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

**Identificação de genes envolvidos na defesa contra patógenos no banco de
dados do CitEST e em macroarranjos da interação
Citrus sinensis-*Guignardia citricarpa***

Simone Guidetti-Gonzalez

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

**Piracicaba
2009**

Simone Guidetti-Gonzalez
Engenheiro Agrônomo

**Identificação de genes envolvidos na defesa contra patógenos no banco de dados do CitEST
e em macroarranjos da interação *Citrus sinensis*-*Guignardia citricarpa***

Orientadora: Prof^ª. Dra. HELAINE CARRER

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor 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**

Guidetti-Gonzalez, Simone

Identificação de genes envolvidos na defesa contra patógenos no banco de dados do
CitEST e em macroarranjos da interação *Citrus sinensis*-*Guignardia citricarpa* / Simone
Guidetti-Gonzalez. - - Piracicaba, 2009.

174 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Frutas cítricas 2. Fungos fitopatogênicos 3. Pinta preta 4. Resistência genética vegetal
I. Título

CDD 634.3
G946i

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

Aos meus pais Marcos e Odete, por tudo.

OFEREÇO

"Há duas fontes perenes de alegria pura: o bem realizado e o dever cumprido."

(Eduardo Girão)

"A vida é mais simples do que a gente pensa; basta aceitar o impossível, dispensar o indispensável e suportar o intolerável."

(Kathleen Norris)

Aos meus grandes amores: meu marido Gustavo e
meus filhos e anjos Lucas e Gabriel, pois:

"A medida do amor é amar sem medida."

(Santo Agostinho)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A ESALQ por me fornecer uma excelente formação acadêmica na Graduação, no Mestrado e Doutorado;

À Profa. Dra. Helaine Carrer pela correção da Tese, e pela oportunidade e orientação durante todos esses anos desde a graduação;

Aos meus pais Marcos e Odete, por me ajudarem a cuidar dos meus filhos, principalmente durante a finalização da Tese, por todo auxílio e por sempre estarem dispostos a me ajudar em tudo;

A toda minha amada família: minha avó Dulce, meu irmão Cleyton, minha sogra, meus cunhados e cunhadas, meus primos, tios e meus queridos sobrinhos, pelas alegrias proporcionadas;

Ao Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’ (Cordeirópolis – SP), ao Dr. Fernando Alves de Azevedo pelo fornecimento de folhas de laranja com sintomas de Pinta preta e ao Dr. Marcos Antônio Machado pela iniciativa do Projeto Millenium – CitEST;

Ao Prof. Dr. Antonio de Goes (Departamento de Fitossanidade, UNESP - Jaboticabal) pela iniciativa do projeto “Etiologia, aspectos epidemiológicos e controle de *Guignardia citricarpa* agente causal da mancha preta dos citros”;

Ao Laboratório de Biotecnologia Animal (ESALQ/USP), ao Dr. Luiz Lehmann Coutinho por ter disponibilizado a infra-estrutura para realização das etapas de macroarranjo deste trabalho, a Dra. Erika Cristina Jorge e Nirlei Aparecida Silva por me ensinarem a técnica de macroarranjo;

Ao Prof. Dr. Eduardo Jordão Neves (Depto. de Estatística, IME-USP) e ao Lucas Fahham (Depto. de Matemática Aplicada, IME-USP) pelo auxílio com a análise estatística dos dados do macroarranjo;

Ao Laboratório de Genética de Microrganismos (ESALQ/USP) (Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner) pelo uso do aparelho de PCR em Tempo Real e a doutoranda Maria Carolina Quecine pelo auxílio;

Ao Dr. Marcel Bellato Spósito (Fundecitrus) pelo constante e rápido auxílio, e pelo fornecimento das mudas de laranja;

A todos os estagiários, pós-graduandos e funcionários do CEBTEC, pela amizade, pelo convívio e lições aprendidas, especialmente: Fátima, Joice, Danila, Evandro, Frederico, André,

Eduardo, Rafael, Waléria e Graça. A Valentina de Fátima De Martin pela paciência e pelo auxílio constantes durante todos esses anos (quase 12 anos me aturando!!!). A Joice pelo companheirismo e ajuda durante o desenvolvimento do trabalho. A Danila companheira de ESALQ desde a graduação;

A Maria Solizéte Granziol Silva, secretária PPG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, por toda e rápida ajuda;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de Doutorado;

Ao meu marido Gustavo e aos meus filhos Lucas e Gabriel por compreenderem os momentos em que estive ausente, por existirem e por todo amor que me dão e me fazem sentir;

A todos que de forma direta ou indireta auxiliaram neste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Citros.....	17
2.2. A doença Mancha Preta ou Pinta Preta dos citros.....	18
2.3. Processos de indução de resistência.....	20
2.3.1 Genes de resistência (genes <i>R</i>).....	21
2.3.2 Genes requeridos pelos genes <i>R</i>	23
2.3.3 MAP kinases (mitogen activated protein kinases).....	25
2.3.4 Reação de Hipersensibilidade (HR)	28
2.3.5 SnRKs (<i>Sucrose non-fermenting-1-related protein kinases</i>)	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Banco de dados de Citros - CitEST.....	33
3.1.1 Busca de genes relacionados a resistência de plantas.....	33
3.2 Macroarranjo.....	34
3.2.1 Escolha dos clones a serem impressos nas membranas de macroarranjo.....	34
3.2.2 Confecção das membranas.....	34
3.2.2.1 Replicação dos clones para a construção manual das membranas de macroarranjo.....	34
3.2.2.2 Extração do DNA plasmidial - Miniprep.....	35
3.2.2.3 PCR da miniprep dos clones.....	36
3.2.2.4 Precipitação dos produtos de PCR.....	37
3.2.2.5 Impressão manual das membranas.....	37
3.2.3 Normalização das membranas com sonda plasmidial - <i>Overgo</i>	38
3.2.3.1 Pré-hibridização.....	39
3.2.3.2 Síntese da sonda plasmidial - <i>overgo</i>	39
3.2.3.3 Hibridização das membranas com sonda plasmidial - <i>overgo</i>	40
3.2.3.4 Geração das imagens das membranas.....	40

3.2.3.5 Lavagem final das membranas (<i>Striping</i>)	40
3.2.4 Hibridização com as sondas (CsS e CsP) preparadas com folhas de citros.....	41
3.2.4.1 Extração do RNA total de citros.....	41
3.2.4.2 Quantificação e análise de qualidade do RNA.....	42
3.2.4.3 Síntese das sondas de cDNA	42
3.2.4.4 Hibridização dos macroarranjos com as sondas CsS e CsP.....	43
3.2.5 Quantificação, normalização do sinal dos <i>spots</i> e análise estatística.....	44
3.3 Validação dos resultados do macroarranjo por RT-PCRq.....	45
3.3.1 Seleção dos genes e obtenção dos <i>primers</i> para RT-PCRq.....	46
3.3.2 Síntese de cDNA fita simples	48
3.3.3. PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-PCRq).....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1 Busca de sequencias de citros <i>in silico</i>	51
4.1.1 Genes de resistência (genes <i>R</i>)	52
4.1.1.1 NBS-LRR.....	52
4.1.1.2 RLPs	60
4.1.1.3 RLKs.....	62
4.1.1.4 Serina-treonina kinase citoplasmática.....	64
4.1.1.5 Sete-transmembranas (7-TM) proteínas de resistência.....	64
4.1.2 Genes requeridos pelos genes <i>R</i>	65
4.1.3 MAP kinases.....	69
4.1.4 Resposta de hipersensibilidade (HR)	81
4.1.4.1 Canais de íons.....	83
4.1.4.2 Rota dos fenilpropanóides (enzimas: CM, PAL, C4H, CHS).....	84
4.1.4.3 Biossíntese de ácido salicílico (enzima isocorismato sintase).....	86
4.1.4.4 Metacaspases.....	87
4.1.4.5 Biossíntese de óxido nítrico (enzima nitrato redutase).....	87
4.1.5 SnRKs.....	90
4.1.5.1 Identificação de supostas SnRKs.....	90
4.1.5.2 Análises de supostas SnRKs no CitEST.....	92
4.2 Macroarranjo.....	95

4.2.1 Confecção manual das membranas de macroarranjo.....	95
4.2.1.1 Miniprep e PCR da miniprep dos clones selecionados para o macroarranjo.....	95
4.2.1.2 Impressão dos produtos de PCR e hibridização com a sonda plasmidial OVERGO.....	96
4.2.2 Extração de RNA total para o preparo das sondas.....	96
4.2.3 Hibridizações das membranas com as sondas de cDNA.....	96
4.2.4 Análise estatística do macroarranjo.....	97
4.2.5 Transcritos de <i>C. sinensis</i> com expressão diferencial.....	101
4.2.5.1 Transcritos induzidos em folha com sintomas de pinta preta.....	101
4.2.5.2 Transcritos reprimidos em folha com sintomas de pinta preta.....	110
4.3 PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-PCRq)	114
4.3.1 RT-PCRq com cDNA de folha.....	114
4.3.2 RT-PCRq: comparação da diferença de expressão de genes de folha e fruto com sintomas da doença pinta preta e sadios.....	122
5 CONCLUSÕES.....	127
REFERÊNCIAS.....	129
ANEXOS.....	157

RESUMO

Identificação de genes envolvidos na defesa contra patógenos no banco de dados do CitEST e em macroarranjos da interação *Citrus sinensis*-*Guignardia citricarpa*

A citricultura brasileira concentra-se principalmente no Estado de São Paulo que contribui com 80,4 % da produção nacional, sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais de citros. Um dos problemas enfrentados pela citricultura é a sua vulnerabilidade a pragas e doenças, devido principalmente a baixa diversidade genética nas variedades comerciais utilizadas, associada ao sistema de plantio em áreas extensas. Uma das doenças que vem causando crescentes prejuízos para a citricultura brasileira é a pinta preta ou mancha preta dos citros causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely. O uso de conhecimentos de biologia molecular e métodos biotecnológicos devem ser considerados como importante alternativa para a produção de plantas geneticamente modificadas expressando genes de resistência. Para se obter plantas de citros resistentes a doenças, se faz necessário identificar genes que estejam relacionados com os mecanismos de defesa da planta. Na tentativa de identificar estes genes, o objetivo geral deste trabalho foi a identificação de genes *in silico* no banco de dados do Projeto Millenium CitEST e a análise de expressão diferencial de genes envolvidos na defesa. Mais de 7600 sequencias foram identificadas nas buscas no CitEST com similaridade aos genes *R* e genes envolvidos na HR e defesa, MAPKs e SNF1. Destes, foram selecionados 273 sequencias para experimentos de macroarranjo para análise da interação *Citrus sinensis*-*Guignardia citricarpa*. A análise estatística revelou que 171 genes (62,63%) apresentaram expressão diferencial significativa ao nível de 5% de probabilidade. Destes, 80 apresentaram expressão diferencial significativa maior do que duas vezes, dos quais 38 genes foram induzidos e 42 foram reprimidos no tecido infectado. Entre os genes induzidos estão MAPKs, genes de resistência (*R*), genes envolvidos na resposta de hipersensibilidade (HR) e na defesa da planta. Entre os transcritos reprimidos, há quatro similares a peroxidases e cinco similares a catalases, o que era esperado já que catalases e algumas peroxidases são capazes de remover H₂O₂, e assim a planta produz espécies reativa de oxigênio capaz de desencadear a ativação de genes de defesa. Os dados do macroarranjo foram validados via transcrição reversa seguida de PCR quantitativo em tempo real (RT-PCRq) de 9 genes. As análises confirmaram a expressão diferencial de 8 deles sendo que somente um apresentou resultado contrastante ao macroarranjo, o que demonstra a eficiência da metodologia de macroarranjos para estudo de muitos genes simultaneamente. Os genes diferencialmente expressos identificados na interação *C. sinensis*-*G. citricarpa* são de grande importância, pois são fortes candidatos para serem utilizados na transformação genética de plantas com o objetivo de obter novas variedades de plantas com resistência a patógenos.

Palavras-chave: laranja, expressão diferencial, RT-PCRq, resistência à doença.

ABSTRACT

Identification of genes involved in defense against pathogens in the CitEST databank and in macroarrays of *Citrus sinensis*-*Guignardia citricarpa* interaction

The Brazilian citrus industry is concentrated mainly in the State of Sao Paulo which contributes with 80.4% of national production, with Brazil being a leading world producer of citrus. One of the problems facing the citrus industry is its vulnerability to pests and diseases, mainly due to low genetic diversity of the commercial varieties used, linked to the system of planting in extensive areas. A disease that is causing increasing damage to the Brazilian citrus industry is the black spot of citrus caused by the fungus *Guignardia citricarpa* Kiely. The use of knowledge of molecular biology and biotechnological methods should be considered as an important alternative for the production of genetically modified plants expressing genes for resistance. In order to obtain citrus plants resistant to diseases it is necessary to identify genes that are related to the defense mechanisms of the plant. In an attempt to identify these genes, the general aim of this study was to identify genes *in silico* in the database of the Millennium CitEST Project and to perform differential expression analysis of genes involved in the defense mechanisms. More than 7600 reads were identified in the CitEST search with similarity to *R* genes, genes involved in HR and defense, MAPKs and SNF1. It was selected 273 reads for macroarray experiments to analysis of *Citrus sinensis*-*Guignardia citricarpa* interaction. Statistical analysis revealed that 171 genes (62.63%) showed significant differential expression at the level of 5% probability. From these, 80 showed significant differential expression higher than two fold, in which 38 genes were induced and 42 were repressed in infected tissue. Among the induced genes are MAPKs, resistance (*R*) genes, genes involved in hypersensitivity response (HR) and plant defense. Among the suppressed transcripts, there are four similar to peroxidases and five similar to catalases, which is expected because catalases and some peroxidases are able to remove H₂O₂, and so the plant produces reactive oxygen species capable of triggering the activation of defense genes. The macroarray data were validated by reverse transcription followed by quantitative real-time PCR (RT-PCRq) of 9 genes. The analysis confirmed the differential expression of 8 of them, and only one presented different result of macroarray which demonstrate the efficiency of the macroarray methodology to analyze several genes simultaneously. The genes differentially expressed in the interaction of *C. sinensis* x *Guignardia citricarpa* identified are of great importance because they are strong candidates for use in genetic transformation of plants with the objective of obtaining new varieties of plants resistant to pathogens.

Keywords: orange, differential expression, RT-PCRq, disease resistance.

1 INTRODUÇÃO

Em 2007, o Brasil produziu aproximadamente 18,3 milhões de toneladas de frutas cítricas, mantendo a posição de maior produtor e exportador de suco concentrado e congelado de laranja. A principal área produtora é o Estado de São Paulo, produzindo 80,4% do total (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2008). O destino da produção da citricultura paulista é voltado, sobretudo, ao processamento industrial.

As frutas cítricas (laranja, lima, limão e tangerina) estão entre as principais categorias responsáveis pelo crescimento na geração de divisas com a exportação de frutas, juntamente com a banana, maçã, mamão, manga, melão e uva que, representaram em 2006 cerca de 95% da receita gerada com exportação de frutas no país (VITTI, 2007).

Não obstante a importância econômica e social que representa a citricultura para o país, este setor enfrenta vários problemas de natureza fitossanitária, onde se insere especialmente a pinta preta ou mancha preta dos frutos cítricos. Esta doença é causada pelo fungo *Guignardia citricarpa*, e tem sido responsável por elevados prejuízos na citricultura de diversas regiões produtoras do mundo, devido às lesões provocadas principalmente no flavedo dos frutos, depreciando-os para o mercado *in natura* (CAIXETA et al., 2008). A pinta preta se encontra na África, Ásia, Austrália e na América do Sul (Argentina, Brasil e Peru) (REIS; TIMMER; GOES, 2006) e vem causando graves e crescentes prejuízos para a citricultura brasileira, afetando todas as variedades de laranjeiras (*Citrus sinensis* L. Osbeck), mas principalmente, as de maturação média-tardia ('Pêra') a tardias ('Valência' e 'Natal'). Além da comercialização no mercado de frutas a pinta preta prejudica também sua exportação devido à barreira fitossanitária existente na União Européia e Estados Unidos, por ser uma doença quarentenária, onde a tolerância de frutos com sintomas da doença é zero, limitando grandemente a possibilidade de exportação de frutos *in natura* (BALDASSARI et al., 2007). Nos casos em que a doença atinge o pedúnculo do fruto, pode ocorrer a queda prematura do fruto, aumentando as perdas na produção e até limitando seriamente a citricultura em vários estados brasileiros (ROBBS; BITTENCOURT, 1995).

Embora ocupe uma posição de destaque no mercado mundial, a produtividade média brasileira de citros, em torno de 2,0 caixas/planta/ano, ainda é baixa. Essa baixa produtividade, associada ao fato de grande parte dos plantios não serem irrigados, deve-se, principalmente, a

problemas fitossanitários e às estratégias de manejo do pomar e pós-colheita dos frutos (MACHADO et al., 2005).

O desenvolvimento de variedades tolerantes ou resistentes a doenças através do melhoramento genético convencional dos citros apresenta dificuldades de ordem botânica e genética, tais como esterilidade de pólen e óvulo, incompatibilidade sexual, poliembrionia, embrião nucelar, alta heterozigosidade e longo período de juvenilidade (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990). Com isso, a introdução de ferramentas biotecnológicas como a hibridação somática e a transformação genética apresentam perspectivas para contribuir na superação desses problemas, permitindo a obtenção de genótipos melhorados (ASTUA-MONGE; FREITAS-ASTUA; MACHADO, 2004). Mas para a obtenção de uma planta transgênica resistente a doenças faz-se necessário identificar os genes envolvidos nas interações planta-patógeno.

Diante desta real necessidade para a cultura do citros, este trabalho teve como objetivo identificar no banco de dados do CitEST (Projeto Millenium de Sequenciamento de ESTs de Citros, APTA-Citros) os genes *R* (genes de resistência), os genes envolvidos nos mecanismos de transdução de sinais como as MAP kinases e SnRKs, e os genes de hipersensibilidade (HR) e defesa. Sendo que alguns destes genes identificados foram analisados quanto à expressão diferencial na interação *Citrus sinensis* - *Guignardia citricarpa* em macroarranjos, selecionados e validados via transcrição reversa seguida de PCR quantitativo em tempo real (RT-PCRq). Os resultados aqui obtidos contribuem para as perspectivas de desvendar a maquinaria genética de *Citrus* na resposta de defesa da planta e contribuem como genes candidatos na obtenção de plantas transgênicas resistentes a doenças.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Citros

As plantas cítricas do gênero *Citrus* pertencem à família Rutaceae e subfamília Aurantioideae e são nativas da região sudeste do continente asiático (SWINGLE; REECE, 1967; SOOST; CAMERON, 1975).

As espécies cítricas ocupam o primeiro lugar na produção mundial de frutas, desempenhando um papel de acentuada importância sócio-econômica mundial. Esta posição de destaque deve-se à grande aceitação dos citros na alimentação humana, na forma de fruta fresca e suco. A safra de laranja de 2008 é estimada em 18.580.697 t (455,4 milhões de caixas de 40,8 kg), superior em 0,4 % a 2007. São Paulo, maior produtor do País, responde por mais de 80% da produção brasileira da fruta. A produção paulista deverá totalizar 360 milhões de caixas de 40,8 kg, pouco variando em relação a 2007 (IBGE, 2008).

O Brasil é o maior produtor e exportador de suco de laranja do mundo, dominando a maioria do mercado internacional, comercializando suco de laranja concentrado. As exportações brasileiras de suco de laranja correspondem a 95% das exportações brasileiras de sucos de fruta (ASSOCITRUS, 2008). O Estado de São Paulo é responsável pela maior parte da produção nacional e 98% da matéria prima para suco concentrado, e se beneficia com 400 mil postos de trabalho (diretos e indiretos) com a citricultura (NEVES et al., 2007). As maiores regiões produtoras do Estado de São Paulo formam quatro pólos produtores de citros: a região central (São Carlos - Araraquara), a norte (Bebedouro - São José do Rio Preto), a sudeste (Araras - Mogi Guaçu) e o pólo centro - sul (Bauru - Itapetininga) (BOTEON; NEVES, 2005). Dentre os demais Estados produtores destacam-se Bahia, Sergipe, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul (BOTEON; NEVES, 2005; IBGE, 2009).

Contudo, a produção é limitada devido à presença de doenças nos pomares produtores (MARQUES et al., 2007). Entre as principais doenças que afetam a cultura, acarretando na diminuição da produtividade, estão: a clorose variegada dos citros (CVC), o cancro cítrico, o *greening*, a tristeza, o declínio, a pinta preta, a gomose e morte súbita dos citros. O surgimento constante desses problemas fitossanitários pode estar relacionado ao fato da citricultura paulista estar fundamentada em quatro cultivares de copa de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck)

(‘Pêra’, ‘Natal’, ‘Valência’ e ‘Hamlin’) e três cultivares de porta enxerto, com predominância do limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck). Além disso, os citros são multiplicados vegetativamente resultando em plantios clonais potencialmente mais suscetíveis ao ataque de pragas e doenças.

Acredita-se que, globalmente, um quinto do potencial rendimento de colheita é perdido por ano devido a doenças (DOW; DANIELS, 2000), assim estudos para o entendimento dos mecanismos da interação planta-patógeno podem ser úteis na tentativa de se descobrir controles mais efetivos para as doenças.

2.2. A doença Mancha Preta ou Pinta Preta dos citros

A Mancha Preta ou Pinta Preta dos Citros, causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely, é uma doença que vem causando graves e crescentes prejuízos para a citricultura brasileira, principalmente para a região sul do Estado de São Paulo (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997), afetando todas as variedades de laranjeiras (*Citrus sinensis* L. Osbeck), principalmente as de maturação média-tardia (‘Pera’) a tardias (‘Valência’ e ‘Natal’) (SCHINOR et al., 2002). Com exceção da limeira ácida (*C. latifolia* Tanaka) ‘Tahiti’, da laranjeira ‘Azeda’ (*C. aurantium* L.) e seus híbridos, todas as variedades comerciais são suscetíveis, principalmente os limoeiros verdadeiros (*C. limon* Burn), que têm papel fundamental no início da doença nos pomares (AGUILAR-VILDOSO, 1997). A variedade Tahiti (*C. latifolia*), não apresenta sintomas da doença em condições de campo mesmo em áreas de alta pressão de inóculo. As razões para essa resistência ainda são desconhecidas (BALDASSARI; WICKERT; GOES, 2008). No campo, as variedades cítricas apresentam diferenças de suscetibilidade devido à época de maturação dos frutos, sendo mais evidentes entre espécies e variedades (SCHINOR et al., 2002).

A pinta 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, 1926), onde rapidamente tornou-se o principal problema fitossanitário da citricultura daquele país. A doença também atinge outros países da África, Ásia, Oceania e América do Sul, e em alguns destes países, é uma das mais importantes doenças fúngicas (KOTZÉ, 1988; FEICHTENBERGER, 1996; FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997; TIMMER;

GARNSEY; GRAHAM, 2000; PERES; TIMMER 2003). 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-SACCÁ, 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 (GOES; FEICHTENBERGER, 1993) e também está presente nos Estados do Rio Grande do Sul (FEICHTENBERGER, 1996), Minas Gerais e Espírito Santo (COSTA et al., 2003).

O ciclo da doença inicia-se com a disseminação dos conídios ou picnidiósporos (esporos assexuais) e ascósporos (esporos sexuais) do fungo *Guignardia citricarpa*. Os conídios (picnidiósporos) são responsáveis pelas infecções à curta distância e estão localizados no interior dos picnídios oriundos dos frutos infectados. Um agregado de conídios emerge através da abertura do picnídio (ostíolo), dissolve-se na água da chuva, orvalho ou irrigação, e cai sobre os pequenos frutos susceptíveis que se formam após as floradas. Já os ascósporos são responsáveis pela disseminação à curta e longa distância, pois são lançados dos peritécios que se formam em folhas caídas ao solo, e são levados por correntes aéreas, infectando pequenos frutos susceptíveis (ROBBS, 1990).

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. Em ataques severos, a pinta preta causa a queda acentuada dos frutos (FUNDECITRUS, 2008), podendo reduzir a produção em até 80% (KLOTZ, 1978).

Os sintomas mais comuns observados em frutos são os do tipo mancha dura e os da falsa melanose (KOTZÉ, 1988). O sintoma do tipo mancha dura caracteriza-se por lesões circulares, depressivas, com bordas salientes de coloração marrom e na maioria das vezes por apresentar pontuações negras no seu interior, que correspondem aos picnídios. Este tipo de sintoma normalmente ocorre no período de mudança da coloração dos frutos. As lesões podem atingir os frutos maduros ou no início de maturação, podendo aparecer após a colheita, no transporte e armazenamento (ROBBS; BITTENCUCOURT, 1995). O sintoma do tipo falsa melanose caracteriza-se por minúsculas e numerosas pontuações escuras, dispersas ou agregadas, que normalmente aparecem em frutos ainda verdes (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO,

1997). Os sintomas da pinta preta não são comuns em folhas de laranjeiras, mas quando ocorrem são do tipo mancha dura e podem ocorrer nas duas faces da folha (FUNDECITRUS, 2008).

A pinta preta afeta apenas a casca do fruto (o flavedo), sem causar dano internamente, limitado pelo albedo. Porém, sua comercialização no mercado de frutas é prejudicada, assim como a sua exportação devido à barreira fitossanitária existente na União Européia (BALDASSARI et al., 2007). Nos casos em que a doença atinge o pedicelo, pode ocorrer a queda prematura do fruto, aumentando as perdas na produção e até limitando seriamente a citricultura em vários estados brasileiros (ROBBS; BITTENCUCOURT, 1995).

O controle da doença baseia-se no emprego de métodos culturais e principalmente pela utilização de fungicidas. O principal cuidado para evitar a entrada do patógeno nos pomares é a prevenção, pela utilização de mudas sadias, manter a boa nutrição e sanidade do pomar, e desinfestação de máquinas agrícolas, materiais de colheita e outros equipamentos antes de entrar no pomar (FUNDECITRUS, 2008).

2.3. Processos de indução de resistência

As plantas são frequentemente expostas a condições ambientais desfavoráveis como temperaturas extremas, falta de água, salinidade, poluição, e patógenos, que afetam o crescimento, desenvolvimento e a produtividade. Para sobreviverem, as plantas desenvolveram uma complexa rede de sinalização que as protege de condições ambientais adversas (KOVTON et al., 2000).

Para se proteger contra a invasão de patógenos as plantas utilizam mecanismos de defesa pré-existent, como também mecanismos que são induzidos. Os mecanismos de defesa induzidos geralmente incluem a geração de espécies reativas de oxigênio, a ativação de genes de defesa e uma rápida e localizada morte celular (*Hypersensitive Response* – HR) (MARTIN, 1999). Consequentemente um processo de imunidade ou resistência sistêmica adquirida (SAR) se desenvolve na planta contra uma ampla gama de patógenos (McDOWELL; DANGL, 2000). A ativação destas respostas de defesa é iniciada pelo reconhecimento do patógeno pela planta, a qual é mediada pela interação gene-a-gene entre o produto do gene de resistência da planta (gene *R*) e o gene de avirulência do patógeno (*Avr*) ou seus elicitores (DANGL; JONES, 2001). Os

sinais gerados de tal interação são traduzidos em respostas celulares através de muitas rotas interligadas (MARTIN, 1999), sendo a cascata de MAPKs (mitogen-activated protein kinases) uma dessas rotas (ZHANG; KLESSIG, 2001; ZHANG et al., 2006).

Com o advento da engenharia genética reduziu-se o tempo para a produção de plantas melhoradas, já que somente o gene de interesse é inserido no novo cultivar, diferente do que ocorre no melhoramento genético tradicional onde o cruzamento de variedades cultivadas com espécies selvagens, portadoras de genes de resistência, pode acarretar também na introdução de genes indesejáveis. Assim é necessário compreender como as plantas se defendem, estudando o papel dos diferentes componentes dessa complexa rede de eventos que culmina com a resistência das plantas. Dentro desse contexto os mecanismos que levam a reação de hipersensibilidade (HR), as cascatas de MAPKs e ativação de genes de resistência, parecem ser processos importantes na interação planta-patógeno e os genes envolvidos podem ser utilizados para a obtenção de plantas transformadas com possibilidade de serem resistentes a doenças. Manipulando esses mecanismos poderiam-se obter plantas que estariam em constante estado de “alerta” e assim impedir ou minimizar as consequências de infecção por patógenos.

2.3.1 Genes de resistência (genes *R*)

Durante seu ciclo de vida, as plantas estão sujeitas a inúmeras adversidades do ambiente externo. Infecções por fungos, bactérias e vírus patogênicos são uma das mais sérias ameaças que as plantas têm que enfrentar. Uma vez que as plantas são sésseis, elas têm desenvolvido um amplo leque de estratégias, incluindo mecanismos genéticos para reagir e para se proteger contra estresses bióticos e abióticos.

O controle genético da resistência de plantas a doenças frequentemente depende da ocorrência simultânea de um gene de resistência (*R*) no genoma vegetal e um gene específico de avirulência (*Avr*) correspondente no genoma do patógeno (FLOR, 1971). A resistência fornecida por esses genes é muito eficaz e específica contra patógenos expressando apenas o gene de avirulência correspondente. Essas observações são consistentes com genes *R* que codificam receptores que detectam, direta ou indiretamente, os produtos de genes *Avr* do patógeno (DANGL; JONES, 2001). Após o reconhecimento do patógeno, as proteínas *R* acionam as

defesas que muitas vezes resulta em uma resposta hipersensível (HR), o que leva a uma rápida indução de morte da célula hospedeira no sítio de invasão do patógeno (NOUTOSHI et al., 2005). Esta resposta da planta está associada com um massivo fluxo celular de íons, geração de espécies reativas de oxigênio, reforço da parede celular, e também com a expressão de muitas proteínas de defesa, incluindo as proteínas relacionadas com a patogênese (PR proteínas) (HEATH, 2000).

O maior grupo de genes *R* codifica proteínas citoplasmáticas que apresentam um nucleotídeo central de ligação (NBS) e um domínio rico em repetições de leucina (LRR), codificadas por genes *NBS-LRR* (TÖR et al., 2004). A importância funcional desses motivos característicos é exemplificada pelas muitas mutações que demonstraram resultar tanto em perda de função ou auto-ativação da proteína NBS-LRR (GRANT et al., 1995; TORNERO et al., 2002a; TAMELING et al., 2006; ADE et al., 2007; GABRIËLS et al., 2007). Este grupo de proteínas é subdividido em duas subclasses principais: (1) uma contendo um domínio amino-terminal “coiled-coil” (CC) denominado CC-NBS-LRR (BITTNER-EDDY et al., 2000; McDOWELL et al., 1998), tais como RPS2, RPM1, RPS5, RPP13 (BITTNER-EDDY et al., 2000) e RPP8 (McDOWELL et al., 1998), e (2) outra, contendo domínio amino-terminal que se assemelha ao domínio de sinalização citoplasmática dos receptores transmembrana Toll e Interleukin-1 (TIR) sendo denominado TIR-NBS-LRR, tais como RPS4, RPP1, RPP5 e N (WHITHAM et al., 1994; DANGL; JONES, 2001; TÖR et al., 2004). Além disso, o grupo TIR-NBS-LRR pode ser dividido em dois subgrupos dependendo da presença de um domínio C-terminal diferente de LRR (DODDS; LAWRENCE; ELLIS, 2001).

As sequências TIR-NBS-LRR podem ser distinguidas das outras NBS-LRR por motivos internos aos seus domínios NBS ou por um único resíduo de aminoácido na porção final do motivo Quinase-2, que invariavelmente é um ácido aspártico na subclasse TIR-NBS-LRR, e de um triptofano nas outras subclasses (MEYERS et al., 1999). As sequências TIR estão presentes em espécies dicotiledôneas, enquanto que as outras sequências NBS-LRR foram relatadas amplamente em angiospermas (MEYERS et al., 1999; PAN; WENDEL; FLUHR, 2000). Estudos têm destacado a importância dos domínios específicos para a resistência. Às proteínas receptoras LRR-quinase têm sido atribuídas funções no desenvolvimento normal de plantas e de percepção hormonal, bem como função de resistência (gene *R*) (TROTOCHAUD et al. 1999; WANG et al., 2001). Em contrapartida, a classe de genes NBS-LRR tem sido associada geneticamente à

resistência a doenças (NIMCHUK et al., 2003). Outras estruturas de resistência podem ter sido derivadas de famílias de proteínas com funções no crescimento vegetal e desenvolvimento (NIMCHUK et al., 2003).

O segundo grupo de genes *R* contém uma serina-treonina kinase citoplasmática, sendo representado pelos genes *Pto*. Esses genes conferem resistência ao patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* pv *tomate* (MARTIN et al., 1993). O terceiro grupo de genes *R* codifica um receptor do tipo quinases (RLKs) e contém um domínio extracelular de LRR com uma única região transmembrana e um domínio quinase citoplasmático (TÖR et al., 2004). O gene de resistência *Xa21*, que confere resistência a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em arroz (SONG et al., 1995), pertence a esse grupo (TÖR et al., 2004). O genoma de *Arabidopsis* contém 174 sequências com homologia a quinases transmembrana, mas apenas uma tem um papel atribuído a resistência (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

A família de genes *Cf* e *HcrVf2* são exemplos do quarto grupo de genes *R*, que são proteínas semelhantes a receptores (RLPs) (TÖR et al., 2004). Eles são semelhantes aos genes RLK na codificação de LRRs extracelular e na ancoragem na membrana pelo C-terminal, mas falta o domínio quinase citoplasmático (DIXON et al., 1996).

Outro grupo de genes *R* é o de sete-transmembranas (7-TM) proteínas de resistência, proteínas desse grupo não são classificadas em grupos clássicos por não conterem domínios estruturais reconhecíveis semelhantes aos produtos de outras classes de genes *R* (LIU; WANG, 2002)

2.3.2 Genes requeridos pelos genes *R*

A expressão das proteínas *R* é rigorosamente regulada, a fim de evitar ativação inapropriada de respostas de defesa local e sistêmica (NOUTOSHI et al., 2005). Existem genes necessários para o funcionamento dos genes *R* e que já foram identificados, especialmente os pertencentes às classes do CC-NBS-LRR e TIR-NBS-LRR (DANGL; JONES, 2001; ELLIS; DODDS; PRYOR, 2000; HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997).

Mutações nos genes *NDRI*, *EDS1*, *PAD4*, *NPRI*, *EDS5*, *RAR1* ou *SGT1b* mostrou reprimir a resistência e o desenvolvimento de HR controlado por múltiplos genes *R* do tipo NBS-

LRR (XIAO et al., 2005), demonstrando a sua necessidade para a função dos genes *R*. O mutante recessivo *edr1* de *Arabidopsis thaliana* é altamente resistente a alguns fungos e bactérias patogênicas (FRYE; INNES, 1998). O gene *EDR1* codifica uma MAP3K do tipo Raf, que também pode funcionar como um regulador negativo da resistência às doenças (FRYE; TANG; INNES, 2001). As proteínas EDS1 (*Enhanced Disease Susceptibility 1*), PAD4 (fitoalexinas Deficient 4), NPR1 e EDS5 parecem ser componentes da via de defesa dependente do ácido salicílico, também exigido para a expressão de defesa basal contra vários patógenos virulentos (CAO et al., 1997; FALK et al., 1999; JIRAGE et al., 1999; NAWRATH et al., 2002). EDS1, PAD4 e EDS5 são importantes para desencadear a resistência contra patógenos avirulentos mediada por genes *R* da classe TIR-NBS-LRR (XIAO et al., 2005).

O gene de resistência *N* de tabaco requer os genes *RAR1*, *EDS1* e *NPR1/NIM1* para sua função (LIU et al., 2002a). EDS1 constitui o ponto de conversão de vias de sinalização mediadas por genes *R* funcionais da classe TIR-NBS-LRR (LIU et al., 2002a), como *RPP1*, *RPP2*, *RPP4*, *RPP5* e *RPS4* (AARTS et al., 1998). Em contrapartida, NDR1 é um ponto convergente para o funcionamento de genes *R* da classe CC-NBS-LRR (LIU et al., 2002a), como *RPM1*, *RPS2*, e *RPS5* (CENTURY; HOLUB; STASKAWICZ, 1995). O gene *HIN1* apresenta função similar ao gene *NDR1* de *A. thaliana* (GLAZEBROOK, 2001). *RAR1* representa o primeiro exemplo de um componente de sinalização compartilhado tanto por genes *R* do tipo CC-NBS-LRR como também por genes TIR-NBS-LRR (LIU et al., 2002a). *RAR1* de cevada é necessário para o desenvolvimento de HR e para a completa resistência mediada por muitos alelos altamente relacionados a genes *R Mla* (ZHOU et al., 2001; TORNERO et al., 2002b).

SGT1 foi identificada como uma proteína que interage com *RAR1* em levedura híbrida (AZEVEDO et al., 2002). O envolvimento de SGT1 na resistência às doenças foi confirmado em cevada, onde o silenciamento de *SGT1* comprometeu a resistência mediada pela proteína *Mla6* da classe CC-NBS-LRR (AZEVEDO et al., 2002). Além disso, a análise de mutação de *Arabidopsis* revelou que SGT1 é necessário para a resistência a *Peronospora parasitica*, mediada por várias proteínas TIR-NBS-LRR (AUSTIN et al., 2002). Em *Nicotiana benthamiana* SGT1 é necessária para resistência mediada pelos genes *N* (CC-NBS-LRR), *Rx* (CC-NBS-LRR), e *Pto* (serina treonina-quinase) (PEART et al., 2002). A sinalização dos genes *Cf* (RLPs) também foi demonstrada ser dependente de SGT1 (PEART et al., 2002).

Outros exemplos de proteínas necessárias para a função de genes *R* são: RIN4 e PBS1. A degradação da proteína RIN4 de *A. thaliana* pela proteína AvrRpt2 é suficiente para ativação de *RPS2* (MACKEY et al., 2003). RIN4 é necessária para o acúmulo e a função da proteína RPM1 (BELKHADIR et al., 2004). Day et al. (2005) sugeriram que RIN4 pode funcionar, tanto cooperativamente como independentemente de NDR1, para regular negativamente *RPS2* na ausência de patógeno. A protease AvrPphB ativa a sinalização por *RPS5* clivando o domínio quinase de PBS1, mas como este evento contribui para a sinalização não é conhecido (SHAO et al., 2003).

2.3.3 MAP kinases (mitogen activated protein kinases)

A comunicação a nível molecular entre as plantas e os patógenos determina a resposta à patogênese. A liberação de moléculas microbianas dentro ou na região da célula hospedeira, e a consequente percepção destes pelo tecido vegetal invadido, determina a diferença entre doença e resistência à doença. O estresse biótico é percebido pelas plantas através do reconhecimento de elicitores derivados dos patógenos ou dos danos da parede celular (ferimentos). Estudos sugerem que tanto plantas como animais, e insetos possuem mecanismos de imunidade inata contra agentes patogênicos potenciais (MISHRA; TUTEJA; TUTEJA, 2006). Durante os últimos anos tem sido bem estabelecido que MAPKs desempenham papel central na defesa contra patógenos em uma variedade de plantas, e eventos de sinalização iniciados por diversos patógenos convergem em uma cascata conservada de MAP kinases em plantas (NAKAGAMI; PITZSCHKE; HIRT, 2005; ASAI et al., 2002).

As interações entre as plantas e microrganismos patogênicos são específicas, complexas e dinâmicas. Elicitores são compostos altamente ativos e produzidos pelo patógeno invasor, que envia uma mensagem para a planta mobilizar os seus mecanismos de defesa contra as pragas (MISHRA; TUTEJA; TUTEJA, 2006). O sucesso no reconhecimento do patógeno ou do elicitador em plantas desencadeia a ativação de cascatas de MAP kinases que levam a respostas celulares (ASAI et al., 2002; EKENGREN et al., 2003).

As cascatas de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) são módulos de sinalização altamente conservadas em eucariotos, incluindo animais, plantas e leveduras (TENA

et al., 2001). Cascatas de MAP kinases desempenham papéis importantes na coordenação de respostas ao estresse, crescimento e desenvolvimento vegetal (TENA et al., 2001; ZHANG; KLESSIG, 2001; NAKAGAMI; PITZSCHKE; HIRT, 2005; PEDLEY; MARTIN, 2005).

Cada espécie vegetal apresenta múltiplas cascatas de MAP kinases (TAKAHASHI et al., 2004a) 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 quinases, que intermedeiam reações sequenciais de fosforilação, incluindo a MAPK que é ativada por fosforilação nos resíduos de treonina e tirosina pela quinase anterior MAPK kinase (MAPKK / MAP2K), que por sua vez é ativada (fosforilada em dois resíduos de serina/treonina) pela quinase anterior MAPKK kinase (MAPKKK / MAP3K). Esta última quinase é geralmente ativada por uma proteína G, mas em alguns casos, a ativação ocorre pela quinase anterior MAP3K kinase (MAP4K) (CHAMPION; PICAUD; HENRY, 2004). Enquanto que a inativação das MAP kinases requer a atividade de fosfatases (SCHWEIGHOFER; MESKIENE, 2008; LEE et al., 2008).

Evidências sugerem que a cascata de MAP kinase é um dos pontos de convergência depois da percepção de diferentes patógenos e/ou seus elicitores (ZHANG; KLESSIG, 2001; PEDLEY; MARTIN, 2004, 2005). As duas MAPKs implicadas neste processo em tabaco são a SIPK (*salicylic acid-induced protein kinase*) e WIPK (*wounding-induced protein kinase*) (ROMEIS et al., 1999; LIU et al., 2003), AtMPK6 e AtMPK3 em *Arabidopsis* (KOVTON et al., 2000; ASAI et al., 2002; MISHRA; TUTEJA; TUTEJA, 2006), e SIMK (*salt stress-induced MAP kinase*) e SAMK (*stress-activated MAP kinase*) em alfalfa (CARDINALE et al., 2000).

Usando um elicitor de carboidrato de *Phytophthora parasitica* foi demonstrado que a atividade da MAPK WIPK é associada à HR (ZHANG; KLESSIG, 2000). WIPK é ativado em resposta a proteína bacteriana AvrPtoB durante a infecção por *Pseudomonas syringae*, e indícios apontam que WIPK é uma das MAPK chave na regulação da resistência a doença (EKENGREN et al., 2003).

SIPK e WIPK de tabaco, que são homólogos a AtMPK6 e AtMPK3 de *Arabidopsis*, respectivamente, são MAPKs fosforiladas pela MAPK2K NtMEK2 (YANG; LIU; ZHANG, 2001; KIM et al., 2003), sendo ativadas por elicitores gerais e pela interação raça-específica de proteínas de avirulência e suas proteínas de resistências aparentadas (ZHANG; KLESSIG, 1998,

2000; ROMEIS et al., 1999; ASAI et al., 2002; MISHRA; TUTEJA; TUTEJA, 2006). Experimentos de aumento de expressão e silenciamento gênico indicam a importância central de cascatas de MAP kinases na resistência a doenças mediada por genes *R*. Plantas de tabaco expressando o gene *R Cf-9*, apresentaram um aumento de seis vezes nas concentrações de WIPK e SIPK, quando tratadas com a proteína de avirulência fúngica Avr9 (ROMEIS et al., 1999; HEESE; LUDWIG; JONES, 2005). Do mesmo modo, a ativação de SIPK e WIPK também ocorre de uma forma dependente do gene *N* depois da inoculação do vírus do mosaico do tabaco (TMV) em planta de tabaco (ZHANG; DU; KLESSIG, 1998; JIN et al., 2003). Redução simultânea na expressão de NtMEK2, SIPK, e WIPK, ou apenas de SIPK e WIPK, por silenciamento gênico resultaram na atenuação da resistência a TMV e ao peptídeo Avr 9 fúngico, respectivamente (JIN et al., 2003; SHARMA et al., 2003), sendo que a ativação de SIPK e WIPK induz a HR (LIU et al., 2007).

O aspecto da morte celular em mutantes ativos de MAP2Ks (MKK4 e MKK5) em plantas transgênicas de *Arabidopsis* sob condição de indução é precedido pela geração de peróxido de hidrogênio, o que sugere que a indução de HR por MAPK pode ser mediada pela geração de H₂O₂ (REN; YANG; ZHANG, 2002).

A identificação de MAP kinases, dos seus diferentes substratos e reguladores negativos de todos os componentes desta cascata, ajuda a compreender a via de MAP kinases nas plantas. Em plantas as cascatas de MAP kinases não são vias lineares, mas redes complexas, que são necessários para muitas funções fisiológicas fundamentais como sinalização de estresse, respostas hormonais, regulação do ciclo celular, e mecanismos de defesa. Esta rede é também conhecida por estar envolvida na imunidade inata da planta, que confere resistência a microorganismos patogênicos. Sendo cascatas altamente conservadas e componentes universais na transdução de sinais que ligam diferentes receptores/sensores para respostas celulares e nucleares (MISHRA; TUTEJA; TUTEJA, 2006). Sendo os componentes da cascata de MAP kinases implicados na percepção de diferentes patógenos e na consequente ativação de mecanismos de defesa, podem ser importantes alvos a serem utilizados na transformação genética de citros para obtenção de plantas geneticamente modificadas expressando estes genes constitutivamente, para obtenção de plantas resistentes a doenças.

2.3.4 Reação de Hipersensibilidade (HR)

As interações planta-patógeno envolvem mecanismos complexos, específicos, e dinâmicos. Quando uma planta é resistente a um patógeno (interação incompatível), este reconhecimento resulta frequentemente em uma reação de hipersensibilidade (HR), uma morte rápida das células da planta no local da infecção limitando o crescimento e a propagação do patógeno (PARKER; COLEMAN, 1997; LEE; HWANG, 2005; MUR et al., 2008). Acredita-se que o reconhecimento dos patógenos incompatíveis, através dos genes específicos de resistência (genes *R*) da planta, conduz à ativação de um número de diferentes mecanismos de sinalização que se iniciam na membrana plasmática (PONTIER; MITTLER; LAM, 2002).

Na tentativa de impedir a infecção por uma patógeno avirulento a planta produz uma bateria de defesa frequentemente acompanhada pelo colapso da célula hospedeira delimitando a zona de infecção e evitando a multiplicação e disseminação do patógeno (DE STEFANO; FERRARINI; DELLEDONNE, 2005). O rápido acúmulo de ROS (espécies reativas de oxigênio) e NO (óxido nítrico) pela ativação de enzimas como NADPH oxidase e óxido nítrico sintase é um dos eventos iniciais na reação de hipersensibilidade (DE STEFANO; FERRARINI; DELLEDONNE, 2005; RENTEL et al., 2004), sendo que em *Nicotiana benthamiana* a explosão oxidativa originada por estas enzimas é regulada por uma cascata de MAP kinases (ASAI; OHTA; YOSHIOKA, 2008). Há evidências de que a morte da célula hospedeira durante a HR é resultante da ativação de uma fina modulação nos níveis de O_2^- , H_2O_2 e NO (DELLEDONNE et al., 2001; MUR; CARVER; PRATS, 2006). O H_2O_2 produzido pela explosão oxidativa no escuro não desempenha um papel importante na execução da morte celular, mas uma produção precoce e maciça de hidroperóxidos de ácidos graxos por lipoxigenases tem um papel proeminente na morte celular nestas condições (MONTILLET et al., 2005).

Tanto NO quanto ROS são necessários para a ativação da morte celular do hospedeiro, eles também são componentes de um sistema altamente amplificado e integrado de defesa. Este sistema envolve a ativação de fluxo de íons, mudanças nos padrões de fosforilação de proteínas, de pH extracelular, do potencial da membrana, e perturbações no nível de Ca^{2+} citosólico que ativam a expressão local de genes de resistência e pode ter um papel importante nas rotas que levam a HR e resistência sistêmica adquirida (SAR) (MA et al., 2008; ROMERO-PUERTAS; DELLEDONNE, 2003).

Após o reconhecimento do elicitor do patógeno pelos produtos dos genes de resistência (*R*) da planta, ocorre uma cascata de transdução de sinais através da ativação por fosforilação das MAP kinases, que por fim pode desencadear respostas de defesa da planta (PEDLEY; MARTIN, 2005; ZHANG et al., 2007). Em resumo, os aspectos fisiológicos e morfológicos da HR, que ocorrem após o reconhecimento do patógeno pela planta, incluem o aumento rápido de agentes oxidantes, perda de íons potássio e ganho de íons hidrogênio pelas células, a destruição de compartimentos e espessamento das paredes celulares e da cutícula, além da síntese de toxinas (fitoalexinas) e proteínas relacionadas à defesa (PR: do inglês *pathogenesis related*) (DURRANT; DONG, 2004). Outros exemplos de mecanismos de defesa que são ativados após tentativa de invasão do patógeno incluem a biossíntese de ácido salicílico e de compostos antimicrobianos, e a indução da biossíntese de etileno (SCHEEL, 1998; KLESSIG et al., 2000; LAM; KATO; LAWTON, 2001; APEL; HIRT, 2004).

2.3.5 SnRKs (*Sucrose non-fermenting-1-related protein kinases*)

Proteínas denominadas SNF1 (*sucrose non-fermenting-1*) desempenham um papel importante na regulamentação da expressão gênica em células eucarióticas. Esta família de proteínas reguladoras é representada pela proteína quinase *sucrose non-fermenting-1* (SNF1) em *Saccharomyces cerevisiae*, *AMP-activated protein kinases* (AMPKs) em mamíferos e SnRKs (*Sucrose non-fermenting-1-related protein kinases*) em plantas superiores (CARRARO; LAMBAIS; CARRER, 2001; HALFORD et al., 2004).

SNF1 é caracterizada por um domínio quinase serina/treonina N-terminal e um domínio C-terminal regulador (GANCEDO, 1998), sendo SNF1 de *Saccharomyces cerevisiae* a primeira proteína desta classe a ser caracterizada (CARLSON; OSMOND; BOTSTEIN, 1981; CELENZA; CARLSON, 1984). Em *Saccharomyces cerevisiae*, SNF1 é necessária para respostas a estresses, notavelmente, mediante a adaptação das células ao estresse de carbono, e regula a transcrição de muitos genes em resposta à limitação de glicose, e também é necessária para a utilização de fontes alternativa de carbono (HONG et al., 2003). Os membros da subfamília AMP-activated/SNF1-related proteínas quinases são elementos centrais de cascatas de proteínas

quinases altamente conservadas que parecem estar presentes na maioria, senão em todas as células eucarióticas (HARDIE; CARLING; CARLSON, 1998).

Proteínas SnRKs têm sido associadas a processos celulares envolvidos em respostas a estresses nutricional e ambiental que diminuem os níveis de ATP celulares em plantas superiores (HARDIE, 1999; SUGDEN et al., 1999). As SnRKs também podem estar envolvidas no controle do metabolismo de carboidratos por um mecanismo de detecção de glicose semelhante ao verificado com SNF1 (KOCH et al., 2000; LU et al., 2007). SnRKs de plantas regula a atividade de enzimas metabólicas de taxa limitante, incluindo nitrato redutase e sacarose fosfato sintase (SUGDEN et al., 1999; POLGE; THOMAS, 2007), bem como a transcrição de genes para glicose e de genes regulados por estresse (BHALERAO et al., 1999; PURCELL; SMITH; HALFORD, 1998; ROLLAND; BAENA-GONZALEZ; SHEEN, 2006).

Durante a evolução, a família de proteínas quinases de plantas relacionadas a SNF1 se expandiu e divergiu em três subfamílias: SnRK1a/1b, SnRK2, e SnRK3 (HALFORD et al., 2003). A subfamília SnRK1 são os homólogos estrutural e funcional da família SNF1/AMPK (HALFORD; HARDIE, 1998; HALFORD et al., 2003). Proteínas SnRK1 homólogas provenientes de várias espécies de plantas podem complementar o mutante de levedura com fenótipo defeituoso *snf1*, sugerindo uma conservação evolutiva da sua função (ROLLAND; GONZALEZ-BAENA; SHEEN, 2006). Os grupos SnRK2 e SnRK3 são exclusivos de plantas e podem estar envolvidos na resposta a estresses ambientais (KELNER et al., 2004). Embora SnRK2 e SnRK3 estejam claramente dentro do grupo SNF1, são significativamente menos semelhantes à SNF1 e AMPK do que é SnRK1; SnRK2s e SnRK3s têm 42-45% de identidade de sequência de aminoácidos com SnRK1, SNF1 e AMPK no domínio catalítico (HALFORD et al., 2004). A análise do genoma de *Arabidopsis* identificou três membros da família SnRK1, 10 membros da família SnRK2 e 29 membros da família SnRK3 (HALFORD et al., 2003).

A subfamília SnRK1 se divide em dois grupos, SnRK1a e SnRK1b, com base na similaridade de sequência de aminoácidos e padrões de expressão; a primeira é expressa em toda a planta, enquanto a última se expressa apenas na semente (HALFORD; HARDIE, 1998; LU et al., 2007; JAIN; LI.; CHOUREY, 2008). Proteínas SnRK1a e SnRK1b têm aproximadamente 68% de identidade de sequência de aminoácidos entre si, com maior divergência no domínio C-terminal. Por enquanto, o grupo SnRK1b parece estar presente apenas em cereais enquanto que o

grupo SnRK1a parece estar presente tanto em dicotiledôneas como em monocotiledôneas (ZHANG et al., 2001).

Schwachtje et al. (2006) verificaram que a subunidade β de uma SnRK1, a GAL83, regula a resposta induzida por herbivoria em *Nicotiana attenuata*, que aumenta a alocação de açúcar às raízes. A transcrição de GAL83 é rapidamente diminuída em folhas fonte após ataque de herbívoro e, quando silenciados, aumenta o transporte de assimilados às raízes. Demonstrando que SnRK1 pode alterar a alocação de recursos, melhorando a tolerância da planta a herbivoria.

A subfamília SnRK2 inclui PKABA1 de trigo, que está envolvida mediando alterações na expressão gênica induzidas por ABA, incluindo a supressão de ácido giberélico na sinalização nas camadas de aleurona induzidas por ABA (GOMEZ-CADENAS et al., 1999, 2001). Os resultados obtidos por Kobayashi et al. (2004) indicam que a família de proteína quinase SnRK2 de arroz evoluiu especificamente para sinalização de estresse osmótico e que membros individuais adquiriram propriedades distintas reguladoras, incluindo responsividade a ABA por modificação do domínio C-terminal.

As 10 SnRK2 de *Arabidopsis* foram expressas tanto em células que crescem em solução salina como em mudas expostas ao estresse hiperosmótico; nove das 10 SnRK2 foram ativadas por hiperosmolaridade induzida por manitol, bem como NaCl, indicando um importante papel da família SnRK2 na sinalização a estresse osmótico (BOUDSOCQ; BARBIER-BRIGOO; LAURIÈRE, 2004). Em contrapartida, os autores não observaram a ativação de SnRK2 no tratamento de frio; enquanto que o ácido abscísico ativou apenas cinco das nove SnRK2. Ambos os genomas de arroz e *Arabidopsis* codificam 10 membros da família SnRK2 de proteínas quinases (HRABAK et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2004).

Várias quinases da subfamília SnRK3 foram descritas sendo uma delas a proteína quinase WPK4 de trigo (*Triticum aestivum*), cuja expressão é induzida pela luz, citocininas, e baixa temperatura e reprimida pela sacarose (IKEDA et al., 1999; RIKIISHI et al., 2008). Existem relatos que indicam que um grupo de quinases, que pertencem à subfamília SnRK3, faz parte da defesa da planta contra estresses abióticos (LUAN et al., 2002; CHINNUSAMY; SCHUMAKER; ZHU, 2004; GONG et al., 2004). O mais conhecido membro deste grupo é o SOS2 quinase, uma proteína quinase de *Arabidopsis* exigida para homeostase de sódio e potássio e na tolerância salina (LIU et al., 2000; BATELLI et al., 2007).

Carraro, Lambais e Carrer (2001) identificaram na base de dados do SUCEST (VETTORE et al., 2001) 22 EST-contigs codificando supostas SnRKs em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Com base em análise de padrões de expressão dos EST-contigs em 26 bibliotecas cDNA os autores sugerem que SnRKs de cana-de-açúcar podem estar envolvidas no desenvolvimento das plantas e na resposta ao ambiente.

Como os dados sugerem a participação do complexo de quinases de SnRKs de planta na regulação global do metabolismo, bem como no desenvolvimento e respostas a estresses (POLGE; THOMAS, 2007), são proteínas interessantes para serem estudadas com relação ao seu comportamento em interações planta-patógeno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Banco de dados de Citros - CitEST

O banco de dados de ESTs (etiquetas de sequencias expressas) de Citros (CitEST) utilizado neste trabalho foi desenvolvido no Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’ (Cordeirópolis – SP) e contém mais de 242 mil sequencias validadas. Estas sequencias foram produzidas a partir do sequenciamento de ESTs de diversas bibliotecas de cDNA (ácido desoxirribonucléico complementar ao RNAm) de citros construídas com tecidos de *Citrus sinensis*, *C. reticulata*, *C. limonia*, *C. aurantifolia*, *C. aurantium*, *C. limettiodes*, *C. latifolia*, *C. sunki* e *Poncirus trifoliata*, em diferentes combinações de fatores limitantes (bióticos e abióticos), condições fisiológicas (adulto x juvenil) e tecidos como folha, casca, fruto, raiz, flor e sementes (TARGON et al., 2007).

3.1.1. Busca de genes relacionados a resistência de plantas

As buscas no CitEST por: 1) genes *R*; 2) genes requeridos pelos genes *R*; 3) genes envolvidos na HR e na defesa; 4) genes das MAPKs e; 5) SNF1, foram feitas por palavras-chave, e por BlastX (busca de sequencia de proteína utilizando nucleotídeos traduzidos) e BlastN (busca de sequencia de nucleotídeos utilizando nucleotídeos) (ALTSCHUL et al., 1990). Para as buscas foram utilizadas sequencias destes genes já identificadas em *Citrus sp*, *Arabidopsis thaliana*, tomate (*Lycopersicon esculentum*), arroz (*Oryza sativa*) e fumo (*Nicotiana tabacum*) disponíveis no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/). Após a identificação das sequencias no CitEST, somente aquelas com e-value $<10^{-10}$ de similaridade com a enzima-alvo foram agrupadas usando o programa CAP3 (Contig Assembly Program-Third generation) (HUANG; MADAN, 1999) formando os *contigs* (agrupamento de ESTs alinhados) e *singletons* (ESTs que não tiveram similaridade o suficiente para serem agrupadas em *contigs*).

Para estudo das regiões conservadas que caracterizam as diferentes proteínas, as sequencias deduzidas de aminoácidos dos *contigs* e *singletons* foram alinhadas usando os programas ClustalW (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) e Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) ou programa AlignX (Vector NTI Program, InforMax, Inc.).

3.2 Macroarranjo

3.2.1 Escolha dos clones a serem impressos nas membranas de macroarranjo

Após a identificação dos *contigs* e *singletons* relacionados às proteínas de defesa vegetal, observou-se “in silico” que alguns destes *contigs* se mostravam com expressão mais frequente em bibliotecas infectadas por patógenos. Com o objetivo de analisar se estas sequencias apresentavam expressão diferencial na ausência e presença de *G. citricarpa*, foi preparado um macroarranjo utilizando sequencias identificadas no CitEST. O macroarranjo foi preparado com 273 sequencias (Nomenclatura CitEST - Anexo 1) contendo: 97 sequencias relacionadas a genes *R*, 10 genes requeridos pelos genes *R*, 77 MAP kinases, 18 SNF1 e 71 sequencias envolvidas na HR e defesa (sendo: 6 - NADPH oxidase, 7 - SOD, 3 - nitrato redutase, 4 - fenilalanina-amônia liase, 3 - corismato mutase, 2 - isocorismato sintase, 10 - PR-proteínas, 2 - canais de cálcio, 2 - chalcona sintase, 2 - glutathione transferases, 2 - glutathione peroxidase, 4 - canais de íons, 3 - metacaspases, 5 - lipoxigenases, 5 - peroxidases, 2 - ácido cinâmico 4-hidroxilase, 5 - catalases, 2 - epoxide hydrolase, 2 - estresse inducible protein) e duas sequencias controles positivos com similaridade a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e β -actina. Estas sequencias foram impressas manualmente em membranas de náilon *Hybond⁺* (Invitrogen) geralmente utilizadas para experimentos de macroarranjos.

3.2.2 Confecção das membranas

3.2.2.1 Replicação dos clones para a construção manual das membranas de macroarranjo

Para a confecção manual das membranas de macroarranjo os 273 clones mais os dois controles positivos (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e β -actina), mantidos em estoque com glicerol a -80°C , foram replicados com auxílio de palitos de madeira autoclavados para placas de replicação (microplacas) contendo 1 mL de *Circle Grow* suplementado com ampicilina (100 mg/L). Em seguida, as microplacas foram fechadas com adesivos plásticos transparentes,

perfurados com agulha, para oxigenação e melhor crescimento dos clones, e incubadas a 320 rpm, 37°C, durante 22 horas. Os genes controle estavam presentes repetidamente nas microplacas, sendo 8 vezes o gene para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e 7 vezes o da β -actina. Após o crescimento das bactérias, fez-se o isolamento do DNA plasmidial de todos os clones.

3.2.2.2 Extração do DNA plasmidial - Miniprep

Para a extração do DNA plasmidial contendo como inserto sequencias dos genes identificados no CitEST e dos genes controle foi utilizado o método de lise alcalina para microplacas (<http://sucest.lad.ic.unicamp.br/public>), com algumas modificações. Após as células terem sido sedimentadas a 2.254 x g por 6 minutos à temperatura ambiente (T.A.), o sobrenadante foi descartado por inversão e as placas ficaram invertidas sobre papel absorvente por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 240 μ L de solução GET (glicose 20 %, EDTA 0,5 M, pH 8,0 e TRIS-HCl 1 M pH 7,4), as placas foram seladas com adesivo e as células foram ressuspensas. Após uma nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado por inversão e as placas ficaram invertidas sobre papel absorvente por 5 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em 80 μ L de GET. A suspensão foi transferida para uma microplaca de fundo redondo (tipo Elisa) contendo 2,5 μ L de RNase (10 mg/mL). Foram então adicionados 80 μ L de uma solução consistindo de NaOH 0,2 N e SDS 1 % e homogeneizou-se a solução. Após 10 minutos à T.A. foram adicionados 80 μ L de KOAc 3 M, permanecendo por mais 10 minutos à T.A. A suspensão foi incubada a 90°C durante 30 minutos, imediatamente transferida para o gelo por 10 minutos e centrifugada a 2.254 x g, à T.A., por 4 minutos. Todo o volume das suspensões foi filtrado através de microplaca Millipore (MAGV N22) a 2.254 x g, à T.A., por 4 minutos. Ao filtrado foram adicionados 110 μ L de isopropanol e centrifugados a 2.254 x g, à T.A., por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão e o sedimento foi lavado com 200 μ L de etanol 70 % (-20°C) e novamente centrifugado a 2.254 x g à T.A., por 5 minutos. O sedimento resultante foi seco à T.A., durante 1 h e, finalmente, ressuspensado em 40 μ L de água Milli-Q esterilizada.

A observação da qualidade e a quantificação dos clones foram obtidas efetuando-se eletroforese em gel de agarose 1% e comparando-se as bandas com as do padrão de peso molecular do vetor pGEM (Promega).

3.2.2.3 PCR da miniprep dos clones

Para a obtenção das sequencias específicas de citros (exclusão dos vetores) foram feitas reações de PCR (reação em cadeia da polimerase - *Polymerase Chain Reaction*) das minipreps dos clones e os produtos de PCR foram quantificados e impressos nas membranas. Para isso, na reação de PCR para 1 µL de DNA da miniprep foram adicionados:

Tampão 10X *	3,0 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2,0 µL
Solução de dNTPs (1,25 mM)	2,0 µL
Primer M13 forward (5 pmol/µL) **	1,2 µL
Primer M13 reverse (5 pmol/µL)***	1,2 µL
Água Milli-Q estéril	19,4 µL
Enzima Taq DNA polimerase	0,2 µL

* 100 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 500 mM KCl, and 0.8% (v/v) Nonidet P40

** 5' – CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG – 3'

*** 5' – CCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT – 3'

As condições de tempo e temperatura utilizadas nesta reação foram:

Temperatura	Tempo	Nº de repetições
95°C	3 minutos	1
95°C	30 segundos	} 35
65°C	45 segundos	
72°C	3 minutos	
72°C	5 minutos	1
4°C	∞	

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1% para verificação da presença de DNA e seguiu-se para a purificação dos produtos de PCR.

3.2.2.4 Precipitação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram precipitados, adicionando-se 20 μL de acetato de amônio 7,5 M e 80 μL de etanol absoluto. Após homogeneização as placas foram centrifugadas a 2.254 x g por 45 minutos, a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, 150 μL de etanol 70% gelado foram adicionados. As placas foram centrifugadas a 2.254 x g por 15 minutos, a 4°C e, após o descarte do sobrenadante, foram secas à T.A., por 1 hora.

O precipitado foi ressuspendido em 10 μL de água Milli-Q estéril e quantificado em eletroforese em gel de agarose 1% através da comparação com o padrão de peso molecular pGEM (Promega). Os produtos de PCR foram diluídos (quando necessário) para concentração final de 100 ng/ μL .

3.2.2.5 Impressão manual das membranas

Para a impressão dos produtos de PCR nas membranas, foram adicionados 5 μL de NaOH 0,4 M a 5 μL de cada produto de PCR (100 ng/ μL), obtendo-se concentração final de 50 ng/ μL de DNA e 0,2 M de NaOH. Após homogeneização, esta solução foi aquecida a 37 °C, por 15 minutos, para desnaturação do DNA.

Seis membranas de náilon *Hybond⁺* (Invitrogen) foram cortadas nas dimensões de 13 X 7 cm e impressas de forma idêntica (réplicas), com o auxílio do transferidor manual *VP Scientific* de 96 *pins*. Os DNAs foram impressos 3 (três) vezes em cada *spot* (ponto) e em triplicata. Após impressão o DNA foi fixado às membranas, expondo-as a 70 mJ/segundo de radiação ultravioleta (UV). As membranas foram armazenadas em local seco, entre folhas de papel 3 mm, até serem utilizadas.

3.2.3 Normalização das membranas com sonda plasmidial - *Overgo*

A normalização, ou seja, o ajustamento sistemático das diferenças na intensidade relativa de cada ponto (*spot*) que não representam diferenças reais foi realizado pelo método *overgo*.

Desde que utilizou-se os *primers* M13 direto (D) e reverso (R) para amplificação dos clones por PCR, uma sonda plasmidial foi construída com base na região complementar à região de anelamento do *primer* SP6 (5' - ATTTAGGTGACACTATAG - 3') presente no fragmento amplificado (CASSOLI, 2007) (Figura 1). Uma sequência de 18 bases foi utilizada de forma que houvesse complementaridade de 8 bases entre os *primers*: SP6 e *Overgo* (3' - GTGATATCTTCTCGATAC - 5') (CASSOLI, 2007) (*primer Overgo* cedido pelo Laboratório de Biotecnologia Animal, ESALQ/USP, Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho).

1. Região de inserção do cDNA

```
CCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGAATTTAGGTGACACTATAGAAGAGCTATG
ACGTCGCATGCACGCGTACGTAAGCTTGGATCCTCTAGAGCGGCCGCC
Inserto de cDNA CGGACGCGTGGGTCGACCCGGAATTCCGGACCGGTACC
TGCAGGCGTACCAGCTTTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGAGCTTGGCG
TAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT
```

2. Regiões de alinhamento de *primers* no pSPORT1

```
5'
CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG 3' (M13 - forward)
CCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGAATTTAGGTGACACTATAG
(SP6) 5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'
AAGAGCTATGACGTCGCATGCACGCGTACGTAAGCTTGGATCCTCTAGAGCGGCCGCC
Inserto de cDNA CGGACGCGTGGGTCGACCCGGAATTCCGGACCGGTACCTGCA
GGCGTACCAGCTTTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGAGCTT
3' GGGATATCACTCAGCATAAT 5' (T7)
GGCGTA ATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT
(M13 - reverse) 3' GGACACACTTTAACAATAGGCGA 5'
```

3. Primer *Overgo* construído com base na região do *primer* SP6

```
5' ATTTAGGTGACACTATAG 3' (Sp6)
3' GTGATATCTTCTCGATAC 5' (Overgo)
```

Figura 1 - Regiões de inserção dos cDNAs e de anelamento dos *primers* do pSPORT1, utilizadas para construção do *primer Overgo* (modificado de CASSOLI, 2007)

3.2.3.1 Pré-hibridização

Anteriormente à hibridização com a sonda plasmidial-*overgo* as membranas contendo os clones foram colocadas em um recipiente plástico, permanecendo separadas por uma malha de filtro. A seguir, as membranas foram lavadas com solução fervente de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1 % por 5 minutos, sob agitação lenta, a fim de diminuir os resíduos de fundo (*background*). Em seguida, as membranas foram imersas em 200 mL de uma solução de pré-hibridização, constituída por 2 g de soro albumina bovina (BSA), 400 µL de EDTA 0,5 M pH 8,0, 14 g de SDS, 100 mL de tampão Fosfato de Sódio 1M (7,1 g Na₂HPO₄ + 0,4 mL H₃PO₄ 85%), e mantidas 4 horas a 50°C em banho-maria *Maxi-shake* (HETO).

3.2.3.2 Síntese da sonda plasmidial – *overgo*

Paralelamente à pré-hibridização, foi preparada a sonda plasmidial - *overgo*. Para isso, os oligonucleotídeos utilizados como sonda plasmidial - *overgo*. (Figura 1) foram misturados a uma concentração final de 10 pmol/µL para a reação de marcação com α³³P-dCTP (GE Healthcare). A suspensão de oligonucleotídeos foi primeiramente incubada a 80°C por 5 minutos, para desnaturação, em seguida a 37°C por 10 minutos, para anelamento da região complementar entre os *primers*, e imediatamente transferida para o gelo. Foram adicionados a 1 µL desta solução os reagentes listados a seguir e a reação foi realizada a 37°C, por 1 hora.

mix de óligos desnaturados (SP6 + Overgo)	1 µL
BSA (2 mg/mL)	0,5 µL
Tampão OLB*	2,0 µL
α ³³ P-dCTP (GE Healthcare)	0,5 µL
<i>Klenow</i> DNA polimerase I (5 U/µL)	0,5 µL
<i>Primer</i> M13 reverso (5 pmol/µL)	4,0 µL
Água Milli-Q estéril	5,5 µL

* Solução OLB: Soluções A:B:C = 1:2,5:1,5

Solução O: 1,25 M Tris-HCl pH 8,0 + 125 mM MgCl₂

Solução A: 66,6 µL solução O + 1,2 µL de β-mercaptoetanol + 1,0 µL mix dATG 10 mM

Solução B: 2M HEPES-NaOH pH6,6

Solução C: 3mM Tris-HCl pH 7,4 + 0,2 mM EDTA

3.2.3.3 Hibridização das membranas com sonda plasmidial – *overgo*

Após a reação de síntese e marcação da sonda plasmidial - *overgo*, o volume final da mistura de reação foi ajustado para 50 µl e a sonda foi purificada em coluna *Sephadex* G-50 (Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. Uma vez purificada, a sonda foi desnaturada a 94°C por 10 minutos e imediatamente transferida para gelo.

Em seguida, a solução de pré-hibridização foi substituída pela solução de hibridização, de mesma composição da solução de pré-hibridização e suplementada com a sonda plasmidial - *overgo*. As membranas foram incubadas na solução de hibridização durante 18 horas a 50°C, em banho-maria *Maxi-shake* (HETO), com agitação lenta (60 rpm). As membranas foram então lavadas duas vezes com SSC 2x (NaCl 1,8 % e ácido cítrico 1,5 %) contendo SDS 0,1 %, por 15 minutos, depois mais duas vezes com SSC 1,5x e SDS 0,1 % por 15 minutos, e finalmente duas vezes com SSC 0,5x e SDS 0,1 % por 15 minutos, a 50°C.

3.2.3.4 Geração das imagens das membranas

As imagens das hibridizações dos macroarranjos foram obtidas após a exposição a um *Imaging Plate* (IP) (Kodak) durante 48 horas. A revelação do IP foi realizada com o sistema de análise de imagens STORM 860 (GE Healthcare) e as imagens obtidas foram digitalizadas utilizando o *software ImageQuant* (GE Healthcare) do Laboratório de Biotecnologia Animal, ESALQ/USP (Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho).

3.2.3.5 Lavagem final das membranas (*Stripping*)

Após a revelação, a sonda foi removida das membranas lavando-as duas vezes com uma solução de NaOH 0,4 N e SDS 0,1 % a 65°C em banho-maria com agitação *Maxi-shake* (HETO) por 15 minutos, seguida por mais duas lavagens com TRIS 0,2 N, pH 8,0, SDS 0,1 % e SSC 0,1x a 65°C por 15 minutos. As membranas foram novamente expostas ao IP por 24 horas, para confirmação da completa remoção da sonda. As membranas foram armazenadas a -20°C

(embebidas na última solução de lavagem e entre folhas de plástico) para posterior utilização ou foram imediatamente utilizadas para hibridização com sondas específicas de *Citrus sinensis* da variedade Valência.

3.2.4 Hibridização com as sondas (CsS e CsP) preparadas com folhas de citros

3.2.4.1 Extração do RNA total de citros

Os tecidos de plantas utilizados para preparo das sondas de hibridização foram folhas de *C. sinensis* sadias denominadas, CsS, e com sintomas de Pinta preta (com no máximo 4 manchas do tipo mancha preta ou dura) denominadas, CsP. As folhas foram gentilmente fornecidos pelo Centro APTA Citros 'Sylvio Moreira', Cordeirópolis, SP. O método de extração de RNA total utilizado foi o Método do Fenol (BEZERRA, 1998), descrito a seguir, com pequenas modificações:

Para cada sonda, CsS e CsP, utilizou-se 2 g de folha macerada em cadinho com nitrogênio líquido. O pó resultante da maceração foi transferido para tubos de centrífuga de 50 mL resfriados a 4°C contendo 6 mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e 10 mL de tampão NTES (200 µL de NaCl 5M, 100 µL de Tris-HCl 1M, pH 7,5, 20 µL de EDTA 500 mM, pH 8,0, 1 mL de SDS 10%, 8,680 mL de H₂O tratada com DEPC 0,1%). Os tubos foram bem tampados e agitados vigorosamente por 15 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se a 10.000 x g por 15 minutos, a 4 °C. A fase superior foi transferida cuidadosamente para novo tubo e adicionou-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M (pH 4,5) e 2 volumes de etanol absoluto (-20 °C). Homogeneizou-se e incubou-se a -20 °C por no mínimo 1 hora. Os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 15 minutos, a 4 °C e o sobrenadante descartado. Dissolveu-se o sedimento em 5 mL de H₂O tratada com DEPC 0,1% previamente resfriada. Foi adicionado 2,5 mL de cloreto de lítio 8 M e seguiu-se a incubação a 4°C por, no mínimo, 3 horas. Centrifugou-se a 10.000 x g por 15 minutos, a 4 °C e o sobrenadante foi descartado e repetiu-se o procedimento anterior (o sedimento foi novamente dissolvido em 5 mL de H₂O DEPC previamente resfriada e foi adicionado cloreto de lítio 8M) porém a incubação foi *overnight* a 4°C. Após incubação seguiu-se a centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos, a 4 °C, descartou-se o sobrenadante, e o

sedimento foi dissolver em 1,8 mL de H₂O DEPC previamente resfriada. Adicionou-se 0,2 mL de acetato de sódio 3M (pH 4,5) e 4 mL de etanol absoluto (-20 °C) e a precipitação ocorreu a -20 °C por, no mínimo, 1 hora. Centrifugou-se a 10.000 x g por 20 minutos, a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 5 mL de etanol 70% ao precipitado seguida de centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos, a 4 °C e descarte do etanol. O RNA foi seco por 15 minutos a 37 °C e dissolvido em 250 µL de H₂O DEPC resfriada.

3.2.4.2 Quantificação e análise de qualidade do RNA

A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotometria a 260 nm ($1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ µg de RNA mL}^{-1}$) 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 ácido 3-[N-morfolino] propaneusulfônico, 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 µg/mL) e finalmente foram aplicadas no gel. A documentação fotográfica foi realizada no *Electrophoresis Documentation and Analysis System-120* (Kodak Digital Science) utilizando-se o programa *1D Image Analysis Software* (Kodak Digital Science). 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.

3.2.4.3 Síntese das sondas de cDNA

A síntese das sondas de cDNA foi realizada segundo metodologia adaptada descrita por Hervé et al. (1996). A reação de cada sonda foi iniciada com 30 µg de RNA total em 6 µL de água-DEPC e 1 µL de oligo dT_{18V} (156 pmoles/µL). As amostras foram incubadas durante 10 minutos a 75°C e imediatamente transferidas para o gelo. Em seguida, foram adicionados:

<i>First Strand Buffer</i> 5x*	5,0 µL
ditiotritol (DTT) 100 mM	2,5 µL
<i>RNaseOUT</i> (40U/µL) (Invitrogen)	2,0 µL
d(ATG) (10mM cada)	2,5 µL
α^{33} P-dCTP (10 µCi/µL) (GE Healthcare)	5,0 µL

* TRIS-HCl 250 mM pH8,3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM (Invitrogen)

A mistura de reação foi incubada durante 5 minutos a 42°C, e então adicionou-se 2 µL de *SuperScript™ II* RT (200 U/µL) (Gibco-BRL), seguindo-se pela incubação a 42°C por mais 20 minutos. A seguir, foram adicionados 1,25 µL de dCTP (10mM) à mistura de reação, que foi mantida por mais 1 hora a 42°C, quando então foram adicionados 2 µg de *polyadenylic acid Poly-A* (GE Healthcare). A suspensão foi desnaturada a 94°C por 5 minutos, seguida de adição de 1,4 µL de NaOH 5 M e incubação a 37°C por 15 minutos. Por fim, foram adicionados 1,8 µL de HCl 3,94 M e 7 µL de TRIS-HCl 1 M pH 7,5 e o volume final foi ajustado para 50 µL com água Milli-Q esterilizada. As sondas foram purificadas em coluna *Sephadex G-50* (Amersham Biosciences) e após desnaturação a 94 °C por 3 minutos foram utilizadas para hibridização das membranas.

3.2.4.4 Hibridização dos macroarranjos com as sondas CsS e CsP

Das seis membranas preparadas, somente as numeradas como 3 e 4 apresentaram resultados de melhor uniformidade com a sonda *overgo*. Estas foram descongeladas e colocadas em tubos individuais (20 cm x 3,5 cm) de hibridização (Wheaton) contendo solução de pré-hibridização, que consistiu de:

SSC* 20x pH 7,0	2,5 mL
TRIS-HCl 1 M pH 7,5	0,2 mL
formamida deionizada (Gibco-BRL)	5,0 mL
<i>Denhardt's</i> 50 x (Invitrogen)	2,0 mL
SDS 10 %	1,0 mL
DNA de esperma de salmão (10 mg/mL)	0,1 mL
desnaturado a 94°C por 10 minutos	

*SSC 20x: NaCl 18 % e ácido cítrico 15 %

As membranas permaneceram durante 2 horas nesta solução a 42°C. Após este período, a solução de pré-hibridização de cada tubo foi substituída por 5 mL de solução de hibridização, pré-aquecida a 42°C e preparada com:

SSC 20x pH 7,0	1,25 mL
TRIS-HCl 1 M pH 7,5	0,1 mL
formamida deionizada (Gibco-BRL)	2,5 mL
<i>Denhardt's</i> 50 x (Invitrogen)	0,2 mL
SDS 10 %	0,5 mL
sulfato de dextrano 50 % (GE Healthcare)	0,5 mL
DNA de espermatozoides de salmão (10 mg/mL)	50 µL
desnaturado a 94°C por 10 minutos	

A sonda de cDNA, previamente desnaturada a 94°C por 3 minutos, foi adicionada a solução de hibridização. As membranas permaneceram durante 18 horas nesta solução de hibridização, a 42°C.

Na 1ª etapa a membrana 3 foi hibridizada com a sonda CsS e a membrana 4 com CsP, simultaneamente, depois as membranas foram lavadas com SSC e SDS (descrito a seguir), verificou-se se realmente a lavagem foi completa, e inverteu-se as hibridizações: membrana 3 com a sonda CsP e membrana 4 com CsS.

As membranas foram então lavadas duas vezes com SSC 2x (NaCl 1,8 % e ácido cítrico 1,5 %) contendo SDS 0,1 %, por 15 minutos, a temperatura ambiente, depois mais duas vezes com SSC 1,5x e SDS 0,1 % por 15 minutos, a 58°C, e finalmente duas vezes com SSC 0,5x e SDS 0,1 % por 15 minutos, a 58°C.

As etapas de obtenção das imagens e lavagem final das membranas foram realizadas como descrito nos itens 3.2.3.4 e 3.2.3.5, respectivamente.

3.2.5 Quantificação, normalização do sinal dos *spots* e análise estatística

Para a obtenção do resultado de expressão dos genes correspondentes aos produtos de PCR impressos, as imagens obtidas por meio de STORM® *PhosphorImager* (GE Healthcare – Amersham Biosciences) foram digitalizadas utilizando-se o *software ImageQuant* (GE

Healthcare – Amersham Biosciences) e analisadas pelo software *ArrayVision (Imaging Research Inc.)*.

A análise foi iniciada informando-se ao programa as características referentes à geometria das membranas, como: número de linhas e colunas contendo os *spots*, distância horizontal e vertical entre o centro dos *spots* e diâmetro destes, para obter o endereçamento dos sinais, com objetivo de identificar o clone correspondente a cada região da membrana. Para a quantificação do sinal, efetuou-se uma distinção entre aqueles correspondentes aos *spots* hibridizados, daqueles oriundos do ruído de fundo (*background*). Assim foram estipulados valores para a intensidade destes sinais e realizou-se uma correção, com base no sinal do *background* (razão entre estes dois tipos de sinais).

A primeira normalização foi feita com base nos sinais obtidos após hibridização com a sonda plasmidial - *overgo*. Para corrigir possíveis diferenças na quantidade de material impresso nas membranas o valor de intensidade de cada *spot*, resultante da hibridização com as diferentes sondas, foi dividido pelo valor do mesmo *spot* resultante da hibridização com a *overgo*. Uma segunda normalização foi efetuada com base nos sinais do gene constitutivo β -actina, uma vez que este apresentou nível de expressão mais uniforme nas diferentes hibridizações em relação ao GAPDH e, desta forma, foi utilizado como controle positivo. Sendo assim, calculou-se o valor médio dos sinais de β -actina de cada hibridização e dividiu-se o valor normalizado de cada *spot* por este.

O valor final obtido de cada *spot* foi, então, transformado em $\log_2$ e utilizado no modelo em dois estágios proposto por Wolfinger et al. (2001). Os dados foram então submetidos à análise estatística, utilizando o teste t ao nível de 5 % de probabilidade.

3.3 Validação dos resultados do macroarranjo por RT-PCRq

Com o objetivo de validar os resultados de expressão diferencial utilizando genes selecionados no experimento de macroarranjo, foi realizada a transcrição reversa seguida de PCR quantitativo em tempo real (RT-PCRq). Este é um método rápido e sensível para a quantificação dos produtos na fase exponencial da reação. Anteriormente às reações de RT-PCRq, as condições de amplificação foram estabelecidas e otimizadas em PCR convencional.

A técnica de PCR quantitativo em tempo real consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR através da ligação de uma sonda específica ou um corante na fita recém sintetizada (HIGUCHI; FOCKLER; DOLLINGER, 1993; BUSTIN, 2000). A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento IQ5 (Bio-Rad) do Laboratório de Genética de Microrganismos da ESALQ/USP (Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner) utilizando o reagente SYBRGreen PCR Master Mix[®] (Invitrogen), que além de conter todos os reagentes necessários para a realização de uma reação de PCR (dNTPs, MgCl, tampão, Taq Ampli-Gold[®]), contém também o corante SYBRGreen[®], componente intercalante de DNA dupla fita, necessário para a detecção da reação ciclo a ciclo.

Na reação, inicialmente, se estabelece um limiar de detecção denominado *threshold*. À medida que a quantidade de produto amplificado em determinada amostra produz uma curva de amplificação que ultrapassa o limiar de detecção, esse ponto de cruzamento é denominado Ct (*threshold cycle*). O Ct se refere à fase exponencial da reação. Quanto menor o Ct, maior a expressão do gene e, portanto, mais precocemente ele será amplificado. A fluorescência emitida antes do nível do Ct para cada amostra é considerada ruído de fundo (*background*).

3.3.1 Seleção dos genes e obtenção dos *primers* para RT-PCRq

Dos genes diferencialmente expressos, a 5 % de significância ($\alpha=0,05$) no experimento de hibridização dos macroarranjos, foram selecionados 9 genes para validação por RT-PCRq: 5 genes super-expressos e 4 genes reprimidos, e o gene β -actina foi utilizado como controle. Assim o primeiro passo para isso foi à seleção dos genes e obtenção dos *primers* específicos destes genes.

As sequencias dos RNAm dos respectivos unigenes foram utilizadas para a síntese dos *primers* da reação de amplificação. Para desenhar cada *primer* de um mesmo par de *primer* que se pareassem em exons diferentes foi feita a comparação das sequencias de citros selecionadas, com os respectivos genes semelhantes do *GenBank*.

Os *primers* específicos para cada uma das sequencias selecionadas foram desenhados utilizando o programa *Primer3* (ROZEN; SKALETSKY, 2000; http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Os *primers* sugeridos por este programa foram confirmados

parear em exons diferentes de cada gene (no caso o gene ao qual a sequencia de citros é semelhante), para garantir que somente o cDNA seja amplificado na reação de PCR. Por fim, os *primers* foram validados pelo programa *NetPrimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>) e submetidos ao *GenBank* pelo *Blast short* (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) para assegurar que cada sequencia de *primer* era única para o gene alvo. Na Tabela 1 estão listados os genes selecionados para validação, a sequencia dos pares de *primers*, bem como o tamanho dos respectivos produtos amplificados.

Tabela 1 - Relação dos genes, *primers* e tamanho em pares de bases (pb) dos fragmentos amplificados por PCR comum, para posterior amplificação em RT-PCRq de *C. sinensis*

Genes	Sequencia do <i>primer</i>	Produto
Genes induzidos (<i>super-expressos</i>)		
SGT1 - <i>Contig 3</i>	F-5' CACCAGCCAGACCAAAATAC- 3'	181 pb
	R-5' CCAAATAAGCGAGGTTGAAA- 3'	
MAP3K - <i>Contig 23</i>	F-5' AATCAAGCGCAATACTCTGG- 3'	211 pb
	R-5' AAGCGTGTTCCTTCACAATCC- 3'	
RPM1 - <i>Contig 95</i>	F-5' TCGACGATGTTTGGAAGATT- 3'	115 pb
	R-5' CAAGCCTTAGCGACATTCAT- 3'	
MAP3K - <i>Singleton</i>	F-5' TTGAGATGTCTGGGGTTTGT- 3'	170 pb
	R-5' GATGTCAGGGGATAGGCTTT- 3'	
MAPK WIPK - <i>Contig 93</i>	F-5' CCCCAACATCCTCGTCAGTC- 3'	227 pb
	R-5' TGCTCTTCTCCCAGGCTTTG- 3'	
Genes reprimidos		
MAP3K - <i>Contig 91</i>	F-5' CATAGCACCAACACCATTCA-3'	192 pb
	R-5' ATTTCCATCCTTTTGCATCA- 3'	
Catalase - <i>Singleton</i>	F-5' GGATTTGCGGTCAAGTTTTA- 3'	183 pb
	R-5' TTCAGGATGATGGGAGAAGA- 3'	
Peroxidase - <i>Singleton</i>	F-5' CTGGTGTTGTTTCCTGTGCT-3'	156 pb
	R-5' TGTCATTGTGATCTGGGAGA- 3'	
HIN1 - <i>Contig 1</i>	F-5' CCTAATCACCATCCTCATCG- 3'	200 pb
	R-5' GGTAAGTGGCGTAAAGGTCA- 3'	
Gene controle		
Actina	F-5' CTCTTTATGCCAGTGGTCGT - 3'	120 pb
	R- 5' CCAAGTCCAAACGAAGAATG- 3'	

3.3.2 Síntese de cDNA fita simples

Anteriormente a síntese de cDNA fita simples foi feito o tratamento do RNA total com DNase I (Invitrogen). O tratamento consistiu de: em um microtubo de 1,5 mL foi adicionado 2 µg de RNA total dissolvido em 8 µl de água-DEPC, 1 µl de tampão 10x e 1 µl de DNase I (1U/µL) e incubação por 15 minutos a temperatura ambiente. Adicionou-se 1 µl de EDTA (25 mM) para inativação da DNase I. Aquecimento a 65°C por 10 minutos e gelo por 1 minuto. Dessa maneira a amostra de RNA estava pronta para ser usada na transcrição reversa.

Para a síntese do cDNA fita simples foi utilizado o RNA total isolado folha sadia e com sintomas de pinta, conforme descrito no item 3.2.4.1, e tratado com DNase I.

A conversão do RNA total em cDNA fita simples foi realizada com o Kit *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen). Partiu-se da mistura de 2 µg de RNA total tratado com DNase I. A esta suspensão foram adicionados 1 µL de *primer* oligo-dT (0,5 µg/µL) e 1 µL de dNTP mix (10 mM cada). A mistura de reação foi incubada a 65° C por 5 minutos e imediatamente transferida para o gelo. Em seguida, foram adicionados 2 µL de *RT Buffer* 10 x (TRIS-HCl 200 mM pH 8,4; KCl 500 mM); 4 µL de MgCl₂ 25 mM; 2 µL de DTT 0,1 M e 40 U de *RNase out* e a mistura de reação foi incubada a 42° C por 2 minutos. A seguir, foram adicionados 50 U da enzima *SuperScript II RT* (Invitrogen) e a transcrição reversa foi realizada a 42°C durante 50 minutos. A reação de transcrição foi inativada por incubação a 70°C durante 20 minutos. O RNA molde da molécula híbrida cDNA/RNA foi removido pela adição de 2 U de *RNase H* com incubação a 37°C por 20 minutos.

3.3.3. PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-PCRq)

As reações de amplificação foram realizadas no equipamento IQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), com a utilização do fluoróforo *SYBR-green* (Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG – Invitrogen). Para cada triplicata de reação foi preparada uma mistura de reação contendo 0,7 µL (10 µM) de cada *primer* direto e reverso, 17,5 µL de Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG, 13,1 µL de água-Milli-Q e, por último, foi adicionado 3 µL de cDNA fita simples de folha ou fruto (flavedo) de citros (20 ng/µL). O volume

final foi transferido para 3 diferentes poços da placa de PCR (cerca de 10 µL por poço) a placa foi selada com adesivo (Microseal 'B' Film – Bio-Rad) e colocada no equipamento de PCR em Tempo Real. A cada conjunto de primers foram adicionadas reações controles, sem o cDNA (*NCT – no template controls*). Esse procedimento garantiu que a fluorescência emitida não estava sendo gerada por amplificações inespecíficas. Todas as reações foram estabelecidas a uma temperatura de pré-incubação de 94°C por 5 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95° C por 15 segundos, pareamento a 58°C (exceto para MAPK WIPK - *Contig 93* - 63°C) por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Os dados foram coletados na forma de emissão de fluorescência (Ct) e visualizados em forma de curva.

Foram realizadas três repetições para cada reação de amplificação (par de *primers* + cDNA) e controle negativo (água em substituição ao cDNA) e foram utilizados três cDNAs diferentes de cada tratamento. A especificidade dos *primers* foi avaliada pela visualização dos produtos amplificados em gel de agarose 1 %. O método escolhido para quantificação dos resultados foi o de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ proposto por Livak e Schmittgen (2001), o qual envolve a quantificação do gene de interesse em relação a um gene controle “constitutivo”, que neste estudo foi a β -actina. Para este tipo de quantificação, o valor médio obtido do ciclo limite (*Ct, cycle threshold*) de cada amostra é utilizado para se determinar o ΔCt (Ct do gene alvo – Ct β -actina). A quantificação relativa é obtida através do cálculo da $\Delta\Delta Ct$ [ΔCt gene alvo (na interação citros-pinta preta) - ΔCt gene no tratamento controle (folha sadia)], obtendo-se assim, a razão de expressão de um gene em relação ao outro (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Busca de sequencias de citros *in silico*

Para se proteger contra a invasão de patógenos as plantas utilizam mecanismos de defesa pré-existentes, como também mecanismos que são induzidos. Os mecanismos de defesa induzidos geralmente incluem a geração de espécies reativas de oxigênio, a ativação de genes de defesa e uma rápida e localizada morte celular (*Hypersensitive Response* – HR) (MARTIN, 1999). A ativação deste tipo de defesa é iniciada pelo reconhecimento do patógeno pela planta, o qual é mediado pela interação gene-a-gene entre o produto do gene de resistência da planta (gene *R*) e o gene de avirulência do patógeno (*Avr*) ou seus elicitores (DANGL; JONES, 2001). Os sinais gerados de tal interação são traduzidos em respostas celulares através de muitas rotas interligadas (MARTIN, 1999), sendo a cascata de MAPKs (mitogen-activated protein kinases) uma dessas rotas (ZHANG; KLESSIG, 2001), desencadeando respostas de defesa.

Neste trabalho foi utilizado a base de dados do CitEST (ESTs de Citros, desenvolvido no Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’, Cordeirópolis - SP) para identificar genes relacionados aos mecanismos de defesa de citros. Este banco produziu até o momento 242 mil sequencias, as quais foram obtidas de 33 bibliotecas preparadas a partir de 9 espécies cítricas (*Citrus sinensis*, *C. reticulata*, *C. limonia*, *C. aurantifolia*, *C. aurantium*, *C. limettiodes*, *C. latifolia*, *C. sunki* e *Poncirus trifoliata*). Já no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) estão depositadas aproximadamente 185 mil sequencias de *Citrus sp* e 29 mil de *Poncirus sp* predominantemente.

Utilizando-se de buscas por palavras chaves e por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) de sequencias de genes relacionados à defesa contra patógenos em plantas depositadas no NCBI, contra o banco de dados do CitEST foi identificado o total de 7635 sequencias, as quais produziram 720 contigs e 641 singletons com o programa CAP3 (Contig Assembly Program-Third generation) (HUANG; MADAN, 1999). Nas Tabelas 2 a 6 e Anexo 2 são apresentados os números de *contigs* e *singletons* de citros que codificam supostas proteínas relacionadas aos genes *R*, aos genes requeridos pelos genes *R*, as MAP kinases e outras diretamente relacionadas a HR e genes de defesa, e a SNF1 que foram identificados nas bibliotecas desenvolvidas no CitEST.

4.1.1 Genes de resistência (genes *R*)

Numerosos genes *R* foram clonados de uma ampla variedade de espécies de plantas, incluindo *Arabidopsis thaliana*, linho (*Linum usitatissimum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), beterraba (*Beta vulgaris*), maçã (*Malus domestica*), arroz (*Oryza sativa*), cevada (*Hordeum vulgare*) e milho (*Zea mays*). A busca no banco de dados do CitEST por palavras chaves e por BLAST utilizando sequencias depositadas no *Genbank* contra o banco de dados do CitEST resultou na identificação de 1.300 sequencias relacionadas aos genes *R* (GUIDETTI-GONZALEZ; CARRER, 2007). Estas sequencias formaram 259 *contigs* e 332 *singletons* após a clusterização e por BLAST supostos genes *R* de diferentes classes foram identificados, sendo: 94 NBS-LRR, 30 RLPs, 2 RLKs, duas serina-treonina kinases citoplasmáticas e duas da família de sete-transmembranas (7-TM) proteínas de resistência. Todos os genes identificados são mostrados na Tabela 2 e a seguir serão comentados alguns dos resultados obtidos

4.1.1.1 NBS-LRR

A classe NBS-LRR de genes *R* representa o maior grupo de genes *R*. Genes desse grupo codificam as proteínas citoplasmáticas que contêm um nucleotídeo central de ligação (NBS) e um domínio rico em repetições de leucina (LRR) (TÖR et al., 2004). Associam-se a este grupo as proteínas classificadas como CC-NBS-LRR, que apresentam um domínio amino-terminal “coiled-coil” (CC) (BITTNER-EDDY et al., 2000; McDOWELL et al., 1998), e as TIR-NBS-LRR que apresentam domínio amino-terminal que se assemelha ao domínio de sinalização citoplasmática dos receptores transmembrana Toll e Interleukin-1 (TIR) (WHITHAM et al., 1994; DANGL; JONES, 2001; TÖR et al., 2004).

O sequenciamento completo do genoma de *Arabidopsis* revelou aproximadamente 149 genes de NBS-LRR (MEYERS et al., 2003), enquanto que no genoma de arroz foram identificados aproximadamente 600 genes de NBS-LRR (GOFF et al., 2002). Nenhuma outra função foi atribuída a estes genes do arroz, sugerindo que todos estes membros funcionais devem estar envolvidos na defesa da planta (AYLIFFE; LAGUDAH, 2004).

Tabela 2 - Número de *contigs* e *singletons* encontrados no banco de dados do CitEST, similares a genes *R*

(continua)				
Gene	Número de acesso (<i>Genbank</i>)	Melhor e-value	Número <i>contigs</i> *	Número <i>singletons</i>
NBS-LRR/NBS/LRR				
AIG1	AAM65167 <i>Arabidopsis thaliana</i>	e-120	2	3
B8	AAK61315 <i>Phaseolus vulgaris</i>	3e-29	0	1
B11	AAK61320 <i>Phaseolus vulgaris</i>	3e-18	1	1
cD7	AAD13036 <i>Phaseolus vulgaris</i>	1e-17	0	3
cD8	AAD13037 <i>Phaseolus vulgaris</i>	3e-17	1	2
clone 82-4	AAO89149 <i>Gossypium barbadense</i>	6e-30	0	1
clone 409	AAL00995 <i>Theobroma cacao</i>	2e-33	0	1
Ctv	AAN62335; AAN62348; AAN62350; AAN62351; AAN62352; AAN62353 <i>Poncirus trifoliata</i>	0.0	28 (C201; C250)	35
I2	AAD27815 <i>Lycopersicon esculentum</i>	3e-30	0	3
I2C-1	AAB63274 <i>Lycopersicon esculentum</i>	2e-32	0	2
I2C-2	AAB63275 <i>Lycopersicon esculentum</i>	3e-17	0	2
I2C-5	AAL01986 <i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>	1e-28	0	2
I2GA-SH194-2	AAW48302 <i>Solanum tuberosum</i>	2e-30	1	0
J71	AAK61321 <i>Phaseolus vulgaris</i>	9e-41	1	0
J78	AAK61318 <i>Phaseolus vulgaris</i>	2e-10	0	1
KR1	AF327903 <i>Glycine max</i>	6e-35	1	1
KR4	AAO15846 <i>Glycine max</i>	1e-14	1	0
MHD30	AF369833 <i>Vitis vinifera</i>	2e-51	0	2
MHD106	AAM21288 <i>Vitis vinifera</i>	2e-28	0	3
MsR1	AAN62760 <i>Medicago sativa</i>	2e-43	2	0
PM3b	BAD53385 <i>Oryza sativa</i>	2e-19	1	0
Pt3	AAN08169 <i>Citrus grandis</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>	2e-66	1	0
Pt6	AAN08166 <i>Citrus grandis</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>	2e-57	1	0
Pt14	AAN08168 <i>Citrus grandis</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>	3e-28	0	1
Pt19	AAN08179 <i>Citrus grandis</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>	7e-34	0	1
RCa2	AAO38214 <i>Manihot esculenta</i>	1e-27	0	3
RGA	CAD56833 <i>Lens culinaris</i>	7e-39	2	1
RGA-II24	AF516646 <i>Malus prunifolia</i>	2e-12	0	1
RGA s-reg19	CAD45035 <i>Hordeum vulgare</i>	2e-16	1	2
rga S-120	AJ507100 <i>Hordeum vulgare</i>	1e-17	1	0
rga S-226	CAD45027 <i>Hordeum vulgare</i>	6e-13	0	2
rga S-9201	CAD45029 <i>Hordeum vulgare</i>	9e-46	3	5
RGA1	AAP45163 <i>Solanum bulbocastanum</i>	e-106	1	0
RGA2	CAA72178 <i>Arabidopsis thaliana</i>	e-114	1	0
RGA2	AAP86601 <i>Solanum bulbocastanum</i>	6e-14	0	3
RGA3	AAP45165 <i>Solanum bulbocastanum</i>	1e-52	1	1
RGA4	AAP45166 <i>Solanum bulbocastanum</i>	2e-12	0	3
RGA 9	AAU89643 <i>Poncirus trifoliata</i>	5e-31	0	1
RGA 22	AY746418 <i>Poncirus trifoliata</i>	8e-19	1	0
RGC1b	AF017751 <i>Lactuca sativa</i>	4e-34	4 (C197)	5
RGC2	AAQ72576 <i>Lactuca sativa</i>	6e-54	5	6
RGC2a	AF017752 <i>Lactuca sativa</i>	8e-11	0	2

Tabela 2 - Número de *contigs* e *singletons* encontrados no banco de dados do CitEST, similares a genes *R*

(continuação)

Gene	Número de acesso (<i>Genbank</i>)	Melhor e-value	Número <i>contigs</i> *	Número <i>singletons</i>
RGC2B	AAD03156 <i>Lactuca sativa</i>	7e-11	0	1
RGC2J	AAD03671 <i>Lactuca sativa</i>	9e-11	0	1
RGC2K	AAD03672 <i>Lactuca sativa</i>	4e-27	0	4
RGC2K	AAP44460 <i>Lactuca serriola</i>	4e-22	2	0
RGC20	AAD03673 <i>Lactuca sativa</i>	9e-28	0	4
RGH1	AAO37645 <i>Manihot esculenta</i>	1e-31	3	4
RGH1	BAD08985 <i>Oryza sativa</i>	5e-25	0	3
RGH2	AAO37646 <i>Manihot esculenta</i>	7e-33	0	1
RPc	AAS77675 <i>Quercus suber</i>	5e-81	21 (C194)	4
RPH8A	BAC15497 <i>Oryza sativa</i>	2e-11	0	1
Rsv3	AAL76166 <i>Glycine max</i>	4e-58	1	2
SIVe1	AAP20229 <i>Solanum lycopersicoides</i>	2e-29	0	1
Ve1	AAK58682 <i>Lycopersicon esculentum</i>	9e-28	0	2
Ve2	XP_550023 <i>Oryza sativa</i>	3e-75	1 (C113)	0
YR1	AAN03738 <i>Oryza sativa</i>	3e-27	0	1
YR5	AAN03740 <i>Oryza sativa</i>	5e-12	0	1
YR9	AAK93796 <i>Oryza sativa</i>	3e-12	0	1
3gG2	AY518517 <i>Glycine Max</i>	2e-33	1	1
5gG3	AY518518 <i>Glycine Max</i>	2e-81	3	0
11P31	AAN08158 <i>Citrus grandis</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>	8e-41	1 (C235)	1
	BAB02054 <i>Arabidopsis thaliana</i> leucine-rich repeat disease resistance protein-like	3e-43	0	1
	AAO00824; BAB10347; T46170 <i>Arabidopsis thaliana</i> (disease resistance protein)	9e-16	0	3
	AAD50010; AAG51872; AAG51873; AAF01520; AAO50553; BAC42094; CAB40943 <i>Arabidopsis thaliana</i> (putative disease resistance protein)	4e-91	2	8
	CAA06201 <i>Glycine Max</i> (resistance protein)	6e-12	0	1
	AAG21897; NP_915900 <i>Oryza sativa</i> (putative resistance protein)	5e-15	0	2
	NP_908793 <i>Oryza sativa</i> (putative stripe rust resistance protein)	6e-10	0	1
	AAF78445 <i>Arabidopsis thaliana</i>	e-122	1	9
CC-NBS-LRR				
ADR1	NP_195056 <i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	2 (C216; C219)	2
B149	AAR29073 <i>Solanum bulbocastanum</i>	3e-36	0	1
clone	Ha- AY490797 <i>Helianthus annuus</i>	6e-95	1	0
NTIR3B				
MLA6	NP_919661 <i>Oryza sativa</i>	5e-10	0	1
RPG1-B	AAR19097 <i>Glycine max</i>	e-108	1	1
RPM1	AAD41050 <i>Arabidopsis lyrata</i>	3e-12	0	1
RPM1	AAT09451 <i>Prunus persica</i>	e-102	2	0
RPP8	AAP82810 <i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	5	2
RPP13	NP_190237 <i>Arabidopsis thaliana</i>	e-158	8	10

Tabela 2 - Número de *contigs* e *singletons* encontrados no banco de dados do CitEST, similares a genes *R*

(continuação)				
Gene	Número de acesso (<i>Genbank</i>)	Melhor e-value	Número <i>contigs</i> *	Número <i>singletons</i>
RPS2	AAK96709 <i>Arabidopsis thaliana</i> ; AAM90858 <i>Arabidopsis lyrata</i> ; AAF19803 <i>Brassica oleracea</i>	1e-13	0	3
RPS2	BAD53266 <i>Oryza sativa</i>	4e-37	2	0
StEIG-A51	AB124833 <i>Solanum tuberosum</i>	3e-44	2	1
TIR-NBS-LRR				
Bs4	AAR21295 <i>Lycopersicon esculentum</i>	1e-63	1	0
LM6	AAG09951 <i>Glycine max</i>	3e-23	0	1
L20a	AAG48132 <i>Glycine max</i>	6e-12	0	1
MRGH63	AAO45749 <i>Cucumis melo</i>	1e-29	1	0
N	CAA16928; CAB40942; BAB08447; BAB11635 <i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	20 (C122)	12
N	AAT37497; BAD12594 <i>Nicotiana tabacum</i>	e-104	3	1
NBS7	AAL07542 <i>Helianthus annuus</i>	2e-22	1	0
NBS9	AAL07544 <i>Helianthus annuus</i>	7e-14	0	1
NL25	CAA08797 <i>Solanum tuberosum</i>	6e-58	0	1
PU3	AAL07535 <i>Helianthus annuus</i>	9e-30	0	1
RPP1	CAB96660 <i>Arabidopsis thaliana</i>	2e-43	1	1
RPP1-WsA	AAC72977 <i>Arabidopsis thaliana</i>	2e-12	0	1
RPP1-WsB	NP_197270 <i>Arabidopsis thaliana</i>	3e-50	0	3
RPP5	CAB40943 <i>Arabidopsis thaliana</i>	4e-72	3	1
RPS4	BAB11393 <i>Arabidopsis thaliana</i>	2e-42	6	5
RRS1	Q9FH83 <i>Arabidopsis thaliana</i>	7e-17	0	1
ry-1	CAC82811 <i>Solanum tuberosum</i>	2e-61	3	2
R4	AAQ93076 <i>Malus baccata</i>	4e-45	0	1
R11	AAQ93077 <i>Malus x domestica</i>	9e-70	1	0
	NP_176305 <i>Arabidopsis thaliana</i> (disease resistance protein (TIR class))	5e-82	3	2
RLP				
Cf-2.1	BAC22244 <i>Oryza sativa</i>	4e-86	3	8
Cf-2.1	T10504 <i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>	4e-54	0	14
Cf-2.2	AAC15780 <i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>	e-129	7 (C204)	1
Cf-2	BAB64604 <i>Oryza sativa</i>	6e-30	0	3
Cf2/Cf5	CAD42634 <i>Hordeum vulgare</i>	9e-10	0	1
Cf2/Cf5	NP_917533 <i>Oryza sativa</i>	2e-11	0	1
Cf-4	CAA05268 <i>Lycopersicon hirsutum</i>	2e-26	1	0
Cf-4A	CAA73187 <i>Lycopersicon esculentum</i>	2e-37	1	0
Cf-5	AAN15323 <i>Arabidopsis thaliana</i>	e-166	1	1
Cf-5	AAC78591 <i>Lycopersicon esculentum</i>	1e-65	7 (C200)	5
Cf-9	CAA05274 <i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>	2e-54	1	3
Cf-9	AAP03881 <i>Nicotiana tabacum</i>	9e-31	0	3
Cf-9	BAD54033 <i>Oryza sativa</i>	1e-38	2	0
EILP	BAA88636 <i>Nicotiana tabacum</i>	4e-38	2	0
Eix1	AY359965 <i>Lycopersicon esculentum</i>	1e-61	1 (C4)	0
Eix2	AY359966 <i>Lycopersicon esculentum</i>	4e-72	1	0
HcrVf1	CAC40825 <i>Malus floribunda</i>	e-104	2	4
HcrVf2	CAC40826 <i>Malus floribunda</i>	7e-92	5	4
HcrVf3	CAC40827 <i>Malus floribunda</i>	e-111	3	3
Hcr2-0A	AAC78592 <i>Lycopersicon esculentum</i>	8e-46	1	4

Tabela 2 - Número de *contigs* e *singletons* encontrados no banco de dados do CitEST, similares a genes *R*

(conclusão)

Gene	Número de acesso (<i>Genbank</i>)	Melhor e-value	Número <i>contigs</i> *	Número <i>singletons</i>
Hcr2-0B	AAC78593 <i>Lycopersicon esculentum</i>	4e-55	2	6
Hcr2-2A	AAC78594 <i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>	6e-25	1	0
Hcr2-5B	AAC78595 <i>Lycopersicon esculentum</i>	5e-34	1	0
Hcr2-5D	AAC78596 <i>Lycopersicon esculentum</i>	9e-76	4 (C184; C202)	8
Hcr9-4C	CAA05267 <i>Lycopersicon hirsutum</i>	2e-66	1	3
Hcr9-9D	CAA05275 <i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>	9e-30	0	1
Hcr9-NL0D	AAD13301 <i>Lycopersicon esculentum</i>	6e-95	1	2
Hcr9-SC0A	AAD13305 <i>Lycopersicon esculentum</i>	1e-13	0	1
Peru 2	AAV41396 <i>Lycopersicon peruvianum</i>	8e-34	1	0
RPP27	CAE51864 <i>Arabidopsis thaliana</i>	e-101	15 (C9; C125; C133; C198)	14
RLK				
Xa21	AAU44210; BAD69455; NP_919177; XP_464646; XP_464648; XP_464649; XP_468209; XP_481680 <i>Oryza sativa</i>	e-125	22 (C6; C23; C137; C191; C233)	19
Xa26	AY364476 <i>Oryza sativa</i>	e-153	5 (C199)	1
serina-treonina kinase citoplasmática				
Pto	AAQ82657 <i>Capsicum chinense</i>	7e-37	1 (C237)	0
Pto	AAF76306 <i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>	6e-66	2	0
7-TM				
Mlo	AAM45040; NP_201398; NP_565902; O49621 <i>Arabidopsis thaliana</i>	2e-59	1 (C236)	3
Mlo	AAG46114; AAN17391 <i>Oryza sativa</i>	2e-61	1	4

* Entre parênteses estão representados somente os *contigs* (C) comentados nos resultados.

O *Vírus da tristeza dos citros* (CTV) é um dos mais importantes patógenos de citros (BERNET; BRETÓ; ASINS, 2004). Um único gene dominante da classe NBS-LRR, *Ctv*, fornece um amplo espectro de resistência a CTV em *Poncirus trifoliata* L. Raf. (GMITTER et al., 1996). No banco de dados do CitEST 28 *contigs* e 35 *singletons* com similaridade ao gene *Ctv* (Tabela 2) foram observados em diversas bibliotecas. Sendo os *contigs* C250 e C201 os que apresentaram expressão específica em condição de infecção por patógeno. O *contig* C250 (8e-42) apresenta expressão específica em biblioteca de casca de *P. trifoliata* infectada por *Phytophthora* (Figura 2). Enquanto que o *contig* C201 (8e-49) tem padrão de expressão exclusivo em folhas infectadas por *X. fastidiosa* (de *C. sinensis* e *C. reticulata*) (Figura 2). Estes resultados sugerem a presença do gene *Ctv* em espécies de *Citrus* e um possível papel na resistência a doença contra patógenos, devido à presença de sequências de bibliotecas infectadas.

As proteínas putativas Pt19 e 11P31 de resistência à doença de *Citrus grandis* x *Poncirus trifoliata* (DENG et al., 2000) também foram identificadas no CitEST. Os dois *singletons* relacionados a estas proteínas são de bibliotecas de folha de *C. reticulata* infectadas por *X. fastidiosa*, enquanto o *contig* que representa (C235) a proteína 11P31 contém duas sequencias, uma de biblioteca genômica de *C. sinensis* e a outra de folha de *P. trifoliata* infectada pelo *Vírus da tristeza dos citros* (Figura 2), sugerindo uma possível expressão em condição de infecção em *Poncirus*.

Figura 2 - Dados transformados representando a abundância relativa de ESTs por biblioteca, expressa em 10^4 sequencias, em *contigs* relacionados a classe NBS-LRR. CA: *Citrus aurantium*; CS: *Citrus sinensis*; CR: *Citrus reticulata*; PT: *Poncirus trifoliata*; C1: cDNA de folha; C2: cDNA da casca; G8: "shotgun" do genoma; 101: infectado com *Xylella fastidiosa*; 102: 30 dias após infecção com *X. fastidiosa*; 103: 60 dias após infecção com *X. fastidiosa*; 301: infectado com *Phytophthora*; 901: infectado com o *Vírus da tristeza dos citros*; 002: material sadio do campo; 000: genoma

A existência de motivos conservados nos genes de resistência permite a confecção de *primers* degenerados e assim o isolamento de genes de resistência a doenças análogos (RGAs) (NOIR et al., 2001) e genes de resistência homólogos (RGHs) (CANNON et al., 2002) por PCR

do genoma. No CitEST foram identificados *contigs* e *singletons* apresentando similaridades a RGAs e RGHs (Tabela 2), sendo o *contig* C197 similar a RGC1b (NBS-LRR) de *Lactuca sativa* e apresentando expressão exclusiva em biblioteca de folha de *C. reticulata* infectada por *X. fastidiosa* (30 dias após infecção) (Figura 2), indicando assim um possível papel na defesa dessa espécie cítrica.

No banco de dados do CitEST, foram identificados 21 *contigs* e 4 *singletons* similares à proteína de resistência (R_{Pc}) de *Quercus suber* (Tabela 2), sendo o *contig* C194 (1e-42) o que apresentou suposto envolvimento com relação à resistência a doenças, já que em *C. reticulata* apresenta maior expressão em biblioteca de folha infectada por *X. fastidiosa* (Figura 2).

Os genes *Ve1* e *Ve2* de tomate conferem resistência ao fungo *Verticillium albo-atrum* em batata (KAWCHUK et al., 2001). Um *contig* (C113), com similaridade (3e-75) a proteína *Ve2* de arroz foi identificada no CitEST. Este *contig* é formado exclusivamente por sequências de bibliotecas de folha de *C. sinensis* infectadas por *X. fastidiosa* (Figura 2), sugerindo função na defesa contra patógeno.

A Proteína ADR1 pertence a classe CC-NBS-LRR de genes *R*. A super-expressão dessa proteína produz ativação constitutiva de genes de defesa dependentes de ácido salicílico e origina amplo espectro de resistência à doenças em *Arabidopsis* (GRANT et al., 2003). Este mutante também apresentou aumento de tolerância à seca sugerindo significativa sobreposição nas vias de sinalização entre estresse biótico e abiótico (CHINI et al., 2004). Dois *contigs* foram identificados no banco de dados do CitEST, C219 e C216, que estão estreitamente relacionadas a esta proteína (Tabela 2), mas as sequências presentes neles são predominantemente de tecidos saudáveis. O *contig* C219 (e-116) é composto por cinco sequências de biblioteca de casca de *Poncirus trifoliata* e três sequências de biblioteca de fruto e uma de biblioteca de folha de *Citrus reticulata*. O *contig* C216 (e = 0.0) apresenta 12 sequências das quais quatro são de biblioteca de fruto de *C. reticulata* e *C. sinensis* e seis são de bibliotecas de folha de *C. reticulata* e *P. trifoliata*. O alinhamento destes *contigs* com a proteína ADR1 de *Arabidopsis* (NP_195056) mostra os motivos conservados da região NBS (P-loop, kinase2, RNBS-A, GLPL, RNBS-D, QH₂VDV, TVS e PKAE) (MEYERS et al., 1999; CANNON et al., 2002; GRANT et al., 2003; CHINI; LOAKE, 2005) como apresentado na Figura 3. Apenas a família de proteína ADR1 contém uma glutamina (Q) em vez de uma metionina (M) como o terceiro resíduo do motivo M₂H₂VDV, e é referida como QH₂VDV nesta família (CHINI; LOAKE, 2005). Os motivos TVS e

A proteína N, ou melhor, o complexo contendo a proteína N, especificamente reconhece a proteína p50 de TMV (*Tobacco mosaic virus*) e desencadeia a cascata de transdução de sinal, induzindo a HR, restringindo a propagação do vírus e inicia a SAR (resistência sistêmica adquirida) (LIU; SCHIFF; DINESH-KUMAR, 2004). No CitEST foram identificados 23 *contigs* e 13 *singletons* similares à proteína N (TIR-NBS-LRR) de *Arabidopsis* e *Nicotiana tabacum* (Tabela 2). Sendo o *contig* C122 (3e-30) o que apresenta um padrão de expressão específico em bibliotecas de folha de *C. sinensis* infectadas com *X. fastidiosa* (Figura 2), sugerindo um possível papel desta proteína, similar à proteína de defesa viral, só que na defesa de *C. sinensis* contra bactérias.

Levando-se em conta os *contigs* e *singletons* identificados no CitEST de supostas proteínas NBS-LRR em citros, podemos inferir que mais genes sejam identificados a medida que novas bibliotecas envolvendo diferentes interações de citros-patógenos forem sequenciadas. E como foram identificados *contigs* apresentando sequencias conferindo expressão diferencial em bibliotecas infectadas por patógenos, supõem-se que também estejam envolvidos em mecanismos de defesa de citros já que em arroz esta classe de genes está comprovadamente envolvida na resistência (AYLIFFE; LAGUDAH, 2004). Estudos funcionais são necessários para a confirmação dessas e de outras supostas proteínas na defesa contra patógenos em espécies cítricas.

4.1.1.2 RLPs

Os genes *Cf* de tomate conferem resistência ao fungo patogênico *Cladosporium fulvum* e pertence ao grupo RLP de genes *R* (JOOSTEN; DE WIT, 1999). No banco de dados do CitEST foram identificados *contigs* e *singletons* relacionados a uma ampla variedade de genes *Cf* (Tabela 2). O *contig* C204, similar (2e-54) a Cf-2.2 de *L. pimpinellifolium*, mostrou expressão exclusivamente em bibliotecas infectadas por *X. fastidiosa* (*C. sinensis* e *C. reticulata*) (Figura 4), o que pode indicar expressão específica em condição de infecção por bactéria.

Figura 4 - Dados transformados representando a abundância relativa de ESTs por biblioteca, expressa em 10^4 sequências, em *contigs* relacionados a classe RLPs. CS: *Citrus sinensis*; CR: *Citrus reticulata*; C1: cDNA de folha; 101: infectado com *Xylella fastidiosa*; 102: 30 dias após infecção com *X. fastidiosa*; 103: 60 dias após infecção com *X. fastidiosa*

O *contig* C200 ($8e-61$) é exemplo da proteína Cf-5 de *L. esculentum* (Tabela 2) e mostra padrão de expressão espécie e tecido específicos em folha de *C. reticulata* infectada por *X. fastidiosa* (Figura 4), indicando um possível papel na defesa em *C. reticulata*.

Os genes *Cf-4* e *Cf-9* são membros da família Hcr9 (homólogos ao gene de resistência a *C. fulvum*, *Cf-9*) (PARNISKE et al., 1997; THOMAS et al., 1997; TAKKEN et al., 1999), enquanto os genes *Cf-2* e *Cf-5* pertencem ao subgrupo Hcr2 (DIXON et al., 1996, 1998). Supostas proteínas relacionadas aos grupos Hcr2 e Hcr9 de espécies de *Lycopersicon* foram identificadas no CitEST (Tabela 2). Os *contigs* C184 ($9e-76$) e C202 ($2e-60$) estão relacionados à proteína Hcr2-5D e apresentam expressão específica em biblioteca de folha *C. reticulata* infectada por *X. fastidiosa* (60 dias após infecção) (Figura 4), sugerindo um padrão de expressão espécie e tecido específicos para resistência à doença.

A proteína RPP27 de *A. thaliana* confere resistência ao patógeno *Peronospora parasitica* e apresenta similaridade a proteínas Cf de tomate (TÖR et al., 2004). No CitEST foram

identificados 15 *contigs* e 14 *singletons* relacionados a esta proteína (Tabela 2), sendo que 4 destes *contigs* (C125, e-101; C198, 4e-23; C133, 1e-24 e C9, 5e-46) apresentaram um padrão específico de expressão em bibliotecas de folha de *C. sinensis* e/ou *C. reticulata* infectadas por *X. fastidiosa* (Figura 4). Estes resultados sugerem o envolvimento destas proteínas na resistência a doença em *C. sinensis* e *C. reticulata*.

Os genes *EILP* (TAKEMOTO et al., 2000), *EIX1* e *EIX2* (RON; AVNI, 2004) também apresentam similaridade aos genes de resistência *Cf* de tomate, e também foram identificados no CitEST (Tabela 2). O *contig* C4 é similar a *EIX1* (1e-61) e apesar desta proteína ser relacionada a resistência a fungos em outras espécies (RON; AVNI, 2004) no banco de dados de ESTs de citros este *contig* é formado por sequências vindas exclusivamente de bibliotecas infectadas pela bactéria *X. fastidiosa* (folha de *C. sinensis*) (Figura 4), sugerindo possível papel também na defesa contra patógeno bacteriano.

4.1.1.3 RLKs

Os genes *Xa21* e *Xa26* de arroz conferem resistência a um amplo espectro de raças do patógeno bacteriano *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e pertencem a classe RLK (LI et al., 2001; SUN et al., 2004). A atividade de resistência do gene *Xa21* é controlada durante o desenvolvimento; essa resistência aumenta progressivamente sendo susceptível no estágio juvenil até a completa resistência na fase adulta (SUN et al., 2004), enquanto *Xa26* confere resistência a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em ambos os estágios juvenil e adulto em arroz (YANG et al., 2003) e é constitutivamente expresso (SUN et al., 2004).

No CitEST foram identificados 22 *contigs* e 19 *singletons* similares a *Xa21* distribuídos entre as diferentes bibliotecas. Os *contigs* C6 (2e-76), C23 (e-111), C137 (2e-50) e C191(8e-52) apresentam maior expressão em bibliotecas de folha infectadas por *X. fastidiosa* (*C. sinensis*) (Figura 5), indicando possível ação na defesa. Enquanto que o *contig* C233 (6e-56) apresentou expressão exclusivamente em folha de *P. trifoliata* infectada pelo *Vírus da tristeza dos citros* (Figura 5). E como o gene *Xa21* confere resistência a bactéria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em arroz (SONG et al., 1995), além da provável resistência a patógeno bacteriano em citros, os

resultados obtidos sugerem suposta função também na defesa contra doença viral em *P. trifoliata*.

No banco de dados do CitEST foram identificados 5 *contigs* e 1 *singleton* relacionados a *Xa26*. As sequencias estão distribuídas dentro das diferentes bibliotecas, sendo o *contig* C199 (4e-75) o que apresentou padrão de expressão exclusivo em folha de *C. sinensis* e *C. reticulata* infectadas por *X. fastidiosa* (Figura 5), indicando possível relação na defesa contra patógeno bacteriano, como ocorre em arroz (SUN et al., 2004).

Figura 5 - Dados transformados representando a abundância relativa de ESTs por biblioteca, expressa em 10^4 sequencias, em *contigs* relacionados a classe RLKs. CS: *Citrus sinensis*; CR: *Citrus reticulata*; PT: *Poncirus trifoliata*; C1: cDNA de folha; C3: cDNA de fruto; 101: infectado com *Xylella fastidiosa*; 102: 30 dias após infecção com *X. fastidiosa*; 103: 60 dias após infecção com *X. fastidiosa*; 901: infectado com o *Vírus da tristeza dos citros*; 701: fruto no estágio 2 de desenvolvimento (TARGON et al., 2007)

4.1.1.4 Serina-treonina kinase citoplasmática

O gene *Pto* confere resistência a raças de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* que expressam o gene de avirulência *avrPto* e foi introduzido na espécie cultivada *L. esculentum* a partir da espécie relacionada *L. pimpinellifolium* (MARTIN et al., 1993). O gene *Pto* é relativamente pequeno, sendo que a ORF (“open reading frame” - quadro aberto de leitura) consiste de 963 nucleotídeos, não apresenta introns e codifica uma serina-treonina kinase funcional (MARTIN et al., 1993; LOH; MARTIN, 1995). No banco de dados de ESTs de citros foram observados 3 *contigs* com similaridade a proteína Pto (Tabela 2). Entre estes *contigs* o C237 apresentou similaridade (7e-37) a proteína Pto de *Capsicum chinense*. Este *contig* apresentou padrão exclusivo de expressão em folha de *P. trifoliata* infectada com o Vírus da tristeza dos citros (2 sequencias), sugerindo que nesta espécie existe uma possível função na defesa contra patógeno, como ocorre em *Capsicum chinense*.

4.1.1.5 Sete-transmembranas (7-TM) proteínas de resistência

MLO é uma proteína de resistência de cevada que não contem domínios estruturais reconhecíveis semelhantes aos produtos de outras classes de genes *R* (LIU; WANG, 2002), pertencendo a classe de sete-transmembranas (7-TM) proteínas de resistência. Na espécie dicotiledônea *Arabidopsis* e na monocotiledônea cevada, a presença de isoformas específicas da família de proteínas MLO é necessária para o sucesso da invasão da célula do hospedeiro por espécies de patógenos fúngicos (PANSTRUGA, 2005). Genótipos de cevada que não apresentam MLO funcional, devido tanto à variação genética natural (PIFFANELLI et al., 2004) ou por lesões induzidas no gene *Mlo* (PIFFANELLI et al., 2002), são resistentes a todos os isolados conhecidos do patógeno fúngico. No banco de dados do CitEST foram observados 2 *contigs* e 4 *singletons* (Tabela 2) com similaridade a proteína MLO de *Arabidopsis* e arroz. O *contig* C236 (2e-59), relacionado à proteína MLO de *Arabidopsis* é formado por duas sequencias, sendo uma delas originada de biblioteca de folha de *P. trifoliata* infectada pelo Vírus da tristeza dos citros e a outra de biblioteca de fruto de *C. sinensis*. Entre os *singletons*, um deles (2e-61) é derivado de

folha de *C. sinensis* infectada por *X. fastidiosa*, sugerindo uma suposta ação na resposta de defesa.

4.1.2 Genes requeridos pelos genes *R*

A expressão dos genes *R* é firmemente regulada para impedir a ativação inapropriada de respostas de defesa local e sistêmica (NOUTOSHI et al., 2005). Esta regulação é feita pelos genes requeridos para o funcionamento da resistência mediada pelos genes *R* e estudos genéticos têm sido usados extensivamente para identificar estes genes, particularmente os tipos pertencentes às classes CC-NBS-LRR e TIR-NBS-LRR (DANGL; JONES, 2001; ELLIS; DODDS; PRYOR, 2000; HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997).

Mutações em *Arabidopsis* levou a identificação de componentes de sinalização que ocorrem anteriormente ao funcionamento das proteínas *R* (GLAZEBOOK, 2001). No banco de dados do CitEST foram identificados 290 sequencias similares a genes que são necessários para o funcionamento dos genes *R* (*EDR1*, *EDS1*, *EDS5*, *HIN1*, *NDR1*, *NPR1*, *PAD4*, *PBS1*, *RAR1*, *RIN4* e *SGT1*), os quais formaram 45 *contigs* e 30 *singletons* (Tabela 3). Alguns destes *contigs* estão detalhados a seguir conforme sua interação nos mecanismos de defesa de citros.

Estudos com mutantes *edr1* de *Arabidopsis* sugerem que eles são mais sensíveis às condições ambientais do que o tipo selvagem e que resistência à doença é uma das funções da proteína EDR1 (TANG; CHRISTIANSEN; INNES, 2005). Pesquisas no CitEST resultou na identificação de *contigs* e *singletons* (Tabela 3) relacionados a proteínas EDR1 de *A. thaliana*, *Hordeum vulgare* e *O. sativa*. Dois dos *contigs* (C5, 8e-31 e C74, 8e-31) parecem estar relacionados à resistência a doença, apresentando sequencias exclusivamente de bibliotecas de folha de *C. sinensis* e *C. reticulata* infectada por *X. fastidiosa* (Figura 6). Estes resultados indicam uma condição específica de expressão e reforça a evidência do envolvimento destas proteínas na resistência a doença em plantas cítricas.

O gene *EDS1* (“Enhanced Disease Susceptibility 1”) codifica uma proteína com similaridade a lipases (FALK et al., 1999), e é necessário para a resistência mediada por genes *R* da classe TIR (LIU et al., 2002a). No único *contig* relacionado a EDS1 (C1, e = 0.0), as sequencias originadas de bibliotecas de folha de *C. sinensis* e *C. reticulata* apresentam tendência

de expressão em condição de infecção por *X. fastidiosa* (30 dias após infecção) e também em tecido juvenil de *C. sinensis* (Figura 6), indicando possível envolvimento na defesa.

Tabela 3 – Números de *contigs* e *singletons* representando os genes requeridos para a função dos genes *R*

Gene	Número de acesso (<i>Genbank</i>)	Melhor e-value	Número <i>contigs</i> *	Número <i>singletons</i>
EDR1	AAG31143; NP_563824 <i>Arabidopsis thaliana</i>	e-126	3	6
	AAG31142 <i>Hordeum vulgare</i>		2	3
	AAN61142; NP_921612 <i>Oryza sativa</i>		3 (C5; C74)	5
EDS1	AAL85347 <i>Nicotiana benthamiana</i>	0.0	1 (C1)	0
EDS5	AAM63262 <i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	4 (C1)	1
HIN1	AAM67015 <i>Arabidopsis thaliana</i>	3e-76	2 (C1; C2)	1
NDR1	AAN72015 <i>Arabidopsis thaliana</i>	8e-52	1	1
NPR1/NIM1	AAT57638; AAT57639 <i>Lycopersicon esculentum</i>	0.0	3 (C7)	0
	AAT57641 <i>Nicotiana tabacum</i>		5 (C5)	1
	AAS55117 <i>Carica papaya</i> NP_916283 <i>Oryza sativa</i>		2 (C8) 1	0 3
PAD4	NP_190811 <i>Arabidopsis thaliana</i>	9e-58	1	0
PBS1	AAG38109 <i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	2	0
	NP_914952 <i>Oryza sativa</i>		10 (C22; C26)	5
RAR1	AAT40496 <i>Solanum demissum</i>	4e-59	1	0
	AAM62409 <i>Nicotiana tabacum</i>		0	1
RIN4	NP_189143 <i>Arabidopsis thaliana</i>		1	0
SGT1	AAO85509 <i>Nicotiana benthamiana</i>	e-151	2	3
	NP_917765 <i>Oryza sativa</i>		1 (C4)	0

* Entre parênteses estão representados os *contigs* (C) comentados nos resultados.

Como a expressão de *EDS5* induzida por patógeno é prejudicada em mutantes *eds1* e *pad4*, *EDS5* parece funcionar após *EDS1* e *PAD4* na rota de sinalização de defesa (NAWRATH et al., 2002). Entre os *contigs* relacionados à *EDS5*, formados a partir do banco de dados de citros, o *contig* C1 (4e-82) parece ter uma expressão dependente da espécie, enquanto em *C.*

sinensis apresenta expressão em frutos, em *C. reticulata* a expressão ocorre em biblioteca de folha infectada por *X. fastidiosa* (30 dias após infecção) (Figura 6) indicando uma possível função na defesa contra patógeno bacteriano em *C. reticulata*.

Figura 6 - Dados transformados representando a abundância relativa de ESTs por biblioteca, expressa em 10^4 sequências, em *contigs* relacionados aos genes requeridos pelos genes *R*. CA: *Citrus aurantium*; CG: *Citrus aurantifolia*; CS: *Citrus sinensis*; CR: *Citrus reticulata*; PT: *Poncirus trifoliata*; C1: cDNA de folha; C3: cDNA de fruto; 100, e 900: material não infectado; 101: infectado com *Xylella fastidiosa*; 102: 30 dias após infecção com *X. fastidiosa*; 103: 60 dias após infecção com *X. fastidiosa*; 901: infectado com o *Vírus da tristeza dos citros*; 002: material sadio do campo; 003: material sadio de casa-de-vegetação; 650: tecido juvenil; 700, 701, 702, 704 e 705: diferentes estágios de desenvolvimento do fruto (estágios 1, 2, 3, 5 e 6) (TARGON et al., 2007)

O gene de tabaco *HIN1* (“harpin-induced”) é rapidamente ativado por elicitor protéico secretado por patógenos bacterianos de plantas (GOPALAN; WEI; HE, 1996). Os dois *contigs* obtidos (C1 e C2) no CitEST apresentaram tendência de expressão em tecidos infectados, sugerindo resposta de defesa. No *contig* C1 ($3e-76$) esta tendência foi observada em bibliotecas de folha de *C. sinensis* e *C. reticulata* infectadas pela *X. fastidiosa*, enquanto o *contig* C2 ($3e-74$)

apresenta expressão exclusivamente em folha de *P. trifoliata* infectada pelo *Vírus da tristeza dos citros* (Figura 6).

O gene *NDR1* de *A. thaliana* apresenta similaridade de sequência com *HIN1* e está envolvido em alguns mecanismos de resistência mediado por genes *R* em resposta ao ataque de ambos os patógenos bacteriano e fúngico (CENTURY; HOLUB; STASKAWICZ, 1995; CENTURY et al., 1997). No banco de dados do CitEST similaridade a *NDR1* foi observado em apenas 1 *contig* e 1 *singleton* derivados de sequências vindas de bibliotecas não infectadas. Devido a esta observação, a similaridade de sequência a *HIN1* e a tendência de *HIN1* identificado de citros ser expresso em tecidos infectados, estes resultados podem sugerir que em plantas cítricas a função do *NDR1* na defesa, seja executada por *HIN1*. Ou *NDR1* seja expresso em outras interações planta-patógeno que não as sequenciadas no projeto CitEST.

NPR1 atua na ativação da expressão de genes *PR* (relacionados à patogênese) (DESPRÉS et al., 2003). No CitEST foram identificados 11 *contigs* e 4 *singletons* relacionados a *NPR1* (Tabela 3). Entre eles, três *contigs* (C5, C7 e C8) parecem ter relação na defesa contra patógeno devido maior expressão em bibliotecas de folha de *C. reticulada* infectadas com *X. fastidiosa* (Figura 6).

O reconhecimento específico de raças de *Pseudomonas syringae* que expressam o gene de avirulência *avrPphB* requer dois genes em *Arabidopsis*, *RPS5* e *PBS1*. O gene de resistência (*R*) *RPS5* requer a proteína *PBS1* para conferir resistência (SHAO et al., 2003). No CitEST foram identificados 12 *contigs* e 5 *singletons* com similaridade a proteína *PBS1* (Tabela 3). No *contig* C22 (e-101) foi observada uma maior tendência de expressão em biblioteca de folha de *C. sinensis* infectada por *X. fastidiosa*, enquanto que o *contig* C26 (5e-64) apresenta expressão exclusivamente em folha de *C. sinensis* no início da infecção por *X. fastidiosa* (Figura 6), mostrando um padrão espécie-específico de expressão e sugerindo um papel na defesa de *C. sinensis*.

A proteína *SGT1* de *Arabidopsis* tem duas funções na defesa da planta: *SGT1* é um antagonista de *RAR1* para regular negativamente o acúmulo de proteína de resistência antes da infecção, e *SGT1* tem uma função independente de *RAR1* regulando a morte celular programada durante a infecção (HOLT; BELKHADIR; DANGL, 2005). No banco de dados do CitEST foram observados 3 *contigs* e 3 *singletons* relacionados a *SGT1* (Tabela 3). De todos os *contigs* de genes requeridos pelos genes *R* analisados o que apresentou maior expressão em biblioteca

infectada por patógeno foi o C4-SGT1, pois apresentou expressão espécie, tecido e condição específicos, sendo formado por sequências derivadas exclusivamente de casca de *P. trifoliata* infectada por *Phytophthora*, apresentando uma abundância relativa de 17 ESTs/10⁴ ESTs dessa biblioteca, reforçando o suposto envolvimento na defesa de *Poncirus*.

Os resultados que mostram uma tendência de expressão em bibliotecas infectadas, sugerem que sua expressão acontece quando a planta é atacada por um patógeno, o que está de acordo com sua função, junto com os genes de resistência (*R*), podendo acarretar posteriormente na ativação da HR e na resistência a doença.

4.1.3 MAP kinases

Em geral, cada cascata de MAP kinases consiste de pelo menos três proteínas quinases, que intermedeiam reações sequenciais de fosforilação, incluindo a MAPK que é ativada por fosforilação nos resíduos de treonina e tirosina pela quinase anterior MAPK kinase (MAPKK ou MAP2K), que por sua vez é ativada (fosforilada em dois resíduos de serina/treonina) pela quinase anterior MAPKK kinase (MAPKKK ou MAP3K). Esta última quinase é geralmente ativada por uma proteína G, mas em alguns casos, a ativação ocorre pela quinase anterior MAP3K kinase (MAP4K) (CHAMPION; PICAUD; HENRY, 2004).

O sequenciamento completo do genoma de *Arabidopsis* permitiu a identificação de todo o conjunto de componentes das cascatas de MAPKs nesta planta (ICHIMURA et al., 2002). A análise desse genoma identificou supostos genes que devem codificar 20 MAPKs, 10 MAPKKs e mais de 60 MAPKKKs (ICHIMURA et al., 2002; CHAMPION; PICAUD; HENRY, 2004).

Analisando-se os 81 *contigs* e 27 *singletons* resultantes das buscas *in silico* no banco de dados do CitEST formados por sequências com similaridade a MAP kinases e também pela presença do motivo característico (JONAK et al., 2002), foram identificadas pelo menos 15 supostas MAPKs, 3 MAP2Ks, 46 MAP3Ks e 2 MAP4Ks (Figuras 7 a 13). Nesses resultados de MAP kinases não foram incorporados as supostas proteínas onde o motivo característico não chegou a ser sequenciado. Na Figura 7 pode-se observar a diferenciação de dois grupos dentro das MAPKs, um grupo que apresenta o motivo de fosforilação TEY e outro que apresenta o motivo TDY no seu sítio ativo. A principal diferença nas sequências protéicas dos subgrupos

TEY e TDY ocorre no centro do sítio de ativação, que fornece uma plataforma de ligação para o substrato da proteína (HUSE; KURIYAN 2002). Os subgrupos TDY de arroz apresentam de três a quatro inserções extras de aminoácidos perto do sítio de ativação, em comparação com as MAPKs do subgrupo TEY (ROHILA; YANG, 2007). Essas inserções de aminoácidos podem influenciar a especificidade de substrato, mas não são determinantes para a especificidade de ativação por sinais anteriores (JIANG et al. 1997). Na Tabela 4 estão apresentados os números totais de *contigs* e *singletons* relacionados às diferentes MAP kinases (que apresentam ou não o motivo característico) identificados.

Figura 7 - Árvore filogenética (feita pelo programa Vector NTI – AlingX) das MAPKs, diferenciando as sequências que apresentam o motivo de fosforilação TEY das que apresentam o motivo TDY no seu sítio ativo

Figura 8 - Alinhamento das MAPKs que apresentaram o motivo conservado T(E/D)YVxTRWYRAPE(L/V) (sublinhado). Os aminoácidos destacados em amarelo são idênticos em todas as proteínas. Destaque em azul representa os resíduos dos consensos derivados de um bloco de resíduos similares; verde representa resíduos de consensos derivados da ocorrência de mais de 50% de um único resíduo em uma dada posição.

Figura 9 - Alinhamento das MAP2Ks que apresentaram o motivo conservado VGTxxYMSPER (sublinhado). Os aminoácidos destacados em amarelo são idênticos em todas as proteínas. Destaque em azul representa os resíduos dos consensos derivados de um bloco de resíduos similares; verde representa resíduos de consensos derivados da ocorrência de mais de 50% de um único resíduo em uma dada posição.

Figura 10 - Alinhamento das MAPKKs do subgrupo MEKK que apresentaram o motivo conservado G(T/S)Px(W/Y/F)MAPEV (sublinhado). Os aminoácidos destacados em amarelo são idênticos em todas as proteínas. Destaque em azul representa os resíduos dos consensos derivados de um bloco de resíduos similares; verde representa resíduos de consensos derivados da ocorrência de mais de 50% de um único resíduo em uma dada posição.

(139) 139 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 252

C29 (139) VKNWARQILRGIAAYLHGHDPPVIHRDLKCDNIFVNGHLGQVKIGDLGLAAILRGSQHAHSVIGTPEFMAPELYEEDYNELVDIYSFGMCVLEMLTSEYPYSECSNPAQIYKKVT

C56 (127) VKLWCRQILRGLLYLHSHDPPVIHRDLKCDNIFVNGNQGEVKIGDLGLAAILRKSHAHCV-GTPEFMAPEVYEEAYNELVDIYSFGMCILEMVTFEYPYSECTHPAXIYKKVV

C88 (135) IKSWARQILQGLVYLHSDPPQVIHRDLKCDNIFVNGHLGQVKIGDLGLAAILRGSKSAHSVIGTPEFMAPELYEEDYNELVDIYSFGMCVLEMTCEYPYSECANPAQIYKKVT

C59 (111) VKGWARQILSGLIYLHSHDPPVIHRDLKCDNIFVNGNQGEVKIGDLGLATIMEQAN-AKSVIGTPEFMAPELYDENYNELADIYSFGMCMLEMTFEYPYSECRNSAQIYKKVS

O62 (53) LKKWSRQILEGLSYLHSHDPPVIHRDLKCDNIFVNGNQGEVKIGDLGLAAILAQARSAHSVIGTPEFMAPELYEEFYNELVDIYAFGMCLELVTFEYPYVECTNAAQIYKKVT

Consensus(139) VK WARQIL GLIY LHS D P P V I H R D L K C D N I F V N G N Q G E V K I G D L G L A A I L R S S A H S V I G T P E F M A P E L Y E E D Y N E L V D I Y S F G M C V L E M V T F E Y P Y S E C T N P A Q I Y K K V T

Figura 11 - Alinhamento das MAPKKs do subgrupo ZIK que apresentaram o motivo conservado GTPEFMAPE(L/V)Y (sublinhado). Os aminoácidos destacados em amarelo são idênticos em todas as proteínas. Destaque em azul representa os resíduos dos consensos derivados de um bloco de resíduos similares; verde representa resíduos de consensos derivados da ocorrência de mais de 50% de um único resíduo em uma dada posição.

(123) 123 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 236

C7 (60) IATLLRETALKALVYLHFGHIHRDVKAGNILIDSNGAIKLADFGVSACMFDAGDRQSRNTFVGTPCWMAPEVMQQLHGYDFKADIWSFGITALELAHGHPFSKYPPMKVLLM

C36 (123) IGSILKETLKALDYLHRQGHIIHRDVKAGNILLDTNGVVKLADFGVSACMFDTGDRQSRNTFVGTPCWMAPEVLQPGSGYNSKADIWSFGITALELAHGHPFSKYPPMKVLLM

Consensus(123) IASILKETLKAL YLH GHIHRDVKAGNILIDSNG IKLADFGVSACMFD GDRQSRNTFVGTPCWMAPEVLQ GY KADIWSFGITALELAHGHPFSKYPPMKVLLM

Figura 12 - Alinhamento das MAP4Ks que apresentaram o motivo conservado TFGVTPxMAPEV (sublinhado). Os aminoácidos destacados em amarelo são idênticos em todas as proteínas. Destaque em azul representa os resíduos dos consensos derivados de um bloco de resíduos similares; verde representa resíduos de consensos derivados da ocorrência de mais de 50% de um único resíduo em uma dada posição.

Figura 13 - Alinhamento das MAPKKs do subgrupo Raf que apresentaram o motivo conservado GTxx(W/Y)MAPE (sublinhado). Os aminoácidos destacados em amarelo são idênticos em todas as proteínas. Destaque em azul representa os resíduos dos consensos derivados de um bloco de resíduos similares; verde representa resíduos de consensos derivados da ocorrência de mais de 50% de um único resíduo em uma dada posição.

Tabela 4 - Número de *contigs* e *singletons* relacionados às MAP kinases, encontrados no banco de dados do CitEST, organismo ortólogo e número de acesso

(continua)

Gene	Produto gênico	Organismo	Número de Acesso	Número <i>contigs</i> *	Número <i>singletons</i>
MAPK	AtMPK3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q39023	1	0
	ATMPK16	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_197402	2	1
	ATMPK18	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_175756	0	1
	MAPK	<i>Medicago sativa</i>	AAD28617	2 (C35; C107)	0
	MAPK2	<i>Glycine max</i>	AAQ14867	1	0
	MAPK7	<i>Oryza sativa</i>	BAD61401	1	0
	MAPK9	<i>Leishmania mexicana mexicana</i>	CAC07963	2	0
	MAP kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	D84859	1	0
	MAP kinase 4	<i>Petroselinum crispum</i>	AAN65180	2	0
	MPK8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_173253	0	1
	MPK17	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAP21277	1	0
	MPK9	<i>Brassica napus</i>	AAU95462	1	0
	NRK1	<i>Nicotiana tabacum</i>	BAB32406	1	0
	NTF3	<i>Nicotiana tabacum</i>	CAA49592	2 (C47)	0
	NTF6	<i>Nicotiana tabacum</i>	Q40531	0	1
	RMAPK1	<i>Oryza sativa</i>	AAF23902	0	1
	WIPK	<i>Nicotiana tabacum</i>	BAB79636	1 (C93)	0
MAPKK (MAP2K)	MAPKK	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AAU04436	2 (C76; C86)	0
	NQK1 MAPKK	<i>Nicotiana tabacum</i>	BAB32405	1 (C67)	0
MAPKKK (MAP3K)	CTR1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAB82938	1	0
	CTR1	<i>Brassica juncea</i>	AAP86285	0	1
	CTR1	<i>Brassica juncea</i>	AAP86286	3 (C66)	1
	CTR1	<i>Oryza sativa</i>	BAC79157	0	1
	CTR1	<i>Oryza sativa</i>	BAD28881	1	0
	CTR1	<i>Oryza sativa</i>	BAD37611	4	1
	CTR1	<i>Oryza sativa</i>	XP_450193	13	0
	CTR1	<i>Rosa hybrid cultivar</i>	AAK40361	2 (C1)	3
	EDR1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAG31143	0	2
	EDR1	<i>Oryza sativa</i>	BAD62538	1	0
	MAP3K	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAB16796	1	0
	MAP3K	<i>Arabidopsis thaliana</i>	D85436	0	1
	MAP3K alpha 1	<i>Oryza sativa</i>	BAD27776	1	0
	MAP3K delta-1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAA74591	0	1
	MAP3K delta-1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAB87658	1	0
	MAP3K delta-1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_196746	0	1
	MAP3K delta-1	<i>Oryza sativa</i>	XP_464691	1	0
	MAP3K epsilon	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BAB01760	2 (C63)	0
	MAP3K epsilon 1	<i>Brassica napus</i>	CAB54520	0	1
	MAP3K gamma	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAA74696	3	0
	MAP3K isoform 1	<i>Canis familiaris</i>	XP_547807	1	0
	MEK kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAD10848	0	2
	MEKK1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAB77975	2	0
	mekk1	<i>Medicago sativa</i>	CAE00640	1 (C22)	0
	NPK1-related	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BAA21856	1	0
	protein kinase 2				
	YDA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAR10436	2	0

Tabela 4 - Número de *contigs* e *singletons* relacionados as MAP kinases, encontrados no banco de dados do CitEST, organismo ortólogo e número de acesso

(conclusão)					
Gene	Produto gênico	Organismo	Número de Acesso	Número <i>contigs</i> *	Número <i>singletons</i>
	MAP kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BAB01779	1	0
	mitogen-activated protein kinase	<i>Nicotiana tabacum</i>	AAQ83971	2 (C88)	0
	similar to	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_175344	0	2
	MAP/ERK kinase				
	kinase 3				
	gil4505153				
	ZIK1	<i>Medicago sativa</i>	CAC84087	12	5
MAPKKKK	MAP4K alpha1	<i>Oryza sativa</i>	XP_468215	2	0
(MAP4K)	Ste-20 related	<i>Oryza sativa</i>	AAL54869	1 (C48)	0
	kinase				
	Ste20-related	<i>Oryza sativa</i>	AAP54648	1 (C54)	0
	protein kinase				

*Entre parênteses estão representados os *contigs* (C) comentados nos resultados.

Em plantas de tabaco, a proteína kinase induzida por ácido salicílico (SIPK) e a proteína kinase induzida por fermento (WIPK) compõem cascatas de sinalização para ativar respostas de defesa tais como a expressão de genes relacionados à patogênese (PR) e resposta de hipersensibilidade e de resistência a doenças (YANG; LIU; ZHANG, 2001; JIN et al., 2003). Estudos mostram que a atividade de SIPK sozinha é suficiente para induzir a morte celular (ZHANG; LIU, 2001; SAMUEL; ELLIS, 2002), e que WIPK acelera o processo de morte celular (LIU et al., 2003). No banco de dados do CitEST apenas um *contig* (C93) bastante similar (e-value = 0.0) a WIPK (MAPK) de tabaco (BAB79636) foi observado, e mostra a tendência de expressão em bibliotecas de folha de *C. sinensis* e *P. trifoliata* infectadas, respectivamente, por *X. fastidiosa* e pelo *Vírus da tristeza dos citros* (Figura 14) sugerindo função na defesa contra patógenos bacteriano e viral.

Plantas de alfalfa e *Medicago truncatula* transgênicas, contendo o gene TDY1 (uma MAPK de *Medicago sativa* - AAD28617) fusionado a região codificadora da beta-glucuronidase (GUS) exibiu expressão de GUS em vários locais da raiz e caule, e em folha ocorreu a expressão em áreas do mesófilo ao redor de ferimentos e de infecção por patógeno (SCHOENBECK et al., 1999). No CitEST foram encontrados 2 *contigs* similares a TDY1 (C35 e C107). O *contig* C35 apresenta alta similaridade com TDY1 (e-value = 0.0) e mostra maior tendência de expressão em

bibliotecas infectadas por *Xylella fastidiosa* (Figura 14). O *contig* C107 (e-146) apresenta tendência de expressão em bibliotecas de *C. reticulata* infectadas com *X. fastidiosa* e em casca de *Poncirus trifoliata* infectada com *Phytophthora* (Figura 14), sugerindo suposto envolvimento na resposta de defesa contra patógenos.

Figura 14 - Dados transformados representando a abundância relativa de ESTs por biblioteca, expressa em 10⁴ sequencias, em *contigs* relacionados a MAPKs. CA: *Citrus aurantium*; CG: *Citrus aurantifolia*; CS: *Citrus sinensis*; CR: *Citrus reticulata*; LT: *Citrus latifolia*; PT: *Poncirus trifoliata*; C1: cDNA de folha; C2: cDNA da casca; C3: cDNA de fruto; 100, 300 e 900: material não infectado; 101: infectado com *Xylella fastidiosa*; 102: 30 dias após infecção com *X. fastidiosa*; 103: 60 dias após infecção com *X. fastidiosa*; 301: infectado com *Phytophthora*; 901: infectado com o *Vírus da tristeza dos citros*; 002: material sadio do campo; 003: material sadio de casa-de-vegetação; 650: tecido juvenil; 700, 701, 702, 703, 704 e 705: diferentes estágios de desenvolvimento do fruto (estágios 1, 2, 3, 4, 5 e 6) (TARGON et al., 2007)

A MAPK NTF3 de tabaco (CAA49592) foi expressa em todos os tecidos de tabaco estudados por Wilson et al. (1993) e no CitEST esta MAPK foi observada em 2 *contigs* (Tabela 4), sendo que no *contig* C47 (e-value = 0.0) observa-se uma tendência de expressão em bibliotecas de *C. sinensis* e *C. reticulata* infectadas por *X. fastidiosa* (Figura 14). Já a MAPK NTF6 de *Nicotiana tabacum* (Q40531), que está envolvida na resistência ao vírus do mosaico do tabaco, sendo requerido pelo gene de resistência *N* (LIU; SCHIFF; DINESH-KUMAR, 2004), está representado por apenas 1 *singleton* (CR05-C1-100-043-E08-CT.F) (3e-85), originado de biblioteca de *C. reticulata* não infectada.

Também foram encontrados *contigs* e *singletons* relacionados a outras MAP kinases (Tabela 4), incluindo YDA MAPKK kinase que apresenta um papel chave no início do desenvolvimento de embriões de *Arabidopsis* (LUKOWITZ et al., 2004) e NPK1 (MAPKKK), NQK1 (MAPKK) e NRK1 (MAPK) de tabaco que é a cascata que está envolvida na regulação da citocinese em células vegetais (SOYANO et al., 2003).

Estudos sugerem que NPK1 tem um complexo papel na regulação de múltiplos processos celulares, pois o silenciamento do gene além de reduzir o tamanho celular e originar uma planta com fenótipo anão, também interfere na resposta de resistência a patógenos mediada pelos genes de resistência *N*, *Bs2* e *Rx* (JIN et al., 2002). Ou seja, NPK1 além de estar envolvida na citocinese vegetal também apresenta função na defesa da planta contra patógenos (JIN et al., 2002). Foi demonstrado que a MAP2K NQK1 também atua na defesa vegetal, especificamente na regulação positiva do gene *N* de tabaco, auxiliando na defesa contra o vírus do mosaico do tabaco (LIU; SCHIFF; DINESH-KUMAR, 2004). No CitEST foi observado apenas 1 *contig* (C67) com alta similaridade (e-123) a NQK1, sendo que das sequencias derivadas de biblioteca de folha que formam o *contig*, observa-se a tendência de serem originadas de bibliotecas infectadas por *X. fastidiosa* (Figura 15), sugerindo possível papel na defesa de citros.

Outra MAP2K que atua na resistência contra patógenos é a LeMKK4 de tomate (AAU04436), que desencadeia a resposta de hipersensibilidade nessa espécie (PEDLEY; MARTIN, 2004) e no banco de dados do CitEST foram identificados 2 *contigs* (C76 e C86) apresentando similaridade a esta proteína. O *contig* C86 (e-100) é formado pelo mesmo número de sequencias derivadas de bibliotecas de folha de *P. trifoliata* infectada ou não pelo *Vírus da tristeza dos citros*, já o *contig* C76 (e-120) apresentou tendência de maior expressão em

biblioteca de folha de *C. sinensis* infectada por *X. fastidiosa* (Figura 15), sugerindo um suposto envolvimento na defesa desta espécie.

Figura 15 - Dados transformados representando a abundância relativa de ESTs por biblioteca, expressa em 10^4 sequências, em *contigs* relacionados a MAP2Ks. CS: *Citrus sinensis*; CR: *Citrus reticulata*; PT: *Poncirus trifoliata*; C1: cDNA de folha; C3: cDNA de fruto; 100 e 900: material não infectado; 101: infectado com *Xylella fastidiosa*; 102: 30 dias após infecção com *X. fastidiosa*; 103: 60 dias após infecção com *X. fastidiosa*; 901: infectado com o Vírus da tristeza dos citros; 704 e 705: diferentes estágios de desenvolvimento do fruto (estágios 5 e 6) (TARGON et al., 2007)

O *contig* C88 mostrou similaridade (e-152) a uma MAP3K de tabaco (AAQ83971) que está envolvida na resistência ao Vírus do mosaico do tabaco (FENG et al., 2006) e na base de dados do CitEST apresenta expressão exclusivamente em bibliotecas de folhas infectadas por *X. fastidiosa* (*C. sinensis* e *C. reticulata*) e pelo Vírus da tristeza dos citros (*P. trifoliata*) (Figura 16), evidenciando um provável padrão de expressão específico na defesa vegetal. Já o *contig* C1 (e-140), similar a MAP3K CTR1 de rosa (AAK40361), apresentou expressão exclusivamente em bibliotecas infectadas por *X. fastidiosa* (Figura 16).

A MAP3K Mekk1 de *Medicago sativa* (CAE00640) tem função na ativação de H_2O_2 induzindo a morte celular (NAKAGAMI; KIEGERL; HIRT, 2004), sendo o *contig* C22 (e-106)

representando esta proteína no CitEST e mostrando forte tendência de expressão em plantas de *C. sinensis* infectadas por *X. fastidiosa* (Figura 16), indicando envolvimento na defesa de citros.

O *contig* C66 (e-107), similar a MAP3K CTR1 de *Brassica juncea* (AAP86286), apresentou diferente padrão de expressão entre espécies, em *C. reticulata* a expressão é induzida em folhas infectadas por *X. fastidiosa* e em *P. trifoliata* apresenta padrão de expressão em tecido não infectado (Figura 16), sugerindo expressão diferencial entre as espécies. Já o *contig* C63 apresenta alta similaridade (e = 0.0) a MAP3K de *Arabidopsis* (BAB01760) e apresenta tendência de expressão em biblioteca de fruto sadio e em biblioteca de folha de *C. sinensis* infectada por *X. fastidiosa* (Figura 16), sugerindo que em folha a ativação ocorre em resposta ao ataque de patógeno.

Figura 16 - Dados transformados representando a abundância relativa de ESTs por biblioteca, expressa em 10^4 sequências, em *contigs* relacionados a MAP3Ks. CG: *Citrus aurantifolia*; CS: *Citrus sinensis*; CR: *Citrus reticulata*; PT: *Poncirus trifoliata*; C1: cDNA de folha; C3: cDNA de fruto; 100 e 900: material não infectado; 101: infectado com *Xylella fastidiosa*; 102: 30 dias após infecção com *X. fastidiosa*; 103: 60 dias após infecção com *X. fastidiosa*; 901: infectado com o *Vírus da tristeza dos citros*; 003: material sadio de casa-de-vegetação; 650: tecido juvenil; 700, 701, 703 e 705: diferentes estágios de desenvolvimento do fruto (estágios 1, 2, 4 e 6) (TARGON et al., 2007)

Com relação aos *contigs* relacionados à MAP4K dois deles apresentaram tendência de expressão em bibliotecas infectadas. O *contig* C48 apresentou padrão de expressão em bibliotecas infectadas de *C. reticulata* e *P. trifoliata* e em tecido sadio de *C. sinensis* (Figura 17). Já o *contig* C54 apresentou maior tendência de expressão em biblioteca de *C. sinensis* infectada por *X. fastidiosa* (Figura 17), sugerindo possível envolvimento na defesa desta espécie.

Figura 17 - Dados transformados representando a abundância relativa de ESTs por biblioteca, expressa em 10^4 sequencias, em *contigs* relacionados a MAP4Ks. CS: *Citrus sinensis*; CR: *Citrus reticulata*; PT: *Poncirus trifoliata*; C1: cDNA de folha; 100 e 900: material não infectado; 102: 30 dias após infecção com *X. fastidiosa*; 901: infectado com o *Vírus da tristeza dos citros*; 650: tecido juvenil

4.1.4 Resposta de hipersensibilidade (HR)

As plantas são continuamente expostas ao ataque de patógenos, mas o sucesso da infecção é raro porque as plantas se protegem usando uma ampla gama de mecanismos de respostas. Um deles é a resposta de hipersensibilidade (HR), que é uma forma de morte celular associado frequentemente com a resistência da planta à infecção pelo patógeno, impedindo a propagação do patógeno de tecidos infectados para tecidos não infectados. A percepção de moléculas derivadas

do patógeno pelos produtos do gene de resistência (*R*) da planta ativa a morte celular, que é associada a um maciço acúmulo de espécies reativas de oxigênio, de ácido salicílico e de outros sinais de pré-morte tais como o óxido nítrico. Pelas análises no CitEST foi possível identificar diversos genes putativos que codificam para enzimas chaves envolvidas na HR e outros genes também envolvidos na defesa da planta. Sendo que a clusterização das sequências identificadas resultou na formação de 227 *contigs* e 174 *singletons* (Tabela 5) (GUIDETTI-GONZALEZ et al., 2007). Na Tabela 5 estão apresentadas as classes de proteínas identificadas, sendo que alguns *contigs* especificados estão descritos mais detalhadamente a seguir. Uma descrição de todos os genes envolvidos na HR e defesa identificados estão no Anexo 2.

Tabela 5 – Classes de proteínas envolvidas na HR e defesa, identificadas no banco de dados do CitEST (GUIDETTI-GONZALEZ et al., 2007)

Proteínas	Número	
	<i>contigs</i> *	<i>singletons</i>
Ácido Cinâmico 4-hidroxilase (C4H)	3 (C1, C3)	2
Canais de cálcio	2	2
Canais de íons	17	16
Chalcona sintase (CHS)	4 (C1, C3, C4)	12
Corismato mutase (CM)	5 (C4, C6)	4
Fenilalanina amônia liase (PAL)	4 (C8, C10)	7
Fosfolipase	9	12
Glutathione peroxidase	10	2
Glutathione transferase	36	4
Isocorismato sintase	2 (C2)	1
Lipoxigenase	16	18
Metacaspase	3	4
NADPH oxidase	3	3
Nitrato redutase	3 (C7, C10, C11)	1
Peroxidase	52	42
PR-5	10	4
Quitinase	29	24
Superóxido dismutase (SOD)	19	16

* Entre parênteses estão representados os *contigs* (C) comentados nos resultados.

Na base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) estão depositadas 184.881 e 28.822 sequências de espécies de *Citrus* e *Poncirus*, respectivamente. Buscas nesta base de dados

revelou a presença de duas sequencias relacionadas a glutathione peroxidase, uma sequencia de peroxidase, duas superóxido dismutases, cinco fenilalanina-amônia liase, três ácidos cinâmico 4-hidroxilase, três chalcona sintase, duas fosfolipases, três lipoxigenases, quatro quitinases e uma osmotina em citros, enquanto em *Poncirus* existe somente uma superóxido dismutase, duas nitrato redutase e uma glutathione transferase. Alguns genes analisados não foram identificados nesta base de dados, tais como metacaspase, proteínas relacionadas a canais de cálcio e íons, isocorismato sintase e corismato mutase, entretanto foram identificados na base de dados do CitEST. A presença destes supostos genes permite inferir uma rota putativa que desencadeia a HR e que leva a ativação de genes de defesa em plantas cítricas (Figura 18).

4.1.4.1 Canais de íons

Alguns dos eventos iniciais de sinalização detectados durante a HR incluem mudanças na permeabilidade da membrana plasmática levando ao influxo de Ca^{+} e H^{+} e efluxo de K^{+} e Ca^{+} (ATKINSON et al., 1990; McDOWELL; DANGL, 2000).

Sendo o potássio um íon inorgânico predominante das células vegetais, onde desempenha papel importante contribuindo para a pressão hidrostática celular (turgor), crescimento, e respostas ao ambiente (MICHARD et al., 2005).

O gene *HLM1* codifica um membro da família de canal de íon CNGC (“cyclic nucleotide-gated channel”), o CNGC4 (MASER et al., 2001). O estudo deste produto gênico demonstrou que CNGC4 é permeável a ambos K^{+} e Na^{+} , e a sua expressão é induzida em resposta a infecção por patógeno e alguns sinais relacionados à patógenos. Assim, HLM1 pode ser considerado um componente comum da rota de sinalização desencadeando a HR (BALAGUÉ et al., 2003). A busca no CitEST identificou apenas um *singleton* similar a HLM1 (6e-96), os outros 15 *singletons* e 17 *contigs* mostraram similaridade a outros membros da família CNGC (Anexo 2). Análises revelaram a presença de transcritos similares a canais de íons (CNGC) em bibliotecas de *C. reticulata*, *C. sinensis*, *C. latifolia*, *C. aurantifolia* e *P. trifoliata*. Estes resultados eram esperados, pois íons como o potássio está envolvido em uma ampla gama de respostas ambientais, e possivelmente também na HR e defesa em citros.

4.1.4.2 Rota dos fenilpropanóides (enzimas: CM, PAL, C4H, CHS)

Em plantas a rota dos fenilpropanóides é responsável pela síntese de uma ampla variedade de compostos metabólicos secundários, incluindo lignina, salicilatos, flavonóides, etc (HWANG et al., 2003).

Na rota dos fenilpropanóides a enzima corismato mutase (CM) catalisa a reação que forma fenilalanina, e a enzima fenilalanina-amônia liase (PAL) produz ácido cinâmico a partir de fenilalanina (GOZZO, 2003; KANEKO et al., 2003). Outras enzimas estão presentes nesta rota, como o ácido cinâmico 4-hidroxilase (C4H) que leva a síntese de uma variedade de componentes incluindo monômeros de lignina e flavonóides (MORANT et al., 2003; GRAVOT et al., 2004). Chalcona sintase (CHS) é a enzima que catalisa a reação de produção de flavonóides e fitoalexinas (YANG et al., 2002). A substância final produzida por esta rota (4, 2', 4', 6'-tetrahidroxichalcone) é utilizada para a produção de uma ampla variedade de compostos flavonóides que apresentam diversas funções como pigmentação de flores, proteção contra UV, sinalização, fertilidade masculina, e na defesa contra patógenos microbianos (WINKEL-SHIRLEY, 2001; KORKINA, 2007).

No banco de dados do CitEST, foram identificados 5 *contigs* e 4 *singletons* similares a corismato mutase (Tabela 5 e Anexo 2), alguns deles mostram padrão específico de expressão. O *contig* C4, que é similar a corismato mutase de *A. thaliana* (AAC73018), mostrou expressão específica em fruto de *C. sinensis*, enquanto o *contig* C6 (1e-67) apresentou tendência de expressão em fruto de *C. reticulata* e em folha de *C. sinensis* infectada por *X. fastidiosa*, sugerindo papel na defesa de *C. sinensis*.

Quatro *contigs* e 7 *singletons* foram identificados no CitEST, com similaridade a PAL (Tabela 5 e Anexo 2). O *contig* C10 apresenta alta similaridade (2e-107) com a PAL de *Nerium oleander* e foi expressa exclusivamente em biblioteca de casca de *P. trifoliata* infectada por *Phytophthora*, sugerindo função na defesa desta espécie. O *contig* C8 é formado por 20 sequencias de diversas bibliotecas, sendo que todas as 4 sequencias vindas de *C. sinensis* são derivadas de bibliotecas de folha infectadas por *X. fastidiosa*, podendo estar relacionado à defesa desta espécie de citros.

Em estudo com laranja doce Valência, dois cDNAs de ácido cinâmico 4-hidroxilase (C4H) foram clonados e apresentaram regulação de expressão diferencial (BETZ; MCCOLLUM;

MAYER, 2001). Um destes cDNAs, o C4H2, mostrou ser expresso constitutivamente e parece exercer função de gene “housekeeping” na rota dos fenilpropanóides. E estudos de expressão mostraram que C4H1 é fortemente induzido por ferimento, mas mesmo em tecido ferido o mRNA alcança níveis muito mais baixos do que C4H2 (BETZ; MCCOLLUM; MAYER, 2001).

No banco de dados do CitEST foram identificados 3 *contigs* e 2 *singletons* relacionados a C4H2 (Tabela 5 e Anexo 2). Um desses *contigs* (C3) é formado por 46 sequencias e apresenta 100% de identidade com C4H2, sendo a maioria das sequencias originadas de frutos de *C. sinensis* e *C. reticulata* em diferentes estágios de desenvolvimento. O *contig* C1 apresenta 91% de identidade com C4H2 e é formado por 11 sequencias, a maioria derivada de bibliotecas de estágios iniciais de desenvolvimento de fruto de *C. sinensis* (10 sequencias) e uma sequencia de biblioteca de folha de *P. trifoliata* infectada pelo *Vírus da tristeza dos citros*. Estes resultados sugerem um possível padrão de expressão desta proteína em frutos de *C. sinensis* e *C. reticulata*. Entretanto um possível envolvimento na defesa contra patógeno em *P. trifoliata* não pode ser excluído.

Dois clones de cDNA que codificam chalcona sintase (CHS) foram isolados (CitCHS1 e CitCHS2) de citros (MORIGUCHI et al., 1999). Estudos indicam que estes dois genes são diferencialmente expressos durante a embriogênese somática de citros e CitCHS2 pode regular o acúmulo de flavonóides em culturas de células de citros. No CitEST foram observados 4 *contigs* e 12 *singletons* relacionados a chalcona sintase, entre eles 3 *contigs* e 8 *singletons* relacionados a CitCHS2 (Tabela 5 e Anexo 2). O *contig* C3 é formado por 75 sequencias, sendo a maioria derivada de bibliotecas de frutos de *C. sinensis* em estágios iniciais de desenvolvimento e, como esperado, é 100% idêntico a sequencia de *C. sinensis* do NCBI. Já no *contig* C4, formado por 54 sequencias, a maioria das sequencias é derivada de bibliotecas de frutos de *C. reticulata* em estágios iniciais de desenvolvimento e apresenta 92% de identidade com CHS de *C. sinensis*. Finalmente, um outro *contig* (C1) formado por 9 sequencias de *C. sinensis* apresenta tendência de expressão em folha em estágios iniciais de infecção por *X. fastidiosa*, sendo 79% idêntico a CHS de *C. sinensis* do NCBI. Estes dados indicam uma possível presença de pelo menos duas CHS em *C. sinensis*, uma que se expressa durante o desenvolvimento do fruto, como ocorre em outras espécies (AHARONI; O'CONNELL, 2002; KUMAR; ELLIS, 2003), além da provável existência de uma CHS que pode estar envolvida na resposta de citros a patógenos.

4.1.4.3 Biossíntese de ácido salicílico (enzima isocorismato sintase)

O envolvimento do ácido salicílico (SA) como uma molécula sinal para a defesa da planta tem sido estudado extensivamente (SHAH; KLESSIG, 1999; SHAH, 2003; STOUT; THALER; THOMMA, 2006). SA se acumula rapidamente no local da infecção durante o ataque do patógeno e durante a HR, e se espalha para outras partes da planta para induzir uma grande variedade de respostas de defesa (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005). Além de induzir genes das proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR), SA atua antes da divergência das duas ramificações metabólicas acarretando na rota dos fenilpropanóides e na ativação da explosão oxidativa. De tal maneira o SA amplifica sua própria síntese, a qual, em adição, é estimulado por H_2O_2 (GOZZO, 2003; ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005).

Em cloroplasto de *Arabidopsis*, SA é sintetizado a partir de isocorismato catalisado por isocorismato sintase. Esta rota, típica de bactérias, parece ser requerida mesmo em outras plantas para a produção de SA para a defesa contra patógenos (MÉTRAUX, 2002; GOZZO, 2003).

Embora as evidências de tabaco e batata indiquem que o ácido salicílico pode ser derivado de fenilalanina através de ácido benzóico, catalisado por ácido benzóico 2-hidroxilase (YALPANI et al., 1993; COQUOZ; BUCHALA; METRAUX, 1998), em plantas cítricas a formação de SA parece ocorrer através da rota do isocorismato, pois no banco de dados do CitEST e também no NCBI não foi encontrado nenhuma sequência relacionada ao ácido benzóico 2-hidroxilase.

As análises do CitEST resultaram em 2 *contigs* e 1 *singleton* similar a isocorismato sintases de *M. truncatula*, *Capsicum annuum* e *Catharanthus roseus* (Tabelas 5 e Anexo 2). Somente um *contig* (C2), com similaridade a isocorismato sintase de *M. truncatula* (1e-81), mostrou um padrão de expressão em condição de infecção, apresentando uma maior tendência de expressão em folhas de *C. sinensis* em estágio inicial de infecção por *X. fastidiosa*. Este resultado pode sugerir que esta suposta proteína pode estar envolvida na produção de SA em condição de infecção por patógeno, com o objetivo de estimular a defesa da planta.

4.1.4.4 Metacaspases

Apoptose em animal é caracterizado e normalmente definido como sendo a ativação de uma família de proteases cisteína-dependente e aspartato-específica, ou caspases (PENNELL; LAMB, 1997). Caspases podem proteoliticamente ativar outras caspases ou utilizar vários substratos celulares, desencadeando a morte celular (UTZ; ANDERSON, 2000). Em plantas, homólogos às caspases têm sido reportados e denominados metacaspases (HOEBERICHTS; TEN HAVE; WOLTERING, 2003; VERCAMMEN et al., 2004). Em tomate, a metacaspase *LeMCA1*, é induzida durante a infecção das folhas com *Botrytis cinerea* (HOEBERICHTS; TEN HAVE; WOLTERING, 2003), entretanto não se sabe ao certo o papel de metacaspases durante a HR (MUR et al., 2008). Na busca no banco de dados do CitEST foram identificadas 18 sequencias com similaridade a metacaspases de *A. thaliana*, *L. esculentum* e *O. sativa*, as quais formaram 3 *contigs* e 4 *singletons* (Tabela 5 e Anexo 2). Um destes *singletons*, com similaridade (3e-84) a metacaspase de *L. esculentum* é derivado de biblioteca de folha de *P. trifoliata* infectada pelo *Vírus da tristeza dos citros*, o que pode sugerir o envolvimento na resistência a doença, como observado em outras espécies (DE JONG et al., 2000; HOEBERICHTS; TEN HAVE; WOLTERING, 2003).

4.1.4.5 Biossíntese de óxido nítrico (enzima nitrato redutase)

Duas fontes potenciais de óxido nítrico (NO) em plantas são o NO sintase (NOS) e nitrato redutase (NR). NOS é uma família de enzimas bem caracterizadas em células de mamíferos (DESIKAN et al., 2002) e que foi encontrado em muitas plantas (NEILL et al., 2002), e funciona como um sinalizador para o crescimento, desenvolvimento e defesa da planta (DELLEDONNE et al., 1998; KLESSIG et al., 2000; NEILL et al., 2002). NR é uma enzima central na assimilação de nitrogênio em plantas (KAISER et al., 2002), sendo induzido em tubérculo de batata tratado tanto com *Phytophthora infestans* ou com um elicitor derivado deste patógeno (YAMAMOTO et al., 2003).

NO tem funções biológicas bem conhecidas em mamíferos, mas foi somente recentemente reconhecido como um componente de sinalização em plantas (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE,

2005). De fato, sabe-se agora que NO desempenha um papel importante em diversos processos fisiológicos nas plantas (GRUN et al., 2006). Os fatores Avr de patógenos estimulam a produção de NO, o qual promove resistência à doença em plantas, colaborando com as espécies reativas de oxigênio na explosão oxidativa (DELLEDONNE et al., 1998).

Apesar da grande quantidade de ESTs de citros sequenciados no projeto do CitEST, não foram encontradas sequencias similares a NOS, o que sugere que a síntese de NO nestas espécies pode ser feito preferencialmente por NR, o que também já foi demonstrado em *Arabidopsis* na interação com a bactéria patogênica *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (MODOLO et al., 2005). No banco de dados do CitEST foram formados 3 *contigs* e 1 *singleton* similares a NR (Tabela 5 e Anexo 2). Um destes *contigs* (C10), similar a NR de *Petunia x hybrida* (e-value = 0.0), parece ser expresso especialmente em tecidos de folha não infectados de *C. reticulata* e *P. trifoliata*, enquanto que a única sequencia originada de casca de *P. trifoliata* é derivada de biblioteca infectada por *Phytophthora*. Este resultado sugere que na casca de *P. trifoliata* pode ocorrer a produção de NO para a defesa, similar ao que ocorre em tubérculos de batata infectada por *P. infestans* (YAMAMOTO et al., 2003).

Outro *contig* (C11), com similaridade a NR de *Tilia platyphyllos* (2e-152) apresenta sequencias vindas somente de folha de *C. reticulata* e apresenta tendência de expressão em biblioteca infectada por *X. fastidiosa*, sugerindo papel na defesa de *C. reticulata*. O *contig* C7 não apresentou expressão espécie-específica, mas é formado principalmente de sequencias de bibliotecas de folha de *C. reticulata* e *C. sinensis* infectadas com *X. fastidiosa*, indicando que este transcrito possa estar envolvido na resposta a este estresse biótico.

Figura 18 - Possível rota de sinalização para HR e ativação de genes de defesa de citros. Após a percepção na membrana plasmática do sinal de avirulência do patógeno pelos receptores (genes *R* e genes requeridos pelos genes *R*) ocorre o estímulo de influxo de H⁺ e Ca²⁺ e efluxo de K⁺ e Cl⁻. Este fluxo de íons estimula a ativação de cascata de sinalização de MAP kinases e a geração de espécies reativas de oxigênio (ODJAKOVA; HADJIIVANOVA, 2001), sendo que a cascata de MAP kinases também estimula o aumento na geração de H₂O₂ e ativação da transcrição de genes de defesa no núcleo (REN; YANG; ZHANG, 2002; PEDLEY; MARTIN, 2005). Abreviações e símbolos: APX, ascorbato peroxidase; CHS, chalcona sintase; C4H, ácido cinâmico-4-hidroxilase; CA, ácido cinâmico; CAT, catalase; CM, corismato mutase; gpx, glutathione peroxidase; gst, glutathione S-transferase; H₂O₂, peróxido de hidrogênio; HR, resposta de hipersensibilidade; ICS, isocorismato sintase; NO, óxido nítrico; NR, nitrato redutase; PAL, fenilalanina-amônia liase; PHE, fenilalanina; PR, proteínas relacionadas à patogênese; SA, ácido salicílico; SOD, superóxido dismutase; (+), regulação positiva; (-), regulação negativa (Baseado e adaptado de Lamb; Dixon (1997); Gozzo (2003); e Pedley; Martin (2005) e modificado de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho)

4.1.5 SnRKs

4.1.5.1 Identificação de supostas SnRKs

Com base na sequência de aminoácidos, foram identificados 535 sequências semelhantes a SNF1 de *S. cerevisiae* (e-value $<10^{-10}$), que formaram 108 *contigs* e 78 *singletons*. Destes, 18 *contigs* e dois *singletons* apresentaram domínio catalítico N-terminal altamente conservados presente também em SnRKs de várias outras espécies vegetais (*A. thaliana*, *L. esculentum* e *O. sativa*), os quais também apresentavam o motivo conservado T-loop. (Figura 19). O tamanho médio de três destes *contigs* é de 200-300 aminoácidos; cinco *contigs* e os únicos dois *singletons* apresentam 301-400 aminoácidos; cinco *contigs* 401-500 e cinco *contigs* foram de tamanho superior a 500 aminoácidos (GUIDETTI-GONZALEZ; RAGASSI; CARRER, 2007). A similaridade dos *contigs* e *singletons* com outros organismos está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 – Número de *contigs* e *singletons* com similaridade a genes SnRKs

Gene	Organismo	Número de acesso	Número de <i>contigs</i> *	Número de <i>singletons</i>	Melhor <i>e-value</i>
SnRK1					
<i>LeSNF1</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AAF66639	1	0	0.0
SnRK2					
<i>NtOSAK</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	AAL89456	2 (C12; C21)	0	2e-166
<i>SAPK1</i>	<i>Oryza sativa</i>	Q75LR7	1	0	7e-128
<i>PKABA1</i>	<i>Oryza sativa</i>	AAO65504	0	1	6e-50
SnRK3					
<i>OsPK4</i>	<i>Oryza sativa</i>	BAA83688	1	0	2e-130
<i>SOS2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAK26847	1	0	0.0
<i>SOS2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	O22932	1	0	6e-107
<i>SOS2</i>	<i>Glycine max</i>	AAM83095	1	0	1e-160
<i>ZmPK4</i>	<i>Zea mays</i>	AAF22219	1	0	5e-96
<i>wpk4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAK62444	7 (C89; C91)	0	5e-143
<i>wpk4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAM13241	1	1	e-98
<i>wpk4</i>	<i>Oryza sativa</i>	BAD73090	1	0	2e-60

* Entre parênteses estão representados os *contigs* (C) comentados nos resultados.

Figura 19 - Alinhamento de parte do domínio catalítico N-terminal e do domínio T-loop de *contigs* e *singletons* originários do CitEST que codificam supostas SnRKs com SNF1 e outras SnRKs. Números de acesso: SNF1 - *Saccharomyces cerevisiae* (M13971); SNF1 - *Lycopersicon esculentum* (AAF66639); AKIN10 - *A. thaliana* (M93023); RSK1 - Arroz (U55768); ASK2 - *A. thaliana* (Z12120); WPK4 - Trigo (D21204); ATSKINI - *A. thaliana* (X94755); BKIN12 - Cevada (X65606); ATHSERTHR (M91548) e A (*A. thaliana*) (S71172). Aminoácidos destacados em amarelo são idênticos em todas as proteínas. Azul representa resíduos consensos derivados de um bloco de resíduos semelhantes; verde representa resíduos consensos derivados da ocorrência de mais de 50% de um único resíduo em uma determinada posição. O domínio conservado T-loop está sublinhado em vermelho. Os resíduos conservados DFG e APE do T-loop estão sublinhados em azul. A suposta treonina fosforilada está indicada por asterisco (*).

4.1.5.2 Análises de supostas SnRKs no CitEST

Apesar da grande quantidade de sequências de *Citrus* e *Poncirus* depositadas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) não foram encontradas sequências relacionadas com SNF1 ou SnRKs nesse banco de dados (GUIDETTI-GONZALEZ; RAGASSI; CARRER, 2007).

Analisando proteínas relacionadas à SNF1 de diferentes espécies de plantas Halford e Hardie (1998) classificaram as SnRKs em três subfamílias (SnRK1, SnRK2 e SnRK3), baseada na relação evolutiva dos aminoácidos. Comparando as sequências de aminoácidos dos *contigs* e *singletons* identificados no CitEST com SnRKs conhecidos, foi possível classificá-los em diferentes subfamílias: um para SnRK1 (subfamília SnRK1a), quatro para SnRK2 (dois SnRK2a e dois SnRK2b) e quinze SnRK3 (Figura 20). Não foram encontrados *contigs* ou *singletons* relacionados com a subfamília SnRK1b descrita em cana-de-açúcar (CARRARO; LAMBAIS; CARRER, 2001), sugerindo que poderiam ser específicos para gramíneas.

Em acordo com Halford e Hardie (1998) e Carraro; Lambais; Carrer (2001), a análise filogenética mostrou que SNF1 de levedura formou um clado diferente que têm relação mais próxima com a subfamília SnRK1 (Figura 20), e semelhante ao que foi relatado por Halford e Hardie (1998) e em contraste com Carraro; Lambais; Carrer (2001) a subfamília SnRK1 parece ser mais relacionada com SnRK2 do que para a subfamília SnRK3 (Figura 20). Este resultado era esperado porque durante a divergência evolucionária das famílias de SnRKs, proteínas SnRK2 parece desempenhar uma posição intermediária, pois foram identificadas SnRK2s envolvidas em alterações na expressão gênica induzidas por ABA e na sinalização de estresse osmótico (KOBAYASHI et al., 2004; BOUDSOCQ et al., 2007), enquanto existem SnRK1s que são ativadas por ABA (BRADFORD et al., 2003; WEBER; BORISJUK; WOBUS, 2005) e há SnRK3s que tem funções específicas na adaptação da planta a estresses osmóticos (LIU et al., 2000), levando a família SnRK2 a ocupar uma posição intermediária na árvore filogenética, estando entre SnRK1 e SnRK3.

Figura 20 - Relações filogenéticas entre *contigs* e *singletons* originários do CitEST que codificam supostas SnRKs com SNF1 e outras SnRKs. Números de acesso: SNF1 - *Saccharomyces cerevisiae* (M13971); SNF1 - *Lycopersicon esculentum* (AAF66639); AKIN10 - *A. thaliana* (M93023); RSK1 - Arroz (U55768); ASK2 - *A. thaliana* (Z12120); WPK4 - Trigo (D21204); ATSKINI - *A. thaliana* (X94755); BKIN12 - Cevada (X65606); ATHSERTHR (M91548) e A (*A. thaliana*) (S71172). O alinhamento de aminoácidos do N-terminal catalítico e domínio T-loop foi realizado utilizando AlignX (Vector NTI program). As diferentes subfamílias SnRKs estão separadas por blocos cinza

SNF1, AMPKs e SnRKs são regulados pela fosforilação em uma treonina (equivalente a Thr172 em mamíferos AMPK e Thr175 em *Arabidopsis thaliana* SnRK1 - AKIN10), dentro do "T-loop" entre os motivos conservados DFG e APE (SUGDEN et al. , 1999). O motivo T-loop está presente nas supostas SnRKs identificadas no CitEST, sugerindo funções conservadas (Figura 19).

A proteína quinase ativada por estresse osmótico (NtOSAK) de *Nicotiana tabacum* está envolvida em vias sinalizadoras de estresse em plantas e representa a primeira proteína SnRK2 caracterizada (KELNER et al., 2004). No CitEST foram encontrados dois *contigs* (C12 e C21), cujas sequencias deduzidas de aminoácidos são muito similares a esta proteína (Tabela 6) e na análise filogenética esses *contigs* também pertencem à família SnRK2 (SnRK2b subfamília) (Figura 20) e de acordo com a análise das sequencias que os constituem mostram uma tendência de expressão no início do desenvolvimento dos frutos de *C. reticulata* e *C. sinensis*. A falta de uma biblioteca específica no CitEST que confira estresse osmótico torna difícil relacionar diretamente esta proteína a esse estresse abiótico, então pode-se apenas sugerir o possível envolvimento dessas supostas proteínas no desenvolvimento dos frutos nessas espécies cítricas.

O gene *WPK4* de *Triticum aestivum* codifica uma proteína quinase de 56-kDa que pertence a família SnRK3, mostrando ser induzida por luz e citocininas e reprimida pela sacarose (SANO; YOUSSEFIAN, 1994), sendo que 2 dos *contigs* e 1 *singleton* (PT11-C1-901-040-F09-CT.F) observados no CitEST [C89 (3e-98) e C91 (3e-88)], semelhantes a *WPK4* de *Arabidopsis thaliana*, mostram uma tendência de expressão em folha de *P. trifoliata* infectada pelo vírus da tristeza dos citros (CTV), o que sugere um possível papel na interação planta-patógeno. Este *singleton* apresenta uma inserção de 35 aminoácidos ajusante do motivo conservado T-loop. Tal inserção não foi encontrada em nenhuma outra SnRK identificada (Figura 19).

O conhecimento do papel fisiológico das SnRKs em plantas é muito pequeno, quando comparado com levedura e mamíferos. Os dados sugerem a participação desse complexo de quinases de planta na regulação global do metabolismo, bem como no desenvolvimento e respostas a estresse (POLGE; THOMAS, 2007). Além dos *contigs* anteriormente mencionados, as sequencias que pertencem aos *contigs* relacionados a diferentes SnRKs de várias bibliotecas, tais como folhas de *C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. reticulata*, *Poncirus trifoliata* e frutos de *C. sinensis* e *C. reticulata* sugerem a falta de um padrão específico de expressão e, em alguns casos, podem-se inferir uma expressão constitutiva. Devido ao foco do projeto CitEST em bibliotecas

de frutos e folhas saudáveis e bibliotecas envolvendo interação planta-patógeno, em plantas cítricas não podemos inferir a relação das SnRKs identificadas em resposta ao estresse osmótico. Os dados aqui descritos, também sugerem o envolvimento de supostas SnRKs no desenvolvimento de frutos e respostas na interação planta-patógeno, embora mais estudos sobre a expressão e funções específicas destes genes identificados serão necessárias para uma melhor compreensão da base genética e bioquímica de SnRKs em citros.

4.2 Macroarranjo

4.2.1 Confeção manual das membranas de macroarranjo

4.2.1.1 Miniprep e PCR da miniprep dos clones selecionados para o macroarranjo

Membranas (*Hybond⁺* - *Invitrogen*) foram preparadas manualmente com 273 clones mais os controles positivos GAPDH e β -actina. Os clones utilizados foram preparados a partir de seus produtos de PCR. Para isso foi feito a miniprep desses clones e eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da extração plasmidial. A concentração dos produtos de PCR de cada miniprep foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose comparando-se o padrão de bandas obtidos com o padrão de peso molecular pGEM (200 ng) (Figura 21).

Figura 21 - Eletroforese de alguns dos produtos de PCR da miniprep dos clones selecionados para o macroarranjo. A última canaleta de cada linha: 200 ng do padrão de peso molecular pGEM

4.2.1.2 Impressão dos produtos de PCR e hibridização com a sonda plasmidial OVERGO

Após a verificação da concentração de DNA dos produtos de PCR, os mesmos foram ajustados para a concentração de 100 ng/μL e impressos nas membranas. Para a verificação da quantidade de DNA impressa em cada *spot* e posterior normalização dos dados, efetuou-se a hibridização das membranas com a sonda plasmidial OVERGO. Das 6 membranas confeccionadas, duas foram escolhidas (membranas M3 e M4) para as hibridizações com as sondas de cDNA por apresentarem adequada quantidade de DNA nos *spots*.

4.2.2 Extração de RNA total para o preparo das sondas

Obteve-se RNA de folha de *Citrus sinensis* sadia e com sintomas de Pinta preta pelo método do Fenol. Na Figura 22 está demonstrada a qualidade do RNA extraído em gel de agarose desnaturante e para a quantificação realizou-se leitura em espectrofotômetro. As sondas obtidas: CsS (folhas de *Citrus sinensis* sadias) e CsP (folhas de *Citrus sinensis* com sintomas de pinta preta) foram preparadas com o cDNA obtido a partir destes RNAs apresentados.

Figura 22 - Gel de agarose desnaturante do RNA total extraído de folha sadia (1) e com sintomas de Pinta preta (2) utilizados para a síntese das sondas de cDNA

4.2.3 Hibridizações das membranas com as sondas de cDNA

Para avaliação da expressão dos genes impressos nas membranas, foram efetuadas hibridizações das duas membranas diferentes (M3 e M4) com cada sonda. Na Figura 23 estão representados os resultados obtidos das hibridizações destas membranas

Figura 23 - Resultados obtidos após hibridizações das membranas com as sondas: (A) M3 com a sonda CsP (folhas de *C. sinensis* com sintomas de Pinta preta); (B) M3 com a sonda CsS (folhas de *Citrus sinensis* sadia); (C) M4 com a sonda CsP e (D) M4 com a sonda CsS

4.2.4 Análise estatística do macroarranjo

O uso de macroarranjos na análise transcricional de determinados organismos e ou condições biológicas contrastantes tem sido uma ferramenta eficiente em relação a outras metodologias utilizadas para monitorar o perfil de expressão gênica.

Os genes usados para a impressão das membranas para macroarranjo foram escolhidos com base nas análises *in silico*. Eles foram selecionados de acordo com a similaridade nas diferentes categorias (Tabela 7). Nesta tabela também está apresentado os resultados obtidos da análise estatística de expressão dos transcritos.

Tabela 7 - Classificação dos genes estudados de acordo com a sua provável função e proporção dos genes que apresentaram expressão diferencial no macroarranjo

Categoria	Função putativa	Número de genes na membrana	% Genes com expressão diferencial (n°)	% Genes com expressão diferencial > 2x (n°)
C1	genes <i>R</i>	97	59 % (57)	32 % (31)
C2	genes requeridos pelos genes <i>R</i>	10	60 % (6)	50 % (5)
C3	MAPK	19	79 % (15)	37 % (7)
C4	MAP2K	3	67 % (2)	0
C5	MAP3K	51	57 % (29)	18 % (9)
C6	MAP4K	4	0	0
C7	SnRKs	18	72 % (13)	28 % (5)
C8	NADPH oxidase	6	67 % (4)	17 % (1)
C9	superóxido dismutase	7	86 % (6)	43 % (3)
C10	nitrato redutase	3	67 % (2)	0
C11	fenilalanina-amônia liase	4	75 % (3)	0
C12	corismato mutase	3	100 % (3)	100 % (3)
C13	Isocorismato sintase	2	100 % (2)	100 % (2)
C14	PR-proteínas	10	60 % (6)	30 % (3)
C15	canais de cálcio	2	0	0
C16	chalcona sintase	2	50 % (1)	50 % (1)
C17	glutathione transferases	2	50 % (1)	0
C18	glutathione peroxidase	2	50 % (1)	0
C19	peroxidases	5	100 % (5)	40 % (2)
C20	catalases	5	100 % (5)	80 % (4)
C21	canais de íons	4	75 % (3)	25 % (1)
C22	metacaspases	3	67 % (2)	33 % (1)
C23	lipoxigenases	5	60 % (3)	20 % (1)
C24	ácido cinâmico 4-hidroxilase	2	100 % (2)	0
C25	epoxide hydrolase	2	0	0
C26	stress inducible protein	2	0	0

A análise estatística revelou que dos 273 genes analisados, 171 (62,63 %) apresentaram expressão diferencial significativa ao nível de 5 % de probabilidade (Tabela 7, Figuras 24 a 26). Sendo que na interação *Citrus-G. citricarpa* 67 genes foram super-expressos e 104 genes foram reprimidos (Anexos 3 e 4, respectivamente). Destes 171 genes com expressão diferencial, 80 (46,78 %) apresentaram expressão diferencial significativa maior que 2 vezes, dos quais 38 genes foram induzidos e 42 foram reprimidos (Figuras 25 e 26). Na Figura 24 estão representados os valores de probabilidade que superaram o valor crítico de 5 %. Neste gráfico, o eixo *x* é log2 das diferenças estimadas (médias de quadrado mínimo) entre os dois tratamentos (Controle e com

sintomas de Pinta preta) e no eixo y é $-\log_{10}$ do valor de probabilidade (p-valor) pelo teste t, correspondente. De acordo com este gráfico (Figura 24), tem-se que os genes abaixo da linha horizontal (102) são pontos não significativos. Já, os 171 genes acima da linha horizontal: genes na secção superior à direita (42), na secção à esquerda (38) e seção central (91), têm alto valor-p, determinando estas diferenças como significativas. Sendo os 42 genes na secção superior à direita e os 38 genes na secção à esquerda os que apresentaram maiores diferenças entre os tratamentos (> do que duas vezes).

Figura 24 - Diferenças entre contrastes versus valor de probabilidade para os genes de *C. sinensis*. Cada ponto representa um único gene. Valores significativos ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t estão localizados acima da linha horizontal indicado pela seta

Os transcritos foram analisados pela similaridade a sequencias do *GenBank* do NCBI e a anotação dos 67 genes super-expressos, bem como dos 104 genes reprimidos está descrita nos Anexos 3 e 4, respectivamente.

Figura 25 - Total de genes com expressão diferencial e o número de genes com expressão diferencial maior que duas vezes para cada categoria.

Figura 26 - Porcentagem (com relação aos genes com expressão diferencial) de genes com expressão diferencial induzidos e reprimidos mais do que duas vezes, para cada categoria.

4.2.5 Transcritos de *C. sinensis* com expressão diferencial

4.2.5.1 Transcritos induzidos em folha com sintomas de pinta preta

Genes *R*: Dentre os 57 transcritos similares a genes *R* com expressão diferencial, 31 apresentaram expressão diferencial maior do que duas vezes (Figura 25), sendo que 14 deles apresentaram-se induzidos nos tecidos com sintomas da doença pinta preta. Entre os transcritos mais induzidos nesta classe de genes estão os transcritos similares a: RPM1 (AAT09451); disease resistance-like protein (AAO72594); *Citrus tristeza vírus resistance* (Ctv) de *Poncirus trifoliata* (AAN62350) que confere um amplo espectro de resistência a CTV em *P. trifoliata* (GMITTER et al., 1996) e pelos resultados (análise *in silico* e macroarranjo) em *Citrus* é expresso em condição de infecção por bactéria e fungo; Cf-5 de *Arabidopsis thaliana* (AAF78445); MRGH63 (AAO45749); ry-1 de *Solanum tuberosum* (CAC82811) que confere morte celular em batata após infecção pelo vírus Y (VIDAL et al., 2002); RPc de *Quercus suber* (AY526717); Hcr9-9D de *Lycopersicon pimpinellifolium* (CAA05275) sendo o único representante desta proteína em *C. sinensis* um *singleton* originário de biblioteca infectada por *X. fastidiosa*; rga S-9201 de *Hordeum vulgare* (CAD45029) cujo *contig* também apresentou expressão diferencial pela análise *in silico* em biblioteca de *P. trifoliata* infectada com o Vírus da tristeza dos citros; B149 de *Solanum bulbocastanum* (AAR29073) que confere amplo espectro de resistência à *Phytophthora infestans* na cultura de batata e tomate (VOSSEN et al., 2003) e cujo único *singleton* representante em *C. sinensis* é proveniente de biblioteca infectada com *X. fastidiosa*; RGC2 de *Lactuca sativa* (AAQ72576); RPS2 de arroz (BAD53266); Pt19 de *Citrus grandis* x *Poncirus trifoliata* (AAN08179) cujo representante é originário de biblioteca infectada com *X. fastidiosa*; e TMV resistance protein (BAB08447). A proteína ADR1 (*activated disease resistance 1*) que em *A. thaliana* confere resistência contra os patógenos biotróficos *Peronospora parasitica* e *Erysiphe cichoracearum* (GRANT et al., 2003), e apesar das análises *in silico* não sugerirem o envolvimento desta proteína nas interações citros-patógeno que foram sequenciadas, ela foi induzida na interação *C. sinensis*-*G. citricarpa*. Os transcritos induzidos no macroarranjo sugerem envolvimento deles neste tipo de interação. E os transcritos que tanto na análise *in silico* como no macroarranjo tiveram expressão diferencial induzida em condição de infecção por

patógeno, reforçam o seu papel na defesa de citros nesta condição e também na atuação contra o fungo responsável pela doença pinta preta.

Genes requeridos pelos genes *R*: Dos 5 desses transcritos que apresentaram expressão diferencial maior do que duas vezes, 2 apresentaram indução em folha com sintomas (Figura 25), sendo esses transcritos similares a RAR1 de *Nicotiana tabacum* (AAM62409) e SGT1 de *Nicotiana benthamiana* (AAO85509).

RAR1 é um componente fundamental para resistência mediada por diversos tipos de genes *R* em *Arabidopsis* (HOLT; BELKHADIR; DANGL, 2005; MUSKETT et al., 2002; TORNERO et al., 2002b). RAR1 contém dois domínios conservados necessários para interação física com a proteína SGT1 (AZEVEDO et al., 2002) e a interação entre estas duas proteínas parece ser essencial para as suas funções na defesa vegetal (AUSTIN et al., 2002; LIU et al., 2002b). SGT1 pode desempenhar um papel na acumulação de proteínas codificadas por genes *R* (AZEVEDO et al., 2006) e semelhante a RAR1, SGT1 é necessária para resistência mediada por variados genes *R* e resistência de plantas não hospedeiras em muitas espécies, incluindo *Arabidopsis*, tabaco, trigo e tomate (AUSTIN et al., 2002; LEISTER et al., 2005; SCHORNACK et al., 2004; SCOFIELD et al., 2005). Foi recentemente demonstrado que SGT1, mas não RAR1, é essencial para a resistência de amplo espectro de batata mediada pelo gene *RB* (BHASKAR et al., 2008).

Os ortólogos de arroz OsRAR1 e OsSGT1 também interagem fisicamente um com o outro e funcionam na resistência basal a bactéria *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* e ao fungo *Magnaporthe oryzae* (WANG et al., 2008). Os genes *Rar1* e *Sgt1* são necessários em vários tipos de resistência mediada por genes *R* contra vírus, bactérias e fungos (SHIRASU; SCHULZE-LEFERT, 2003).

RAR1 é um exemplo de um componente de sinalização envolvido na rota compartilhada por ambas as classes de genes de resistência CC-NB-LRR e TIR-NB-LRR (LIU et al., 2002b). Já que RAR1 é necessário para a função dos genes de resistência *RPM1* (TORNERO et al., 2002a) e *N* (LIU et al., 2002a) e como transcritos similares a estes genes também foram induzidos em laranja é de se esperar que o transcrito similar a RAR1 também seja induzido nesta espécie, o que realmente aconteceu, sugerindo efeito desses genes na tentativa defesa contra a Pinta preta. E

também como RAR1 e SGT1 podem interagir fisicamente originando resposta de defesa, é coerente que ocorra um aumento na expressão de ambos.

MAP kinases: Em plantas, alguns estudos têm demonstrado que MAP kinases são ativadas por estresses abióticos, ferimento, hormônios, durante interações planta-patógeno e divisão celular (ZHANG et al., 2006). Entre os transcritos de *C. sinensis* de maior expressão em folhas com sintomas de Pinta preta, destacam-se os que apresentaram similaridade com MAP kinases, 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). Dentre os 15 transcritos similares a MAPKs com expressão diferencial, 7 apresentaram expressão diferencial maior do que duas vezes (Figura 25), sendo 3 deles induzidos. E dos 29 transcritos MAP3Ks com expressão diferencial, 9 apresentaram expressão maior do que duas vezes (Figura 25), e 6 deles foram induzidos no tecido com sintomas da doença pinta preta. Os transcritos diferencialmente expressos, que também apresentaram expressão diferencial em condição de infecção por patógeno nas análises *in silico* no banco de dados do CitEST, são similares a diferentes MAPKs e MAP3Ks (Anexo 3). Destacando-se os transcritos similares a: o único *singleton* similar a MPK8 de *Arabidopsis thaliana* (NP_175756) e que é originário de biblioteca infectada por *X. fastidiosa* (CR05-C1-103-059-B03-CT.F), MAPK NTF3 de *Nicotiana tabacum* (CAA49592) e WIPK (*wound induced protein kinase*) (BAB79636), sendo este último um componente de cascatas de sinalização para ativar respostas da defesa tais como a expressão de genes relacionados à patogênese (PR) e resposta de hipersensibilidade (HR) e de resistência a doenças (YANG; LIU; ZHANG, 2001; JIN et al., 2003).

Também ocorreu aumento de expressão de um transcrito similar (e-135) a SIPK (*salicylic acid-induced protein kinase*) (AAB58396). Sendo que SIPK juntamente com WIPK forma a cascata de MAP kinases que é ativada por patógenos e promove a geração de espécies reativas de oxigênio nos cloroplastos, que desempenha um importante papel na sinalização para execução de HR e ativação de genes de defesa em plantas (LIU et al., 2007). WIPK e SIPK são MAP kinases requeridas para resistência a TMV dependente do gene *N* (ROMEIS et al., 1999; ZHANG; KLESSIG, 1998; JIN et al., 2003), sendo que um transcrito similar a esse gene também foi induzido, reforçando o papel coordenado destes transcritos na ativação para defesa de citros.

Estudos demonstram que MAPKs de planta, como SIPK e WIPK de tabaco, e seus ortólogos em outras espécies vegetais, são pontos de convergência após a percepção de diferentes agentes patogênicos e de elicitores derivados de patógenos na rede de sinalização de defesa (LIU et al., 2007). A ativação de SIPK sozinho mostrou ser suficiente para induzir a HR (REN et al., 2006; ZHANG; LIU, 2001). No entanto, o fenótipo de HR é atrasado na ausência da atividade de WIPK, confirmando que esta proteína apresenta um papel de regulador positivo na cascata MAPK, acelerando o processo de morte celular (LIU et al., 2003). Essas proteínas podem ser, portanto, importantes na sinalização para defesa de *C. sinensis* contra *Guignardia citricarpa*, no intuito de uma resposta de defesa mais rápida da planta na tentativa combater esse fungo.

Análises do perfil de expressão de mRNA sugerem a participação da MAPK de arroz WJUMK1 na resposta de defesa e desenvolvimento (AGRAWAL et al., 2003b). Um transcrito similar a esta MAPK (CAD54742) também foi induzido em *C. sinensis* sugerindo, que nessa espécie, este transcrito tenha uma provável função na resposta de defesa contra patógeno.

Durante a evolução, as plantas têm desenvolvido os seus próprios mecanismos de defesa contra agentes patogênicos. Componentes da superfície liberados pelo microorganismo e por seu hospedeiro podem atuar como moléculas sinalizadoras para a planta no evento de percepção do ataque do patógeno. Essas moléculas incluem fragmentos de oligossacarídeos gerados a partir de paredes celulares da própria planta e de fungos (FRY et al., 1993; FELIX; BAUREITHEL; BOLLER, 1998).

Algumas respostas de defesa iniciais, como o fluxo de íons em toda a membrana plasmática, a produção de espécies reativas de oxigênio, e fosforilação/desfosforilação de proteínas, são induzidos após tratamento com oligossacarídeos em muitas espécies vegetais (FELIX; BAUREITHEL; BOLLER, 1998; NAVAIZIO et al., 2002). A análise da MAP3K *oipk* (*oligochitosan-induced protein kinase*) (AAQ83971) de tabaco revelou que este gene foi expresso em níveis elevados após indução por oligoquitosana em tabaco selvagem, mas não em tabaco transgênico onde o gene sofreu silenciamento (FENG et al., 2006). Estes resultados indicam que *oipk* está envolvida na via de sinalização de resistência induzida por oligoquitosana, pois também ocorreu diminuição da atividade de fenilalanina amônia-liase e diminuição da resistência ao vírus do mosaico do tabaco (TMV) quando *oipk* foi silenciado no tabaco transgênico (FENG et al., 2006). Em *C. sinensis* um transcrito similar a OIPK também foi induzido, sugerindo possível envolvimento na defesa contra fungo, devido provavelmente pela indução por oligoquitosana

liberada a partir da parede celular da planta na tentativa do patógeno quebrar a parede para penetrar e/ou liberada devido ao arsenal enzimático da planta na tentativa de se defender digerindo a parede celular do fungo.

Dois transcritos similares a MAP3K CTR1 de *Brassica juncea* (AAP86286) e um similar a MAP3K de *Arabidopsis* (BAB01760) com expressão diferencial em bibliotecas infectadas do CitEST, também apresentaram expressão diferencial induzida em *C. sinensis* em condição de infecção pela *G. citricarpa* no experimento de macroarranjo, reforçando o possível envolvimento em resposta a interação citros-patógeno.

Mas também foram induzidos outros transcritos similares a MAP kinases que não apresentaram expressão diferencial em bibliotecas infectadas de acordo com as análises *in silico*, como os transcritos similares a: YDA (MAP3K) de *Arabidopsis thaliana* (AAR10436), três transcritos similares a MAP3K - CTR1 de arroz (BAD37611; XP_450193), o único *singleton* representante similar a MAP3K de *Brassica napus* (CAB54520), três MAP3K – ZIK1 de *Medicago sativa* (CAC84087), um transcrito similar a AtMPK3 de *Arabidopsis thaliana* (Q39023) e um similar a MAPK7 de arroz (BAD61401). Os resultados das análises *in silico* pode ser também devido a falta de uma biblioteca de folha infectada por fungo no CitEST, que pode apresentar mecanismos de infecção diferentes dos de bactérias e vírus, gerando respostas diferentes da planta durante a interação.

Interessantemente não ocorreu indução de nenhum dos três transcritos similares a MAP2K presentes nas membranas, sendo que 2 deles foram reprimidos. Pode ser que exista alguma outra MAP2K no genoma de laranja que não tenha sido sequenciada no projeto CitEST e que desempenha papel na sinalização contra patógeno fúngico, já que não foi feita biblioteca de folha de laranja infectado por fungo, ou a resposta de defesa oriunda da interação citros-*G. citricarpa* não necessite de um aumento na indução de MAP2K bastando para isso a indução de MAPK e MAP3K.

SnRKs: têm sido associados a processos celulares envolvidos em resposta a estresses nutricional e ambiental, que diminuem os níveis celulares de ATP em plantas (HARDIE, 1999; SUGDEN et al., 1999). SnRK1 é um intermediário na cascata de sinalização de açúcar (LU et al., 2007) e como açúcares regulam quase todos os processos fundamentais em todo o ciclo de vida das

plantas, incluindo a embriogênese, germinação, crescimento, desenvolvimento, reprodução, senescência, e respostas a doenças e estímulos ambientais (SMEEKENS, 2000; HALFORD; PAUL, 2003) são proteínas importantes a serem estudadas. Dos 13 transcritos similares a SnRKs com expressão diferencial, 5 apresentaram expressão diferencial maior do que duas vezes, sendo 3 desses transcritos induzidos no tecido com sintomas de pinta preta. Esses 3 transcritos são similares a: SOS2-PK5 de *Arabidopsis thaliana* (AAK26844), SOS2-PK8 de *A. thaliana* (AAK26847) e *osmotic stress-activated protein kinase* (NtOSAK) de *Nicotiana tabacum* (AAL89456) que está envolvido em rotas de sinalização de stress (KELNER et al., 2004).

Em resposta a elicitores fúngicos, a bomba de prótons da membrana plasmática é inibida por fosforilação por uma proteína quinase dependente de Ca^{2+} (LINO; BAIZABAL-AGUIRRE; DE LA VARA, 1998) e reativada por desfosforilação (XING; HIGGINS; BLUMWALD, 1996). Fuglsang et al. (2007) observaram que SOS2 - PKS5 regula negativamente a atividade da bomba de prótons e que fosforila a bomba de próton AHA2 de *Arabidopsis*, no sítio Ser-931, no domínio regulatório C-terminal. Esta fosforilação impede a interação com uma proteína ativadora, sugerindo que PKS5 é um regulador em uma rota de sinalização de Ca^{2+} controlando a atividade da bomba de próton e acidificação extracelular (FUGLSANG et al., 2007), podendo estar relacionada também a resistência a fungo em *C. sinensis* devido a sua atividade já relatada em *Arabidopsis* (FUGLSANG et al., 2007).

Síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS): Uma das respostas mais rápidas após a elicitação de células vegetais por um patógeno é o rápido aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS), altamente reativas e citotóxicas em todos os organismos, podendo ter ação antimicrobiana direta. Com relação aos genes envolvidos na explosão oxidativa que leva a resposta de hipersensibilidade e a resposta de defesa destacam-se NADPH oxidases e superóxido dismutases (SOD). Dos 6 transcritos de NADPH oxidase analisados pelo macroarranjo nenhum apresentou diferença de expressão maior do que duas vezes, mas apesar de apresentar diferença de expressão menor no macroarranjo um transcrito similar a NADPH oxidase (AAF97278) também apresentou expressão diferencial em biblioteca infectada, na análise *in silico* (*Poncirus* infectada pelo *Vírus da tristeza dos citros*). Dentre os 7 transcritos similares a SOD analisados 6 apresentaram expressão diferencial, sendo 3 com expressão diferencial maior do que duas vezes e

entre esses 2 foram induzidos (AAQ14591; P11796), sugerindo resposta da planta na tentativa de ativação de fatores de transcrição de outros genes relacionados à defesa e que são ativados por ROS.

O perfil de expressão de superóxido dismutase (Mn) de *Nicotiana plumbaginifolia* (P11796) é dramaticamente induzido durante condições de estresse, principalmente em culturas de tecidos como resultado do metabolismo do açúcar e também como parte da resposta de defesa da planta, sendo induzida pelo etileno, ácido salicílico e em infecção por *Pseudomonas syringae* (BOWLER et al., 1998) e agora foi observado ser induzido em laranja pelo fungo *Guignardia citricarpa*, sugerindo o envolvimento de MnSOD também na resposta de defesa em *C. sinensis*.

Síntese de fitoalexinas: Fitoalexinas são compostos de baixo peso molecular, que são sintetizados e acumulados em plantas depois da exposição a microorganismos (HAYASHI et al., 2008). Em *C. sinensis* foram induzidos transcritos que supostamente estão envolvidos na rota de síntese de fenilpropanóides e que podem acarretar na produção de vários compostos, entre eles as fitoalexinas. Neste contexto foram induzidos transcritos similares a: corismato mutase (CAA81286), fenilalanina-amônia liase de *Citrus limon* (Q42667), ácido cinâmico-4-hidroxilase e finalmente um dos transcritos que apresentou maior indução é o similar a chalcona sintase (AAM63130). Estes transcritos estão envolvidos na rota dos fenilpropanóides e em *C. sinensis* parecem estar envolvidos na defesa contra o fungo causador da Pinta preta, apesar de apenas um transcrito (entre 3) similar a corismato mutase e um similar a chalcona sintase apresentarem indução maior do que duas vezes.

Síntese de ácido salicílico: uma das enzimas da rota de produção de ácido salicílico é a isocorismato sintase, e os dois transcritos similares a essa enzima analisados no macroarranjo apresentaram expressão diferencial maior do que duas vezes (Figura 25), sendo que um deles foi induzido. O transcrito induzido é similar a isocorismato sintase de *Arabidopsis thaliana* (AAC97926). Esse transcrito é originário de um *contig* que também apresentou uma maior tendência de expressão em folhas de *C. sinensis* em estágio inicial de infecção por *X. fastidiosa*, reforçando o seu provável papel na defesa da espécie contra patógenos.

Síntese de proteínas PR: Enzimas de defesa das plantas incluem as proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas), como, por exemplo, β -1,3-glucanase e taumatina/ PR-5 (NG, 2004). Proteínas taumatina, pertencente ao grupo 5 das proteínas relacionadas à patogênese (PR-5), são proteínas comumente encontradas tanto em espécies mono como dicotiledôneas. A maioria das proteínas PR-5 conhecidas desempenham um papel na defesa contra fungos patogênicos (NG, 2004). Proteínas β -1,3-glucanases são enzimas hidrolíticas abundantes amplamente distribuídas em plantas (LEUBNER-METZGER et al., 1998) e parecem desempenhar um papel protetor em plantas (HWANG et al., 2007). β -1,3-glucanases hidrolisam ligações β -1,3 de glucanas, um dos principais componentes das paredes celulares de fungos, e exibem atividade antifúngica (HWANG et al., 2007). Além disso, oligossacarídeos liberados das paredes celulares dos patógenos, por sua ação podem induzir uma variedade de fatores de respostas contra patógenos (FELIX; BAUREITHEL; BOLLER, 1998; NAVAIZIO et al., 2002). Como o ácido salicílico estimula positivamente a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005), e cuja enzima de síntese também foi induzida, era de se esperar que taumatina e β -1,3-glucanases fossem induzidas em *C. sinensis* o que realmente foi observado. Das 4 proteínas PR com expressão diferencial maior do que duas vezes, as duas que foram induzidas são similares a PR-5/taumatina (BAA74546) e a beta-1,3-glucanase de *C. sinensis* (CAA03908). Sendo que esses transcritos também apresentaram expressão diferencial nas análises *in silico*: o transcrito PR-5 foi o terceiro mais induzido no macroarranjo e originário de *singleton* de biblioteca infectada por *X. fastidiosa*, e o transcrito beta-1,3-glucanase faz parte de um *contig* que apresenta tendência de expressão em biblioteca infectada por *X. fastidiosa* em *C. sinensis*, reforçando a suposta função na defesa de citros.

Ascorbato peroxidase: Na espécie resistente *Solanum nigrum*, não hospedeira de *Phytophthora infestans*, o aumento da atividade de ascorbato peroxidase após tratamento com o patógeno, quando o conteúdo de H_2O_2 da folha permaneceu constante, mas os primeiros pontos de HR já apareceram, chama a atenção para o papel primordial da ascorbato peroxidase no controle do nível de espécies reativas de oxigênio (POLKOWSKA-KOWALCZYK; WIELGAT; MACIEJEWSKA, 2007). Estudos também sugerem que a expressão de mRNAs de duas ascorbato peroxidase de arroz (OsAPX1 e OsAPX2) é desencadeada pelo ataque do patógeno

Magnaporthe grisea, importante fungo patogênico de arroz (AGRAWAL et al., 2003a). *M. grisea* induziu o acúmulo de OsAPX1 / 2, e os sintomas de HR observados nas plantas de arroz submetidas à interação incompatível com o patógeno fornece mais provas do envolvimento dessas ascorbato peroxidases durante a doença (AGRAWAL et al., 2003a). Das 5 peroxidases com expressão diferencial, 2 apresentaram expressão diferencial maior do que duas vezes (Figura 25) sendo um transcrito induzido. Esse transcrito é similar a ascorbato peroxidase (AAB52954), essa indução provavelmente ocorra para garantir o controle da explosão oxidativa, e já que a indução dessa proteína também foi observada em outras espécies em condição de infecção por patógenos (POLKOWSKA-KOWALCZYK; WIELGAT; MACIEJEWSKA, 2007; AGRAWAL et al., 2003a), demonstrando seu papel também durante a interação *C. sinensis*-*G. citricarpa*.

Canal de íon: O canal de íon CNGC4 é permeável a ambos K^+ e Na^+ , e a sua expressão é induzida em resposta à infecção por patógeno e alguns sinais relacionados à patógenos. Assim, HLM1, que codifica CNGC4 (MASER et al., 2001), pode ser considerado um componente comum da rota de sinalização desencadeando a HR e a consequente ativação de genes de defesa (BALAGUÉ et al., 2003). Dos 3 transcritos com expressão diferencial apenas 1 apresentou expressão maior do que duas vezes, sendo esse transcrito similar a CNGC4 (Q94AS9) induzido em folha de *C. sinensis* com sintomas da doença Pinta preta, confirmando que em *C. sinensis* CNGC4 também é induzido em resposta a patógeno.

Metacaspase: Caspases podem proteoliticamente ativar outras caspases ou utilizar vários substratos celulares, desencadeando a morte celular (UTZ; ANDERSON, 2000). Metacaspase 1 (LeMCA1) de tomate (AAM51555) está localizado na vizinhança imediata de vários genes que têm sido relacionados com a morte celular programada. Os níveis de mRNA de LeMCA1 aumentaram rapidamente após a infecção de folhas de tomate com *Botrytis cinerea*, um fungo patogênico que induz a morte celular em várias espécies vegetais (HOEBERICHTS; TEN HAVE; WOLTERING, 2003). Em laranja foi detectado um aumento de expressão de dois transcritos similares a metacaspase de tomate (AAM51555) e de *Arabidopsis* (AAP84706) em condição de infecção pelo fungo *G. citricarpa*. Sendo o transcrito semelhante a LeMCA1 o único

que apresentou expressão maior do que duas vezes e é derivado de biblioteca de folha de *P. trifoliata* infectada pelo *Vírus da tristeza dos citros*, sugerindo também o suposto envolvimento na resistência de *C. sinensis* a doença, como observado em outras espécies (HOEBERICHTS; TEN HAVE; WOLTERING, 2003).

4.2.5.2 Transcritos reprimidos em folha com sintomas de pinta preta

Genes R: Dos 31 transcritos similares a genes *R* com expressão diferencial maior do que duas vezes, 17 foram reprimidos. Apesar do gene *R Bs4* (*bacterial spot disease resistance protein 4*) codificar uma proteína TIR-NBS-LRR muito similar à proteína N de tabaco (WHITHAM et al., 1994) e Y-1 de batata (VIDAL et al., 2002), que foram induzidos em folha de laranja com sintomas de pinta preta, o transcrito similar ao gene *Bs4* de tomate (AAR21295), que reconhece especificamente *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (BALLVORA et al., 2001), foi reprimido, podendo esse gene estar relacionado mais a defesa contra bactérias em laranja, como ocorre em tomate (BALLVORA et al., 2001).

O transcrito similar ao gene *R* que codifica Xa26 de arroz, que confere resistência a um amplo espectro de raças do patógeno bacteriano *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (SUN et al., 2004), também parece estar mais relacionado a defesa contra bactéria pois em *C. sinensis* o transcrito similar foi inibido em condição de infecção pelo fungo *Guignardia citricarpa*, e pela análise *in silico* apresentou padrão de expressão em folha de *C. sinensis* e *C. reticulata* infectadas pela bactéria *X. fastidiosa*, reforçando o possível envolvimento na defesa contra bactérias.

Reuber e Ausubel (1996) observaram que AIG1 de *Arabidopsis* (AAM65167) apresenta indução dependente de RPS2 logo após a infecção com *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. Os autores acreditam que é possível que a HR regula negativamente a expressão de AIG1, pois após a infecção ocorre um aumento dessa proteína e então ocorre uma queda na expressão após o aparecimento da HR. Como o transcrito similar a AIG1 foi reprimido em laranja em condição de infecção no macroarranjo, pode ser que em *C. sinensis* o AIG1 já estivesse na fase de diminuição de expressão ou que realmente não seja ativado durante a interação citros-*G. citricarpa*.

Na espécie dicotiledônea *Arabidopsis* e na monocotiledônea cevada, a presença de isoformas específicas da família de proteínas MLO é necessária para o sucesso da invasão da

célula do hospedeiro por espécies de patógenos fúngicos (PANSTRUGA, 2005), e em laranja dois transcritos semelhantes à MLO (NP_192169; NP_201398) foram inibidos em condição de infecção, o que é coerente na tentativa de impedir a penetração do fungo.

MAP kinases: Entre os 29 transcritos similares a MAP3Ks com expressão diferencial, 9 apresentaram expressão maior do que duas vezes, e 3 deles foram reprimidos no tecido com sintomas da doença pinta preta, destacando-se um transcrito similar a MAP3K de cevada (AF305912), que tem função no topo de uma cascata de MAP kinase e regula negativamente respostas de defesa induzidas por ácido salicílico (FRYE; TANG; INNES, 2001). A inibição deste transcrito já era esperada, devido a sua função pelo menos em cevada, na tentativa de defesa da planta. Dos 3 transcritos de MAP2Ks analisados 2 foram reprimidos, sendo o transcrito similar a MAP2K LeMKK4 de tomate (AAU04436) um deles. Apesar de demonstrado que a superexpressão de LeMKK4 induz a morte celular em folhas de tomate e *N. benthamiana* (PEDLEY; MARTIN, 2004) este gene parece não estar envolvido na resposta de defesa de *C. sinensis*, pelo menos não na interação com o fungo patogênico *G. citricarpa* em tecido foliar onde já se apresentavam os sintomas da doença.

Superóxido dismutase: Dentre os 7 transcritos de SOD analisados 6 apresentaram expressão diferencial, sendo 3 com expressão diferencial maior do que duas vezes (Figura 25) e entre esses 1 foi reprimido. O transcrito reprimido é similar a Fe-superóxido dismutase de *Medicago sativa* (AAL32441), o que já era esperado já que esta proteína está intimamente relacionada a nódulos de leguminosas (RUBIO et al., 2001), e assim a expressão em citros parece estar relacionada a outros mecanismos que não na interação citros-*G. citricarpa*.

Corismato mutase: Os 3 transcritos similares a corismato mutase analisados no macroarranjo apresentaram expressão diferencial maior do que duas vezes, sendo 2 deles reprimidos. Esses transcritos apresentam similaridade a corismato mutase de *Arabidopsis* (NP_196648; AAM61395). Isso pode ter ocorrido devido a esses transcritos poderem ser específicos para a

síntese de fenilalanina para ser utilizada na síntese de outras proteínas que não as utilizadas para a defesa.

Isocorismato sintase: Além de ser uma enzima necessária para a biossíntese de ácido salicílico patógeno-induzida (WILDERMUTH et al., 2001) espera-se que isocorismato sintase esteja presente em todas as plantas verdes porque esta enzima também é um precursor do ácido o-succinilbenzóico, um intermediário na biossíntese de vitamina K1 (SIMANTIRAS; LEISTNER, 1989). Em cloroplastos vitamina K1 é necessária para o processo de fotossíntese onde funciona como um aceptor de elétrons no fotossistema I (VERMAAS, 1998). Plantas transgênicas de tabaco superexpressando isocorismato sintase apresentaram maior conteúdo de vitamina K1 do que as plantas selvagens (VERBERNE et al., 2007). Os dois transcritos similares a isocorismato sintase analisados no macroarranjo apresentaram expressão diferencial maior do que duas vezes (Figura 25), sendo que um deles foi induzido e o outro reprimido. Como no experimento de macroarranjo de *C. sinensis* ocorreu essa indução e supressão de dois transcritos diferentes semelhantes à isocorismato sintase pode ser que se trate de duas isoformas diferentes para esta enzima e que uma pode estar relacionada à síntese de ácido salicílico para a defesa (induzida) e a outra para a síntese de vitamina (reprimida). E como em condição de infecção a prioridade é a defesa da planta a isoforma responsável pela síntese de vitamina pode ter sido reprimida para se obter o máximo de rendimento na síntese de ácido salicílico. Uma vez que o transcrito induzido é originário de um *contig* que também apresentou uma maior tendência de expressão em folhas de *C. sinensis* infectadas por *X. fastidiosa* e o transcrito reprimido é oriundo de *contig* cujas sequências são originárias de tecidos saudáveis, reforçando a hipótese de duas isoformas diferencialmente expressas.

Como o ácido salicílico inibe ascorbatos peroxidase e catalase, duas enzimas que regulam o nível de ROS nas células (DURNER; KLESSIG, 1995; CONRATH et al., 1995), a atividade induzida de isocorismato sintase pode ter permitido a síntese de ácido salicílico em nível necessário para a inibição de peroxidases e catalases em *C. sinensis*.

Proteína PR: quitinase: A única proteína PR reprimida, com expressão diferencial maior do que duas vezes, apresenta similaridade a uma quitinase. Isoformas de quitinases são induzidas em plantas em resposta ao ataque de patógeno, outros estímulos ambientais e são igualmente expressas em certos tecidos de plantas durante o desenvolvimento normal (LINTHORST, 1991; SINGH; KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007). Um possível papel para as quitinases da classe II na defesa vegetal está em agir como moléculas sinalizadoras, liberando elicitores de hifas fúngicas invasoras e agindo como uma primeira linha de defesa (MAUCH; STAEHELIN, 1989). Apesar de certas quitinases serem comprovadamente induzidas em resposta a infecção por fungo (MAUCH; STAEHELIN, 1989; LINTHORST, 1991; SINGH; KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007) em *C. sinensis* um transcrito similar a quitinase da classe II de *C. jambhiri* (BAC20285) foi reprimido, sendo que este transcrito é originário de um *contig* que apresenta 60 sequencias exclusivamente de biblioteca de frutos, reforçando ainda mais o não envolvimento dessa isoforma da proteína em resposta ao ataque de patógeno e o provável envolvimento no desenvolvimento de citros.

Detoxificação de espécies reativas de oxigênio: A análise por macroarranjo revelou que 104 transcritos de *C. sinensis* foram reprimidos durante o processo de interação com o fungo causador dos sintomas de Pinta preta, sendo que destes 42 apresentaram expressão diferencial significativa maior que duas vezes. Dentre os transcritos que apresentaram uma função presumível, destaca-se 4 transcritos similares a peroxidases e 5 similares a catalases. Sendo que a única peroxidase reprimida que apresentou expressão diferencial maior do que duas vezes foi o segundo transcrito mais reprimido no macroarranjo, e todas as 4 catalases com expressão diferencial maior do que duas vezes foram reprimidas. Como H_2O_2 é removido por catalase ou peroxidases incluindo ascorbato e glutathione peroxidases (LAMB; DIXON, 1997) essa diminuição na expressão provavelmente seja para permitir a formação de H_2O_2 suficiente para a ativação de genes de defesa.

H_2O_2 é uma espécie reativa de oxigênio relativamente estável. Não sendo muito reativo e eletricamente neutro H_2O_2 é capaz de passar através das membranas celulares e chegar a células afastadas do local da sua formação. Em células vegetais, H_2O_2 recém-formado poderia ser: (a) espontaneamente quebrado ou com a participação de catalase para formar água e oxigênio

molecular, (b) utilizado como um substrato por várias peroxidases (por exemplo, para a geração de radicais, que são utilizados na síntese de lignina) ou (c) por detoxificação por ascorbato peroxidase (WOJTASZEK, 1997).

Isoenzimas de ascorbato peroxidase cloroplastidiais de espinafre (chlAPX) não mostraram alterações significativas no nível de transcrição em resposta a vários estresses (YOSHIMURA et al., 2000). A expressão constitutiva de chlAPX suporta a hipótese de que esta isoenzima funciona para detoxificar imediatamente o H_2O_2 gerado na organela sob condições normais e de stress (YOSHIMURA et al., 2000). Sob algumas condições de stress ocorreu redução gradual da atividade de chlAPX. Em laranja também ocorreu pequena redução nos níveis de transcrição de um transcrito similar a chlAPX (BAA78552) em condição de infecção pelo fungo causador da Pinta preta, podendo estar relacionado a elevação nos níveis de H_2O_2 na tentativa de ativação de respostas de defesa.

Ácido cinâmico 4-hidroxilase: C4H2 é constitutivamente expressa no flavedo de fruto de laranja e parece ter um papel de gene 'housekeeping' na rota de síntese de fenilpropanóides (BETZ; MCCOLLUM; MAYER, 2001). Os 2 transcritos similares a ácido cinâmico 4-hidroxilase analisados no macroarranjo apresentaram expressão diferencial, mas nenhum apresentou expressão maior do que duas vezes, sendo um induzido e um reprimido. Um transcrito, originário de um *contig* com padrão de expressão em bibliotecas de fruto, similar a C4H2 de *C. sinensis* (AAF66066), teve a sua expressão reprimida. Esta isoforma pode ter sido reprimida para poder liberar mais substrato para a outra isoforma que foi induzida no intuito de obter uma maior resposta de defesa da planta infectada.

4.3 PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-PCRq)

4.3.1 RT-PCRq com cDNA de folha

Transcritos diferencialmente expressos entre folha com sintomas de pinta preta e folha sadia indicados por macroarranjo foram selecionados para serem validados por RT-PCRq. Foram

selecionados os genes induzidos em folha com pinta preta similares a: SGT1 (AAO85509) - *Contig 3*; RPM1 (putative NBS-LRR type disease resistance protein - AAT09451) - *Contig 95*; a MAPK WIPK (wound induced protein kinase - BAB79636) - *Contig 93*; MAP3K (putative ethylene-inducible CTR1-like protein kinase - BAD37611) - *Contig 23* e MAP3K (epsilon 1 protein kinase - CAB54520) - *Singleton*. E os transcritos similares a: MAP3K (gamma protein kinase - CAA74696) - *Contig 91*; catalase (P49317) - *Singleton*; peroxidase (AAD33072) - *Singleton* e HIN1 (harpin-induced protein 1 family - NP_566396) - *Contig 1*, foram selecionados para serem validados entre os transcritos quantificados como reprimidos em folha com sintomas de pinta preta (ou seja, mais expressos em folha sadia).

A especificidade dos *primers* utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real foi confirmada pela visualização da eletroforese em gel de agarose 1 %. Como apresentado na Figura 27, todas as reações apresentaram amplificação de apenas um fragmento de DNA, com tamanho específico para cada par de *primer* testado: (1): MAPK WIPK - *Contig 93*, 227 pb; (2): MAP3K - *Contig 23*, 211 pb; (3): MAP3K - *Singleton*, 170 pb; (4): SGT1 - *Contig 3*, 181 pb; (5): RPM1 - *Contig 95*, 115 pb; (6): MAP3K - *Contig 91*, 192 pb; (7): HIN1 - *Contig 1*, 200 pb; (8): catalase, 183 pb; (9): peroxidase, 156 pb; (10): Actina (Controle), 120 pb (Tabela 1; Figura 27).

Também foi avaliada a temperatura de desnaturação (curva de *melting*) de cada produto da reação de RT-PCRq, cuja finalidade foi diferenciar os produtos amplificados dos possíveis dímeros de *primers* e/ou produtos inespecíficos (Figura 28). Na Figura 29, é possível verificar as curvas de detecção da fluorescência (Ct) emitida em cada experimento. Não foram detectadas amplificações inespecíficas e nem formação de dímeros de *primers* durante os 40 ciclos de amplificação.

Com o objetivo de validar os resultados obtidos no macroarranjo, o método escolhido foi o de quantificação relativa de expressão gênica, por se tratar de um método que permite quantificar transcritos pouco abundantes de forma rápida e precisa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001). A quantificação é relativa porque os valores de expressão dos genes analisados são previamente normalizados em relação ao valor de expressão do gene de referência na mesma amostra de cDNA, evitando-se a o uso de controles prévios para calibração do equipamento (PFAFFL, 2001).

Para o macroarranjo foram utilizados dois genes controle, o GAPDH e o da β -actina, sendo que este último apresentou padrão mais homogêneo entre as repetições e os tratamentos no

macroarranjo e, por isso, foi o controle selecionado para determinação do nível de expressão por RT-PCRq.

Figura 27 - Confirmação da especificidade dos primers com base na visualização dos produtos de PCR esperados. *M*: marcador molecular (1 kb plus DNA Ladder - Invitrogen). As letras *B*, *C* e *T* referem-se às amostras: Branco (água), Controle (folha sadia) e Tratamento (folha com sintomas de Pinta preta), respectivamente. Os números referem-se aos *primers* dos seguintes transcritos: (1): MAPK WIPK - *Contig* 93, 227 pb; (2): MAP3K - *Contig* 23, 211 pb; (3): MAP3K - *Singleton*, 170 pb; (4): SGT1 - *Contig* 3, 181 pb; (5): RPM1 - *Contig* 95, 115 pb; (6): MAP3K - *Contig* 91, 192 pb; (7): HIN1 - *Contig* 1, 200 pb; (8): catalase, 183 pb; (9): peroxidase, 156 pb; (10): Actina, 120 pb. Abaixo de 100 pb são DNTPs e *primers* não incorporados na reação.

Figura 28 - Resultado das amplificações em RT-PCRq de *C. sinensis* para cada par de *primer*: curvas de dissociação (*melting*) dos *primers*, na qual pode-se observar a especificidade de pareamento e a ausência de dímeros, fatores relevantes na eficiência de amplificação

Figura 29 - Resultado das amplificações em RT-PCRq de *C. sinensis* para cada par de *primer*: curva de detecção da fluorescência emitida durante o ciclo da amplificação

Todos os cálculos de $\Delta\Delta C_t$ foram realizados tendo a média de C_t determinada no tratamento com sintomas de pinta preta como referência, de forma que, valores positivos indicam maior expressão no tecido com sintomas (indução) e valores negativos indicam maior expressão no tecido sadio (repressão no tecido com pinta preta) [ΔC_t gene alvo (na interação citros-pinta preta) - ΔC_t gene no tratamento controle (folha sadia)].

Como mostrado na Tabela 8 e Figuras 30 e 31, os dados obtidos através da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) indicam que a técnica de RT-PCRq confirmou aqueles genes que apresentaram super-expressão em macroarranjo e somente um gene reprimido (MAP3K - *Contig 91*) não confirmou a expressão diferencial por esta metodologia.

Tabela 8 - Análise dos dados de RT-PCRq dos genes de folha de *C. sinensis* com sintoma de Pinta preta e sadio, utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) para a determinação das diferenças em expressão entre os tecidos amostrados

Tratamento	VMCt ¹	ΔCt^2	$\Delta\Delta Ct^3$	Razão ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Genes induzidos				
MAP3K - <i>Contig 23</i> (com sintomas)	25,22	0,97	-1,23	2,345
MAP3K - <i>Contig 23</i> (sadio)	25,525	2,2		
MAP3K - <i>Singleton</i> (com sintomas)	31,075	6,635	-0,89	1,853
MAP3K - <i>Singleton</i> (sadio)	30,645	7,525		
RPM1 - <i>Contig 95</i> (com sintomas)	32,81	5,156	-1,131	2,191
RPM1 - <i>Contig 95</i> (sadio)	31,06	6,288		
SGT1 - <i>Contig 3</i> (com sintomas)	26,271	-0,786	-0,908	1,876
SGT1 - <i>Contig 3</i> (sadio)	25,976	0,121		
MAPK WIPK - <i>Contig 93</i> (com sintomas)	22,723	-4,998	-1,578	2,986
MAPK WIPK - <i>Contig 93</i> (sadio)	23,205	-3,42		
Genes reprimidos				
MAP3K - <i>Contig 91</i> (com sintomas)	27,455	0,396	-1,317	2,492
MAP3K - <i>Contig 91</i> (sadio)	27,758	1,714		
HIN1 - <i>Contig 1</i> (com sintomas)	26,511	-1,222	-0,699	-1,623
HIN1 - <i>Contig 1</i> (sadio)	23,933	-1,921		
catalase (com sintomas)	24,49	-1,356	-1,336	-2,525
catalase (sadio)	21,418	-2,693		
peroxidase (com sintomas)	29,456	4,663	-1,896	-3,723
peroxidase (sadio)	27,06	2,766		

1: VMCt: valor médio do Ct; 2: ΔCt (VMCt do gene alvo - VMCt do gene β -actina); 3: $\Delta\Delta Ct$ [ΔCt gene alvo (na interação citros-pinta preta) - ΔCt gene no tratamento controle (folha sadia)]

Figura 30 - Análise dos dados de RT-PCRq utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os números positivos representam a quantificação relativa (razão) dos genes de *C. sinensis* que apresentaram maior expressão em folha com sintomas de Pinta preta e os números negativos representam maior expressão em folha sadia

Embora a maioria dos genes identificados pelo macroarranjo como diferentemente expressos foi confirmado pela técnica de RT-PCRq, houve uma diferença na intensidade de expressão revelada por estas duas técnicas. Estas diferenças podem ser visualizadas na Figura 31. Por exemplo, o transcrito MAP3K - *Contig 23* foi o mais expresso em macroarranjo em folha com sintomas de pinta preta, mas não foi o mais expresso na técnica de RT-PCRq, sendo o gene MAPK WIPK (MAPK - *Contig 93*) o que apresentou maior expressão pelo RT-PCRq. E o gene peroxidase foi o mais reprimido em folha com sintomas (mais expresso em folha sadia) nas duas técnicas utilizadas.

Figura 31 - Comparação dos valores obtidos na expressão diferencial de genes de folha *C. sinensis* com sintomas de Pinta preta e sadia, analisados por macroarranjo e por RT-PCRq

Apesar dos resultados obtidos revelarem uma diferença de estimativa da intensidade de expressão entre os genes avaliados pelas duas metodologias, uma vez que se trata de duas técnicas diferentes, ambas foram eficientemente aplicadas neste trabalho. Dos 9 genes utilizados para confirmação da expressão do macroarranjo, 8 genes tiveram sua expressão diferencial confirmada por PCR quantitativo em tempo real. As informações sobre a quantificação do nível de expressão de genes diferencialmente expressos em condição de infecção pela *Guignardia citricarpa* são interessantes para se tentar compreender o padrão de resposta de *C. sinensis* na interação com o fungo. Estas informações permitiram visualizar o perfil molecular dos genes selecionados durante a interação. Desta forma, os genes identificados como diferencialmente expressos constituem fortes candidatos para estudos futuros, uma vez que a diferença de expressão foi confirmada por macroarranjo e validada por RT-PCRq.

4.3.2 RT-PCRq: comparação da diferença de expressão de genes de folha e fruto com sintomas da doença pinta preta e sadios

Os mesmos genes analisados para a validação do macroarranjo através de RT-PCRq foram estudados pela mesma técnica para observar a diferença de expressão em fruto (flavado) com sintomas de pinta preta e sadios (Figura 32 e Tabela 9). E como era esperado ocorreu diferença de expressão dos genes estudados em folha e fruto, com relação ao tecido contaminado e sadio, o que poderia explicar a diferença no nível de sintomas observados, já que são muito mais frequentes em fruto do que em folha. Os genes que diferiram marcadamente ao nível de expressão de fruto e folha foram: RPM1 que em folha foi induzido no tecido com sintomas (2,2 vezes mais expresso no tecido com sintomas com relação ao tecido sadio) (Figura 32) e em fruto foi reprimido no tecido com pinta preta e o contrário ocorreu com os genes HIN1 e catalase (em folha foram reprimidos no tecido com sintomas e em fruto foram induzidos) (Figura 32).

Figura 32 - Comparação dos valores obtidos na expressão diferencial de genes de folha e fruto (flavado) de *C. sinensis* com sintomas de Pinta preta e sadia, analisados por RT-PCRq

Tabela 9 - Análise dos dados de RT-PCRq dos genes de fruto (flavado) de *C. sinensis* com sintoma de Pinta preta e sadio, utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) para a determinação das diferenças em expressão entre os tecidos amostrados

Tratamento	VMCt ¹	ΔCt ²	ΔΔCt ³	Razão (2 ^{-ΔΔCt})
Genes induzidos no tratamento com sintomas pelo RT - PCRq				
MAP3K - <i>Contig 23</i> (com sintomas)	27,075	2,5325	-2,5625	5,907
MAP3K - <i>Contig 23</i> (sadio)	27,99	5,095		
MAP3K - <i>Singleton</i> (com sintomas)	32,375	7,8325	-1,8125	3,512
MAP3K - <i>Singleton</i> (sadio)	32,54	9,645		
MAP3K - <i>Contig 91</i> (com sintomas)	28,035	3,025	-1,7425	3,346
MAP3K - <i>Contig 91</i> (sadio)	27,662	4,767		
SGT1 - <i>Contig 3</i> (com sintomas)	25,4825	0,94	-0,705	1,630
SGT1 - <i>Contig 3</i> (sadio)	24,54	1,645		
MAPK WIPK - <i>Contig 93</i> (com sintomas)	29,125	5,7975	-2,725	6,612
MAPK WIPK - <i>Contig 93</i> (sadio)	29,9025	3,0725		
HIN1 - <i>Contig 1</i> (com sintomas)	22,7975	-1,745	-1,095	2,136
HIN1 - <i>Contig 1</i> (sadio)	22,245	-0,65		
catalase (com sintomas)	25,2575	0,715	-0,82	1,765
catalase (sadio)	24,43	1,535		
Genes reprimidos no tratamento com sintomas pelo RT - PCRq				
RPM1 - <i>Contig 95</i> (com sintomas)	31,235	6,6925	-0,5525	- 1,466
RPM1 - <i>Contig 95</i> (sadio)	29,035	6,14		
peroxidase (com sintomas)	29,255	4,245	-3,065	- 8,368
peroxidase (sadio)	23,075	1,18		

1: VMCt: valor médio do Ct; 2: ΔCt (VMCt do gene alvo - VMCt do gene β -actina); 3: $\Delta\Delta Ct$ [ΔCt gene alvo (na interação citros-pinta preta) - ΔCt gene no tratamento controle (flavado sadio)]

Uma das principais repostas dos vegetais aos estresses bióticos ou abióticos é a aceleração na produção das espécies reativas de oxigênio (ROS). O balanço entre a formação e a detoxificação destas espécies é crítico para a sobrevivência da célula (MITTLER, 2002). A produção de espécies reativas de oxigênio, em resposta ao ataque de um patógeno é uma das marcas da defesa vegetal. ROS são formadas pela redução incompleta do oxigênio em água, resultando na produção de superóxidos, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio. Geralmente,

o acúmulo de ROS leva ao aumento da síntese de ácido salicílico, a resposta de hipersensibilidade (HR) no local da infecção, e subsequente indução de genes relacionados à patogênese (DEMPSEY; SHAH; KLESSIG, 1999; LAMB; DIXON 1997).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma das espécies reativas de oxigênio formadas, inibe o crescimento e a viabilidade de diversos patógenos (WU et al., 1995). A geração de H_2O_2 na hora e local corretos dificultou o sucesso da penetração fúngica de plantas em três diferentes sistemas planta - fungo (*Erysiphe cichoracearum* - *Vigna unguiculata* cv. Dixie Cream; *Colletotrichum coccodes* - tomate; *Uromyces vignae* - ervilha) (MELLERSH et al., 2002).

Catalases são importantes no desenvolvimento de plantas, na defesa, envelhecimento, e senescência (YANG; POOVAIAH, 2002). Catalase é uma enzima antioxidante importante que converte H_2O_2 em água. Mecanismos para destoxificar as espécies reativas de oxigênio como a catalase são reprimidas durante a HR, um processo que potencializa a indução de morte celular programada e outras defesas devido ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio, que resulta da diminuição da capacidade das células para eliminar H_2O_2 durante a HR (MITTLER; FENG; COHEN, 1998; DOREY et al., 1998).

O equilíbrio entre a atividade de enzimas como a superóxido dismutase e enzimas antioxidantes que degradam H_2O_2 , como a catalase, por exemplo, é crucial para controlar o estado de equilíbrio dos níveis de ROS e do desenvolvimento da morte celular da planta (MITTLER; FENG; COHEN, 1998). Por exemplo, plantas transgênicas de tabaco com reduzido nível de expressão de catalase, mostraram uma maior sensibilidade para a morte celular induzida por bactérias durante a HR (MITTLER et al., 1999).

Devido à repressão da catalase desempenhar um papel importante na ativação de HR (MITTLER et al., 1999), e as espécies reativas de oxigênio serem importantes na morte celular e na ativação de genes de defesa, é interessante no processo de resistência que as enzimas antioxidantes sejam reprimidas durante infecção por patógeno, o que não ocorreu em fruto pelo menos com a catalase estudada em relação ao fungo *Guignardia citricarpa*, onde a catalase foi quase duas vezes mais induzida no tecido com pinta preta e em folha foi mais de duas vezes reprimida (Figura 32), podendo ser este um dos diferenciais de expressão que levam a maior suscetibilidade de fruto do que de folha.

Foi observado que *hin1* está relacionado a genes de HR e que apresenta ativação específica rápida e de alto nível em resposta a HR induzida por bactérias, sendo ativado por

elicitor *harpin* bacteriano e por bactérias com cluster gênico *hrp* (*hypersensitive reaction and pathogenicity*) funcional (GOPALAN; WEI; HE, 1996). O nível de transcrição de um gene *hin1* de arroz (*OsHin1*) subiu rapidamente, mas transitoriamente em 30 minutos a 2 h após a adição de um elicitor de oligossacarídeo do patógeno fúngico *Magnaporthe grisea*, diminuindo após 8 a 12 h após o tratamento (KIM et al., 2000). HIN1 também é predominantemente acumulado nas fases tardias de senescência de folha e flor (PONTIER et al., 1999; TAKAHASHI et al., 2004b). Talvez a expressão deste gene em *C. sinensis* seja dependente do tecido, podendo ter relação com a tentativa de defesa em fruto (pois foi mais expressa em tecido com sintomas da doença pinta preta) (Figura 32) e com senescência em folha, e como as folhas sadias utilizadas não estavam em processo de senescência o gene foi reprimido (Figura 32).

A proteína RPM1 (proteína de resistência a *Pseudomonas maculicola* 1) de *Arabidopsis* reconhece a ação de duas proteínas efetoras distintas do tipo III, proteína de avirulência Rpm1 (*AvrRpm1*) e proteína de avirulência B (*AvrB*), que são encontrados em várias estirpes do patógeno de plantas *Pseudomonas syringae* (BISGROVE et al., 1994; GRANT et al., 1995). O gene *Lr10* de trigo apresenta similaridade com *RPM1* de *Arabidopsis thaliana* e com genes de resistência análogos de arroz e cevada (FEUILLET et al., 2003). Quando superexpressa em plantas transgênicas de trigo, *Lr10* confere resistência à ferrugem foliar causada pelo fungo patogênico *Puccinia triticina* (FEUILLET et al., 2003). E pelos resultados do PCR em tempo real parece ser ativado em folha de laranja infectada pela *G. citricarpa* (onde foi duas vezes mais induzida do que no tecido sadio) podendo ser um gene tecido-específico e estar envolvida na defesa da planta pelo menos em tecido foliar, já que em fruto foi reprimido (Figura 32).

5 CONCLUSÕES

- O banco de dados específico de citros (CitEST) tornou possível identificar em espécies de *Citrus*, genes que podem estar envolvidos nos mecanismos de defesa de citros tais como canais de cálcio e íons, corismato mutase, isocorismato sintase, metacaspase e nitrato redutase, que não existiam no banco de dados do NCBI até o presente momento;
- A técnica de macroarranjo mostrou ser sensível o suficiente para analisar um grande número de genes e identificar genes diferencialmente expressos durante a interação de *Citrus sinensis* com o fungo *G. citricarpa*;
- As variações na expressão gênica de *C. sinensis* na interação com *G. citricarpa* detectadas por macroarranjo foram proporcionalmente confirmadas por PCR quantitativo em tempo real (RT-PCRq), demonstrando a confiabilidade dos resultados do macroarranjo;
- Sob o efeito da interação *C. sinensis*-*G. citricarpa* a tecnologia de macroarranjo identificou genes de citros sendo induzidos e reprimidos. Estes genes são fortes candidatos para manipulação molecular e transformação genética de plantas na tentativa de obter novas variedades com resistência a patógenos;
- As diferenças de expressão gênica existentes, como as confirmadas no presente trabalho, devem contribuir para a maior frequência de sintomas observados da doença Pinta preta em fruto do que em folha.

REFERÊNCIAS

- AARTS, N.; METZ, M.; HOLUB, E.; STASKAWICZ, B.J.; DANIELS, M.J.; PARKER, J.E. Different requirements for *EDS1* and *NDR1* by disease resistance genes define at least two *R* gene-mediated signalling pathways in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 95, p. 10306-10311, 1998.
- ADE, J.; DEYOUNG, B.J.; GOLSTEIN, C.; INNES, R.W. Indirect activation of a plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein by a bacterial protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 104, p. 2531-2536, 2007.
- AGUILAR-VILDOSO, C.I. **Caracterização genética de estirpes de *Phytophthora parasitica*, isoladas de plantas cítricas no Estado de São Paulo**. 1997. 98 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.
- AGRAWAL, G.K.; JWA, N.S.; IWAHASHI, H.; RAKWAL, R. Importance of ascorbate peroxidases OsAPX1 and OsAPX2 in the rice pathogen response pathways and growth and reproduction revealed by their transcriptional profiling. **Gene**, Amsterdam, v. 322, p. 93-103, 2003a.
- AGRAWAL, G.K.; AGRAWAL, S.K.; SHIBATO, J.; IWAHASHI, H.; RAKWAL, R. Novel rice MAP kinases OsMSRMK3 and OsWJUMK1 involved in encountering diverse environmental stresses and developmental regulation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 300, n. 3, p. 775-783, 2003b.
- AHARONI, A.; O’CONNELL, A.P. Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 2073-2087, 2002.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto v. 55, p. 373-399, 2004.
- THE ARABIDOPSIS genome initiative. analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, London, v. 408, p. 796-815, 2000.
- ASAI, S.; OHTA, K.; YOSHIOKA, H. MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 20, n. 5, p.1390-406, 2008.
- ASAI, T.; TENA, G.; PLOTNIKOVA, J.; WILLMANN, M.R.; CHIU, W.L.; GOMEZ-GOMEZ, L.; BOLLER, T.; AUSUBEL, F.M.; SHEEN, J. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. **Nature**, London, v. 415, p. 977-983, 2002.

ASSOCITRUS. Disponível em:< www.associtrus.com.br>. Acesso em: 21 out. 2008

ASTUA-MONGE, G.; FREITAS-ASTUA, J.; MACHADO, M.A. Biotecnologia gera produtividade e citros sadios. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 2, p. 48-53, 2004.

ATKINSON, M.M.; KEPPLER, L.D.; ORLANDI, E.W.; BAKER, C.J.; MISCHKE, C.F. Involvement of plasma membrane calcium influx in bacterial induction of the K^+/H^+ and hypersensitive responses in tobacco. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 92, p. 215-221, 1990.

AUSTIN, M.J.; MUSKETT, P.; KAHN, K.; FEYS, B.J.; JONES, J.D.; PARKER, J.E. Regulatory role of SGT1 in early *R* gene-mediated plant defenses. **Science**, Washington, v. 295, p. 2077-2080, 2002.

AVERNA-SACCÁ, R. Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas por *Phoma citricarpa*. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 15, p. 468-475, 1940.

AYLIFFE, M.A.; LAGUDAH, E.S. Molecular genetics of disease resistance in cereals. **Annals of Botany**, Oxford, v. 94, p. 765-773, 2004.

AZEVEDO, C.; SADANOM, A.; KITAGAWA, K.; FREIALDENHOVEN, A.; SHIRASU, K.; SCHULZE-LEFERT, P. The *RAR1* interactor *SGT1*, an essential component of *R* gene-triggered disease resistance. **Science**, Washington, v. 295, p. 2073-2076, 2002.

AZEVEDO, C.; BETSUYAKU, S.; PEART, J.; TAKAHASHI, A.; NOEL, L.; SADANANDOM, A.; CASAIS, C.; PARKER, J.; SHIRASU, K. Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 25, p. 2007-2016, 2006.

BALAGUÉ, C.; LIN, B.; ALCON, C.; FLOTTES, G.; MALMSTROM, S.; KOHLER, C.; NEUHAUS, G.; PELLETIER, G.; GAYMARD, F.; ROBY, D. HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 365-379, 2003.

BALDASSARI, R.B.; WICKERT, E.; GOES, A. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from *Citrus* spp. **European Journal of Plant Pathology**, Amsterdam, v. 120, p. 103-110, 2008.

BALDASSARI, R.B.; BRANDIMARTE, I.; ANDRADE, A.G. de; SOUZA, D.C.G. de; MORETTO, C.; GOES, A. Indução da expressão precoce de sintomas de *Guignardia citricarpa* em frutos de laranja 'Pêra-Rio'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 269-275, 2007.

BALLVORA, A.; PIERRE, M.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.; SCHORNACK, S.; ROSSIER, O.; GANAL, M.; LAHAYE, T.; BONAS, U. Genetic mapping and functional analysis of the tomato *Bs4* locus, governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AvrBs4 protein. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, p. 629-638, 2001.

BATELLI, G.; VERSLUES, P.E.; AGIUS, F.; QIU, Q.; FUJII, H.; PAN, S.; SCHUMAKER, K.S.; GRILLO, S.; ZHU, J.K. SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H⁺-ATPase and upregulating its transport activity. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 27, n. 22, p. 7781-7790, 2007.

BELKHADIR, Y.; NIMCHUK, Z.; HUBERT, D.A.; MACKEY, D.; DANGL, J.L. *Arabidopsis* RIN4 negatively regulates disease resistance mediated by RPS2 and RPM1 downstream or independent of the NDR1 signal modulator and is not required for the virulence functions of bacterial type III effectors AvrRpt2 or AvrRpm1. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 2822-2835, 2004.

BERNET, G.P.; BRETÓ, M.P.; ASINS, M.J. Expressed sequence enrichment for candidate gene analysis of citrus tristeza virus resistance. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 108, p. 592-602, 2004.

BETZ, C.; MCCOLLUM, T.G.; MAYER, R.T. Differential expression of two cinnamate 4-hydroxylase genes in 'Valencia' orange (*Citrus sinensis* Osbeck). **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 46, p. 741-748, 2001.

BEZERRA, I.C. Análise de RNA pela técnica de *Northern Blot*. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, SPI: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. cap. 15, p. 223-238.

BHALERAO, R.P.; SALCHERT, K.; BAKÓ, L.; ÖKRÉSZ, L.; SZABADOS, L.; MURANAKA, T.; MACHIDA, Y.; SCHELL, J.; KONCZ, C. Regulatory interaction of PRL1 WD protein with *Arabidopsis* SNF1-like protein kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 96, p. 5322-5327, 1999.

BHASKAR, P.B.; RAASCH, J.A.; KRAMER, L.C.; NEUMANN, P.; WIELGUS, S.M.; AUSTIN-PHILLIPS, S.; JIANG, J. *Sgt1*, but not *Rar1*, is essential for the RB-mediated broad-spectrum resistance to potato late blight. **BMC Plant Biology**, London, v. 8, n. 1, 2008. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/8/8>>. Acesso em: 27 nov. 2008.

BISGROVE, S.R.; SIMONICH, M.T.; SMITH, N.M.; SATTLER, N.M.; INNES, R.W. A disease resistance gene in *Arabidopsis* with specificity for two different pathogen avirulence genes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 927-933, 1994.

BITTNER-EDDY, P.D.; CRUTE, I.R.; HOLUB, E.B.; BEYNON, J.L. *RPP13* is a simple locus in *Arabidopsis thaliana* for alleles that specify downy mildew resistance to different avirulence determinants in *Peronospora parasitica*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 21, p. 177-188, 2000.

BOTEON, M.; NEVES, E.M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo; Fundag, 2005. cap. 2, p. 19-36.

BOUDSOCQ, M.; BARBIER-BRIGOO, H.; LAURIÈRE, C. Identification of nine Sucrose Nonfermentig 1 – Related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 279, p. 41758-41766, 2004.

BOUDSOCQ, M.; DROILLARD, M.J.; BARBIER-BRYGOO, H.; LAURIÈRE, C. Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 63, n. 4, p. 491-503, 2007.

BOWLER, C.; ALLIOTTE, T.; DE LOOSE, M.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. The induction of manganese superoxide dismutase in response to stress in *Nicotiana plumbaginifolia*. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 8, n. 1, p. 31-38, 1998.

BRADFORD, K.J.; DOWNIE, A.B.; GEE, O.H.; ALVARADO, V.; YANG, H.; DAHAL, P. Absciscic acid and gibberellin differentially regulate expression of genes of the SNF1-related kinase complex in tomato seeds. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 132, p. 1560-1576, 2003.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 25, p. 169-93, 2000.

CAIXETA, M.P.; CORAZZA, M.J.; OLIVEIRA, R.R.; ZANUTTO, C.A.; NUNES, W.M.C.; VIDA, J.B. Caracterização morfofisiológica e identificação molecular de isolados de *Guignardia citricarpa*, agente patogênico da mancha preta dos citros. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 30, p. 625-630, 2008. Suplemento.

CANNON, S.B.; ZHU, H.; BAUMGARTEN, A.M.; SPANGLER, R.; MAY, G.; COOK, D.R.; YOUNG, N.D. Diversity, distribution, and ancient taxonomic relationships within the TIR and non-TIR NBS–LRR resistance gene subfamilies. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 54, p. 548-562, 2002.

CAO, H.; GLAZEBROOK, J.; CLARKE, J.D.; VOLKO, S.; DONG, X. The *Arabidopsis NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. **Cell**, Cambridge, v. 88, p. 57-63, 1997.

CARDINALE, F.; JONAK, C.; LIGTERINK, W.; NIEHAUS, K.; BOLLER, T.; HIRT, H. Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, p. 36734-36740, 2000.

CARLSON, M.; OSMOND, B.C.; BOTSTEIN, D. Mutants of yeast defective in sucrose utilization. **Genetics**, Austin, v. 98, p. 25-40, 1981.

CARRARO, D.M.; LAMBAIS, M.R.; CARRER H *In silico* characterization and expression analyses of sugarcane putative sucrose non-fermenting-1 (SNF1) related kinases. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, p. 35-41, 2001.

CASSOLI, C.S.S. **Identificação e análise de etiquetas de sequencias expressas (ESTs) na hipófise e hipotálamo de *Gallus gallus***. 2007. 128 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CELENZA, J.L.; CARLSON, M. Cloning and genetic mapping of SNF1, a gene required for expression of glucose-repressible genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 4, p. 49-53, 1984.

CENTURY, K.S.; HOLUB, E.B.; STASKAWICZ, B.J. *NDRI*, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and fungal pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 92, p. 6597–6601, 1995.

CENTURY, K.S.; SHAPIRO, A.D.; REPETTI, P.P.; DAHLBECK, D.; HOLUB, E.; STASKAWICZ, B.J. *NDRI*, a pathogen-induced component required for *Arabidopsis* disease resistance. **Science**, Washington, v. 278, p. 1963–1965, 1997.

CHAMPION, A.; PICAUD, A.; HENRY, Y. Reassessing the MAP3K and MAP4K relationships. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, p. 123-129, 2004.

CHINI, A.; LOAKE, G.J. Motifs specific for the ADR1 NBS - LRR protein family in *Arabidopsis* are conserved among NBS - LRR sequences from both dicotyledonous and monocotyledonous plants. **Planta**, Berlin, v. 221, p. 597-601, 2005.

CHINI, A.; GRANT, J.J.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; LOAKE, G.J. Drought tolerance established by enhanced expression of the CC-NBS-LRR gene, ADR1, requires salicylic acid, EDS1 and ABI1. **The Plant Journal: for cell and molecular biology**, Oxford, v. 38, p. 810-822, 2004.

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.

CONRATH, U.; CHEN, Z.; RICIGLIANO, J.R.; KLESSIG, D.F. Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 92, n. 16, p. 7143-7147, 1995.

COQUOZ, J.L.; BUCHALA, A.; METRAUX, J.P. The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 117, p. 1095-1101, 1998.

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.

DANGL, J.L.; JONES, J.D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, London, v. 411, p. 826-833, 2001.

- DAY, B.; DAHLBECK, D.; HUANG, J.; CHISHOLM, S.T.; LI, D.; STASKAWICZ, B.J. Molecular basis for the RIN4 negative regulation of RPS2 disease resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 1292-1305, 2005.
- DE JONG, A.J.; HOEBERICHTS, F.A.; YAKIMOVA, E.T.; MAXIMOVA, E.; WOLTERING, E.J. Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells: involvement of caspase-like proteases. **Planta**, Berlin, v. 211, p. 656-662, 2000.
- DELLEDONNE, M.; XIA, Y.; DIXON, R.A.; LAMB, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, London, v. 394, p. 585-588, 1998.
- DELLEDONNE, M.; ZEIER, J.; MAROCCO, A.; LAMB, C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, p. 13454-13459, 2001.
- DEMPSEY, D.; SHAH, J.; KLESSIG, D.F. Salicylic acid and disease resistance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 18, p. 547-575, 1999.
- DENG, Z.; HUANG, S.; LING, P.; CHEN, C.; YU, C.; WEBER, C.A.; MOORE, G.A.; GMITTER, F.G.Jr. Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance-gene candidate sequences in citrus. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 101, p. 814-822, 2000.
- DESIKAN, R.; GRIFFITHS, R.; HANCOCK, J.; NEILL, S. A new role for an old enzyme: Nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 99, p. 16314-16318, 2002.
- DESPRÉS, C.; CHUBAK, C.; ROCHON, A.; CLARK, R.; BETHUNE, T.; DESVEAUX, D.; FOBERT, P.R. The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 2181-2191, 2003.
- DE STEFANO, M.; FERRARINI, A.; DELLEDONNE, M. Nitric oxide functions in the plant hypersensitive disease resistance response. **BMC Plant Biology**, London, v.5, Suppl 1:S10, 2005. Disponível em: < <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2229-5-S1-S10.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2008.
- DIXON, M.S.; HATZIXANTHIS, K.; JONES, D.A.; HARRISON, K.; JONES, J.D.G. The tomato *Cf-5* disease resistance gene and six homologs show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 1915-1925, 1998.
- DIXON, M.S.; JONES, D.A.; KEDDIE, J.S.; THOMAS, C.M.; HARRISON, K.; JONES, J.D.G. The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. **Cell**, Cambridge, v. 84, p. 451-459, 1996.

DODDS, P.; LAWRENCE, G.; ELLIS, J. Six amino acid changes confined to the leucine-rich repeat beta-strand/beta-turn motif determine the difference between the P and P2 rust resistance specificities in flax. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 163-178, 2001.

DOIDGE, E.M. Some diseases of citrus prevalent in South África. **South African Journal of Science**, Johannesburg, v.26, p. 320-325, 1926.

DOREY, S.; BAILLIEUL, F.; SAINDRENAN, P.; FRITIG, B.; KAUFFMANN, S. Tobacco class I and II catalases are differentially expressed during elicitor-induced hypersensitive cell death and localized acquired resistance. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 11, p. 1102-1109, 1998.

DOW, J.M.; DANIELS, M.J. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. **Yeast**, Chichester, v. 17, n. 4, p. 263-271, 2000.

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review Phytopathologist**, Palo Alto, v. 42, p.185-209, 2004.

DURNER, J.; KLESSIG, D.F. Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 92, n. 24, p. 11312-11316, 1995.

EKENGREN, S.K.; LIU, Y.; SCHIFF, M.; DINESH-KUMAR, S.P.; MARTIN, G.B. Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 36, p. 905-917, 2003.

ELLIS, J.; DODDS, P.; PRYOR, T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 278-284, 2000.

FALK, A.; FEYS, B.J.; FROST, L.N.; JONES, J.D.G.; DANIELS, M.J.; PARKER, J.E. *EDS1*, an essential component of *R* gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 96, p. 3292-3297, 1999.

FEICHTENBERGER, E. Mancha preta dos citros no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, p. 93-108, 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** São Paulo: Ceres, 1997. v. 2, p. 261-296.

FELIX, G.; BAUREITHEL, K.; BOLLER, T. Desensitization of the perception system for chitin fragments in tomato cells. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 117, p. 643-650, 1998.

FENG, B.; CHEN, Y.; ZHAO, C.; ZHAO, X.; BAI, X.; DU, Y. Isolation of a novel Ser/Thr protein kinase gene from oligochitosan-induced tobacco and its role in resistance against tobacco mosaic virus. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, n. 10, p. 596-603, 2006.

FEUILLET, C.; TRAVELLA, S.; STEIN, N.; ALBAR, L.; NUBLAT, A.; KELLER, B. Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 100, n. 25, p. 15253-15258, 2003.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 9, p. 275-296, 1971.

FRY, S.C.; ALDINGTON, S.; HETHERINGTON, P.R.; AITKEN, J. Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 103, p. 1-5, 1993.

FRYE, C.A.; INNES, R.W. An *Arabidopsis* mutant with enhanced resistance to powdery mildew. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 947-956, 1998.

FRYE, C.A.; TANG, D.; INNES, R.W. Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, n. 1, p. 373-378, 2001.

FUGLSANG, A.T.; GUO, Y.; CUIN, T.A.; QIU, Q.; SONG, C.; KRISTIANSEN, K.A.; BYCH, K.; SCHULZ, A.; SHABALA, S.; SCHUMAKER, K.S.; PALMGREN, M.G.; ZHU, J.K. *Arabidopsis* protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H^+ -ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 5, p. 1617-1634, 2007.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Manual de pinta preta**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/>>. Acesso em: 15 dez. 2008.

GABRIËLS, S.H.E.J.; VOSSEN, J.H.; EKENGREN, S.K.; OOIJEN, G. van; ABD-EL-HALIEM, A.M.; BERG, G.C. van den; RAINEY, D.Y.; MARTIN, G.B.; TAKKEN, F.L.; DE WIT, P.J.; JOOSTEN, M.H. An NB-LRR protein required for HR signalling mediated by both extra- and intracellular resistance proteins. **The Plant Journal**, Oxford, v. 50, p. 14-28, 2007.

GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolic repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, p. 334-361, 1998.

GLAZEBROOK, J. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 301-308, 2001.

GMITTER, F.G.; XIAO, S.Y.; HUANG, S.; HU, X.L.; GARNSEY, S.M.; DENG, Z. A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 92, p. 688-695, 1996.

- GOES, A.; FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 73-75, 1993.
- GOFF, S.A.; RICKE, D.; LAN, T.H.; PRESTING, G.; WANG, R.; DUNN, M. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). **Science**, Washington, v. 296, p. 79-92, 2002.
- GOMEZ-CADENAS, A.; ZENTELLA, R.; WALKER-SIMMONS, M.K.; HO, T.H. Gibberelin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 667-679, 2001.
- GOMEZ-CADENAS, A.; VERHEY, S.D.; HOLAPPA, L.D.; SHEN, Q.; HO, T.H.; WALKER-SIMMONS, M.K. An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 96, p. 1767-1772, 1999.
- GONG, D.; GUO, Y.; SCHUMAKER, K.S.; ZHU, J-K. The SOS3 family of calcium sensors and SOS2 family of protein kinases in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 134, p. 919-926, 2004.
- GOPALAN, S.; WEI, W.; HE, S.Y. *hrp* gene-dependent induction of *hin1*: a plant gene activated rapidly by both harpins and *avrPto* gene-mediated signal. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 10, p. 591-600, 1996.
- GOZZO, F. Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 4487-4503, 2003.
- GRANT, J.J.; CHINI, A.; BASU, D.; LOAKE, G.J. Targeted activation tagging of the *Arabidopsis* NBS-LRR gene, *ADRI*, conveys resistance to virulent pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 16, n. 8, p. 669-80, 2003.
- GRANT, M.R.; GODIARD, L.; STRAUBE, E.; ASHFIELD, T.; LEWALD, J.; SATTTLER, A.; INNES, R.W.; DANGL, J.L. Structure of the *Arabidopsis* *RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. **Science**, Washington, v. 269, p. 843-846, 1995.
- GRAVOT, A.; LARBAT, R.; HEHN, A.; LIEVRE, K.; GONTIER, E.; GOERGEN, J.L.; BOURGAUD, F. Cinnamic acid 4-hydroxylase mechanism-based inactivation by psoralen derivatives: cloning and characterization of a C4H from a psoralen producing plant-*Ruta graveolens*-exhibiting low sensitivity to psoralen inactivation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 422, p. 71-80, 2004.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews**, Berlin, v. 8, p. 339-374, 1990.
- GRUN, S.; LINDERMAYR, C.; SELL, S.; DURNER, J. Nitric oxide and gene regulation in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 507-516, 2006.

- GUIDETTI-GONZALEZ, S.; CARRER, H. Putative resistance genes in the CitEST database. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 3, p. 931-942, 2007. Supplement.
- GUIDETTI-GONZALEZ, S.; RAGASSI, C.F.; CARRER, H. Identification of protein kinase SNF1 in CitEST. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 3, p. 866-871, 2007. Supplement.
- GUIDETTI-GONZALEZ, S.; FREITAS-ASTÚA, J.; DO AMARAL, A.M.; MARTINS, N.F.; MEHTA, A.; SILVA, M.S.; CARRER, H. Genes associated with hypersensitive response (HR) in the citrus EST (CitEST) database. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30 n. 3 p. 943-956, 2007. Supplement.
- HALFORD, N.G.; HARDIE, D.G. SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon catabolism in plants? **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 37, p. 735-748, 1998.
- HALFORD, N.G.; PAUL, M.J. Carbon metabolite sensing and signalling. **Plant Biotechnology Journal**, London, v. 1, p. 381-398, 2003.
- HALFORD, N.G.; HEY, S.; JHURREEA, D.; LAURIE, S.; MCKIBBIN, R.S.; PAUL, M.; ZHANG, Y. Metabolic signalling and carbon partitioning: role for Snf1-related (SnRK1) protein kinase. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 467-475, 2003.
- HALFORD, N.G.; HEY, S.; JHURREEA, D.; LAURIE, S.; MCKIBBIN, R.S.; ZHANG, Y.; PAUL, M.J. Highly conserved protein kinases involved in the regulation of carbon and amino acid metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 35-42, 2004.
- HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 575-607, 1997.
- HARDIE, D.G. Roles of the AMP-activated/SNF1 protein kinase family in the response to cellular stress. **Biochemical Society symposium**, London, v. 64, p. 13-27, 1999.
- HARDIE, D.G.; CARLING, D.; CARLSON, M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 67, p. 821-855, 1998.
- HAYASHI, Y.; TOYOMASU, T.; HIROSE, Y.; ONODERA, Y.; MITSUHASHI, W.; YAMANE, H.; SASSA, T.; DAIRI, T. Comparison of the enzymatic properties of ent-copalyl diphosphate synthases in the biosynthesis of phytoalexins and gibberellins in rice. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 72, n. 2, p. 523-530, 2008.
- HEATH, M.C. Hypersensitive response-related death. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 44, p. 321-334, 2000.
- HEESE, A.; LUDWIG, A.A.; JONES, J.D.G. Rapid phosphorylation of a syntaxin during the Avr9/Cf-9-race-specific signaling pathway. **Plant Physiology**, 2005. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/cgi/rapidpdf/pp.105.063032v1>>. Acesso em: 20 out. 2008.

HERVÉ, C.; PERRET, E.; TREMOUSAYGUE, D.; LESCURE, B. Differential screening using high density filters reveals a dramatic change in gene expression at different growth phase in *Arabidopsis* cell suspension cultures. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 34, p. 425-430, 1996.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: realtime monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, New York, v. 11, p. 1026-1030, 1993.

HOEBERICHTS, F.A.; TEN HAVE, A.; WOLTERING, E.J. A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. **Planta**, Berlin, v. 217, p. 517-522, 2003.

HOLT, B.F.; BELKHADIR, Y.; DANGL, J.L. Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system. **Science**, Washington, v. 309, p. 929-932, 2005.

HONG, S-P.; LEIPER, F.C.; WOODS, A.; CARLING, D.; CARLSON, M. Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 100, p. 8839-8843, 2003.

HRABAK, E.M.; CHAN, C.W.M.; GRIBSKOV, M.; HARPER, J.F.; CHOI, J.H.; HALFORD, N.; KUDLA, J.; LUAN, S.; NIMMO, H.G.; SUSSMAN, M.R.; THOMAS, M.; WALKER-SIMMONS, K.; ZHU, J.K.; HARMON, A.C. The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 132, p. 666-680, 2003.

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

HUSE, M.; KURIYAN, J. The conformational plasticity of protein kinases. **Cell**, v. 109, p. 275-282, 2002.

HWANG, D.H.; KIM, S.T.; KIM, S.G.; KANG, K.Y. Comprehensive analysis of the expression of twenty-seven β -1,3-glucanase genes in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecules and cells**, Seoul, v. 23, n. 2, p. 207-214, 2007.

HWANG, E.I.; KANEKO, M.; OHNISHI, Y.; HORINOUCHI, S. Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 2699-2706, 2003.

ICHIMURA, K.; SHINOZAKI, K.; TENA, G.; SHEEN, J.; HENRY, Y.; CHAMPION, A.; KREIS, M.; ZHANG, S.; HIRT, H.; WILSON, C.; HEBERLE-BORS, E.; ELLIS, B.E.; MORRIS, P.C.; INNES, R.W.; ECKER, J.R.; SCHEEL, D.; KLESSIG, D.F.; MACHIDA, Y.; MUNDY, J.; OHASHI, Y.; WALKER, J.C. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, p. 301-308, 2002.

IKEDA, Y.; KOIZUMI, N.; KUSANO, T.; SANO, H. Sucrose and cytokinin modulation of WPK4, a gene encoding a SNF1-related protein kinase from wheat. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 121, p. 813-820, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 20 out. 2008.

_____. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 17 fev. 2009.

JAIN, M.; LI, Q.B.; CHOUREY, P.S. Cloning and expression analyses of *sucrose non-fermenting-1-related kinase 1* (*SnRK1b*) gene during development of sorghum and maize endosperm and its implicated role in sugar-to-starch metabolic transition. **Physiologia Plantarum**, Denmark, v. 134, n. 1, p. 161-173, 2008.

JIANG, Y.; LI, Z.; SCHWARZ, E.M.; LIN, A.; GUAN, K.; ULEVITCH, R.J.; HAN, J. Structure-function studies of p38 mitogen-activated protein kinase. Loop 12 influences substrate specificity and autophosphorylation, but not upstream kinase selection. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 272, p. 11096-11102, 1997.

JIN, H.; AXTELL, M.J.; DAHLBECK, D.; EKWENNA, O.; STASKAWICZ, B.; BAKER, B. NPK1, an MEKK1-like mitogen-activated protein kinase kinase kinase regulates innate immunity and development in plants. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 3, p. 291-297, 2002.

JIN, H.; LIU, Y.; YANG, K.Y.; KIM, C.Y.; BAKER, B.; ZHANG, S. Function of a mitogen-activated protein kinase pathway in *N* gene-mediated resistance in tobacco. **The Plant Journal: for cell and molecular biology**, Oxford, v. 33, p. 719-731, 2003.

JIRAGE, D.; TOOTLE, T.L.; REUBER, T.L.; FROST, L.N.; FEYS, B.J.; PARKER, J.E.; AUSUBEL, F.M.; GLAZEBROOK, J. *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 96, p. 13583-13588, 1999.

JONAK, C.; OKRESZ, L.; BOGRE, L.; HIRT, H. Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, n. 5, p. 415-424, 2002.

JOOSTEN, M.H.A.J.; DE WIT, P.J.G.M. The tomato-*Cladosporium fulvum* interaction: a versatile experimental system to study plant-pathogen interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 335-367, 1999.

KAISER, W.M.; WEINER, H.; KANDLBIMDER, A.; TSAI, C-B.; ROCKEL, P.; SONODA, M.; PLANCHET, E. Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 875-882, 2002.

KANEKO, M.; HWANG, E.I.; OHNISHI, Y.; HORINOUCI, S. Heterologous production of flavanones in *Escherichia coli*: Potential for combinatorial biosynthesis of flavonoids in bacteria. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v. 30, p. 456-461, 2003.

KAWCHUK, L.M.; HACHEY, J.; LYNCH, D.R.; KULCSAR, F.; VAN ROOIJEN, G.; WATERER, D.R.; ROBERTSON, A.; KOKKO, E.; BYERS, R.; HOWARD, R.J.; FISCHER, R.; PRUFER, D. Tomato *Ve* disease resistance genes encode cell surface-like receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, p. 6511-6515, 2001.

KELNER, A.; PKALA, I.; KACZANOWSKI, S.; MUSZYSKA, G.; HARDIE, D.G.; DOBROWOLSKA, G. Biochemical characterization of the tobacco 42-kd protein kinase activated by osmotic stress. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 136, p. 3255-3265, 2004.

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, C.Y.; LIU, Y.; THORNE, E.T.; YANG, H.; FUKUSHIGE, H.; GASSMANN, W.; HILDEBRAND, D.; SHARP, R.E.; ZHANG, S. Activation of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase cascade induces the biosynthesis of ethylene in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 2707-2718, 2003.

KIM, J.A.; AGRAWAL, G.K.; RAKWAL, R.; HAN, K.S.; KIM, K.N.; YUN, C.H.; HEU, S.; PARK, S.Y.; LEE, Y.H.; JWA, N.S. Molecular cloning and mRNA expression analysis of a novel rice (*Oryza sativa* L.) MAPK kinase kinase, OsEDR1, an ortholog of *Arabidopsis* AtEDR1, reveal its role in defense/stress signalling pathways and development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 300, p. 868-876, 2003.

KIM, C.Y.; LEE, S.H.; PARK, H.C.; BAE, C.G.; CHEONG, Y.H.; CHOI, Y.J.; HAN, C.; LEE, S.Y.; LIM, C.O.; CHO, M.J. Identification of rice blast fungal elicitor-responsive genes by differential display analysis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 13, n. 4, p. 470-474, 2000.

KLESSIG, D.F.; DURNER, J.; NOAD, R.; NAVARRE, D.A.; WENDEHENNE, D.; KUMAR, D.; ZHOU, J.M.; SHAH, J.; ZHANG, S.; KACHROO, P.; TRIFA, Y.; PONTIER, D.; LAM, E.; SILVA, H. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defenses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 97, p. 8849-8855, 2000.

KLOTZ, L.J. Fungal, bacterial and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery and orchard. In: REUTHER, W.; CALAVAN, E.C.; CARMAN, G.E. (Ed.). **The citrus industry**. Riverside: University of California, 1978. v. 4, p. 1-66.

KOBAYASHI, Y.; YAMAMOTO, S.; MINAMI, H.; KAGAYA, Y.; HATTORI, T. Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 1163-1177, 2004.

KOCH, K.E.; YING, Z.; WU, Y.; AVIGNE, W.T. Multiple paths of sugar sensing and sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 417-427, 2000.

KORKINA, L.G. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. **Cellular and Molecular Biology**, Noisy-Le-Grand, v. 53, n. 1, p. 15-25, 2007.

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

KOVTUN, Y.; CHIU, W.; TENA, G.; SHEEN, J. From the Cover: Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.97, p.2940-2945, 2000.

KUMAR, A.; ELLIS, B.E. A family of polyketide synthase genes expressed in ripening *Rubus* fruits. **Phytochemistry**, New York, v. 62, p. 513-526, 2003.

LAM, E.; KATO, N.; LAWTON, M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. **Nature**, London, v. 411, p. 848-853, 2001.

LAMB, C.; DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 251–275, 1997.

LEE, J.S.; WANG, S.; SRITUBTIM, S.; CHEN, J.G.; ELLIS, B.E. Arabidopsis mitogen-activated protein kinase MPK12 interacts with the MAPK phosphatase IBR5 and regulates auxin signaling. **The Plant Journal**, 2008
<<http://www3.interscience.wiley.com/journal/121500304/abstract>>. Acesso em: 20 out. 2008.

LEE, S.C.; HWANG, B.K. Induction of some defense-related genes and oxidative burst is required for the establishment of systemic acquired resistance in *Capsicum annuum*. **Planta**, Berlin, v. 221, p. 790-800, 2005.

LEISTER, R.T.; DAHLBECK, D.; DAY, B.; LI, Y.; CHESNOKOVA, O.; STASKAWICZ, B.J. Molecular genetic evidence for the role of SGT1 in the intramolecular complementation of Bs2 protein activity in *Nicotiana benthamiana*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 1268-1278, 2005.

LEUBNER-METZGER, G.; PETRUZZELLI, L.; WALDVOGEL, R.; VÖGELI-LANGE, R.; MEINS, F. Jr. Ethylene-responsive element binding protein (EREBP) expression and the transcriptional regulation of class I beta-1,3-glucanase during tobacco seed germination. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 38, p. 785-795, 1998.

LINO, B.; BAIZABAL-AGUIRRE, V.M.; DE LA VARA, L.E.G. The plasma-membrane H⁺-ATPase from beet root is inhibited by a calcium-dependent phosphorylation. **Planta**, Berlin, v. 204, p. 352–359, 1998.

LINTHORST, H.J.M. Pathogenesis-related proteins of plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 10, p. 123-150, 1991.

LIU, J.; ISHITANI, M.; HALFER, U.; KIM, C.S.; ZHU, J-K. The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 97, p. 3730-3734, 2000.

LIU, Y.; SCHIFF, M.; DINESH-KUMAR, S.P. Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. **The Plant Journal: for cell and molecular biology**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 800-809, 2004.

LIU, Y.; SCHIFF, M.; MARATHE, R.; DINESH-KUMAR, S.P. Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for N-mediated resistance to *Tobacco mosaic virus*. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 30, p. 415-429, 2002a.

LIU, Y.; SCHIFF, M.; SERINO, G.; DENG, X.W.; DINESH-KUMAR, S.P. Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to *Tobacco mosaic virus*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 7, p. 1483-1496, 2002b.

LIU, Y.; JIN, H.; YANG, K-Y.; KIM, C.Y.; BAKER, B.; ZHANG, S. Interaction between two mitogen-activated protein kinases during tobacco defense signaling. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 34, p. 149-160, 2003.

LIU, Y.; REN, D.; PIKE, S.; PALLARDY, S.; GASSMANN, W.; ZHANG, S. Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 51, n. 6, p. 941-954, 2007.

LIU, W.D.; WANG, S.P. Analysis and mapping of homologous sequences of barley disease resistance gene *Mlo* and maize disease resistance gene *Hm1* in rice. **Yi Chuan Xue Bao**, Beijing, v. 29, p. 875-879, 2002.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, Orlando, v. 25, p. 402-408, 2001.

LI, Z.K.; SANCHEZ, A.; ANGELES, E.; SINGH, S.; DOMINGO, J.; HUANG, N.; KHUSH, G.S. Are the dominant and recessive plant disease resistance genes similar? A case study of rice *R* genes and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* races. **Genetics**, Austin, v. 159, p. 757-765, 2001.

LOH, Y-T.; MARTIN, G.B. The *Pto* bacterial resistance gene and the *Fen* insecticide sensitivity gene encode functional protein kinases with serine/threonine specificity. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 108, p. 1735-1739, 1995.

LU, C.A.; LIN, C.C.; LEE, K.W.; CHEN, J.L.; HUANG, L.F.; HO, S.L.; LIU, H.J.; HSING, Y.I.; YU, S.M. The SnRK1A protein kinase plays a key role in sugar signaling during germination and seedling growth of rice. **The Plant Cell**, v. 19, p. 2484-2499, 2007.

LUAN, S.; KUDLA, J.; RODRIGUEZ-CONCEPTION, M.; YALOVSKY, S.; GRUISSSEN, W. Calmodulins and calcinerurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. S389-S400, 2002.

LUKOWITZ, W.; ROEDER, A.; PARMENTER, D.; SOMERVILLE, C. A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. **Cell**, Cambridge, v. 116, p. 4-5, 2004.

MA, W.; SMIGEL, A.; TSAI, Y.C.; BRAAM J.; BERKOWITZ, G.A. Innate immunity signaling: cytosolic Ca^{2+} elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 148, p. 818-828, 2008.

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, 2005. cap. 9, p. 223-277.

MACKEY, D.; BELKHADIR, Y.; ALONSO, J.M.; ECKER, J.R.; DANGL, J.L. *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. **Cell**, Cambridge, v. 112, p. 379-389, 2003.

MARQUES, J.P.R.; FREITAS-ASTUA J.; KITAJIMA, E.W.; APPEZZATO-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.

MARTIN, G.B. Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 2, p. 273-279, 1999.

MARTIN, G.B.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; CHUNWONGSE, J.; FRARY, A.; GANAL, M.W.; SPIVEY, R.; WU, T.; EARLE, E.D.; TANKSLEY, S.D. Map based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. **Science**, Washington, v. 262, p. 1432-1436, 1993.

MASER, P.; THOMINE, S.; SCHROEDER, J.I.; WARD, J.M.; HIRSCHI, K.; SZE, H.; TALKE, I.N.; AMTMANN, A.; MAATHUIS, F.J.M.; SANDERS, D.; HARPER, J.F.; TCHIEU, J.; GRIBSKOV, M.; PERSANS, M.W.; SALT, D.E.; KIM, S.A.; GUERINOT, M.L. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 126, p. 1646-1667, 2001.

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

McDOWELL, J.M.; DANGL, J.L. Signal transduction in the plant immune response. **Trends in Biochemical Sciences**, Cambridge, v. 25, p. 79-82, 2000.

McDOWELL, J.M.; DHANDAYDHAM, M.; LONG, T.A.; AARTS, M.G.M.; GOFF, S.; HOLUB, E.B.; DANGL, J.L. Intragenic recombination and diversifying selection contribute to

the evolution of downy mildew resistance at the *RPP8* locus of *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 1861-1874, 1998.

MELLERSH, D.G.; FOULDS, I.V.; HIGGINS, V.J.; HEATH, M.C. H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 29, p. 257-268, 2002.

MÉTRAUX, J-P. Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, p. 332-334, 2002.

MEYERS, B.C.; KOZIK, A.; GRIEGO, A.; KUANG, H.; MICHELMORE, R.W. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 809-834, 2003.

MEYERS, B.C.; DICKERMAN, A.W.; MICHELMORE, R.W.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; SOBRAL, B.W.; YOUNG, N.D. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. **The Plant Journal: for cell and molecular biology**, Oxford, v. 20, p. 317-332, 1999.

MICHARD, E.; LACOMBE, B.; PORÉE, F.; MUELLER-ROEBER, B.; SENTENAC, H.; THIBAUD, J.B.; DREYER, I. A unique voltage sensor sensitizes the potassium channel AKT2 to phosphoregulation. **The Journal of General Physiology**, New York, v. 126, p. 605-617, 2005.

MISHRA, N.S.; TUTEJA, R.; TUTEJA, N. Signaling through MAP kinase networks in plants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 452, n. 1, p. 55-68, 2006.

MITTLER, R. Oxidative stress antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MITTLER, R.; FENG, X.; COHEN, M. Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 461-473, 1998.

MITTLER, R.; HERR, E.H.; ORVAR, B.L.; VAN CAMP, W.; WILLEKENS, H.; INZÉ, D.; ELLIS, B.E. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 96, p. 14165-14170, 1999.

MODOLO, L.V.; AUGUSTO, O.; ALMEIDA, I.M.; MAGALHAES, J.R.; SALGADO, I. Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 579, p. 3814-3820, 2005.

MONTILLET, J.L.; CHAMNONGPOL, S.; RUSTERUCCI, C.; DAT, J.; VAN DE COTTE, B.; AGNEL, J.P.; BATTISTI, C.; INZE, D.; VAN BREUSEGEM, F.; TRIANTAPHYLIDES, C. Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 138, p. 1516-1526, 2005.

MORANT, M.; BAK, S.; MOLLER, B.L.; WERCK-REICHHART, D. Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, p. 151-162, 2003.

MORIGUCHI, T.; KITA, M.; TOMONO, Y.; ENDOINAGAKI, T.; OMURA, M. One type of chalcone synthase gene expressed during embryogenesis regulates the flavonoid accumulation in citrus cell cultures. **Plant & Cell Physiology**, Tokyo, v. 40, p. 651-655, 1999.

MUR, L.A.J.; CARVER, T.L.W.; PRATS, E. NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 489-505, 2006.

MUR, L.A.J.; KENTON, P.; LLOYD, A.J.; OUGHAM, H.; PRATS, E. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 501-520, 2008

MUSKETT, P.R.; KAHN, K.; AUSTIN, M.J.; MOISAN, L.J.; SADANOM, A.; SHIRASU, K.; JONES, J.D.; PARKER, J.E. Arabidopsis RAR1 exerts rate-limiting control of *R* gene-mediated defenses against multiple pathogens. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 979-992, 2002.

NAKAGAMI, H.; KIEGERL, S.; HIRT, H. OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 26, p. 26595-26966, 2004.

NAKAGAMI, H.; PITZSCHKE, A.; HIRT, H. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 10, p. 339-346, 2005.

NAVAZIO, L.; MOSCATIELLO, R.; BELLINCAMPI, D.; BALDAN, B.; MEGGIO, F.; BRINI, M.; BOWLER, C.; MARIANI, P. The role of calcium in oligogalacturonide-activated signalling in soybean cells. **Planta**, Berlin, v. 215, p. 596-605, 2002.

NAWRATH, C.; HECK, S.; PARINTHAWONG, N.; METRAUX, J.P. EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 275-286, 2002.

NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R.D.; HANCOCK, J.T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1237-1247, 2002.

NEVES, M.F.; LOPES, F.F.; TROMBIN, V.G.; AMARO, A.A.; NEVES, E.M.; JANK, M.S. **Caminhos para a citricultura: uma agenda para manter a liderança mundial**. São Paulo: Atlas, 2007. 110 p.

NG, T.B. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. **Peptides**, New York, v. 25, p. 1215-1222, 2004.

NIMCHUK, Z.; EULGEM, T.; HOLT, B.F. 3rd; DANGL, J.L. Recognition and response in the plant immune system. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 37, p. 579-609, 2003.

NOIR, S.; COMBES, M.C.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P. Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.). **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 265, p. 654-662, 2001.

NOUTOSHI, Y.; ITO, T.; SEKI, M.; NAKASHITA, H.; YOSHIDA, S.; MARCO, Y.; SHIRASU, K.; SHINOZAKI, K. A single amino acid insertion in the WRKY domain of the *Arabidopsis* TIR-NBS-LRR-WRKY-type disease resistance protein SLH1 (sensitive to low humidity 1) causes activation of defense responses and hypersensitive cell death. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 43, p. 873-888, 2005.

ODJAKOVA, M.; HADJIIVANOVA, C. The complexity of pathogen defense in plants. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, v. 27, n. 1/2, p. 101-109, 2001.

PAN, Q.; WENDEL, J.; FLUHR, R. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 50, p. 203-213, 2000.

PANSTRUGA, R. Serpentine plant MLO proteins as entry portals for powdery mildew fungi. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 33, p. 389-392, 2005.

PARKER, J.E.; COLEMAN, M.J. Molecular intimacy between proteins specifying plant-pathogen recognition. **Trends in Biochemical Sciences**, Cambridge, v. 22, p. 291-296, 1997.

PARNISKE, M.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; GOLSTEIN, C.; THOMAS, C.M.; JONES, D.A.; HARRISON, K.; WULFF, B.B.; JONES, J.D. Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the *Cf-4/9* locus of tomato. **Cell**, Cambridge, v. 91, p. 821-832, 1997.

PEART, J.R.; LU, R.; SADANANDOM, A.; MALCUIT, I.; MOFFETT, P.; BRICE, D.C.; SCHAUER, L.; JAGGARD, D.A.W.; XIAO, S.; COLEMAN, M.J.; DOW, M.; JONES, J.D.G.; SHIRASU, K.; BAULCOMBE, D.C. Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 99, p. 10865-10869, 2002.

PEDLEY, K.F.; MARTIN, G.B. Identification of MAPKs and their possible MAPK kinase activators involved in the Pto-mediated defense response of tomato. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 47, p. 49229-49235, 2004.

_____. Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, p. 541-547, 2005.

PENNELL, R.I.; LAMB, C. Programmed Cell Death in Plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1157-1168, 1997.

PERES, N.A.R.; TIMMER, L.W. **Citrus black spot caused by *Guignardia citricarpa*. CABI crop protection compendium**. Oxford, UK: CAB International, 2003.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, n. 9, p. E45-E49, 2001.

PIFFANELLI, P.; RAMSAY, L.; WAUGH, R.; BENABDELMOUNA, A.; D'HONT, A.; HOLLRICHER, K.; JORGENSEN, J.H.; SCHULZE-LEFERT, P.; PANSTRUGA, R. A barley cultivation-associated polymorphism conveys resistance to powdery mildew. **Nature**, London, v. 430, p. 887-891, 2004.

PIFFANELLI, P.; ZHOU, F.S.; CASAIS, C.; ORME, J.; JAROSCH, B.; SCHAFFRATH, U.; COLLINS, N.C.; PANSTRUGA, R.; SCHULZE-LEFERT, P. The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 129, p. 1076-1085, 2002.

POLGE, C.; THOMAS, M. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, p. 20-28, 2007.

POLKOWSKA-KOWALCZYK, L.; WIELGAT, B.; MACIEJEWSKA, U. Changes in the antioxidant status in leaves of *Solanum* species in response to elicitor from *Phytophthora infestans*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, n. 10, p. 1268-1277, 2007.

PONTIER, D.; MITTLER, R.; LAM, E. Mechanism of cell death and disease resistance induction by transgenic expression of bacterio-opsin. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 499-509, 2002.

PONTIER, D.; GAN, S.; AMASINO, R.M.; ROBY, D.; LAM, E. Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 39, p. 1243-1255, 1999.

PURCELL, P.C.; SMITH, A.M.; HALFORD, N.G. Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 14, p. 195-202, 1998.

REIS, R.F.; TIMMER, L.W.; GOES, A. Effect of temperature, leaf wetness, and rainfall on the production of *Guignardia citricarpa* ascospores and on black spot severity on sweet orange. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 29-34, 2006.

REN, D.; YANG, H.; ZHANG, S. Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, p. 559-565, 2002.

REN, D.; YANG, K.-Y.; LI, G.; LIU, Y.; ZHANG, S. Activation of Ntf4, a tobacco MAPK, during plant defense response and its involvement in hypersensitive response-like cell death. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 141, p. 1482-1493, 2006.

RENTEL, M.C.; LECOURIEUX, D.; OUAKED, F.; USHER, S.; PETERSEN, L.; OKAMOTO, H.; KNIGHT, H.; PECK, S.C.; GRIERSON, C.S.; HIRT, H.; KNIGHT, M.R. OXII kinase is necessary for oxidative burst-mediated signaling in *Arabidopsis*. **Nature**, London, v. 427, p. 858-861, 2004.

REUBER, T.L.; AUSUBEL, F.M. Isolation of *Arabidopsis* genes that differentiate between resistance responses mediated by the *RPS2* and *RPM1* disease resistance genes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 2, p. 241-249, 1996.

RIKIISHI, K.; MATSUURA, T.; MAEKAWA, M.; TAKEDA, K. Light control of shoot regeneration in callus cultures derived from barley (*Hordeum vulgare* L.) immature embryos. **Breeding Science**, Tokyo, v. 58, n. 2, p. 129-135, 2008.

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

ROBBS, C.F.; BITTENCUCOURT, S.M. A mancha preta dos frutos: um dos fatores limitantes à produção citrícola do estado do Rio de Janeiro. **Comunicado Técnico – CTAA-EMBRAPA**, Guaratiba, n. 19, p. 1-5, 1995.

ROBBS, C.F.; PIMENTEL, J.P.; RIBEIRO, R.L. A mancha preta dos citros causada por *Phoma citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 5, p. 455, 1980.

ROHILA, J.S.; YANG, Y. Rice mitogen-activated protein kinase gene family and its role in biotic and abiotic stress response. **Journal of Integrative Plant Biology**, Carlton South, v. 49, n. 6, p. 751-759, 2007.

ROLLAND, F.; GONZALEZ-BAENA, E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 675-709, 2006.

ROMEIS, T.; PIEDRAS, P.; ZHANG, S.; KLESSIG, D.F.; HIRT, H.; JONES, J. Rapid avr 9- and cf-9 –dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. **The Plant Cell**, Rockville, v.11, p. 273-287, 1999.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; DELLEDONNE, M. Nitric oxide signaling in plant-pathogen interactions. **IUBMB Life**, London, v. 55, n. 10/11, p. 579-583, 2003.

RON, M.; AVNI, A. The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 1604-1615, 2004.

ROZEN, S.; SKALETISKY, J. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Ed.). **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Totowa: Humana Press, 2000. p. 365-386.

RUBIO, M.C.; RAMOS, J.; WEBB, K.J.; MINCHIN, F.R.; GONZALEZ, E.; ARRESE-IGOR, C.; BECANA, M. Expression studies of superoxide dismutases in nodules and leaves of transgenic alfalfa reveal abundance of iron-containing isozymes, posttranslational regulation, and compensation of isozyme activities. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, n. 10, p. 1178-1188, 2001.

SAMUEL, M.A.; ELLIS, B.E. Double jeopardy: Both overexpression and suppression of a redox-activated plant mitogen-activated protein kinase render tobacco plants ozone sensitive. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 2059-2069, 2002.

SANO, H.; YOUSSEFIAN, S. Light and nutritional regulation of transcripts encoding a wheat protein kinase homolog is mediated by cytokinins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 91, p. 2582-2586, 1994.

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.

SCHEEL, D. Resistance response physiology and signal transduction. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, p. 305-310, 1998.

SCHINOR, E.H.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Colonização de folhas de laranja 'Pêra' e variedades afins por *Guignardia citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 5, p. 479-483, 2002.

SCHOENBECK, M.A.; SAMAC, D.A. FEDOROVA, M.; GREGERSON, R.G.; GANTT, J.S.; VANCE, C.P. The alfalfa (*Medicago sativa*) *TDY1* gene encodes a mitogen-activated protein kinase homolog. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 12, n. 10, p. 882-893, 1999.

SCHORNACK, S.; BALLVORA, A.; GURLEBECK, D.; PEART, J.; BAULCOMBE, D.; GANAL, M.; BAKER, B.; BONAS, U.; LAHAYE, T. The tomato resistance protein Bs4 is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates defense responses to severely truncated derivatives of AvrBs4 and overexpressed AvrBs3. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 37, p. 46-60, 2004.

SCHWACHTJE, J.; MINCHIN, P.E.; JAHNKE, S.; VAN DONGEN, J.T.; SCHITTKO, U.; BALSWIN, I.T. SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, p. 12935-12940, 2006.

SCHWEIGHOFER, A.; MESKIENE, I. Regulation of stress hormones jasmonates and ethylene by MAPK pathways in plants. **Molecular BioSystems**, Cambridge, v. 4, p. 799-803, 2008.

SCOFIELD, S.R.; HUANG, L.; BRT, A.S.; GILL, B.S. Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the *Lr21*-mediated leaf rust resistance pathway. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 138, p. 2165-2173, 2005.

- SHAH, J. The salicylic acid loop in plant defense. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, p. 365-371, 2003.
- SHAH, J.; KLESSIG, D.F. Salicylic acid: signal perception and transduction. In: LIBBENGA, K.; HALL, M.; HOOYKAAS, P.J.J. **Biochemistry and molecular biology of plant hormones**. London: Elsevier, 1999. v. 33, p. 513-541.
- SHAO, F.; GOLSTEIN, C.; ADE, J.; STOUTEMYER, M.; DIXON, J.E.; INNES, R.W. Cleavage of *Arabidopsis* PBS1 by a bacterial type III effector. **Science**, Washington, v. 301, p. 1230-1233, 2003.
- SHARMA, P.C.; ITO, A.; SHIMIZU, T.; TERAUCHI, R.; KAMOUN, S.; SAITOH, H. Virus-induced silencing of *WIPK* and *SIPK* genes reduces resistance to a bacterial pathogen, but has no effect on the INF1-induced hypersensitive response (HR) in *Nicotiana benthamiana*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 269, p. 583-591, 2003.
- SHIRASU, K.; SCHULZE-LEFERT, P. Complex formation, promiscuity and multifunctionality: protein interactions in disease-resistance pathways. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 8, p. 252-258, 2003.
- SIMANTIRAS, M.; LEISTNER, E. Formation of o-succinylbenzoic acid from iso-chorismic acid in protein extracts from anthraquinone-producing plant cell suspension cultures. **Phytochemistry**, New York, v. 28, p. 1381-1382, 1989.
- SINGH, A.; KIRUBAKARAN, S.I.; SAKTHIVEL, N. Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 56, n. 1, p. 100-109, 2007.
- SMEEKENS, S. Sugar-induced signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 49-81, 2000.
- SONG, W.Y.; WANG, G.L.; CHEN, L.L.; KIM, H.S.; PI, L.Y.; HOLSTEN, T.; GARDNER, J.; WANG, B.; ZHAI, W.X.; ZHU, L.H.; FAUQUET, C.; RONALD, P. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. **Science**, Washington, v. 270, p. 1804-1805, 1995.
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p. 507-540.
- SOYANO, T.; NISHIHAMA, R.; MORIKIYO, K.; ISHIKAWA, M.; MACHIDA, Y. NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 17, p. 1055-1067, 2003.
- STOUT, M.J.; THALER, J.S.; THOMMA, B.P.H.J. Plant-mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 51, p. 663-689, 2006.

SUGDEN, C.; CRAWFORD, R.M.; HALFORD, N.G.; HARDIE, D.G. Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 19, p. 433-439, 1999.

SUN, X.; CAO, Y.; YANG, Z.; XU, C.; LI, X.; WANG, S.; ZHANG, Q. *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. **The Plant Journal: Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 37, p. 517-527, 2004.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. p. 190-430.

TAKAHASHI, Y.; SOYANO, T.; SASABE, M.; MACHIDA, Y.A. MAP kinase cascade that controls plant cytokinesis. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 136, p. 127-132, 2004a.

TAKAHASHI, Y.; BERBERICH, T.; YAMASHITA, K.; UEHARA, Y.; MIYAZAKI, A.; KUSANO, T. Identification of tobacco *HIN1* and two closely related genes as spermine-responsive genes and their differential expression during the *Tobacco mosaic virus*-induced hypersensitive response and during leaf- and flower-senescence. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 54, n. 4, p. 613-22, 2004b.

TAKEMOTO, D.; HAYASHI, M.; DOKE, N.; MISHIMURA, M.; KAWAKITA, K. Isolation of the gene for EILP, an elicitor-inducible LRR receptor-like protein, from tobacco by differential display. **Plant & Cell Physiology**, Tokyo, v. 41, p. 458-464, 2000.

TAKKEN, F.L.; THOMAS, C.M.; JOOSTEN, M.H.; GOLSTEIN, C.; WESTERINK, N.; HILLE, J.; NIJKAMP, H.J.; DE WIT, P.J.; JONES, J.D. A second gene at the tomato *Cf-4* locus confers resistance to *Cladosporium fulvum* through recognition of a novel avirulence determinant. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 20, p. 279-288, 1999.

TAMELING, W.I.L.; VOSSEN, J.H.; ALBRECHT, M.; LENGAUER, T.; BERDEN, J.A.; HARING, M.A.; CORNELISSEN, B.J.C.; TAKKEN, F.L.W. Mutations in the NB-ARC domain of I-2 that impair ATP hydrolysis cause autoactivation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 140, p. 1233-1245, 2006.

TANG, D.; CHRISTIANSEN, K.M.; INNES, R.W. Regulation of plant disease resistance, stress responses, cell death, and ethylene signaling in *Arabidopsis* by the EDR1 protein kinase. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 138, p. 1018-1026, 2005.

TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; AMARAL, A.M.DO; SOUZA, A.A.DE; LOCALI-FABRIS, E.C.; DORTA, S.O.; BORGES, K.M.; SOUZA, J.M. DE; RODRIGUES, C.M.; LUCHETA, A.R.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M.A. CitEST libraries. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 3, p. 1019-1023, 2007. Supplement.

TENA, G.; ASAI, T.; CHIU, W.L.; SHEEN, J. Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, 392-400, 2001.

THOMAS, C.M.; JONES, D.A.; PARNISKE, M.; HARRISON, K.; BALINT-KURTI, P.J.; HATZIXANTHIS, K.; JONES, J.D.G. Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognitional specificity in *Cf-4* and *Cf-9*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 2209-2224, 1997.

TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. **Compendium of citrus diseases**. 2nd ed. St. Paul: APS Press, 2000. 92 p.

TÖR, M.; BROWN, D.; COOPER, A.; WOODS-TÖR, A.; SJÖLANDER, K.; JONES, J.D.G.; HOLUB, E.B. *Arabidopsis* downy mildew resistance gene *RPP27* encodes a receptor-like protein similar to *CLAVATA2* and tomato *Cf-9*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 135, p. 1100-1112, 2004.

TORNERO, P.; CHAO, R.; LUTHIN, W.; GOFF, S.; DANGL, J.L. Large scale structure function analysis of the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 435-450, 2002a.

TORNERO, P.; MERRITT, P.; SADANOM, A.; SHIRASU, K.; INNES, R.W.; DANGL, J.L. *RAR1* and *NDR1* contribute quantitatively to disease resistance in *Arabidopsis*, and their relative contributions are dependent on the *R* gene assayed. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 1005-1015, 2002b.

TROTOCHAUD, A.E.; HAO, T.; WU, G.; YANG, Z.; CLARK, S.E. The *CLAVATA1* receptor-like kinase requires *CLAVATA3* for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 393-405, 1999.

UTZ, P.J.; ANDERSON, P. Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 7, p. 589-602, 2000.

VERBERNE, M.C.; SANSUK, K.; BOL, J.F.; LINTHORST, H.J.; VERPOORTE, R. Vitamin K1 accumulation in tobacco plants overexpressing bacterial genes involved in the biosynthesis of salicylic acid. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 128, n. 1, p. 72-79, 2007.

VERCAMMEN, D.; COTTE, B. van de; DE JAEGER, G.; EECKHOUT, D.; CASTEELS, P.; VANDEPOELE, K.; VANDENBERGHE, I.; VAN BEEUMEN, J.; INZE, D.; VAN BREUSEGEM, F. Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, p. 45329-45336, 2004.

VERMAAS, W. An introduction to photosynthesis and its applications. **The World and I**, Quebec, v. 3, p. 158-165, 1998.

VETTORE, A.L.; SILVA, F.R. da; KEMPER, E.L.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, p. 1-7, 2001.

VIDAL, S.; CABRERA, H.; ANDERSSON, R.A.; FREDRIKSSON, A.; VALKONEN, J.P. Potato gene *Y-1* is an *N* gene homolog that confers cell death upon infection with *potato virus Y*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 7, p. 717-727, 2002.

VITTI, A. Exportações avançam. **Hortifruti Brasil**, ano 6, n. 63, nov. 2007. Disponível em: <www.cepea.esalq.usp.br/hfbrasil>. Acesso em: 31 jan. 2008.

VOSSSEN, E. van der, SIKKEMA, A.; HEKKERT, B.L.; GROS, J.; STEVENS, P.; MUSKENS, M.; WOUTERS, D.; PEREIRA, A.; STIEKEMA, W.; ALLEFS, S. An ancient *R* gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 36, n. 6, p. 867-882, 2003.

WANG, Y.; GAO, M.; LI, Q.; WANG, L.; WANG, J.; JEON, J.S.; QU, N.; ZHANG, Y.; HE, Z. OsRAR1 and OsSGT1 physically interact and function in rice basal disease resistance. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 21, n. 3, p. 294-303, 2008.

WANG, Z.Y.; SETO, H.; FUJIOKA, S.; YOSHIDA, S.; CHORY, J. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. **Nature**, London, v. 410, p. 380-383, 2001.

WEBER, H.; BORISJUK, L.; WOBUS, U. Molecular physiology of legume seed development. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 253-279, 2005.

WHITHAM, S.; DINESH-KUMAR, S.P.; CHOI, D.; HEHL, R.; CORR, C.; BAKER, B. The product of the *Tobacco mosaic virus* resistance gene *N*: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. **Cell**, Cambridge, v. 78, p. 1101-1115, 1994.

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.

WILDERMUTH, M.C.; DEWDNEY, J.; WU, G.; AUSUBEL, F.M. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. **Nature**, London, v. 414, p. 562-565, 2001.

WILSON, C.; ELLER, N.; GARTNER, A.; VICENTE, O.; HEBERLE-BORS, E. Isolation and characterization of a tobacco cDNA clone encoding a putative MAP kinase. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 23, n. 3, p. 543-551, 1993.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 126, p. 485-493, 2001.

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **The Biochemical Journal**, London, v. 322, p. 681-692, 1997.

WOLFINGER, R.D.; GIBSON, G.; WOLFINGER, E.D.; BENNETT, L.; HAMADEH, H.; BUSHEL, P.; AFSHARI, C.; PAULES, R.S. Assessing gene significance from cDNA microarray

expression data via mixed models. **Journal of Computational Biology**, New York, v. 8, p. 625-637, 2001.

WU, G.; SHORTT, B.J.; LAWRENCE, E.B.; ELAINE, E.B.; FITZSIMMONS, K.C.; SHAH, D.M. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 1357-1368, 1995.

XIAO, S.; CALIS, O.; PATRICK, E.; ZHANG, G.; CHAROENWATTANA, P.; MUSKETT, P.; PARKER, J.E.; TURNER, J.G. The atypical resistance gene, *RPW8*, recruits components of basal defence for powdery mildew resistance in *Arabidopsis*. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 42, p. 95-110, 2005.

XING, T.; HIGGINS, V.J.; BLUMWALD, E. Regulation of plant defense response to fungal pathogens: Two types of protein kinases in the reversible phosphorylation of the host plasma membrane H⁺-ATPase. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 555-564, 1996.

YALPANI, N.; LEON, J.; LAWTON, M.A.; RASKIN, I. Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 103, p. 315-321, 1993.

YAMAMOTO, A.; KATOU, S.; YOSHIOKA, H.; DOKE, N.; KAWAKITA, H. Nitrate reductase, a nitric oxide-producing enzyme: induction by pathogen signals. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 69, p. 218-229, 2003.

YANG, J.; HUANG, J.; GU, H.; ZHONG, Y.; YANG, Z. Duplication and adaptive evolution of the chalcone synthase genes of *Dendranthema* (Asteraceae). **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 19, p. 1752-1759, 2002.

YANG, K.Y.; LIU, Y.; ZHANG, S. Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, p. 741-746, 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.

YANG, Z.; SUN, X.; WANG, S.; ZHANG, Q. Genetic and physical mapping of a new gene for bacterial blight resistance in rice. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 106, p. 1467-1472, 2003.

YOSHIMURA, K.; YABUTA, Y.; ISHIKAWA, T.; SHIGEOKA, S. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 123, n. 1, p. 223-234, 2000.

ZHANG, S.; KLESSIG, D.F. *N* resistance gene-mediated *de novo* synthesis and activation of a tobacco MAP kinase by TMV infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 95, p. 7433-7438, 1998.

_____. Pathogen-induced MAP kinases in tobacco. In: HIRT, H. **Results and problems in cell differentiation: MAP kinases in plant signal transduction**. Heidelberg: Springer, 2000. p. 65-84.

ZHANG, S.; LIU, Y. Activation of salicylic acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 1877-1889, 2001.

ZHANG, S.; DU, H.; KLESSIG, D.F. Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 435-450, 1998.

ZHANG, S.; KLESSIG, D.F. MAPK cascades in plant defense signaling. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, n. 11, p. 520-527, 2001.

ZHANG, T.; LIU, Y.; YANG, T.; ZHANG, L.; XU, S.; XUE, L.; NA, L. Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, n. 5/6, p. 274-283, 2006.

ZHANG, Y.; SHEWRY, P.R.; JONES, H.; BARCELO, P.; LAZZERI, P.A.; HALFORD, N.G. Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence causes abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 28, p. 431-441, 2001.

ZHANG, X.; DAI, Y.; XIONG, Y.; DeFRAIA, C.; LI, J.; DONG, X.; MOU, Z. Overexpression of Arabidopsis *MAP kinase kinase 7* leads to activation of plant basal and systemic acquired resistance. **The Plant Journal**, Oxford, v. 52, n. 6, p. 1066-1079, 2007.

ZHAO, J.; DAVIS, L.C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 23, p. 283-333, 2005.

ZHOU, F.; KURTH, J.; WEI, F.; ELLIOT, C.; VALE, G.; YAHIAOUI, N.; KELLER, B.; SOMERVILLE, S.; WISE, R.P.; SCHULZE-LEFERT, P. Cell-autonomous expression of barley *Mla1* confers race-specific resistance to the powdery mildew fungus via a *Rar1*-independent signaling pathway. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, 337-350, 2001.

ANEXOS

Anexo 1: Nomenclatura dos clones CitEST:

Organismo_Variedade--Tecido e tipo -- Biblioteca -- N° da placa -- Posição na placa --
Laboratório - Sentido do sequenciamento

Organismo (2 caracteres)	Nomenclatura
<i>Citrus sinensis</i>	CS
<i>Citrus reticulata</i>	CR
<i>Citrus aurantium</i>	CA
<i>Citrus aurantifolia</i>	CG
<i>Citrus latifolia</i>	LT
<i>Poncirus trifoliata</i>	PT

Variedade (2 números)	Nomenclatura
Laranja doce Pêra IAC	00
Ponkan mandarin	05
Rubidoux- BAG 835 CN RG 035	11
Laranja doce Pêra Olímpia	12
Laranja doce Pêra Campo	13
BAG CV 244 RG 23	26
BAG CV 299 Matrizes, Micro-enxerto 2380	32
BAG CV 304 Matrizes, Micro-enxerto 779	33

Tecido e tipo (1 caractere e 1 número)	Nomenclatura
Shotgun	G
cDNA	C
Folha	1
Casca	2
Fruta	3
Genoma	8

Número da placa (3 números)	Nomenclatura
	001
	n...

Laboratório (2 caracteres)	Nomenclatura
Centro de Citricultura	CT
Unesp / Eliana	EU
Unesp / Vitor	UV

Biblioteca (3 números)	Descrição	Nomenclatura
Genoma		000
Teste preliminar com material de campo		001
Material sadio, campo		002
Material sadio de casa de vegetação		003
Crescimento hidropônico, sem estresse		004
Germinação em câmara de crescimento		005
CVC (with <i>Xylella</i>):		
	Não infectado	100
Estágio 1	Infectado	101
Estágio 2	30 dias após infecção	102
Estágio 3	60 dias após infecção	103
Estágio 4		104
Estágio 5		105
		n...
Gummosis (<i>Phytophthora</i>):		
	Não infectado	300
Estágio 1	Infectado	301
Tecido Juvenil:		650
Fruto em diferentes estágios:		
	Estágio 1	700
	Estágio 2	701
	Estágio 3	702
	Estágio 4	703
	Estágio 5	704
	Estágio 6	705
Tristeza (CTV):		
	Não infectado	900
	Infectado	901

Sentido do sequenciamento (1 caractere)	Nomenclatura
5' a 3' (.g)	F
3' a 5' (poly(A), .d)	R

Anexo 2 - Descrição dos ESTs de citros encontrados, que codificam proteínas envolvidas na HR

(continua)

Produto gênico e organismo	Número de acesso	Melhor e-value	Melhor similaridade	Número Contigs* Singletons	
Ácido cinâmico 4-hidroxilase					
cinnamate 4-hydroxylase CYP73 [<i>C. sinensis</i>]	AAF66066	0.0	485/485	2 (C1; C3)	2
Cinnamic acid 4-hydroxylase [<i>M. sativa</i>]	P37114	4e-74	108/121	1	0
Canais de cálcio					
two-pore calcium channel [<i>A. thaliana</i>]	gil14349162	0.0	371/432	1	0
two-pore calcium channel [<i>N. tabacum</i>]	gil46275794	9e-52	133/170	1	2
Canais de íons					
CNGC1 [<i>A. thaliana</i>]	NP_200125	0.0	366/386	11	7
CNGC2 [<i>G. hirsutum</i>]	AAX18166	0.0	337/359	3	0
CNGC3 [<i>A. thaliana</i>]	NP_566075	e-100	204/245	0	2
CNGC4/ HLM1 [<i>A. thaliana</i>]	Q94AS9	6e-96	175/194	0	1
CNGC9 [<i>A. thaliana</i>]	NP_194785	1e-81	179/234	0	1
CNGC10 [<i>A. thaliana</i>]	NP_563625	1e-12	83/160	1	0
CNGC14 [<i>A. thaliana</i>]	NP_850056	2e-84	121/158	0	1
CNGC15 [<i>A. thaliana</i>]	NP_180393	3e-60	135/182	0	2
CNGC17 [<i>A. thaliana</i>]	NP_194765	3e-179	347/394	1	2
CNGC19 [<i>A. thaliana</i>]	NP_188396	2e-118	254/311	1	0
Chalcona sintase					
chalcone synthase [<i>C. sinensis</i>]	BAA81664	0.0	391/391	3 (C1; C3; C4)	8
chalcone synthase [<i>Betula pendula</i>]	CAA71904	2e-40	89/108	1	1
chalcone synthase [<i>Aubrieta deltoidea</i>]	AAG43406	1e-25	86/146	0	1
chalcone synthase 3 [<i>Ruta graveolens</i>]	Q9FSB7	3e-17	106/239	0	1
chalcone synthase [<i>Chrysanthemum indicum</i>]	AAM46963	7e-19	43/46	0	1
Corismato mutase					
putative chorismate mutase [<i>Fagus sylvatica</i>]	ABA54871	8e-122	265/326	1	0
putative chorismate mutase [<i>A. thaliana</i>]	AAC73018	5e-100	219/290	1 (C4)	1
chorismate mutase ATCM2 [<i>A. thaliana</i>].	NP_196648	4e-65	145/182	1	0
chorismate mutase [<i>L. esculentum</i>]	AAD48923	4e-15	49/60	0	1
chorismate mutase-T [<i>A. thaliana</i>]	BAB10786	1e-35	97/137	0	1
chorismate mutase [<i>A. thaliana</i>]	AAM61395	3e-107	270/370	2 (C6)	1
Fenilalanina amônia liase					
phenylalanine-ammonia lyase [<i>C. clementina</i> x <i>C. reticulata</i>]	CAB42794	0.0	708/713	1	2
phenylalanine ammonia-lyase [<i>C. limon</i>]	Q42667	0.0	715/722	1 (C8)	3
phenylalanine ammonia-lyase [<i>Jatropha curcas</i>]	ABI33979	0.0	356/380	1	0
phenylalanine ammonia-lyase [<i>Nerium oleander</i>]	AAX18625	2e-107	200/208	1 (C10)	0
phenylalanine ammonia-lyase 1 [<i>Manihot esculenta</i>]	AAK62030	e-116	231/270	0	1
phenylalanine ammonia-lyase [<i>Populus trichocarpa</i>]	P45730	9e-55	110/145	0	1

Anexo 2 - Descrição dos ESTs de citros encontrados, que codificam proteínas envolvidas na HR

(continuação)					
Produto gênico e organismo	Número de acesso	Melhor e-value	Melhor similaridade	Número Contigs* Singletons	
Fosfolipases					
putative phospholipase A2 [<i>O. sativa</i>]	XP_468549	6e-47	98/120	1	0
phosphoinositide-specific phospholipase C P13 [<i>G. max</i>]	AAB03258	0.0	512/602	1	0
putative phospholipase C [<i>A. thaliana</i>]	AAC32238	e-127	229/276	1	0
phospholipase C [<i>O. sativa</i>]	CAC81703	e-101	94/118	0	4
phospholipase C [<i>A. thaliana</i>]	NP_175685	e-108	200/222	0	1
1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase [<i>N. rustica</i>]	CAA72681	e-147	273/306	1	0
phosphoinositide-specific phospholipase C P12 [<i>G. max</i>]	gil7435171	5e-33	67/85	0	1
phosphoinositide-specific phospholipase C [<i>N. rustica</i>]	CAA65127	e-112	236/286	2	0
PLC [<i>A. thaliana</i>]	AAL16172	9e-92	178/204	0	1
ATPLC2 phospholipase C (ATPLC2) [<i>A. thaliana</i>]	NP_187464	2e-70	153/191	0	3
phospholipase C2 [<i>N. tabacum</i>]	AAF33824	3e-73	164/214	0	1
PLD [<i>A. thaliana</i>]	AAP42742	e-160	289/312	3	1
Glutathione peroxidases					
Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase [<i>C. sinensis</i>]	CAE46896	1e-91	167/167	1	0
CIT-SAP GPX4_CITS Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) (Salt-associated protein) [<i>C. sinensis</i>]	CAA47018	9e-92	167/167	1	2
Phospholipid glutathione peroxidase [<i>Pisum sativum</i>]	CAA04142	2e-89	193/246	2	0
Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase [<i>Momordica charantia</i>]	AAL40914	4e-76	148/164	2	0
Putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase [<i>Cicer arietinum</i>]	CAD31839	8e-24	83/137	1	0
Glutathione peroxidase, putative [<i>A. thaliana</i>]	NP_564813	2e-69	139/153	1	0
Putative glutathione peroxidase [<i>A. thaliana</i>]	AAM67012	5e-68	145/169	1	0
Glutathione peroxidase, putative [<i>A. thaliana</i>]	NP_194915	6e-86	168/184	1	0
Glutathione transferases					
Glutathione S-transferase GST 22 [<i>G. max</i>]	AAG34812	3e-89	181/209	6	1
Glutathione S-transferase GST 14 [<i>G. max</i>]	AAG34804	2e-66	145/220	3	1
Glutathione S-transferase GST 23 [<i>G. max</i>]	AAG34813	5e-35	79/85	1	0
Glutathione S-transferase T3 LeGST-T3 [<i>L. esculentum</i>]	AAG16758	4e-82	173/223	5	1
Glutathione S-transferase [<i>Pisum sativum</i>]	BAC81649	8e-97	196/236	3	0
Glutathione transferase [<i>Carica papaya</i>]	CAA04391	2e-82	159/180	2	0

Anexo 2 - Descrição dos ESTs de citros encontrados, que codificam proteínas envolvidas na HR

(continuação)

Produto gênico e organismo	Número de acesso	Melhor e-value	Melhor similaridade	Número Contigs* Singletons	
Glutathione S-transferase [<i>Euphorbia esula</i>]	AAF65767	3e-79	166/212	2	0
Glutathione S-transferase [<i>E. esula</i>]	AAF72197	6e-89	188/210	1	0
Glutathione S-transferase 2 [<i>Papaver somniferum</i>]	AAF22518	2e-85	175/215	2	0
Glutathione S-transferase/oxidase [<i>Capsicum chinense</i>]	CAI48072	e-100	193/220	2	0
Glutathione S-transferase [<i>Thlaspi caerulescens</i>]	AY917145	5e-174	204/240	1	0
Glutathione transferase AtGST 10 [<i>A. thaliana</i>]	BAB09723	4e-99	208/237	1	1
Glutathione S-transferase [<i>A. thaliana</i>]	AAG30140	6e-77	164/215	1	0
Putative glutathione S-transferase [<i>A. thaliana</i>]	AAM64426	5e-62	153/205	1	0
Putative glutathione S-transferase [<i>O. sativa</i>]	XP_470193	3e-71	163/218	1	0
Putative glutathione transferase [<i>O. sativa</i>]	BAD28950	7e-22	52/60	1	0
Glutathione S-transferase GST 9 [<i>Zea mays</i>]	AAG34817	3e-31	85/110	1	0
Putative glutathione S-transferase [<i>Phaseolus acutifolius</i>]	AAM34480	4e-13	42/48	1	0
Glutathione S-transferase [<i>Cucurbita maxima</i>]	BAC21263	5e-66	153/189	1	0
Isocorismato sintase					
isochorismate synthases, putative [<i>M. truncatula</i>].	ABE91019	1e-81	185/202	1 (C2)	0
isochorismate synthase [<i>C. annuum</i>]	AAW66457	3e-65	175/244	1	0
Isochorismate synthase, chloroplast precursor [<i>Catharanthus roseus</i>]	Q9ZPC0	1e-58	163/246	0	1
Lipoxigenase					
Lipoxigenase [Fragaria x ananassa]	CAE17327	e-126	219/255	1	1
Lipoxigenase [<i>Corylus avellana</i>]	CAD10740	4e-76	158/187	0	1
Lipoxigenase [<i>Solanum tuberosum</i>]	CAA65268	0.0	622/803	3	0
Lipoxigenase [<i>C. jambhiri</i>]	BAB84352	0.0	762/904	6	10
Lipoxigenase 1 [<i>Sesbania rostrata</i>]	CAC43237	0.0	803/950	1	0
Lipoxigenase 1 [<i>Prunus dulcis</i>]	CAD10779	8e-05	44/74	0	2
Lipoxigenase 2 [<i>Zantedeschia aethiopica</i>]	AAG18376	0.0	690/819	2	0
Lipoxigenase 2 [<i>Nicotiana attenuata</i>]	AAP83137	4e-83	207/289	3	4
Metacaspases					
metacaspase 1 [<i>A. thaliana</i>]	AAP84706	e-104	202/243	2	0
metacaspase 3 [<i>A. thaliana</i>]	AAP44516	6e-38	125/226	0	1
metacaspase 7 [<i>A. thaliana</i>]	AAP84710	4e-88	206/267	1	0
metacaspase 1 [<i>L. esculentum</i>]	AAM51555	3e-84	181/234	0	2
putative metacaspase [<i>O. sativa</i>]	AAR06365	4e-20	81/150	0	1
NADPH					
NADPH oxidase [<i>N. tabacum</i>]	AAM28891	0.0	639/720	1	0
FRO2-like protein; NADPH oxidase-like [<i>A. thaliana</i>]	BAA98161	e-104	235/310	1	0

Anexo 2 - Descrição dos ESTs de citrus encontrados, que codificam proteínas envolvidas na HR

(continuação)					
Produto gênico e organismo	Número de acesso	Melhor e-value	Melhor similaridade	Número Contigs* Singletons	
ferric reductase-like transmembrane component family protein [<i>A. thaliana</i>]	NP_199785	e-152	317/401	1	1
FRO2 homolog [<i>A. thaliana</i>]	BAB08722	1e-79	178/272	0	1
respiratory burst oxidase homolog [<i>N. benthamiana</i>]	BAC56865	3e-69	81/119	0	1
Nitrate redutase					
nitrate reductase [NADH] (NR) [Petunia x hybrida]	P36859	0.0	495/567	1 (C10)	0
nitrate reductase [<i>Tilia platyphyllos</i>]	AAN15927	2e-152	294/337	1 (C11)	0
nitrate reductase [<i>Ricinus communis</i>]	AAG30576	1e-85	179/211	1 (C7)	0
nitrate reductase [<i>Brassica napus</i>]	BAA07395	4e-23	60/89	0	1
Peroxidases					
thioredoxin peroxidase [<i>N. tabacum</i>]	CAC84143	e-113	234/278	3	2
apoplastic anionic guaiacol peroxidase [<i>G. hirsutum</i>]	AAL92037	e-129	282/352	4	1
peroxidase [<i>Spinacia oleracea</i>]	CAA71492	e-111	246/314	2	0
ascorbate peroxidase [<i>Ipomoea batatas</i>]	AAP42501	e-126	231/250	4	0
peroxidase [<i>N. tabacum</i>]	AAK52084	e-125	271/354	1	0
peroxidase precursor [<i>Quercus suber</i>]	AAR31106	e-92	189/218	1	0
putative peroxidase [<i>A. thaliana</i>]	AAO50583	e-117	233/250	1	0
cationic peroxidase isozyme 40K precursor [<i>N. tabacum</i>]	BAA07664	e-98	240/321	7	0
class III peroxidase [<i>G. hirsutum</i>]	AAP76387	e-152	291/318	2	0
putative peroxidase [<i>A. thaliana</i>]	AAM20043	e-129	254/294	1	0
bacterial-induced peroxidase precursor [<i>G. hirsutum</i>]	AAD43561	e-136	272/320	1	1
peroxidase [<i>Populus balsamifera</i> subsp. <i>Trichocarpa</i>]	CAA66037	e-120	258/343	3	0
peroxidase ATP2a [<i>A. thaliana</i>]	CAA66863	e-126	244/281	2	0
putative L-ascorbate peroxidase [<i>A. thaliana</i>]	BAC42431	9e-53	133/170	1	1
peroxidase precursor [<i>G. max</i>]	AAD11482	e-127	267/316	1	1
putative ascorbate peroxidase [<i>A. thaliana</i>]	AAF23294	6e-98	183/202	1	0
putative trypanothione-dependent peroxidase [<i>O. sativa</i> (japonica cultivar-group)]	AAP50932	1e-86	248/406	1	0
L-ascorbate peroxidase 1b (APX1b) [<i>A. thaliana</i>]	NP_187575	e-125	230/248	1	0
ascorbate peroxidase pirIT09845 L-ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11), glyoxysomal - upland cotton	AAB52954	e-119	217/223	1	0
secretory peroxidase [<i>N. tabacum</i>]	AAD33072	e-133	246/257	1	5
chloroplast stromal ascorbate peroxidase [<i>Vigna unguiculata</i>]	AAS55853	e-165	321/369	1	0
Peroxidase pirIT10790 peroxidase (EC 1.11.1.7) - upland cotton	AAA99868	e-168	314/332	1	4
At2g29670/T27A16.23 [<i>A. thaliana</i>]	AAN18208	6e-88	212/278	1	0

Anexo 2 - Descrição dos ESTs de citros encontrados, que codificam proteínas envolvidas na HR

(continuação)

Produto gênico e organismo	Número de acesso	Melhor e-value	Melhor similaridade	Número Contigs* Singletons	
thylakoid-bound ascorbate peroxidase [<i>N. tabacum</i>]	BAA78552	e-100	218/264	1	0
peroxidase precursor [<i>Populus kitakamiensis</i>]	BAA07240	e-127	263/327	1	0
putative ascorbate peroxidase (TL29) [<i>L. esculentum</i>]	CAB64343	e-138	297/347	2	0
putative peroxidase [<i>A. thaliana</i>]	AAP40436	5e-91	181/198	2	0
putative peroxidase ATP2a [<i>A. thaliana</i>]	AAM65003	3e-31	71/80	2	1
peroxidase ATP17a like protein [<i>A. thaliana</i>]	BAD44575	1e-17	51/67	1	0
peroxidase [<i>P. nigra</i>]	BAA11853	e-120	253/325	1	0
peroxidase-like protein [<i>A. thaliana</i>]	BAB08730	1e-25	62/67	0	1
peroxisomal ascorbate peroxidase [<i>Cucurbita</i> cv. Kurokawa Amakuri]	BAB64351	1e-18	52/66	0	1
glutathione peroxidase, putative [<i>A. thaliana</i>]	NP_564813	1e-15	41/43	0	1
peroxidase C2 precursor-like protein [<i>A. thaliana</i>]	AAN15499	3e-14	42/75	0	1
glutathione transferase [<i>Carica papaya</i>]	CAA04391	8e-62	130/160	0	1
korean-radish isoperoxidase [<i>Raphanus sativus</i>]	CAA62597	1e-42	130/233	0	1
putative glutathione peroxidase [<i>A. thaliana</i>]	AAL34198	4e-42	112/174	0	1
peroxidase [<i>Linum usitatissimum</i>]	AAB02926	1e-72	162/213	0	1
putative peroxidase [<i>A. thaliana</i>]	CAB39666	3e-20	61/150	0	1
glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) - sweet orange	S33618	5e-30	42/44	0	1
ascorbate peroxidase [<i>Pimpinella brachycarpa</i>]	AAF22246	e-101	196/250	0	1
PER7_ARATH Peroxidase 7 precursor (Atperox P7)	Q9SY33	4e-58	149/214	0	1
cytosolic ascorbate peroxidase [<i>Fragaria x ananassa</i>]	AAB94574	2e-28	54/98	0	1
putative thioredoxin peroxidase [<i>O. sativa</i> (japonica cultivar-group)]	BAD28826	2e-26	64/73	0	1
peroxidase ATP1a [<i>A. thaliana</i>]	CAA66862	2e-29	112/199	0	1
peroxidase (EC 1.11.1.7), anionic, precursor - wood tobacco	B56555	3e-59	139/190	0	1
peroxidase [<i>A. thaliana</i>]	BAB10239	e-70	176/260	0	1
thylakoid-bound L-ascorbate peroxidase precursor [<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>]	AAC19393	e-34	70/94	0	1
thylakoid-bound ascorbate peroxidase [<i>Cucurbita</i> cv. Kurokawa Amakuri]	BAA12029	e-60	130/146	0	1
thioredoxin peroxidase [<i>Secale cereale</i>]	AAC78473	4e-19	71/142	0	1
peroxidase [<i>A. thaliana</i>]	CAA66957	2e-43	89/140	0	1
putative peroxidase [<i>O. sativa</i> (japonica cultivar-group)]	BAB39281	2e-63	150/216	0	1

Anexo 2 - Descrição dos ESTs de citros encontrados, que codificam proteínas envolvidas na HR

(continuação)					
Produto gênico e organismo	Número de acesso	Melhor e-value	Melhor similaridade	Número Contigs* Singletons	
ascorbate peroxidase [<i>O. sativa</i> (japonica cultivar-group)]	BAB17666	2e-22	67/142	0	1
putative ascorbate peroxidase APX4 [<i>A. thaliana</i>]	AAP72143	3e-30	67/75	0	1
peroxidase [<i>N. tabacum</i>]	BAA82306	8e-71	155/235	0	1
PE48_ARATH Putative Peroxidase 48 (Atperox P48)	O81755	6e-20	61/77	0	1
PR-5					
PR-5-like protein [<i>A. thaliana</i>]	AAM44961	1e-103	218/296	1	0
PR-5-like protein [<i>A. thaliana</i>]	NP_173261	1e-109	208/243	1	0
PR-5-like protein [<i>A. thaliana</i>]	BAB11214	5e-75	158/203	1	0
PR-5-like protein [<i>A. thaliana</i>]	AAM64698	1e-101	193/231	1	0
PR-5-like protein [<i>Citrus sinensis</i>]	AAC02549	2e-63	111/114	1	0
PR-5-like protein OLP1 [<i>L. esculentum</i>]	Q41350	1e-117	204/235	3	0
PR-5-like protein Mdt11 [<i>Malus x domestica</i>]	AAC36740	4e-98	191/235	1	0
PR-5-like protein VVTL1 [<i>Vitis vinifera</i>]	AAB61590	9e-89	177/227	1	0
PR-5-like protein [<i>Brassica rapa</i>]	T14428	6e-75	152/188	0	1
PR-5-like protein [<i>Helianthus annuus</i>]	AAM21199	9e-84	150/188	0	1
PR-5-like protein SE39b [<i>N. tabacum</i>]	BAA74546	1e-83	161/210	0	2
Quitinase					
Acidic class II chitinase [<i>C. jambhiri</i>]	BAC20285	e-169	282/293	6	11
Acidic class I chitinase [<i>C. jambhiri</i>]	BAC20284	e-177	289/300	4	6
Bulb chitinase-1 [<i>Tulipa bakeri</i>]	BAA88408	e-110	230/279	1	0
Chitinase [<i>C. sinensis</i>]	CAA93847	e-178	292/292	3	1
Chitinase [<i>Hevea brasiliensis</i>]	CAA09110	e-139	269/302	1	0
Chitinase CHI1 [<i>C. sinensis</i>]	AAC35981	4e-75	166/232	4	1
Chitinase-like protein [<i>G. hirsutum</i>]	AAQ56598	e-164	291/322	3	2
Chitinase/lysozyme [<i>N. tabacum</i>]	CAA55128	4e-48	126/195	1	2
Putative chitinase [<i>A. thaliana</i>]	CAA19698	9e-45	145/220	1	1
Putative class I chitinase [<i>A. thaliana</i>]	AAG48821	e-149	277/321	3	0
Receptor-like kinase CHRK1 [<i>N. tabacum</i>]	AAD52097	6e-76	299/484	2	0
Superóxido dismutase					
SODM_HEVBR Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial precursor S39492 superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) (Mn)	P35017	e-105	199/231	1	0
Fe-superoxide dismutase precursor [<i>M. sativa</i>]	AAL32441	e-105	216/260	3	0
copper-zinc superoxide dismutase [<i>Nelumbo nucifera</i>]	AAW80437	2e-55	107/112	1	0
Fe-superoxide dismutase precursor [<i>A. thaliana</i>]	AAM61633	3e-86	177/205	1	0
iron superoxide dismutase 3 [<i>A. thaliana</i>]	AAM63713	3e-64	139/178	1	0
superoxidase dismutase [<i>L. esculentum</i>]	AAQ09007	3e-77	75/83	1	0
superoxide dismutase [Fe] [<i>L. esculentum</i>]	CAE22480	3e-76	179/252	1	0
Cu/Zn-superoxide dismutase copper chaperone precursor [<i>G. max</i>]	AAK01931	3e-99	199/217	2	0

Anexo 2 - Descrição dos ESTs de citros encontrados, que codificam proteínas envolvidas na HR

(conclusão)

Produto gênico e organismo	Número de acesso	Melhor e-value	Melhor similaridade	Número Contigs* Singletons	
copper/zinc superoxide dismutase [<i>C. limon</i>]	AAQ14591	7e-85	151/152	4	1
Cu/Zn superoxide dismutase [<i>C. sinensis</i>]	CAA03881	5e-67	125/126	4	5
MnSOD [<i>H. brasiliensis</i>]	CAB53458	3e-16	40/48	0	1
manganese superoxide dismutase [<i>Capsicum annuum</i>]	AAB88870	1e-50	101/110	0	1
putative CuZn-superoxide dismutase [<i>Populus tremula</i> x <i>P. tremuloides</i>]	CAC33847	3e-69	116/127	0	2
iron superoxide dismutase 3 [<i>A. thaliana</i>]	AAC24834	2e-59	142/200	0	2
iron-superoxide dismutase [<i>G. max</i>]	AAQ13492	3e-17	69/120	0	1
copper/zinc superoxide dismutase [<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>]	BAB78597	3e-13	38/40	0	1
superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) (Mn) precursor - curled-leaved tobacco	S03639	e-62	128/153	0	1
iron superoxide dismutase 3 [<i>A. thaliana</i>]	BAB11186	2e-47	65/106	0	1

* Entre parênteses estão representados os *contigs* (C) comentados nos resultados.

Anexo 3 - Genes com expressão diferencial induzidos em folhas de *Citrus sinensis* com sintomas de Pinta Preta

(continua)

Nome da sequencia (<i>contig</i>)	Acesso	Maior similaridade		Anotação	DAE ²
		<i>E-value</i> ¹	Organismo		
CA26-C1-002-005-F10-CT.F (C23)	BAD37611	6e-48	<i>Oryza sativa</i>	putative ethylene-inducible CTR1-like protein kinase	3.6537
CR05-C1-103-050-D08-CT.F	AAM63130	e-107	<i>Arabidopsis thaliana</i>	chalcone synthase-like protein	3.5278
CR05-C1-103-065-F06-CT.F	BAA74546	1e-83	<i>Nicotiana tabacum</i>	thaumatin-like protein SE39b	3.502
CS00-C3-702-106-D08-CT.F (C95)	AAT09451	1e-36	<i>Prunus persica</i>	putative NBS-LRR type disease resistance protein - RPM1	3.3775
CR05-C1-100-004-D07-CT.F (C30)	AAO72594	4e-65	<i>Oryza sativa</i>	disease resistance-like protein	3.2008
CS00-C1-102-062-C05-CT.F (C84)	XP_450193	e-112	<i>Oryza sativa</i>	putative serine/threonine-protein kinase ctr1	3.1791
CR05-C1-102-053-D07-CT.F (C193)	AAN62350	1e-79	<i>Poncirus trifoliata</i>	NBS-LRR type disease resistance protein - Citrus tristeza vírus resistance	3.1085
CR05-C3-701-058-D03-CT.F	CAB54520	e-121	<i>Brassica napus</i>	MAP3K epsilon 1 protein kinase	3.0935
CR05-C1-102-059-E06-CT.F (C47)	CAA49592	e-117	<i>Nicotiana tabacum</i>	NTF3	3.0883
CS00-C3-700-001-F05-CT.F (C2)	AAK26847	e-109	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SOS2-like protein kinase PKS8	3.076
CR05-C1-103-093-C04-CT.F	AAB52954	e-130	<i>Gossypium hirsutum</i>	ascorbate peroxidase	3.0718
CS00-C3-704-029-C12-CT.F	AAF78445	2e-84	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Contains a weak similarity to disease resistance protein (cf-5) gene from <i>Lycopersicon esculentum</i>	3.0155
CR05-C1-103-008-H11-CT.F (C216)	NP_195056	5e-75	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ADR1-L1 (Activated Disease Resistance 1)	2.9374
CS00-C1-101-109-C03-EU.F (C2)	AAC97926	3e-68	<i>Arabidopsis thaliana</i>	isochorismate synthase	2.8452
CS00-C3-700-064-B03-CT.F (C12)	AAL89456	3e-82	<i>Nicotiana tabacum</i>	osmotic stress-activated protein kinase - NtOSAK	2.8027
CR05-C3-701-039-E01-CT.F (C209)	AAO45749	1e-29	<i>Cucumis melo</i>	MRGH63	2.7906
CA26-C1-002-043-C02-CT.F (C24)	AAK26844	1e-85	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SOS2-like protein kinase PKS5	2.7888
CS00-C3-702-045-G04-CT.F (C38)	AAP86286	6e-96	<i>Brassica juncea</i>	CTR1-like kinase kinase kinase	2.7653
CR05-C1-100-026-F01-CT.F	CAC82811	3e-38	<i>Solanum tuberosum</i>	resistance gene-like - ry-1	2.737
CR05-C1-102-041-H10-CT.F (C62)	CAC84087	e-123	<i>Medicago sativa</i>	ZIK1 protein	2.7235
CR05-C1-100-072-D01-CT.F (C72)	CAA49592	9e-75	<i>Nicotiana tabacum</i>	NTF3	2.698
CR05-C1-102-095-E03-CT.F (C21)	AAQ14591	9e-73	<i>Citrus limon</i>	copper/zinc superoxide dismutase	2.6758
PT11-C1-901-051-G11-CT.F	AAM51555	3e-84	<i>Lycopersicon esculentum</i>	metacaspase 1	2.6553

Anexo 3 - Genes com expressão diferencial induzidos em folhas de *Citrus sinensis* com sintomas de Pinta Preta

(continuação)

Nome da sequencia (<i>contig</i>)	Acesso	Maior similaridade		Anotação	DAE ²
		<i>E-value</i> ¹	Organismo		
CA26-C1-002-012-F07-CT.F	AAS77675	3e-26	<i>Quercus suber</i>	resistance protein - RPc	2.6476
CR05-C1-102-009-B09-CT.F (C3)	AAO85509	5e-75	<i>Nicotiana benthamiana</i>	SGT1	2.579
CS00-C1-101-037-B09-CT.F	CAA05275	9e-30	<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>	Hcr9-9D	2.5489
CR05-C1-102-059-F02-CT.F (C6)	P11796	e-103	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial precursor	2.508
CS00-C1-102-092-E11-CT.F (C5)	CAA81286	1e-76	<i>Arabidopsis thaliana</i>	chorismate mutase precursor	2.4233
CG32-C1-003-066-C09-CT.F (C271)	CAD45029	8e-35	<i>Hordeum vulgare</i>	NBS-LRR disease resistance protein homologue - rga S-9201	2.3503
CR05-C1-102-032-F05-CT.F	AAR29073	3e-36	<i>Solanum bulbocastanum</i>	blight resistance protein B149	2.314
CS00-C3-704-024-E02-CT.F	AAM62409	4e-59	<i>Nicotiana tabacum</i>	RAR1	2.2704
CS00-C3-702-008-G05-CT.F (C38)	AAQ72576	2e-27	<i>Lactuca sativa</i>	resistance protein - RGC2	2.2399
CG32-C1-003-057-B04-CT.F (C100)	CAC84087	1e-30	<i>Medicago sativa</i>	ZIK1 protein	2.2149
CS00-C1-102-044-B12-CT.F (C27)	CAA03908	e-113	<i>Citrus sinensis</i>	beta-1,3-glucanase	2.1783
PT11-C1-901-004-E11-CT.F (C93)	BAB79636	e-126	<i>Nicotiana tabacum</i>	wound induced protein kinase WIPK	2.1574
CR05-C3-701-067-D04-CT.F (C211)	BAD53266	5e-30	<i>Oryza sativa</i>	putative disease resistance protein RPS2	2.1073
CA26-C1-002-080-F09-CT.F	Q94AS9	6e-96	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cyclic nucleotide-gated ion channel 4 (AtCNGC4)	2.0804
				(Cyclic nucleotide-and calmodulin-regulated ion channel 4) (AtHLM1)	
CR05-C1-103-012-F11-CT.F	AAN08179	7e-34	<i>Citrus grandis x Poncirus trifoliata</i>	putative citrus disease resistance protein Pt19	2.0054
CR05-C1-100-005-C11-CT.F	BAB08447	e-115	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TMV resistance protein-like	1.9896
CS00-C1-101-060-B07-CT.F (C63)	BAB01760	e-118	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MAP3K epsilon protein kinase	1.8857
PT11-C1-901-062-H07-CT.F (C91)	AAK62444	6e-82	<i>Arabidopsis thaliana</i>	similar to wpk4 protein kinase	1.8696
CS00-C1-102-102-C09-CT.F (C3)	AAP84706	4e-56	<i>Arabidopsis thaliana</i>	metacaspase 1	1.8516
CS00-C3-705-088-D03-CT.F (C24)	AAB58396	e-135	<i>Nicotiana tabacum</i>	salicylic acid-activated MAP kinase SIPK	1.8425

Anexo 3 - Genes com expressão diferencial induzidos em folhas de *Citrus sinensis* com sintomas de Pinta Preta

(conclusão)

Nome da sequencia (<i>contig</i>)	Acesso	Maior similaridade		Anotação	DAE ²
		<i>E-value</i> ¹	Organismo		
PT11-C1-900-087-F05-CT.F	JC7201	6e-98	<i>Malus x domestica</i>	thaumatin-like protein 1	1.8209
CR05-C1-102-065-F04-CT.F (C68)	AAR10436	e-119	<i>Arabidopsis thaliana</i>	YDA	1.7802
CS00-C1-101-098-H05-EU.F (C8)	Q42667	e-121	<i>Citrus limon</i>	phenylalanine-ammonia lyase	1.7545
CR05-C3-701-039-F05-CT.F (C23)	AAK62444	9e-75	<i>Arabidopsis thaliana</i>	similar to wpk4 protein kinase	1.7402
PT11-C1-901-020-F04-CT.F (C10)	AAF97278	7e-59	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NADH oxidase	1.6431
CR05-C1-103-040-H08-CT.F (C51)	XP_450193	e-112	<i>Oryza sativa</i>	putative serine/threonine-protein kinase ctr1	1.5731
CS00-C1-101-062-G11-CT.F (C74)	CAD54742	e-117	<i>Oryza sativa</i>	putative mitogen-activated protein kinase wjumk1	1.5463
CR05-C1-103-059-B03-CT.F	NP_175756	8e-64	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATMPK18 (<i>Arabidopsis thaliana</i> MAP kinase 8)	1.5122
CS00-C1-102-042-B03-CT.F (C29)	AAQ83971	e-103	<i>Nicotiana tabacum</i>	mitogen-activated protein kinase - oipk	1.3445
CS00-C1-101-069-A01-CT.F	AAK57011	e-115	<i>Citrus x paradisi</i>	cinnamate 4-hydroxylase	1.2828
CR05-C1-102-028-E10-CT.F (C184)	AAC78596	2e-60	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Hcr2-5D	1.2805
CR05-C1-100-053-G11-CT.F (C60)	BAB32406	6e-97	<i>Nicotiana tabacum</i>	NRK1 MAPK	1.2186
CR05-C1-103-092-F08-CT.F (C66)	AAP86286	3e-65	<i>Brassica juncea</i>	CTR1-like kinase kinase kinase	1.1902
CR05-C1-100-039-C10-CT.F (C20)	BAA83688	6e-96	<i>Oryza sativa</i>	OsPK4	1.106
CS00-C1-101-028-H08-CT.F (C29)	CAA03908	e-139	<i>Citrus sinensis</i>	beta-1,3-glucanase	0.9853
PT11-C1-901-050-B02-CT.F	O49066	1e-50	<i>Capsicum annuum</i>	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial precursor	0.9213
PT11-C1-901-020-B03-CT.F	AAF97278	1e-93	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NADH oxidase	0.9177
CR05-C1-102-074-H06-CT.F	AAK26841	3e-79	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SOS2-like protein kinase PKS2	0.9009
CR05-C1-103-049-E03-CT.F	CAC43237	e-110	<i>Sesbania rostrata</i>	Lipoxygenase	0.8413
CS00-C1-100-030-D07-CT.F (C56)	CAC84087	e-106	<i>Medicago sativa</i>	ZIK1 protein	0.8345
CS00-C3-702-091-E09-CT.F (C107)	AAN08166	2e-48	<i>Citrus grandis x Poncirus trifoliata</i>	putative citrus disease resistance protein Pt6	0.7353
CR05-C1-100-039-F07-CT.F (C89)	AAK26845	1e-94	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SOS2-like protein kinase PKS6	0.4569
CR05-C1-102-029-B09-CT.F	NP_197045	e-102	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cyclic nucleotide-gated ion channel 2 (<i>AtCNGC2</i>)	0.3448
CR05-C3-701-025-F05-CT.F	AAD27815	3e-30	<i>Lycopersicon esculentum</i>	disease resistance protein I2	0.2648

¹ *E-value*: indica o grau de "confiabilidade" de um alinhamento; ² DAE: diferença absoluta de expressão dos respectivos genes revelada na análise de macroarranjo.

Anexo 4 - Genes com expressão diferencial reprimidos em folhas de *Citrus sinensis* com sintomas de Pinta Preta

(continua)

Nome da sequencia (<i>contig</i>)	Acesso	Maior similaridade		Anotação	DAE ²
		<i>E-value</i> ¹	Organismo		
CR05-C1-100-081-C02-CT.F (C259)	AAC62138	4e-57	<i>Arabidopsis thaliana</i>	putative disease resistance protein	4.7854
CR05-C1-102-022-H06-CT.F	AAD33072	e-134	<i>Nicotiana tabacum</i>	secretory peroxidase	4.6389
CR05-C1-100-078-B04-CT.F (C170)	AAK61321	2e-35	<i>Phaseolus vulgaris</i>	NBS-LRR resistance-like protein J71	4.5561
CS00-C1-650-002-F01-CT.F (C11)	CAA06837	4e-62	<i>Catharanthus roseus</i>	isochorismate synthase	3.9942
CS00-C3-700-058-E12-CT.F (C91)	CAA74696	e-105	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MAP3K gamma protein kinase	3.5361
CR05-C1-102-037-B08-CT.F	AAK62444	1e-85	<i>Arabidopsis thaliana</i>	similar to wpk4 protein kinase	3.4122
CR05-C1-102-023-D07-CT.F	AAC78593	2e-42	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Hcr2-0B	3.3689
CS00-C3-703-073-A09-CT.F (C50)	CAC07963	1e-86	<i>Leishmania mexicana mexicana</i>	putative mitogen-activated protein kinase 9	3.2766
CS00-C1-102-015-G07-CT.F	P49317	e-133	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	Catalase isozyme 3	3.2424
CS00-C1-102-088-C09-CT.F	AAD50974	e-106	<i>Manihot esculenta</i>	catalase CAT1	3.1505
CR05-C1-103-062-G01-CT.F (C200)	AAC78591	1e-48	<i>Lycopersicon esculentum</i>	disease resistance protein -Cf-5	3.0699
CS00-C1-102-015-E11-CT.F	P17598	e-138	<i>Gossypium hirsutum</i>	Catalase isozyme 1	3.0694
CS00-C1-102-102-E08-CT.F	AAD17934	e-130	<i>Brassica juncea</i>	catalase	2.9396
CR05-C1-100-099-D03-CT.F (C10)	AAR19097	4e-29	<i>Glycine max</i>	NBS-LRR type disease resistance protein RPG1-B	2.8633
PT11-C1-901-059-D06-CT.F (C18)	P07505	3e-62	<i>Spinacia oleracea</i>	Superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplast precursor	2.8079
CS00-C1-101-104-G11-EU.F (C4)	AAF97278	e-105	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Strong similarity to 12-oxophytodienoate reductase	2.777
				OPR2 from Arabidopsis thaliana gblU92460 and is a member of the NADH:flavin oxidoreductase / NADH oxidase	
CS00-C1-101-072-D06-CT.F (C1)	NP_566396	1e-65	<i>Arabidopsis thaliana</i>	harpin-induced protein 1 family (HIN1)	2.6426
CS00-C1-102-018-A04-CT.F (C41)	CAC40826	9e-26	<i>Malus floribunda</i>	HcrVf2 protein	2.6423
CR05-C1-102-035-C07-CT.F (C149)	CAA72178	3e-83	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RGA2 protein	2.6031
CS00-C1-102-013-B09-CT.F (C113)	AAK58682	3e-28	<i>Lycopersicon esculentum</i>	verticillium wilt disease resistance protein – Ve1	2.589

Anexo 4 - Genes com expressão diferencial reprimidos em folhas de *Citrus sinensis* com sintomas de Pinta Preta

(continuação)

Nome da sequencia (contig)	Acesso	Maior similaridade		Anotação	DAE ²
		E-value ¹	Organismo		
CS00-C1-102-024-E11-CT.F (C115)	AAR21295	1e-47	<i>Lycopersicon esculentum</i>	bacterial spot disease resistance protein 4 - Bs4	2.58
CS00-C1-100-103-D05-UV.F (C81)	AAM83095	3e-88	<i>Glycine max</i>	SOS2-like protein kinase	2.5734
CS00-C3-705-059-F12-CT.F (C108)	CAB40943	9e-69	<i>Arabidopsis thaliana</i>	putative disease resistance protein	2.5625
CS00-C3-700-106-F11-CT.F (C236)	NP_192169	8e-51	<i>Arabidopsis thaliana</i>	seven transmembrane MLO protein family (MLO1)	2.511
CS00-C1-102-092-A04-CT.F (C12)	NP_196648	9e-71	<i>Arabidopsis thaliana</i>	chorismate mutase, cytosolic (CM2)	2.5027
CS12-C1-001-009-B05-CT.F (C221)	AAK58011	3e-36	<i>Lycopersicon esculentum</i>	verticillium wilt disease resistance protein Ve2	2.4326
CS00-C1-102-023-E09-CT.F (C22)	AAG38109	e-128	<i>Arabidopsis thaliana</i>	protein serine/threonine kinase PBS1	2.347
CS00-C1-101-114-A11-EU.F (C1)	BAB84352	e-120	<i>Citrus jambhiri</i>	Lipoxygenase	2.3107
CS00-C1-101-102-D10-EU.F (C106)	AAN65180	e-108	<i>Petroselinum crispum</i>	MAPK4	2.2897
CS00-C1-101-002-F01-CT.F (C35)	AAD28617	e-108	<i>Medicago sativa</i>	mitogen-activated protein kinase homologue	2.2382
CS00-C1-102-007-B06-CT.F (C6)	AAM61395	2e-87	<i>Arabidopsis thaliana</i>	putative P-protein: chorismate mutase	2.2282
CR05-C3-702-081-G05-CT.F (C15)	NP_564955	4e-86	<i>Arabidopsis thaliana</i>	serine/threonine protein kinase, putative	2.1987
CR05-C1-103-021-D05-CT.F (C8)	AAM62410	1e-94	<i>Nicotiana tabacum</i>	NPR1	2.1984
CR05-C3-700-049-D12-CT.F (C60)	BAC20285	e-120	<i>Citrus jambhiri</i>	acidic class II chitinase	2.1977
CR05-C3-702-091-B05-CT.F (C83)	CAB77975	2e-62	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MEKK1/MAP kinase kinase kinase	2.1884
CS00-C1-102-083-B09-CT.F (C61)	AAD13301	8e-48	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Hcr9-NL0D	2.1622
CS00-C1-100-124-E11-CT.F	CAA34641	8e-66	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	pathogenesis related protein	2.16
CR05-C1-103-008-H02-CT.F (C199)	AAR08150	3e-42	<i>Oryza sativa</i>	bacterial blight resistance protein Xa26	2.1513
CR05-C3-702-033-G08-CT.F (C14)	CAD56833	4e-35	<i>Lens culinaris</i>	putative resistance gene analogue protein - RGA	2.1244
PT11-C2-301-009-C12-CT.F (C107)	AAD28617	2e-59	<i>Medicago sativa</i>	mitogen-activated protein kinase homologue	2.1194
CS00-C1-102-069-B09-CT.F (C126)	CAC40827	2e-42	<i>Malus floribunda</i>	HcrVf3 protein	2.0552
CR05-C3-700-004-F08-EU.F (C71)	AAN62760	4e-35	<i>Medicago sativa</i>	disease resistance protein-like protein MsR1	2.0492
CS00-C1-100-020-C11-CT.F (C14)	BAB02016	e-118	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MAP kinase	1.9726

Anexo 4 - Genes com expressão diferencial reprimidos em folhas de *Citrus sinensis* com sintomas de Pinta Preta

(continuação)

Nome da sequencia (contig)	Acesso	Maior similaridade		Anotação	DAE ²
		<i>E-value</i> ¹	Organismo		
PT11-C1-900-013-B08-CT.F (C86)	NP_177492	6e-69	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATMKK9 (Arabidopsis thaliana MAP kinase kinase 9)	1.9374
CS00-C1-101-109-E12-EU.F (C22)	CAB77975	2e-93	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MEKK1/MAP kinase kinase kinase	1.9302
CS00-C1-102-057-A09-CT.F (C8)	AAL76166	6e-59	<i>Glycine max</i>	candidate plant disease resistance protein	1.8984
CS00-C1-102-013-B10-CT.F	AAL83720	e-134	<i>Vitis vinifera</i>	catalase	1.8697
CR05-C1-103-033-B09-CT.F	AAN08158	8e-41	<i>Citrus grandis</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>	putative citrus disease resistance protein 11P3	1.8601
CS00-C1-100-031-F06-CT.F (C3)	BAA98162	3e-44	<i>Arabidopsis thaliana</i>	FRO1-like protein; NADPH oxidase-like	1.8586
CR05-C3-702-039-B06-CT.F (C13)	XP_450193	e-114	<i>Oryza sativa</i>	putative serine/threonine-protein kinase ctr1	1.8569
CR05-C1-100-051-A02-CT.F (C98)	CAC84087	7e-56	<i>Medicago sativa</i>	ZIK1 protein	1.8514
CR05-C3-701-088-D01-CT.F	AAN08168	3e-28	<i>Citrus grandis</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>	putative citrus disease resistance protein Pt14	1.8227
CS00-C3-701-014-F02-CT.F (C109)	AF305912	3e-43	<i>Hordeum vulgare</i>	EDR1 (MAP3K)	1.8118
CS00-C1-101-036-A04-CT.F (C2)	AAM67012	3e-68	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Glutathione peroxidase	1.8042
CS00-C3-702-032-D01-CT.F (C105)	NP_173253	e-125	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATMPK8 (Arabidopsis thaliana MAP kinase 21)	1.8012
CS00-C1-100-015-H01-CT.F (C85)	AAC02202	1e-43	<i>Lactuca sativa</i>	resistance protein candidate RGC1b	1.7965
CS00-C1-100-084-E11-EU.F (C59)	CAC84087	3e-65	<i>Medicago sativa</i>	ZIK1 protein	1.784
CR05-C1-102-003-H03-CT.F (C17)	AAL32441	2e-82	<i>Medicago sativa</i>	Fe-superoxide dismutase precursor	1.7835
CS00-C1-102-017-G07-CT.F (C76)	AAU04436	1e-77	<i>Lycopersicon esculentum</i>	MAPKK	1.7744
CS00-C1-102-055-E08-CT.F (C52)	AAF78445	4e-82	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Contains a weak similarity to disease resistance protein (cf-5) gene from <i>Lycopersicon esculentum</i>	1.7396
CS00-C1-101-047-B03-CT.F	NP_201398	2e-61	<i>Arabidopsis thaliana</i>	seven transmembrane MLO protein family (MLO10)	1.7231
CS00-C1-101-008-H07-CT.F	AAL24124	3e-29	<i>Arabidopsis thaliana</i>	putative disease resistance Cf-2	1.6994

Anexo 4 - Genes com expressão diferencial reprimidos em folhas de *Citrus sinensis* com sintomas de Pinta Preta

(continuação)

Nome da sequencia (<i>contig</i>)	Acesso	Maior similaridade		Anotação	DAE ²
		<i>E-value</i> ¹	Organismo		
CS00-C1-102-052-D11-CT.F (C127)	AAP45165	1e-40	<i>Solanum bulbocastanum</i>	Disease resistance protein RGA3	1.6759
CS00-C1-100-116-E11-CT.F (C9)	P45726	e-138	<i>Camellia sinensis</i>	phenylalanine-ammonia lyase	1.6435
CS00-C1-100-122-D12-CT.F (C104)	AAD13037	2e-12	<i>Phaseolus vulgaris</i>	NBS-LRR-like protein cD8	1.6332
CS00-C1-101-021-D09-CT.F (C28)	XP_450193	3e-96	<i>Oryza sativa</i>	putative serine/threonine-protein kinase ctr1	1.6297
CS00-C3-701-034-F09-CT.F (C79)	CAA05267	4e-23	<i>Lycopersicon hirsutum</i>	Hcr9-4C	1.5676
CS00-C1-102-052-E08-CT.F (C3)	AAC18566	2e-90	<i>Glycine max</i>	2,4-D inducible glutathione S-transferase	1.3911
CR05-C3-701-103-G04-CT.F (C218)	BAB08447	e-103	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TMV resistance protein-like	1.3891
CS00-C1-102-078-B05-CT.F (C131)	NP_919704	2e-18	<i>Oryza sativa</i>	putative NBS-LRR type resistance protein	1.3718
CS00-C1-101-011-G07-CT.F (C9)	AAK01931	3e-74	<i>Glycine max</i>	Cu/Zn-superoxide dismutase copper chaperone precursor	1.336
CS00-C1-101-064-G09-CT.F (C1)	AAK40361	e-126	<i>Rosa hybrid cultivar</i>	CTR1-like protein kinase	1.3298
CS00-C1-101-063-G09-CT.F	AAA99868	e-123	<i>Gossypium hirsutum</i>	peroxidase	1.3269
CS00-C1-101-085-D11-UV.F	CAA66960	e-109	<i>Arabidopsis thaliana</i>	peroxidase	1.3235
CS00-C3-701-073-H07-CT.F (C21)	AAL89456	e-130	<i>Nicotiana tabacum</i>	osmotic stress-activated protein kinase	1.264
CR05-C3-702-048-G02-CT.F (C79)	XP_450193	1e-62	<i>Oryza sativa</i>	putative serine/threonine-protein kinase ctr1	1.2328
CS00-C1-101-056-B12-CT.F (C150)	AAM65167	2e-63	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AIG1-like protein	1.2138
CS00-C1-101-110-F06-EU.F	BAA78552	e-102	<i>Nicotiana tabacum</i>	thylakoid-bound ascorbate peroxidase	1.2119
CS00-C1-100-105-C10-EU.F (C1)	AAN72015	3e-40	<i>Arabidopsis thaliana</i>	non-race specific disease resistance protein (NDR1)	1.16
CS00-C3-701-035-D07-CT.F (C1)	AAF66066	e-124	<i>Citrus sinensis</i>	cinnamate 4-hydroxylase CYP73	1.1295
CS00-C1-102-071-H11-CT.F	AAC15779	4e-54	<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>	Cf-2.1	1.0553
CR05-C1-102-074-F07-CT.F (C196)	Q9LRR4	2e-37	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Putative disease resistance RPP13-like protein 1	1.0033
CS00-C1-102-037-C12-CT.F	AAL56987	6e-35	<i>Glycine max</i>	functional candidate resistance protein KR1	0.9986
CR05-C1-103-009-E11-CT.F	AAO89149	6e-30	<i>Gossypium barbadense</i>	NBS-type resistance protein - clone 82-4	0.9865
CR05-C3-701-086-B10-CT.F (C64)	BAA21856	e-102	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NPK1-related protein kinase 2	0.9847
CS00-C1-100-073-F01-CT.F (C37)	NP_193038	e-125	<i>Arabidopsis thaliana</i>	serine/threonine protein kinase	0.9758

Anexo 4 - Genes com expressão diferencial reprimidos em folhas de *Citrus sinensis* com sintomas de Pinta Preta

(conclusão)

Nome da sequencia (contig)	Acesso	Maior similaridade		Anotação	DAE ²
		E-value ¹	Organismo		
CS00-C1-102-068-F08-CT.F (C3)	CAB42794	e-138	<i>Citrus clementina</i> x <i>Citrus reticulata</i>	phenylalanine-ammonia lyase	0.9489
PT11-C1-901-038-C12-CT.F (C231)	AAC02202	3e-17	<i>Lactuca sativa</i>	resistance protein candidate RGC1b	0.9488
CS00-C1-100-058-D04-CT.F (C118)	AAF78445	7e-80	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Contains a weak similarity to disease resistance protein (cf-5) gene from <i>Lycopersicon esculentum</i>	0.9465
CS00-C2-003-080-D07-CT.F	AAN62348	e-144	<i>Poncirus trifoliata</i>	NBS-LRR type disease resistance protein - CTV.4	0.9402
CS00-C1-102-049-B10-CT.F	NP_175344	1e-75	<i>Arabidopsis thaliana</i>	protein kinase family protein	0.9237
CS00-C1-102-080-G10-CT.F	CAD33532	3e-42	<i>Datisca glomerata</i>	pathogenesis-related protein PR10A	0.8793
CR05-C1-100-096-B10-CT.F (C10)	AAG30576	e-136	<i>Ricinus communis</i>	nitrate reductase	0.8536
CG32-C1-003-042-G07-CT.F (C101)	CAB82938	5e-69	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE CTR1	0.8458
CS00-C1-102-037-B06-CT.F	AAD10848	4e-89	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MEK kinase - MAP3Ka	0.7992
CS00-C1-102-044-H03-CT.F (C7)	CAA38031	1e-85	<i>Betula pendula</i>	nitrate reductase	0.7432
CR05-C1-102-016-D10-CT.F (C125)	CAE51864	2e-42	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RPP27 protein	0.7171
CS00-C1-102-017-H10-CT.F (C97)	AK26845	e-100	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SOS2-like protein kinase PKS6	0.7101
CA26-C1-002-100-E11-CT.F (C39)	XP_450193	e-114	<i>Oryza sativa</i>	putative serine/threonine-protein kinase ctr1	0.6746
CR05-C1-102-014-B12-CT.F	CAA05280	e-117	<i>Lycopersicon esculentum</i>	loxc homologue	0.6703
CR05-C3-702-003-E08-CT.F (C78)	NP_197402	2e-55	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MPK16 (mitogen-activated protein kinase 16)	0.646
CS00-C1-102-077-A07-CT.F	NP_194785	1e-81	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATCNGC9 (CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL 9)	0.6422
CS00-C1-100-124-F09-CT.F (C46)	AAO65504	e-126	<i>Oryza sativa</i>	abscisic acid-inducible protein kinanase - PKABA1	0.4833
CR05-C1-102-082-A03-CT.F (C45)	BAD37611	9e-27	<i>Oryza sativa</i>	putative ethylene-inducible CTR1-like protein kinase	0.3214

¹ E-value: indica o grau de "confiabilidade" de um alinhamento² DAE: diferença absoluta de expressão dos respectivos genes revelada na análise de macroarranjo.