figura 18).

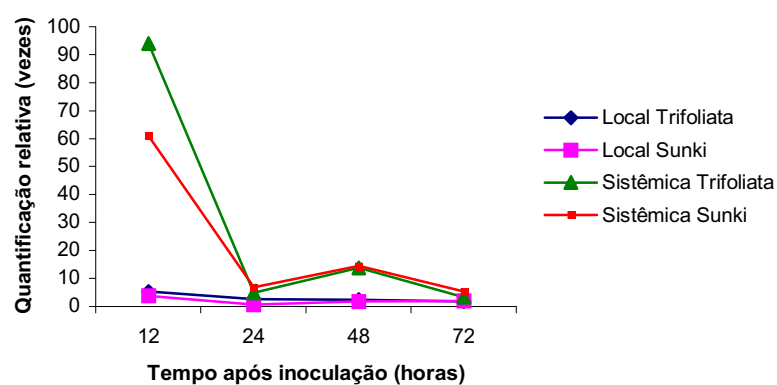


FIGURA 18. Comparação da expressão local e sistêmica de genes do tipo *PR-2* induzida por ferimento em *P. trifoliata* e *C. sunki*, com três meses de idade.

Genes do tipo *PR-5* tiveram expressão local eliciada por ferimento nas duas espécies estudadas. Valores maiores de expressão foram observados em *P. trifoliata* 12, 24 e 48 horas a.i., estatisticamente diferentes entre si, quando comparados com os de *C. sunki* (Figura 19). A indução sistêmica foi observada apenas no primeiro tempo de coleta em *C. sunki*, enquanto em *P. trifoliata* a expressão foi detectada em todos os tempos, com expressão máxima 72 horas a.i. (Figura 19).

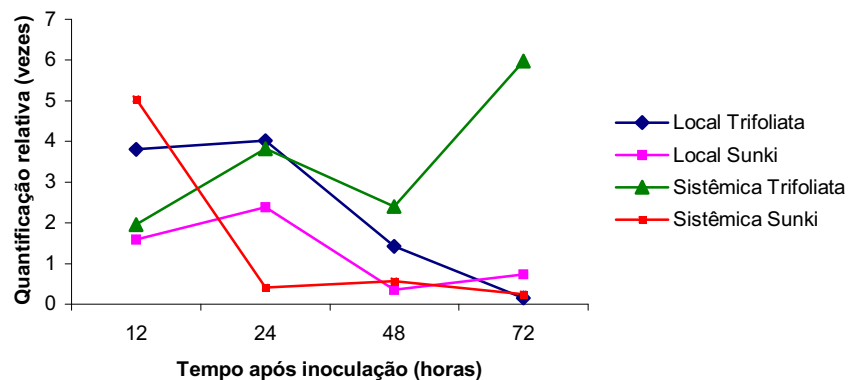


FIGURA 19. Comparação da expressão local e sistêmica de genes do tipo *PR-5* induzida por ferimento em *P. trifoliata* e tangerina Sunki, com três meses de idade.

De modo geral, os valores de expressão detectados em *P. trifoliata* eliciados por ferimento foram de magnitude maior do que aqueles obtidos quando a expressão gênica foi induzida por *P. parasitica*. Esta é uma evidência de que a indução na resistência de *P. trifoliata* poderia estar relacionada ao ferimento produzido pelo oomiceto, para infectar a planta (hipótese não comprovada), ou por outros causados durante o manejo.

4 CONCLUSÕES

1. O início e os valores máximos da expressão local da maioria dos genes estudados em *Poncirus trifoliata* não são detectados nos tempos analisados neste trabalho.
2. *Poncirus trifoliata*, induzido por *Phytophthora parasitica*, expressa um padrão de genes de defesa característicos de uma planta resistente durante interação incompatível, nas condições estudadas.
3. *Citrus sunki*, induzido por *P. parasitica*, expressa um padrão de genes de defesa característicos de uma planta suscetível durante interação compatível, nas condições estudadas.
4. De modo geral, a expressão dos genes estudados, tanto local quanto sistêmica, é mais rápida e mais intensa em *P. trifoliata* do que em *C. sunki*, exceto para a expressão local de genes do tipo *LOX* e *PR-2*.
5. De modo geral, a expressão local é mais rápida e de maior intensidade do que a expressão sistêmica, exceto para a expressão sistêmica de genes do tipo *LOX* em *P. trifoliata*.
6. O ferimento realizado nas plantas, no momento da inoculação do oomiceto, induz um alto nível de expressão da maioria dos genes estudados, exceto para genes do tipo *POX*, principalmente em *P. trifoliata*.

7. A presença do patógeno *P. parasitica* potencializa o padrão de expressão dos genes estudados, nas duas espécies, de forma significativa, exceto para genes do tipo *POX*.
8. *P. trifoliata* apresenta elevados níveis constitutivos de genes SAR, característicos de imunidade inata, os quais são ainda maiores após indução local e sistêmica por *P. parasitica*, nas condições estudadas.
9. A técnica de RT-qPCR é eficiente em detectar a expressão diferencial dos genes de defesa de citros estudados nas condições deste trabalho, *PAL*, *POX*, *LOX*, *PR-2* e *PR-5*, e os dados gerados são confiáveis.
10. As amostras *pool*, formadas pela mistura de RNAs de três repetições biológicas, podem ser usadas para representar as três repetições biológicas neste experimento.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANAND, A.; ZHOU, T.; TRICK, H.N.; GILL, B.S.; BOCKUS, W.
NUTHUKRISHNAN, S.M. Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v.54, n.384, p. 574 – 580, 2002. 1101-1111, 2003.
- BELL, E.; MULLET, J. E. Characterization of an *Arabidopsis* Lipoxygenase Gene Responsive to Methyl Jasmonate and Wounding. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, n. 4, p. 1133-1137, Dec. 1993.
- GARDNER, H. W. Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. **Biochem Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1084, n. 3, p. 221-239, July 1991.
- JALLOUL, A.; MONTILLET, J. L.; ASSIGBETSÉ, K.; AGNEL, J. P.; DELANNOY, E.; TRIANTAPHYLIDÈS, C.; DANIEL, J. F.; MARMEY, P.; GEIGER, J. P.; NICOLE, M. Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction. **The Plant Journal**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 1-12, Oct. 2002.
- KOHLER, A.; SCHWINDLING, S.; CONRATH, U. Benzothiadiazole-induced priming of potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the *NPR1/NIM1* gene in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 128, n. 3, p. 1046-1056, Mar. 2002.
- LAWRENCE, C. B.; JOOSTEN, M. H. A. J.; TUZUN, S. Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 48, n. 6, p. 361-377, June 1996.
- MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, n. 3, p. 936-942, Nov. 1988.
- MORRIS, S. W.; VERNOOIJ, B.; TITATARN, S.; STARETT, M.; THOMAS, S.; WILTSE, C. C.; FREDERIKSEN, R. A.; BHANDHUFALCK, A.; HULBERT, S.; UKNES, S. Induced Resistance Responses in Maize. **Molecular Plant Microbe Interaction**, Oxford, v. 11. n. 7, p. 643-658, July 1998.

SASAKI, K.; IWAI, T.; HIRAGA, S.; KURODA, K.; SEO, S.; MITSUHARA, I.; MIYASAKA, A.; IWANO, M.; ITO, H.; MATSUI, H.; OHASHI, Y. Ten Rice peroxidases redundantly respond to multiple stresses including infection with rice blast fungus. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 45, n. 10, p. 1442-1452, Oct. 2004.

SCHENK, P. M.; KAZAN, K.; MANNERS, J. M.; ANDERSON, J. P.; SIMPSON, R. S.; WILSON, I. W.; SOMERVILLE, S. C.; MACLEAN, D. J. Systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana* during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 2, p. 999-1010, June 2003.

SIVIERO, A. **Avaliação de Métodos de Inoculação de *Phytophthora parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata* à gomose.** 2001. 117 p. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu.

STANDNEK, M. J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, n. 1, p. 25-34, July 2000.

TORNERO, P.; GADEA, J.; CONEJERO, V.; VERA, P. Two PR-1 genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis related genes during the hypersensitive response and development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 10, n. 5, p. 624-634, July 1997.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 55, n. 1, p. 85-97, 1999.

VÉRONESI, C.; RICKAUER, M.; FOURNIER, J.; POUÉNAT, M. L.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T. Lipxygenase Gene Expression in the tobacco-*Phytophthora parasitica nicotianae* interaction. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, n. 3, p. 997-1004, Nov. 1996.

VLEESHOUWERS, V. G. A. A.; VAN OOIJEWEERT, W.; GOVERS, F.; KAMOUN, S.; COLON, L. T. Does basal *PR* gene expression in *Solanum* species contribute to non-specific resistance to *Phytophthora infestans*? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, n. 1, p. 35-42, July 2000.

WARD, E. R.; UKNES, S. J.; WILLIAMS, S. C.; DINCHER, S. S.; WIEDERHOLD, D. L.; ALEXANDER, D. C.; AHL-GOY, P.; METRAUX, J. P.; RYALS, J. A. Coordinate gene activity in response to agents that induced systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 3, n. 10, p. 1085-1094, Oct. 1991.

ZHU, B.; CHEN, T. H. H.; LI, P. H.; ZHU, B. L. Analysis of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plants expressing sense and antisense genes for an osmotin-like protein. **Planta**, Berlin, v. 198, n. 1, p. 70-77, 1996.

CAPÍTULO 3

A expressão constitutiva de genes do tipo *PR* pode ser usada para monitorar a resistência de citros a *Phytophthora parasitica* ?

RESUMO

TEIXEIRA, J. E. C. **A expressão constitutiva de genes do tipo *PR* pode ser usada para monitorar a resistência de citros a *Phytophthora parasitica*?** 2005. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.*

A resistência sistêmica adquirida (SAR) ocorre em várias espécies de plantas e está associada à expressão de alguns genes marcadores, denominados genes *SAR*. Entre os genes *SAR* estão incluídos genes que codificam proteínas PR, os quais ocorrem em famílias multigênicas em muitas plantas. Altos níveis de expressão constitutiva de genes do tipo *PR-2* e *PR-5* têm sido correlacionados com a resistência de plantas a patógenos, sendo este último frequentemente associado com a resistência a *Phytophthora* spp. O objetivo deste trabalho foi quantificar o nível de expressão basal de genes do tipo *PR-2* e *PR-5* em plantas de citros resistentes a *P. parasitica*, *P. trifoliata*, em plantas suscetíveis, *C. sunki*, e em híbridos *C. sunki* x *P. trifoliata*, com diferentes níveis de resistência, através de RT-PCR quantitativo em tempo real. A presença de genes *PR-2* e *PR-5* no genoma de *P. trifoliata* e *C. sunki* foi confirmada por análise de *Southern blot*. Os vários sinais de hibridização revelados são indicativos da ocorrência destes genes como famílias multigênicas no genoma destas espécies. O alto nível de expressão constitutiva de genes do tipo *PR-5* nestas plantas foi associado com a resistência de citros a *P. parasitica*. Portanto, os níveis basais de genes *PR-5* poderiam funcionar como biomarcadores para monitorar a resistência de citros a *P. parasitica* na seleção de materiais promissores em programas de melhoramento de citros.

* Comitê Orientador: Dr. Luciano Vilela Paiva– UFLA (Orientador), Dra. Magnólia Araújo Campos (Co-Orientadora) – RD-Centro APTA Citros Sylvio Moreira/LCBM–UFLA.

ABSTRACT

TEIXEIRA, J. E. C. **Can the constitutive expression of *PR*-like genes be used to monitor citrus resistance to *Phytophthora parasitica*?** 2005. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.*

Systemic acquired resistance occurs in many plant species and are associated to the expression of marker genes, known as SAR genes. Among them, it can be included genes that encode for PR proteins, which are present in gene family in the plant genome. High constitutive expression of *PR*-2 and *PR*-5-like genes has been correlated with the resistance of plants to pathogens, being *PR*-5 like-gene associated to the *Phytophthora* spp resistance. The objective of this work was to analyse the constitutive expression of *PR*-2 and *PR*-5-like genes in resistant plants (*P.trifoliata*), susceptible (*C.sunki*) and hybrids (*P.trifoliata* x *C. sunki*) using real time quantitative RT-PCR (RT-qPCR). The presence of *PR*-2 and *PR*-5-like genes in the genome of *C. sunki*, *P. trifoliata*, *C. sinensis*, *C. limonia* was confirmed by Southern blot analysis. The multiple hybridization signals obtained are indicative of the occurrence of these genes as a gene family in the genome of these citrus species. The high constitutive expression of the *PR*-5-like genes was associated with the citrus resistance to *P. parasitica* and could be, therefore, used to monitor citrus resistance to *P. parasitica*, working as a biomarker for the selection of promising materials in citrus breeding programs

* Comitê Orientador: Dr. Luciano Vilela Paiva– UFLA (Orientador), Dra. Magnólia Araújo Campos (Co-Orientadora) – RD-Centro APTA Citros Sylvio Moreira/LCBM–UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A resistência de plantas a patógenos pode ser atribuída à ação coordenada de vários mecanismos de resistência, funcionando de maneira precisa e específica (Vleeshouwers et al., 2000). Um destes mecanismos é a resistência sistêmica adquirida (SAR), que geralmente é seguida por um ataque mal sucedido do patógeno e envolve um aumento no estado de resistência da planta a um amplo espectro de patógenos. SAR está associada a um aumento na expressão de genes que codificam para proteínas relacionadas com a patogênese (proteínas PR).

A ocorrência constitutiva natural de SAR tem sido encontrada em algumas cultivares e híbridos de plantas agronomicamente importantes, como batata e tomate, e na planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Ahl Goy et al., 1992; Yalpani et al., 1993; Lawrence et al., 1996; Vleeshouwers et al., 2000). Variedades destas espécies de plantas apresentam um aumento na resistência a vários patógenos e esta resistência foi associada com a alta expressão constitutiva de genes *PR*. Assim, os níveis de expressão basal de genes *PR*, tais como *PR-1*, *PR-2* e *PR-5* em plantas não-inoculadas com patógenos, têm sido empregados para monitorar a expressão constitutiva de SAR.

A identificação de marcadores moleculares ligados à resistência a patógenos é de grande valor em programas de melhoramento, visando a obtenção de variedades mais resistentes a doenças. Como uma estratégia a este enfoque, níveis de expressão basal de genes *PR-2* e *PR-5* foram analisados por RT-qPCR em espécies suscetíveis a *P. parasitica*, *Citrus sunki*, em plantas resistentes, *Poncirus trifoliata* e em híbridos obtidos do cruzamento entre estas duas espécies com diferentes níveis de resistência.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os trabalhos de casa de vegetação e laboratório foram desenvolvidos no Centro APTA Citros Sylvio Moreira, em Cordeirópolis, SP.

2.1 Material Genético

Híbridos entre *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata* ‘Rubidoux’, gerados no CAPTACSM por polinização controlada em setembro de 1993, e mantidos em campo desde 1997, junto com seus parentais, foram utilizados para análise da expressão basal de genes que codificam Glucanase (PR-2) e Osmotina (PR-5). Entre os híbridos foram selecionadas 8 plantas resistentes a *P. parasitica* (70, 73, 102, 133, 114, 57, 23, 142, 54), 8 suscetíveis (47, 19, 20, 26, 145, 148, 129, 2) e 4 intermediárias (59, 143, 152, 161), com base em dados de inoculações obtidos em dois experimentos independentes realizadas por Siviero (2001) e Boava (2004). Estas plantas têm aproximadamente 10 anos de idade e estão plantadas próximo ao laboratório de biotecnologia do CAPTACSM. Folhas novas foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a – 80°C até o momento das análises.

2.2 Extração de RNA e síntese do cDNA

De cada amostra foi extraído RNA total conforme descrito no Capítulo 2 desta dissertação, item 2.4. As amostras foram digeridas com DNase I para eliminar qualquer contaminação por DNA. cDNAs foram obtidos, das amostras das espécies parentais, dos 3 híbridos mais resistentes, dos 3 mais suscetíveis, de

3 intermediários e do *pool* de cada tratamento, que foi obtido misturando todas as amostras.

2.3 RT-PCR Quantitativo em Tempo Real

A análise da expressão gênica por RT-qPCR foi realizada em Sistema de detecção de seqüências ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). O sistema de detecção utilizado foi o SYBR green. A expressão dos genes que codificam para as proteínas antimicrobianas Osmotina (PR-5) e Glucanase (PR-2) foram analisadas usando os *primers* descritos no Capítulo 2 desta dissertação, item 2.5. As condições térmicas da PCR foram: 50°C por 2 min, 10 min a 94°C, e 40 ciclos, constituídos de 15 seg, a 95°C e 1 min à 60°C cada ciclo. Para cada amostra foi utilizado 1 µg de cDNA, que foi adicionado a 12,5 µL de Master Mix (Applied Biosystems), 0,2 µM de cada *primer* direto e reverso para um volume final da reação de 25 µL. Cada amostra foi processada em duplicata. Como controle endógeno foi utilizado o gene que codifica para a proteína β-tubulina, de expressão constitutiva, visando normalizar as amostras quanto as possíveis diferenças nas quantidades de cDNA adicionadas em cada reação. Os resultados foram normalizados utilizando C_t s obtido para o controle endógeno utilizando a equação $\Delta C_t = C_t(\text{gene alvo}) - C_t(\text{controle endógeno})$. A calibração foi determinada pela fórmula $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{amostra}) - \Delta C_t(\text{calibrador})$. A quantificação relativa foi obtida pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

2.4 Preparo e marcação de sondas com digoxigenina

Através da análise do banco de dados CitEST foram identificadas EST's (*expressed sequence tags*) de laranja 'Pêra IAC' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com identidade de seqüências com genes do tipo PR-2 e PR-5 já descritos em banco

de dados. Estes clones foram utilizados como sondas através da marcação por PCR pela incorporação de digoxigenina, utilizando o kit *DIG-DNA Labeling* (Boehringer Mannheim), segundo metodologia descrita pelo fabricante. As condições térmicas de amplificação foram 94°C por 1 min, seguidos por 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 50°C por 1 min e 72°C por 1 min e 30 seg, finalizando com uma extensão a 72°C por 5 min.

2.5 Southern blot

Para verificar a presença e o número de cópias de genes do tipo *PR-2* e *PR-5* no genoma de algumas espécies de citros, DNA genômico de tangerina Sunki (*Citrus sunki*), *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux', limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck 'Cravo') e laranja Pêra (*Citrus sinensis* 'Pêra') foi isolado de folhas jovens pelo método CTAB (Murray e Thompson, 1980). Uma quantidade de 10 µg de DNA total de cada amostra foi digerida com *EcoR* I, e após a digestão, os fragmentos foram separados em eletroforese utilizando gel de agarose 0,8% (TAE 1X) durante 6 horas a 60 V. O DNA foi transferido para membrana de *nylon* Hybond-N (Amersham) usando os procedimentos para transferência alcalina descritos pela Amersham, durante 16 horas. As membranas foram imersas por 30 min em solução de desnaturação (NaOH 1M/ NaCl 1M) e 30 minutos em solução de neutralização (Tris 0,5M pH 8.0/ NaCl 1M) e, após retirado o excesso de umidade, fixadas sob luz UV (*crosslink*). A hibridização ocorreu sob alta estrigência, com pré-hibridização e hibridização a 65°C por 6 horas e 16 horas, respectivamente. Após hibridização, as membranas foram lavadas duas vezes por 5 min cada, à temperatura ambiente e sob agitação, com tampão SSC 2X (NaCl 0,3M/Citrato de sódio 0,03M) contendo 0,1% de SDS. Em seguida, foram lavadas duas vezes por 15 min cada, a 65°C e sob agitação, com tampão SSC 0,5X contendo 0,1% de SDS, pré-aquecida a

65°C e por 5 min em tampão de lavagem (ácido maleico 0,1 M/ NaCl 0,15 M/ tween 20 0,3 %). Posteriormente, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente sob agitação por 2 horas em solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina diluído (1:10.000). Após duas lavagens de 15 min cada com tampão de lavagem, as membranas foram imersas no substrato CSPD por 5 min à temperatura ambiente e posteriormente colocadas em cassete (HypercassetteTM – Amersham), expostas a filmes (HyperfilmTM – MP – Amersham) e mantidas a 37° C por 20 min. A revelação destes filmes foi feita por quimioluminescência em sala escura, por 2 min em solução específica, em seguida os filmes foram fixados para análise.

2.6 Análise dos dados

As amostras foram avaliadas quanto às diferenças na expressão de genes do tipo *PR-2* e *PR-5* e quanto ao número de bandas geradas após hibridização com as sondas. Os dados normalizados, com duas repetições por amostra, foram utilizados nas análises estatísticas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Expressão constitutiva de genes do tipo *Glucanase (PR-2)* e *Osmotina (PR-5)*

Este é o primeiro relato do uso da expressão constitutiva de genes do tipo *PR* monitorando a resistência de citros. A expressão constitutiva de genes do tipo *PR-2* e *PR-5* em porta-enxertos *C. sunki*, *P. trifoliata* e híbridos (*C. sunki* x *P. trifoliata*) foi determinada, em plantas não inoculadas, por RT-qPCR.

Para genes do tipo *PR-2*, apesar de os valores obtidos pelos cálculos de quantificação apresentarem diferenças entre as plantas estudadas (Figura 20), estas diferenças não foram estatisticamente significativas, ou seja, os materiais estudados não diferem quanto à expressão de genes do tipo *PR-2* (Tabela 2).

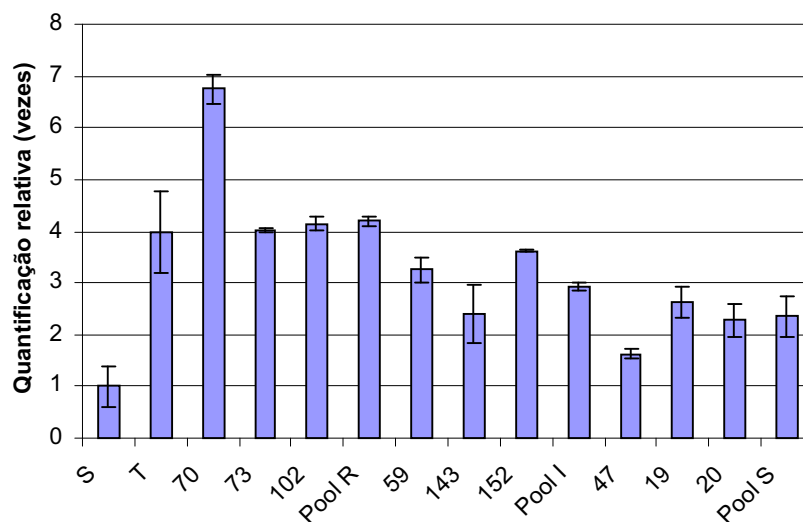


FIGURA 20. Expressão constitutiva de genes do tipo *Glucanase* (*PR-2*) em plantas de citros, *C. sunki* (S), *P. trifoliata* (T) e híbridos resistentes (70, 73 e 102), intermediários (59, 143 e 152), suscetíveis (47, 19 e 20) e da mistura das plantas (*pool*).

TABELA 2. Resumos das análises de variância da expressão constitutiva de genes do tipo *PR-2* e *PR-5* de *P. trifoliata*, *C. sunki* e híbridos (*C. sunki* x *P trifoliata*).

Fontes de Variação	G L	Quadrado Médio	
		<i>PR-2</i>	<i>PR-5</i>
Tratamento	13	0,351945	0,835524 *
Erro	14	0,217324	0,087686
Total	27	0,569269	0,92321
CV (%)		6,79	8,90

*Valores significativos a 5% de probabilidade pelo teste de F de Snedecor.

RNAm de genes do tipo *PR-5* estão presentes em maior nível em *P. trifoliata* do que em *C. sunki* (Figura 21). As plantas estudadas foram estatisticamente diferentes entre si em relação à expressão de genes do tipo *PR-5* (Tabela 2). O porta-enxerto *P. trifoliata*, ao contrário de *C. sunki*, apresenta resistência a diversas doenças importantes na citricultura, incluindo a *P. parasitica*. Altos níveis de atividade de proteínas PR, entre elas *PR-5*, também estão presentes em vários genótipos de tomate que apresentam resistência a *Alternaria solani*, de forma constitutiva (Lawrence et al., 1996).

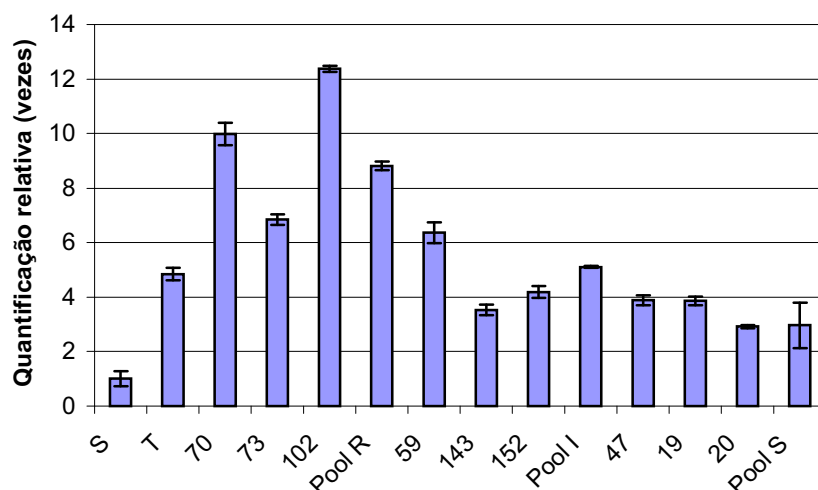


FIGURA 21. Expressão constitutiva de genes do tipo *Osmotina* (*PR-5*), em plantas de citros, *C. sunki* (S), *P. trifoliata* (T) e híbridos resistentes (70, 73 e 102), intermediários (59, 143 e 152), suscetíveis (47, 19 e 20) e da mistura das plantas (*pool*).

A análise de variância gerou médias de expressão de genes do tipo *PR-5* nas plantas estudadas, que foram separadas em quatro grupos, estatisticamente distintos, classificados como a, b, c e d (Tabela 3).

TABELA 3. Médias da expressão de genes do tipo *PR-5* em plantas de citros, *C. sunki* (S), *P. trifoliata* (T) e híbridos resistentes (70, 73 e 102), intermediários (59, 143 e 152), suscetíveis (47, 19 e 20) e da mistura das plantas (*pool*).

AMOSTRAS	<i>PR-5</i>
Híbrido 102	1,55 a
Híbrido 70	1,86 a
<i>Pool</i> Resistente	2,04 a
Híbrido 73	2,41 b
<i>Pool</i> Intermediário	2,45 b
Híbrido 59	2,51 b
Híbrido 47	2,83 b
<i>P. trifoliata</i>	2,91 b
Híbrido 152	3,12 c
Híbrido 19	3,23 c
Híbrido 143	3,37 c
<i>Pool</i> Suscetível	3,61 c
Híbrido 20	3,64 c
<i>C. sunki</i>	5,18 d

¹ Médias seguidas da mesma letra, são agrupadas conforme Scott & Knott ($P \leq 0,05$).

No grupo a foram agrupados os híbridos inicialmente classificados como resistentes, híbridos 70 e 73 e o *pool* R, formado pela mistura dos 8 híbridos mais resistentes, apresentando os maiores valores de expressão constitutiva de

genes do tipo *PR-5*, estatisticamente iguais entre si. No grupo b foram agrupadas plantas inicialmente classificadas como resistentes, híbrido 73, plantas inicialmente classificadas como suscetíveis 47, intermediárias 59, *pool I*, formado pelos quatro híbridos intermediários e pelo parental resistente *P. trifoliata*, que apresentaram valores de expressão constitutiva de genes do tipo *PR-5*, estatisticamente iguais entre si, inferiores ao grupo a e superiores aos demais grupos. O grupo c foi formado por plantas inicialmente classificadas como intermediárias, híbridos 152 e 153, suscetíveis, híbridos 10 e 20 e *pool S*, mistura dos 8 híbridos mais suscetíveis, que apresentaram valores de expressão constitutiva de *PR-5*, estatisticamente iguais entre si, superiores apenas ao grupo d. O grupo d foi constituído pelo parental suscetível *C. sunki*, que apresentou o menor valor de expressão constitutiva de genes do tipo *PR-5*.

Boava (2004) caracterizou os híbridos 70 e 102 como mais resistentes a *P. parasitica* do que seu parental resistente *P. trifoliata*, possuindo, portanto, segregação transgressiva. A demonstração de que níveis constitutivos de expressão de genes do tipo *PR-5* foram mais elevados nestes híbridos do que no parental *P. trifoliata* (Tabela 3) representa uma forte evidência da participação de genes do tipo *PR-5* na provável resistência quantitativa de *P. trifoliata* a *P. parasitica* e confirma os dados de Boava (2004).

Elevados níveis de RNAm de genes *PR* podem servir como marcadores moleculares da resposta de resistência do tipo SAR constitutiva ou imunidade inata (Jones & Takemoto, 2004), auxiliando na seleção de plantas mais resistentes e fornecendo uma nova perspectiva para o melhoramento assistido por marcadores. Neste sentido, altos níveis de expressão constitutiva de genes do tipo *PR-5* observados neste trabalho, em plantas de citros resistentes a *P. parasitica*, sugerem a utilização deste gene como biomarcador da resistência de citros a *P. parasitica*.

Esta variação no nível de RNAm de genes do tipo *PR* encontrada nos vários materiais estudados corroboram com resultados encontrados em espécies de *Solanum* por Vleeshouwers e colaboradores (2000), que mostram uma ausência de regulação coordenada, ou seja, na expressão simultânea entre diferentes genes *PR*, nas plantas estudadas.

Em *Arabidopsis*, mutantes *sid 1* e *sid 2* possuem a rota que leva à expressão de *PR-1* bloqueada, não expressando este gene; entretanto, os genes *PR-2* e *PR-5* foram expressos. Assim, um acúmulo de RNAm desigual de diferentes genes *PR* pode resultar em diferentes caminhos de regulação para membros individuais das duas famílias de genes *PR*, refletindo, possivelmente, uma ampla extensão de respostas fisiológicas na qual estas proteínas estariam envolvidas (Zhu et al., 1995; Tornero et al. 1997).

3.2 Ocorrência de genes do tipo *Glucanase (PR-2)* e *Osmotina (PR-5)* no genoma de citros

Para verificar a ocorrência de seqüências gênicas do tipo *PR-2* e *PR-5* no genoma de citros foi realizado um *Southern blot*. DNA genômico dos parentais estudados neste experimento, *P.trifoliata* 'Rubidoux' e *C. sunki*, laranja 'Pêra', e limão 'Cravo'. Laranja 'Pêra' foi utilizada como controle, pois o gene utilizado como sonda foi extraído de bibliotecas de cDNA de laranja Pêra, e limão 'Cravo', por ser o porta enxerto mais empregado na citricultura brasileira. O DNA genômico de cada planta foi digerido com *EcoR* I e hibridizado com sondas produzidas a partir de EST's do tipo *Glucanase* e *Osmotina* de laranja 'Pêra IAC', identificadas no banco de dados CitEST (<http://citest.centrodecitricultura.br>). Nas Figuras 22 e 23 são mostrados a digestão e *Southern blot* dos genomas estudados. Análises prévias utilizando digestão eletrônica revelaram que a enzima *EcoR* I não corta dentro da maioria

dos genes do tipo *Glucanases* e *Osmotinas* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Vários sinais de hibridização foram detectados, indicando a presença de famílias multigênicas para *PR-2* e *PR-5* em espécies de citros.

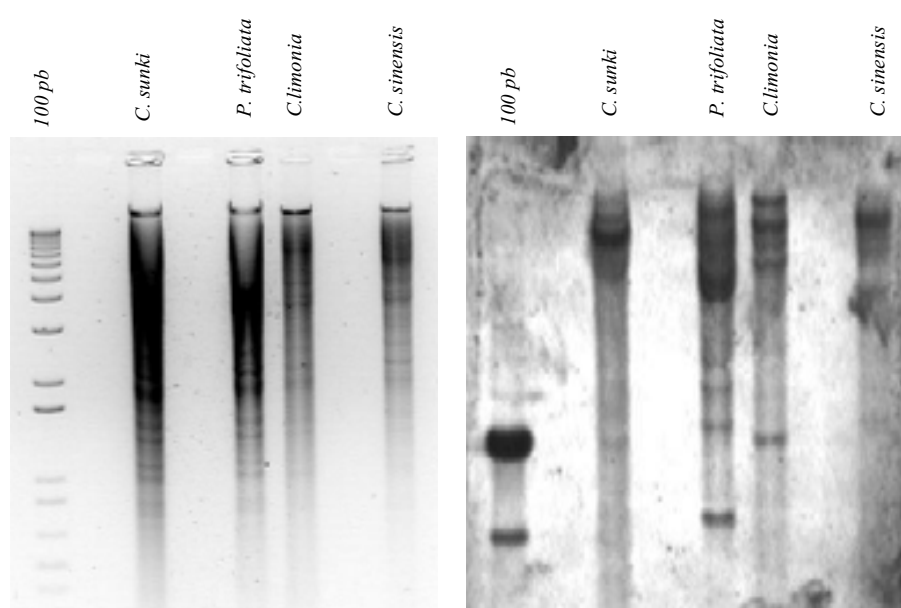


FIGURA 22. Digestão do DNA genômico dos materiais estudados com *EcoR* I (esquerda) e *Southern blot* (direita) com a sonda *PR-5*. 100 pb (marcador molecular - Promega).

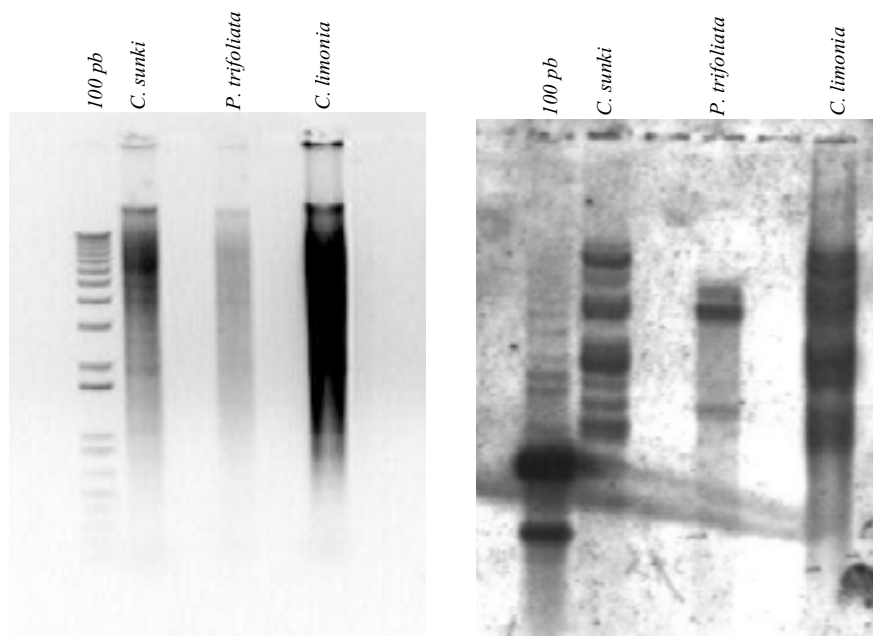


FIGURA 23. Digestão do DNA genômico dos materiais estudados com *EcoR* I (esquerda) e *Southern blot* (direita) com a sonda *PR-2*. 100 pb (marcador molecular-Promega).

Variação na intensidade dos sinais de hibridização foi observada, sugerindo uma diversidade de seqüências ou diferença no número de cópias entre membros da família. Famílias multigênicas têm sido reportadas em várias espécies de plantas (Van Loon & Van Strien, 1999; Vleeshouwers et al., 2000). Para os genes *PR* estudados, uma certa especificidade pode ser notada. Um padrão de hibridização mais semelhante entre espécies do gênero *Citrus* foi observado este difere bastante do padrão obtido pela espécie *P. trifoliata*. Um maior número de bandas nas espécies de *Citrus* spp. foi observado para genes do tipo *PR-2*; já para *P. trifoliata*, um maior número de sinais de hibridização foi observado para genes do tipo *PR-5* (Figuras 22 e 23). Estes resultados poderiam ser explicados pelo fato de espécies de gêneros relacionados estão mais distantes geneticamente do que espécies pertencentes ao mesmo gênero.

4 CONCLUSÕES

1. Plantas de citros resistentes a *Phytophthora parasitica* apresentam altos níveis de expressão constitutiva de genes do tipo *PR-5*, podendo ser usado, como biomarcador na seleção de materiais promissores para resistência a *Phytophthora* spp., em programas de melhoramento de citros.

2. Os níveis de expressão constitutiva de genes do tipo *PR-2* são baixos em plantas de citros resistentes a *P. parasitica*.

3. Ausência de regulação coordenada entre genes do tipo *PR-2* e *PR-5* é observada em plantas de citros nas condições estudadas.

4. Genes do tipo *PR-2* e *PR-5* ocorrem em famílias multigênicas no genoma de diferentes espécies de citros.

5. Espécies dentro do gênero *Citrus*, *C. sunki*, *C. limonia* e *C. sinensis* apresentam padrões de hibridização semelhantes e diferentes de *P. trifoliata*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHL GOY, P.; FELIZ, G.; METRAUX, J.P.; MEINS, F.Jr. Resistance to disease in the hybrid *Nicotiana glutinosa* x *Nicotiana debneyi* is associated with high constitutive levels of beta 1,3-glucanase, chitinase, peroxidase and polyphenoloxidase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 41, p. 11-21, 1992.

BOAVA, L. P. **Estabilidade de QTLs ligados à resistência dos citros a gomose, causada por *Phytophthora parasitica***. 2004. 67 p. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu.

JONES, D. A.; TAKEMOTO, D. Plant innate immunity – direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 16, n. 1, p. 48-62, 2004.

LAWRENCE, C. B.; JOOSTEN, M. H. A. J.; TUZUN, S. Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 48, n. 6, p. 361-0377, June 1996.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Limerick, v. 8, p. 4321-4325, 1980.

SIVIERO, A. **Avaliação de Métodos de Inoculação de *Phytophthora parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata* à gomose**. 2001. 117 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu.

TORNERO, P.; GADEA, J.; CONEJERO, V.; VERA, P. Two PR-1 genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis related genes during the hypersensitive response and development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 10, n. 5, p. 624-634, July 1997.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 55, n. 1, p. 85-97, 1999.

VLEESHOUWERS, V. G. A. A.; VAN OOIJEWEERT, W.; GOVERS, F.; KAMOUN, S.; COLON, L. T. Does basal *PR* gene expression in *Solanum* species contribute to non-specific resistance to *Phytophthora infestans*? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, n. 1, p. 35-42, July 2000.

YALPANI, N.; SHULAEV, V.; RASKIN, I. Endogenous salicylic acid levels correlate with accumulation of pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, p. 702-708, 1993.

ZHU, B.; CHEN, T. H. H.; LI, P. H.; ZHU, B. L. Activation of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plants expressing sense and antisense genes for an osmotin-like protein. **Planta**, Berlin, v. 198, n. 1, p. 70-77, 1996.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho gerou informações importantes sobre respostas de defesa de plantas de citros a *Phytophthora parasitica*, as quais podem ser usadas na validação de ESTs do Banco de Dados CitEST/IAC das bibliotecas de *Poncirus trifoliata* e *Citrus sunki* induzidas por *Phytophthora parasitica*. Além disso, a caracterização da expressão de genes do tipo *PR-5* como biomarcadores na seleção de materiais promissores resistentes a *Phytophthora* spp. poderá ter aplicação prática auxiliando o melhoramento de citros visando resistência a este patógeno.

Informações adicionais, que contribuiriam significativamente para a elucidação das respostas de citros a *Phytophthora*, poderão emergir a partir da caracterização da expressão de vários outros genes, como genes de resistência e receptores de moléculas PAMP's, já encontrados no banco de dados CitEST. Além disso, novos bioensaios poderiam ser realizados usando um *time course* menor, por exemplo 15 min, 30 min, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas e 12 horas, principalmente, para caracterização do momento em que a expressão destes e outros genes de defesa em *P. trifoliata* tem seu início e ponto máximo de expressão.

Uma vez que a maioria dos genes de defesa estão organizados em genomas como famílias multigênicas, marcadores moleculares do tipo SNP's poderiam contribuir na caracterização destas famílias de genes que codificam para diferentes isoformas de uma determinada proteína de defesa. Este estudo poderia conduzir ao entendimento de quais isoformas são induzidas por patógeno, por ferimento ou pela resposta geral de defesa contra diversos estresses abióticos, bem como para a localização celular na planta.

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABLELA 1A Resumo das análises de variância da epressão de genes do tipo <i>PAL</i> nas três repetições biológicas de <i>C. sunki</i> e <i>P.trifoliata</i> induzidos por <i>P. parasitica</i>	102
TABLELA 2A Resumo das análises de variância da epressão de genes do tipo <i>PAL</i> , <i>POX</i> , <i>LOX</i> , <i>PR-2</i> e <i>PR-5</i> induzidos em <i>C. sunki</i> e <i>P.trifoliata</i> por <i>P. parasitica</i>	103
TABLELA 3A Resumo das análises de variância da epressão de genes do tipo <i>PAL</i> , <i>POX</i> , <i>PR-2</i> e <i>PR-5</i> induzidos em <i>C. sunki</i> e <i>P.trifoliata</i> por fermento	105

TABELA 1A. Resumo das análises de variância da expressão de genes do tipo *PAL* nas três repetições biológicas de *C. sunki* e *P. trifoliata* por *P. parasitica*. Lavras, MG.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio
		<i>PAL</i>
Espécie	1	9.4063 *
Tempo	4	34.7854 *
Local	1	32.1286*
E x T	4	7.9624*
E x L	1	2.4656 ^{ns}
T x L	4	3.6853 ^{ns}
E x T x L	4	5.6498*
Resíduo	20	0.2125
CV (%)		7.58

^{ns} e * Não significativo e significativo pelo teste F de Snedecor, a 1% de probabilidade

TABELA 2A. Resumo das análises de variância da expressão de genes do tipo *PAL*, *POX*, *LOX*, *PR-2* e *PR-5* induzidos em *C. sunki* e *P. trifoliata* por *P. parasitica*. Lavras, MG.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio				
		<i>PAL</i>	<i>POX</i>	<i>LOX</i>	<i>PR-2</i>	<i>PR-5</i>
Espécie (E)	1	14.5256 *	54.5936 *	227.2179 *	1.1025 ^{ns}	10.4167 *
Tempo (T)	3	4.6357 *	0.8279 ^{ns}	28.4781 *	19.6130 *	12.6529 *
Tratamento (TR)	1	6.7405 *	1.0481 ^{ns}	42.1688 *	9.6410 *	8.3665 *
Local (L)	1	19.1734 *	6.2313 *	9.4172 ^{ns}	13.8756 *	63.9600 *
E x T	3	1.3460 ^{ns}	1.8226 ^{ns}	110.8955 *	1.5398 ^{ns}	5.0285 *
E x TR	1	9.7422 *	0.0848 ^{ns}	0.8859 ^{ns}	0.2328 ^{ns}	12.7271 *
E x L	1	0.0468 ^{ns}	3.8957 ^{ns}	6.8317 ^{ns}	0.5814 ^{ns}	0.0826 ^{ns}
T x TR	3	0.2483 ^{ns}	0.5625 ^{ns}	21.3997 *	0.4633 ^{ns}	2.3652 ^{ns}
T x L	3	1.2884 ^{ns}	1.1293 ^{ns}	6.8578 *	1.4684 ^{ns}	3.3956 ^{ns}
TR x L	1	8.8135 *	6.8932 *	35.6690 *	0.0001 ^{ns}	0.6602 ^{ns}
E x T x TR	3	2.2023 ^{ns}	2.8931 *	1.2520	0.8386 ^{ns}	3.0072 ^{ns}
E x T x L	3	0.2343 ^{ns}	2.7347 *	16.2910 *	0.3552 ^{ns}	16.6672 *
E x TR x L	3	0.084 ^{ns}	0.1113 ^{ns}	1.2516	1.0609 ^{ns}	0.4590 ^{ns}

...“Continua” ...

“TABELA 2A Cont.”

T x TR x L	3	0.1931 ^{ns}	0.4353 ^{ns}	11.6551 *	0.9636 ^{ns}	0.46613 ^{ns}
Resíduo	32	0.2414	0.1991	0.5445	0.4727	0.41202
CV (%)		7,54	9,13	19.09	11,29	7.49

^{ns} e * Não significativo e significativo pelo teste F de Snedecor, a 1% de probabilidade

TABELA 3A. Resumo das análises de variância da expressão de genes do tipo *PAL*, *POX*, *PR-2* e *PR-5* induzidos em *C. sunki* e *P. trifoliata* por ferimento. Lavras, MG.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio			
		<i>PAL</i>	<i>POX</i>	<i>PR-2</i>	<i>PR-5</i>
Espécie	1	16.1036 *	24.9482 *	0.0331 ^{ns}	37.0948 *
Tempo	4	12.7290 *	4.2780 *	14.5948 *	8.8075 *
Local	1	0.4203 ^{ns}	12.1992 *	17.3054 *	49.2396 *
E x T	4	2.2583 ^{ns}	1.2995 ^{ns}	1.0487 ^{ns}	1.7330 ^{ns}
E x L	1	2.0702 ^{ns}	6.7486 *	0.0570 ^{ns}	1.7389 ^{ns}
T x L	4	0.6612 ^{ns}	1.0937 ^{ns}	2.5592 ^{ns}	3.0180 ^{ns}
E x T x L	4	2.6638 ^{ns}	2.3330 *	0.4869 ^{ns}	6.0950 *
Resíduo	20	0.2714	0.1677	0.3854	0.3838
CV (%)		7.08	7.71	8.96	6.89

^{ns} e * Não significativo e significativo pelo teste F de Snedecor, a 1% de probabilidade