

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

Ana Paula Moisés de Sousa

**IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO* DE GENES EFETORES CITOSÓLICOS A  
PARTIR DO SECRETOMA DE *Phytophthora parasitica* DOS CITROS**

Cuité  
2013

Ana Paula Moisés de Sousa

**IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO* DE GENES EFETORES CITOSÓLICOS A  
PARTIR DO SECRETOMA DE *Phytophthora parasitica* DOS CITROS**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas  
da Universidade Federal de Campina Grande/Campus  
Cuité, para obtenção do Grau de Licenciado em Ciências  
Biológicas.

Orientador: Magnólia de Araújo Campos

Cuité

2013

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

S725i      Sousa, Ana Paula Moisés de.

Identificação in silico de genes efetores citosólicos a partir do secretoma de *Phytophthora* parasítica dos citros. / Ana Paula Moisés de Sousa. – Cuité: CES, 2013.

65 fl.

Monografia (Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2013.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Magnólia de Araújo Campos.

1. Proteínas secretadas. 2. Citest - banco de dados. 3. Glicoproteínas. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 57

Ana Paula Moisés de Sousa

**IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO* DE GENES EFETORES CITOSÓLICOS A PARTIR DO SECRETOMA DE *Phytophthora parasitica* DOS CITROS**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande/Campus Cuité, para obtenção do Grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Magnólia de Araújo Campos (Orientadora) – UFCG/CES

---

Prof. Dr. Humberto Actis Zaidan – UFCG/CDSA

---

Prof. Dr. Luiz Sodré Neto – UFCG/CES

Cuité, 26 de abril de 2013

*Ao meu Pai Celestial.*  
*Às minhas Heroínas:*  
*Janice, Gabriela e Magnólia.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, meu Pai Celestial, por agraciar-me com anjos que cuidam e proporcionam amor e zelo à minha vida. Por seu amor, força, colo, bênçãos, cuidado, proteção divina e por não desistir de sua filha amada. Muito Obrigada, Pai, pelo caminho que me fizeste chegar até aqui! O amo infinitamente.

À minha amada mãe, por sua bondade em acalantar e cuidar de mim. Seu amor e confiança são preciosos para mim. Obrigada por ter dado condições e a oportunidade de estar concluindo mais uma etapa para o meu crescimento e satisfação pessoal. Perdoe-me pela ausência, mas chegou a hora de levantar vãos cada vez mais altos. A amo incondicionalmente.

Aos meus irmãos, Gabriela e Gabriel. Obrigada por dividirem comigo a preciosidade de uma família. Vocês são referências para onde devo chegar como pessoa e profissional. Vocês são o melhor que há em mim. Mana, você é a melhor irmã e amiga do mundo. Os amo incansavelmente.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos. A senhora é um exemplo de força, fé, garra, luta, perseverança. Uma verdadeira guerreira de Deus. As oportunidades confiadas a mim foram o ‘ponta pé’ inicial pelo gosto de seguir adiante em minha vida acadêmica. Muito obrigada por sua dedicação, orientação, carinho, disponibilidade, amor, amizade, conselhos. Meu caráter não é mais o mesmo depois que a conheci. Perdoe-me pelas vezes que lhe estressei e/ou desapontei. Darei orgulho ainda, viu?! Rezo ao nosso Pai para abençoar lhe grandiosamente.

Aos professores do Curso de Ciências Biológicas do CES, pelo compartilhamento do conhecimento científico. Agradeço pelo apoio, incentivo, disponibilidade, ajuda de todos vocês. Foram importantíssimos e cruciais para a realização dessa etapa em minha vida. Desculpem-me pelas vezes que não fui uma boa aluna.

Às técnicas do laboratório de Ciências Biológicas do CES, Jacque e Danila, pela força, apoio e por serem sempre solícitas. Obrigada por muitas vezes resolverem os meus problemas experimentais, não sei o que seria dos meus ‘filhos Phy’ sem vocês.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico–CNPq, pela concessão de bolsa PIBIC e ao Dr. Marcos Antônio Machado, pesquisador do Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis–SP por ceder o isolado IAC–095, objeto de estudo do presente trabalho.

Ao LBIotec Team, pelo bom convívio e união. Vocês ensinaram como é bom trabalhar em grupo, proporcionando o ambiente de trabalho mais dócil e tranquilo. Em especial, a Gláucia, minha eterna ‘sub chefinha’, e Rayane, doidinha. As levarei e guardarei, com muito carinho, em minha memória os tempos bons, corridos e exaustivos do lab. As nossas risadas, conversas, desabafos, programações, festinhas e encontros foram únicos, verdadeiros e especiais. Vocês são pessoas maravilhosas!!! Muito obrigada por me aturarem.

Aos meus eternos, Fafá e Jean. Faltam palavras para descreverem o quanto os agradeço pelo carinho, atenção, zelo, cuidado e amizade, tornando a saudade de casa menos dolorida e o passado dado mais alegre e afetuoso. Respeitando os limites de cada um, vocês não tem noção do quanto os quero bem. A emoção toma conta quando penso que muitos momentos não serão mais vividos juntos, pois chegou o momento de cada um seguir o seu caminho. Obrigada por estarem em minha vida e por terem tornado a ‘época da universidade’ inesquecível. Resta-me um desejo: quero que vocês sejam felizes, hei de ser feliz também.

À turma ‘Cientistas da Vida’–2008.2, pelo companheirismo de 4 anos. Não somos sinônimos de união, mas as aulas, conhecimento, ideias, trabalhos, provas foram mais fáceis de enfrentar com o apoio de todos vocês. Em especial aos meus amados amigos Wanderson, Cris, Gaby, Emily, Lau e Wheli. Lembrarei sempre dos nossos momentos, encontros, ‘jantinhas’, conversas, farras, birras, a festa do niver de Wheli, as dormidas, os estudos em vésperas de prova, os filmes, enfim, todos os momentos foram preciosos e especiais, pois tudo era novo para mim. Obrigada por tornaram a ‘época da universidade’ tão especial. A minha melhor época de vida, vocês estavam comigo. Tudo que vivi com vocês me tornaram uma pessoa mais madura.

À Cris maguinha, por ter me ajudado nessa fase final. Cris, a sua companhia e conversas tornaram, menos exaustivo, esse momento do tcc. Saiba que toda vez que eu ouvir a música ‘Gatinha assanhada’ lembrarei de você e dos momentos descontraídos que vivenciamos.

Por fim, agradeço a todos os meus familiares, amigos e professores que fazem ou fizeram parte de minha vida que, mesmo sem os nomes aqui citados, são também responsáveis por eu ter chegado até aqui. Reconheço que o papel exercido por cada um foi essencial e indispensável.

***Muito Obrigada!***

...Quando elas decidem acreditar  
Elas são fortes e sabem sonhar  
Imperfeitas princesas feitas de realeza  
Que em suas histórias escolheram lutar.  
(MARCELA TAÍS)

## RESUMO

Durante interações planta–patógeno, patógenos secretam proteínas efetoras para o apoplasto e citoplasma vegetal, as quais modulam as respostas de doença ou de resistência das plantas. Devido à importância de *Phytophthora parasitica* como agente causal da doença gomose dos citros, o objetivo deste trabalho foi identificar genes efetores citosólicos a partir do secretoma de *Phytophthora parasitica* dos citros, por meio de ferramentas computacionais e ensaios biológicos. Usando o Programa Netglycate, um total de 117 genes de *P. parasitica* foram identificados no CitEST/PP, que possivelmente codificam glicoproteínas secretadas, com homologia a proteínas de *Phytophthora* spp. Dentre estes, seis genes foram selecionados como candidatos para estudos futuros de expressão gênica e por isso primers específicos para amplificação por PCR quantitativo em tempo real foram desenhados e sintetizados. Os primers foram validados pela amplificação de DNA total de *P. parasitica* por PCR, tendo gerado amplicons de tamanhos esperados. Visando os estudos de expressão gênica, fases do desenvolvimento assexual *in vitro* do patógeno foram obtidas em grande quantidade e a condição de cultivo adequada variou para cada fase. A produção abundante de hifas e clamidósporos foi obtida em meio líquido cenoura-ágar sob luz constante a 25 °C, por 12 e 45 dias, respectivamente. Esporângios de *P. parasitica in vitro* foram produzidos 5 dias após imersão de discos de micélio em água destilada estéril. Para a ativação da patogenicidade e estudos de interação citros-Phytophthora, *P. parasitica* foi recuperado de folhas de laranjeiras com sucesso. O RNA total de micélio foi isolado por um método de fenol modificado, por trizol e pelo Kit RNeasy (Qiagen). Os efetores do tipo glicoproteínas identificados são fortes candidatos para estudos de expressão gênica e para o entendimento e controle da gomose em citros.

**Palavras-chave:** Proteínas secretadas. Banco de dados CitEST. Gomose. Glicoproteínas.

## ABSTRACT

During plant–pathogen interactions, pathogens secrete effectors toward apoplast and cytoplasm of plants that modulate disease or defense host responses. Due to the importance of *Phytophthora parasitica* as causal agent of the citrus gummosis, the main objective of this work was to identify cytosolic effector genes from *Phytophthora parasitica* secretome, using computational tools and biological assays. By using the Netglycate Program, a total of total of 117 *P. parasitica* genes were identified into the CitEST/PP database, which putatively encode secreted glycoproteins, sharing homologies with other *Phytophthora* spp proteins. Among of them, six genes were selected as candidates to future studies of gene expression, and reason that specific primers to quantitative real time PCR amplification were designed and sintesized. These primers were validated by the PCR amplification using *P. parasitica* genomic DNA, since it has been generated amplicons of expected sizes. Aiming gene expression studies, *in vitro* asexual growth phases of the pathogen were obtained in large scale and the culture conditions were different for each phase. Hyphae (mycelia) and chlamydospores abundant production was obtained on liquid carrot culture medium under constant light at 25°C during 12 and 45 days, respectively. *P. parasitica* sporangia were *in vitro* produced at 5 days after the immersion of mycelia-agar in sterile distilled water. In order to activate the pathogenicity of the pathogen, *P. parasitica* was successfully re-isolated from orange leaf pieces. Total RNA from mycelia was extracted using a phenol protocol modified, trizol and RNeasy Kit (Qiagen). The identified glycoprotein-like effectors are strong candidates for the quantitative expression studies, as well as to understand and control of the citrus gummosis.

**Keywords:** Secreted proteins. CitEST database. Gummosis. Glycoproteins.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Demonstração das condições assépticas para manuseio de <i>P. parasitica</i> ....	34
FIGURA 2	Bioensaio de interação citros- <i>Phytophthora parasitica</i> para ativação da patogenicidade, via inoculação de folha de citros em água .....	35
FIGURA 3	Bioensaio de interação citros- <i>Phytophthora parasitica</i> para ativação da patogenicidade, via inoculação de laranja .....	36
FIGURA 4	Repicagens de <i>Phytophthora parasitica</i> para a produção de esporângios ....	37
FIGURA 5	Sequências de nucleotídeo e de aminoácidos deduzida de PpCyPB ( <i>Phytophthora parasitica</i> cyclophilin B), indicando os códons de iniciação (azul) e de parada (róseo) .....	43
FIGURA 6.	A comparação da sequência de aminoácidos deduzida do alinhamento múltiplo de PpCYPB com outras proteínas homólogas à ciclofilina B foi realizada utilizando o programa ClustalW .....	44
FIGURA 7.	Eletroforese em gel de agarose 0,8% de DNA isolado do desenvolvimento assexual <i>in vitro</i> de <i>Phytophthora parasitica</i> . M. Marcador de peso molecular (Axygen). 1, 2, 3. DNA .....	46
FIGURA 8	Eletroforese em gel de agarose 0.8% de produtos de PCR usando DNA de <i>P. parasitica</i> e diferentes pares de primers específicos para amplificar genes de interesse .....	47
FIGURA 9	Validação das condições de cultivo para <i>Phytophthora parasitica</i> no Laboratório de Biologia Celular e molecular do CES/UFMG .....	48
FIGURA 10	Recuperação de inoculo de <i>Phytophthora parasitica</i> após ativação da patogenicidade em folhas de citros .....	50
FIGURA 11	Micrografias da penetração de <i>P. parasitica</i> em pedaços de folhas de limoeiro e em pedaços de folhas de laranjeira, visualizadas sob	

microscópio luz, resolução 40x .....	51
FIGURA 12. Laranjas apresentando os sintomas de infecção por <i>P. parasitica</i> , 12 dias após a inoculação do patógeno .....	52
FIGURA 13 Micrografias de hifas, esporângios e clamidósporos de <i>Phytophthora parasitica</i> visualizadas sob microscópio luz, resolução 40x .....	53
FIGURA 14 Eletroforese em gel de agarose de RNA total isolado de micélio de <i>Phytophthora parasitica</i> (A e B). M. Marcador de peso molecular (Axygen). 1, 2, 3, 4. Repetições de extrações de RNA .....	55

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Representação parcial de unigenes de <i>Phytophthora parasitica</i> com homologia via BLASTx com glicoproteínas de outras <i>Phytophthora</i> spp.....	40
TABELA 2	Sequência dos primers desenhados para genes efetores de <i>P. parasitica</i> , visando análises da expressão por PCR quantitativo em tempo real.....	45
TABELA 3	Quantificação do DNA genômico de <i>P. parasitica</i> por ng/ $\mu$ L em cada amostra extraída utilizando o Nanodrop.....	46
TABELA 4	Quantificação do RNA de <i>P. parasitica</i> por ng/ $\mu$ L em cada amostra extraída utilizando o espectrofotômetro Nanodrop .....	55
TABELA 5	Representação das fases obtidas de <i>Phytophthora parasitica</i> . Micrografias visualizadas sob o microscópio de luz.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APTA	Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Avr	Avirulência
BLAST	Do inglês, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CA	Cenoura-Ágar
CBEL	Do ingles, Cellulose Binding with Elicitor and Lectin Activity
cDNA	DNA complementar
CES	Centro de Educação e Saúde
CitEST	Banco de dados de segmentos de sequências expressas de citros
ClustalW	Do inglês, <i>Multiple Sequence Alignment</i>
CRN	Do inglês, <i>Crinkling and Necrosis-Inducing Protein</i>
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
CyPs	Ciclofilinas
DDBJ	Do inglês, <i>DNA Data Bank of Japan</i>
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDPC	Enzimas que Degradam Parede Celular
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPI	Inibidor de Protease Extracelular
EPIC	Do inglês, Cystatin-like Extracelular Protease Inhibitor
ESTs	Do inglês, <i>Expressed Sequence Tags</i> , segmentos de sequências expressas
ETI	Do inglês, <i>Effector Triggered Immunity</i> , imunidade ativada por efetores

ETS	Suscetibilidade desencadeada por efetores
GPI	Do inglês, <i>Glucanase Inhibitor Proteins</i>
HR	Resposta de Hipersensibilidade
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
INCT	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
INSDC	Do inglês, <i>International Nucleotide Sequence Database Collaboration</i>
Leu	Leucina
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	Do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NLS	Localização Nuclear Funcional
ORF	Do inglês, <i>Open Reading Frame</i>
PAMP	Padrão Molecular Associado à Patógeno
PCF	Proteína rica em Cisteína
PCR	Do inglês, Polymerase Chain Reaction
PiYPT1	Do inglês, <i>Ras Related Protein Piypt1</i>
PP	<i>Phytophthora parasitica</i>
PpCyPB	<i>Phytophthora parasitica</i> CyP B
PRR	Receptor de Reconhecimento Padrão
PTI	Do inglês, <i>PAMP Triggered Immunity</i>
PVP	Polivinilpirrolidona
R	Resistência
RE	Retículo Endoplasmático
S33	Do inglês, <i>Serine Protease Family S33</i>
SNE	Supressor de Necrose
Ser	Serina
RNA	Ácido Ribonucléico
Thr	Treonina

T <sub>m</sub>	Temperatura
TP	Do inglês, <i>Transmembranase Protein</i>
UAE	Unidade Acadêmica de Educação
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Justificativa .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2 Objetivos .....</b>	<b>19</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Importância dos Citros .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 O Oomiceto <i>Phytophthora parasitica</i> de Citros .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Interações Planta–Patógeno .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Interação Planta–Phytophthora .....</b>	<b>24</b>
<b>2.5 Efeitores de Patógenos: o Secretoma .....</b>	<b>25</b>
<b>2.6 Efeitores Apoplásticos de <i>Phytophthora</i> spp.....</b>	<b>27</b>
<b>2.7 Efeitores Citoplasmáticos de <i>Phytophthora</i> spp. ....</b>	<b>28</b>
<b>2.8 Glicoproteínas .....</b>	<b>29</b>
<b>2.9 Bioinformática aplicada ao estudo de genomas .....</b>	<b>30</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Seleção, identificação e caracterização de genes efetores de <i>Phytophthora parasitica</i> de citros a partir do CitEST/PP.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Desenho de primers para genes efetores citosólicos de <i>P. parasitica</i>....</b>	<b>32</b>
<b>3.3 Extração de DNA genômico de <i>P. parasitica</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>3.4 Reações em Cadeia da Polimerase (PCR).....</b>	<b>33</b>
<b>3.5 Descrição e condições de cultivo do isolado de <i>Phytophthora parasitica</i>....</b>	<b>34</b>
<b>3.6 Bioensaios de patogenicidade de <i>P. parasitica in planta</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>3.7 Validação de fases do desenvolvimento do ciclo de vida assexual de <i>P. parasitica</i> .....</b>	<b>36</b>
<b>3.8 Estabelecimento de protocolos para extração de RNA total de <i>P. parasitica</i> .....</b>	<b>37</b>
<b>3.9 Eletroforese de DNA e RNA em gel de agarose .....</b>	<b>38</b>
<b>4. ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Caracterização molecular <i>in silico</i> de genes efetores de <i>Phytophthora parasitica</i> de citros .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2. Primers desenhados para genes efetores citosólicos de <i>P. parasitica</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3 Qualidade do DNA de <i>Phytophthora parasitica</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>4.4 Validação dos primers por reação em cadeia da polimerase (PCR) .....</b>	<b>46</b>
<b>4.5 Validação das condições de cultivo para <i>Phytophthora parasitica</i> .....</b>	<b>47</b>
<b>4.6. Ativação da patogenicidade de <i>P. parasitica in planta</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>4.7 Estudo das diferentes fases do ciclo de vida de <i>P. parasitica in vitro</i> .....</b>	<b>52</b>
<b>4.8. Extração de RNA de fases de <i>P. parasitica</i> .....</b>	<b>54</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os citros abrangem espécies do gênero *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunela*. Incluem as laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*Citrus reticulata*, *C. deliciosa* e *C. sunki*), limões (*Citrus limonia*), limas ácidas, o Tahiti (*Citrus latifolia*) e o Galego (*Citrus aurantiifolia*), e doces, lima da Pérsia (*Citrus limettioides*), pomelo (*Citrus paradisi*), cidra (*Citrus medica*), laranja-azeda (*Citrus aurantium*) e toranjas (*Citrus grandis*) (OLIVEIRA, 2013). Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de citros, portanto, o agronegócio dos citros é uma importante atividade econômica do país. (OLIVEIRA, 2011).

### 1.1 Justificativa

A citricultura brasileira enfrenta desafios ambientais e fitopatogênicos. Existem descritas mais de 35 doenças que limitam a produção e qualidade dos frutos. Dentre estas, está incluída a Gomose caracterizada pelo escorrimento de goma do tronco, rachadura na casca e podridão do tronco, podendo afetar e expandir para as raízes. É causada pelo agente patogênico *Phytophthora parasitica*, responsável por grandes perdas de citros. As perdas na produção ocorrem em todas as fases da produção de citros, desde o viveiro até a pós-colheita.

*P. parasitica* é um oomicetos, patogênico de solo que apresenta estratégias para a infecção em seu hospedeiro. Apresenta um ciclo de vida assexuado e sexuado, portanto, heterolítico. As fases do desenvolvimento assexuado são esporângio, zoósporo, clamidósporo e hifa. O ciclo de vida sexual necessita de tipos de compatibilidade sexual distinto, gerando isolados mais competitivos para o ambiente. Clamidósporo e zoósporo são considerados estruturas de resistência e assim vivem por muito tempo no solo em condições adversas.

Possuem um arsenal de genes que facilitam a infecção parasitária e a interação entre *Phytophthora*–hospedeiro é, portanto, mediada pelo grande número de trocas de sinal. O patógeno secreta efetores, moléculas capazes de modificar a estrutura e função da célula hospedeira, para facilitar a infecção (fatores de virulência) ou desencadear respostas de defesa em plantas resistentes (fatores de avirulência) (QUTOB, 2002).

Atualmente, as pesquisas sobre as interações entre plantas–patógenos vêm trazendo uma diversidade de informações cruciais para o conhecimento da função molecular de

proteínas efetoras, envolvidas na patogenicidade e virulência de patógenos. Dependendo do local de ação que as moléculas efetoras atuam no hospedeiro, elas podem ser classificadas como Efetores Apoplásticos ou Efetores Citoplasmáticos. Os Apoplásticos incluem enzimas que degradam a parede celular do tecido vegetal, toxinas, elicinas encontradas em espécies de *Phytophthora* e alguns PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns), enquanto que como efetores citoplasmáticos incluem proteínas do tipo RxLR, CRN (*Crinkler*) e SNE1.

Pesquisas recentes têm focado interesse no secretoma de patógenos, visto que estes microrganismos apresentam várias estratégias de ataque ao hospedeiro e, secretam proteínas efetoras, consideradas fatores de virulência, e diversas moléculas para o meio citoplasmático dos respectivos hospedeiros com a função de suprimir as respostas de defesa da planta, permitindo o estabelecimento de doenças (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006; BIRCH *et al.*, 2006; JONES; DANGL, 2006; BLOCK *et al.*, 2008). Portanto, o estudo de genes efetores de *Phytophthora parasitica* de citros representa uma alternativa relevante para a elucidação dos mecanismos de patogenicidade bem como para elaboração novas medidas para controlar perdas agronômicas no campo.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo Geral

- Identificar genes efetores citosólicos a partir do secretoma de *Phytophthora parasitica* dos citros, por meio de ferramentas computacionais e ensaios biológicos.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar, identificar e caracterizar genes efetores de *Phytophthora parasitica* de citros a partir do banco de dados CitEST/PP;
- Selecionar genes efetores candidatos para estudos de expressão gênica e desenhar primers para genes efetores citosólico de *P.parasitica*;
- Iniciar etapas fundamentais de estudos de expressão de genes candidatos, incluindo desenho e validação de primers, pela extração de DNA genômico de *P. parasitica* e PCR;
- Descrever condições de cultivo e obtenção de fases do desenvolvimento assexual de do isolado de *Phytophthora parasitica*;
- Estabelecer bioensaios de interação citros-Phytophthora e recuperar isolado de *P. parasitica* após ativação *in planta* da patogenicidade;
- Estabelecer protocolos para a extração total de RNA das fases do desenvolvimento assexual de *P. parasitica*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância dos Citros

A produção de citros para o consumo no mercado interno é de frutos e suco concentrado para o mercado externo. O agronegócio dos citros é uma das mais importantes atividades econômicas do Brasil, sendo o estado de São Paulo, Sergipe e Bahia os principais produtores de citros. Apesar disso, a citricultura brasileira sofre desafios ambientais e fitopatogênicos e, está associada à expansão simultânea de pragas e doenças, com significativo reflexo nos custos de produção. Tendo em vista a importância da citricultura na economia, estima-se que mais de 60% dos custos de produção de citros no Brasil estejam relacionados ao controle fitossanitário de pragas e doenças (MACHADO, 2013).

Os citros podem ser atacados por pragas como o ácaro da ferrugem, a orthozia, a larva minadora (em viveiro ou pomar novo), pulgões, moscas-das-frutas, lagartas, cochonilhas e formigas (EMBRAPA, 2003). Entre as doenças, destacam-se a clorose variegada dos citros, a leprose, a pinta preta, a mancha de alternaria, a morte súbita, o cancro cítrico, a gomose, a tristeza e, mais recentemente, o *huanglongbing* (*greening*). Os esgotamentos do modelo de convivência ou de controle químico de vetores de doenças, com seus altos custos financeiros e ambientais, têm destacado a importância dos trabalhos de melhoramento genético, como estratégia abrangente e duradoura de controle de doenças (MACHADO, 2013).

### 2.2 O Oomiceto *Phytophthora parasitica* de Citros

Espécies de *Phytophthora*, pertencentes ao Reino Stramenopila, são patógenos responsáveis por causar infecções em vários hospedeiros, levando a uma série de doenças em diferentes espécies vegetais. As espécies mais comuns e importantes encontradas no Brasil são *Phytophthora citrophthora* e *Phytophthora parasitica*, principal agente causal da doença gomose dos citros.

*P. parasitica* é um patógeno de solo comum em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, pois toleram temperaturas de até 35°C. A temperatura favorável ao seu desenvolvimento é 27° a 32°C, portanto, mais ativos em condições úmidas e quente (BELTRAME, 2010). Segundo Gouveia (2004), a espécie caracteriza-se por possuir

estruturas de hifa cenocítica e hialina e esporângios apicais e/ou papilados globosos. Apresentam zoósporos biflagelados que produzem parede celular, composta por  $\beta$  1–3 glucana e celulose, no processo de encistamento para germinar e causar infecções. Apresentam estruturas de resistência, como clamidósporo, zoósporo e oósporo e fase vegetativa diploide (MARTINS, 2010).

A espécie apresenta um ciclo de vida assexual e sexual, portanto, heterolítica. O ciclo de vida assexual de *P. parasitica* inicia com a produção de esporângio que libera grande quantidade de zoósporos que necessita de baixa temperatura e água disponível no ambiente para sua locomoção. Em condições favoráveis, os zoósporos encontram a superfície de contato ferido do hospedeiro, encistam e germinam para formar micélio. A produção de clamidósporo é estimulada quando há condições desfavoráveis ao desenvolvimento de micélio, tais como, pouca disponibilidade de água e nutrientes, baixa temperatura (15° a 18°C) e baixo teor de oxigênio (O<sub>2</sub>) e germina, novamente, em micélio. Quando há disponibilidade de água, a germinação de clamidósporo é semelhante à de esporângio e dar-se continuidade a todo o ciclo.

O ciclo de vida sexual necessita da ausência de luz e de tipos de compatibilidade sexual distinto (A<sup>1</sup> e A<sup>2</sup>), a união do oogônio (estrutura feminina) com o anterídio (estrutura masculina) origina o oósporo (esporo sexual). Posteriormente, o oósporo amadurece em clamidósporo que germina, ao encontrar condições favoráveis, em esporângio e reinicia o ciclo ou sob condições de umidade, clamidósporos e oósporos podem germinar para formar esporângios que libertam os zoósporos e reiniciam o ciclo. (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

A gomose ou ‘podridão do pé’ é causada pelo patógeno *P. parasitica* e é uma das principais doenças citrícolas, pois as perdas na produção podem ocorrer em todas as fases da produção de citros, desde a sementeira, o viveiro, passando pelo pomar, comprometendo os tecidos jovens com o aparecimento de lesões escuras podendo levar ao definhamento de plântulas, a fase pós-colheita e até o armazenamento e transporte do fruto (LARANJEIRA *et al.*, 2005). Essa doença afeta o sistema radicular, o tronco abaixo e acima do solo, ramos, folhas e frutos.

Caracterizam-se pelas lesões encontradas no caule, tais como, escurecimento, rachaduras e morte dos tecidos. Tais lesões podem levar a exsudação da goma, conhecida como gomose. Pode observar ainda a podridão do caule e radículas, murcha, queda e

coloração amarelada de folhas, redução do crescimento e desenvolvimento de plântulas, sistema radicular pouco desenvolvido, produção de pequenos frutos e, possivelmente, morte da planta (SILVA *et al.*, 2008). Em condições de umidade, os frutos próximos ao solo podem ser contaminados por respingos de chuva causando uma podridão marrom típica de frutos e queda de folhas (BELTRAME, 2010). As podridões causadas são secas de cor marrom–parda e os frutos contaminados apresentam odores característicos. Em condições favoráveis ao desenvolvimento micelial, como alta umidade, o patógeno desenvolve-se na casca do fruto infectado, podendo expressar os sintomas apenas na pós-colheita (FEICHTENBERGER *et al.*, 2005; LARANJEIRA *et al.*, 2005).

Portanto, faz-se necessário conhecer como acontecem as interações planta–patógeno e entender os mecanismos de patogenicidade para buscar alternativas e estratégias para o controle de *P. parasitica*, por exemplo, pela manipulação genética de plantas cítricas, levando-as à resistência a patógenos oomicetos.

### **2.3 Interações Planta–Patógeno**

As plantas estão, intimamente, associadas a uma variedade de organismos vivos, especialmente os micróbios (HINES e ZAHN, 2009; RODRIGUEZ *et al.*, 2009; REDFORD *et al.*, 2010). Por serem atacadas por diversos patógenos e parasitas, incluindo os vírus, bactérias, fungos, oomicetos, nematóides e insetos (AGRIOS, 2005), as plantas iniciam o mecanismo de resistência a partir do reconhecimento de sinais exógenos provenientes do patógeno, continuam com os mecanismos de transdução desses sinais e resultam na ativação de genes (WALTERS *et al.*, 2007) afim de evitar a atividade do patógeno em seus tecidos.

As plantas apresentam, em sua superfície celular e intracelular, receptores do sistema imunológico e os patógenos produzem uma gama de efetores capazes de modular os processos, incluindo a indução e supressão das defesas da planta (WIN *et al.*, 2012). Dessa maneira, os mecanismos de defesa, que são estimulados por um eliciador (TERRY; JOYCE, 2004) em resposta às invasões das moléculas efetoras do patógeno, tendem a serem constitutivos, existentes nas plantas antes do contato com os patógenos, e induzíveis, ativados em resposta à invasão do tecido pelo patógeno (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2008). Portanto, o reconhecimento dos eliciadores se faz tanto no apoplasto quanto no citosol de células do hospedeiro (SCHORNACK *et al.*, 2010) visando impedir a infecção do patógeno.

Foi proposta a existência de duas linhas de defesa na planta. O primeiro sistema atua na etapa extracelular da interação planta-patógeno antes da invasão da célula pelo patógeno e a outra atua após as moléculas efetoras serem secretadas no citoplasma celular da planta (JONES; DANGL, 2006; STERGIOPOULOS; DE WIT, 2009).

Para Stergiopoulos e De Wit (2009), a imunidade ativada por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Patterns) ocorre quando há reconhecimento de defesa na etapa extracelular após a infecção de PAMPs ou PTI (PTI, *PAMP Triggered Immunity*) por proteínas receptoras presentes na membrana plasmática, tratando-se de uma defesa basal. No entanto, esta defesa é superada pelos patógenos devido à translocação de moléculas efetoras para o meio citoplasmático vegetal que suprimem PTI e contribuem para a virulência do patógeno, resultando em uma suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS) (DE WIT, 2007; JONES; DANGL, 2006).

Desse modo, as plantas desenvolveram uma defesa denominada de imunidade ativada por efetores (ETI, *Effector Triggered Immunity*) baseados nas proteínas codificadas pelos genes *R* que podem reconhecer os efetores ou a sua interferência em proteínas específicas na célula e ativar as respostas de defesa restringindo o desenvolvimento do patógeno ao local inicial de infecção.

De acordo com Flor (1942), existe uma relação entre genes de ataque do patógeno e de defesa no hospedeiro. Para cada gene de avirulência (*Avr*) no patógeno, existe um gene de resistência (*R*) correspondente no hospedeiro e a interação do produto destes genes resulta em resposta de defesa, dentre elas a morte celular localizada, conhecida por reação de hipersensibilidade ou HR.

De acordo com a interação molecular e a teoria gene-a gene, é possível observar a coevolução entre patógeno e planta, durante a qual patógenos respondem por mutação ou perda de efetores, ou através do desenvolvimento de novos efetores que podem evitar ou reprimir ETI, enquanto as plantas desenvolvem novas proteínas *R* mediando reconhecimento de novos efetores (DANGL; MCDOWELL, 2006). Desse modo, para a compreensão da resistência a doença faz-se necessário a identificação das proteínas expressas durante a interação planta-patógeno.

## 2.4 Interação Planta–Phytophthora

Fitopatógenos que compreendem fungos e oomicetos apresentam diversas estratégias para infeccionar seu hospedeiro. Espécies de *Phytophthora* são capazes de infeccionar através de aberturas vegetais, como estômatos, ou através de feridas no hospedeiro (KEBDANI *et al.*, 2010) resultando no estabelecimento de doenças em espécies vegetais economicamente importantes.

Como as espécies de *Phytophthora* possuem em seu ciclo de vida a fase zoósporo e esporo, infectam folhas ou superfícies radiculares por meio da água, estes, então, encistam, germinam e penetram no tecido do hospedeiro (HARDHAM, 2001; VAN WEST, 2003). Ao germinarem, os cistos produzem tubos germinativos para formar apressórios ou estruturas semelhantes que facilitam a adesão e penetração nas superfícies das plantas. Em algumas espécies de *Phytophthora*, a penetração pode ocorrer entre as células sem a ajuda de um apressório (HARDHAM, 2001).

Por apresentarem um arsenal de genes que facilitam a infecção parasitária, o gene *Car* de *Phytophthora infestans* (GORNHARDT, 2000) é regulado na fase em cistos germinativos e apressórios, antes da penetração do tecido da planta, que codifica para a proteína do tipo mucina. É sugerido que essa proteína seja expressa para facilitar na aderência do patógeno ao hospedeiro. Foram identificados em bancos contendo segmentos de sequências expressas (Est) genes com similaridade significativa para a degradação de enzimas, tais como as cutinases, proteases, endoglucanases, exoglucanases, e quitinases, para facilitar a infecção por quebrar barreiras físicas na planta (HUITEMA *et al.*, 2004).

Sendo assim, após a infecção, as plantas apresentam repostas de defesa através da produção de enzimas antimicrobianas, por exemplo, glucanases e proteases, capazes de degradarem as paredes celulares microbianas. Por outro lado, as espécies de *Phytophthora* são capazes de suprimir estas repostas de defesa por produção de moléculas inibidoras de enzimas (KAMOUN, 2004).

Dessa forma, a interação entre *Phytophthora* e plantas é, portanto, mediada pelo grande número de trocas de sinal. O patógeno produz efetores, moléculas capazes de modificar a estrutura e função da célula hospedeira, para facilitar a infecção, chamados de fatores de virulência ou desencadear repostas de defesa em plantas resistentes, os fatores de

avirulência ou eliciadores específicos. Eles interagem direta ou indiretamente com os componentes das vias de resposta de defesa de plantas, que podem ser proteínas de resistência ou várias moléculas de outras plantas, geralmente denominados alvos de virulência. No entanto, alguns eliciadores apresentam a função, como toxinas, para facilitar a colonização do tecido hospedeiro durante a fase tardia da infecção de *Phytophthora*, quando o tecido do hospedeiro entra em colapso e se torna necrótica (QUTOB, 2002).

Moléculas efetoras de *Phytophthora* induzem uma variedade de respostas de defesa celular em plantas (KEBDANI *et al.*, 2010). Alguns efetores induzem respostas de defesa tanto em plantas suscetíveis como em plantas resistentes e são conhecidos como eliciadores inespecíficos. No entanto, outros efetores induzem a resposta de defesa, especificamente, em plantas resistentes, portanto, são conhecidos como eliciadores específicos levando a uma resposta de hipersensibilidade.

## **2.5 Efetores de Patógenos: o Secretoma**

Patógenos secretam diversas proteínas chamadas efetores que ajudam a invasão de plantas hospedeiras (HANN *et al.*, 2010; KOECK *et al.*, 2011; STASSEN *et al.*, 2011). Portanto, a identificação de efetores de patógenos e suas funções é crucial para compreender melhor a virulência do patógeno. Estudos vêm sendo realizados para compreender a função e mecanismos de ação de proteínas secretadas pelo patógeno, relevantes para a patogenicidade associados à planta hospedeira, visando identificar essas moléculas específicas quando na presença de seu hospedeiro (FERREIRA, 2009).

Secretoma é um termo que emergiu recentemente para descrever estudos globais de proteínas que são sintetizadas por uma célula, tecido ou organismo e direcionadas para o meio extracelular, portanto secretadas, em um determinado tempo ou sob certas condições. O secretoma constitui uma importante classe de proteínas que controlam e regulam uma multitude de processos biológicos e fisiológicos, o que as tornam uma relevante fonte para descobertas de alvos terapêuticos e biomarcadores, visando aplicações clínicas. O estudo do secretoma pode ser realizado através do isolamento, identificação e perfil de proteínas secretadas, por uma combinação de estratégias bioquímicas, proteômicas e de bioinformática, neste caso, pela identificação de genes expressos. Além da conhecida via secretória clássica de eucariotos, pelo retículo endoplasmático-Golgi, estudos de secretoma têm suportado a

existência de uma via secretória que atua por mecanismos não clássicos (AGRAWAL *et al.*, 2010).

O interesse de estudar o secretoma de patógenos está no fato de que estes microrganismos apresentam várias estratégias de ataque ao hospedeiro e, secretam proteínas efetoras, consideradas fatores de virulência, e diversas moléculas para o meio citoplasmático dos respectivos hospedeiros com a função de suprimir as respostas de defesa da planta, permitindo o estabelecimento de doenças (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006; BIRCH *et al.*, 2006; JONES; DANGL, 2006; BLOCK *et al.*, 2008). Segundo Lucas (2004), patógenos podem secretar as moléculas efetoras no meio intercelular patógeno-planta ou translocar para o citoplasma da célula hospedeira.

As moléculas efetoras são capazes de manipular a estrutura e função da célula hospedeira facilitando a infecção, pois há supressão de imunidade ou modifica a fisiologia da planta para permitir o crescimento e propagação do parasita. Essas respostas são conhecidas coletivamente como suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS) e são facilitadas através de um conjunto de processos definidos como alvos de efetores (ETP). No entanto, efetores também podem disparar e ativar os receptores de plantas imunes, uma resposta conhecida como imunidade ativada por efetores (ETI). Em contraste, os receptores da superfície das células de plantas reconhecem os efetores apoplásticos, bem como moléculas de patógenos conservadas conhecido como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (BOLLER e FELIX, 2009; THOMMA *et al.*, 2011). Estes receptores são conhecidos como receptores de reconhecimento padrão (PRRs). O resultante da resposta imune é conhecido como imunidade desencadeada por PRR ou imunidade PAMP-triggered (PTI).

As proteínas efetoras, portanto, são capazes de interferir no fenótipo das interações patógeno-hospedeiro, determinando inclusive, a variedade de plantas hospedeiras ou não hospedeiras de um determinado patógeno. Dependendo do local de ação que as moléculas efetoras atuam no hospedeiro, elas podem ser classificadas em duas categorias: efetores extracelulares ou apoplásticos e efetores citoplasmáticos. (KAMOUN, 2006; MUELLER *et al.*, 2008; MOSQUERA *et al.*, 2009; KHANG *et al.*, 2010).

## 2.6 Efeitores Apoplásticos de *Phytophthora* spp.

As proteínas são secretadas e permanecem no meio extracelular, interagindo com alvos extracelulares e receptores de superfície envolvidos na defesa (HARDHAM, 2010). Como exemplo de efetores Apoplásticos, incluem-se enzimas que degradam a parede celular (EDPC) do tecido vegetal, toxinas, elicitinas encontradas em espécies de *Phytophthora* e alguns PAMPs, porém, alguns possuem a função de virulência desconhecida (HOGENHOUT *et al.*, 2009).

A penetração da superfície vegetal e, posterior, colonização nos tecidos das plantas ocorre devido à ação de uma gama de enzimas degradantes do tecido da planta que são sintetizadas e secretadas pelo patógeno, afim que essas enzimas desempenhem o papel de digerir a parede celular da planta. As EDPCs incluem pectinas, xiloglucanos e hidrolases, responsáveis pela quebra da celulose (GÖTESSON *et al.*, 2002; MCLEOD *et al.*, 2003; COSTANZO *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2008; FENG *et al.*, 2010).

As plantas, por sua vez, reagem através de elicitores contra o ataque dos patógenos secretando enzimas hidrolíticas capazes de danificar a parede celular do agente patogênico. Espécies de *Phytophthora* apresentam 3 efetores apoplásticos capazes de inibir as atividades das enzimas hidrolíticas, assim, diminuem a produção de elicitores da planta (HARDHAM, 2010). *Phytophthora sojae* secreta proteínas inibidoras de glucanases (GIP-glucanase inhibitor proteins) (HAM *et al.*, 1997; YORK *et al.*, 2004). *Phytophthora infestans* secreta um grupo de efetores chamado Kazal-like, inibidores de proteases extracelulares (EPI) (TIAN *et al.*, 2004). *Phytophthora ramorum*, *P. sojae* e *P. infestans* secretam vários inibidores da protease tais como a cistatina (EPIC-Cystatin-like Extracelular Protease Inhibitor) (TIAN *et al.*, 2007).

Alguns efetores são pequenas proteínas ricas em cisteína, as elicitinas, que proporcionam uma maior estabilidade à proteína no apoplasto, uma região rica em proteases devido à formação de pontes dissulfeto. As elicitinas agem como transportadoras de esterol em oomicetos (OSMAN *et al.*, 2001), desempenhando funções na patogenicidade, e em espécies de *Phytophthora* são essenciais para o crescimento e desenvolvimento do patógeno (HARDHAM, 2010). As toxinas consideradas efetoras são Pcf e Pcf-like, proteínas pequenas ricas em cisteínas.

Alguns PAMPs são considerados efetores, como a CBEL (Cellulose Binding with Elicitor and Lectin activity), proteína de parede celular encontrada em *P. parasitica*. (GAULIN *et al.*, 2006) importante na adesão do patógeno ao seu hospedeiro. A proteína NEP1 é responsável por induzir a necrose em plantas, também considerado efector do apoplasto (VEIT *et al.*, 2001; FELLBRICH *et al.*, 2002; QUTOB *et al.*, 2002). A proteína GP42 é uma transglutaminase encontrada em espécies de *Phytophthora* que induz a resposta de defesa culminando a morte celular (HALIM *et al.*, 2004; MEIJER *et al.*, 2006).

## **2.7 Efetores Citoplasmáticos de *Phytophthora* spp.**

Os efetores atravessam a membrana da célula hospedeira e são translocados para o interior das células através de estruturas especializadas, como vesículas e haustórios, que geralmente se desenvolvem dentro do limite da parede celular da planta, e invaginam para dentro da célula do hospedeiro (HARDHAM, 2010).

Os efetores Citoplasmáticos de oomicetos estão inseridos em dois grupos de proteínas. O primeiro grupo de efetores é o RXLR que possuem um domínio RxLR (Arginina-aminoácido-Leucina-Arginina), na extremidade N-terminal (WHISSON *et al.*, 2007; DOU *et al.*, 2008b) conservado e um domínio C-terminal variável (REHMANY *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2008; HAAS *et al.*, 2009). Há evidências de que o domínio N-terminal seja responsável pela entrada e direcionamento da proteína no hospedeiro e o domínio C-terminal esteja envolvido na atividade efetora em suprimir as respostas de defesa do hospedeiro (WIN *et al.*, 2007; ALLEN *et al.*, 2008).

Tyler (2008) afirmou que a diversidade dessas proteínas possibilitou a identificação de genes que são capazes de suprimirem as respostas de defesa da planta, como também genes capazes de ativarem os mecanismos de defesa por parte da planta. Sendo assim, efetores RxLR foram identificadas, como proteínas de avirulência, em três diferentes espécies: *P. infestans*, *P. sojae* e *Hyaloperonospora arabidopsidis* (LAMOUR *et al.*, 2007). As proteínas ATR1 e ATR13, identificadas em *H. arabidopsidis*, são capazes de suprimir PAMPs (SOHN *et al.*, 2007). O efector AVR3a, encontrado em *P. infestans*, é capaz de desencadear uma reação de hipersensibilidade em batata através da interação com o gene de resistência, *R3* (ARMSTRONG, *et al.*, 2005), assim como suprimir a morte celular induzida por uma

elicítina (BOS *et al.*, 2006). A Proteína AVR1b, de *P. sojae*, contribui para a virulência em soja e supressão da resposta de hipersensibilidade da célula hospedeira (DOU *et al.*, 2008a).

O segundo grupo de efetores citosólicos são os CRN (*Crinkling and Necrosis-Inducing Protein*), conhecido como os efetores Crinkler (TORTO *et al.*, 2003), responsáveis por causarem necrose e enrugamento foliar. Apresentam características típicas, como um peptídeo sinal na região N-terminal seguido de um motivo LXFLAK adjacente a um domínio DWL (ácido aspártico-triptofano-leucina) e uma região C-terminal diversificada (HAAS *et al.*, 2009).

Outra proteína considerada como efetor citosólico é a SNE1 (Supressor de Necrose 1), encontrada em *P. infestans*, responsável por suprimir a morte da célula hospedeira (KELLEY *et al.*, 2010) induzida pelo hospedeiro. Por possuir um motivo RXLR, estudos sugerem que SNE1 apresenta sinais de localização nuclear para translocar o efetor para o núcleo da célula vegetal.

Atualmente, as pesquisas sobre as interações entre plantas-patógenos vêm trazendo uma diversidade de informações cruciais para o conhecimento da função e patogenicidade de proteínas efectoras. No entanto, ainda há muito a ser descoberto.

## 2.8 Glicoproteínas

As glicoproteínas são importantes em vias de sinalização, indução e manutenção de formas ativas da proteína, reconhecimento celular e nos primeiros estágios de infecção do patógeno, como a adesão célula a célula. Atuam também, na diminuição da alergenicidade de proteínas e defesa contra patógenos. Evidências estão emergindo sob o papel da glicosilação no direcionamento apical e tráfico de proteínas secretórias. Portanto, são formadas a partir do processo de glicosilação que é responsável pela adição de carboidratos à cadeia proteica. Este processo é importante para a formação das proteínas secretórias e de membrana, ocorrendo no Retículo Endoplasmático (RE) e Complexo de Golgi. Proteínas citoplasmáticas não estão aptas a modificações por esse processo.

Existem duas vias de glicosilação: a nitrogênio-glicosilação (N-glicosilação), onde o resíduo *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) liga-se ao grupo amida (NH<sub>2</sub>) de cadeias laterais de asparagina (Asn) que reconhecem a sequência Asparagina/Aminoácido/Serina/Treonina

(Asn/X/Ser/Thr) e um oligossacarídeo inteiro, contendo 14 resíduos de açúcar, são adicionados a cadeia lateral do aminoácido; e a oxigênio-glicosilação (O-glicosilação), o resíduo *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) une-se ao grupo hidroxila de uma Serina ou Treonina e um monossacarídeo é adicionado por vez formando, geralmente, cadeias curtas (AMIGO-BENAVENT, 2007).

## 2.9 Bioinformática aplicada ao estudo de genomas

O auxílio da informática na era do genoma, transcriptoma, proteoma, interatômica e metabolômica torna-se fundamental para facilitar a compreensão das funções biológicas, a partir de dados experimentais. Surge a Bioinformática visando organizar, armazenar e analisar a informação contida nas principais biomoléculas, o Ácido Desoxirribonucleico (DNA), o Ácido Ribonucleico (RNA) e as Proteínas (REYS, 2011).

Devido à quantidade de informações geradas a partir do sequenciamento genético fez-se necessário a criação de bancos de dados a fim de facilitar o armazenamento, organização e análise das informações geradas e garantir o acesso fácil e rápido a nível mundial. O NCBI (National Center for Biotechnology Information [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) é o banco de dados central sobre informações genômicas. Existem vários outros bancos de dados, tais como, o INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration [www.insdc.org/](http://www.insdc.org/)), resultante da associação de três bancos de dados parceiros, o DDBJ (DNA Data Bank of Japan [www.ddbj.nig.ac.jp/](http://www.ddbj.nig.ac.jp/)), o EMBL Nucleotide Sequence Database ([www.ebi.ac.uk/embl](http://www.ebi.ac.uk/embl)) e o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), contendo informações que incluem genes individuais, genomas completos, RNAs, anotações, sequências expressas, cDNAs (fita complementar de DNA) (TATENO *et al.*, 2005; KANZ *et al.*, 2005; BENSON *et al.*, 2005).

Centros de dados de bioinformática têm surgido no Brasil devido os investimentos na construção de bancos de dados cada vez mais específicos. De acordo com Machado (2013), o Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo de Campinas ([biotecnologia.centrodecitricultura.br/](http://biotecnologia.centrodecitricultura.br/)) e a Embrapa atuam há vários anos no melhoramento de citros, desenvolvendo trabalhos de produção e avaliação de novos materiais genéticos, incorporando ferramentas de biotecnologia para acelerar ganhos genéticos.

O Centro de Citricultura desenvolveu extenso banco de dados de genoma expresso de citros (CitEST) integrando melhoramento genético, genoma comparativo e funcional de citros

e alguns de seus patógenos, como por exemplo, o CitEST/PP que contém sequências expressas do patógeno *P. parasitica* durante a interação fitopatógenos (MACHADO, 2013). O CitEST/PP foi construído a partir de duas bibliotecas de cDNA (fita complementar) de diferentes condições de crescimento, *in vivo* e *in planta*, do patógeno. O entendimento da genética e fisiologia de *P. parasitica* pode levar ao desenvolvimento de técnicas de controle, assim como, fornecer informações para a elucidação do patógeno durante a interação com a planta hospedeira de citros (ROSA *et al.*, 2007).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

As atividades foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Educação e Saúde-UFCG, Cuité PB.

#### 3.1 Seleção, identificação e caracterização de genes efetores de *Phytophthora parasitica* de citros a partir do CitEST/PP

As sequências dos unigenes do genoma funcional de *Phytophthora parasitica* presentes no banco de dados CitEST/PP ([www.centrodecitricultura.br](http://www.centrodecitricultura.br)) foram inicialmente traduzidas para sequências de aminoácidos preditas e depois analisadas quanto a presença de sinal de secreção usando o Programa Signal P (PETERSEN *et al.*, 2011). Em seguida, as sequências resultantes da análise Signal P foram analisadas quanto a presença de domínio de ligação a monossacarídeos, usando o programa NetGlycate (JOHANSEN *et al.*, 2006). Sequências Netglycate positivas foram analisadas quanto a homologia com outras sequências do banco de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), usando a ferramenta BLASTx (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Posteriormente, as sequências foram analisadas quanto a presença de genes completos usando o programa ORFFinder (*Open Reading Frame Finder*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). O programa ClustalW (*Multiple Sequence Alignment*) (HIGGINS, 1994) foi utilizado para realizar o alinhamento entre sequências homólogas de interesse, durante a caracterização molecular de novos genes.

#### 3.2 Desenho de primers para genes efetores citosólicos de *P. parasitica*

Com o programa *PePrimer* 1.1 (MARSHALL, 2004) para PCR quantitativo em tempo real, primers para genes efetores de *P. parasitica*, foram desenhados dentro da região conservada das ORFs, obedecendo os seguintes parâmetros: Amplicons de 90-100 pb são fortemente recomendados; Tamanho adequado do primer entre 10-24 pb; T<sub>m</sub> = 60 a 70°C. A síntese dos oligonucleotídeos foi feita pela Integrated DNA Technologies (IDT, [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)).

### 3.3 Extração de DNA genômico de *P. parasitica*

DNA genômico foi isolados a partir do desenvolvimento assexual *in vitro* de *P. parasitica*, utilizando um protocolo de extração, resultante da mistura de métodos de extração de DNA de plantas usando CTAB e Axy Multisource Genomic DNA Miniprep Kit Axygen. Tecidos do oomiceto foram macerados em tampão de extração CTAB, contendo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) na concentração de 2%; NaCl (Cloreto de Sódio) 1,4M; Tris HCl pH 8.0 200 mM; EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)-pH 8.0 20 mM e PVP 1%, usando cadinho e pistilo. O macerado foi transferido para microtubos e, em capela de exaustão, adicionou-se 0.2% de  $\beta$ -mercaptoetanol; 10 mg/mL de proteinase K e 10 mg/mL de Ribonuclease A. A mistura foi incubada em banho-maria a 65 °C por 15 minutos, misturando-se de vez em quando. Em seguida, adicionou-se igual volume de Clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), homogeneizou-se usando o vortex e centrifugou-se durante 10 minutos. A fase aquosa foi recuperada, transferida para coluna (Axygen) encaixada em um eppendorf de 2 ml e centrifugada por 1 minuto à 12.000 rpm. Descartou-se o filtrado do tubo e pipetou-se 500  $\mu$ L de tampão W1 na coluna e centrifugou-se por 1 minuto a 12.000 rpm e descartou-se o filtrado. Com a coluna em novo tubo, adicionou-se 700  $\mu$ L de tampão W2, e centrifugou-se 1 min a 10.000 rpm. Esta etapa foi repetida, e desta vez descartou-se novamente o filtrado e centrifugou-se novamente sem nada, para retirar eventual resíduo do tampão anterior. Transferiu-se a coluna para o novo tubo de 1,5 mL e, para eluir o DNA, adicionou-se 100  $\mu$ L de água Milli- $\phi$ , e centrifugou-se por 1 minuto a 12.000 rpm. O fragmento eluído foi armazenado à -20 °C.

### 3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi utilizada para a amplificação de fragmentos de DNA de tamanho esperado. As reações foram realizadas em volumes de 25  $\mu$ L utilizando-se tampão da Taq 1X; 1,5 mM de  $MgCl_2$ ; 0.2 mM de dNTPs; 1,5  $\mu$ M de cada primer forward e reverse; 75 ng de DNA total de *P. parasitica*, 1 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas). As condições térmicas da reação foram 95 °C/2 min. para uma etapa de desnaturação inicial, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C/30 seg., onde ocorre a abertura da fita dupla de DNA, anelamento dos primers em cada uma das fitas do DNA molde a 50 °C/45 seg e extensão a 72 °C/1 min. Em seguida, uma extensão final de 72 °C/ 7min.

### 3.5 Descrição e condições de cultivo do isolado de *Phytophthora parasitica*

O isolado utilizado neste trabalho foi o IAC095 de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*, proveniente do Centro APTA Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo de Campinas, Cordeirópolis SP. O cultivo do patógeno foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Educação e Saúde–CES, Universidade Federal de Campina Grande–UFCG, Campus Cuité-PB, de acordo com instruções do Laboratório de Fitopatologia do referido Centro. O manuseio do patógeno foi feito sob condições assépticas (Figura 1A), tendo sido mantido no Laboratório em placa de Petri contendo o meio cenoura-ágar (CA) autoclavado (500 mL de água destilada, 100g de cenoura e 10 g de ágar), por sucessivas repicagens (Figura 1B). A cultura foi crescida em luz constante a 25 °C, durante 8-12 dias e, posteriormente, armazenados a 4 °C por uma semana até a próxima repicagem.

**FIGURA 1. Demonstração das condições assépticas para manuseio de *P. parasitica*.**



\* (A) Manipulação de meios de cultura e cultivo do patógeno em capela de fluxo laminar vertical na presença de lamparina. (B) Placa de Petri contendo o crescimento micelial de *P. parasitica* após 8 dias crescido sob luz constante a 25°C, mostrando os discos de ágar-micélio para subcultivo.

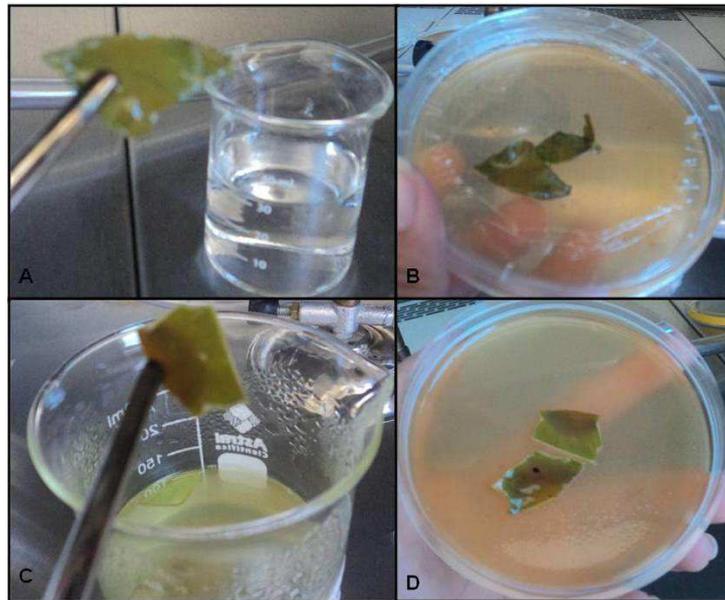
Fonte: DADOS DA PESQUISA.

### 3.6 Bioensaios de patogenicidade de *P. parasitica* in planta

Com o intuito de ativar a patogenicidade da *Phytophthora parasitica* in planta, após sucessivos subcultivos *in vitro*, foi realizado um procedimento baseado no método de isca, descrito por Grimm e Alexander (1973). Três discos de micélio foram inseridos em um Becker contendo água destilada estéril e pedaços de folhas de limoeiro ou de laranjeira, cujos ferimentos poderiam facilitar a ação da *P. parasitica*. Após 8 dias, os pedaços de folhas

inoculadas foram rapidamente lavadas com 2% de hipoclorito, depois com álcool 98% e com água destilada estéril, secos em papel de filtro e imediatamente transferidos para nova placa de Petri contendo cenoura-CA seletivo contendo os antibióticos ampicilina (20 µg/mL) e rifampicina (20 µg/mL). As placas foram mantidas no escuro ou sob luz constante a 25°C, durante 5 dias (Figura 2).

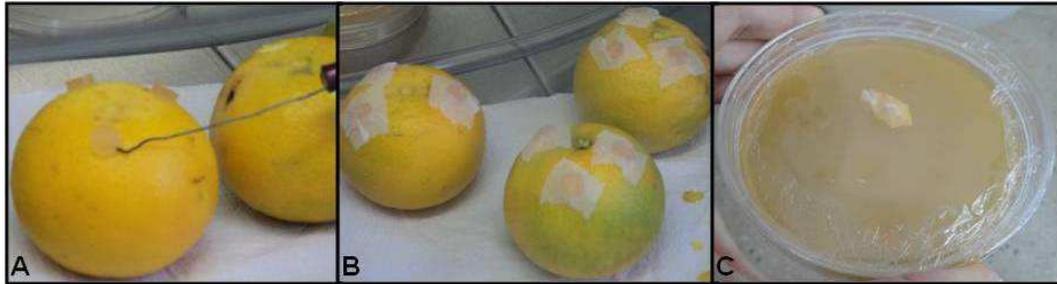
**FIGURA 2. Bioensaio de interação citros-*Phytophthora parasitica* para ativação da patogenicidade, via inoculação de folha de citros em água.**



\*Detalhe de um pedaço de folha de laranjeira inoculado com *P. parasitica* (A) sendo subcultivado em placa de Petri contendo meio cenoura ágar seletivo (B). Detalhe de um pedaço de folha de limoeiro contendo *P. parasitica* (C) sendo subcultivado em placa de Petri contendo meio cenoura ágar seletivo (D).  
Fonte: DADOS DA PESQUISA.

Além disso, discos de micélio-CA de *P. parasitica* também foram inoculados na casca de laranjas “azedas” na região do albedo e incubados em sacos plásticos durante 20 dias, à temperatura de 25°C e luminosidade constante (Figura 3). Em seguida, segmentos de casca contendo o patógeno foram, ou não, rapidamente lavados com 2% de hipoclorito, depois com álcool 98% e com água destilada estéril, secos em papel de filtro e imediatamente transferidos para nova placa de Petri contendo o meio cenoura-ágar apenas, ou cenoura-ágar seletivo com os antibióticos ampicilina 20 µg/mL e rifampicina 20 µg/mL. As placas foram mantidas no escuro ou sob luz constante a 25°C, durante 5 dias (Figura 3C).

**FIGURA 3. Bioensaio de interação citros-*Phytophthora parasitica* para ativação da patogenicidade, via inoculação de laranja.**



Imagens de laranjas detalhando a inoculação por disco de micélio de *P. parasitica* na região do albedo (A). Três laranjas, sendo duas apresentando discos de micélio do patógeno e uma com discos de cenoura ágar funcionando como controle do experimento envolvido por esparadrapo sem zinco (B). Pedaco de casca de laranja contendo o patógeno em placa de Petri com meio cenoura-ágar seletivo (C).

Fonte: DADOS DA PESQUISA.

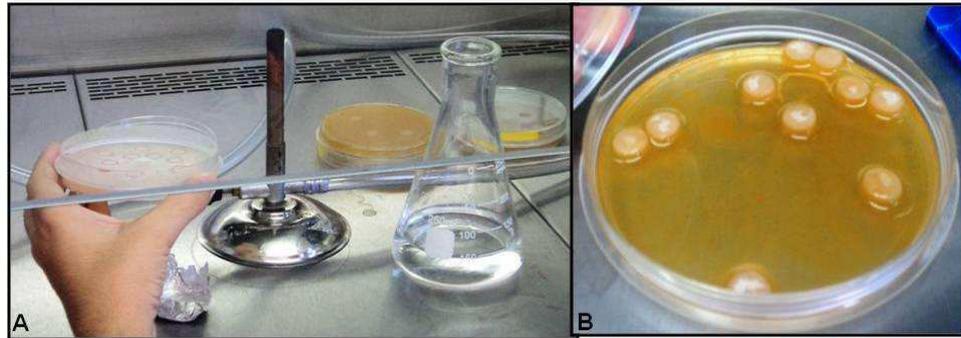
### 3.7 Validação de fases do desenvolvimento do ciclo de vida assexual de *P. parasitica*

**a. Hifas:** Para a produção de hifas/micélio do patógeno, um disco de micélio-CA foi inoculado em placas de Petri contendo meio de cultura cenoura-ágar autoclavado, ou três discos em meio cenoura líquido (500 mL de água destilada e 100g de cenoura) autoclavado. As placas foram mantidas sob luz constante ou no escuro, a uma temperatura de 24-25 °C, enquanto que os Erlenmeyers foram mantidos sob luz constante a 25 °C. O crescimento micelial foi monitorado durante 25 dias, antes da produção de clamidósporos.

**b. Clamidósporos:** Para a produção de clamidósporos, três discos de micélio-CA foram inoculados em meio cenoura líquido dentro de Erlenmeyer sob luz constante a 25 °C. O desenvolvimento de clamidósporos foi monitorado durante 45 dias.

**c. Esporângios:** Para a produção de esporângios utilizou-se a metodologia descrita por Mitchell e Kannwischer-Mitchell (1993). Cerca de 10 discos de micélio-CA de *P. parasitica* foram transferidos para um Erlenmeyer de 250 mL contendo água destilada estéril e incubado sob luz constante a 25 °C (Figura 4A). Outro método testado foi o descrito por Jeffers (2006) em que 10 discos de micélio-CA, provenientes de um crescimento micelial em placa de Petri incubada no escuro a 25°C foi subcultivado em placa de Petri contendo 20 mL de meio cenoura líquido deixado sob luz constante e 25 °C e monitorado a partir de 24 horas (Figura 4B)

**FIGURA 4. Repicagens de *Phytophthora parasitica* para a produção de esporângios.**



Ilustrações de discos de micélio-CA sendo transferidos para Erlenmeyer de 250 mL contendo água destilada estéril (A). Placa de Petri contendo meio cenoura líquido com 10 discos micélio-CA, retirados de cultura crescida no escuro (B).

Fonte: DADOS DA PESQUISA.

### 3.8 Estabelecimento de protocolos para extração de RNA total de *P. parasitica*

RNA total foi extraído apenas da fase de hifa (micélio) obtido a partir de meio cenoura líquido após 10 dias, usando um protocolo adaptado dos métodos Trizol (Invitrogen) e fenol para isolamento de RNA de plantas, visando posterior análise da expressão de genes efetores por PCR quantitativo em tempo real.

Para eliminação de ribonucleases, as vidrarias e as soluções foram tratadas com DEPC (dietil pirocarbonato), sendo que o Tris-HCl, pH 7,5 foi preparado com água DEPC. O tecido micelial foi macerado, usando cadinho e pistilo, em tampão de extração de fenol (0,1M de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH:7,5, 1 mM de EDTA, 1% de SDS, 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol) e, em seguida, adicionou-se igual volume de clorofane (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, 25:24:1). A mistura foi incubada por 30 segundos a temperatura ambiente por 10 minutos. Após centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos à 4 °C, ao sobrenadante recuperado em novo microtubo de 2 mL foi adicionado 2M de cloreto de lítio ( $\text{LiCl}_2$ ) e incubado à 4 °C por 3 horas. Após homogeneização, a mistura foi centrifugada 10.000 rpm por 15 minutos à 4 °C. Em seguida, o pellet foi ressuscitado em 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q e adicionou-se 300  $\mu\text{L}$  de isopropanol RNase free e 300  $\mu\text{L}$  de Tampão Citrato (0,8M de citrato de sódio e 1,2M de NaCl), incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação a 10.000 rpm por 15 min à 4°C, o pellet foi lavado em etanol 75% RNase free gelado, seco a temperatura ambiente e ressuscitado em 25  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q. A quantidade do RNA isolado foi

estimada em gel de agarose 0,8% em TAE (242 g de tris base, 57,1 mL de ácido acético glacial e 500 mM de EDTA) tratado com DEPC.

Posteriormente, foram realizadas novas extrações de RNA total de *P. parasitica* usando RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) para a fase de hifa obtida do desenvolvimento assexuado de *P. parasitica*. Foram realizadas 3 repetições de cada fase, nas mesmas condições ambientais, 25 °C e luz constante. O tecido micelial foi macerado, usando cadinho e pistilo previamente tratadas com DEPC, em tampão de extração Buffer RLC e tampão de maceração (0,5M de NaCl, 100 mM de Tris-HCl pH:7,5, 10 mM de EDTA, água destilada DEPC) e, em seguida, a amostra foi homogeneizada e incubada a 56 °C por 2 minutos. Logo, a amostra contendo o lisado foi passada para a coluna QiaShedder e centrifugada por 2 minutos à 12.000 rpm. Transferiu-se o sobrenadante para novo tubo de coleta e adicionou 0,5 volume de etanol absoluto. Posteriormente, aplicou-se a amostra na coluna RNeasy e centrifugou por 15 segundos à 10.000 rpm. Adicionou 700 µL do tampão RW1 à coluna RNeasy, centrifugou por 15 segundos à 10.000 rpm. Após transferir a coluna para novo tubo de 2 mL, foi pipetado 500 µL do tampão RPE sobre a coluna, centrifugou-se novamente por 15 segundos à 10.000 rpm, repetindo o mesmo procedimento mais uma vez. Depois, colocou-se a coluna em novo tubo de 2mL e centrifugou-se por 1 minuto à 10.000 rpm. Após centrifugação, a coluna foi eluída em novo tubo de 1,5mL com 30 µL de água RNase Free. A quantidade do RNA isolado foi quantificada usando o espectrofotômetro Nanodrop.

### **3.9 Eletroforese de DNA e RNA em gel de agarose**

A eletroforese foi realizada tanto para identificar a qualidade e a concentração do DNA genômico, RNA e para visualização dos fragmentos amplificados pela PCR. No preparo do gel utilizou-se agarose em uma concentração de 0,8% para DNA e 1% para RNA em tampão de corrida T.A.E. (100 mM de Tris HCl pH 8,0- 57,1mL de Ácido acético glacial e 500mM de EDTA pH 7,5) corado com brometo de etídeo. As amostras foram aplicadas em gel contendo 1 µl de tampão de amostra 8X; 5 µl de DNA isolado. A migração do DNA no gel foi realizada a 100 V por 30 minutos para DNA e 150 V por 15 minutos para RNA, em seguida, os ácidos nucleicos foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados.

## 4. ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Este trabalho tem o mérito de relatar pela primeira vez a caracterização de genes efetores que codificam glicoproteínas, a partir do secretoma de *Phytophthora parasitica* de citros, utilizando uma abordagem *in silico*. Visando futuros estudos de expressão gênica dos genes efetores elucidados, entre outros, esta pesquisa também aborda ensaios para obtenção de fases do desenvolvimento assexuado *in vitro* de *P. parasitica* bem como ensaios para estudos de interação citros-Phytophthora.

### 4.1 Caracterização molecular *in silico* de genes efetores de *Phytophthora parasitica* de citros

A identificação e caracterização molecular de genes efetores do tipo glicoproteínas, disponíveis no banco de dados CitEST/PP, e o estabelecimento de condições *in vitro* para a produção de fases do desenvolvimento assexual de *Phytophthora parasitica* no Laboratório de Biologia Molecular do CES/UAE, visando a validação da expressão quantitativa de genes de interesse. Um total de 6.051 sequências de aminoácidos deduzidas a partir dos Unigenes presentes no banco de dados CitEST/PP, um arsenal de 534 (8,82%) de possíveis proteínas efectoras translocáveis foi predito como proteínas secretadas básicas pelo Programa Signal P. A fim de investigar possíveis glicoproteínas envolvidas nos primeiros estágios da infecção por *P. parasitica*, tais como adesão, cisto, e encistamento de zoósporos, foram identificadas 190 proteínas com sítios de glicosilação entre as proteínas preditas como proteínas secretadas básicas. Destas, um total de 117 possíveis glicoproteínas de *P. parasitica* possuem significativa similaridade com sequência de aminoácidos de espécies de *Phytophthora* (Tabela 1), incluindo *P. infestans* (79, 43%), *P. sojae* (29, 16%), *P. nicotiana* (3, 1,6%), *P. parasitica* (3, 1,6%) e *P. cinnamomi* (1, 0,5 %). Além disso, 28 proteínas de *P. parasitica* possuem similaridade de sequência de aminoácidos com proteínas hipotéticas (hypothetical protein PHYSODRAFT) de *P. sojae*, 22 com proteínas hipotéticas conservadas (*conserved hypothetical protein*) de *P. infestans* T30-4 e 68 com proteínas isoladas de outros organismos.

**TABELA 1. Representação parcial de unigenes de *Phytophthora parasitica* com homologia via BLASTx com glicoproteínas de outras *Phytophthora* spp. Cuité PB, 2013.**

Unigene-PP	Tamanho (pb)	Número de reads	Número de Acesso	Nome	Organismo	Similaridade
100943.1	436	3	ACL11863.1	Hypothetical protein	<i>P. cinnamomi</i>	40/66 (61%)
101779.1	855	12	AAN31509.1	Acidic chitinase	<i>P. infestans</i>	191/197 (97%)
101866.1	697	4	ADP08192.1	Aspartic protease 8	<i>P. infestans</i>	167/176 (95%)
103177.1	863	1	AAW24460.1	Ketol-acid reductoisomerase, partial	<i>P. infestans</i>	119/122 (98%)
102573.1	901	9	AAB40355.1	Ras related protein PiYpt1	<i>P. infestans</i>	201/201 (100%)
101429.1	789	2	AAB94814.1	Surface glycoprotein elicitor	<i>P. infestans</i>	114/117 (97%)
101401.1	593	2	EEY63610.1	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, putative	<i>P. infestans</i>	165/167 (99%)
105111.1	752	1	EEY66141.1	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, mitochondrial precursor	<i>P. infestans</i>	163/216 (75%)
101624.1	635	7	EEY53513.1	40S ribosomal protein S15	<i>P. infestans</i>	117/118 (99%)
103769.1	854	1	EEY58388.1	Amino Acid-Polyamine-Organocation (APC) Family	<i>P. infestans</i>	193/219 (88%)
104942.1	905	1	EEY63620.1	ATP-binding Cassette (ABC) Superfamily	<i>P. infestans</i>	197/228 (86%)
100399.1	641	2	EEY70245.1	Calnexin, putative	<i>P. infestans</i>	161/199 (81%)
102905.1	927	1	EEY54423.1	Carbohydrate esterase, putative	<i>P. infestans</i>	143/162 (88%)
104112.1	962	1	EEY55026.1	Cell 5A endo-1,4-beta-glucanase	<i>P. infestans</i>	78/87 (90%)
100508.1	801	5	EEY56778.1	Cellulose binding elicitor lectin (CBEL), putative	<i>P. infestans</i>	225/245 (92%)
101242.1	825	5	EEY67714.1	Chitinase, putative	<i>P. infestans</i>	156/198 (79%)
102985.1	904	1	EEY53054.1	CREG-like protein	<i>P. infestans</i>	182/194 (94%)
105313.1	912	1	EEY54046.1	Crinkler (CRN) family protein	<i>P. infestans</i>	144/249 (58%)
102069.1	616	2	EEY64187.1	Cullin family protein, putative	<i>P. infestans</i>	172/174 (99%)
102724.1	922	1	EEY54007.1	Cytochrome P450, putative	<i>P. infestans</i>	115/124 (93%)
101356.1	567	2	EEY56763.1	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	<i>P. infestans</i>	157/167 (94%)
105856.1	564	1	EEY57167.1	Drug/Metabolite Transporter (DMT) Superfamily	<i>P. infestans</i>	161/163 (99%)
100126.1	659	4	EEY60228.1	Elicitin-like protein	<i>P. infestans</i>	114/118 (97%)
100174.1	704	2	EEY65849.1	Endomembrane protein 70-like	<i>P. infestans</i>	90/192 (99%)

				protein, putative		
104003.1	884	1	EEY69550.1	Er lumen protein retaining receptor	<i>P. infestans</i>	146/147 (99%)
101219.1	947	7	EEY55350.1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit f, putative	<i>P. infestans</i>	277/279 (99%)
101919.1	577	2	EEY59449.1	Fatty-acid-coa ligase, putative	<i>P. infestans</i>	168/173 (97%)
104936.1	939	1	EEY66444.1	Fumarylacetoacetate (faa) hydrolase, putative	<i>P. infestans</i>	156/159 (98%)
104495.1	829	1	EEY53347.1	Glucosidase 2 subunit beta, putative	<i>P. infestans</i>	111/123 (90%)
104953.1	855	1	EEY62676.1	Glutamyl-trna synthetase, putative	<i>P. infestans</i>	160/165 (97%)
102807.1	855	1	EEY63475.1	Glutamyl-trna(gln) amidotransferase subunit a, putative	<i>P. infestans</i>	227/265 (86%)
101566.1	1426	11	EEY67182.1	Glycosyl transferase, putative	<i>P. infestans</i>	375/460 (82%)
100262.1	1404	5	EEY69426.1	Gpi-anchored serine rich tenascin-like glycoprotein	<i>P. infestans</i>	221/227 (97%)
105356.1	842	1	EEY53084.1	Hect e3 ubiquitin ligase, putative	<i>P. infestans</i>	100/108 (93%)
101149.1	766	3	EEY58650.1	Lysocardiolipin acyltransferase, putative	<i>P. infestans</i>	124/138 (90%)
104987.1	842	1	EEY68703.1	Nadh-cytochrome b5 reductase, putative	<i>P. infestans</i>	229/244 (94%)
105475.1	935	1	EEY62006.1	Nicotinate phosphoribosyltransferase, putative	<i>P. infestans</i>	137/161 (85%)
101856.1	632	3	EEY57056.1	Npp1-like protein	<i>P. infestans</i>	151/228 (66%)
100851.1	1156	5	EEY58436.1	Phosphatidylinositol synthase (pis)	<i>P. infestans</i>	175/181 (97%)
100125.1	706	3	EEY67584.1	Phosphoglucomutase	<i>P. infestans</i>	156-236 (97%)
100351.1	702	3	EEY63036.1	Phospholipase a2, putative	<i>P. infestans</i>	201/207 (97%)
102439.1	1719	20	EEY58277.1	Phospholipase d, pi-pld-like-1	<i>P. infestans</i>	522/528 (99%)
101131.1	1199	5	EEY61004.1	Polyadenylate-binding protein 1-b	<i>P. infestans</i>	294/298 (99%)
105905.1	852	1	EEY69302.1	Protein kinase, putative	<i>P. infestans</i>	112/112 (100%)
104779.1	850	1	EEY57902.1	Protein phosphatase 2c, putative	<i>P. infestans</i>	170/178 (96%)
102553.1	1279	5	EEY59986.1	Protein transporter sec24	<i>P. infestans</i>	340/342 (99%)
102007.1	849	3	EEY69327.1	Ribose-phosphate pyrophosphokinase, putative	<i>P. infestans</i>	271-285 (99%)
102016.1	669	3	EEY55635.1	Secreted rxlr effector peptide protein, putative	<i>P. infestans</i>	191/200 (96%)
104536.1	893	1	EEY53479.1	Serine protease family s33, putative	<i>P. infestans</i>	220/269 (82%)
105489.1	977	1	EEY67173.1	Small cellulose binding protein,	<i>P. infestans</i>	97/114 (85%)

				putative		
101307.1	607	2	EEY70088.1	Thioredoxin-like protein	<i>P. infestans</i>	178/187 (95%)
100400.1	624	2	EEY57212.1	Transmembrane protein, putative	<i>P. infestans</i>	199/206 (97%)
101302.1	742	2	EEY60193.1	Vacuolar protein sorting-associated protein 35, putative	<i>P. infestans</i>	203/207 (98%)
105709.1	958	1	ACR82294.1	Cyclophilin b	<i>P. nicotianae</i>	197/208 (95%)
105668.1	985	1	ABH11757.1	Elicitin-like protein 6 precursor	<i>P. nicotianae</i>	88/88 (100%)
104338.1	743	1	AAV57576.1	Mitochondrial manganese superoxide dismutase	<i>P. nicotianae</i>	153/160 (96%)
102408.1	680	2	ABA40831.1	Mitogen-activated protein kinase 1a	<i>P. parasitica</i>	224/224 (100%)
103466.1	894	1	ABB77565.1	Phospholipase A2	<i>P. parasitica</i>	67/77 (87%)
100547.1	462	2	AAB34031.1	Elicitin 310	<i>P. parasitica</i>	89/89 (100%)
105309.1	892	1	EGZ11034.1	Oxidoreductase	<i>P. sojae</i>	153/184 (83%)
100907.1	677	3	ABB55996.1	Putative elicitin protein SOJ3A	<i>P. sojae</i>	100/111 (90%)

De particular importância foi a descoberta de um gene novo que pode ser de grande interesse para o entendimento da interação citros-*P. parasitica*, o qual codifica para uma proteína do tipo Cyclophilin B. Esta proteína é um membro da família de ciclofilinas (CyPs) com extensões específicas nas regiões amino e carboxi-terminais. CyPs são proteínas onipresentes capazes de catalizar a isomerização de ligações peptidil-propil. Tem sido especulado que proteínas CyPs possuem funções no dobramento de certas proteínas, nos processos de transdução de sinal e, mais recentemente, na infecção, pela facilitação da penetração e colonização da célula hospedeira e pela ativação de proteínas efetoras do patógeno dentro do citoplasma da célula do hospedeiro.

A análise da sequência do Unigene 105709.1 revelou uma ORF completa de um gene, denominado de *PpCyPB* (*P. parasitica* CyP B), com 627 pb de comprimento, sem introns e é traduzida em uma proteína precursora com 209 resíduos de aminoácidos (Figura 5). Os 23 primeiros aminoácidos desta proteína possuem características de um peptídeo sinal, incluindo um sítio de clivagem posicionado entre os aminoácidos 22-23, baseado no Programa Signal P (PETERSEN *et al.*, 2011). Este gene representa um importante candidato efetor para a validação da expressão quantitativa usando os RNAs extraídos das fases do desenvolvimento assexual de *P. parasitica*.

**FIGURA 5. Sequências de nucleotídeo e de aminoácidos deduzida de PpCyPB (*Phytophthora parasitica* cyclophilin B), indicando os códons de iniciação (azul) e de parada (róseo).**

```

1 atggccaagtggacggttctcgcttctggcgatatgcctgacggcg
M A K W T F S L L A I C L T A
46 ttggtgctggtagttcaggccggcaagggccccaagatcaccaat
L V L V V Q A G K G P K I T N
91 caggtctacttctgacgtgagcatcgacggcgagcccgctggccgc
Q V Y F D V S I D G E P A G R
136 atcgtcatgggtctctacggcaagacagtgcccaagactgctggag
I V M G L Y G K T V P K T A E
181 aacttccgcgcgctgtgacggggcgagaagggcgttggcaaaagc
N F R A L C T G E K G V G K S
226 ggcaagccgctgcactacaaggacagcattttccaccgcatcatc
G K P L H Y K D S I F H R I I
271 ccaaacttcatggtgcagggcggagacttcactaacttcaacgga
P N F M V Q G G D F T N F N G
316 atgggcggcgagagtatctacggcgaaaagtttccggacgagaac
M G G E S I Y G E K F P D E N
361 ttttaagctgaagcacgcggcaaggggtacgctcagcatggcctaac
F K L K H A G K G T L S M A N
406 tcgggcgccaacacgaacggcagccagttctttatgtgactgtc
S G A N T N G S Q F F I C T V
451 aagacctcgtggctggacggcccgccacgtcgtcttccggccgctc
K T S W L D G R H V V F G R V
496 atcaagggcatggatggttctcgacgccattggaggtgggtccgctc
I K G M D V L D A I G G G P L
541 gccccagcgggtacccccgagcaaaaaggtcctcctcattgaaagc
A P A V P P S K K V L L I E S
586 ggtgagcttgggctgctggacaactttgtggaggaaaaataa 627
G E L G L L D N F V E E K *

```

A análise de homologia via BLASTp revelou que PpPyPB possui similaridade de sequência de aminoácidos com proteínas Cyclophilin B de *P. nicotianae* (93%) e com a hypothetical protein PHYSODRAFT\_288960 de *P. sojae* (92%) (Figura 6).

**FIGURA 6. A comparação da sequência de aminoácidos deduzida do alinhamento múltiplo de PpCYPB com outras proteínas homólogas à ciclofilina B foi realizada utilizando o programa ClustalW.**

```

PnCYPB      MAKWTFSLLAICLTALVLVVQAGKGPKITNQVYFDVSDIDGEPAGRIVMGLYGKTVPKTAE
PsHYPP      MAKWTFSLALCLTALVLAVQAGKGPKITNQVYFDVSDIDGAPAGRIVMGLYGKTVPKTVE
PpCYPB      MAKWTFSLLAICLTALVLVVQAGKGPKITNQVYFDVSDIDGEPAGRIVMGLYGKTVPKTAE
*****:*****.*****

PnCYPB      NFRALCTGEKGVGKSGKPLHYKDSIFHRIIPNFMVQGGDFTNFNGMGGESIYGEKFPDEN
PsHYPP      NFRALCTGEKGEKSGKPLHYKDSIFHRIIPNFMVQGGDFTHFNGMGGESIYGEKFPDEN
PpCYPB      NFRALCTGEKGVGKSGKPLHYKDSIFHRIIPNFMVQGGDFTNFNGMGGESIYGEKFPDEN
***** *****:*****

PnCYPB      FKLKHAGKGTLSMANSANTNGSQFFICTVKTSWLDGRHVVFGRVIKGMVDLDAIEAVGS
PsHYPP      FKLKHAGKGTLSMANSANTNGSQFFICTVKTSWLDGRHVVFGRVINGMDVLDLDAIEAVGS
PpCYPB      FKLKHAGKGTLSMANSANTNGSQFFICTVKTSWLDGRHVVFGRVIKGMVDLDAIIGGGPL
*****:*****

PnCYPB      PSGTF-SKKVVVTESGELAADNFVEEE-
PsHYPP      PSGTF-SKKVVITDSGELAADDFVQEE-
PpCYPB      APAVPPSKKVLLESSELGLLDNFVEEK

```

#### 4.2. Primers desenhados para genes efetores citosólicos de *P. parasitica*

Visando o estudo de expressão gênica, seis primers específicos para genes efetores de *P. parasitica* de citros foram desenhados utilizando o programa *PePrimer*, para PCR quantitativo (qPCR) em tempo real. Os genes para os quais novos primers foram desenhados são *RxLR* (RxLR), *NPP1* (NPP1), *Ras related protein Piypt1* (PiYPT1), *Serine Protease Family S33* (S33), *Transmembranase Protein* (TP), *Ciclophylin B* (CYP) (Tabela 2). Estes primers serão usados para amplificar fitas molde de cDNA (DNA complementar a fita de RNA mensageiro), que serão utilizados em futuras reações de qPCR.

**TABELA 2. Sequência dos primers desenhados para genes efetores de *P. parasitica*, visando análises da expressão por PCR quantitativo em tempo real. CUITÉ PB, 2013.**

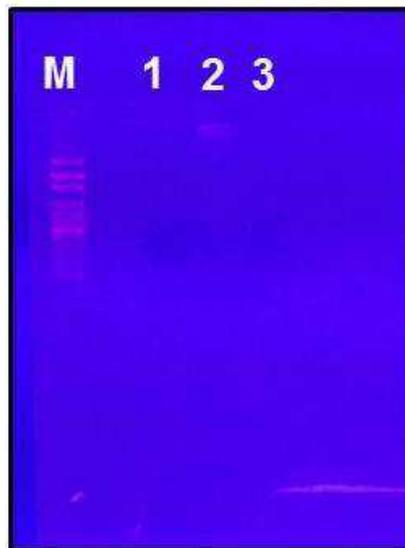
Primer	Sequência	Tamanho do fragmento	T <sub>m</sub> * (°C)	% G/C
RXLR	Fow 5' CCAGATCCTCAACGACTACG 3'	20 b	60,09	55
	Rev 5' CTACCATCGCCACAGAATCC 3'	20 b	60,73	55
NPP1	Fow 5' CGTACCCTGCTGTGAATGCT 3'	20 b	57,6	55
	Rev 5' GTAAACTTGAGAGCCAAGAGC 3'	24b	57,6	50
PiYPT1	Fow 5' CACGATCACTAGCAGTTACTACC3'	23 b	60,75	47,8
	Rev 5' CAGCTTGTTACATTCTCACAG 3'	22 b	60,27	45,4
S33	Fow 5' CGTCACTACTTTCCTCGTGTC 3'	21 b	60,73	52,3
	Rev 5' TTATTGAAATTACGCAGATGCTCC 3'	24 b	60,15	37,5
TP	Fow 5' ACAAGCTCGTGATATGGGAC 3'	20 b	60,02	50
	Rev 5' GATTGACTGGCCATTGTCCA 3'	20 b	60,81	50
CYP	Fow 5' CATCCCAAACCTTCATGGTGCAG 3'	22 b	54,6	20
	Rev 5' TCAGCTTAAAGTTCTCGTCCG 3'	21 b	54,6	47,6

\*T<sub>m</sub>, temperatura de melting.

#### 4.3 Qualidade do DNA de *Phytophthora parasitica*

O protocolo testado para isolamento de DNA usando o Mix de CTAB/Kit AxyGen foi capaz de purificar pouco DNA genômico de *P. parasitica*. Visualmente em gel de agarose, observou-se pouca quantidade do DNA isolado (Figura 7). É possível que o manuseio ou a maceração do tecido micelial na ausência de nitrogênio líquido tenha sido ineficiente para a lise celular.

**FIGURA 7. Eletroforese em gel de agarose 0,8% de DNA isolado do desenvolvimento assexual *in vitro* de *Phytophthora parasitica*. M. Marcador de peso molecular (Axygen). 1, 2, 3. DNA.**



Posteriormente, a quantidade de DNA extraído foi analisada usando o Nanodrop (Tabela 3).

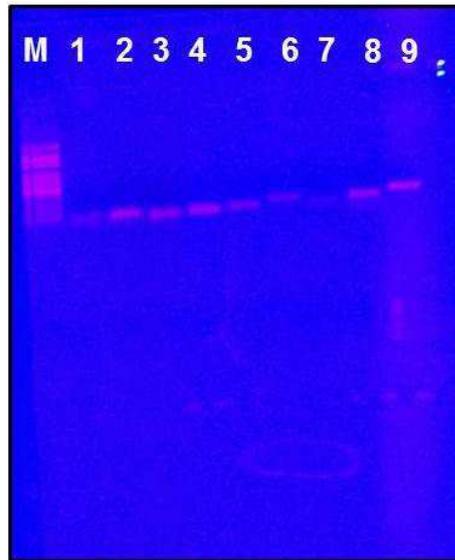
**TABELA 3. Quantificação do DNA genômico de *P. parasitica* por ng/ $\mu$ L em cada amostra extraída utilizando o espectrofotômetro Nanodrop.**

Amostra de DNA	A260/280	ng/ $\mu$ L
1	12,04	0,9
2	1,87	15,5
3	15,04	0,3

#### 4.4 Validação dos primers por reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amostra de DNA genômico foi utilizada como molde em reações em cadeia da polimerase para testar os primers específicos desenhados para amplificar genes efetores de *P. parasitica*. Como resultado, todos os primers novos e os controles positivos produziram fragmentos de tamanho esperado, conforme demonstrado na Figura 8.

**FIGURA 8. Eletroforese em gel de agarose 0.8% de produtos de PCR usando DNA de *P. parasitica* e diferentes pares de primers específicos para amplificar genes de interesse.**

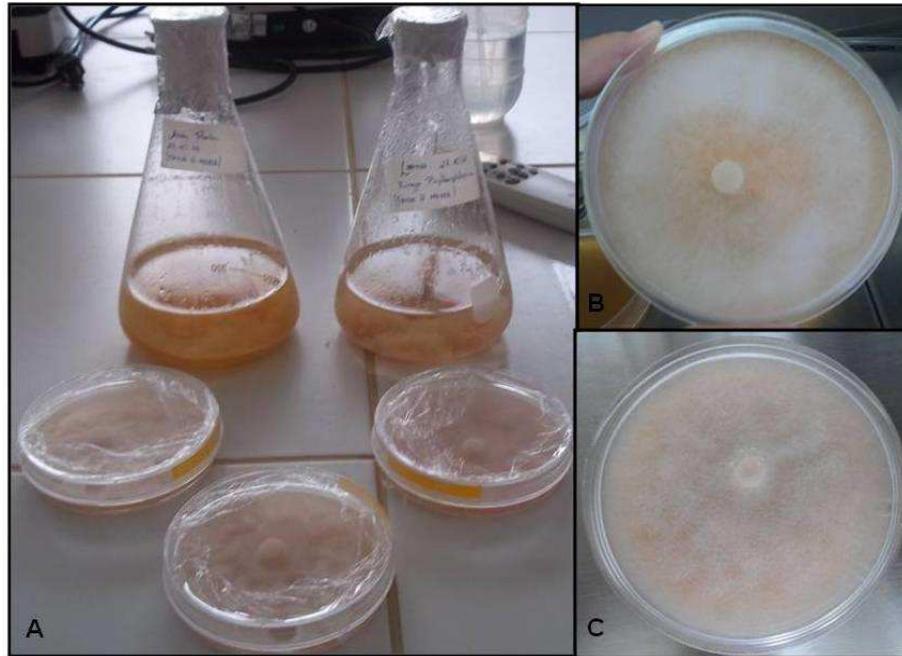


M: Marcador de peso molecular 100 pb Ladder (Axygen). 1 e 3, controles positivos, primers para genes CBEL e CAR (COSTA, 2007); 2, NPP1; 4, CRN (MEDEIROS, 2010); 5, CYP; 6, SP; 7, RXLX, 8, TP e 9, YPT.

#### 4.5 Validação das condições de cultivo para *Phytophthora parasitica*

O cultivo do isolado IAC095 de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* de citros nas condições testadas de acordo com Costa (2007) foi bem sucedido, tanto em placas de Petri como em Erlenmeyers (Figura 9A). As condições mais favoráveis de cultivo do oomiceto *P. parasitica*, visando à separação de fases do seu ciclo de vida, foram em meios de cultura cenoura líquido distribuído em Erlenmeyers de 500 mL, contendo 250 mL de cultura, onde foi colocado três disco de meio de cultura contendo o patógeno. A utilização do meio líquido proporcionou um abundante crescimento do patógeno. O cultivo em meio de cultura cenoura-água em placas de Petri levou a um crescimento micelial ótimo, no entanto, para a separação das fases o crescimento em meio líquido é mais adequado.

**FIGURA 9. Validação das condições de cultivo para *Phytophthora parasitica* no Laboratório de Biologia Celular e molecular do CES/UFMG.**



Cultivo do isolado IAC095 de *P. parasitica* em meio cenoura ágar em placas de Petri e meio cenoura líquido em Erlenmeyer (A). Placa de Petri com meio de cenoura-ágar contendo crescimento micelial de *P. parasitica* crescido sob luz constante a 25 °C com 8 dias de cultivo (B). Placa de Petri com meio de cenoura ágar contendo micélio de *P. parasitica* crescido no escuro a 25 °C com 8 dias de cultivo (C).  
 Fonte: DADOS DA PESQUISA.

Estes resultados corroboram com Costa (2007), em que o uso de Erlenmeyers propiciou um crescimento de um material puro e mais abundante. Além disso, em placas de Petri, o índice de contaminação foi alto e apresentou um baixo rendimento do material coletado, sendo contornado com o cultivo em Erlenmeyers. Nesse estudo, não houve contaminação em placas de Petri. As placas de Petri foram mantidas tanto no escuro como na luz constante, ambas a 25 °C. Não foi possível observar diferença visível quanto ao crescimento micelial do patógeno, porém a *P. parasitica* cresceu mais rápido sob luz constante (Figura 9B e C).

#### **4.6. Ativação da patogenicidade de *P. parasitica* in planta**

Com o intuito de gerar as fases de *P. parasitica* em grande quantidade para a extração de RNA total e análise da expressão de genes efetores, o patógeno teve sua capacidade de causar doença ativada pelo contato com parte de plantas de citros. Espera-se com este

procedimento recuperar o patógeno a expressão induzida com genes efetores pela planta. O procedimento baseado no método de isca, descrito por Grimm e Alexander (1973) foi realizado com êxito. O patógeno desenvolveu em Beckers que continham apenas pedaços de folhas de limoeiro e naqueles com pedaços de folhas de laranjeira. As folhas de limoeiro ou laranjeira necrosaram e o patógeno foi visualizado tentando penetrar ou penetrando as células feridas das folhas (Figura 10A e B). Esta observação está de acordo com a afirmação proposta por Siviero (2002) em que são necessários pequenos ferimentos na área de inoculação para facilitar a penetração do patógeno, ocorrendo a necrose das folhas. Whiteside (1971) provou que o patógeno necessita de ferimento para penetrar na planta e provocar infecção.

*P. parasitica* foi recuperado com sucesso apenas a partir de pedaços de folhas laranjeira quando incubados no escuro (Figura 10C), enquanto que quando cultivado sob luz constante observou-se apenas o crescimento de microrganismos contaminantes (Figura 10D). Similarmente, placas de Petri contendo meio cenoura ágar seletivo com pedaço de folha de limoeiro incubada sob luz constante a 25 °C apresentaram apenas o crescimento de microrganismos contaminantes (Figura 10F), enquanto que quando incubado no escuro apresentou o crescimento do patógeno, mas também de contaminantes (Figura 10E).

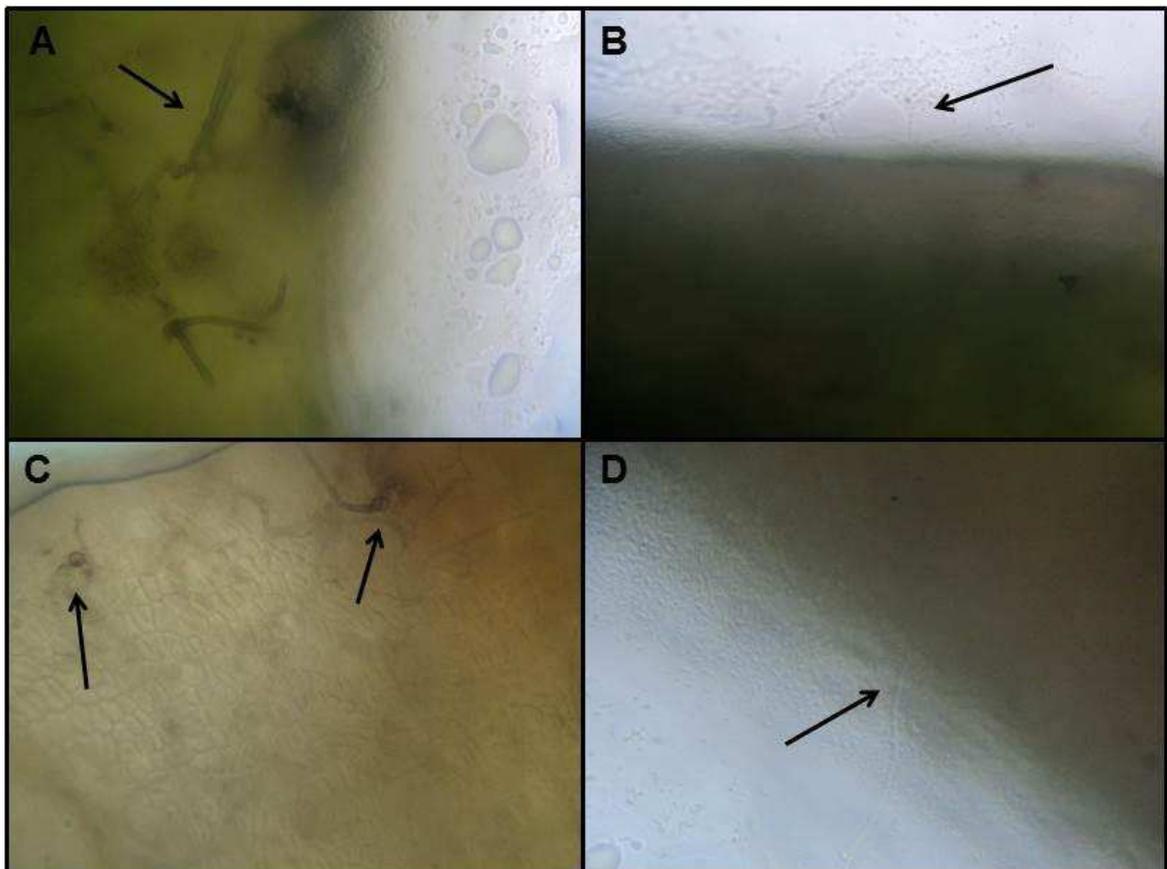
**FIGURA 10. Recuperação de inoculo de *Phytophthora parasitica* após ativação da patogenicidade em folhas de citros.**



Pedaços de folhas de laranja necrosadas após a ação do patógeno com 20 dias de inoculo exposto a luz constante a 25 °C (A). Pedacos de folhas de limoeiro necrosadas após a ação do patógeno com 20 dias de inoculo exposto a luz constante a 25 °C (B). Placa de Petri contendo crescimento micelial de *P parasitica* a partir do pedaço de folha de laranja em meio cenoura-ágar seletivo incubados no escuro à 25 °C com 8 dias de cultivo (C). Placa de Petri contendo contaminantes a partir do pedaço de folhas de laranja em meio cenoura-ágar seletivo incubados sob luz constante à 25 °C com 8 dias de cultivo (D). Placa de Petri contendo crescimento micelial e contaminantes (indicado pela seta) a partir do pedaço de folhas de limoeiro em meio cenoura-ágar seletivo incubados no escuro à 25 °C com 8 dias de cultivo (E). Placa de Petri contendo contaminantes a partir do pedaço de folhas de limoeiro em meio cenoura-ágar seletivo incubados sob luz constante à 25 °C com 8 dias de cultivo (F).

Observou-se a penetração de *P. parasitica* (Figura 11D) em pedaços de folhas de limoeiro (Figura 11A) e em pedaços de folhas de laranjeira (Figura 11C). A penetração das paredes celulares das folhas se deu a partir da tentativa de penetração da hifa (Figura 11B) e ocorreu em locais aleatórios na superfície da célula da folha. A epiderme foi então colonizada e o micélio foi observado em locais diferenciados. O processo de penetração foi completado dentro de 24 h. Esta observação está similar com a afirmação proposta por Kebdani e outros (2010) em que são necessários no mínimo, 10 h para completar o processo de penetração de *P. parasitica* no hospedeiro.

**FIGURA 11. Micrografias da penetração de *P. parasitica* em pedaços de folhas de limoeiro e em pedaços de folhas de laranjeira, visualizadas sob microscópio luz, resolução 40x.**



A. Interface entre folha e água. Seta indica a hifa entre as células vegetais. B. Tentativa da penetração da hifa, que está na água, tentando colonizar a parede celular vegetal, indicado pela seta. C. Hifa em locais aleatórios entre as células da folha de limão. As setas indicam necrose. D. Hifa, indicado pela seta, aderindo e penetrando a parede celular vegetal.

Fonte: DADOS DA PESQUISA.

Por outro lado, *P. parasitica* conseguiu desenvolver em laranjas “azedas” e os sintomas começaram a surgir com, aproximadamente, 12 dias do inoculo (Figura 12). O reisolamento do oomiceto em segmento de casca do fruto em meio cenoura ágar seletivo ou apenas meio cenoura ágar não foi possível.

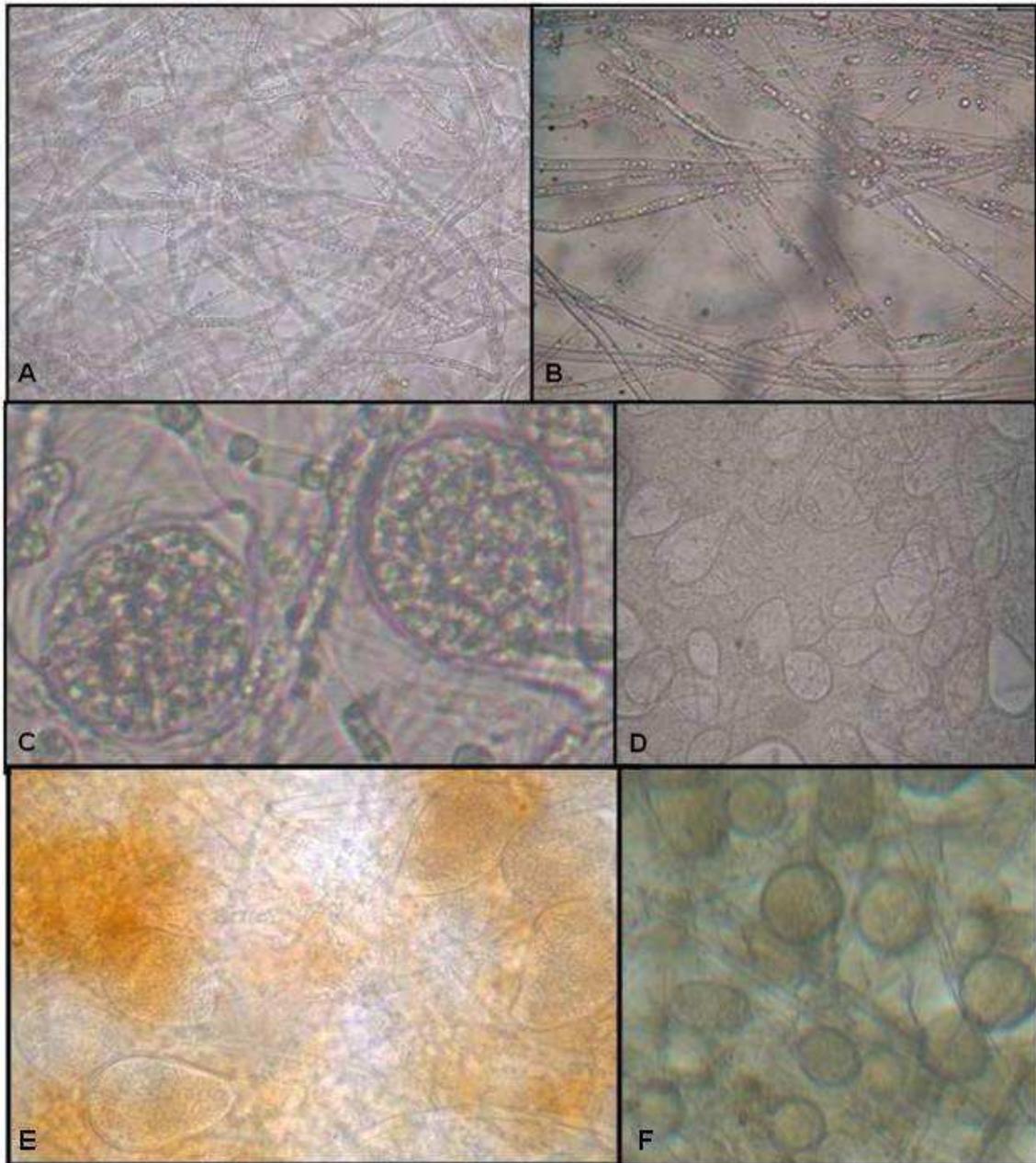
**FIGURA 12. Laranjas apresentando os sintomas de infecção por *P. parasitica*, 12 dias após a inoculação do patógeno.**



#### **4.7 Estudo das diferentes fases do ciclo de vida de *P. parasitica* in vitro**

O crescimento micelial do patógeno foi obtido em meio líquido e cenoura-ágar (Figura 13A e B) crescido em temperatura a 25 °C, permanecendo por aproximadamente 11 dias, tempo máximo para o crescimento de micélio sem a produção de esporângios (Figura 13C). Essa fase foi a mais abundante tanto em meio cenoura ágar como no meio cenoura líquido. Os resultados encontrados para essa fase do ciclo de vida da *P. parasitica* tanto em meio cenoura-ágar como em meio cenoura líquido foram semelhantes aos descritos por Costa (2007) e Medeiros (2010).

**FIGURA 13. Micrografias de hifas, esporângios e clamidósporos de *Phytophthora parasitica* visualizadas sob microscópio luz, resolução 40x.**



**A. Presença de hifa em meio de cultura cenoura líquida com 12 dias de cultivo crescido sob luz constante a 25 °C. B. Presença de hifa em meio de cultura cenoura ágar com 8 dias de cultivo crescido sob luz constante a 25 °C. C. Esporângios encontrados em Erlenmeyer contendo meio cenoura líquido com 46 dias de cultivo. D. Esporângios visualizados em Erlenmeyer com água destilada estéril cultivadas sob luz constante a 25 °C com 6 dias de cultivo. E. Esporângios visualizados da obtenção em placa de Petri com meio cenoura líquido incubadas sob luz constante a 25 °C com 15 dias de cultivo. F. Clamidósporos obtidos a partir do cultivo em Erlenmeyer contendo meio cenoura líquido sob luz constante a 25 °C com 46 dias de cultivo.**

**Fonte: DADOS DA PESQUISA.**

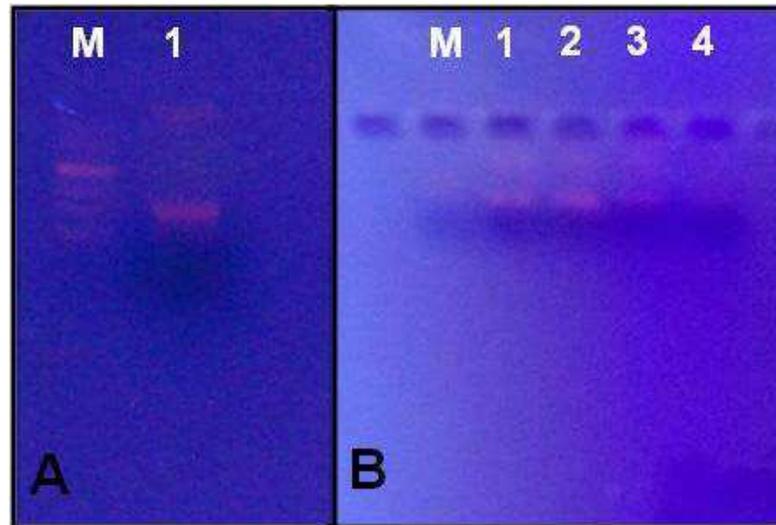
A fase de esporângio foi obtida em meio cenoura líquido aos 46 dias de cultivo estacionário, tendo sido observada ao microscópio de luz pouca quantidade de esporângio sem haver a liberação de zoósporos (Figura 13C). Segundo Costa (2007), a produção de esporângios ocorreu após 25 dias de cultivo *in vitro* com a obtenção do maior número possível de esporângios. Então, a produção de esporângios deve ser monitorada antes. O experimento testado de acordo com Mitchell e Kannwischer-Mitchell (1993) foi um sucesso, o aparecimento de esporângio se deu com apenas cinco dias de cultivo, monitorado e observado ao microscópio de luz grande quantidade de esporângios, porém vazios (Figura 13D).

Segundo Mitchell e Kannwischer-Mitchell (1993) a produção de esporângios é realizada mediante estresse nutricional, onde o patógeno é transferido do meio de cultura para água destilada estéril, estimulando, assim, a formação e estruturas de reprodução, principalmente, esporângios. O protocolo descrito por Jeffers (2006) foi alcançado. O aparecimento de esporângios cheios se deu com aproximadamente 09 dias de cultivo sob luz constante a 25°C, monitorado e observado ao microscópio de luz (Figura 13E). Em seu estudo Jeffers (2006) aponta que o aparecimento de esporângios se dá com apenas 24 horas quando os discos de micélio estão expostos à luz constante, porém no laboratório testado o aparecimento de esporângios foram a partir de 9 dias do cultivo. A fase de clamidósporo (Figura 13F) foi observada apenas em meio cenoura líquido, aos 45 dias de cultivo, bastante abundante. A obtenção dessa fase tem sido descrita sob condições desfavoráveis ao crescimento micelial, como baixa temperatura, pouca disponibilidade de nutrientes, falta de oxigênio (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

#### **4.8. Extração de RNA de fases de *P. parasitica***

Um ensaio preliminar foi realizado visando testar um protocolo adaptado dos métodos Trizol (Invitrogen) e fenol (0,1M de NaCl, 10mM de Tris-HCl pH:7,5, 1mM de EDTA, 1% de SDS, 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol e 6,3 mL d H<sub>2</sub>O DEPC) para isolamento de RNA de hifas de *Phytophthora parasitica*. Como resultado obteve-se RNA visualizado no gel de agarose 0,8% (Figura 14). Aparentemente, observou-se pouca quantidade de RNA, o que pode ser devido à maceração do tecido micelial na ausência de nitrogênio líquido, podendo ter acontecido rápida degradação do RNA e/ou lise celular ineficiente.

**FIGURA 14. Eletroforese em gel de agarose de RNA total isolado de micélio de *Phytophthora parasitica* (A e B). M. Marcador de peso molecular (Axygen). 1, 2, 3, 4. Repetições de extrações de RNA.**



O RNA total extraído da fase de hifa utilizando o protocolo RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) foi quantificado usando o Nanodrop (Tabela 4) e verificou-se quantidade suficiente para, posteriormente, realizar o cDNA.

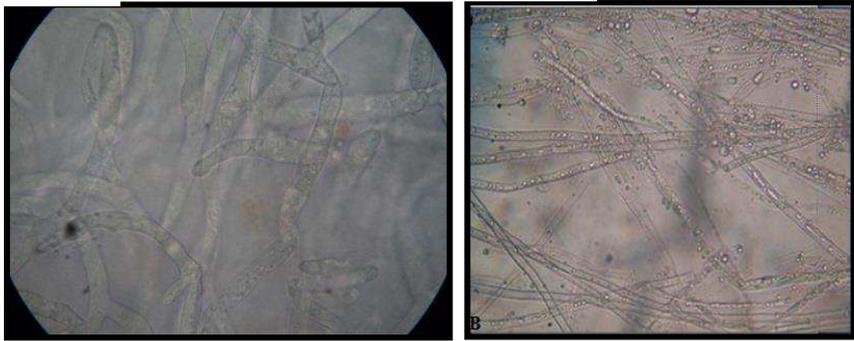
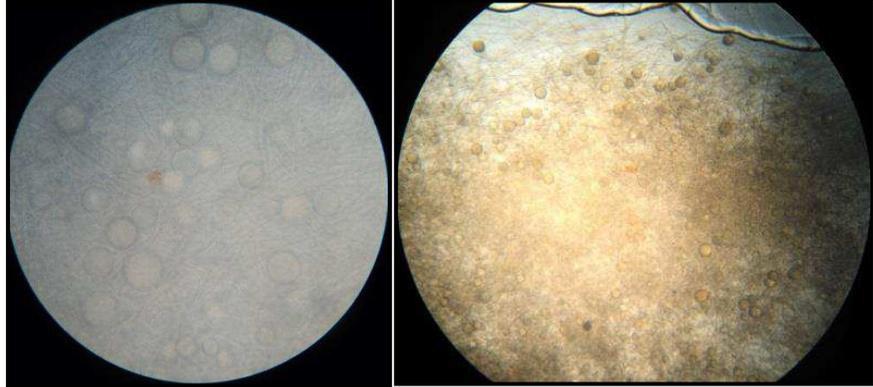
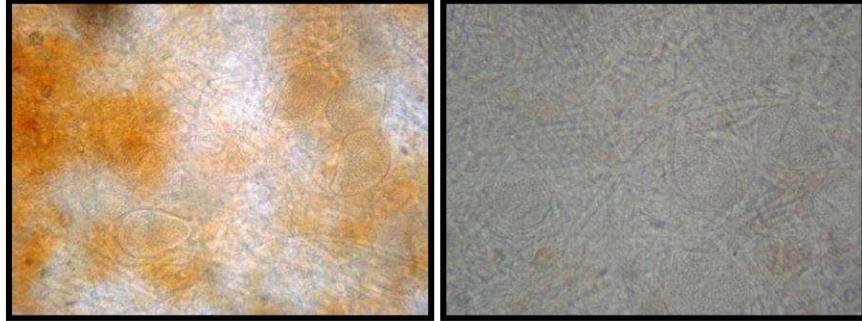
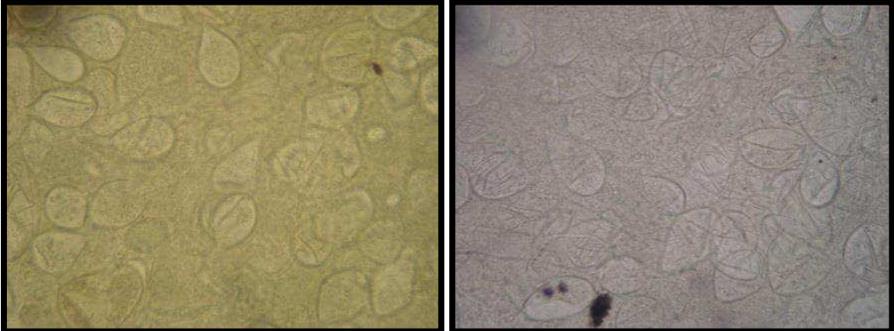
**TABELA 4. Quantificação do RNA de *P. parasitica* por ng/ $\mu$ L em cada amostra extraída utilizando o espectrofotômetro Nanodrop. CUITÉ, 2013.**

Fase Extraída	Amostra	A260/280	ng/ $\mu$ L
Hifa	1.1	2,17	416,7
	1.2	2,19	875,2
Hifa	2.1	2,15	381,6
	2.2	2,18	667,5
Hifa	3.1	2,15	389,3
	3.2	2,16	298,2

O protocolo RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) mostrou-se mais rápido e eficiente quando comparado com o protocolo adaptado dos métodos Trizol (Invitrogen) e fenol,

posteriormente, as outras fases do desenvolvimento assexual do ciclo de vida de *P. parasitica* (Tabela 5) serão extraídas utilizando o protocolo do kit da Qiagen.

**TABELA 5. Representação das fases obtidas de *Phytophthora parasitica*. Micrografias visualizadas sob o microscópio de luz.**

FASE OBTIDA	MICROGRAFIAS	RNA ISOLADO? N° DE REPETIÇÕES
Hifa		3 Repetições RNA Isolado
Clamidósporo		3 Repetições RNA não Isolado
Hifa com esporângio cheio		3 Repetições RNA não Isolado
Hifa com esporângio vazio		3 Repetições RNA não Isolado

## 5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados, foi possível concluir que:

- É possível identificar genes efetores do tipo glicoproteínas, a partir do genoma funcional de *Phytophthora parasitica*, usando o programa Netglycate.
- A condição adequada para o cultivo de *P. parasitica* de citros *in vitro* varia para produção das diferentes fases do seu ciclo de vida.
- A produção abundante de hifas e clamidósporos é obtida em meio líquido cenoura-água sob luz constante a 25 °C, por 12 e 45 dias, respectivamente.
- A condição adequada para induzir a produção de esporângios de *P. parasitica in vitro* é a imersão de discos de micélio em água destilada estéril, por 5 dias.
- Para a ativação da patogenicidade e estudos de interação citros-*Phytophthora*, *P. parasitica* pode ser recuperado de folhas de laranjeiras com sucesso.
- É possível isolar RNA total de micélio com qualidade usando um protocolo adaptado de protocolos com fenol e trizol.
- Os efetores do tipo glicoproteínas identificados são fortes candidatos para estudos de expressão gênica e para o entendimento e controle da gomose em citros.
- Os seis primers sintetizados para amplificar genes efetores candidatos para estudos de expressão gênica produzem fragmentos de tamanho esperado a partir do DNA genômico de *P. parasitica*.

### 5.1. Considerações Finais

Como perspectivas futuras de continuidade desta pesquisa, pretende-se concluir as extrações de RNA total das demais fases obtidas do ciclo assexuado de *P. parasitica* e realizar análises da expressão dos genes efetores por PCR semiquantitativo ou quantitativo em tempo real.

A importância deste trabalho para o Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas e para o profissional deste curso é a união dos conhecimentos teóricos com a prática rotineira de técnicas básicas de biologia molecular e microbiologia, incrementadas por atividades da pesquisa científica, contribuindo para a capacitação do profissional e o contato direto entre professor/aluno. Ainda, o estudo da interação planta-patógeno ao nível de genes é uma área de

pesquisa de ponta e importante para a agricultura brasileira, pois pode levar ao controle das mais relevantes pragas de culturas de grande interesse econômico, como é o caso dos citros.

## REFERÊNCIAS

- ABRAMOVITCH, R. B. *et al.* Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, p. 601- 611, 2006.
- AGRAWAL, G.K.; JWA, N.S.; LEBRUN, M.H. JOB, D.; RAKWAL, R. Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. **Proteomics**, 10(4):799-827, 2010.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**, v.5, p. 922. London: Elsier, 2005.
- ALLEN, R. L. *et al.* Natural variation reveals key amino acids in a downy mildew effector that alters recognition specificity by an *Arabidopsis* resistance gene. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, p. 511–523, 2008.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucl. Acids Res.**, 25, 3389-3402, 1997.
- AMIGO-BENAVENT, M., VILLAMIEL, M., DEL CASTILLO, M. D. Glicoproteínas: propiedades, funciones y aplicaciones. **Alimentacion, Nutricion y Salud**, v. 14, p. 1-11, 2007.
- ARMSTRONG, M. R. *et al.* An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 7766–7771, 2005.
- BELTRAME, André Boldrin. **Interação *Phytophthora nicotianae* – porta-enxerto de citros (tangerina Sunki e citrumelo Swingle): efeito no sistema radicular, aspectos biológicos e bioquímicos**. Tese (Doutorado) –ESALQ/USP, p. 137, 2010.
- BENSON, D. A. *et al.* GenBank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. 34–38, 2005.
- BIRCH, P. R. *et al.* Trafficking arms: Oomycete effectors enter host plant cells. **Trends in Microbiology**, v. 14, p. 8 – 11, 2006.
- BLOCK, A. *et al.* Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 396 – 403, 2008.
- BOLLER, T.; HE, S.Y. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. **Science**, v. 324, p. 742-744, 2009.
- BOS, J. I. B. *et al.* The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. **The Plant Journal**, v. 48, p. 165–176, 2006.

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

COSTANZO, S. et al. Gene duplication event in family 12 glucosyl hydrolase from *Phytophthora* spp. **Fungal Genetics and Biology**, v. 43, p. 707–714, 2006.

DANGL, J. L.; MCDOWELL, J. M. Two modes of pathogen recognition by plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 103, n. 23, p. 8575–8576, 2006.

DE WIT, P. J. G. M. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 2726–2731, 2007.

DOU, D. et al. Conserved C-terminal motifs required for avirulence and suppression of cell death by *Phytophthora sojae* effector Avr1b. **The Plant Cell**, v. 20, p. 1118–1133, 2008a.

DOU, D. et al. RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. **The Plant Cell**, v. 20, p. 1930–1947, 2008b.

EMBRAPA. **Sistema de Produção de Citros para o Nordeste** (2003). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/index.htm>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2013.

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

FEICHTENBERGER, E. et al. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUZ, E.D.M.N; MATSUOKA, K.; SANTOS, A. F.; BEZERRA, J.L. (Ed). **Doenças causadas por *phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria Rural, p. 283-342, 2005.

FELLBRICH, G. et al. NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 32, p. 375–390, 2002.

FENG, B.-Z. et al. Functional analysis of *Pcpme6* from oomycete plant pathogen *Phytophthora capsici*. **Microbial Pathogenesis**, v. 49, p. 23–31, 2010.

FERREIRA, RAFAEL MARINI. **Secretoma da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade De Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal–SP, 2009.

FLOR, H. H. Inheritance of pathogenicity im *Melampsora lini*. **Phytopathology**, v.32, p. 653-669, 1942.

GAULIN, E. et al. Cellulose binding domains of a *Phytophthora* cell wall protein are novel pathogen-associated molecular patterns. **The Plant Cell**, v. 18, p. 1766–1777, 2006.

GORNHARDT, B. et al. Cyst germination proteins of the potato pathogen *Phytophthora infestans* share homology with human mucins. **Molecular Plant Microbe Interact**, v. 13, p. 32–42, 2000.

GÖTESSON, A. et al. Characterization and evolutionary analysis of a large polygalacturonase gene family in the oomycete plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Plant–Microbe Interactions** v. 15, 907–921, 2002.

GOUVEIA, M.E. **Métodos moleculares na identificação, caracterização e detecção de *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman e *Phytophthora cinnamomi* Rands associadas com a doença da tinta do castanheiro.** Doutorado em Ciências Agronômicas/Proteção de Plantas, UTAD. Vila Real, 163p., 2004.

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

HAAS, B. J. et al. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. **Nature**, v. 461, p. 393–398, 2009.

HALIM, V. A. et al. PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid. **The Plant Journal**, v. 57, p. 230–242, 2009.

HAM, K.-S. et al. Fungal pathogens secrete an inhibitor protein that distinguishes isoforms of plant pathogenesis-related endo- $\beta$ -1,3-glucanases. **The Plant Journal**, v.11, p. 169–179, 1997.

HANN, D. R. et al. Bacterial virulence effectors and their activities. **Curr Opin Plant Biology**, v. 13, p. 388-393, 2010.

HARDHAM, A. R. The cell biology behind *Phytophthora* pathogenicity. **Plant Pathology**.v. 30, p. 91–98. Australas, 2001.

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

HIGGINS, D. et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22:4673-4680, 1994.

HINES, P. J.; ZAHN, L. M. What’s bugging plants? **Science**, p. 324-341. 2009.

HOGENHOUT, A. S. et al. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, v. 22, p. 115–122, 2009.

HUITEMA, E. et al. Active defense responses associated with nonhost resistance of *Arabidopsis thaliana* to the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. **Mol. Plant Pathol.** v. 4, p. 487–500, 2004.

JEFFERS, S. N. **Identifying Species of *Phytophthora*.** Department of Entomology, Soils, & Plant Sciences. Clemson, SC, 2006.

JIANG, R. H. Y. et al. RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. **Proceedings of the**

**National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 4874–4879, 2008.

JOHANSEN, M. B., KIEMER, L., & BRUNAK S. **Nalysis and prediction of mammalian protein glycation**. *Glycobiology*, 16:844-853, 2006.

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

KANZ, C. et al. The EMBL nucleotide sequence database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. 29–33, 2005.

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

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

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

KELLEY, B. S. et al. A secreted effector protein (SNE1) from *Phytophthora infestans* is a broadly acting suppressor of programmed cell death. **The Plant Journal**, v. 62, p. 357–366, 2010.

KHANG, C. H. et al. Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. **Plant Cell**, v. 22, p. 1388-1403, 2010.

KOECK, M. et al. The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. **Cellular Microbiology**, v. 13, p. 1849-1857, 2011.

LAMOUR, K. H., WIN, J., KAMOUN, S. Oomycete genomics: new insights and future directions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 274, p. 1–8, 2007.

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

LUCAS, J. A. Survival, surfaces and susceptibility—the sensory biology of pathogens. **Plant Pathology**, v. 53, p. 679-691, 2004;

MACHADO, M. A., 2013. Disponível em: <http://www.fapesp.br/4898.html> Acessado em 10 de Abril de 2013.

MARSHALL, O. J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics**. 20(15):2471-2472, 2004.

MARTINS, M. F. T., **Caracterização do gene *gip* de *Phytophthora cinnamomi* Rands associado à doença da Tinta do castanheiro e pesquisa de novos fitofármacos no controlo da doença**. Doutorado em Ciências Agrônômicas, Instituto Politécnico de Bragança. Bragança, 2010.

- MCLEOD, A.; SMART, C. D.; FRY, W. E. Characterization of 1,3-b-glucanase and 1,3;1,4-b-glucanase genes from *Phytophthora infestans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, p. 250–263, 2003.
- MEDEIROS, G.D.A. **Identificação e caracterização molecular de efetores do tipo CRN (*Crinkling and Necrosis-Inducing Protein*) de *Phytophthora nicotianae* de citros**. Monografia, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, PB, 2010.
- MEIJER, H. J. G. et al. Identification of cell wall-associated proteins from *Phytophthora ramorum*. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, v. 19, p. 1348–1358, 2006.
- MITCHELL, D.J.; KANNWISCHER-MITCHELL, M.E. *Phytophthora*. In: SINGLETON, L.L. MIHAIL, J.D. & RUSH, C.M. (Eds.) **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. S t. Paul : American Phytopathological Society, p.31-38, 1993.
- MOSQUERA, G. et al. Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease. **Plant Cell**, v. 21, p. 1273-1290, 2009.
- MUELLER, O. et al.. The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. **Fungal Genetic Biology** v. 45, p. 63-70, 2008.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Acesso em: 29 de Maio de 2012.
- OLIVEIRA, A. **A escolha da variedade de citros é feita em função da expectativa do produtor com o negócio**. 09 de janeiro de 2013. Disponível em: <http://www.cpt.com.br/artigos/variedades-de-citros-clima-e-solo#ixzz2QkU3CNP0> acessado em 02 de Abril, 2013.
- OLIVEIRA, R.P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Genetic linkage maps of ‘Pera’ sweet orange and ‘Cravo’ mandarin with RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.2, p.159-165, 2011.
- OSMAN, H. et al. Fatty acids bind to the fungal elicitor cryptogein and compete with sterols. **FEBS Letters**, v. 489, p. 55–58, 2001.
- PETERSEN, T.N., BRUNAK S., VON HEIJNE,G. & NIELSEN, H. **SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions**. *Nature Methods*, 8:785-786, 2011.
- QUTOB, D.; KAMOUN, S.; GIJZEN, M. Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. **Plant J** 32: 361–373. 2002.
- REDFORD, A. J. et al. The ecology of the phyllosphere: Geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. **Environ Microbiology**, v.12, p. 2885–2893, 2010.

- REHMANY, A. P. et al. Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by *RPP1* resistance genes from two *Arabidopsis* lines. **The Plant Cell**, v. 17, p. 1839–1850, 2005.
- REYS, L. F.; MACEDO, J. N. A.; DAMALIO, J. C. P. Dogma Central da Biologia Molecular e Introdução à Bioinformática. **W Educacional**, Brasília, 2011.
- RODRIGUEZ, R. J. et al. Fungal endophytes: Diversity and functional roles. **New Phytology** v.182, p. 314–330. 2009.
- ROSA, D.; CAMPOS, M. A.; TARGON, M. L.P. N.; SOUZA, A. A. *Phytophthora parasitica* transcriptome, a new concept in the understanding of the citrus gummosis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, 3 (suppl), p. 997-1008, 2007.
- SCHORNACK, S. et al. Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. **PNAS**. v. 107, p. 17421–17426, 2010.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. et al. Mecanismos bioquímicos e defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S. F., LEITE, B., STANGARLIN, J. R., CIA, P. **Interação Planta-patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, cap 6, p. 227-248, 2008.
- SILVA, K. S. et al. Atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 749-754, out./dez. 2008.
- SIVIERO, A. **Métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus Trifoliata* a gomose**. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, p. 114, 2002.
- SOHN, K. H. et al. The downy mildew effector proteins ATR1 and ATR13 promote disease susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, v. 19, p. 4077–4090, 2007.
- STASSEN, J. H. M. et al. How do oomycete effectors interfere with plant life? **Curr Opin Plant Biology**, v. 14, p. 407-414, 2011.
- STERPIOPOULOS, I., DE WIT, P. J. G. M. Fungal Effector Proteins. **Annual Review of Phytopathology**, v. 47, p. 233-263, 2009.
- TATENO, Y. et al. DDBJ in collaboration with mass-sequencing teams on annotation. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. 25–28, 2005.
- TERRY, L. A.; JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, v.32, p. 1-13. Amsterdam, 2004.
- THOMMA, B. P. H. J. et al. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. **Plant Cell**, v. 23, p. 4-15, 2011.

- TIAN, M. et al. AKazallike extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 26 370–26 377, 2004.
- TIAN, M. et al. *Phytophthora infestans* cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease. **Plant Physiology**, v. 143, p. 364–377, 2007.
- TORTO, et al. EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. **Genome Res**, v. 13(7), p. 1675-85, 2003.
- TYLER, Brett M. **Entering and breaking: virulence effector proteins of oomycete plant pathogens**. Blackwell Publishing Ltd, Cellular Microbiology, v. 11, p. 13–20, 2008.
- VAN WEST, P. Advances in research on oomycete root pathogens. *Physiol. Molecular Plant Pathology*, v 62, p. 99–113, 2003.
- VEIT, S. et al. A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, *Arabidopsis*, and tobacco. **Plant Physiology**, v. 127, p. 832–841, 2001.
- WALTERS, D. et al. Induced resistance for plant defence – a sustainable approach to crop protection. **Oxford: Blackwell**, p. 258, 2007.
- WHISSON, S. C. et al. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. **Nature** v. 450, p. 115–118, 2007.
- WHITESIDE, J.O. Some factors affecting the occurrence and development of foot rot on citrus trees. **Review Phytopathology**, v.61, p.1233-8, 1971.
- WIN, J. et al. Effector Biology of Plant-Associated Organisms: Concepts and Perspectives. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 77, 2012.
- WU C.-H. et al. Functional characterization of a gene family encoding polygalacturonase in *Phytophthora parasitica*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, p. 480–489, 2008.
- YORK, W. S., QIN, Q., ROSE, J. K. C. Proteinaceous inhibitors of *endo*- $\beta$ glucanases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1696, p. 223–233, 2004.