**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Análise anatômica e molecular do albedo de frutos de *Citrus sinensis*
(L.) Osbeck ‘Pêra’ na interação com *Guignardia citricarpa***

Joice Bissoloti Brigati

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba
2009**

Joice Bissoloti Brigati
Licenciada em Ciências Biológicas

**Análise anatômica e molecular do albedo de frutos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck
'Pêra' na interação com *Guignardia citricarpa***

Orientadora: Prof^a. Dra. HELAINE CARRER

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Brigati, Joice Bissoloti

Análise anatômica e molecular do albedo de frutos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pêra' na interação com *Guignardia citricarpa* / Joice Bissoloti Brigati. - - Piracicaba, 2009.
108 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Amido 2. Anatomia vegetal 3. Fungos fitopatogênicos 4. Laranja 5. Mancha Preta
6. 6. Morfologia vegetal 7. Resistência genética vegetal I. Título

CDD 634.31
B854a

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

“Tem gente que tem cheiro de colo de Deus. De banho de mar quando a água é quente e o céu é azul. Ao lado delas, a gente sabe que os anjos existem e que alguns são invisíveis. Ao lado delas, a gente lembra que no instante em que rimos Deus está dançando conosco de rostinho colado. O tempo é outro. E a vida fica com a cara que ela tem de verdade, mas que a gente desaprende a ver.”

(Ana Cláudia Saldanha Jacomo)

Aos meus pais Terezinha e João, minha
irmã Camila e a minha linda e
maravilhosa sobrinha e afilhada Maria
Eduarda.

OFEREÇO

Ao amor da minha vida: meu noivo, meu
amigo, meu companheiro,
Erick Moura F. Petrilli

“Se eu não te amasse tanto assim
Talvez perdesse os sonhos
Dentro de mim...
Se eu não te amasse tanto assim
Talvez não visse flores
Por onde eu vim...”
(Herbert Vianna)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, inteligência suprema, causa primeira de todas as coisas.

À Profa. Dra. Helaine Carrer pela orientação, oportunidade e paciência;

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos na Iniciação Científica (processo 03/03268-2) e no Mestrado (processo 06/59512-07);

Ao Dr. Marcel Bellato Spósito por me orientar sobre a fitopatologia da doença pinta preta, e delinear os caminhos do projeto de pesquisa com muito conhecimento, dedicação e humildade. E também por fornecer todos os frutos utilizados durante o trabalho;

À Profa. Dra. Lilian Amorim por disponibilizar o Laboratório de Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP para o crescimento do fungo e inoculação dos frutos;

À Profa. Dra. Beatriz Appezzato da Glória por disponibilizar o Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP para a realização do estudo de anatomia;

Ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada (NAP/MEPA) (ESALQ – USP) por disponibilizar o Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss®;

À Dra. Helena Javiel Alves e à Dra. Ana Carla Oliveira da Silva Pinhati, pelas valiosas recomendações e ensinamentos na construção das bibliotecas de cDNA;

À química Valentina de Fátima de Martin, técnica do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP, por sempre ajudar nas atividades práticas e por sequenciar pacientemente todos os clones;

À Dra. Maria das Graças Ongarelli, técnica do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP, por todo auxílio durante o desenvolvimento e estudo anatômico da interação fungo-planta;

À Silvia de Afonseca Lourenço, técnica do Laboratório de Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP pelo auxílio no cultivo da *Guignardia citricarpa* e na inoculação dos frutos;

À farmacêutica Marli K. M. Soares, técnica do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP pelo apoio técnico durante as atividades práticas de anatomia;

À doutoranda Waléria Guerreiro Lima pelo imprescindível auxílio com a microscopia eletrônica de varredura;

A todos os colegas da Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas da ESALQ pelo auxílio e pelos momentos de descontração;

À secretária da Pós Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas da ESALQ, Maria Solizéte Granzio Silva sempre eficaz e solícita;

A todos os amigos do CEBTEC pelo bom convívio, pelos inúmeros momentos de alegria e descontração: Prof. Dr. Murilo de Melo, Valentina de Fátima, Enio, Amaral, Danila, André Luiz, Simone, Evandro, Frederico, Graça, Rafael, Eduardo, Leno e Waléria. A Danila por compartilhar e entender os momentos difíceis; a Simone, por sempre ajudar, ensinar, ler e corrigir;

Às minhas eternas amigas: Camila Brigati, Aline Melegatti, Fabiana Mariano, Francine P. Venturini, Fernanda Rondon e Vanessa Morgan – vocês são a essência de como é bom ter amigos;

A toda minha amada família: meus pais, Terezinha e João, por estarem sempre presentes, lembrando que há dois principais ensinamentos na vida: HUMILDADE e CARIDADE; minha irmã Camila que em sua sabedoria sempre me disse as palavras certas para meu crescimento; a minha sobrinha Maria Eduarda por trazer muita alegria todos os dias; minha tia Nazir, minha sogra e sogro, aos meus cunhados e cunhadas pelas alegrias proporcionadas;

Em especial ao meu noivo, minha fonte de inspirações, meu porto seguro, meu amigo, meu tudo, Erick Moura Fabbri Petrilli pela paciência e por entender a minha busca incessante de conhecimento.

Obrigada a todos que de forma direta ou indireta auxiliaram neste trabalho.

"Você vê as coisas como elas são e pergunta: por quê? Mas eu sonho com coisas que nunca foram e pergunto: por que não?"

(Bernard Shaw)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	15
LISTA DE SÍMBOLOS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Citros.....	19
2.2 Doenças dos citros.....	21
2.3 A mancha preta dos citros.....	23
2.4 O albedo de <i>Citrus sinensis</i>	26
2.5 Morfo-anatomia das plantas.....	27
2.6 Análise ultra-estrutural das plantas.....	29
2.7 Biblioteca de cDNA.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Material Vegetal.....	33
3.2 Cultivo do fungo <i>Guignardia citricarpa</i>	33
3.3 Inoculação dos frutos com <i>Guignardia citricarpa</i>	33
3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	34
3.5 Análise anatômica dos frutos.....	35
3.6 Extração de RNA total.....	36
3.6.1 Isolamento do RNA mensageiro.....	38
3.6.2 Construção das bibliotecas de cDNA.....	39
3.6.2.1 Síntese da primeira fita de cDNA.....	39
3.6.2.2 Síntese da segunda fita de cDNA.....	40
3.6.2.3 Adição do adaptador <i>Sall</i>	40
3.6.2.4 Digestão com <i>NotI</i>	41
3.6.2.5 Fracionamento do cDNA.....	41
3.6.2.6 Ligação ao vetor pSPORT 1.....	42

3.6.2.7 Transformação por choque térmico.....	42
3.7 Análise das Bibliotecas de cDNA.....	43
3.7.1 PCR das colônias transformadas.....	43
3.7.2 Purificação da reação da PCR.....	43
3.8 Sequenciamento de cDNAs.....	44
3.9 Análises das sequencias.....	44
3.9.1 Redundância das sequencias obtidas.....	45
3.9.2 Anotação e categorização funcional das sequencias.....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	47
4.2 Análise morfo-anatômica das plantas.....	50
4.2.1 Análise morfo-anatômica para detecção do fungo.....	54
4.2.2 Análise morfo-anatômica para detecção do amido.....	55
4.2.3 Análise morfo-anatômica para detecção de compostos fenólicos.....	57
4.3 Análise das bibliotecas de cDNA.....	59
4.3.1 Construção das bibliotecas de cDNA.....	59
4.3.2 Análise das sequencias.....	63
4.4 Análise das ESTs.....	63
4.4.1 Distribuição e frequência das ESTs em <i>singletons</i> e <i>contigs</i>	63
4.4.2 Análise de similaridade das bibliotecas nos bancos <i>CitEST</i> e <i>Genbank</i>	65
4.5 Categorização geral das ESTs.....	66
4.6 Classificação das ESTs em subcategorias.....	67
4.6.1 Subcategoria metabolismo primário e secundário.....	68
4.6.2 Subcategoria metabolismo de energia.....	70
4.6.3 Subcategoria interação intra-extracelular.....	71
4.6.4 Subcategoria transdução de sinais.....	72
4.6.5 Subcategoria defesa celular e virulência.....	74
4.6.6 Subcategorias: transcrição, vias de transporte de componentes celulares e facilitadores de transporte.....	75
4.6.7 Outras subcategorias.....	77

	10
5 CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS.....	79
ANEXOS.....	95

RESUMO

Análise anatômica e molecular do albedo de frutos de *Citrus Sinensis* (L.) Osbeck 'pêra' na interação com *Guignardia citricarpa*

A produção brasileira de laranjas destina-se à indústria de suco concentrado, principal produto citrícola, sendo o estado de São Paulo o maior produtor e exportador do país. Devido à diminuição da variabilidade genética causada pela multiplicação de plantas cítricas por enxertia, esta cultura se tornou alvo constante de inúmeras pragas e doenças. Dentre estas doenças que vem causando crescentes prejuízos para a citricultura brasileira destaca-se a pinta preta causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely. O combate desta doença é feito por inúmeras pulverizações de fungicidas que aumenta significativamente o custo para os produtores. Uma possível alternativa para o combate a este patógeno seria a produção de plantas cítricas resistentes a doença, através de transformação gênica. Mas para isto, é necessário conhecer os mecanismos de respostas de defesa da planta e identificar quais genes podem estar relacionados com a defesa. Na tentativa de elucidar as respostas de defesa deste hospedeiro foram feitas análises anatômicas de frutos de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Pêra) inoculados com o patógeno e análise transcricional de duas bibliotecas de cDNA, uma de albedo de frutos sadios(BAFS) e outra de albedo de frutos inoculados com o patógeno (BAFC). As análises anatômicas mostraram que os danos causados pelo patógeno na planta iniciam-se 24 horas após a inoculação com as lesões das células do epicarpo, e continuam gradativamente até 72 horas apresentando a diminuição na quantidade de amido e acúmulo de compostos fenólicos. Foi obtido 184 ESTs válidas da BAFS e 370 da BAF. A anotação e categorização destas sequências apresentaram que o perfil transcricional encontrado nas duas bibliotecas foi semelhante, porém, na BAFC, foram encontrados transcritos pertencentes à defesa da planta como a catalase, a glutatona e monooxygenases. Esta análise mostrou que a resposta de defesa da planta inicia-se com lesões nas células, que a interação é custo-intensiva (redução da reserva de amido) para o hospedeiro, e que a defesa da planta está relacionada a muitos genes de defesa.

Palavras-chave: Laranja; Anatomia diferencial; Amido; Resistência à doença; cDNA

ABSTRACT

Atomic and molecular analysis of the fruit albedo of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'pêra' in the interaction with *Guignardia citricarpa*

The Brazilian production of oranges is mainly for the industry of concentrated juice, it is the most important citrus product, and the state of São Paulo is the largest producer and exporter of the country. Due to the low genetic variability caused by the multiplication of citrus plants by grafting, this culture became constant target of many pests and diseases. Among all the diseases that lead to elevated damage to the Brazilian citrus plantation, one is very relevant, the Black Spot disease caused by the fungus *Guignardia citricarpa* Kiely. The control of this disease is done by many sprays of fungicides that significantly increase the production cost to the producers. A possible alternative to control this pathogen is the development of resistant citrus plants to disease through genetic transformation. To that, it is necessary to understand the mechanisms of plant defense response and identify the genes related to the defense. In an attempt to elucidate the responses of this host both, anatomical analysis of sweet orange fruits (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Pêra) inoculated with the pathogen and transcriptional analysis of two cDNA libraries of albedo section were done. One was from health fruits (BAFS) and another from albedo of fruits inoculated with the pathogen (BAFC). The analysis showed that the anatomical damage caused by the pathogen in the plant shall begin 24 hours after inoculation showing lesions on epicarp cells, and continue gradually until 72 hours also showing a decrease in the amount of starch and accumulation of phenolic compounds. It was obtained 184 valid ESTs of the BAFS and 370 from BAFC. The annotation and categorization of these sequences showed that the transcriptional profile in the two libraries were similar, however, in BAFC, were found transcripts belonging to plant defense such as catalase, the glutathione and monooxygenases. These analyses showed that the plant defense response begins with lesions in the cells, being it cost-intensive interaction for the host, (with reduction of starch reserves) and the plant defense to resistance is related to many genes.

Keywords: Orange; Differential anatomy; Starch; Disease resistance; cDNA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fruto de <i>Citrus sinensis</i>	27
Figura 2 -	Disposição e inoculação dos frutos.....	34
Figura 3 -	Aspecto dos conídios de <i>Guignardia citricarpa</i> em microscópio eletrônico de varredura 0, 6, 12 e 24 horas após a inoculação (h.ai.) em frutos de laranja doce 'Pêra'.....	48
Figura 4 -	Aspecto do conídio de <i>Guignardia citricarpa</i> em microscópio eletrônico de varredura 48 e 72 horas após inoculação (h.a.i) em frutos de laranja doce 'Pêra'.....	50
Figura 5 -	Análise diferencial dos tecidos do fruto de laranja doce 'Pêra' sadio e inoculado com o fungo <i>G.citricarpa</i> (0 e 6 horas).....	51
Figura 6 -	Análise diferencial dos tecidos do fruto de laranja doce 'Pêra' sadio e inoculado com o fungo <i>G.citricarpa</i> (12 e 24 horas).....	52
Figura 7 -	Análise diferencial dos tecidos do fruto de laranja doce 'Pêra' sadio e inoculado com o fungo <i>G. citricarpa</i> (48 e 72 horas).....	53
Figura 8 -	Análise diferencial dos tecidos do fruto de laranja doce 'Pêra' sadio e inoculado com o fungo <i>G. citricarpa</i> reagindo com cloreto de zinco iodado.....	56
Figura 9 -	Análise diferencial dos tecidos do fruto de laranja doce 'Pêra' sadio e inoculado com o fungo <i>G.citricarpa</i> reagindo com tricloreto férrico.....	58
Figura 10 -	Amostras do RNA do albedo de citros visualizadas em gel de agarose desnaturante.....	61

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR.....	62
Figura 12 - Classificação funcional dos 542 transcritos das bibliotecas de cDNA (BAFS e BAFC) em seis diferentes categorias do <i>FunCat</i>	67
Figura 13 - Classificação funcional dos 542 transcritos das bibliotecas de cDNA (BAFS e BAFC) em 14 diferentes subcategorias do <i>FunCat</i>	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAFC	Biblioteca de albedo do fruto contaminado
BAFS	Biblioteca de albedo do fruto sadio
Blast	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BlastN	Comparação de sequências de nucleotídeos em bancos de dados de DNA
BlastX	Comparação sequência de nucleotídeos contra bancos de proteínas
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar ao RNAm
<i>contig</i>	agrupamento de ESTs alinhados
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
D.O. _{600nm}	Densidade óptica para um comprimento de onda de 600 nm
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EST	Etiqueta de sequência expressa
E-value	<i>Expected value</i> , indica o grau de "confiabilidade" de um alinhamento.
h.a.i	Horas após a inoculação
HR	Resposta de hipersensibilidade
IPTG	b-D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
KCl	Cloreto de potássio
KEGG	Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MilliQ	Água destilada deionizada e estéril
MIPS	Centro de Proteínas e Categorias Funcionais de Sequências de Munique
ML	Microscopia de luz
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanesulfônico
MPC	Mancha preta dos citros
NaCl	Cloreto de sódio

NCBI	<i>National Center for Biotechnological Information</i>
NH ₄ OAc	Acetato de amônio
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
<i>Primer</i>	Oligonucleotídeo iniciador
<i>Primer</i> (F)	<i>Primer</i> “forward” que se anela no sentido da transcrição
<i>Primer</i> (R)	<i>Primer</i> “reverse” que é complementar à porção 3’ do gene
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
SAR	Resistência sistêmica adquirida
<i>singletons</i>	ESTs que não tiveram similaridade o suficiente para serem agrupadas em <i>contigs</i>
SDS	Duodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio (Sodium Duodecyl Sulfate)
T.A.	Temperatura ambiente
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-galactopiranosídeo

LISTA DE SÍMBOLOS

⁰ Brix	teor de sólidos solúveis
°C	graus Celsius
pb	pares de bases
mM	milimolar
ng	nanograma
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
µM	micromolar
g	Gramas
x g	múltiplos de força gravitacional terrestre (rcf)

1 INTRODUÇÃO

A produção de frutos de laranjas representa uma importante fonte de divisas para o Brasil, atualmente o maior produtor mundial desta cultura. A maior parte da produção brasileira de laranja destina-se à indústria de suco concentrado, principal produto cítrico, sendo o estado de São Paulo o maior produtor e exportador do país (ABECITRUS, 2008). Porém, devido à diminuição da variabilidade genética causada pela multiplicação de plantas cítricas por enxertia, esta cultura se tornou alvo constante de inúmeras pragas e doenças, que têm reduzido consideravelmente a produtividade média brasileira de citros.

Dentre as inúmeras doenças que atingem os citros no Brasil, destaca-se a pinta preta ou mancha preta dos citros (MPC), causada pelo fungo *Guignardia citricarpa*. Esta doença ataca todas as variedades comerciais de citros (SPÓSITO, 2004) causando lesões em frutos, folhas, pedúnculos, pecíolos, ramos verdes e espinhos (AGUILAR-VILDOSO et al., 2002). Geralmente é controlada por quatro a cinco pulverizações fungicidas por ano no campo, estratégia que reduz a quantidade de focos doentes, mas não erradica a doença, e aumenta o custo de produção da cultura.

Por isso, o estudo particular desta doença é fundamental para gerar outras possibilidades de combate, como o desenvolvimento de variedades tolerantes ou resistentes, através da transformação genética (ASTUA-MONGE; FREITAS-ASTUA; MACHADO, 2004). Mas para isto, é necessário o conhecimento de quando se inicia e quais são as respostas de defesa da planta contra o patógeno, pois apenas desta forma, há a possibilidade de escolha de um gene específico que poderá ser utilizado em transformações futuras contra esta doença.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar os danos iniciais causados pelo fungo *Guignardia citricarpa* nos tecidos da planta, utilizando-se da análise anatômica diferencial e descrição do perfil transcricional desta interação a partir da construção e análise de duas bibliotecas de cDNA, sendo uma de albedo de frutos sadios e outra de inoculados com o fungo patogênico para identificar genes relacionados ao mecanismo de defesa deste tecido da planta.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Citros

Os citros utilizados em plantios comerciais pertencem à família *Rutaceae*, subfamília *Aurantoidea*, sendo a maioria das espécies pertencentes ao gênero *Citrus* (SWINGLE; REECE, 1967). Análises filogenéticas sugerem que o gênero *Citrus* seja composto por apenas três espécies verdadeiras: cidra (*Citrus medica* L.), tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) e toranja (*Citrus grandis* L.), sendo os outros genótipos derivados de hibridações entre estas espécies (SCORA, 1975; BARRETT; RHODES, 1976). Estudos com marcadores moleculares têm ajudado a decifrar as relações filogenéticas entre os representantes do gênero *Citrus* e gêneros relacionados, e tem confirmado a origem híbrida da maioria das espécies de importância econômica (NICOLOSI et al., 2000).

Os citros são originários das regiões úmidas tropicais e subtropicais do continente asiático e ilhas adjacentes, tendo sido levados para os países europeus há séculos, antes da descoberta do novo continente (WEBBER, 1967). No Brasil, as citrinas foram, sem dúvida, introduzidas pelas primeiras expedições colonizadoras (ANDRADE, 1930).

Encontrando no Brasil melhores condições para vegetar e produzir do que nas próprias regiões de origem, os citros se expandiram para todo o país. Foi no centro-sul, graças ao estabelecimento de grandes núcleos populacionais (Rio de Janeiro e São Paulo) que garantiam o consumo da produção, que a citricultura encontrou seu principal centro de desenvolvimento. As qualidades incomparáveis dos citros e o aumento contínuo da produção proporcionaram condições para se iniciar, logo na segunda década do século XX, a exportação de produtos cítricos para a Argentina e em seguida para a Europa (ANDRADE, 1930).

As frutas cítricas de uso comercial podem ser agrupadas em laranjas doces (*C. sinensis* (L.) Osbeck), tangerinas (*C. reticulata* Blanco), limões (*C. limon* (L.) Burm. F.), limas ácidas [*C. aurantifolia* (Christm.) Swing e *C. latifolia* (Yu. Tanaka)], pomelos (*C. paradise* Macf.), entre outras (PIO et al., 2005). Algumas espécies são utilizadas principalmente como porta-enxerto, como limão 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck), limão

‘Volkameriano’ (*C. volkameriana* V. Ten & Pasq.), tangerina ‘Sunki’ (*C. sunki* hort. ex Tanaka), tangerina ‘Cleópatra’ (*C. reshni* hort. ex Tanaka), laranja azeda (*C. aurantium* L.), trifoliata (*Poncitrus trifoliata* (L.) Raf.), os híbridos citrange ‘Carrizo’, citrange ‘Troyer’ [*Poncitrus trifoliata* (L.) Raf. x *C. sinensis* (L.) Osbeck], e citrumelo ‘Swingle’ [*C. paradisi* Macfad. Cv. Duncan x *Poncitrus trifoliata* (L.) Raf.] (POMPEU JUNIOR, 2005).

Entre os países produtores de citros destacam-se o Brasil, China, EUA, México e Espanha, responsáveis por, aproximadamente, 18,8%, 16,0%, 10,6%, 6,0% e 5,6% da produção mundial, respectivamente (FAO, 2008). O Brasil é, portanto, o maior produtor de citros do mundo, apresentando uma produção de cerca de 20 milhões de toneladas (FAO, 2008), seguido dos EUA que é responsável por aproximadamente 9 milhões de toneladas da produção (FAO, 2008).

A maior parte da produção brasileira de laranja destina-se à indústria de suco de laranja concentrado, sendo que uma grande parte do suco de laranja produzido no país é exportada, principalmente para União Européia (ABECITRUS, 2008). Segundo dados da ABECITRUS (2008), na safra 2007/2008, o Brasil exportou 877.828 toneladas de suco concentrado de laranja, gerando em torno de um bilhão e trezentos milhões de dólares.

O estado de São Paulo, maior produtor do país, possui cerca de 760 mil hectares de plantações citrícolas (FNP, 2007), sendo responsável pela maior produção desta cultura, cerca de 80% da produção do país. No estado de São Paulo, calcula-se que cerca de 80% do parque citrícola utiliza um único porta-enxerto, o limão ‘Cravo’. A população de cultivares comercial é composta basicamente por ‘Pêra’ (45%), ‘Natal’ (24%), ‘Valência’ (13%) e ‘Hamlin’ (5%). As outras cultivares representam apenas 13% do total.

Apesar do grande volume de produção dos citros no Brasil e no mundo, a citricultura tem sofrido muitas perdas, causadas por pragas e doenças que afetam a cultura. No Brasil, os pomares têm sido atingidos por doenças desde o início de sua fase comercial até os dias atuais.

2.2 Doenças dos citros

Com a tecnificação da citricultura, as plantas passaram a ser multiplicadas por enxertia, o que trouxe grandes vantagens em termos de precocidade e uniformidade aos pomares, porém, ao mesmo tempo diminuiu a variabilidade, tornando a cultura alvo constante de inúmeras pragas e doenças que, encontrando condições favoráveis ao seu desenvolvimento, são capazes de causar danos irreversíveis.

No Brasil, os pomares têm sido atingidos por diversas doenças causadas por fungos (gomose), bactérias [cancro cítrico, clorose variegada dos citros (CVC) e greening] e vírus (tristeza dos citros). Efetivamente nenhuma destas doenças foi excluída dos pomares brasileiros, apenas foram encontradas formas de controle.

Por volta de 1910, os pomares brasileiros foram afetados pela gomose, doença causada pelo fungo *Phytophthora* spp. Apresentando exsudação de goma, escurecimento dos tecidos localizados abaixo da casca, clorose e posteriormente necrose intensa das folhas como sintomas. Na tentativa de controle desta doença, os pomares brasileiros iniciaram a substituição dos porta-enxertos de laranja 'Caipira' para os de laranja azeda, que apresenta baixa susceptibilidade ao patógeno causador da doença.

Em 1937, a citricultura brasileira foi atingida pela mais destrutiva doença dos citros, a tristeza dos citros, causada pelo vírus denominado *Citrus tristeza vírus* (CTV). O CTV praticamente dizimou os pomares paulistas, pois numa época que existiam 11 milhões de pés de laranja, foi perdido nove milhões de plantas cítricas sobre porta-enxertos de laranja azeda. (FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997; FUNDECITRUS, 2008). O controle do CTV no Brasil se deu pela substituição total dos porta-enxertos intolerantes por tolerantes (de laranja azeda por limão 'Cravo'), além da utilização da pré-imunização, com estirpes fracas do vírus, como estratégia para diminuir o efeito do vírus em copas de pomelos, limas ácidas e laranjas doces, que mesmo em porta-enxertos tolerantes apresentavam sintomas (MÜLLER; COSTA, 1991).

Na década de cinquenta, a citricultura brasileira que ainda se recuperava dos enormes prejuízos causados pela tristeza do citros, se viu diante da iminência de um

novo colapso (ROSSETI, 1977; ROSSETI et al., 1981) após a descoberta do cancro cítrico, doença causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (*Xac*) (NAMEKATA; ROSSI; CERAVOLO, 1996) que ataca todas as variedades e espécies de citros e constituem numa das mais graves doenças da citricultura brasileira. A doença manifesta-se por lesões em folhas, frutos e ramos, e quando em altas severidades pode provocar a queda de frutos e folhas com sintomas (FUNDECITRUS, 2008). Como não há uma forma de erradicação eficiente para a doença, inspeções freqüentes são realizadas em talhões verificando a presença de sintomas nas plantas cítricas. A prevenção é a melhor arma contra o cancro cítrico e deve ser feita já na implantação ou renovação do pomar, com mudas sadias, e uso de quebra ventos (FUNDECITRUS, 2008).

A clorose variegada dos citros (CVC), conhecida como amarelinho causado pela bactéria *Xylella fastidiosa* desestruturou novamente a citricultura no ano de 1987. A doença que fica restrita ao xilema da planta provoca o entupimento dos vasos responsáveis por levar água e nutrientes da raiz para a copa da planta. A produção do pomar afetado cai rapidamente, os frutos ficam duros, pequenos e amadurece precocemente, a perda de peso do fruto pode chegar a 75%. A bactéria é transmitida e disseminada nos pomares por insetos vetores. Como ainda não há uma forma específica de combate à *Xylella fastidiosa*, os citricultores devem implantar em seus pomares estratégias de manejo da doença, como utilização de mudas sadias, podas de ramos com sintomas iniciais da doença em plantas com mais de dois anos, e controle das cigarrinhas.

No ano de 2001, a morte súbita dos citros, doença de causa desconhecida foi detectada nos pomares da região sul do Triângulo Mineiro, Norte e Noroeste do Estado de São Paulo. Em 2004, o maior problema enfrentado pela citricultura foi o greening ou huanglongbing, causado pela bactéria *Candidatus Liberibacter* ssp (MATTOS et al., 2005) O sintoma inicial geralmente aparece em um ramo ou galho, que se destaca pela cor amarela em contraste com a coloração verde das folhas dos ramos não afetados. As folhas apresentam coloração amarela pálida, com áreas de cor verde, formando manchas irregulares. Também é comum a ocorrência de sintomas semelhantes à deficiência de zinco, cálcio e nitrogênio nas folhas dos ramos afetados. O fruto fica

deformado, assimétrico e pode apresentar internamente diferença de maturação nas diferentes partes, ou seja, ter um dos lados maduro (amarelo) e o outro ainda verde. O controle da doença é feita por aquisição de mudas sadias, eliminação rápida das mudas doentes, e controle químico do possível vetor *Diaphorina citri* (FUNDECITRUS, 2008).

A citricultura brasileira é atingida por outras doenças que causam uma devastação menor na produção, mas de igual importância na economia, visto que a exportação de produtos cítricos é diretamente afetada, pois países importadores não aceitam plantas de regiões que tenham histórico de doenças que eles não possuem, nem plantas com sintomas. A mancha preta dos citros (MPC), causada pelo fungo *Guignardia citricarpa*, vem, atualmente, causando um grande impacto à economia da citricultura, pela redução da produtividade em pomares, depreciação dos frutos para o mercado de fruta fresca e inadequação para a exportação (FUNDECITRUS, 2008).

2.3 A mancha preta dos citros

A mancha preta foi relatada pela primeira vez em 1895 na Austrália, afetando frutos de laranjeira doce 'Valência' (KIELY, 1948). Em 1925 a doença foi observada na África do Sul (DOIDGE, 1929), onde rapidamente se tornou o principal problema fitossanitário da citricultura daquele país (SCHUTTE; BEETON; KOTZÉ, 1997), fato que perdura até os dias de hoje. A doença também atingiu outros países da África, Ásia e América do Sul (KOTZÉ, 1988; FEICHTENBERGER, 1996; FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997; TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000).

No Brasil a doença foi descrita inicialmente no Estado de São Paulo, a partir de frutos cítricos coletados em uma feira livre no município de Piracicaba, entre 1938 e 1940 (AVERNA-SACCA, 1940). No início da década de 80, sua ocorrência foi relatada no Estado do Rio de Janeiro, atingindo vários municípios produtores da Baixada Fluminense (ROBBS; PIMENTEL; RIBEIRO, 1980). Em 1992, a doença reapareceu no Estado de São Paulo, causando severos prejuízos em pomares localizados nas regiões dos municípios de Conchal e Mogi-Guaçu (GOES; FEICHTENBERGER, 1993) e também foi detectada nos Estados do Rio Grande do Sul (FEICHTENBERGER, 1996), Minas Gerais e Espírito Santo (COSTA et al., 2003).

O fungo causador da mancha preta dos frutos cítricos foi primeiramente descrito por McAlpine, em 1889 (McONIE, 1964) na sua forma assexuada, e recebeu a designação de *Phoma citricarpa* McAlpine. Posteriormente, surgiram duas novas propostas para a recombinação do binômio: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Petrak. e *Phyllostictina citricarpa* (Mc Alpine) Petrak., ambas, segundo Robbs (1990) adotadas indistintamente pelos fitopatologistas. O estágio sexual do patógeno foi descoberto por Kiely, em 1948, e foi chamado de *Guignardia citricarpa* Kiely (KOTZÉ, 1981, 1996). No ano de 1964, McOnie descreveu duas variantes de *G. citricarpa*, morfologicamente idênticas, que ocorriam em citros, sendo apenas uma delas patogênica, e a outra endofítica. Entretanto, atualmente, sabe-se que a forma endofítica é outra espécie denominada de *Guignardia mangiferae* (anamórfica: *Phyllosticta capitalensis*), de acordo com Baayen et al. (2002).

Todas as variedades comerciais são suscetíveis, principalmente os limoeiros verdadeiros (*C. limon* Burn), que têm papel fundamental no início das epidemias da mancha preta (AGUILAR-VILDOSO et al., 2002). Em laranjeiras, perdas consideráveis podem ocorrer especialmente em variedades de maturação médio-tardia ('Pêra') e tardia ('Valência' e 'Natal') (SCHINOR et al., 2002). Na variedade lima ácida (*C. latifolia* Tanaka) 'Tahiti', nunca foi observados sintomas em frutos, apesar de estes serem susceptíveis a doença.

Disseminada por meio de mudas, restos de material vegetal, água da chuva e vento, a doença não provoca alterações no sabor dos frutos, que podem ser comercializados para a indústria de suco, mas, devido à aparência, tornam-se impróprios para o mercado de fruta fresca e inadequados às exportações para a União Européia, maior importador dos frutos cítricos brasileiros. A doença é considerada quarentenária A1 na União Européia, por não estar presente em seus países membros. A tolerância em relação a frutos importados com sintomas da doença é zero.

A quantidade e a qualidade das frutas cítricas são freqüentemente ameaçadas devido aos danos deixados na planta, que dependendo da intensidade do ataque, podem torná-la improdutiva ou levar à sua erradicação (FUNDECITRUS, 2008).

Os órgãos da planta que são afetados pela mancha preta dos citros são em ordem de freqüência: frutos, folhas, pedúnculos, pecíolos, ramos verdes e espinhos.

Uma das principais características desta doença é que folhas e frutos podem estar infectados sem apresentarem os sintomas típicos da doença (AGUILAR-VILDOSO et al., 2002). Há vários tipos de lesões, nomeados de acordo com suas características, que podem variar dependendo do tamanho do fruto, condição climática e tipo de esporo responsável pela infecção (FUNDECITRUS, 2008).

Os sintomas são classificados e caracterizados em seis diferentes tipos de acordo com o Fundecitrus:

Falsa melanose: os sintomas são semelhantes aos da melanose dos citros, diferindo pelo fato de que, ao contrário da melanose, as lesões não são ásperas. As lesões são pequenas, com cerca de 2 mm, rodeadas por pontos pequenos com aproximadamente 1 mm de diâmetro. Este sintoma ocorre em frutos em desenvolvimento, normalmente, a partir de março-abril.

Mancha preta: é o sintoma mais comum da doença, caracterizando-se por lesões deprimidas, de bordos bem definidos, com centro acinzentado, contendo frutificações (picnídios). Ocorre principalmente na fase de transição do fruto verde para maduro. Em frutos verdes, as lesões apresentam um círculo amarelo ao seu redor. Frutos colhidos e infectados, embora não apresentem sintomas aparentes, podem desenvolvê-los durante o transporte ou armazenagem, não exibindo áreas deprimidas e pontuações negras.

Mancha marrom ou mancha sardenta: são lesões pequenas de coloração pardo-avermelhadas, levemente deprimidas, com bordos definidos, formato irregular, normalmente sem apresentar as frutificações do fungo. Ocorrem após início da maturação dos frutos, sendo quase invisíveis a olho nu e podendo coalescer originando lesões parecidas com as formadas pela melanose. Sob condições favoráveis de temperatura e luminosidade podem dar origem à mancha virulenta.

Mancha rendilhada: são lesões superficiais sem bordas definidas e textura lisa, que aparecem quando os frutos ainda estão verdes. Estas lesões chegam a atingir grande parte da superfície do fruto;

Mancha trincada: a lesão é superficial e ocorre em pequeno número em frutos ainda verdes. Quando o fruto amadurece, a lesão trinca e está sempre associada ao ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*).

Mancha virulenta: caracteriza-se pela formação de lesões grandes, escuras ou de coloração marrom, deprimidas, com ou sem frutificações, de formato irregular, podendo ocupar áreas de vários centímetros quadrados, sendo deprimidas ou não. O centro possui cor cinza e as bordas são salientes, marrom escura ou vermelha escura, com ou sem frutificações. Pode ser resultante da evolução das manchas pretas e aparecem, em geral, no final da safra, quando os frutos estão maduros, e com ocorrência de altas temperaturas.

Contudo, os sintomas mais comuns observados em frutos são a mancha dura e a falsa melanose (KOTZÉ, 1988). Devido ao longo período de suscetibilidade dos frutos, são necessárias várias pulverizações com fungicidas protetores ou sistêmicos, isoladamente ou combinados, associados ao óleo mineral ou vegetal, elevando assim, o custo de produção da cultura. O principal cuidado para evitar a entrada do patógeno nos pomares é a prevenção, pela utilização de mudas sadias, sanidade do pomar, retirada do material vegetal em decomposição e a utilização de quebra-ventos que reduzem a disseminação dos esporos (FUNDECITRUS, 2008).

2.4 O albedo de *Citrus sinensis*

A casca dos frutos de laranja é caracterizada por duas partes: o exocarpo, a mais externa, designada como 'flavedo' constituído pela epiderme e por uma camada de células glandulares de óleo, onde podem ser encontrados os carotenóides, vitaminas e óleos essenciais, e o mesocarpo, constituído por uma camada de células esponjosas brancas denominadas de 'albedo', um tecido rico em celulose, carboidratos solúveis, aminoácidos, vitaminas, pectina e flavonóides (Figura 1).

O uso do extrato do albedo, flavedo e endocarpo de laranjas na inibição do crescimento micelial de *Phomopsis citri*, agente causal da melanose, foi relatado por El-Tobshy e Sinclair (1964). Os resultados mostraram que na presença dos extratos de flavedo e albedo juntos e somente na presença do extrato de albedo ocorria a inibição do crescimento fúngico, justificando a importância do albedo. Toffano (2005) sugere que o fungo *G. citricarpa*, fica restrito somente ao flavedo, pois provavelmente existem compostos tóxicos que impedem a entrada do patógeno no albedo confirmando Góes

(1998) e Cardoso-Filho (2003) que também relataram que a doença pinta- preta restringe-se apenas ao flavedo. Contrariando estes relatos, Marques et. al (2008), verificaram que em frutos com sintomas de mancha dura, há danos no flavedo, mas que estes são muito mais severos no albedo, e que há ali a presença de estruturas do fungo.

Figura 1 - Fruto de *Citrus sinensis*. Flavedo parte mais externa; e o mesocarpo parte do meio (albedo)

2.5 Morfo-anatomia das plantas

A morfo-anatomia tem relevante destaque nas diversas áreas de estudo, principalmente tratando-se da resistência estrutural das plantas contra os patógenos. A microscopia de luz (ML) é o método mais antigo, nestas descrições histopatológicas, sendo empregado como ferramenta de trabalho nas análises das interações hospedeiro-patógeno (SILVA; ALQUINI; CAVALLET, 2005; MARQUES et al., 2007; SHAH, 2005).

As relações entre os tecidos de revestimento da planta e a sua tentativa de defesa estão diretamente correlacionadas, e são observadas comparando-se a anatomia do vegetal sadio com a do infectado com algum patógeno. Diversas

substâncias são encontradas ou então depositadas nas estruturas de revestimento dos vegetais, tanto na superfície, quanto no interior das células, na tentativa de evitar o desenvolvimento do patógeno, ou outras adversidades do ambiente como o estresse contra seca (SILVA; ALQUINI; CAVALLET, 2005).

A lignificação do tecido, por exemplo, pode proporcionar um aumento na resistência das paredes impedindo a difusão de toxinas do patógeno em direção ao hospedeiro, e a difusão de nutrientes da planta hospedeira em direção ao patógeno, restringindo assim a colonização deste (RODRIGUES-JUNIOR, 1980; AGRIOS, 1988; PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Frutos infectados por microrganismos podem ter nas células próximas às infecções acúmulo de calose, suberina, taninos, substâncias pécicas, carboidratos, géis, lignina e ácidos fenólicos complexos (MATIELLO; BARBIERI; CARVALHO, 1997). Estas substâncias depositadas agem em ação de resistência do hospedeiro aos ferimentos causados pelo patógeno (SAMBUGARO et al., 2004).

Já foi observada a formação de uma bainha, composta pela deposição de material celulósico e lignina, em plantas infectadas por fungos, que impede o progresso das hifas para o interior do citoplasma caracterizando a resistência da planta (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Cultivares da mesma espécie pode apresentar densidade, compactação e espessura da parede das células do parênquima paliçádico diferenciados resultando em resistências à patógenos. Àqueles com maior número de células e maior índice de compactação têm demonstrado serem mais resistentes (PRABHPREET et al., 2000).

Em células necrosadas do córtex de laranja-doce causada pela leprose-dos-citros observou-se a presença de compostos lipídicos, e ausência de compostos fenólicos e substâncias pécicas. Observou-se também nestas células necrosadas a formação de um meristema de cicatrização (MARQUES et al., 2007). Este tipo de meristema é normalmente formado em áreas lesionadas e desempenha uma função de proteção a despeito da causa do ferimento (MELO-DE-PINA et al., 2002). Shah (2005) discute o acúmulo de substâncias lipídicas no córtex e no tecido epidérmico relacionando estes compostos com a defesa da planta.

2.6 Análise ultra-estrutural das plantas

A melhoria das técnicas de preparação das amostras e o início da utilização do microscópio eletrônico ampliaram, sobremaneira, a capacidade de observação da ultra-estrutura celular. Muitas concepções sobre a morfologia de certos organismos sobre a organização de tecidos e funções celulares foram radicalmente alteradas. Nenhuma outra ferramenta de pesquisa experimentou tão rápido avanço, em toda a história da ciência, quanto os microscópios eletrônicos de varredura e de transmissão (SANTOS, 1996).

Os mecanismos de resistência a agentes patogênicos são amplamente conhecidos em diversos patossistemas (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Em princípio, esses mecanismos patogênicos podem se expressar em qualquer estágio durante a patogênese (RUBIALES; NIKS, 1992). A histologia da interação patógeno-hospedeiro é um recurso eficiente no estudo dos processos de infecção, pois ajuda esclarecer os eventos de pré-penetração, penetração e colonização do hospedeiro, além de possibilitar entender a fisiologia da interação. Também pode ser útil no esclarecimento dos mecanismos de resistência do hospedeiro (ARAÚJO; MATSUOKA, 2004).

Foram feitos estudos histopatológicos utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para estudar a infecção por *Colletotrichum acutatum* em plântulas de pinus (NAIR; CORBIN, 1981). Manandhar et al. (1985) estudaram processos de penetração e infecção em folhas de soja por *Colletotrichum truncatum* e *Glomerella glycines*. Roberts e Snow (1984) também utilizaram esta ferramenta para estudar os aspectos histopatológicos causados por *Colletotrichum capsici* em algodão, observando o tempo para a formação de estruturas como tubos germinativos, apressórios e modos de penetração. Uribeondo, Forster e Adaskaveg (2003), estudando o patossistema, noz x *Colletotrichum acutatum*, observaram, 36 horas após a inoculação, a formação de “pegs” de penetração e vesícula de infecção nas células onde o fungo penetrou, também com o auxílio da microscopia de varredura.

Liu e Kolattukudy (1998), utilizando MEV, relataram que conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* necessitam se aderir na superfície de contato do

hospedeiro para receber os sinais químicos da cera de superfície do hospedeiro, como o etileno e o ácido 2,3- dihidroxibenzóico, para induzir a formação de apressório.

2.7 Biblioteca de cDNA

Recentemente, várias estratégias foram desenvolvidas para permitir o estudo da função bioquímica de vários genes simultaneamente, entre elas: a genética reversa (geração de mutações específicas em genes de interesse), *screens* mutagênicos (geração de mutações randômicas e *screening* de um *pool* de mutantes para identificar fenótipos de interesse) e bioinformática (a análise dos dados gerados). As estratégias acima, associadas aos projetos genoma, têm possibilitado o estudo sistemático da expressão diferencial de genes em nível de genoma como um todo.

As ESTs (*Expressed Sequence Tags*) são uma forma complementar, mas extremamente rápida de identificação de novos genes (HOFTE et al., 1993), pois são sequências curtas de DNA produzidas a partir de clones de cDNA escolhidos aleatoriamente e sequenciados uma única vez (GAUTHERET et al., 1998). Esta tecnologia é baseada no sequenciamento parcial de extremidades 3' ou 5' de clones de bibliotecas de cDNA (DNA complementar) gerados a partir do RNA mensageiro (RNAm) (ADAMS et al., 1991). Assim, quanto maior a expressão de um determinado gene em uma célula num determinado momento, teoricamente maior será o número de transcritos e, conseqüentemente, maior será o número de cópias de cDNAs correspondentes (OHLROGGE; BENNING, 2000).

O estudo da expressão gênica diferencial pode contribuir para a caracterização da resistência, pois possibilita a identificação de genes-chave que se expressam em uma estrutura em desenvolvimento sob condições anormais, ou quando submetida a algum tipo de estresse ou quando carrega alguma mutação (GHANNOUM; RICE, 1999). O conjunto de dados da expressão diferencial de vários genes sob diferentes condições pode ser usado para reconstruir as vias reguladas por estes genes, prever onde eles atuam e identificar novos genes associados ao processo. Por isto, a construção de bibliotecas de cDNAs tem possibilitado a geração de informações úteis

para estudos de predição de genes, principalmente daqueles relacionados aos processos de patogenicidade (IDNURM; HOWLETT, 2001).

Birch et al. (1999), isolaram genes de batatas, induzidos nos primeiros estágios da resposta de hipersensibilidade (RH) à *Phytophthora infestans*. Os produtos dos genes isolados apresentaram similaridade com moléculas sinalizadoras envolvidas na diferenciação celular, apoptose (morte celular programada) e na transdução de sinal da RH. Em tomateiro, Xiao, Tang e Zhou (2001) identificaram genes envolvidos em diversos mecanismos de defesa, como transdução de sinal, resposta de hipersensibilidade, estresse oxidativo e proteólise. Em cafeeiros, Guzzo (2004), identificou genes envolvidos na resistência sistêmica adquirida (SAR) em plantas suscetíveis contra fitopatógenos.

Takemoto et al. (2003), em plantas de fumo após o tratamento com o elicitor de respostas de defesa, constituído por componentes da parede celular de hifas de *Phytophthora infestans* isolaram 19 genes induzidos, sendo eles codificadores de PR-proteínas, como β -1,3-glucanase, ou de proteínas da parede celular vegetal, como a extensina e uma proteína rica em glicina. Os autores verificaram, também, o padrão de expressão desses genes, em resposta ao tratamento com ácido salicílico e metil jasmonato ou à inoculação com a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, não patogênica à *Nicotiana tabacum*. Pelos resultados obtidos, verificou-se que a ativação da transcrição desses genes é regulada por diferentes moléculas sinalizadoras e que os respectivos produtos estão envolvidos em processos distintos relacionados à resistência.

Ferro et al. (2007) analisando ESTs de cana-de-açúcar susceptível infectada com o patógeno *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli* descobriu um gene reprimido com similaridade com motivos da lipase, que catalisa a etapa inicial da biossíntese do hormônio jasmonato, cuja expressão é induzida em múltiplas respostas de defesa da planta. A análise de plantas de cana-de-açúcar tolerante com este mesmo patógeno resultou no aumento da expressão de um gene relacionado a uma proteína de membrana que atua percebendo os sinais extracelulares, H⁺ -ATPase.

Karlsson, Olson e Stenlid (2003), em um banco de ESTs de *Heterobasidion annosum*, um fungo fitopatogênico de coníferas, identificaram sete genes associados

ao processo de infecção. Um estudo com um dos mais importantes patógenos de trigo, *Mycosphaerella graminicola*, revelou que de 1500 ESTs, 35 unigenes apresentaram homologia a sequências relacionadas a fatores de virulência ou patogenicidade de fungos (KEON et al., 2005).

Abreu (2007), analisando genes diferencialmente expressos associados ao declínio dos citros identificou genes de respostas das plantas a estímulos ambientais, como a proteína LEA desidrinha; hidrolases, que têm sido associadas aos mecanismos de defesa da planta contra fitopatógenos (STANGARLIN; PASCHOLATI, 2000); e metalotioneína possivelmente relacionada à detoxificação celular.

Freitas-Ástua et al. (2007), analisando plantas de citros inoculadas com o vírus da leprose, identificaram genes diferencialmente expressos como glicoproteínas, lectina e proteínas ligadas aos íons cálcio. Dentre estes citados dois já foram relatados como genes de defesa contra estresses bióticos de insetos [lectina (GATEHOUSE et al., 1999)], e de outros patógenos [proteínas ligadas aos íons cálcio (CHIASSEON et al., 2005)].

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para a realização da análise anatômica, ultra-estrutural e construção das bibliotecas de cDNA do albedo de citros foram selecionados frutos sadios de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pêra', com aproximadamente 30 a 40 mm de diâmetro estando entre 90 e 120 dias de idade. Estes frutos foram coletados da estufa de crescimento do Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), Araraquara/SP e cedidos pelo pesquisador Dr. Marcel Bellato Spósito.

3.2 Cultivo do fungo *Guignardia citricarpa*

Para o cultivo do fungo *Guignardia citricarpa* foram obtidos isolados de culturas-estoque da micoteca do Departamento de Fitossanidade da UNESP/FCAV Jaboticabal – SP, cedidos pelo professor Dr. Antônio de Góes. O isolado utilizado foi previamente identificado pelo código 92 e caracterizado como patogênico por testes de inoculação realizados por Baldassari (2001). O isolado foi cultivado em meio de cultura batata-dextrose-ágar – BDA (PILLEGI, 2006) e incubados a 28° C com luz constante, por aproximadamente 18 dias, ou até o início da esporulação do fungo.

Para a inoculação dos frutos foi utilizada uma suspensão da cultura do fungo *G. citricarpa* com concentração de 10^5 conídios/mL. A determinação do número de conídios foi feita ressuspensando as colônias do fungo crescidas em meio BDA em água. A suspensão obtida foi filtrada em camada dupla de gaze e realizou-se a contagem dos conídios em câmara de Neubauer de acordo com Antonini (2004). Fêz-se uma padronização para se obter uma cultura com concentração de 10^5 conídios/mL.

3.3 Inoculação dos frutos com *G. citricarpa*

Todos os frutos passaram por uma etapa de desinfestação que incluía: imersão em solução de álcool 70% por 5 minutos, seguida de imersão em hipoclorito de sódio 3% por 10 minutos e em água destilada por 10 minutos.

Os frutos foram distribuídos em grupo de 5 frutos por caixas gerbox[®] colocadas dentro de uma bandeja contendo água para manter a umidade e revestida com saco plástico transparente para possibilitar a passagem total da luz (Figura 2A).

Figura 2 – Disposição e inoculação dos frutos. A. Frutos em caixa gerbox[®] mantidos em câmara a 28°C, com luz constante. B. Frutos marcados com círculos para a inoculação

Em cada fruto foram feitos 3 círculos, com caneta esferográfica, que delimitavam o local aonde seriam inoculados a cultura do fungo (Figura 2B). Cada um destes locais foi inoculado, com pipeta, pingando 10µL da suspensão do fungo na concentração de 10^5 conídios/mL. A bandeja foi colocada dentro de uma BOD com temperatura de 28°C $\pm$ 1 e luz constante. As mesmas condições foram mantidas para os frutos sadios, estes, porém, foram inoculados apenas com água destilada. Os frutos sadios e inoculados foram mantidos em caixas gerbox[®] separadas.

Todos os frutos foram inoculados simultaneamente e mantidos sob estas condições atendendo as próximas fases do experimento.

3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises ultra-estruturais foram realizadas às 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação (h.a.i) dos frutos com o fungo. Aproximadamente, 25 mm² do flavedo de 3

frutos no local aonde ocorreu à inoculação foi excisado e fixado em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). O mesmo foi feito com os frutos inoculados apenas com água destilada. Logo em seguida, as amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,2 por 1 hora a temperatura ambiente em capela de fluxo laminar. As amostras foram lavadas com água destilada e submetidas a banhos, em soluções crescentes de álcool (10, 30, 50, 70, 90 e 100%) por 10 minutos cada uma e passadas três vezes em etanol absoluto (100%). As amostras foram desidratadas utilizando-se o aparelho de ponto crítico de CO₂ (HORRIDGE; TAMM, 1969), montadas sobre suportes de alumínio (STUBs), metalizadas com ouro e analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss® do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada (NAP/MEPA) da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ – USP, com supervisão do Prof. Elliot Watanabe Kitajima.

3.5 Análise anatômica dos frutos

As análises anatômicas foram realizadas às 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação (h.a.i) dos frutos com o fungo. Aproximadamente 125 mm³ do tecido (flavedo + albedo) de 3 frutos no local aonde se fez a inoculação foi excisado e fixado em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). O mesmo foi feito com os frutos inoculados apenas com água destilada. Para melhor fixação, as amostras foram levadas a uma bomba de vácuo para a retirada do ar contido nos tecidos. Após a fixação, as amostras foram desidratadas em série etílicas (de 10 a 100% de etanol) e infiltradas em resina hidroxietilmetacrilato (Leica Historesin), seccionadas de 5, 7 e 10 µm de espessura em micrótomo rotatório. As secções foram montadas em lâminas de vidro e posteriormente coradas com:

- 1) Azul de Toluidina (SAKAI, 1973) para as análises histológicas dos tecidos epiderme, epicarpo e endoderme;
- 2) Xylidine Ponceau para detecção de compostos protéicos e possível análise das estruturas do fungo (CORTELLAZO, 2007);

- 3) Tricloreto férrico (JOHANSEN, 1940) para compostos fenólicos e cloreto de zinco iodado (JENSEN, 1962) para detectar amido nos tecidos estudados.

Depois de coradas, as lâminas histológicas foram montadas em resina sintética 'Entellan' e as imagens obtidas foram fotografadas.

3.6 Extração de RNA total

Foram preparadas duas bibliotecas, uma de albedo de frutos sadios (BAFS) e outra de albedo de frutos inoculados com *G. citricarpa* (BAFC). Para a construção de cada uma das bibliotecas de cDNA foram utilizados no total 30 frutos sendo 10 para cada período (6, 12 e 24 horas após a inoculação). O albedo das plantas inoculadas com *G. citricarpa* foi coletado a 2 cm de distância de onde ocorreu a inoculação, congelado imediatamente com nitrogênio líquido e estocado em ultrafreezer (-80°C). O mesmo foi feito com os frutos sadios inoculados apenas com água destilada. Foi preparado um 'pool' de tecido de albedo dos frutos dos três períodos diferentes (6, 12 e 24 horas após a inoculação) para a extração do RNA total.

Para a extração do RNA total, utilizou-se o protocolo do método de fenol (JONES; DUNSMUIR; BEDBROOK, 1985) com algumas modificações. Antes do início da extração, todo o material utilizado foi previamente tratado com água DEPC 0,01% e autoclavado na tentativa de prevenir a ação de RNAses, que degradam o RNA extraído. As soluções também foram preparadas com água DEPC. Para iniciar a extração, amostras de aproximadamente 700 mg de albedo do fruto congelado foi macerado em almofariz, previamente resfriado com nitrogênio líquido, até obter-se um pó fino que foi transferido para 6 tubos de centrifuga de 50 mL, adicionados de 6 mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e 9 mL de tampão NTES (NaCl 0,1M, Tris-HCl 10mM pH 7,5, EDTA 1mM, SDS 1%, e água DEPC 0,01%). Os tubos foram agitados vigorosamente durante 15 minutos à temperatura ambiente e logo em seguida, foram centrifugados a 10.600 x g por 10 minutos para separação das fases. A fase aquosa (superior) de cada tubo foi transferida para 6 tubos de centrifuga, aproximadamente 6 mL de cada amostra.

Repetiu-se mais duas vezes a limpeza fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). A fase aquosa (superior) formada em cada tubo foi transferida para 6 outros tubos de centrífuga limpos, nas duas repetições. Logo em seguida, foram adicionados ao volume obtido um décimo de acetato de sódio 3M (pH 4,5) e dois volumes de etanol absoluto (-20°C), homogeneizado e os tubos incubados a -20°C por uma hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.600 x g por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado formado correspondente ao RNA foi dissolvido em 2,5 mL de água DEPC 0,1% previamente resfriada, e nele foi adicionado 2,5 mL de LiCl 8 M. Em seguida, cada amostra foi incubada a 4° C durante a noite. No dia seguinte, cada amostra foi centrifugada a 10.600 x g por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi novamente dissolvido em 1,8 mL de água DEPC 0,1%, previamente resfriada, acrescida de 0,2 mL de acetato de sódio 3M (pH 4,5) e 4 mL de etanol (-20°C) e a amostra colocada a -20°C durante uma hora para precipitação do RNA. As amostras foram centrifugadas a 10.600 x g por 20 minutos e o sobrenadante de cada uma descartado.

Adicionou-se 5 mL de etanol 70% a cada amostra, a qual foi centrifugada durante 3 minutos a 10.600 x g. O etanol foi cuidadosamente descartado. Cada amostra foi seca durante duas horas a temperatura ambiente, ou até que todo o etanol 70% tivesse evaporado. O precipitado foi dissolvido em 200µL de água DEPC 0,1% resfriada.

A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotometria a 260 nm ($OD_{260} = 40 \mu\text{g de RNA mL}^{-1}$) e a qualidade determinada pelas razões A_{260}/A_{280} e $A_{260}/A_{230\text{nm}}$. A integridade do RNA total foi verificada por eletroforese em gel desnaturante de agarose 0,8 %. Este gel é composto de tampão MOPS 1X (0,02 M de 3-[N-morpholino] propanesulfonic acid, 0,005 M de acetato de sódio e 0,001 M EDTA) e 2,5 % de formaldeído. Para a visualização no gel foram utilizados 10 µg de RNA em tampão de carregamento (MOPS 1x, 17% de formaldeído, 50 % formamida, 5% glicerol, 0,25% de azul de bromofenol), as amostras foram desnaturadas por 15 minutos a 55°C, deixadas no gelo por 5 minutos, foi adicionado 3 µL de brometo de etídeo ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) para visualização das bandas (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989) e finalmente foram aplicadas no gel. O RNA foi precipitado em 1/10 do volume de NaOAc 3 M, pH 4,5 e 2

volumes de etanol absoluto e armazenado a -80°C . Este procedimento foi realizado tanto para o fruto sadio como para o fruto contaminado.

3.6.1 Isolamento do RNA mensageiro

A partir de 75 μg de RNA total das amostras de albedo de frutos sadios e de frutos inoculados com *G. citricarpa*, procedeu-se à obtenção do RNA mensageiro com auxílio do *Dynabeads® mRNA Purification Kit* (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante. A metodologia desse *kit* baseia-se no pareamento de bases entre resíduos poli A da extremidade 3' da maioria dos mRNAs e resíduos *oligo* dT covalentemente ligados à superfície dos *Dynabeads® Oligo* (dT)25. Assim, outros tipos de RNAs desprovidos de resíduos poli A não apresentam complementaridade aos *Dynabeads® Oligo* (dT)25 e são facilmente eliminados. Para isso, a amostra de 75 μg de RNA total foi ressuspensa em 100 μL de Água MilliQ tratada com DEPC e aquecida a 65°C por 2 minutos para quebra das estruturas secundárias.

Nesse intervalo, 200 μL (1 mg) de *Dynabeads® Oligo* (dT)25 foram transferidos do estoque para um tubo *Eppendorf*, para serem lavados duas vezes com auxílio do *Dynal MPC®*, um concentrador de partículas magnético. Após lavagem com tampão de ligação (20 mM Tris-HCl pH=7,5; 1 M LiCl; 2 mM EDTA; Água MilliQ tratada com DEPC completando o volume final; esterilizado por filtração com filtro Millipore 0,2 μM), os *oligos* (dT) foram ressuspensados em 100 μL de tampão de ligação e adicionados à amostra de 75 μg de RNA ressuspensas em 100 μL de Água DEPC. A amostra de RNA complexada aos *oligo* (dT)25, foi mantida sob agitação constante por 5 minutos à temperatura ambiente com auxílio de um agitador *sample mixer* (Invitrogen). Uma vez homogeneizada, a amostra foi colocada no concentrador de partículas. O sobrenadante foi removido depois de 30 segundos, e o precipitado lavado com 200 μL de tampão de lavagem B (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,15 M LiCl; 1 mM EDTA; Água MilliQ tratada com DEPC completando o volume final; esterilizado por filtração com filtro Millipore 0,2 μM).

Todas as lavagens foram realizadas com auxílio do concentrador magnético, sempre se descartando o sobrenadante e ressuspensando o material precipitado. Ao final das lavagens, o RNA mensageiro foi eluído pela adição de 20 µL de 10 mM Tris-HCl ao material precipitado e mantido a 65°C por 2 minutos. Os tubos foram imediatamente transferidos para o concentrador magnético *Dynal MPC®* e o RNA mensageiro eluído transferido para novos tubos *Eppendorf* livres de RNases.

3.6.2 Construção das bibliotecas de cDNA

Para construção das duas bibliotecas de cDNA (BAFS e BAFC) foi utilizado o kit *SuperScript™ Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning da Invitrogen*. Para tanto foram realizadas as seguintes etapas para cada biblioteca:

3.6.2.1 Síntese da primeira fita de cDNA

Ao RNA mensageiro extraído de cada amostra foram adicionados 2 µL de *Not I primer adapter* (0,5 µg/µL), um *primer oligo(dT)* associado a um adaptador contendo um sítio de restrição para a enzima *Not I* sendo a mistura aquecida a 70°C, por 10 minutos, em seguida resfriada em gelo, e centrifugada rapidamente. A seguir foram adicionados 4 µL de *First Standard Buffer 5X* [250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂]; 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µL de dNTP mix 10 mM]. Após a adição, os reagentes foram misturados e centrifugados rapidamente. Procedeu-se, então, a incubação por 2 minutos a 37 °C para equilibrar a temperatura. O passo seguinte foi a adição de 2 µL da enzima *Superscript II* e incubação a 37°C por 2 horas, sendo a reação finalizada no gelo.

3.6.2.2 Síntese da segunda fita de cDNA

Nesta etapa, foram adicionados os reagentes, em gelo, na seguinte ordem: 93µL de H₂O DEPC, 30µL de *Second Standard Buffer 5X* [100 mM Tris- HCl (pH 6,9), 450 mM KCl, 23 mM MgCl₂, 0,75 mM β-NAD⁺, 50 mM (NH₄)₂SO₄]; 3µL de dNTP mix 10 mM; 1µL de *E. coli* DNA ligase (10 U/µL); 4µL de *E. coli* DNA polimerase I (10 U/µL) e 1µL de *E. coli* Rnase H (2U /µL).

A reação foi homogeneizada e incubada por 2 horas a 16 ° C. Foram adicionados então 2µL de T4 DNA polimerase e continuou-se a incubação a 16 ° C por mais 5 minutos. A reação foi transferida para o gelo e em seguida foram adicionados 10µL de EDTA 0,5 M para interrompê-la completamente.

A seguir, foram adicionados 150µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) à reação, misturando-se completamente os reagentes e procedendo-se centrifugação por 15 minutos a 14.000 x g para a separação das fases. Ao sobrenadante recuperado foram adicionados 70µL de NH₄OAc 7,5 M e 500µL de etanol absoluto (-20 °C), os quais foram centrifugados imediatamente a 14.000 x g por 20 minutos à temperatura ambiente. Ao *precipitado* obtido foram adicionados 500µL de etanol 70% (-20 °C), seguindo-se de centrifugação 14.000 x g por 20 minutos à temperatura ambiente. O cDNA foi seco a 37 °C por 10 minutos para eliminar o etanol residual.

3.6.2.3 Adição do adaptador *SalI*

Nesta fase, o precipitado de cDNA obtido foi ressuspendido em 25µL de H₂O DEPC; e a ele foi adicionado 10µL de T4 Ligase *Buffer 5X* [250 mM Tris-HCl (pH 7,6), 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% (w/v) PEG 8000]; 10µL de Adaptador *Sal I* e 5µL de T4 DNA ligase.

Após homogeneização, incubou-se a 16 °C por 16 horas e adicionou-se 50µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) à reação, misturou-se e centrifugou-se a 14000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente para a separação das fases. Foi adicionado 25µL de NH₄OAc e 150µL de etanol absoluto (-20 °C) ao volume recuperado,

os quais foram centrifugados a 14.000 x g por 20 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e foram adicionados 500µL de etanol 70% (-20 °C) ao precipitado, procedendo-se nova centrifugação a 14.000 x g por 2 minutos à temperatura ambiente. O cDNA foi seco a 37° C por 10 minutos para a evaporação do etanol residual.

3.6.2.4 Digestão com *Not I*

Ao cDNA obtido foi adicionado os reagentes na seguinte ordem: 41µL de H₂O DEPC; 5µL de React III *buffer* e 4µL da enzima de restrição *Not I* (15 U/µL), fez-se a homogeneização e incubação por duas horas a 37 °C. Em seguida, adicionou-se 70µL de NH₄OAc 7,5 M e 500µL de etanol absoluto (-20 °C), os quais foram centrifugados imediatamente a 14.000 x g por 20 minutos à temperatura ambiente. Ao precipitado obtido foram adicionados 500µL de etanol 70% (-20 °C), seguindo-se de centrifugação 14.000 x g por 20 minutos à temperatura ambiente e o cDNA foi seco a 37 °C por 10 minutos para eliminar o etanol residual. O precipitado foi ressuspensionado em 100µL de *TEN buffer* [10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 mM EDTA; 25 mM NaCl].

3.6.2.5 Fracionamento do cDNA

O cDNA foi fracionado seguindo-se as especificações do *Kit Superscript TM Plasmid System with GatewayTM Technology for cDNA Synthesis and Cloning* (Invitrogen). Foram feitas, em uma coluna cromatográfica, sucessivas lavagens com *TEN buffer* obtendo-se no final 20 frações correspondendo ao tamanho dos fragmentos a serem clonados posteriormente. A amostra de cDNA (100µL) foi adicionada à coluna e o efluente coletado no tubo numerado 1. Em seguida, foram adicionados 100µL de *TEN buffer* à coluna e coletado o efluente completamente no tubo de número 2. Adicionou-se uma alíquota de 100µL de *TEN buffer* na coluna, e cada gota efluente foi colocada em um tubo *Eppendorf*. Coletou-se um total de 18 gotas iniciando no tubo de número 3 indo até o tubo de número 20, 1 gota por tubo, sendo que cada 100µL corresponderam a 3 gotas. Usando-se uma pipeta automática, mediu-se o volume de

cada tubo, registraram-se cada valor em uma tabela e foi calculado o volume acumulativo. Identificou-se então, a fração para a qual o valor acumulativo estivesse mais próximo, mas não excedendo a 550µL. Estas frações, que excederam os 550µL normalmente correspondentes aos tubos do número 15 ao 20, não foram utilizadas para a ligação por conterem cDNAs pequenos (menores que 500 pb) e adaptadores não ligados.

Foram selecionadas as cinco frações anteriores que provavelmente apresentavam insertos maiores às aquelas que foram desprezadas para dar início ao processo de clonagem.

3.6.2.6 Ligação ao vetor pSPORT 1

O cDNA fracionado (1-2µL) foi empregado nas reações de ligação, adicionado-se 0,5µL de vetor *pSPORT 1* (50ng/µL); 2,0µL de Tampão da ligase [250 mM Tris-HCl (pH 7,6), 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% (w/v) PEG 8000]; 1,0µL da enzima T4 DNA ligase (1 U/µL), em um volume final de 10µL. Após homogeneização dos reagentes, as reações foram incubadas a 16 °C por 16 horas.

3.6.2.7 Transformação por choque térmico

A transformação foi feita por choque térmico, onde cada reação de ligação (10µL) foi acrescentada de uma alíquota de 100µL de *E. coli* DH5α competente, que foi incubado por 20 minutos em gelo e, então, submetido a um choque térmico a 42°C por 3 minutos e colocado novamente em gelo por 2 minutos. Imediatamente foram adicionados às células 900µL de meio SOC (triptona 2 %, extrato de levedura 0,5 %; 10 mM NaCl; 10 mM MgCl₂ ; 2,5 mM KCl e 100 mM MgSO₄). As amostras foram incubadas por 1 hora a 37 °C.

O volume total da reação de transformação (1 mL) foram plaqueados em placas contendo meio LB ágar (triptona, extrato de levedura, NaCl e ágar) com ampicilina (100µg/mL), acrescidos de 20 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-galactopiranosídeo

(X-Gal) e de 100 mM de β -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo (IPTG). As placas foram mantidas invertidas na estufa a 37°C por 12 horas.

3.7 Análise das bibliotecas de cDNA

3.7.1 PCR das colônias transformadas

Para verificar a presença e o tamanho do inserto clonado, realizou-se uma Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) do DNA de colônias transformadas obtidas após a transformação. As colônias foram plaqueadas em placas contendo 96 poços e uma réplica foi colocada para crescimento em meio líquido LB com ampicilina (100µg/mL) por 16 horas a 37°C, sob agitação constante de 220 rpm. A reação para a realização da PCR utilizada foi: 3µL de Tampão KCl, 2µL $MgCl_2$ 25mM, 1,5µL dNTP 2mM, 1,2µL de *primer* (5pmol/µL) pUCM13*Forward* (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'), 1,2µL de *primer* (5pmol/µL) pUCM13*Reverse* (5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'), 19,9µL de água Milli-Q e 0,2µL de Taq DNA polimerase, completando com Água MilliQ um volume de 30µL. A mistura da reação foi colocada no termociclador e submetida a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de: 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 65°C e 3 minutos a 72°C; 72°C por 5 minutos; e a 4°C finalizando a reação da PCR.

3.7.2 Purificação da reação da PCR

Para a purificação de cada amostra da PCR realizada foi adicionado 20µL de NH_4OAc e agitou-se em vórtex, adicionou-se 80µL de etanol 100%, agitou-se em vórtex misturando bem as soluções e centrifugou-se por 45 minutos a 4°C a 1700 x g rpm. Logo em seguida, estas soluções foram descartadas e adicionou-se 150µL de etanol 70%, foram centrifugadas novamente por 15 minutos a 4°C a 4000 rpm, e depois descartou-se o etanol residual. As amostras de DNA foram então secas por 1 hora a 37°C, e logo em seguida o DNA de cada amostra foi ressuspendido em 20µL de água

MilliQ. As amostras de DNA foram aplicadas em gel de agarose 0,8%, para conferência da qualidade, tamanho do inserto e concentração do DNA obtido, sendo comparado com o padrão Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

Foram selecionados para serem sequenciados e estocados apenas os clones com insertos maiores do que 550 pb. Os clones foram estocados em meio CG com 16% de glicerol e guardados em freezer -80°C.

3.8 Sequenciamento de cDNAs

A reação de sequenciamento dos clones selecionados foi realizada segundo as especificações do *DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham Biosciences). Ao DNA plasmidial foram adicionados 3µL de tampão “*Save money*” (TRIS 200 mM, pH 9,0; MgCl₂ 5 mM), 1µL de *DYEnamic ET Terminator* (Amersham Biosciences) e 1µL de *primer* 5 pmoles/µL SP6 (5' –ATTTAGGTGACACTATAG-3'). O volume foi ajustado para 10µL com água MilliQ esterilizada. A mistura da reação foi submetida a 30 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 55°C e 1 minuto a 60°C, no termociclador (Applied Biosystem). A purificação das amostras foi realizada adicionando 1µL de NaOAc 1,5 M, pH 8,5, EDTA 250 mM e 100µL de etanol absoluto (-20°C). Após centrifugação a 1700 x g, a 4°C, durante 45 minutos, o etanol foi descartado e o DNA foi lavado com 150µL de etanol 70 % (-20°C). Foi realizada mais uma centrifugação a 1700 x g, a 4°C, por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado, o DNA foi seco à 37°C durante 1 hora e ressuspendido em 10µL com *Hi Di Formamide* (Applied Biosystem). Os clones foram submetidos ao sequenciamento automático utilizando sequenciador ABI 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystem).

3.9 Análises das sequências

Os cromatogramas gerados no sequenciamento dos clones foram utilizados para a análise dos dados em programas de bioinformática. Os programas utilizados para o início do processamento das sequências foram *Phred/Cap3/Consed* (EWING; GREEN,

1998; HUANG; MADAN, 1999; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998) que avaliaram as sequências quanto à qualidade de bases, eliminando as sequências de vetor, adaptadores e sequências poli(A), e realizaram o agrupamento de várias ESTS mediante a sobreposição das bases (*contigs*), de acordo com os critérios do programa *Cap3* com padrão de similaridade de 30 pb com identidade de 90% (HUANG; MADAN, 1999).

Para as sequências geradas no estudo foram considerados como sequências válidas (*reads*) aquelas com mais de 100 bases com qualidade superior a 20 (um erro a cada 100 bases sequenciadas). As sequências que não atingiram esse parâmetro foram descartadas da análise.

3.9.1 Redundância das sequencias obtidas

As sequências selecionadas a partir dos parâmetros de qualidade estabelecidos (100 bases com qualidade *Phred* superior a 20) foram submetidas à clusterização pelo programa *Cap3* (HUANG; MADAN, 1999). Este programa permitiu a montagem dos *contigs*, onde as sequências válidas referentes a uma mesma sequência consenso foram alinhadas por regiões com alta qualidade de bases.

Para a análise de redundância destas bibliotecas de cDNA de albedo de laranja, os *contigs* constituídos a partir de 9 EST foram considerados altamente expressos, sendo que os *contigs* constituídos de 4 a 8 EST foram considerados de média expressão.

3.9.2 Anotação e categorização funcional das sequências

Uma vez obtidos os dados do sequenciamento das moléculas de cDNA foi realizado a identificação de cada uma das sequencias obtidas. Todas as sequencias das ESTs válidas foram comparadas às depositadas aos bancos de dados, utilizando-se o *GenBank* (BENSON et al., 1999) e programa *Blastx* (ALTSCHUL et al., 1990) e

também às sequências do banco específico de *Citrus*, o *CitEST* (TARGON et al., 2007) utilizando-se o programa *Blastn* (ALTSCHUL et al., 1990) para identificar as sequências pelo grau de similaridade entre elas.

Os resultados obtidos nestas análises, tanto no *GenBank* como no *CitEST* foram agrupados de acordo com o e-value obtendo-se, desta forma, 4 grupos: sequências com alta significância (e-value de 0,0 a $\leq 10^{-20}$), média significância (e-value de 10^{-5} a 10^{-19}), baixa ou nenhuma significância (e-value $> 10^{-5}$) e sem similaridade (*no hit*). Somente as identificações de sequências com alta e média significância, juntamente com os *no hit* foram anotados manualmente.

Após a identificação dos genes expressos no albedo dos frutos de laranja 'Pêra' inoculados com *G. citricarpa* e sadios, estes foram classificados em categorias e subcategorias de acordo com suas funções bioquímicas descritas na Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto – KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) e analisados no *FunCat* (RUEPP et al, 2004) do Centro de Proteínas e Categorias Funcionais de Sequências de Munique – MIPS (<http://mips.gsf.de/>) de acordo com o descrito por Freitas-Astúa et al. (2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A mancha preta dos citros, causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* causa danos em todas as espécies cítricas de valor comercial. Em laranjeiras doces, os sintomas são mais severos nas variedades médio-tardias (Pêra) ou tardias (Valência) (FEICHTENBERGER, 1996). Para a realização dos experimentos deste trabalho foram selecionadas frutos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pêra', pois além de desenvolver todos os sintomas típicos da doença é uma das variedades de laranja mais consumidas como fruta fresca no mercado brasileiro.

Os tecidos do flavedo dos frutos sadios e inoculados com *G. citricarpa* foram analisados individualmente por microscopia eletrônica quanto à adesão, tentativa de entrada deste no hospedeiro, desenvolvimento de estruturas reprodutivas do fungo e análise comparativa nos períodos após inoculação: 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas.

A análise das Figuras 3 e 4 mostram a cinética da evolução dos conídios do fungo *G. citricarpa* logo após a inoculação nos frutos de laranja doce cv. 'Pêra'. Na Figura 3A e 3B são apresentados conídios do fungo 0 e 6 horas, respectivamente, após a inoculação do fruto. As setas destas figuras apontam para o conídio que ainda não germinou, e também não se aderiu à superfície do hospedeiro. Na Figura 3C correspondente a 12 horas após a inoculação, observou-se que o conídio do fungo possivelmente encontra-se aderido à superfície do fruto, devido maior superfície do conídio estar em contato com o tecido do fruto, conforme indicado pela seta. Esta etapa de aderência do patógeno no hospedeiro é chamada de pré-penetração, e ocorre devido à liberação de materiais adesivos produzidos pelo patógeno (LEITE et al., 2001). Porém, estes materiais liberados não foram observados na adesão do fungo *G. citricarpa* na superfície do fruto.

A adesão é considerada pré-requisito essencial durante a patogênese de fungos (NICHOLSON; EPSTEIN, 1991), sendo que a atração e o contato entre patógeno e hospedeiro fazem parte das fases iniciais da interação planta-patógeno (LEITE et al., 1997).

Figura 3 - Aspecto dos conídios de *Guignardia citricarpa* em microscópio eletrônico de varredura 0, 6, 12 e 24 horas após a inoculação (h.a.i.) em frutos de laranja doce 'Pêra'. A-B. 0 e 6 (h.a.i.) respectivamente, as setas indicam o conídio do fungo não germinado. C. Aderência do conídio do fungo (seta) à superfície do fruto, 12 h.a.i. D. Início da formação do tubo germinativo (ponta da seta) pelo conídio (seta) 24 h.a.i. (A) barra = 10 μ m. (B, C e D) barra = 5 μ m. ES = estômato. Sup= superfície do fruto

Considerando-se os subprocessos de pré-penetração e penetração, torna-se evidente que a penetração e infecção somente serão atingidas se houver adesão adequada estabelecendo assim as relações parasitárias estáveis entre fungo e planta (AMORIM, 1995). Portanto, a adesão é o primeiro passo da garantia da penetração e infecção do fungo. Mercure, Kunoh e Nicholson (1994) afirmam que a adesão do

esporo na superfície hospedeira influência no desenvolvimento da doença, pois, uma rápida adesão destes esporos é relevante para o sucesso do estabelecimento do patógeno. Leite et al. (2001) afirmam ainda que a capacidade de aderir, parece ser, antes de tudo, um fator de virulência.

Para que o resultado de uma infecção seja positivo após a adesão do patógeno deve ocorrer o crescimento do tubo germinativo sobre a superfície do hospedeiro, o que foi verificado 24 horas após a inoculação (Figura 3D). A seta aponta para o conídio que está começando a formar o tubo germinativo, indicado pela ponta da seta.

Na Figura 4A, observa-se que o tubo germinativo, formado pelo conídio (seta) já está desenvolvido (48 h.a.i), e a ponta da hifa pronta para se modificar e formar o apressório.

A ponta da hifa também é responsável pela liberação de enzimas degradadoras da parede celular que facilita a penetração do fruto pelo patógeno (LEITE et al., 2001). O início da formação do apressório foi verificado também 48 horas após a inoculação (Figura 4B), sendo indicado pela seta.

As Figuras 4C e 4D mostram a evolução dos conídios 72 horas após a inoculação do fruto. A Figura 4C mostra claramente a formação e desenvolvimento do apressório indicada pela ponta da seta. A Figura 4D mostra que grande parte dos esporos já germinaram e possuem os tubos germinativos, e cada qual já está iniciando a formação do apressório.

A utilização da MEV garantiu a observação da viabilidade dos conídios de *G. citricarpa* inoculados nos frutos de laranja 'Pêra'.

Mesmo que a penetração do patógeno não tenha sido observada, o desenvolvimento desta etapa de microscopia de varredura permitiu analisar as estruturas reprodutivas do patógeno numa cinética de infecção e foi fundamental para a realização dos próximos experimentos, pois além de garantir a viabilidade dos conídios do fungo *G. citricarpa* também indicou qual o período da cinética de infecção seria mais indicado para a retirada do albedo para a construção das bibliotecas de cDNA para identificação dos genes diferencialmente expressos na condição de interação da planta com o patógeno.

Figura 4 - Aspecto do conídio de *Guignardia citricarpa* em microscópio eletrônico de varredura 48 e 72 horas após inoculação (h.a.i) em frutos de laranja doce 'Pêra'. A. O tubo germinativo totalmente desenvolvido é indicado pela seta, 48 h.a.i. B. Início da formação do apressório (seta) 48 h.a.i. C. Desenvolvimento do apressório 72 h.a.i dos frutos (seta). D. Início da formação do apressório por inúmeros conídios (72 h.a.i). (A, C e D) barra = 5 µm; (B) barra = 2 µm; TG= Tubo Germinativo.

4.2 Análise morfo-anatômica das plantas

Para a análise morfo-anatômica foram utilizados tecidos com aproximadamente 125 mm³ (flavedo e albedo) dos frutos inoculados com o fungo *G. citricarpa* em 6 períodos diferentes: 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação. Estes tecidos foram analisados individualmente quanto à penetração do patógeno, busca de estruturas do

fungo dentro da planta inoculada e modificações estruturais no tecido vegetal característico da resposta do hospedeiro à entrada do patógeno.

Para as análises diferenciais da estrutura anatômica dos tecidos dos frutos inoculados com o fungo *G. citricarpa* utilizou-se o corante azul de Toluidina (SAKAI, 1973).

As figuras 5A, 5C, 6A, 6C, 7A e 7C correspondem aos tecidos dos frutos inoculados com água destilada analisados às 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação, respectivamente.

Figura 5 - Análise diferencial dos tecidos do fruto de laranja doce 'Pêra' sadio e inoculado com o fungo *G. citricarpa* (0 e 6 horas). A. Fruto sadio 0 hora. B. Fruto 0 h.a.i do fungo. C. Fruto sadio 6 horas h.a.i.. D. Fruto 6 h.a.i do fungo. (A-D) barra=200 μm. E= epiderme. Ep= epicarpo. En= endoderme. Es= Estômato

As análises destes tecidos mostraram que não houve alteração nas células do epicarpo e da endoderme, mesmo após as 72 horas dentro da BOD com temperatura e luz constante. As figuras 5B, 5D e 6B correspondem aos tecidos dos frutos inoculados com o fungo *G. citricarpa* às 0, 6 e 12 horas, respectivamente, após a inoculação. As observações dos tecidos, epicarpo e endoderme, mostraram que até as 12 horas após a inoculação dos frutos as células destes tecidos mantiveram-se sem alterações.

Contudo, a primeira alteração observada mostra que as células do epicarpo apresentam-se lesionadas logo após 24 horas da inoculação como pode ser observado pelas setas na Figura 6D.

Figura 6 - Análise diferencial dos tecidos do fruto de laranja doce 'Pêra' sadio e inoculado com o fungo (12 e 24 h.a.i.) *G. citricarpa*. A. Fruto sadio 12 h.a.i.. B. Fruto inoculado 12 h.a.i. C. Fruto sadio 24 h.a.i.. D. Fruto inoculado 24 h.a.i. (A-D) barra= 200 μm. E= epiderme. Ep= epicarpo. En= endoderme

Estas lesões são sintomas característicos de defesa vegetal contra o ataque de patógenos (SILVA; ALQUINI; CAVALLET, 2004). O aumento da quantidade de células lesionadas (indicado pelas setas) no decorrer do tempo da cinética de infecção, pode ser observado nas Figuras 7B e 7D que correspondem aos tecidos dos frutos inoculados 48 e 72 h.a.i., respectivamente.

Figura 7 - Análise diferencial dos tecidos do fruto de laranja doce 'Pêra' sadio e inoculado com o fungo *G. citricarpa* (48 e 72 h.a.i.). A e C. Frutos sadios 48 e 72 h.a.i. com água destilada, respectivamente. B. Fruto 48 h.a.i com o fungo. D. Fruto 72 h.a.i. com o fungo. (A-D) barra= 200 μ m. E= epiderme. Ep= epicarpo. En= endoderme

Estas lesões também foram verificadas em uma interação do patógeno *Stemphylium solani* em tomateiro, onde os autores verificaram um intenso colapso das

células do mesófilo após 36 horas de inoculação de folhas de tomate com uma suspensão conidial deste patógeno (BENTES; MATSUOKA, 2004).

Em planta resistente a este patógeno citado, mesmo havendo um atraso das lesões, estes autores verificaram que após 48 horas da inoculação das folhas, as células do mesófilo mostraram-se lesionadas. Estas lesões podem ser vistas como uma tentativa de interromper a entrada do patógeno, ou pelo menos, atrasar a penetração, enquanto os genes de resistência da planta são ativados.

4.2.1 Análise morfo-anatômica para detecção do fungo

Na tentativa de detecção das estruturas do fungo e de compostos protéicos a análise anatômica foi realizada utilizando o corante Xylidine Ponceau (CORTELLAZO, 2007). O resultado deste teste foi negativo. Não há relatos na literatura de quanto tempo leva para que o fungo *G. citricarpa* penetre nos tecidos do fruto, e esta cinética feita analisando 5 períodos diferentes após inoculação não foi suficiente para tal observação.

Diferentes autores conseguiram encontrar o tempo em que ocorreu a penetração de patógenos em plantas utilizando-se da cinética de infecção. Bentes e Matsuoka (2004) observaram a entrada do fungo *Stemphylium solani* em tomateiro 12 horas após a inoculação. Brunelli et al. (2005) verificaram a penetração do fungo *Stenocarpella macrospora* em folhas de milho por estômatos abertos 27 horas após a inoculação. Baptista et al. (1999) verificaram que entre isolados da mesma espécie há diferenças quando se compara o tempo para a penetração no hospedeiro. Após 24 horas da inoculação de plântulas de *Eucalyptus urophylla* com um isolado do patógeno *Pisolithus tinctorius* observou-se na superfície da epiderme presença do micélio do fungo. Enquanto que a inoculação da planta com outro isolado do mesmo patógeno apresentou estruturas do fungo só depois de 96 horas da inoculação (BAPTISTA et al., 1999).

Com base nestas informações, há a necessidade de um estudo mais ampliado para encontrar quanto tempo é necessário para o fungo penetrar na planta após ser

inoculado. Isto pode ser feito aumentando o espaço de tempo das análises após a infecção do patógeno no hospedeiro e utilizando-se da microscopia de transmissão. Esta metodologia demonstra ser mais eficiente para a análise da profundidade de entrada das estruturas reprodutivas do patógeno no tecido do hospedeiro (BRUNELLI et al., 2005).

4.2.2 Análise morfo-anatômica para detecção de amido

Numerosos relatos indicam que o metabolismo de carboidratos é influenciado pelo ataque de patógenos (TECSI et al., 1996). De acordo com Shalitin e Wolf (2000) a inibição do acúmulo de amido e ou degradação durante o processo de infecção de um patógeno é provavelmente devido ao aumento da procura de açúcares solúveis necessário para manter a alta taxa de respiração. Kocal, Sonnewald e Sonnewald (2008) propuseram que a redução da quantidade de amido está diretamente relacionada com a necessidade da planta em acumular açúcares solúveis, visto que este acúmulo é um sinal para a ativação de genes de defesa da planta.

Quando se observou as células dos cortes dos frutos de citros reagindo com o corante cloreto de zinco iodado às 0, 6, 12, 24 e 48 h.a.i com *G. citricarpa*, não foram detectadas diferenças na quantidade de amido das células do epicarpo. Já na análise feita neste tecido após 72 horas da inoculação foi observada ausência de amido. Na Figura 8A pode-se observar o grande acúmulo de grãos de amido nas células do epicarpo formando uma camada extensa e evidente. Enquanto na Figura 8B as células dos frutos apresentam-se sem amido 72 horas após terem sido inoculadas com o fungo.

O início da redução da quantidade de amido presente nas células relaciona-se com o aumento da expressão e da atividade da enzima invertase, responsável pela quebra do amido em hexoses (BERGER; SINHÁ; ROITSCH, 2007). O sucesso de defesa da planta contra o patógeno esta diretamente relacionada com o acúmulo de hexoses, pois estas agem como transportadores de sinais moleculares que são responsáveis por induzir genes relacionados com a defesa (HERBERS et al., 2000).

Foi observado que plantas transgênicas de tabaco que superexpressavam uma invertase de levedura, quando inoculadas com um vírus deixavam de apresentar os

sintomas característicos desta interação (HERBERS et al., 2000). A superexpressão da invertase foi responsável por uma redução na quantidade de amido armazenado e houve aumento na taxa de hexoses metabolizáveis. Este fenômeno, segundo os autores, foi acompanhado pela inibição da capacidade fotossintética e aumento das transcrições de genes de resistência.

Figura 8 - Análise diferencial dos tecidos do fruto de laranja doce 'Pêra' sadio e inoculado com o fungo *G. citricarpa* reagindo com cloreto de zinco iodado. A. Grãos de amido nas células do epicarpo do fruto 72 h.a.i com água. Ausência de amido nas células do epicarpo (seta) do fruto 72 h.a.i com o fungo. (A-B) barra= 200 μ m. E= epiderme. Ep= epicarpo. En= endoderme

Mas, há em contrapartida, uma relação conflitante causada pelo acúmulo destas hexoses, pois, durante a fase da infecção do hospedeiro pelo patógeno este acúmulo de hexoses serve também como nutriente para o patógeno, auxiliando-no no desenvolvimento da doença (SEO et al., 2007).

Em plantas de tomate transgênicas apresentando o gene da invertase silenciado, quando inoculadas com o patógeno *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*, apresentaram um atraso no aparecimento dos sintomas típicos da doença (KOCAL; SONNEWALD; SONNEWALD, 2008). Os autores concluíram com isto, que esta enzima é essencial, pois as hexoses geradas são responsáveis pela ativação dos genes de defesa, e estes pelo reconhecimento das proteínas de avirulência do patógeno e consequentemente com isto o aparecimento dos sintomas. Estes autores verificaram também, que nesta interação o patógeno não se nutriu com as hexoses geradas, pois,

o crescimento da bactéria foi normal mesmo na ausência das hexoses. Os resultados obtidos mostraram que o patógeno possivelmente utiliza outros nutrientes do apoplasto presente nas células como ácidos orgânicos e aminoácidos.

Outros autores estudando a interação de citros com patógenos também identificaram esta redução na quantidade de amido. Marques et al. (2007) ao verificarem lesões em ramos e folhas de laranjeiras causadas pela leprose dos citros mostraram que em tecidos infectados há a ausência de amido diferindo do tecido sadio. Já Freitas-Ástua et al. (2007) em sua análise molecular da interação citrus-leprose identificaram a ativação de diversas enzimas após a entrada do patógeno, envolvidas na via de degradação do amido, dentre elas uma sacarose sintase e uma glicose-6-fosfato isomerase.

Conforme observado, 72 horas após a inoculação dos frutos houve redução da quantidade do amido nas células do epicarpo o que está diretamente relacionado com a defesa da planta contra o patógeno, comprovando que a planta já apresenta resposta de defesa. Outro aspecto na interação de plantas com patógenos decorrente da diminuição do amido vem a ser a deposição de calose e produção de compostos fenólicos produzidos a partir de esqueletos carbônicos formados com a redução do amido em açúcares solúveis (HERBERS, 1996).

4.2.3 Análise morfo-anatômica para detecção de compostos fenólicos

O teste realizado para detectar a presença de compostos fenólicos durante a cinética de infecção foi realizado utilizando o corante tricloreto férrico (JOHANSEN, 1940). Nas análises feitas com este corante nos tecidos dos frutos 0, 6, 12, 24 e 48 h.a.i mostram que não houve reação dos tecidos com o corante. Porém, 72 horas após a inoculação observou-se um acúmulo de compostos fenólicos na epiderme e células do epicarpo. A Figura 9 compara as células de fruto sadio (Figura 9A) com o fruto 72 horas após a inoculação com o fungo *G. citricarpa* (Figura 9B).

Os compostos fenólicos vegetais podem ser didaticamente divididos em duas classes gerais: aqueles que são sintetizados durante o desenvolvimento normal dos

tecidos da planta (DEY; HARBORNE, 1997) e os que são sintetizados pelas plantas em resposta a uma injúria física, infecção (bactéria, fungo, nematóides e vírus) ou qualquer outro tipo de estresse (nutricional, hídrico, poda, etc) (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992).

Figura 9 - Análise diferencial dos tecidos do fruto de laranja doce 'Pêra' sadio e inoculado com o fungo *G.citricarpa* reagindo com tricloreto férrico. A. Fruto sadio 72 (h.a.i. com água. B. Fruto 72 h.a.i. com *G. citricarpa* (A-B) barra = 200µm. E= epiderme. Ep= epicarpo

Compostos fenólicos em citros, como em outras angiospermas em geral, são produtos do metabolismo secundário, que se acredita ser resultante da interação planta e fatores adversos do ambiente (CARDOSO FILHO, 2003). Marten e Kneusel (1988) propuseram que a estratégia defensiva das plantas envolveria o rápido acúmulo de compostos fenólicos no sítio de infecção, que tem como função impedir ou diminuir o crescimento do patógeno e permitir a ativação de respostas de defesas secundárias como as fitoalexinas, proteínas-PR, espécies reativas de oxigênio e outros compostos relacionados a este tipo de estresse.

Baptista et al. (1999), verificaram um aumento na quantidade de compostos fenólicos na interação *Eucalyptus urophylla* com um isolado do patógeno *Pisolithus tinctorius* 96 horas após a inoculação, este aumento ficou restrito a este período. Os autores concluíram que este fato estaria relacionado ao início da penetração do fungo. Marques et al. (2008) verificaram a presença de compostos fenólicos em frutos com

sintomas já desenvolvidos, típicos da doença pinta preta em citros, mostrando que não há a presença destes nos frutos sadios.

A verificação da presença de compostos fenólicos apenas nos frutos inoculados 72 horas após inoculação deixa evidente a resposta da planta contra o ataque do fungo patogênico, e indica que o fungo deve estar presente nos tecidos do fruto neste período após a infecção. Desta forma períodos próximos a 72 horas após inoculação ou infecção devem ser cruciais na penetração das estruturas infectivas de *G. citricarpa* nos tecidos do fruto. Apesar de não ter sido observado a penetração de apressórios nos tecidos de citros tanto nas análises de microscopia de varredura como nas análises morfo-anotômicas, podemos inferir que este período é crucial na interação do fungo com o fruto ativando as reações de defesa das células.

4.3 Análise das bibliotecas de cDNA

4.3.1 Construção das bibliotecas de cDNA

A construção de bibliotecas de cDNA e seu sequenciamento geram as ESTs que representam o perfil de expressão de uma célula ou organismo, em um curto espaço de tempo (FARIA-CAMPOS et al., 2003).

Esta etapa da pesquisa teve como objetivo o sequenciamento de cDNAs que se expressam no albedo de frutos sadios e de frutos inoculados com *G. citricarpa* para buscar genes relacionados com mecanismos de defesa desta interação.

O albedo e o flavedo de laranja já foram citados por apresentarem efeito anti-fúngico na inibição de *Phomopsis citri in vitro* (EL-TOBSHY; SINCLAIR, 1964). E isto possivelmente se deve ao fato destes tecidos possuírem compostos fenólicos sintetizados durante o desenvolvimento normal das plantas (DEY; HARBORNE, 1997). Góes (1998), Cardoso-Filho (2003) e Toffano (2005) relataram que o fungo *G. citricarpa* e as respostas do hospedeiro ao patógeno ficam restritas somente no tecido do flavedo (tecido mais externo). Marques et al. (2008), contradizendo estes autores, verificaram

que em frutos com sintomas de mancha dura da pinta preta, apresenta danos no flavedo, mas que estes são mais intensos no albedo.

Devido a isto, os fatores e as respostas da planta ao fungo *G.citricarpa* devem se concentrar no albedo, visto que, não há relatos de que o fungo penetre na endoderme (camada mais interna) e altere as propriedades qualitativas do fruto como acontece em frutos de laranjeira 'Valência' contaminadas com o vírus da tristeza, em que o teor de sólidos solúveis (⁰Brix) é alterado (BORDIGNON et al., 2003). O albedo deve ser uma barreira contra o fungo *Guignardia citricarpa* impossibilitando uma colonização mais profunda do fruto.

Tecidos do albedo de frutos de citros foram coletados 6, 12 e 24 horas pós terem sido inoculados com *G. citricarpa* para a extração do RNA total. Foi preparado um 'pool' destes tecidos. Logo após 6 horas da cinética de infecção, o patógeno ainda não havia germinado, mas estava em contato com o hospedeiro. As 12 h.a.i. o conídio do fungo já se encontrava aderido ao hospedeiro, e as 24 h.a.i. começava a formação do tubo germinativo. Mesmo não tendo constatado o exato momento da penetração do patógeno no hospedeiro, o fator adesão foi levado em consideração, pois de acordo com Leite et al. (2001) a adesão do patógeno no hospedeiro ativa uma complexa cascata de transdução de sinais que é mobilizada no processo de reconhecimento entre patógeno e hospedeiro e posterior defesa do hospedeiro ou instalação da doença. E assim também, o início da formação do tubo germinativo que corresponde a uma das etapas de infecção de fungos patogênicos. O mesmo foi feito com os frutos inoculados apenas com água destilada.

Para a extração do RNA total do albedo foram necessários testes de muitos métodos, pois sendo o albedo constituído por uma camada de células esponjosas brancas, rico em hemicelulose, celulose, lignina, glicídeos solúveis, pectina e muitos compostos fenólicos (MENDONÇA et al., 2006) a extração de um RNA íntegro foi dificultada. O RNA total íntegro, puro e em quantidade são essenciais, pois é a partir deste que se faz a seleção do RNA (poli) A⁺ que compreende a maioria das mensagens presentes na célula (RNA mensageiro). Sendo o cDNA a cópia da mensagem, as impurezas advindas do RNA total com certeza dificultariam as etapas sequenciais.

É de conhecimento a dificuldade de se conseguir um RNA de boa qualidade de tecidos com altos níveis de compostos fenólicos, e pectinas que se precipitam juntamente com o RNA (SALZMAN et al., 1999; KITA et al., 2000; TAO et al., 2004), e este é o caso dos tecidos de citros. Tao et al. (2004) desenvolveram um protocolo que se utilizava a desidratação do tecido de citros com etanol absoluto. Este protocolo foi testado, mas não garantiu um RNA de boa qualidade para o tecido utilizado.

Neste trabalho foi utilizado o método do fenol (JONES; DUNSMUIR; BEDBROOK, 1985) com algumas modificações, por ter se mostrado eficiente. As modificações incluíam duas etapas adicionais de limpeza com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), o que aumentava a pureza do RNA extraído, porém diminuía a quantidade total. Para obter a quantidade de RNA necessária, realizou-se a extração de 35 amostras do albedo para cada biblioteca.

As amostras de RNA extraídas foram submetidas à quantificação através de leitura espectrofotométrica e para verificação da integridade do RNA fez-se um gel de agarose desnaturante (Figura 10). A maioria das amostras de RNA, aproximadamente 90%, obtidas com este método de extração garantiu na análise do espectrofotômetro boa qualidade, pois se apresentava sem proteínas e compostos fenólicos.

Figura 10 - Amostras do RNA do albedo de citros visualizadas em gel de agarose desnaturante. A. RNA total do fruto sadio. B-C. RNA total de duas amostras individuais do albedo do fruto inoculado com *G. citricarpa*

Após a verificação da qualidade do RNA total as amostras com uma boa integridade e pureza foram submetidas para a seleção do RNA mensageiro e construção da biblioteca de cDNA. Das frações resultantes no processo de síntese do cDNA, cinco frações foram selecionadas para serem clonadas no vetor pSPORT1 (INVITROGEN).

Para a verificação do tamanho dos insertos clonados e seleção dos clones para serem estocados e sequenciados foi realizada PCR das colônias transformadas e conferência em gel de agarose 1% (Figura 11). Aproximadamente 500 clones de cada uma das bibliotecas geradas que apresentaram insertos maiores que 550 pb foram estocados em freezer -80°C.

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR. DNA de citros de diferentes clones demonstra o tamanho dos insertos no vetor pSPORT1

Foram preparadas duas bibliotecas de albedo do fruto de laranja 'Pêra'. Uma de um 'pool' de tecidos do albedo de citros sadio (BAFS) e outra de um 'pool' de tecidos do albedo infectado com *G. citricarpa* após 6,12 e 24 horas (BAFC). As duas bibliotecas estão armazenadas no Laboratório de Biologia Molecular e Genômica do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP.

4.3.2 Análise das sequencias

Dos 1000 clones de ESTs do albedo do fruto de laranja 'Pêra' (sadio e inoculado) gerados, 600 clones foram selecionados para o sequenciamento, sendo 200 da BAFS e 400 da BAFC. As sequências obtidas passaram por uma análise de qualidade utilizando ferramentas de bioinformática realizando um pré-processamento que incluiu o corte e a remoção das sequências com baixa qualidade. Nas sequências de boa qualidade, foram retiradas as regiões correspondentes a vetores, *primers* e sequências que apresentaram tamanho inferior a 100 pb com qualidade (*phred* <20). Também foram eliminadas sequências contaminantes, onde os insertos correspondiam a sequências mitocondriais, ribossomais e humano (EWING; GREEN, 1998).

Ao final deste processo foram obtidas 554 sequências válidas, sendo 184 da BAFS e 370 da BAFC, resultando em um índice de sucesso de 92%. Este alto índice de sucesso está relacionado com a boa qualidade do sequenciamento, sendo que apenas 5,9 % das sequências foram removidas por baixa qualidade, e 2,1% das sequências foram eliminadas por terem apresentado tamanho considerado insatisfatório (menor que 100 pb com qualidade Phred <20).

4.4 Análise das ESTs

4.4.1 Distribuição e frequencia das ESTs em *singletons* e *contigs*

Na montagem dos contigs com as sequencias válidas utilizando o programa Cap3 (HUANG; MADAN, 1999) obteve-se da BAFS 112 sequências únicas (60%) e as 72 sequências restantes foram distribuídas em 7 *contigs* contituídos pela sobreposição de 2 a 15 sequências de ESTs (Anexo A). Já na BAFC foram obtidas 212 sequências únicas (57%) e foram formados 17 *contigs* com 2 a 22 sequencias de ESTs sobrepostas (Anexo B).

Os dados obtidos nas bibliotecas BAFS e BAFC através do sequenciamento de ESTs permitiram verificar a frequencia de determinados transcritos sob esta condição. A

análise da redundância de uma biblioteca gerada relaciona-se, primeiramente, com a garantia de que o índice de novidade gerado seja alto o suficiente para sequenciar várias ESTs de um determinado organismo, e logo em seguida esta redundância também está relacionada com genes que estão sendo mais expressos no momento da síntese do RNAm. Isto é, se há um gene que está se expressando muito no momento da extração do RNAm (que será utilizado para a construção da biblioteca), possivelmente, na análise de ESTs haverá muitos transcritos relacionados a este gene.

De acordo com Coward, Haas e Vingron (2002), a alta frequência de determinados transcritos, entre as ESTs, significa que possuem similaridade o suficiente para se assumir que são derivados de um mesmo gene. Consequentemente, esta redundância poderia refletir um maior nível de expressão do gene correspondente (KARLSSON; OLSON; STENLID, 2003). Entretanto, não tem sido relatado na literatura um critério para se determinar o número mínimo de ESTs num *contig* para que este seja referido como o transcrito de maior expressão, e a escolha tem sido de acordo com o tipo de estudo. Neste estudo, para a análise das duas bibliotecas, os genes representados por *contigs* com 4 a 8 ESTs foram considerados de média expressão, e apresentando a partir de 9 ESTs foram considerados altamente expressos (Anexos A e B).

Esta classificação permitiu estabelecer, de uma forma mais precisa o perfil da expressão gênica dos transcritos das bibliotecas de cDNA. Foram identificados 12 transcritos mais expressos, sendo 9 considerados de média expressão e 3 altamente expressos. Cabe aqui salientar que o termo maior ou menor “expressão” é referido para a quantidade de transcritos em nível de RNA, os quais, não necessariamente serão codificados em proteínas, tendo em mente as alterações pós-transcricionais. Dentre os transcritos considerados mais expressos 3 (sendo 2 de alta expressão e um de média expressão) foram identificados na BAFS (Anexo A) e os outros 9 (um de alta expressão e 8 de média expressão) na BAFC (Anexo B), estes transcritos estão assinalados com asterístico (*) nas tabelas.

4.4.2 Análise de similaridade das bibliotecas nos bancos *CitEST* e *Genbank*

A análise das duas bibliotecas contra os bancos de dados, *CitEST* e *Genbank*, teve como objetivo identificar a maior quantidade de transcritos similares às sequências depositadas nestes bancos, pois assim, seria maior e mais detalhada a descrição do perfil de transcrição dos genes expressos no albedo do frutos nas duas diferentes condições.

Os transcritos da BAFS quando comparados por *blastn* individualmente contra o banco de dados *CitEST* geraram 173 sequências com similaridade válida (e-value $\leq 10^{-5}$) e 11 sequências tiveram baixa ou nenhuma similaridade (e-value $\geq 10^{-5}$). Já os transcritos da BAFC quando comparados contra o banco de dados do *CitEST* gerou 362 sequências válidas com similaridade (e-value $\leq 10^{-5}$) e 8 sequências tiveram baixa ou nenhuma similaridade (e-value $\geq 10^{-5}$).

Quando os transcritos da BAFS foram analisados contra o *Genbank* (NCBI) geraram 180 sequências válidas com similaridade (e-value $\leq 10^{-5}$) e 4 sequências tiveram baixa ou nenhuma similaridade. Já a análise feita individualmente para a BAFC contra o *Genbank* gerou 362 sequências válidas com similaridade (e-value $\leq 10^{-5}$) e 8 sequências tiveram baixa ou nenhuma similaridade (e-value $\geq 10^{-5}$).

Verificou-se que havia sequências com similaridade com proteínas com a função conhecida; hipotéticas; desconhecidas e também sem similaridade. A incidência de proteínas hipotéticas permite inferir sobre a necessidade de estudos funcionais, uma vez que são sequências já identificadas para outras espécies, porém sem nenhuma função biológica determinada (PANDOLFI, 2006). As proteínas sem similaridade contra os bancos podem significar que existem novos genes ainda não caracterizados em outros organismos ou sequências que representam genes que divergiram ao longo do tempo (CIRERA; WINTER; FREDHOLM, 2000).

A análise contra o *Genbank* mostrou um maior número de transcritos similares quando se compara com a análise contra o *CitEST*. Por isso, as próximas análises foram feitas com os resultados obtidos somente contra o *Genbank*.

4.5 Categorização geral das ESTs

Os 542 transcritos das bibliotecas BAFS e BAFC com similaridade a proteínas quando comparados contra o *Genbank* foram submetidos primeiramente à anotação manual de suas funções bioquímicas descritas na Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto – KEGG e logo em seguida categorizados no *FunCat* (RUEPP et al., 2004) do Centro de Proteínas e Categorias Funcionais de Sequências de Munique (MIPS). Por se tratar de um esquema estruturalmente hierárquico, flexível e eficiente para anotação de dados gerados por estudos de genomas, transcriptomas e proteomas (RUEPP et al., 2004), este sistema de anotação tem sido amplamente utilizado para atribuir uma descrição funcional às sequências de ESTs de diferentes banco de dados.

A categorização dos transcritos foi feita de acordo com Freitas-Astúa et al. (2007) que classificaram os transcritos gerados da biblioteca de cDNA de frutos cítricos contaminados com a leprose do vírus nestas categorias funcionais do *FunCat*. Cabe aqui salientar que a designação das categorias funcionais (anotação) para cada comparação foi estabelecida com base em resultados de *Blastx* estabelecidos previamente para outros organismos e sem uma confirmação funcional experimental (TRAIL et al., 2003). Em função disso, a maioria dos resultados de comparações é referida como função ‘presumível’. Esta denominação é utilizada, por exemplo, quando o sistema de categorização é feito de forma automática, ou seja, baseado no grau de similaridade entre duas sequências, sem confirmação experimental. Assim, a denominação ‘proteína x’ pode ser substituída por ‘proteína x provável’, ‘presumível’, ‘semelhante à proteína x’, refletindo seu grau de incerteza na transferência da função (RIGDEN; MELLO, 2002).

Numa primeira análise, os transcritos foram classificados em seis maiores categorias (Figura 12).

As categorias de maior representatividade foram àquelas constituídas por transcritos com similaridade a proteínas envolvidas em vias do metabolismo (32%), seguida por proteínas sem similaridade (20%), bem como proteínas hipotéticas (18%). As outras categorias representam a via de informação genética (DNA-RNA-proteína) com 14%, transporte celular (11%) e percepção a estímulos externos (5%).

Figura 12 - Classificação funcional dos 542 transcritos das bibliotecas de cDNA (BAFS e BAFC) em seis diferentes categorias do *FunCat*

Em uma análise individual do BAFS, 35% dos transcritos estão relacionados com o metabolismo da planta. Na via de informação genética (DNA-RNA-proteína), transporte celular e percepção a estímulos externos foram identificados 16%, 6% e 2% de transcritos respectivamente. A categorização em proteínas hipotéticas e sem similaridade somaram 41% das sequências válidas.

Esta mesma análise foi feita para BAFC, e foram identificados e categorizados 30% dos transcritos relacionados com o metabolismo da planta, 14% na via de informação genética (DNA-RNA-proteína), 12% no transporte celular, 7% na percepção a estímulos externos, e 37% somando as proteínas hipotéticas e os transcritos sem similaridade. Toda a anotação das sequências válidas estão nos Anexos A e B.

4.6 Classificação das ESTs em subcategorias

Após a categorização geral dos transcritos das duas bibliotecas em seis maiores categorias, os transcritos foram classificados em 14 diferentes subcategorias do *FunCat* (Figura 13). Estas subcategorias estão diretamente relacionadas às funções de cada

proteína que apresentaram e-value $\leq 10^{-5}$ de similaridade com os transcritos comparados ao banco de dados do *Genbank*, utilizando o algoritmo *Blastx*.

Figura 13 - Classificação funcional dos 542 transcritos das bibliotecas de cDNA (BAFS e BAFC) em 14 diferentes subcategorias do *FunCat*

4.6.1 Subcategoria metabolismo primário e secundário

A análise da Figura 13 mostra que 21% destes transcritos estão associados ao metabolismo primário e secundário. Os metabólitos primários são aqueles que estão diretamente envolvidos nas rotas de síntese e degradação das macromoléculas em qualquer ser vivo (DIXON, 2001). Dentre esses metabólitos estão: os aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos, carboidratos e seus derivados fosforilados, além de um grande número de ácido mono-, di- e tricarboxílicos.

Os metabólitos secundários são mais comuns em plantas e fungos (CHALLIS; HOPWOOD, 2003; HALL, 2006). Eles atuam como componentes estruturais, defesas

contra herbívoros e patógenos, são atrativos para polinizadores e agentes nas interações interespecíficas, como a alelopatia (ENGEL et al., 2002; CHALLIS; HOPWOOD, 2003). Diferem dos metabólitos primários por apresentarem distribuição restrita no reino vegetal, ou seja, metabólitos secundários específicos são restritos a uma espécie vegetal ou a um grupo de espécies relacionadas, enquanto que metabólitos primários são encontrados em todo o reino vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os metabólitos secundários são moléculas que geralmente não estão envolvidas em funções vitais, geralmente não fazem parte do metabolismo básico e possuem características químicas muito variadas e, às vezes, bem complexas (HALL, 2006). Sabe-se hoje, que estão relacionados com a defesa dos vegetais contra patógenos, agem como atrativos para animais polinizadores e dispersores de sementes, bem como agentes na competição planta-planta (TAIZ; ZEIGER, 2004). Os principais grupos de metabólitos secundários são os alcalóides, terpenos, taninos, flavonóides e glicosídeos (HALL, 2006).

Na BAFS foram identificados 25% dos transcritos similares com proteínas relacionadas ao metabolismo primário e secundário. Na BAFC foram identificados 19% de transcritos relacionados ao metabolismo primário e secundário (individualmente apresentados nos Anexos A e B, respectivamente).

A BAFS apresentou um gene altamente expresso da subcategoria metabolismo primário, a quitinase. A função de quitinases em mecanismos de defesa vegetal é bem conhecida, mas nos processos de desenvolvimento das plantas requer estudos mais detalhados para o completo entendimento da função desta enzima nas plantas. Na defesa vegetal das plantas, as quitinases desempenham um papel contra o ataque de patógenos inibindo, por exemplo, o crescimento fúngico e agem também como moléculas sinalizadoras, liberando elicitores de hifas fúngicas invasoras e agindo como uma primeira linha de defesa (MAUCH; STAEHELIN, 1989).

No processo de desenvolvimento das plantas, estudos mostram que as quitinases estão envolvidas nos processos de crescimento e desenvolvimento (COLLINGE et al., 1993). Uma série de quitinases foi identificada em plantas em todos os órgãos e tecidos, pois algumas formas de quitinases são sintetizadas constitutivamente (REGALADO et al., 2000). Uma alta expressão de quitinases foi

encontrada em tecidos florais, presentes na germinação de sementes, desenvolvimento e maturação dos frutos (KASPRZEWSKA, 2003). Experimentalmente, sabe-se que uma mutação dirigida em um gene de quitinase de *Arabidopsis thaliana* provocou evidentes alterações fenotípicas no crescimento da planta e na deposição de lignina na parede celular (ZHONG; KAYS; SCHROEDER, 2002).

A grande quantidade de transcritos correspondentes a quitinases expressos e identificados na BAFS, possivelmente deve-se ao fato da biblioteca de cDNA ter sido construída com frutos ainda jovens em fase de crescimento e amadurecimento e seria esperado estar presente na BAFC.

4.6.2 Subcategoria metabolismo de energia

Nas bibliotecas analisadas foram identificados 7% dos transcritos relacionados ao metabolismo de energia. Estas proteínas encontradas estão envolvidas nos processos de respiração, fermentação e fotossíntese, fornecendo energia para a célula. Observou a presença de 7% de transcritos na BAFS e na BAFC (individualmente apresentados nos Anexos A e B).

A manutenção e divisão celular do microrganismo requerem a atividade da maquinaria bioquímica relacionada ao anabolismo de macromoléculas como proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos. Adicionalmente, tais processos requerem energia e envolvem o gasto de ATP. A taxa de produção de energia aumenta significativamente em interações de plantas com seus patógenos. Mesmo havendo uma redução na taxa fotossintética não há um indicativo de que os genes da fotossíntese sejam primeiramente reprimidos.

Existem razões óbvias que mostram que o contato dos agentes patogênicos com a planta altera totalmente o metabolismo vegetal, pois a indução da defesa é de custo intensivo (HEIL; BOSTOCK, 2002; SWARBRICK; SCHULZE-LEFERT; SCHOLLES, 2006).

A infecção das plantas por patógenos resulta na indução de reações de defesa, bem como alterações no metabolismo de carboidratos. Por um lado, o patógeno possivelmente, tenta manipular o metabolismo de carboidratos da planta para seu

próprio proveito, por outro lado, a planta tem de reorganizar os fluxos de carbono para assegurar a luta contra o patógeno (BERGER et al., 2004).

Muitos estudos têm sido conduzidos relacionando também a taxa de respiração aeróbica como resposta ao patógeno. Hull (2002), afirma que em interações onde o patógeno causa lesões locais necróticas nas plantas, a taxa de respiração aumenta juntamente com o desenvolvimento da necrose. Porém, Freitas-Astúa et al (2007) ao estudarem a leprose do citros, que tem como sintoma característico inicial a lesão necrótica, observou de imediato uma redução na taxa de respiração durante esta interação, contrariando o que já havia sido observado por Hull (2002).

Isto mostra que muitos genes desta subcategoria estão sendo induzidos ou reprimidos com a interação planta-patógeno. A redução da quantidade de amido, apresentada aqui neste trabalho, prova que há diversas alterações moleculares acontecendo, mas muitas investigações desta subcategoria ainda são necessárias para a compreensão da funcionalidade destes genes nos estudos de interação.

4.6.3 Subcategoria interação intra-extracelular

Assim como a subcategoria de metabolismo energético, a subcategoria de interação intra-extracelular também está relacionada com a interação planta-patógeno. Na análise das bibliotecas foi encontrado apenas 1% de transcritos com este perfil. Na BAFS não foram encontrados transcritos relacionados com a via de interação intra-extracelular. Enquanto que na BAFC foi encontrado 1% de transcritos, o que corresponde a dois unigenes desta subcategoria: sensor histidine kinase e nitrogen metabolism transcriptional regulator, NtrC (Anexo B).

Estes genes relacionados a esta subcategoria são fundamentais para as plantas, pois qualquer alteração no ambiente pode afetar drasticamente o metabolismo da planta. Uma rápida percepção da mudança é essencial, pois ativa genes mais eficientes para as situações enfrentadas.

A proteína sensor histidine kinase têm destaque porque está relacionada diretamente com a sinalização gerada por estímulos ambientais. Estudos recentes

demonstram que esta proteína compõe um sistema de transdução de sinais relacionados com a concentração de citocinina (MEHTA et al., 2007). O modelo proposto prediz que a variação na concentração de citocinina é percebida pela proteína sensor histidine kinase que está ancorada na membrana plasmática, e a partir daí inicia-se uma cascata de sinalização que resulta na translocação nuclear dos reguladores no citosol (HARPER; BRETON; HARMON, 2004).

Em uma pesquisa realizada no banco de dados do CitEST foram encontrados alguns genes histidine kinases, membros da via de sinalização da citocinina (MEHTA et al., 2007). O genoma da *Arabidopsis* revelou três receptores de citocinina (PISCHKE et al., 2006) assim como genes similares também foram encontrados na cultura do milho, sugerindo uma conservação do mecanismo de sinalização de citocinina em plantas (KIBA et al., 2005).

A proteína nitrogen metabolism transcriptional regulator, NtrC, também está envolvida na sinalização capaz de desencadear alterações na expressão gênica que modificam o metabolismo e consequentemente o desenvolvimento da planta. Esta sinalização se baseia na concentração de nitrogênio dentro das plantas, pois este composto é responsável por regular a expressão do NtrC que ativa a transcrição de genes/ operons. Não se sabe ao certo, a atuação desta rota de sinalização relacionada à concentração de nitrogênio na ativação de genes (SAKAKIBARA; TAKEI; HIROSE, 2006). Em *Escherichia coli*, um estudo recente demonstrou que esta proteína é responsável por iniciar uma cascata de eventos que ativam aproximadamente 2% de genes do genoma, e que dentre estes há inúmeros operons de transporte (ZIMMER et al., 2000).

4.6.4 Subcategoria transdução de sinais

A análise das bibliotecas contou com 5% dos transcritos na subcategoria transdução de sinais. A análise individual da BAFS mostra que 4% dos transcritos encontrados estão relacionados a esta subcategoria. Na BAFS foram encontrados 6%

dos transcritos caracterizados nesta subcategoria (individualmente descritos nos Anexos A e B).

A transdução dos sinais percebidos pela planta é essencial para efetivar genes de mecanismos de defesa contra um possível ataque de patógenos, mudança no ambiente como seca, luz intensa, umidade. Íons cálcio, fosfolipase C (produção de derivados do inositol), o ácido fosfatídico (PA) e EROs são responsáveis pela iniciação das cascatas de sinalização em plantas que é finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento (CHINNUSAMY; SCHUMAKER; ZHU, 2004; ZHU, 2002; BOUDSOCQ; LAURIÈRE, 2005) que assemelham-se aos mecanismos de sinalização de modelos animais e de microrganismos. Porém outros como aqueles que envolvem ácido abscísico (ABA) são exclusivos de organismos vegetais.

Acredita-se que existam receptores celulares internos e externos para ABA, embora seja desconhecido a quantidade e o tipo de receptor (BRAY, 1997; XIONG; ZHU, 2001). Muitos dos genes responsivos ao estresse estudados até hoje são induzidos por fatores de transcrição que respondem ao acúmulo de ABA, evidenciando o papel vital deste sinalizador (KOORNNEEF et al., 1998; XIONG et al., 2001). As respostas desencadeadas por esta rota são lentas e, provavelmente, relacionadas a medidas de adaptação ao estresse (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000).

Recentes estudos têm demonstrado também que cascatas MAPKs desempenham importantes funções na resposta das plantas a múltiplos estresses (ZHANG; KLESSIG, 2001; YOSHIOKA et al., 2003). Embora membros de diversas subfamílias MAPKs tenham sido relatados em plantas, as exatas funções ainda não estão esclarecidas. Evidências sugerem que a cascata MAPK é um dos pontos de convergência depois da percepção de diferentes patógenos e/ou seus elicitores pelos produtos dos genes de resistência (*R*) (ZHANG; KLESSIG, 2001).

Cada espécie vegetal apresenta múltiplas cascatas de MAPK (TAKAHASHI et al., 2004) que intermedeiam a transmissão intracelular e a amplificação do estímulo extracelular, resultando na indução de respostas celulares bioquímicas e fisiológicas (SCHAEFFER; WEBER, 1999; WIDMANN et al., 1999), em geral, cada cascata

consiste de pelo menos três proteínas kinases, que intermedeiam reações sequenciais de fosforilação.

4.6.5 Subcategoria defesa celular e virulência

Na análise das bibliotecas foram encontrados e caracterizados como pertencentes a esta subcategoria 2% dos transcritos. Na BAFS não foram encontrados transcritos similares a proteínas com esta funcionalidade, mas na BAFC foram encontrados 3% de transcritos similares (Anexo B). Os genes desta subcategoria estão envolvidos nas respostas iniciais contra todos os tipos de estresses abiótico e biótico, causado ou não pelo patógeno. São caracterizadas por enzimas pertencentes a espécies reativas de oxigênio, enzimas antioxidantes, proteínas de defesa.

Antes da ativação das cascatas de MAPKs, a percepção de moléculas derivadas do patógeno pelos produtos do gene de resistência (*R*) da planta está associada com a maciça acumulação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que incluem O_2^- , H_2O_2 e OH^- (HEGEDUS; ERDEI; HORVÁTH, 2001). Foi verificado que elicitores derivados do patógeno provocam uma biossíntese muito rápida de EROs (menos de 5 minutos) e que concentrações micromolares de H_2O_2 são capazes de inibir a penetração e infecção de fungos em plantas hospedeiras (SHETTY et al., 2007). Porém, o acúmulo de EROs pode resultar em prejuízos consideráveis para a célula e por isso dispõe de enzimas detoxificantes.

Na análise do perfil transcricional das bibliotecas não foram encontrados genes referentes as EROs, nem genes de defesa, mas foram encontrados genes envolvidos na detoxificação da célula na BAFC (Anexo B). Isto demonstra a grande possibilidade de que houve necessidade da detoxificação das células vegetais por enzimas antioxidantes. Em plantas de tomate infectadas com *Botrytis cinerea* Pers. analisaram-se o aparecimento de enzimas antioxidantes após a inoculação do patógeno (SHETTY et al., 2008).

Dentre as enzimas detoxificantes destacam-se a catalase e a glutatona. A catalase é uma enzima responsável em converter H_2O_2 em H_2O e O_2 (BREUSEGEM et

al., 2001) e são essenciais no desenvolvimento de plantas, na defesa, envelhecimento, e senescência (YANG; POOVAIAH, 2002). Freitas-Ástua et al. (2007) também encontraram na análise diferencial da interação, citros-vírus da leprose uma catalase a sendo induzida na biblioteca de cDNA em resposta ao patógeno.

Foram encontrados também unigenes identificados na família das monooxygenases (DszA monooxygenase e NtaA/SnaA/SoxA monooxygenase) que estão relacionadas à manutenção e ao desenvolvimento celular. Incluem uma gama de genes diferentes, e podem estar envolvidas na oxidação de diferentes isoflavonóides que são produzidos pela planta em resposta a condições de estresse (DIXON; SUMNER, 2003). Kim et al. (2006) identificaram um gene desta família em uma análise de microarray de cDNA de plantas de pimentas após a inoculação do patógeno *Xanthomonas axonopodis*, indicando que estes genes podem desempenhar um papel na resposta de defesa.

A verificação da expressão destes genes apenas na BAFC pode ser um indício das respostas de defesa da planta, confirmando os dados obtidos na análise anatômica.

4.6.6 Subcategorias: transcrição, vias de transporte de componentes celulares e facilitadores de transporte

Na análise das bibliotecas foram encontrados nas subcategorias transcrição e vias de transporte de componentes celulares 8% de transcritos em cada e na subcategoria de facilitadores de transporte foram encontrados 2% dos transcritos. A análise individual da BAFS foi caracterizada por 8% dos transcritos na subcategoria transcrição, 5 % em vias de transporte de componentes celulares e na subcategoria de facilitadores de transporte não foram encontrados transcritos. Já na análise da BAFC foram encontrados 8% dos transcritos na transcrição, 10% no transporte de componentes celulares e 2% de facilitadores de transporte.

O reconhecimento dos elicitores do patógeno produz intermediários reativos de oxigênio (EROs) que é uma rápida explosão oxidativa capaz de ativar os mecanismos

de defesa da planta (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). Este rápido mecanismo de sinalização é possível porque não requer nova síntese protéica, pois os genes que são ativados são fatores de transcrição, já existentes, que ativam os genes de resposta retardada, que são geralmente, os genes responsivos ao estresse sofrido (KÖRBES, 2006). Então, esta capacidade de resposta rápida e eficiente aos estímulos externos e internos ocorre em virtude da existência de uma complexa rede de fatores de transcrição. Os fatores de transcrição ativam os mecanismos de resposta ao estresse para restabelecer a homeostase e proteger ou reparar proteínas e membranas danificadas (KÖRBES, 2006).

Além disto, várias respostas bioquímicas estão envolvidas na elicitação das células e defesa das plantas como: ativação de receptores, formação de poros e canais para transporte de proteínas, íons, anions, drogas, vitaminas, carreadores de elétrons e transportadores simportes e antiportes (subcategoria de facilitadores de transporte) aumentado consideravelmente o transporte celular. Este se relaciona ao transporte de componentes como mitocôndria, cloroplastos, retículo de Golgi e outros em vias de sistema como o de secreção.

Na BAFC foi encontrado um gene mais expresso, o LysR family transcriptional regulator, classificado na subcategoria transcrição. É um gene de regulação transcricional (LTTRs) e pertence a uma grande família de proteínas que controlam a expressão de uma infinidade de genes associados a processos celulares diversificados como a biossíntese de aminoácido, fixação de CO₂, transporte de íons e replicação cromossômica (MADDOCKS; OYSTON, 2008). Relacionado à biossíntese de aminoácido, Picossi, Belitsky e Sonenshein (2007), estudaram o gene *GltC* desta família relacionado a biossíntese de glutamato, e Kovaleva e Gelfand (2007) estudaram um gene relacionado a biossíntese e transporte da metionina e cisteína (*gene MetR*). Cao et al.(2001) estudaram o gene *MvfR* relacionado a regulação de patogenicidade em *Pseudomonas aeruginosa*, assim como Heroven et al. (2007) analisaram a repressão do gene *RovM*, responsável pela invasão, mobilidade e virulência de *Yersinia pestis*.

4.6.7 Outras subcategorias

As subcategorias relacionadas à síntese de proteínas correspondem a 2% dos transcritos, um valor relativamente baixo comparando-se com Pandolfi (2006) que obteve 9%. Na BAFS foram encontrados 4% de transcritos similares a proteínas desta subcategoria e na BAFC foram identificados apenas 2% dos transcritos nesta subcategoria.

A subcategoria ciclo celular e processamento do DNA contou com 2% dos transcritos totais. Na BAFS foram identificados 3% de transcritos relacionados a proteínas desta subcategoria e na BAFC foram identificados 2% de transcritos relacionados à subcategoria citada.

O ciclo celular consta das modificações sofridas pela célula desde sua formação até sua divisão em duas células filhas e é grandemente influenciado pelas condições ambientais (COOPER, 2004). A análise desta subcategoria é fundamental, pois a ausência da regulação do ciclo ocasionando o aumento da divisão celular pode estar envolvida em disfunções da célula em resposta a algum tipo de estresse, biótico ou abiótico.

A frequência de transcritos com função desconhecida (proteínas hipotéticas, 18%), das duas bibliotecas, juntamente com os transcritos que não apresentaram similaridade (21%) com proteínas depositadas no banco de dados do *Genbank* reflete o grande número de genes de albedo de *Citrus sinensis* sadio ou em condições alteradas (no caso inoculado com o patógeno *G. citricarpa*), que ainda não foram caracterizados e ou identificados.

Esta grande quantidade de subcategorias encontradas para classificação dos transcritos já era esperada, uma vez que a invasão de patógenos desencadeia inúmeras alterações fisiológicas e bioquímicas em células, tecidos e até na planta inteira, causando significativas mudanças na expressão gênica do hospedeiro (MOLLER; CHUA, 1999; MAULE; LEH; LEDERER, 2002; HUANG et al., 2005).

5 CONCLUSÕES

- Análises anatômicas de frutos de citros demonstram que os danos caracterizados por lesões celulares no epicarpo iniciam-se 24 horas após a inoculação com o patógeno *G. citricarpa* sendo que após 72 horas, o acúmulo de amido da célula do epicarpo é reduzido mostrando que a defesa da planta é custo intensiva e ocorre acúmulo de compostos fenólicos nas células da epiderme e do epicarpo, que indica uma reação de defesa da planta na tentativa de impossibilitar a entrada do patógeno.
- O sequenciamento de 600 ESTs das bibliotecas do albedo de frutos sadios e inoculados com *G. citricarpa* produziu 184 e 370 sequencias válidas, respectivamente, com índice de sucesso de 92% quanto a qualidade das sequencias obtidas. A categorização destas sequências demonstra a existência de transcritos relacionados à defesa da planta como a catalase, a glutathione e monooxygenases na biblioteca de frutos inoculados com o patógeno.
- O seqüenciamento de ESTs das bibliotecas permitiu identificar genes de citros efetivamente envolvidos na reação de defesa do citros durante o início da interação com *Guignardia citricarpa*.

REFERÊNCIAS

- ABECITRUS.** Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br>>. Acesso em: 09 set. 2008.
- ABREU, J.R. de. **Identificação de genes diferencialmente expressos associados ao declínio dos citros (*Citrus Spp.*)**. 2007. 88 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica/Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- ADAMS, M.D.; POLYMERPOULOS, M.H.; XIAO, H.; MERRIL, C.R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R.F.; KERLAVAGE, A.K.; MCCOMBIE, W.R.; VENTER, A. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**, Washington, v. 252, p. 1651-1656, 1991.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1988. 803 p.
- AGUILAR-VILDOSO, C.I., RIBEIRO, J.G.B., FEICHTENBERGER, E., GOES, A.; SPÓSITO, M.B. **Manual técnico de procedimentos da mancha preta dos citros**. Brasília: MAPA, DAS, DDIV, 2002. 72 p.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, DJ. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- AMORIM, L. Ciclos primário e secundário. In: BERGAMIN, F.A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 1995. p. 234-245.
- ANDRADE, E.N. **Campanha citrícola**. São Paulo: Brasil Rothschild, 1930. 191 p.
- ANTONINI, R.C.A. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos. 2004. 34 p.
- ARAUJO, J.C.A.; MATSUOKA, K. Histopatologia da interação *Alternaria solani* e tomateiros resistente e suscetível. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 268-275, 2004.
- ASTUA-MONGE, G.; FREITAS-ASTUA, J.; MACHADO, M.A. Biotecnologia gera produtividade e citros sadios. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 2, p. 48-53, 2004.
- AVERNA-SACCÁ, R. Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas por *Phoma citricarpa*. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 15, p. 468-475, 1940.

BAAYEN, R.P.; BONANTS, P.J.M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G.C.; VAN DER AA, H.A.; DE WEERDT, M.; VAN BROUWERSHAVEN, I.R.; SCHUTTE, G.C.; MACCHERONI, W. JR.; GLIENKE-BLANCO, C.; AZEVEDO, J.L. Nonpathogenic isolates of citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, p. 464-477, 2002.

BALDASSARI, R.B. **Influência de frutos sintomáticos de uma safra na incidência de *Guignardia citricarpa* na safra subsequente e período de suscetibilidade de frutos de laranjeiras Natal e Valência**. 2001. 60 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2001.

BAPTISTA, M.J.; GLORIA, B.A.; PASCHOLATI, S.F.; KRUGNER, T.L. Produção de compostos fenólicos durante a infecção ectomicorrízica por dois isolados de *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 309-315, out. 1999. Suplemento.

BARRETT, H.C.; RHODES, A.M. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. **Systematic Botany**, Notre Dame, v. 1, n. 2, p. 105-136, 1976.

BENSON, D.A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; WHEELER, D. L GenBank. **Nucleic Acids Research**, London, v. 27, n. 1, p. 38-43, 1999.

BENTES, J.L.S.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Stemphylium solani* e tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 224-231, 2005.

BERGER, S.; SINHA, A.K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, Rockville, v. 58, p. 4019–4026, 2007.

BERGER, S.; PAPADOPOULOS, M.; SCHREIBER, U.; KAISER, W.; ROITSCH, T. Complex regulation of gene expression, photosynthesis and ugar levels by pathogen infection in tomato. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 122, p. 419–428, 2004.

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

BORDIGNON, R.; MEDINA-FILHO, H.P.; SIQUEIRA, W.J.; PIO, R.M. Efeito da tristeza em caracteres vegetativos, produtivos e industriais da laranjeira ‘Valência’ enxertada em híbridos segregando para tolerância. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 207-215, 2003.

BOUDSOCQ, M.; LAURIÈRE, C. Osmotic signaling in plants. multiple pathways mediated by emerging kinase families. **Plant Physiology**, Rockville, v. 138, p. 1185-1194, 2005.

BRAY, E.A. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science, Oxford**, v. 2, p. 48-54, 1997.

BREUSEGEM, F.V.; VRANOVA, E.; DAT, J.F.; INZE, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Amsterdam, v. 161, p. 405-414, 2001.

BRUNELLI, K.R.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; CAVALCANTI, L.S.; FERREIRA, P.T.O.; CAMARGO, L.E.A. Germinação e penetração *Stenocarpella macrospora* em folhas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 187-190, 2005.

CAO, H.; KRISHNAN, G.; GOUMNEROV, B.; TSONGALIS, J.; TOMPKINS, R.; RAHME, L.G. A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 98, p. 14613–14618, 2001.

CARDOSO FILHO, J.A. **Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) e dos indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-S-metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (Teleomorfo: *Guignardia citricarpa*)**. 2003. 125 p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CHALLIS, G.L.; HOPWOOD, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 100, p. 14555-14561, 2003.

CHIASSEN, D.; EKENGREN, S.K.; MARTIN, G.B.; DOBNEY, S.L.; SNEDDEN, W.A. Calmodulin-like proteins from *Arabidopsis* and tomato are involved in host defense against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 58, p. 887-897, 2005.

CHINNUSAMY, V.; SCHUMAKER, K.; ZHU, J-K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 225-336, 2004.

CIRERA, S.; WINTER, A.K.; FREDHOLM, M. Why do we still find anonymous ESTs? **Mammalian Genome**, New York, v. 11, p. 689-693, 2000.

COLLINGE, D.B.; KRAGH, K.M.; MIKKELSEN, J.D.; NIELSEN, K.K.; RASMUNSEN, U.; VAD, K. Plant chitinases. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, p. 31-40, 1993.

COOPER, G. M. **The cell: a molecular approach**. 3rd ed. Washington: ASM Press, 2004. 713 p.

CORTELAZZO, A.L. **Caracterização celular e bioquímica de sementes**. Campinas: UNICAMP, 2007. 13 p.

COSTA, H.; VENTURA, J.A.; ARLEU, R.J.; AGUILAR-VILDOSO, C.I. Ocorrência da pinta preta (*Guignardia citricarpa*) em citros no Estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 205, 2003. Suplemento.

COWARD, E.; HAAS, S.A.; VINGRON, M. SpliceNest: visualization of gene structure and alternative splicing based on EST clusters. **Trends in Genetics**, Oxford, v. 18. 2002.

DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. **Plant biochemistry**. New York: Academic Press, 1997. 554 p.

DIXON, R.A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, London, v. 411, p. 843-847, 2001.

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

DOIDGE, E.M. Some diseases of citrus prevalent in South África. **Journal of Science**, Stanford, v. 26, p. 320-325, 1929.

EL-TOBSHY, Z.; SINCLAIR, J.B. Inhibition *in vitro* of *Phomopsis citri* by extracts from orange and by fungicides. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, 1964. v. 48, p. 925-927.

ENGEL, S.; JENSEN, P.R.; FENICAL, W. Chemical ecology of marine microbial defense. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v. 28, n. 10, p. 1971-1985, 2002.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

FAO. Disponível em: < <http://www.faostat.fao.org>>. Acesso em: 16 set. 2008.

FARIA-CAMPOS, A.C.; CERQUEIRA, G.C; ANACLETO, C.; CARVALHO, C.M.B. de; ORTEGA, J.M. Mining microorganism EST databases in the quest for new proteins. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 2, p. 169-177, 2003.

FEICHTENBERGER, E. Mancha preta dos frutos cítricos. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, p. 79-92, 1996.

FEICHTENBERGER, E.; MULLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: doenças da plantas cultivadas. São Paulo. Editora Ceres, 1997. v. 2, p. 261-296.

FERRO, M.I.T.; BARROS, N.M. de; DABBAS, K.M.; LAIA, M.L. de; KUPPER, K.C.; MORAES, V.A.de; OLIVEIRA, J.C.F.de; FERRO, J.F.; ZINGARETTI, S.M.

Análise do perfil de expressão de genes da cana-de-açúcar envolvidos na interação com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 154-166, 2007.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Citrus. In: _____. **Agrianual**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2007. p. 227-297.

FREITAS-ASTÚA, J.; BASTIANEL, M.; LOCALI-FABRIS, E.C.; NOVELLI, V.M.; SILVA-PINHATI, A.C.; BASÍLIO-PALMIERI, A.C.; TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A.

Differentially expressed stress-related genes in the compatible Citrus-Citrus leprosis virus interaction. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, suppl. 3, p. 980-990, 2007.

FUNDECITRUS. Disponível em: <www.fundecitrus.com.br>. Acesso em: 11 set. 2008.

GATEHOUSE, A.M.R.; DAVISON, G.M.; STEWART, J.N.; GATEHOUSE, L.N.; KUMAR, A.; GEOGHEGEN, I.E.; BIRCH, N.E.; GATEHOUSE, J.A. Concanavalin A inhibits development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) and peach-potato aphid (*Myzus persicae*) when expressed in transgenic potato plants. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 5, p. 153-165, 1999.

GAUTHERETI, D.; POIROT, O.; LOPEZ, F.; AUDIC, S.; CLAVERIE, J.M.

Alternate polyadenylation in human mRNAs: a large-scale analysis by EST clustering. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, p. 524-530, 1998.

GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms for resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GÓES, A. de. Controle da mancha-preta dos frutos cítricos. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 9, p. 293-304, 1998.

GOES, A. de; FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (McAlp) Van der Aa (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 138, 1993. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 10., 1993, Aracaju.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 195-202, 1998

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

HALL, R.D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist**, Oxford, v. 169, p. 453-468, 2006.

HARPER, J.F.; BRETON, G.; HARMON, A. Decoding Ca(2+) signals through plant protein kinases. **Annual Review of Plant Biology**, Boca Raton, v. 55, p. 263-288, 2004.

HEGEDUS, A.; ERDEI, S.; HORVÁTH, G. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. **Plant Science**, Amsterdam, v. 160, p. 1085-1093, 2001.

HEIL, M.; BOSTOCK, R. M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, p. 503–512, 2002.

HERBERS, K.; MEUWLY, P.; FROMMER, W.B.; METRAUX, J.P.; SONNEWALD, U. Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. **Plant Cell**, Baltimore, v.8, p. 793–803, 1996.

HERBERS, K.; TAKAHTA, Y.; MELZER, M.; MOCK, H.P.; HAJIREZAEI, M.; SONNEWALD, U. Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. **Molecular Plant Pathology**, Gatersleben, v.1, p. 51–59, 2000.

HEROVEN, A.K.; BOHME, K.; TRAN-WINKLER, H.; DERSCH, P. Regulatory elements implicated in the environmental control of invasion expression in enteropathic Yersinia. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 603, p. 156–166, 2007.

HOFTE, H.; DESPREZ, T.; AMSELEM, J.; CHIAPELLO, H.; MOISAN, M.C.; JORJON, M.F. An inventory of 1152 expressed sequence tags obtained by partial sequencing of cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 4, p. 1051-1061, 1993.

HORRIDGE, G.A.; TAMM, S.L. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliar motion. **Science**, Washington, v. 13, n. 3869, p. 871-818, 1969.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: a DNA sequence assembly program. **Genome Research**, Woodbury, v. 9, p. 868-877, 1999.

HUANG, Z.; YEAKLEY, J.M.; GARCIA, E. W.; HOLDRIDGE, J.B.F.; WHITHAM, S.A. Salicylic acid-dependent expression of host genes in compatible *Arabidopsis*-virus interactions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 137, p. 1147-1159, 2005.

HULL, R. **Matthews' plant virology**. 4th ed. Orlando: Academic Press, 2002. 1001 p.

IDNURM, A.; HOWLETT, B.J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 2, p. 241-255, 2001.

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry**. San Francisco: W. H. Freeman, 1962. 408 p.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940. 523 p.

JONES, J.D.G.; DUNSMUIR, P.; BEDBROOK, J. High level expression of introduced chimaeric genes in regenerated transformed plants. **EMBO Journal**, Heidelberg, v. 4, p. 2411-2418, 1985.

KARLSSON, M.; OLSON, A.; STENLID, J. Expressed sequences from the basidiomycetous tree pathogen *Heterobasidion annosum* during early infection of scots pine. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 39, p. 51–59, 2003.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases – regulation and function. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Amsterdam, v. 8, p. 809–824, 2003.

KEON, J.; ANTONIW, J.; RUDD, J.; SKINNER, W.; HARGREAVES, J.; KOSACK, K.H. Analysis of expressed sequence tags from the wheat leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*). **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 376-389, 2005.

KIBA, T.; NAITOU, T.; KOIZUMI, N.; YAMASHINO, T.; SAKAKIBARA, H.; MIZUNO, T. Combinatorial microarray analysis revealing *Arabidopsis* genes implicated in cytokinin responses through the His → Asp Phosphorelay circuitry. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 46, p. 339-355, 2005.

KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* spp.: the ascigenous stage of *Phoma citricarpa* McAlp and its relation to black spot of citrus. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, New York, v. 73, p. 249-292, 1948.

KIM, Y.C.; KIM, S.Y.; PAEK, K.H.; CHOJ, D.; PARK, J.M. Suppression of CaCYP1, a novel cytochrome P450 gene, compromises the basal pathogen defense response of pepper plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 345, p. 638-645, 2006.

KITA, M.; HISADA, S.; ENDO-INAGAKI, T.; OMURA, M.; MORIGUCHI, T. Changes in the levels of mRNAs for putative cell growth-related genes in the albedo and flavedo during citrus fruit development. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 19, p. 582-587, 2000.

KOCAL, N.; SONNEWALD, U.; SONNEWALD, S. Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between Tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 148, p. 1523–1536, 2008.

KOORNNEEF, M.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K.M.; SCHWARTZ, S.H.; ZEEVAART, A.D. The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 36, p. 83-89, 1998.

KÖRBES, A.P. **Avaliação da capacidade de genes de *Eucalyptus grandis* em conferir tolerância à deficiência hídrica**. 2006. 83 p. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

KOVALEVA, G.Y.; GELFAND, M.S. Transcriptional regulation of the methionine and cysteine transport and metabolism in streptococci. **FEMS Microbiol Letters**, Amsterdam, v. 276, p. 207–215, 2007.

KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v. 65, p. 945-950, 1981.

_____. Black spot. In: WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M.; TIMMER, L.W. (Ed.). **Compendium of citrus diseases**. St. Paul, APS Press, 1988. p. 10-12.

_____. History and epidemiology of Citrus Black Spot in South Africa. **Proceedings of International Society of Citriculture**, Tokyo, v. 2, p. 1296-1299, 1996.

LEITE, B.; PASCHOLATI, S.F.; KITAJIMA, E.W.; ISHIDA, M.L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 9, p. 1-41, 2001.

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

LIU, Z-M.; KOLATTUKUDY, P.E. Identification of a gene product induced by hard-surface contact of *Colletotrichum gloeosporioides* conidia as a ubiquitinconjugating enzyme by yeast complementation. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 3592–3597, 1998.

MADDOCKS, S.E.; OYSTON, P.C.F. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. **Microbiology**, Penryn, v. 154, p. 3609-3623, 2008.

MANDHAR, J.B.; KUNWAR, I.K.; SINGH, T.; HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B. Penetration and infection of soybean leaf tissues by *Colletotrichum truncatum* and *Glomerella glycines*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 75, n. 6, p. 705-709, 1985.

MARQUES, J.P.R.; FREITAS-ASTUA, J.F.; KITAJIMA, E.W.; APEZZATO-da-GLÓRIA, B. Lesões foliares e de ramos de laranjeira-doce causadas pela leprose-dos-citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 1531-1536, 2007.

MARQUES, J.P.R.; AMORIM, L.; SPÓSITO, M.B.; APEZZATO DA GLÓRIA, B. Histopathology of black spot symptoms in sweet orange fruits. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 59., 2008, Natal. **Abstracts...** Natal: Quatro Cores, 2008. 1 CD-ROM.

MARTEN, U.; KNEUSEL, R.E. The phenolic compounds in plant resistance. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 16, p. 153-170, 1988.

MATIELLO, R.R.; BARBIERI, R.L.; CARVALHO, F.I.F. Resistência de plantas a moléstias fúngicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, p. 161-168, 1997.

MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag, 2005. 929 p.

MAUCH, F.; STAEHELIN, A. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. **Plant Cell**, Baltimore, v. 1, p. 447–457, 1989.

MAULE, A.; LEH, V.; LEDERER, C. The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 279-284, 2002.

McONIE, K.C. The latent occurrence in citrus and others hosts of a *Guignardia easiluy* confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, v. 54, p. 40-43, 1964.

MERCURE, E.W.; KUNOH, H.; NOCHOLSON, R.L. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requeriment for disease development. **Phyological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 45, n. 6, p. 407-720, Dec. 1994.

MEHTA, A.; SILVA, M.S.; GUIDETTI-GONZALEZ, S.; CARRER, H.; TAKITA, M.A.; MARTINS, N.F. Signaling pathways in a Citrus EST database. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 3, p. 734-751, 2007. Supplement.

MELO-DE-PINNA, G.F.A.; KRAUS, J.E.; MENEZES, N.L. de. Morphology and anatomy of leaf mine in *Richterago riparia* Roque (Asteraceae) in the campos rupestres of Serra do Cipó, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 62, n. 1, p. 179-185, 2002.

MENDONÇA, L.M.V.L.; CONCEIÇÃO, A. de; PIEDADE, J.; CARVALHO, V.D.; THEODORO, V.C.A. Caracterização da composição química e do rendimento dos resíduos industriais do limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 870-874, 2006.

MOLLER, S.G.; CHUA, N-H. Interactions and intersections of plant signaling pathways. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 293, p. 219-234, 1999.

MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. In: RODRIGUEZ, O.; ROSSETTI, V., MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. (Ed.). **Citricultura brasileira**. São Paulo: Fundação Cargill, 1991. p. 735-762.

NAIR, J.; CORBIN, J.B. Histopathology of *Pinus radiata* seedlings infected by *Colletotrichum acutatum* f. sp. Pineae. **Phytopathology**, St. Paul, v. 71, n. 8, p. 777-783, Aug. 1981.

NAMEKATA, T.; ROSSI, A.C.; CERAVOLO, L.C. Avaliação de novos métodos de erradicação de cancro cítrico. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, n. 1, p. 67-78, 1996.

NICHOLSON, R.L.; EPSTEIN, L. Adhesion of fungi to the plant surface: prerequisite for pathogenesis. In: COLE, G.T.; HOCH, H.C. (Ed.). **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York: Plenum Press, 1991. p. 3-23.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, H. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 369-389, 1992.

NICOLOSI, E.; DENG, N.; GENTILE, A.; LA MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 8, p. 1155-1166, 2000.

OHLROGGE, J.; BENNING, C. Unraveling plant metabolism by EST analysis. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 224-228, 2000.

PANDOLFI, V. **Análise transcricional do fitopatógeno *Fusarium graminearum* Schwabe na interação antagonista com a bactéria *Pantoea agglomerans* Gavini.** 2006. 141 p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 417-453.

PICOSSI, S.; BELITSKY, B.R.; SONENSHEIN, A.L. Molecular mechanism of the regulation of *Bacillus subtilis* gltAB expression by GltC. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 365, p. 1298–1313, 2007.

PILLEGI, S.A.V. **Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico.** 2006. 141 p. Dissertação (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S. CARDOSO, S.A.B. Variedades copas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros.** Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. cap. 3, p. 39-60.

PISCHKE, M.S.; HUTTLIN, E.L.; HEGEMAN, A.D.; SUSSMAN, M.R. A transcriptome-based characterization of habituation in plant tissue culture. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 1255-1278, 2006.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: _____ (Ed.). **Citros.** Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. cap. 4, p. 63-104.

PRABHPREET, I.; DHILLON, M.; SINGH, P.P.; INDER, P. Mesophyll characteristics of muskmelon leaf in relation to resistance/susceptibility to downy mildew. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 15, n. 1, p. 18-23, 2000.

REGALADO, A.P.; PINHEIRO, C.; VIDAL, S.; CHAVES, I.; RICARDO, P.P.; RODRIGUES-POUSADA, R.; RODRIGUES-POUSADA, C. The *Lupinus albus* class-III chitinase gene, *IF3*, is constitutively expressed in vegetative organs and developing seeds. **Planta**, Berlin, v. 210, p. 543-550, 2000.

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

RIGDEN, D.J.; MELLO, L.V. Anotação funcional computacional de proteínas: novos métodos computacionais poderão preencher lacunas do sistema de anotação atual. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Florianópolis, v. 25, p. 63-70, 2002.

ROBBS, C.F. A mancha preta dos frutos cítricos (*Phyllosticta citricarpa*) ameaça a citricultura paulista. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 11, p. 75-86, 1990.

ROBBS, C.F.; PIMENTEL, J.P.; RIBEIRO, R.L. A mancha preta dos citros causada por *Phoma citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 3, p. 455, 1980. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 1980, Rio de Janeiro.

ROBERTS, R.G.; SNOW, J.P. Histopathology of cotton boll rot caused by *Colletotrichum capsici*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, n. 4, p. 390-397, Apr. 1984.

RODRIGUES JUNIOR, C.J. **Mecanismos de resistência das plantas aos agentes patogénicos**. Lisboa: Junta de Investigações Científicas do Ultramar, 1980.

ROSSETI, V. Citrus canker in Latin America: a review. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Tokyo, v. 3, p. 918-924, 1977.

ROSSETI, V.; FEICHTENBERGER, E.; SILVEIRA, M.L. **Cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. citri)**: bibliografia analítica. São Paulo: Instituto Biológico. 1981. 203 p.

RUBIALES, D.; NIKS, R.E. Low apressorium formation by rust fungi on *Hordeum chilense* lines. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, p. 1007-1012, 1992.

RUEPP, A.; ZOLLNER, A.; MAIER, D.; ALBERMANN, K.; HANI, J.; MOKREIS, M.; TETKO, I.; GULDENER, U.; MANNHAUPT, G.; MUNSTERKOTTER, M.; MEWES, H.W. The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 32, p. 5539-5545, 2004.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973.

SAKAKIBARA, H.; TAKEI, K.; HIROSE, N. Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 11, n. 9, p. 440-448, Sept. 2006.

SALZMAN, R.A.; FUJITA, T.; ZHU-SALZMAN, K.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. **Plant Molecular Biology Reporter**, Ottawa, v. 17, p. 11-17, 1999.

SAMBUGARO, R.; FURTADO, D.L.; RODELLA, R.A.; MATTOS, C.R.R. Anatomia foliar de seringueira (*Hevea* spp.) e desenvolvimento da infecção por *Microcyclus ulei*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 1, p. 51-56, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1890 p.

SANTOS, J.M. dos. **Microscopia eletrônica de varredura aplicada às ciências biológicas**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 56 p.

SCHAEFFER, H.J.; WEBER, M.J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 19, p. 2435–2444, 1999.

SCHINOR, E.H.; MOURÃO-FILHO, F.A.A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; SOBRINHO, J.T. Colonização de folhas de laranjeira “Pêra” e variedades afins por *Guignardia citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 5, p. 479-483, set./out. 2002.

SCHUTTE, G.C; BEETON, K.V.; KOTZÉ, J.M. Rind stippling on Valencia oranges by copper fungicides used for control of citrus black spot in South África. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, p. 851-854, 1997.

SCORA, R.W. On the history and origin of *Citrus*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v. 102, n. 6, p. 369, 1975.

SEO, Y.S.; CHO, J.I.; LEE, S.K.; RYU, H.S.; HAN, M.; HAHN, T.R.; SONNEWALD, U. Current insights into the primary carbon flux that occurs in plants undergoing a defense response. **Plant Stress**, Takamatsu, v. 1, p. 42–49. 2007.

SHAH, J. Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 229–260, 2005.

SHALITIN, D.; WOLF, S. *Cucumber mosaic virus* infection affects sugar transport in melon plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, p. 597-604, 2000.

SHETTY, N.P.; MEHRABI, R.; LÜTKEN, H.; HALDRUP, A.; KEMA, G.H.J.; COLLINGE, D.B.; JORGENSEN, H.J.L. Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. **New Phytologist**, London, v. 174, p. 637–647, 2007.

SHETTY, N.P.; JORGENSEN, H.J.L.; JENSEN, J.D.; COLLINGE, D.B.; SHETTY, H.S. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 121, p. 267–280, 2008.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion of Plant Biology**, London, v. 3, p. 217-223, 2000.

SILVA, L.M., ALQUINI, Y.; CAVALLET, V.J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 183-194, 2005.

- SPÓSITO, M.B. **Dinâmica temporal e espacial da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros**. 2004. 112 p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- STANGARLIN, J.R.; PASCHOTATI, S.F. Atividade de ribulose-1, 5-bifosfatocarboxilase-oxigenase (Rubisco), clorofilase, β -1, 3-glucanase e quitinase e conteúdo de clorofila em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) infectados com *Uromyces appendiculatus*. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 34-42, jan./mar. 2000.
- SWARBRICK, P.J.; SCHULZE-LEFERT, P.; SCHOLLES, J.D. Metabolic consequences of susceptibility and resistance in barley leaves challenged with powdery mildew. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 29, p. 1061–1076, 2006.
- SWINGLE, W.T; REECE, R.C. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: REUTHER, W.; SWINGLE, W.T; REECE, R.C. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. p. 190-430.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Trad. de E.R. Santarém et al. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.
- TAKAHASHI, Y.; SOYANO, T.; SASABE, M.; MACHIDA, Y. MAP kinase cascade that controls plant cytokinesis. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 136, p. 127-132, 2004.
- TAKEMOTO, D.; YOSHIOKA, H.; DOKE, N.; KAWAKITA, K. Disease stressinducible genes of tobacco: expression profile of elicitor-responsive genes isolated by subtractive hybridization. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 118, n. 4, p. 545-553, Aug. 2003.
- TAO, N.; CHENG, Y.; XU, J.; XU, Q.; XIUXIN DENG, X. An effective protocol for the isolation of RNA from the pulp of ripening citrus fruits. **Plant Molecular Biology Reporter**, Ottawa, v. 22, p. 305-305, Sept. 2004.
- TARGON, M. L.P.N.; TAKITA, M.A.; AMARAL, A.M.; SOUZA, A.A.; LOCALI-FABRIS, E.C.; DORTA, S.O.;BORGES, K.M.;SOUZA, J.M.;RODRIGUES, C.M.; LUCHETA, A.R.; FREITAS-ASTUA, J.; MACHADO, M.A. CitEST libraries. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 3, p. 1019-1023, 2007, Supplement.
- TECSI, L.I.; SMITH, A.M.; MAULE, A.J.; LEEGOOD, R.C. A spatial analysis of physiological changes associated with infection of cotyledons of marrow plants with *Cucumber mosaic virus*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, p. 975-985, 1996.
- TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. **Compendium of citrus diseases**. 2nd ed. St. Paul: APS Press, 2000. 92 p.

TOFFANO, L. **Doenças pós-colheita em citros:** potencial do *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei*, ácido jasmônico, albedo (*Citrus sinensis* var. Valência) e flavedo (*Citrus aurantifolia* var. Tahiti) no controle e na indução de resistência. 2005. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

TRAIL, F.; XU, J.R.; SAN MIGUEL, P.; HALGREN, R.G.; KISTLER, H.C. Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, p. 187–197, 2003.

URIBEONDO, J.D.; FORSTER, H.; ADASKAVEG, J.E. Digital image analysis of internal light apots of apressoria of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 93, n. 8, p. 923-930, 2003.

WEBBER, H.J. History and development of the citrus industry. In: WEBER, H.J.; BATCHELLOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Bethesda: University of California Press, 1967. v. 1, chap. 1, p. 1.

WIDMANN, C.; GIBSON, S.; JARPE, M.B.; JOHNSON, G.L. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiological Reviews**, Washington, v. 79, p. 143-180, 1999.

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

XIONG, L.; ISHITANI, M.; LEE, H.; ZHU, J.K. The *Arabidopsis* LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stressresponsive gene expression. **Plant Cell**, Baltimore, v. 13, p. 2063-2083, 2001.

XIONG, L.; ZHU, J.-K. Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. **Physiologia Plantarum**, Berlin, v. 112, p. 152-166, 2001.

YANG, T.; POOVAIAH, B.W. Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 99, p. 4097-4102, 2002.

YOSHIOKA, H.; NUMATA, N.; NAKAJIMA, K.; KATOU, S.; KAWAKITA, K.; ROWLAND, O.; JONES, J.D.G.; DOKE, N. Nicotiana benthamiana gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to Phytophthora infestans. **Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 706-718, 2003.

ZHANG, S.; KLESSIG, D.F. MAPK cascades in plant defense signaling. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 6, n. 11, p. 520-526, 2001.

ZHONG, R.; KAYS, S.J.; SCHROEDER, B.P.; YE, Z.H. Mutation of a chitinase-like gene causes ectopic deposition of lignin, aberrant cell shapes, and overproduction of ethylene. **Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. 165-179, 2002.

ZHU, J-K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 247-273, 2002.

ZIMMER, D.P.; SOUPENE, E.; LEE, H.L.; WENDISCH, V.F.; KHODURSKY, A.B.; PETER, B.J.; BENDER, R.A.; KUSTU, S.; Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: Scavenging as a defense against nitrogen limitation. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 97, n. 26, p. 14674–14679, Dec. 2000.

ANEXOS

A – Biblioteca de Albedo do Fruto Sadio (BAFS)

Unigenes encontrados na BAFS			
Identificação do unigene	Quantidade de reads no contig	Anotação Presumível contra o Genbank	E-value
Metabolismo de compostos primários e secundários			
S 1C9	1	glutamine synthetase	3e-74
S 1C10	1	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF	4e-61
S 1E11	1	amidohydrolase 2	7e-31
S 1F11	1	Phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole	2e-41
S 1H3	1	glutamate--ammonia ligase	7e-54
S 2G2	1	ketoglutarate semialdehyde dehydrogenase	2e-23
S 2H3	2	esterase	1e-26
S 2H5	1	L-asparaginase I	3e-68
S 2G6	1	2-dehydropantoate 2-reductase	1e-52
S2G7	1	putative MANNOSYLTRANSFERASE PIMB	8e-22
S2A8	1	phosphate synthase	9e-50
S2F8	1	SqdX	9e-21
S 3C5	1	dihydrodipicolinate synthase	3e-25
S 3G6	2	histidinol dehydrogenase	1e-36
S 3F7	2	aldehyde dehydrogenase	1e-34
S 2H2	2	glycosyl transferase, group 1 family protein	3e-41
S3G11	2	dihydrodipicolinate synthase	3e-22
S 2F2*	5	carbamoyl phosphate synthase large subunit	2e-75
S 1E3**	15	chitinase	1e-47
Metabolismo energético			
S 1G4	1	mitochondrial F1 ATP synthase beta subunit	4e-21
S 1H8	1	thiol:disulfide interchange protein DsbE, putative	1e-44
S 1C11	1	molybdopterin oxidoreductase	5e-42
S 2A3	1	Deoxyribokinase	2e-26
S 2G3	1	cytochrome D ubiquinol oxidase subunit II	3e-56
S 2E6	1	indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase, alpha subunit	1e-35
S 2A 7	1	Ycil-like protein	3e-31

S 2F7	3	carbohydrate kinase, PfkB	2e-26
S 3E11	1	tartrate dehydrogenase	3e-54

Ciclo celular e processamento do DNA

S 2F3	1	exodeoxyribonuclease V	1e-34
S 2H4	1	DNA primase	2e-27
S 3H2	1	TOPRIM domain-containing protein	1e-23
S 3E7	2	DNA polymerase I	1e-47

Transcrição

S 1F5	1	phosphonate metabolism transcriptional regulator PhnF	2e-44
S 2D1	1	leucyl-tRNA synthetase	9e-91
S 2G1	1	AraC type:AraC-type transcriptional regulator	6e-32
S 2B2	1	Helix-turn-helix motif	7e-24
S 2C11	1	Periplasmic binding protein/LacI transcriptional regulator	4e-38
S 3F3	1	pyoverdine synthetase A	9e-62
S 3H7	1	GntR family transcriptional regulator	1e-67
S2B8	1	putative HTH-type transcriptional regulator	1e-21
S 3D8	3	response regulator receiver domain- containing protein	2e-104
S 2F5	2	regulatory protein, LacI	1e-26
S 2G8	1	transcription regulator protein	1e-21

Síntese de proteínas

S 1B10	1	methyl-accepting chemotaxis sensory transducer	7e-46
S 2C12	1	chaperone protein HscA	6e-85
S 3F6	1	L-alanine-DL-glutamate epimerase and related enzymes of enolase superfamily	2e-31
S 3D5	1	CoA-binding domain-containing protein	3e-29
S 3A6	1	GTP-binding protein Era	2e-42
S 3B8	3	Phage-related protein, tail component	2e-61

Vias de transporte de componentes celulares

S 1B1	1	putative ABC transporter permease	2e-69
S 1D1	1	chloride transporter, chloride channel (ClC) family	1e-24
S 1E8	1	filamentous hemagglutinin, intein- containing, putative	1e-78
S 2C3	1	zinc ABC transporter, permease protein	1e-56
S 2H10	1	ABC transporter-like	4e-44
S 1B2	1	sulphate transport system permease	1e-22

S 1G5	1	glycine betaine/L-proline transport	3e-31
S 1H6	1	sulfate/thiosulfate ABC transporter	1e-21
S 3D12	1	activation/secretion protein	1e-27
Transdução de Sinais			
S 1H1	1	flagellar hook-associated protein FlgK	8e-28
S 1G3	1	flagellar basal body-associated protein FliL-like protein	4e-25
S 1H9	1	flagellar motor switch protein	6e-97
S 3A 5	1	TonB-dependent siderophore receptor	1e-28
S 2D7	1	citrate transporter	1e-26
S 2G11	1	sulfate transporter, putative	7e-34
S 2E12	1	flagellar hook-associated protein 3	2e-32
Proteína dependente de cofator			
S 1D8	1	aldo/keto reductase	3e-49
S 2E7	1	2,4-dienoyl-CoA reductase FadH	2e-60
S 3B3	1	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	7e-22
Proteínas Hipotéticas			
S 1G1	1	hypothetical protein BCAL2966 [<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315]	8e-32
S 1A12	1	hypothetical protein Pfl01_3945 [<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1]	3e-27
S 2C4	1	hypothetical protein PACG_00342 [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> C3719]	1e-22
S 2F4	1	hypothetical protein Pfl01_0901 [<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1]	2e-72
S 2G4	1	hypothetical protein Pmen_3598 [<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp]	8e-28
S 2C5	2	hypothetical protein Bpet4022 [<i>Bordetella petrii</i> DSM 12804]	5e-29
S 2D10	2	hypothetical protein PSPPH_1367 [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola 1448A]	6e-33
S 2A12	2	hypothetical protein PFL_3094 [<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5]	9e-22
S 3G2	1	hypothetical protein Mfla_0171 [<i>Methylobacillus flagellatus</i> KT]	4e-44
S 3D9	1	hypothetical protein PSPTO_1349 [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. Tomato str. DC3000]	2e-22
S 2 D6**	9	hypothetical protein PFL_5284 [<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5]	2e-70
S 2C1	1	hypothetical protein PROVALCAL_01341 [<i>Providencia alcalifaciens</i>]	8e-24
S 2B4	1	hypothetical protein PP_1474	2e-31

S2D6	3	[<i>Pseudomonas putida</i> KT2440] hypothetical protein PSPTO_1486 [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> str. DC3000	2e-20
S2A5	1	hypothetical protein PputGB1_1079 [<i>Pseudomonas putida</i> GB-1	1e-19
S2C9	1	hypothetical protein Psyr_1296 [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	3e-22
S 1E2	1	hypothetical protein PputGB1_2009 [<i>Pseudomonas putida</i> GB-1]	2e-29
S 1G6	1	hypothetical protein PP_4488 [<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	1e-21

Sem Similaridade

S 1C1	1	Sem Similaridade
S 1F1	1	Sem Similaridade
S 1A2	1	Sem Similaridade
S 1D2	1	Sem Similaridade
S 1B3	1	Sem Similaridade
S 1F3	1	Sem Similaridade
S 1B4	1	Sem Similaridade
S 1E4	1	Sem Similaridade
S 1C5	1	Sem Similaridade
S 1A6	1	Sem Similaridade
S 1C6	1	Sem Similaridade
S 1B7	1	Sem Similaridade
S 1F8	1	Sem Similaridade
S 1B9	1	Sem Similaridade
S 1D9	1	Sem Similaridade
S 1H11	1	Sem Similaridade
S 1B12	1	Sem Similaridade
S 1D12	1	Sem Similaridade
S 1F12	1	Sem Similaridade
S 2D3	1	Sem Similaridade
S 2D5	1	Sem Similaridade
S 2E5	1	Sem Similaridade
S 2C6	1	Sem Similaridade
S 2B7	1	Sem Similaridade
S 2C8	1	Sem Similaridade
S 2G9	1	Sem Similaridade
S 2F10	1	Sem Similaridade
S 3D1	1	Sem Similaridade
S 3H1	1	Sem Similaridade
S 3F2	1	Sem Similaridade
S 3D4	1	Sem Similaridade
S 3F4	1	Sem Similaridade
S 3G4	1	Sem Similaridade

S 3H8	2	Sem Similaridade
S 3H9	3	Sem Similaridade
S 3C10	3	Sem Similaridade
S 3A12	3	Sem Similaridade

* Transcritos apresentando média expressão.

** Transcritos altamente expressos.

B – Biblioteca de Albedo do Fruto Contaminado (BAFC)

Unigenes na BAFC			
Identificação do unigene	Quantidade de reads no contig	Anotação Presumível contra o Genbank	E-value
Metabolismo de compostos primários e secundários			
C1C4	1	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF	2e-68
C1E2	1	aromatic amino acid beta-eliminating	8e-26
C 1F4	1	amino acid adenylation	1e-29
C 1G5	1	shikimate 5-dehydrogenase	7e-22
C 1H6	1	mannosyltransferase family protein	5e-25
C 1H8	1	ribonuclease PH	7e-20
C 1A12	1	cobalt-precorrin-6x reductase	1e-35
C 2A4	1	histidinol-phosphate aminotransferase	1e-30
C 2G5	4	Succinic semialdehyde dehydrogenase	5e-40
C 2B8	1	fimbrial usher protein	2e-23
C 2G9	1	potassium-transporting ATPase subunit C	3e-43
C 2H9	1	galactonate dehydratase	2e-32
C 3B2	1	threonine aldolase, low-specificity	9e-27
C 3F5	1	4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase	2e-72
C 3H5	1	isocitrate dehydrogenase (NADP+)	6e-27
C 3G6	1	putative lipoprotein	7e-29
C 3G12 **	6	proline dehydrogenase	5e-83
C 4C3	1	phosphoserine phosphatase SerB	7e-27
C 4C4	1	riboflavin synthase subunit beta	9e-27
C 4F4	1	putative 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase	3e-55
C 4H4	1	putative decarboxylase	4e-46
C 4C5	1	dihydrodipicolinate synthase	1e-22
C 5B5	2	putative resolvase	4e-33
C 2A 1	2	HAD-superfamily hydrolase	3e-22
C 3F8	2	acyl-CoA dehydrogenase	5e-39
C 3H11	2	cation-transporting P-type ATPase	2e-99
C 4D6	3	acyl-CoA synthetase, putative	1e-74
C 5A 4	3	glutamate racemase	5e-61
C 5C4	3	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	1e-36
C 1B8	1	Phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole	1e-21
C 1A9	1	glutamate--ammonia ligase	2e-32
		malyl-CoA lyase	2e-21
C 1B11	1	ketoglutarate semialdehyde dehydrogenase	2e-43
C 1C12	1	esterase	1e-29

C 1E5	1	L-asparaginase I	3e-21
C 1G1	1	Mandelate racemase/muconate lactonizing protein	7e-29
C 2E6	1	L-alanine-DL-glutamate epimerase	2e-23
C 2D8	1	DgoA protein	9e-23
C 2E9	1	2-oxo-3-deoxygalactonate 6-phosphate aldolase/galactonate dehydratase	2e-28
C 2E11	1	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase	4e-26
C 3A1	1	aromatic amino acid beta-eliminating	8e-26
C 3D1	1	UbiA prenyltransferase	4e-27
C 3D3	1	phosphate synthase	2e-30
C 3G4	1	SqdX	7e-25
C 3F10	1	glycosyl transferase, group 1 family protein	2e-31
C 3D12	1	dihydrodipicolinate synthase	8e-42
C 3E12	1	HMG-CoA lyase-like	6e-22
C 2E1	1	pyruvate carboxyltransferase	5e-21
C 2F1	1	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	4e-22
C 2F8	1	chitin-inducible gibberellin-responsive	8e-23
C 2F9	1	putative phosphoglycolate	2e-67
C 1H9	1	hydrolase	3e-64

Metabolismo energético

C1E10	1	dihydroxyacetone kinase	2e-21
C 1E11	1	cytochrome c oxidase, subunit I	2e-81
C 1D12	1	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	8e-30
C 1E12	1	mitochondrial F1 ATP synthase beta subunit	4e-21
C 2A2	1	aldehyde dehydrogenase	8e-74
C 2A 7	1	bacteriophytochrome histidine kinase	2e-28
C 3E6	1	Dak phosphatase	3e-36
C 3E7	1	ribulose-phosphate 3-epimerase	1e-38
C 3D9	1	phytochrome-like protein	6e-29
C 3B10	1	hydroxypyruvate isomerase	2e-83
C 4E7	1	phosphotransferase system, fructose-specific IIBC component	3e-31
C 4C9	1	PTS fructose IIC component	6e-24
C 4D9	1	2-keto-3-deoxygalactonate kinase	5e-19
C 5F2	1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	1e-29
C 4D11 *	4	amine dehydrogenase	5e-27
C 2E8	1	aa3-type cytochrome	2e-39
C 2B12	1	CoxA	6e-38
C 2F11	1	Deoxyribokinase	2e-27
C 1E7	1	tartrate dehydrogenase	1e-67
C 1D10	1	PedI	1e-55
C 1C6	1	phytochrome-like protein	1e-22
C 5B3	1	phytochrome A, two-component sensor protein	1e-31

Ciclo celular e processamento do DNA			
C 1D2	1	ATP-dependent DNA helicase RecG	3e-76
C 3A10	1	exonuclease V alpha subunit RecD	5e-21
C 4E3	1	DNA primase	1e-37
C 3H8 *	4	glutamate-ammonia-ligase adenylyltransferase	9e-92
Transcrição			
C1D1	1	putative regulator	7e-24
C 1H1	1	response regulator	8e-91
C 1D3	1	MassB	3e-61
C 1F6	1	pyoverdine synthetase A	2e-53
C 1A8	1	transcription regulator protein	1e-21
C 1G8	1	GntR family transcriptional regulator	7e-27
C1C10	1	HTH-type transcriptional regulator	3e-21
C 1F11	1	TetR family transcriptional regulator	2e-34
C 1G11	1	Bbp21	2e-23
C 2G1	1	transcriptional regulator, MerR family	3e-33
C 2D2	1	Periplasmic binding protein/LacI transcriptional regulator	1e-30
C 2H4	1	ribonuclease D	3e-48
C 3H1	1	predicted regulator of arylsulfatase activity	8e-108
C 1F3 *	4	sugar fermentation stimulation protein A	1e-92
C 3H3 *	6	LysR family transcriptional regulator	1e-55
C 1A4	1	diguanylate cyclase	8e-64
C 1B6	1	sigma-54 dependent transcriptional regulator	1e-21
C 1A10	1	LuxR family DNA-binding response regulator	1e-32
C 1C11	1	putative two-component response regulator	1e-56
C 2D9	1	nodulation protein W	1e-25
C 3A4	1	GGDEF	1e-66
C 3A2	1	PsoB	1e-44
C 3A9	1	syringopeptin synthetase B	7e-54
C 3A12	1	MassC	3e-40
C 4B6	1	peptide synthetase XpsB	1e-38
C 4G6	1	putisolvin synthetase	6e-40
C 5C1	1	arthrofactin synthetase B	2e-53
Síntese de proteínas			
C 2G12	1	pili assembly chaperone	4e-28
C 1B12	1	CoA-binding domain-containing protein	6e-28
C 5F10	1	GTP-binding protein Era	1e-23
C 1A1	1	ion-transport protein yfeO	4e-51
C1B3	1	hemolysin activator HlyB	9e-49
C 5B2	1	P pilus assembly protein	8e-26
Vias de transporte de componentes celulares			
C 1C1	1	chloride transporter, chloride channel (ClC)	1e-51

		family	
C 1F1	1	general secretion pathway protein GspK	2e-35
C 1C7	1	activation/secretion protein	1e-27
C 2C2	1	TPS family activation/secretion protein	1e-53
C 5A3	1	gamma-aminobutyrate transporter	3e-28
C 2C6	1	HlyD family secretion protein	5e-43
C 2G8	1	putative ABC transporter permease	5e-36
C 2C9	1	ABC peptide transporter, ATP-binding component	8e-58
C 4C2	1	polar amino acid ABC transporter	1e-27
C 3D2	1	D-xylose ABC transporter, periplasmic-D xylose binding protein	9e-28
C 3E10	1	peptidase C39, bacteriocin processing	2e-75
C 3H12	1	amino acid ABC transporter permease	4e-19
C 4D5	1	spermidine/putrescine ABC transporter ATP	2e-22
C 4A 8	1	serine protease	1e-49
C 4C11	1	GABA permease	9e-26
C 1B2 *	4	phosphate ABC transporter permease	8e-55
C 2E2 *	6	general secretion pathway protein F	5e-37
C 4B8	1	ion-transport protein yfeO	4e-51
C5D4	1	polyamine ABC transporter	4e-29
C 4C7	1	class II aldolase/adducin	1e-21
C 4H2	1	putative ion channel protein	1e-51
C 4F10	1	general secretion pathway protein K	1e-66
C 4G11	1	NCS2 family nucleobase	9e-59
C 4E9	1	Multidrug resistance efflux pump	9e-20
C 4H12	1	efflux transporter	2e-21
C 3A5	1	P-hydroxybenzoic acid efflux pump subunit	4e-21
C 3B12	1	fusaric acid resistance protein FusE II	3e-22
C 3G2	1	D-xylose ABC transporter	3e-20
C 1G9	1	ABC-type ribose transport system	2e-27
C 1H12	1	FusE-MFP/HlyD family membrane protein	3e-28
Transdução de sinais			
C 1G7	1	TonB-dependent siderophore receptor	1e-38
C 2B10	1	serine transporter SdaC	4e-16
C 3D8	1	transporter, putative	7e-21
C 4F7	1	flagellar hook-associated protein 3	2e-27
C 5G2	1	citrate transporter	3e-71
C 5H2	1	sulfate transporter, putative	2e-38
C 5F12	1	flagellar basal body-associated protein FliL-like protein	1e-23
C 3C6 *	6	AsmA	9e-39
C4B12	1	FpvAIII	2e-26
C 4A9	1	type I ferripyoverdine receptor, FpvB	4e-32
C 4F9	1	Outer membrane receptor for ferric	9e-21

C 4H10	1	Fe(III)-pyochelin receptor precursor	4e-23
Defesa celular e virulência			
C 1G3	2	Catalase	1e-27
C 3D10	1	NtaA/SnaA/SoxA family monooxygenase	4e-61
C 1F8	2	DszA family monooxygenase	2e-68
C 5F1	1	membrane-associated protein in eicosanoid and glutathione metabolism	4e-30
C 5G1	2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa (Ubiquitin-protein ligase)	1e-19
C 4E10	1	coenzyme F420-dependent	2e-54
C 4A12	1	luciferase-like protein	2e-36
Interação intra-extracelular			
C 3B7	1	nitrogen metabolism transcriptional regulator, NtrC, Fis family	3e-80
C 4A 2	1	sensor histidine kinase	1e-20
Proteína dependente de cofator			
C 2B4	2	condensin subunit ScpB	3e-25
C 1B4	1	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	6e-53
C 2H7	1	FAD dependent oxidoreductase	1e-94
C3H6	1	aldo/keto reductase	3e-42
C 2A11 *	4	flavin reductase domain-containing protein	7e-41
Facilitador de transporte			
C 1A 6	1	opacity family porin protein	5e-19
C 2C5	1	Full=Ferric-pseudobactin M114 receptor pbuA	3e-36
C 3C1	1	major facilitator transporter	4e-19
C 4A 11	1	RND efflux system, outer membrane lipoprotein	8e-37
C 4H6	1	Cl ⁻ channel, voltage-gated family protein	3e-27
C 2H2	1	xanthine/uracil permease	2e-113
C 2D10	1	uracil permease	6e-26
Proteínas hipotéticas			
C1B1	1	hypothetical protein Ent638_2922 [Enterobacter sp. 638]	1e-30
C1E1	1	hypothetical protein ENTCAN_00470	1e-19
C 1F2	1	hypothetical protein PA14_16750 [Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14]	1e-22
C 1H2	1	hypothetical protein PFL_4841 [Pseudomonas fluorescens Pf-5]	2e-29
C 1A3	1	hypothetical protein SGR_4079 [Streptomyces griseus subsp. griseus NBRC 13350]	1e-20
C 1A5	1	hypothetical protein PFL_1288 [Pseudomonas fluorescens Pf-5]	7e-155
C 1D7	1	hypothetical protein PA0902	3e-21

C 1H7	1	[<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 hypothetical protein YPTB1824 [<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 32953]	1e-55
C1F9	1	hypothetical protein ECP_2415 [<i>Escherichia coli</i> 536]	1e-51
C 1B10	1	hypothetical protein Pfl01_5548 [<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1]	5e-24
C 2D5	1	hypothetical protein Ent638_1315 [<i>Enterobacter</i> sp. 638]	3e-45
C 2H6	1	hypothetical protein Pfl01_0575 [<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1]	8e-63
C 2D7	1	hypothetical protein EUBSIR_00009 [<i>Eubacterium siraeum</i> DSM 15702]	2e-36
C 2E10	1	hypothetical protein Pfl01_0901 [<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1]	6e-89
C 2H10	1	hypothetical protein Pfl01_4226 [<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1]	7e-21
C 2H11	1	hypothetical protein Pfl01_1032 [<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1]	4e-39
C 2A12	1	hypothetical protein PFL_4659 [<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5]	9e-26
C 2D12	1	hypothetical protein PP_2855 [<i>Pseudomonas putida</i> KT2440]	9e-34
C3F2	1	hypothetical protein Pfl01_0914 [<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1]	7e-50
C 3F4	1	hypothetical protein PFL_5617 [<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5]	4e-29
C 3H4	1	hypothetical protein Pput_1298 [<i>Pseudomonas putida</i> F1]	3e-35
C 3E5	1	hypothetical protein Pfl01_0485 <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1]	1e-21
C 3A6	1	hypothetical protein PFL_4454 [<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5]	1e-38
C 3D6	1	hypothetical protein PFL_2174 [<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5]	4e-39
C 3C8	1	hypothetical protein PputGB1_4907 [<i>Pseudomonas putida</i> GB-1]	7e-47
C4G2	1	hypothetical protein Pput_2040 [<i>Pseudomonas putida</i> F1]	9e-40
C 4F2	1	hypothetical protein Bpet3220 [<i>Bordetella petrii</i> DSM 12804]	4e-32
C 4H7	1	hypothetical protein PFL_5887 [<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5]	2e-83
C 4B10	1	hypothetical protein PFL_0977 [<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5]	5e-28
C 5H4	1	hypothetical protein BCAS0675	3e-25

C 5E11	1	[<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315] hypothetical protein PFL_3094	7e-26
C 1G6	2	[<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5] hypothetical protein PFL_1288	1e-92
C 1G10	2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>] hypothetical protein Pfl01_0062	2e-63
C 5E12	2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1] hypothetical protein PFL_2432	2e-65
C 2D1	3	<i>Pseudomonas sp</i> hypothetical protein Pmen_1774	7e-28
C 5D2	1	[<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp] hypothetical protein PA2G_03469	
C 2F3 **	22	[<i>Pseudomonas aeruginosa</i>] hypothetical protein PP_1545	7e-89
		[<i>Pseudomonas putida</i> KT2440]	

Sem similaridade

C 1E3	1	sem similaridade	-
C 1D8	1	sem similaridade	-
C 2B2	1	sem similaridade	-
C 2 A3	1	sem similaridade	-
C 2B3	1	sem similaridade	-
C 2C3	1	sem similaridade	-
C 2G3	1	sem similaridade	-
C 2D4	1	sem similaridade	-
C 2B5	1	sem similaridade	-
C 2F5	1	sem similaridade	-
C 2 A10	1	sem similaridade	-
C 2C10	1	sem similaridade	-
C 2F10	1	sem similaridade	-
C 2C11	1	sem similaridade	-
C 3B1	1	sem similaridade	-
C 3E1	1	sem similaridade	-
C 3F1	1	sem similaridade	-
C 3 A3	1	sem similaridade	-
C 3G3	1	sem similaridade	-
C 3B5	1	sem similaridade	-
C 3C5	1	sem similaridade	-
C 3C7	1	sem similaridade	-
C 3D7	1	sem similaridade	-
C 3H10	1	sem similaridade	-
C 3B11	1	sem similaridade	-
C 3C11	1	sem similaridade	-
C 4C1	1	sem similaridade	-
C 4B2	1	sem similaridade	-
C 4D2	1	sem similaridade	-
C 4 A3	1	sem similaridade	-

C 4G3	1	sem similaridade	-
C 4D4	1	sem similaridade	-
C 4G4	1	sem similaridade	-
C 4B5	1	sem similaridade	-
C 4E5	1	sem similaridade	-
C 4D7	1	sem similaridade	-
C 4C8	1	sem similaridade	-
C 4E8	1	sem similaridade	-
C 4G8	1	sem similaridade	-
C 4E11	1	sem similaridade	-
C 5B1	1	sem similaridade	-
C 5E1	1	sem similaridade	-
C 5F1	3	sem similaridade	-
C 5E5	3	sem similaridade	-
C 5G5	3	sem similaridade	-
C 5 A6	3	sem similaridade	-
C 5B6	1	sem similaridade	-
C 5 A7	1	sem similaridade	-
C 5H9	1	sem similaridade	-
C 5A1	1	sem similaridade	-
C 5C2	1	sem similaridade	-
C 5B4	1	sem similaridade	-
C 1D4	1	sem similaridade	-
C 1B5	1	sem similaridade	-
C 1D9	1	sem similaridade	-
C 1G12	1	sem similaridade	-
C 2C12	1	sem similaridade	-
C 4G10	1	sem similaridade	-

* Transcritos apresentando média expressão.

** Transcritos altamente expressos.