

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**Ativação das Vias Relacionadas a Resistência de *Citrus*
sinensis em resposta a interação com a bactéria
*Xanthomonas axonopodis***

Juliana da Silva Vantini

Orientador: Prof. Dr. Julio Cezar Franco de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro de 2007

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIANA DA SILVA VANTINI – nascida em 31 de março de 1981, no município de Jaboticabal – SP, filha de Arségio Vantini e Lúcia Maria da Silva Vantini. Bióloga, graduada em Bacharelado e Licenciatura pelo Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, em dezembro de 2003. Em agosto de 2004 iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/Jaboticabal).

NÃO APRESSSES

*Não apresses a chuva,
ela tem seu tempo de cair
e saciar a sede da terra.*

*Não apresses o pôr do sol,
ele tem seu tempo
de anunciar o anoitecer
até seu último raio de luz.*

*Não apresses tua alegria,
ela tem seu tempo para aprender
com a tua tristeza.*

*Não apresses teu silêncio,
ele tem seu tempo de paz
após o barulho cessar.*

*Não apresses teu amor,
ele tem seu tempo de semear mesmo
nos solos mais áridos do teu coração.*

*Não apresses tua raiva,
ela tem seu tempo
para diluir-se nas águas mansas
da tua consciência.*

*Não apresses o outro,
pois ele tem seu tempo
para florescer
aos olhos do criador.*

*Não apresses a ti mesmo,
pois precisas de tempo
para sentir
tua própria evolução*

(Autor desconhecido)

AS PEGADAS DO SENHOR

“Uma noite tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia com o SENHOR, e através do céu, passaram-se cenas da minha vida.

Para cada cena que se passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia, um era o meu e o outro era do SENHOR. Quando a última cena da minha vida passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia, e notei que muitas vezes no caminho da minha vida havia apenas um par de pegadas na areia. Notei, também, que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiados do meu viver. Isso aborreceu-me deveras, e perguntei então ao SENHOR: “Senhor tu me dissestes que, uma vez que eu resolvi Te seguir, Tu andarias sempre comigo, todo o caminho, mas notei que durante as maiores tribulações do meu viver havia na areia dos caminhos da vida apenas um par de pegadas. Não compreendo por que, nas horas que eu mais necessitava de Ti, tu me deixastes”.

O SENHOR me respondeu: “Meu precioso filho, Eu te amo e jamais te deixaria nas horas de tua prova e do teu sofrimento. Quando vistes na areia apenas um par de pegadas, foi exatamente aí que Eu te carreguei nos braços...”

Do livro "Pegadas na areia" - Margareth Fishback Powers - Ed.Fundamento

*À Deus, a Onipotência absoluta e Infinita,
que me deu tantos ensejos de felicidade,
saúde, amor e paz!*

*Aos meus pais Arségio e Lúcia, pelo
exemplo de trabalho, da honestidade, da
dignidade em toda a sua vida. Obrigada
pelo amor, carinho e incentivo!!*

*Ao meu querido irmão Fábio, agradeço
por todo o carinho e apoio!*

*Ao meu namorado Fabrício, pelo amor,
respeito, carinho, incentivo e compreensão
em todos os momentos de minha vida.
Obrigada meu amor!!*

DEDICO e AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

- A **Deus**, por ter iluminado o meu caminho e por ter me carregado nos braços nos momentos mais difíceis da minha vida...!!!!
- Ao meu orientador **Prof. Dr. Julio Cezar Franco de Oliveira**, pelos ensinamentos, incentivo e confiança durante todo o desenvolvimento do trabalho.
- À **Profa. Dra. Maria Inês T. Ferro** e ao **Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro**, pela confiança, amizade e contribuição para o meu trabalho.
- Aos **Profs. Manoel Vitor Franco Lemos e Sônia Marli Zingarett Di Mauro**, agradeço pela participação na banca de qualificação.
- Aos componentes da comissão examinadora: **Dra. Poliana Fernanda Giachetto e Prof. Dr. Manoel Vitor Franco Lemos**, pela participação e sugestões fornecidas, as quais foram de grande importância para o aprimoramento deste trabalho.
- Ao **Prof. Dr. Rinaldo Cesar de Paula (Coordenador)**, pela amizade e contribuição para a minha formação acadêmica.
- Aos **Profs. Dr. Luiz Roberto Furlan e Dr. Renato Luís Furlan**, por terem me auxiliado a dar os primeiros passos no campo da pesquisa e da ciência.
- Ao pessoal da bioinformática: **Renata, Paula, Fabrício e Maurílio**, pela atenção, respeito e paciência durante todo este período.
- Aos meus inesquecíveis amigos: **Gigi Dedemo, Agda, Flávia, Karina, Julinho, Dani, Poliana, Renata, Regina, Vanessa M., Paula, Fabiana, Gustavo**,

Fabrcio, Maurlio, Marcelo, Tiago, Cristiano, J de Deza, J de Antnio, Rafael M., Rafael H., Roseli, Maria Luza, Nilson, Mariana, Roberto, Tita, Andressa, Andr (Splinter), Thaís, Leonardo, Marisa, Carminha. Amados e eternos amigos, gostaria de agradecer os momentos de grande ternura, que nos piores momentos, vocs me estenderam as mos, me orientaram, me ensinaram que na vida, h sempre um melhor caminho a seguir, que a melhor vitria de um ser humano, e quando ele consegue perdoar e extrair a felicidade com pequenos e talvez desconhecidos gestos. Obrigada amigos por estarem ao meu lado nesta vida, abrindo caminhos para minha elevao espiritual, obrigada por nossos melhores momentos, sempre obrigada!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

- A **todos os funcionrios do Departamento de Tecnologia**, agradeo pela amizade e contribuio neste trabalho!

- Ao **peessoal do atendimento da Pps-Graduao**, agradeo pela ateno e simpatia.

- Ao auxlio financeiro da **CAPES** pela bolsa de mestrado e à **FAPESP** pelos recursos proporcionados dentro do Auxlio Jovem Pesquisador n 04/02006-7.

- E às minhas lindas e graciosas cachorras: **Jully, Mel, Anita e Írest**, pelos momentos de alegria e descontrao!!!!!!!!!!!!!!

SUMÁRIO

SUMÁRIO	vii
I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVO	3
III. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Citricultura e Cancro Cítrico.....	4
3.2 Resistência de plantas a doenças.....	6
3.3 Resistência não-hospedeira em citros.....	11
IV. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Estirpe bacteriana, condições de cultura e inoculação em plantas.....	13
4.2 Cinética de infecção.....	13
4.3 Extração de RNA total	14
4.4 Obtenção das sondas específicas de β -1,3-glucanase, Aleno oxido sintase, Chalcona sintase e Fenilalanina amônia liase de <i>Citrus sinensis</i>	16
4.4.1 Extração de DNA Genômico de plantas	17
4.4.2 Amplificação dos genes por PCR.....	17
4.4.3 Clonagem dos genes.....	18
4.4.4 Transformação	18
4.4.5 Seleção e Estoque dos Clones Positivos	19
4.4.6 Sequenciamento dos clones positivos	19
4.4.6.1 Micro-preparação de DNA plasmidial (“Boiling-Prep”)	19
4.4.6.2 Reação de Seqüenciamento	20
4.4.6.3 Lavagem das Amostras	21
4.4.6.4 Seqüenciamento	21

4.4.6.5 Anotação das seqüências dos genes	22
4.4.7 Preparação de DNA de plasmídeo	22
4.4.8 Digestão com <i>EcoRI</i>	23
4.4.9 Extração de DNA a partir de gel de agarose.....	24
4.5 “Northern blot”	25
4.5.1 Preparo das amostras e eletroforese	25
4.5.2 Preparo da transferência	25
4.5.3 Preparo das sondas.....	26
4.5.4 Pré-hibridização e hibridização.....	26
4.5.5 Lavagem da membrana	27
4.5.6 Remoção da sonda.....	28
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1 “Northern blot”	29
5.1.1 Extração de RNA total.....	29
5.1.2 Sondas	31
5.1.3 Seqüenciamento	34
5.1.4 Expressão dos genes de resposta de defesa da planta	35
VI. CONCLUSÕES	47
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

ATIVAÇÃO DAS VIAS RELACIONADAS A RESISTÊNCIA DE *Citrus sinensis* EM RESPOSTA A INTERAÇÃO COM A BACTÉRIA *Xanthomonas axonopodis*

RESUMO - A citricultura vem sendo constantemente ameaçada pela bactéria gram negativa *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac-A*), causadora do cancro cítrico. Esta bactéria, quando em contato com uma planta hospedeira, lesiona folhas, frutos e ramos. Por outro lado, quando este patógeno infecta uma planta não-hospedeira provoca uma reação necrótica no sítio de infecção (reação de hipersensibilidade). Os diversos mecanismos de defesa da planta ao ataque do patógeno, incluem aqueles mediados por genes codificadores da produção de ácido salicílico, ácido jasmônico, fitoalexinas, proteínas PR, dentre outros. Neste trabalho investigou-se a expressão dos genes codificadores de Fenilalanina amônia liase (FAL), Aleno oxido sintase (AOS), Chalcona sintase (CHS) e β -1,3-glucanase (PR-2) na interação *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* C (*Xaa-C*::*Citrus*) (resposta de resistência) e o comportamento dos mesmos na interação *Xac-A*::*Citrus* (cancro cítrico). Folhas de laranjeira (*Citrus sinensis*) inoculadas com suspensões bacterianas (*Xac-A* ou *Xaa-C*) foram coletadas em diferentes tempos de infecção. A expressão dos genes foi analisada por *Northern blot* com a ajuda de sondas específicas de *C. sinensis* obtidas via amplificação por PCR, com a utilização de oligonucleotídeos específicos dos genes em questão e DNA genômico de folhas de laranjeira. Os genes *fal*, *aos*, *chs* e *pr-2* foram expressos mais intensamente na interação *Xaa-C*::*Citrus* onde uma reação de resistência não-hospedeira é capaz de evitar o desenvolvimento de sintomas de cancro, quando comparados com a interação *Xac-A*::*Citrus* que leva ao cancro cítrico.

Palavras Chaves: Genes relacionados a resistência, cancro cítrico, resistência não-hospedeira, *Xanthomonas citri*, interação planta::patógeno.

PLANT RESISTANCE PATHWAYS ACTIVATION DURING *Citrus sinensis* AND *Xanthomonas axonopodis* INTERACTION

SUMMARY – The production of citrus fruits has been constantly threatened by the gram negative bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac-A*), the citrus canker disease agent. This bacterium, when in contact with host plants, induces canker lesions on leaves, fruits and branches. On the other hand, when this pathogen infects a non-host plant a necrotic reaction is induced at the infection site as a hypersensitive-like reaction. Plant defense mechanisms to pathogen attack include induction of genes coding for salicylic acid, jasmonic acid, phytoalexins and PR proteins. The expression of resistance related genes phenylalanine ammonia lyase (PAL), allene oxide synthase (AOS), chalcone synthase (CHS) and β -1,3-glucanase (PR-2) were investigated on the *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* C (*Xaa-C*::*Citrus sinensis* interaction (resistance response) or on *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* strain A (*Xac-A*::*Citrus sinensis* (citric canker) interaction. Orange leaves inoculated with bacterial suspensions (*Xac-A* or *Xaa-C*) were collected at different moments during infection. Resistance related gene expression was analyzed by Northern blot with the aid of citrus probes obtained by PCR amplification using specific oligonucleotides and orange leaves genomic DNA. The resistance related genes *pal*, *aos*, *chs* and *pr-2* have shown a more intense expression on the (*Xaa-C*::*Citrus* interaction which induces non-host resistance response, when compared to the citrus canker *Xac-A*::*Citrus* inducing interaction.

Keywords: Resistance related genes, Citrus canker, Non-host resistance, *Xanthomonas citri*, pathogen::plant interaction.

I. INTRODUÇÃO

A produção de citros é uma das atividades agroindustriais mais importantes em nosso país. O Estado de São Paulo responde por mais de 70% de toda a laranja produzida no país e 98% da produção de suco. O Estado responde ainda por 99% das exportações de laranja *in natura* e de 95% das exportações de suco de laranja. Os principais estados produtores, depois de São Paulo, são: Sergipe, Paraná, Rio Grande do Sul, Bahia, Minas Gerais e Santa Catarina (ABECitrus, 2006).

Entretanto, a produção de citros vem sendo constantemente ameaçada pela bactéria gram negativa *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac-A*) causadora do cancro cítrico. Esta bactéria quando em contato com uma planta hospedeira induz a formação de lesões do tipo cancro em folhas, frutos e caules. Sendo uma bactéria de fácil disseminação, um de seus vetores é o próprio homem, que leva as bactérias de um lugar para outro nos materiais de colheita, em veículos, máquinas e implementos, ou mesmo por meio do transporte de folhas, ramos e frutos. Altamente contagiosa, esta bactéria fitopatogênica consegue sobreviver em vários ambientes por vários meses. Em folhas, ramos e frutos com sintomas, a sobrevivência da bactéria pode durar vários anos (FUNDECITRUS, 2006). O único método de controle ao cancro cítrico é erradicar o material contaminado.

Por outro lado, quando este patógeno infecta uma planta não-hospedeira, uma reação necrótica é induzida na planta, a qual assemelha-se a uma Resposta de Hipersensibilidade (HR). Ou seja, nesta interação o patógeno ao tentar colonizar o tecido da planta, induz respostas de defesa não-hospedeira, as quais são rápida e intensamente ativadas impedindo a multiplicação e o desenvolvimento de sintomas da doença.

Diversos são os mecanismos de resposta de defesa de plantas a patógenos, dentre eles se destacam a ativação de vias metabólicas envolvidas na produção de ácido salicílico, ácido jasmônico, fitoalexinas e proteínas PR. Segundo CROZIER *et al.* (2000) o ácido salicílico está ligado à resposta de hipersensibilidade (HR) capaz de

restringir a expansão de fungos, bactérias ou vírus; e também à resposta sistêmica adquirida (SAR), as quais levam à síntese de proteínas relacionadas a patogenicidade (PR). O ácido jasmônico também é importante na resistência de plantas a patógenos pois media a expressão de proteínas antifúngicas e de fitoalexinas.

Neste trabalho, investigou-se a expressão de genes relacionados a vias metabólicas ativadas durante a resposta de resistência de plantas a patógenos, como o gene codificador da enzima aleno oxido sintase envolvida na síntese de ácido jasmônico, chalcona sintase envolvida na síntese de ácido salicílico, fenilalanina amônia liase envolvida na síntese de ácido salicílico e de fitoalexinas, e β -1,3-glucanase que corresponde à proteínas PR-2. A expressão destes genes em planta cítrica (*Citrus sinensis*), foi estudada para as interações *Citrus::Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* C (*Xaa-C*) (interação que induz resposta de resistência) e o comportamento destes genes durante a interação *Citrus::Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* estirpe A (*Xac-A*) que leva ao desenvolvimento de sintomas do cancro cítrico (doença).

II. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo investigar, através da técnica de "Northern blot", a expressão de genes representantes de vias de resistência de plantas a patógenos na interação *Xaa-C::Citrus* (onde uma reação de resistência não-hospedeira é induzida) e o comportamento destes genes na interação *Xac-A::Citrus* (onde sintomas do cancro cítrico são induzidos).

III. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Citricultura e Cancro Cítrico

O Brasil e os Estados Unidos são os maiores produtores de laranja, juntos representam cerca de 45% do total mundial. No Brasil, a produção de citros ocorre principalmente no Estado de São Paulo, onde cerca de 85% da produção brasileira de laranjas é gerada. Outros estados como Bahia, Minas Gerais, Pará, Paraná e Rio Grande do Sul contribuem para o agronegócio dos citros com a produção, principalmente, de laranjas, tangerinas e Tahiti (MATTOS JUNIOR *et al.*, 2006).

Entretanto, é necessário salientar que a produção em larga escala de laranjas em pomares está continuamente exposta a um grande número de patógenos e pragas. Dentre as principais doenças encontramos o cancro cítrico, a clorose variegada dos citros (CVC), a morte súbita dos citros (MSC), e mais recentemente uma nova ameaça, o "greening" (FUNDECITRUS, 2006).

O cancro cítrico é causado pela bactéria gram negativa *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, e é uma das doenças de maior potencial destrutivo (KOLLER, 1994 e ROSSETTI *et al.*, 1993). Esta fitobactéria provoca lesões do tipo cancro nas folhas, frutos e ramos de plantas cítricas, com posterior queda de folhas e frutos com conseqüente redução da produção. O processo de infecção ocorre através das aberturas naturais da planta ou ferimentos por onde a bactéria *Xanthomonas citri* adentra na planta hospedeira, infectando-a. Os sintomas que o cancro provoca nas folhas são manchas amareladas que aos poucos ficam com uma coloração marrom no centro, essas lesões são salientes e aparecem dos dois lados da folha (FUNDECITRUS, 2006). Em relação aos frutos as lesões também são salientes, mas superficiais, as mesmas podem até rachar os frutos quando com a doença em estado avançado. Já nos ramos aparecem lesões salientes do tipo crostas de cor parda.

O único método de controle do cancro cítrico é erradicar o material contaminado. Por exemplo, se um pomar com 1.000 laranjeiras apresentar mais do que 0,5% das

plantas contaminadas, todo o talhão deve ser erradicado, mas se o mesmo apresentar um número menor ou igual a 0,5% de plantas contaminadas, somente as plantas contaminadas é que devem ser erradicadas e todas ao redor delas num raio de 30 metros, e ainda todas as árvores de citros da região devem ser investigadas (FUNDECITRUS, 2006).

São conhecidos cinco tipos diferentes de cancro cítrico (ROSSETTI, 2001), dentre eles estão o cancro cítrico asiático ou cancrose A que é causada pela estirpe "A" da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac-A*), que ataca quase todas as espécies de citros, podendo ser encontrada nas Américas, Ásia, Oceania e África. O cancro cítrico "B" ou cancrose B é induzido pela estirpe "B" da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (*Xaa-B*), que ataca também quase todos as espécies de citros, mas de maneira menos agressiva quando comparada com a estirpe A, sendo encontrada somente na Argentina, Paraguai e Uruguai. Já a cancrose do limoeiro galego ou cancrose C, é causado pela estirpe "C" da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (*Xaa-C*), a qual é capaz de atacar somente o limoeiro galego ("Mexican lime") e induzir resposta de resistência não-hospedeira do tipo hipersensibilidade (HR) em outros citros que não o hospedeiro específico, e restringe-se a algumas regiões do estado de São Paulo (**Figura 1**). Existe também a mancha bacteriana dos citros, esta é induzida pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*, afeta principalmente os citrumelos Swingle e o clone 80-3, ocorrendo em vários viveiros da Flórida. E finalmente, a cancrose D, ocorre somente no México, causa lesões apenas em ramos e folhas de limoeiro galego, assim sendo, os fitopatologistas mexicanos não caracterizam esta doença como cancro cítrico.

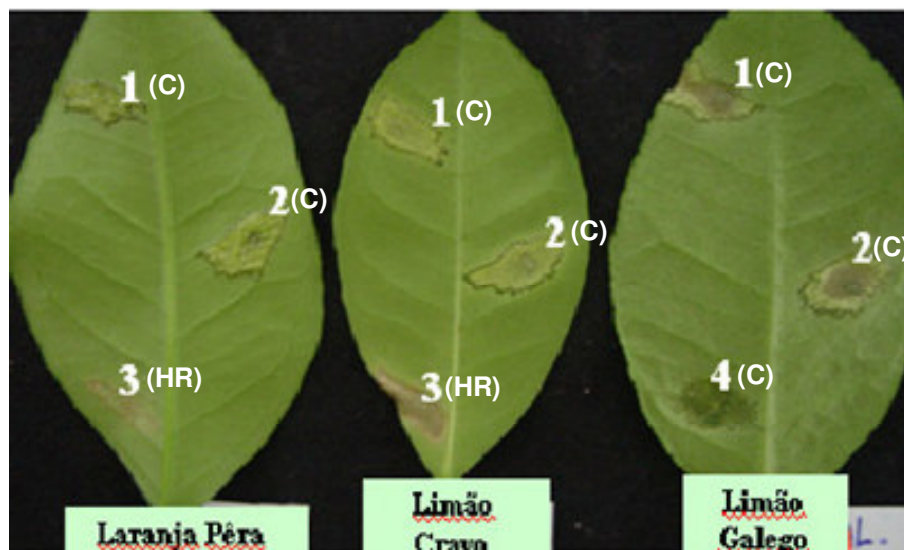


Figura 1. Sintomas de Xac-A, Xaa-B e Xaa-C inoculadas em folhas de laranja pêra, limão cravo e limão galego, respectivamente, após 5 dias de inoculação. (1) Sintomas de cancro (C) induzido por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* estirpe A; (2) Sintomas de cancro induzidos por *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantilolii* estirpe B; (3) Sintomas de HR (HR) induzidos por *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* estirpe C e (4) Sintoma de cancro induzido por *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* estirpe C.

3.2 Resistência de plantas a doenças

As plantas estão constantemente expostas a uma ampla variedade de fatores abióticos e bióticos. Dentre os fatores abióticos tem-se variações na temperatura, umidade, pH do solo, entre outros, enquanto os fatores bióticos envolvem, dentre outros, interações planta/patógenos (vírus, bactérias e fungos). Durante a evolução, em função de sua sobrevivência, as plantas desenvolveram mecanismos de resposta de defesa a danos e doenças, ativados na ocorrência da agressão.

O elaborado sistema de defesa e adaptação das plantas pode atuar de três formas. A primeira, a resistência constitutiva, ocorre mesmo sem a ação de agentes agressores: recebida por herança dos ancestrais, ela torna as plantas imunes à maioria dos patógenos. As outras formas são resistências localizadas, resistência específica gene-a-gene ou a resistência não-hospedeira, ativadas no ponto onde ocorre a

infecção, e a resistência sistêmica adquirida, ativada em decorrência de uma resistência localizada e que protege a planta contra ataques subseqüentes (MARGIS-PINHEIRO *et al.*, 2006).

No contato entre bactérias fitopatogênicas e plantas pode ocorrer o desenvolvimento de reações do tipo compatíveis ou incompatíveis. Na interação compatível o patógeno ataca a planta valendo-se de estratégias que envolvem a neutralização dos mecanismos de defesa da planta hospedeira, produção de toxinas, secreção de enzimas líticas extracelulares e liberação de fatores de virulência nos meios extra e intracelular da planta atacada, permitindo ao patógeno desenvolver-se nos tecidos vegetais e levando à manifestação de sintomas da doença (WHITE *et al.*, 2000). Na interação incompatível, o patógeno é restringido no sítio de infecção após o disparo dos mecanismos de defesa da planta, os quais podem ser caracterizados como resistência espécie-específica ou raça-específica, e resistência não-hospedeira, ambas freqüentemente associadas a uma necrose localizada, também denominada reação de hipersensibilidade (HR, "Hipersensitivity Response") (STASKAWICZ *et al.*, 1995). Se a resposta de hipersensibilidade tiver sucesso, o patógeno é eliminado no sítio de infecção (TAIZ & ZEIGER, 2004).

As alterações que constituem a resposta de defesa das plantas frente a estresses causados por patógenos têm sido intensamente estudadas com o objetivo do melhoramento vegetal (CORDEIRO & GROSSI DE SÁ, 1999). A resposta de defesa de plantas contra patógenos envolve a ativação coordenada da expressão de múltiplos genes, levando ao acúmulo de metabólitos secundários e com freqüência a ativação de uma resposta de hipersensibilidade (HR) e o desenvolvimento de resistência sistêmica adquirida (DANGL & JONES, 2001). A resistência sistêmica adquirida, conhecida como SAR (de "systemic acquired resistance"), protege a planta - junto com a resistência local - contra novos ataques de patógenos. Induzida por diferentes agentes, após uma primeira infecção, a SAR torna a planta resistente, por várias semanas, a infecções posteriores. A proteção é eficaz contra um grupo de patógenos, e não todos, e varia de acordo com a espécie vegetal (MARGIS-PINHEIRO *et al.*, 2006).

Assim sendo, o termo HR refere-se a uma morte celular programada das células vegetais atacadas pelo patógeno e células adjacentes ao sítio de infecção, levando ao bloqueio e eliminação do agente invasor no sítio de infecção (STASKAWICZ *et al.*, 1995). HAMMOND-KOSAK & JONES (1997) afirmam que os fatores ligados à HR envolvem um aumento intracelular dos níveis de espécies reativas de oxigênio, fortalecimento da parede celular, produção de fitoalexinas que são agentes antimicrobianos e indução da expressão de proteínas de defesa, que limitam a colonização de tecidos vegetais e impedem a manifestação da doença.

Muitas vias metabólicas são ativadas em respostas de defesa de plantas a patógenos, dentre elas podemos citar as vias do Ácido jasmônico, do Ácido salicílico, a síntese das Fitoalexinas e a expressão das Proteínas Relacionadas à Patogênese (PR).

O ácido jasmônico é um dos hormônios de grande importância na função da resistência das plantas a insetos e doenças (CROZIER *et al.*, 2000). Ele também é fundamental na resposta a estresse, ferimentos e moléculas elicitoras (DOARES *et al.* 1995; KRAMELL *et al.* 1995; PARCHMANN *et al.* 1997; LEON *et al.* 2001), além de defesa contra patógenos (THOMMA *et al.* 1999; KLOEK *et al.* 2001). A via do ácido jasmônico envolve vários eventos de transdução de sinais, como por exemplo: a percepção imediata do ferimento ou estímulo do estresse para a transdução de sinal local e sistêmico; percepção deste sinal e indução da biossíntese do ácido jasmônico; percepção do ácido jasmônico e indução de respostas de defesa e finalmente a integração da sinalização do ácido jasmônico com as vias do ácido salicílico, etileno e outras vias de sinalização (TURNER *et al.*, 2002).

A biossíntese do ácido jasmônico se inicia com o ácido α -linolênico (VICK & ZIMMERMAN, 1984; SCHALLER, 2001). Há duas vias do ácido jasmônico em tecidos de plantas, uma localizada no cloroplasto e a outra no citoplasma (CREELMAN & MULLET, 1995). A existência de uma via no citoplasma é sugerida por estudos transgênicos envolvendo a superexpressão da aleno oxido sintase (AOS) em tabaco (WANG *et al.*, 1999). Folhas com ferimentos produzem um acúmulo de ácido jasmônico bem como um aumento nos níveis de transcritos da enzima aleno oxido sintase (CROZIER *et al.*, 2000). Entretanto, a superexpressão da AOS em plantas transgênicas

tanto de *Arabidopsis* quanto de tabaco não alterou os níveis basais de ácido jasmônico, porém, quando plantas transgênicas foram submetidas a ferimentos, estas produziram altos níveis de ácido jasmônico quando comparadas a plantas controle (não transformadas) feridas (LAUDERT *et al.*, 2000). Estudos recentes confirmam o envolvimento do ácido jasmônico no desenvolvimento da planta (XIE *et al.*, 1998; SANDERS *et al.*, 2000; STINTZI & BROWSE, 2000) como também nos processos relacionados à defesa contra patógenos (XIE *et al.*, 1998; RYAN, 2000).

A produção de ácido salicílico (AS) também está associada com a resistência a doenças (CROZIER *et al.*, 2000). O AS bloqueia a atividade da enzima catalase, provocando um acúmulo de H_2O_2 , o qual ativa a produção e acúmulo de proteínas relacionadas com a patogênese (PR) e das fitoalexinas. No caso da catalase não ser bloqueada, não é observado o acúmulo de H_2O_2 , verificando-se uma reação compatível. Deste modo, a presença das catalases inibe a reação de hipersensibilidade em função de impedir o acúmulo de H_2O_2 o qual serve como um sinal para a produção e acúmulo das proteínas relacionadas com a patogênese e das fitoalexinas (BALARDIN, 2006).

A enzima fenilalanina amônia liase (FAL) participa tanto da síntese do ácido salicílico quanto das fitoalexinas. A FAL está situada em um ponto de ramificação entre os metabolismos primário e secundário. Assim, quando a planta é invadida por patógenos a quantidade desta enzima aumenta, estimulando a síntese de compostos fenólicos (TAIZ & ZEIGER, 2004). A FAL catalisa o primeiro passo na biossíntese dos fenilpropanóides, levando à produção de compostos fenólicos com amplas funções biológicas, incluindo as fitoalexinas (HAMMERSCHMIDT, 1999). TAIZ & ZEIGER (2004) afirmam que as fitoalexinas constituem um grupo de metabólitos secundários quimicamente diversos, que se acumulam em torno do local de infecção e apresentam atividade antimicrobiana. Além disso, as mesmas não estão presentes nas plantas antes da infecção, mas são sintetizadas muito rapidamente após o ataque do patógeno, devido à ativação de novas rotas biossintéticas.

Uma outra enzima que se destaca no grupo das fitoalexinas é a chalcona sintase (CHS). A CHS atua precocemente na via de biossíntese dos flavonóides, metabólitos

secundários que possuem uma importante função nas interações que ocorrem entre as plantas e o ambiente em que se encontram (CONTESSOTTO *et al.*, 2001). Assim sendo, CUI *et al.* (1996) afirmam que as fitoalexinas (com função nas interações planta-microorganismos) podem ser derivadas da via dos flavonóides, e a ativação da resposta de defesa da planta pode ser frequentemente detectada pela acumulação de mRNA de chalcona sintase ou pela proporção da atividade desta enzima após inoculação na planta com microorganismos.

Por fim, a reação de defesa das plantas também pode ser acompanhada pela indução da síntese de um grupo específico de proteínas, as quais preferencialmente se acumulam nos espaços extracelulares, sendo chamadas de proteínas relacionadas à patogênese (PR) (VAN LOON, 1985; WHITE *et al.*, 1987). A expressão dos genes que codificam as proteínas PR é induzida tanto localmente quanto sistemicamente após a inoculação com patógeno ou seguida do tratamento com ácido salicílico, sendo caracterizadas como moléculas sinalizadoras da resistência de plantas a doenças (TAKEMOTO *et al.*, 2003). As β -1,3-glucanases, mais conhecidas como PR-2, são amplamente distribuídas em plantas superiores e são induzidas durante a resposta de hipersensibilidade de plantas contra patógenos de origem viral, bacterianos ou fúngicos (BUCHER *et al.*, 2001). Além disso, a PR-2 também tem sido implicada em vários processos fisiológicos e de desenvolvimento, incluindo divisão celular, formação de pólen e germinação de sementes (WORRALL *et al.*, 1992). Segundo SCHLUMBAUM *et al.* (1986), estas enzimas hidrolíticas são capazes de inibir o crescimento dos patógenos, presumivelmente degradando suas paredes celulares. As β -1,3-glucanases são enzimas líticas capazes de degradar os polissacarídeos encontrados nas paredes celulares de muitos fungos e tem atividade antifúngica quando analisadas *in vitro* (MAUCH *et al.*, 1988; SELA-BUURLAGE *et al.*, 1993).

A identificação e o estudo da expressão de genes envolvidos nas respostas de defesa de plantas a patógenos constituem-se numa etapa fundamental para a compreensão dos fenômenos bioquímico-moleculares, visando variedades agrícolas mais resistentes, podendo aumentar a produção e a qualidade dos alimentos.

3.3 Resistência não-hospedeira em citros

A resistência de plantas a doenças pode ser classificada em hospedeira e não-hospedeira. A resistência hospedeira em geral é parasita-específica e restrita a raças particulares de patógenos (HEATH, 2000), enquanto a resistência não-hospedeira é um fenômeno que permite às plantas defenderem-se contra a maior parte dos microrganismos patogênicos, podendo ser dividida nos tipos 1 (sem a produção de sintomas visíveis) e 2 (associado ao desenvolvimento de uma HR localizada) (MYSORE & RYU, 2004). Embora seja bem menos compreendida em seus detalhes do que a resistência específica, a resistência não-hospedeira por ser de amplo espectro e eficaz contra diferentes tipos de patógenos, representando portanto, uma possibilidade promissora para a manipulação e transferência destes determinantes de resistência entre espécies cultivadas, como também entre espécies selvagens (HOLUB & COOPER, 2004).

Estudos com a planta modelo *Arabidopsis thaliana* revelaram similaridades entre os perfis de expressão gênica relacionados às resistências específica e não-hospedeira (TAO *et al.*, 2003), sugerindo que estes dois tipos de resistência possam compartilhar vias de transdução de sinais. A verificação de uma resposta de hipersensibilidade (HR) associada tanto à resistência hospedeiro-específica quanto à resistência não-hospedeira, no patossistema *Phytophthora infestans* - batata (VLEESHOUWERS *et al.*, 2000), pressupõe que estas respostas de resistência envolvam mecanismos similares, embora a intensidade e a temporalidade delas variem entre os dois tipos de resistência (ABLE *et al.*, 2003; HUCKELHOVEN *et al.*, 2001).

Os pomares comerciais de laranja são formados por enxertos propagados a partir de cultivares elite, contornando as dificuldades relacionadas ao melhoramento desta cultura, como por exemplo o longo tempo de geração na obtenção de progênie destinadas a estudos de segregação gênica (BORDIGNON *et al.*, 2003). No entanto, a homogeneidade genética das lavouras comerciais predispõe a epidemias causadas pelos mais diversos agentes patogênicos.

As dificuldades do melhoramento vegetal de citros, no que se refere à resistência a patógenos, podem vir a ser contornadas pela utilização de tecnologias modernas envolvendo biologia molecular e análise genômica. Neste sentido, o estudo da resistência não-hospedeira em citros é desejável, pois constitui-se numa alternativa para o desenvolvimento de estratégias que permitam transferir este tipo de resistência não-específica e de amplo espectro a cultivares com altos índices de produtividade.

A cancrose do tipo C, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* estirpe C (*Xaa-C*), afeta somente o hospedeiro específico deste patógeno, o limoeiro do tipo galego. Quando inoculada em outros tipos de citros, *Xaa-C* induz uma rápida resposta de resistência caracterizada por uma reação necrótica restrita ao sítio de infecção, do tipo HR (**Figura. 1**, interação 3), o que tornou este um interessante modelo para a investigação dos fenômenos envolvidos na resistência não-hospedeira em citros.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estirpe bacteriana, condições de cultura e inoculação em plantas

A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* estirpe A (*Xac-A*), cujo genoma foi seqüenciado por completo (Da Silva *et al.*, 2002), e *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* estirpe C (*Xaa-C*), foram cultivadas a 28°C em meio TSA (10 g/L de triptona, 10 g/L de sacarose e 1 g/L de glutamato de sódio), com e sem adição de ágar. As plantas cítricas, *Citrus sinensis* vc *Pera* (laranja pêra), foram mantidas em casa de vegetação antes da inoculação. Durante e após as inoculações as plantas foram mantidas num laboratório de segurança apropriado para a contenção deste fitopatógeno. Foram utilizadas para inoculação folhas jovens, com aproximadamente 7 cm ao longo da nervura principal. A preparação do inóculo foi realizada com bactérias cultivadas por 3 dias a 28°C em meio TSA para obtenção de massa celular, seguido de ressuspensão em água destilada e ajuste para a uma densidade óptica de $A_{600} = 0,3$, equivalente a aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). As inoculações em planta foram realizadas por infiltração da suspensão de bactérias com auxílio de seringa hipodérmica sem agulha, diretamente no espaço apoplástico, em todo o limbo foliar, na parte abaxial de folhas expandidas jovens de plantas de laranja pêra.

4.2 Cinética de infecção

As folhas de laranja pêra inoculadas, respectivamente com *Xaa-C*, *Xac-A* ou água (“Mock”), foram coletadas para uma cinética de infecção com 10 períodos diferentes (0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 e 96 h após inoculação). Além disso, utilizou-se também uma planta controle (planta não inoculada).

4.3 Extração de RNA total

As amostras de RNAs totais foram purificadas segundo o método descrito por CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987), baseado na extração utilizando uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol-Invitrogen)). Para a extração de RNA, todo o material utilizado foi tratado para evitar a presença de RNAses (SAMBROOK *et al.*, 1989) e todas as soluções foram feitas com água ultra pura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), conforme recomendado por SAMBROOK *et al.* (1989). Aproximadamente 1,5 g de folhas foram coletadas de cada ponto da cinética de infecção, inclusive a da planta controle (não inoculada) e mantidas a -80°C até utilização. Para a extração dos RNAs, as folhas correspondentes a cada ponto da cinética foram maceradas com pistilo num gral contendo nitrogênio líquido, até a pulverização do material vegetal.

Realizada a maceração, o material foi transferido rapidamente para um tubo de polipropileno tipo Falcon (50 mL), contendo 10 mL de Trizol e a amostra foi homogeneizada por agitação vigorosa em vortex por aproximadamente 30 s. Após agitação vigorosa e incubação por 5 min em temperatura ambiente, 2 mL de clorofórmio (Merck) (0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol) foram acrescentados, e a solução foi submetida a vigorosa agitação por 30 s e incubada por 3 min em temperatura ambiente e centrifugada à 12.000 xg por 15 min, a 4°C . Após a remoção do sobrenadante por aspiração, o mesmo foi transferido para um tubo tipo Corex de 15 mL e novamente adicionou-se clorofórmio equivalente ao coletado (0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol), agitou-se vigorosamente em vortex por 30 s com uma posterior incubação de 3 min a temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000xg por 15 min, a 4°C , sendo o sobrenadante aspirado mais uma vez e adicionado 0,6 mL de Isopropanol absoluto (Mallinckrodt) para cada 1 mL de solução da fase aquosa, dando início ao processo de precipitação do RNA total. Foi realizada inversão do tubo bem devagar e incubação por 10 min em temperatura ambiente. Seguido isto, a amostra foi centrifugada à 12.000xg por 10 min, a 4°C . Após desprezar o sobrenadante, o precipitado de RNA foi lavado com 4 mL de Etanol 75% gelado

(retirada do excesso de sal) com breve centrifugação a 7.500xg durante 5 min a 4°C, este passo foi novamente realizado. Em seguida, o precipitado de RNA foi seco em bomba a vácuo durante 3 a 5 min e ressuspensão em 500 µL de água-DEPC (água tratada com dietilpircarbonato) pré aquecida a 70°C. Depois, a amostra foi incubada em banho-maria a 65°C por 10 min. Após a ressuspensão, o RNA purificado foi dividido em dois tubos eppendorf de 1,5 mL, os quais foram submetidos à leitura em espectrofotômetro (Biophotometer/8,5mm/Eppendorf), nos comprimentos de onda de 260nm (A260nm) e 280nm (A280nm), para verificação tanto de sua concentração (A260nm) como da presença ou não de proteínas contaminantes (A260nm/A280nm) (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Para verificar a integridade do RNA total foi preparado um gel desnaturante de 1,5% de Agarose. Pesou-se 1,5 g de agarose em um Erlenmeyer de 125 mL. Dissolveu-se a agarose em 82 mL de água-DEPC adicionada de 10 mL de tampão de corrida "Running buffer" 10 vezes concentrado (0,2M MOPS, 80 mM Acetato de Sódio, 10 mM EDTA pH 8,0), submetendo-se em seguida ao microondas por 2 min. Após este procedimento, adicionou-se 8 mL de Formaldeído e a solução foi transferida para a cuba de eletroforese para solidificação do gel. As amostras de RNA total (2 µg cada), secas em bomba a vácuo, foram acrescidas de 80,5% de Tampão de Amostra (66,7% formamida deionizada, 13,3% de tampão de corrida 10X, 8% formaldeído, 0,25% azul de bromofenol e 11,75% de água DEPC), 16,7% de H₂O DEPC e 2,8% de Brometo de etídeo (SAMBROOK *et al.*, 1989), posteriormente, foram aquecidas em banho-maria a 65°C por 7 min, antes de serem aplicadas no gel de agarose. O gel foi então submetido a eletroforese por cerca de 2 h, a 90 V. Após verificação da integridade da amostra de RNA total, os tubos de eppendorfs de 1,5 mL contendo 250 µL da mesma foram estocados a -80°C.

4.4 Obtenção das sondas específicas de β -1,3-glucanase, Aleno oxido sintase, Chalcona sintase e Fenilalanina amônia liase de *Citrus sinensis*

Primeiramente, realizou-se um estudo das vias metabólicas de resposta de defesa das plantas frente a patógenos. Dentre estas vias metabólicas, foram escolhidos alguns genes que codificam enzimas e ou proteínas nas etapas fundamentais das mesmas. Os genes analisados foram β -1,3-glucanase (Proteínas Relacionadas à Patogênese- PR), Aleno oxido sintase (Ácido Jasmônico), Chalcona sintase (Fitoalexinas) e Fenilalanina amônia liase (Fitoalexinas e Ácido Salicílico). As seqüências de cDNAs dos genes em questão foram recuperadas do National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2005) em relação ao organismo estudado, laranja pêra (*Citrus sinensis*). Através das seqüências de nucleotídeos do NCBI (AJ000081), (AY243478), (AB009350) e (AAY82899), respectivamente, foram construídos oligonucleotídeos específicos com o auxílio do programa “Gene runner” para a amplificação por PCR e clonagem dos fragmentos de DNA correspondentes aos genes escolhidos como sondas (**Tabela 1**). Os oligonucleotídeos construídos foram:

Genes	Oligonucleotídeos construídos	Tamanho do fragmento
β -1,3-glucanase	Forward: 5' gTCgTCTTgTTTCTTCTTg 3' Reverse: 5' TTAATCTggTATCTAggCTg 3'	991
Aleno oxido sintase	Forward: 5' AACAAACCACCAAACCTTC 3' Reverse 5' CAgCACTTCgTACACCAC 3'	1007
Chalcona sintase	Forward: 5'.CCACCgAggCCATTAAAg 3' Reverse: 5' TTgCCATACTCCgAAAgC 3'	678
Fenilalanina amônia liase	Forward: 5' CAACTCggTgAATgACAATC 3' Reverse: 5' AgACgTgTTCgCgATCAgC 3'	592

Tabela 1. Oligonucleotídeos específicos de *Citrus sinensis* dos genes escolhidos como sondas, realizados no programa “Gene runner” e os seus respectivos tamanhos de fragmentos de cDNA.

4.4.1 Extração de DNA Genômico de plantas

As amostras de folhas jovens de plantas de laranja pêra foram coletadas pouco tempo antes de proceder a extração. As mesmas foram maceradas em nitrogênio líquido até pulverização completa do material, em seguida foram transferidos 0,125 mg para cada eppendorf de 1,5 mL contendo 500 μ L tampão de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) acrescidos de 1% de β -mercaptoetanol, deixando-os agindo por 30 min em banho 65°C. Após isto, foi adicionado 350 μ L de uma mistura de clorofórmio:etanol (24:1) e as amostras foram bem homogeneizadas. Centrifugou-se por 15 min a 14.000 rpm (Centrífuga Eppendorf série 5415C), a fase aquosa foi recuperada e adicionou-se 350 μ L de isopropanol, sendo lentamente misturados por inversão do tubo e mantidos por 20 min a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 10.000 rpm (Centrífuga Eppendorf série 5415C), o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se ao precipitado 1 mL de solução de lavagem (etanol 76% mais acetato de amônia 10 mM). Cuidadosamente a solução de lavagem foi vertida, a secagem do precipitado foi realizada em temperatura ambiente por 10 min, sendo logo em seguida ressuspensão em 100 μ L de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) (ROMANO & BRASILEIRO, 1999).

4.4.2 Amplificação dos genes por PCR

Os amplicons relativos aos genes selecionados foram obtidos com a utilização de um termociclador de gradiente (Gene Amp PCR System 9700). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 μ L e consistiu de: 16 μ L de água ultra pura autoclavada, 2,5 μ L de tampão de PCR 10X, 2 μ L de dNTP (2,5 mM cada dNTP), 1 μ L de MgCl₂ (50mM), 313,5 ng de DNA genômico de planta, 10 pmoles de oligonucleotídeo “Forward”, 10 pmoles de oligonucleotídeo “Reverse” e 5U de Taq DNA polimerase (“Hight Fidelity”-Invitrogen). Foi utilizado o seguinte ciclo de termociclagem: 2 min a 95°C (denaturação) seguido de 40 ciclos de 45 s a 95°C, 45 s à temperatura de pareamento de cada oligonucleotídeo, 45 s para fragmentos pequenos, com

aproximadamente 300 pb ou 1 min e 30 s para fragmentos maiores (1000 pb), e finalmente 5 min a 72°C (extensão final). Para analisar a amplificação dos fragmentos foi realizado uma eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando 3 µL de cada amostra.

4.4.3 Clonagem dos genes

Os fragmentos amplificados de cada gene foram clonados em vetor TOPO T/A (Original TA cloning kit-Invitrogen). Para cada reação de ligação foi utilizado 6 µL de H₂O, 1 µL tampão de ligação 10X, 1 µL produto de PCR, 1 µL pCR 2.1 vetor 0,025 µg/µL com razão de 1:1 (vetor:inserto) e 1 µL de T₄ DNA ligase 4U/µL, perfazendo um volume final de 10 µL. A reação de ligação foi incubada a 14°C por 16 h.

4.4.4 Transformação

As transformações com os plasmídeos recombinantes foram realizadas por eletroporação, que consistiu de 3 µL do volume total da ligação em 40 µL de células competentes *E.coli* DH10B. As condições do eletroporador (Bio Rad) foram: 400 Ohms de resistência, 25 µF de capacitância e 1250 Kv de voltagem para cubetas de 0,1 cm. Após isto, as bactérias foram recuperadas em meio SOC [1000 µL de meio SOB (5 g de Triptona; 1,25 g de Extrato de levedura; 0,13 g de NaCl; 0,05 g KCl; q.s.p. 250 mL com água destilada), adicionados de 40 µL de Glicose 20% e de 40 µL de MgCl₂ 1M], pré-aquecido a 37°C. Esta recuperação foi feita por incubação a 37°C, a 150 rpm, por 1 h. Em seguida este meio com bactérias eletroporadas foi colocado em eppendorfs e centrifugado por 1 min, 60% do sobrenadante foi descartado para uma maior concentração do eletroporado e o precipitado foi ressuspensão delicadamente com a pipeta, sendo que 50% do ressuspensionado foi colocado em cada placa de Petri.

O plaqueamento foi realizado em meio sólido 2xTY (16 g de Triptona; 10 g de Extrato de Levedura; 5,0 g de NaCl; 12 g de Ágar; q.s.p. 1000 mL com água destilada) contendo 50 µg/mL de canamicina. Esse meio foi suplementado com X-Gal (0,026%) e IPTG (0,82 mM), onde o aparecimento de colônias brancas indicaria sucesso na clonagem.

4.4.5 Seleção e Estoque dos Clones Positivos

A identificação dos clones positivos foi realizada por meio da coloração branca das colônias, sendo coletados com palitos esterilizados. Após isto, os clones foram cultivados em microplacas (Evergreen/Costar) de 96 poços (2,5 mL), cada um contendo 150 µL de meio 2xTY com glicerol (16 g de Triptona; 10 g de Extrato de Levedura; 5,0 g de NaCl; 12 g de Ágar; 80 mL de glicerol 100%; q.s.p. 1000 mL com água destilada) e Canamicina (50 µg/ml), as quais foram seladas com filme adesivo e cada poço foi perfurado com agulha estéril para a aeração da bactéria. As microplacas foram mantidas em estufa a 37°C por 16 h, sendo estocadas a -80°C.

4.4.6 Sequenciamento dos clones positivos

4.4.6.1 Micro-preparação de DNA plasmidial (“Boiling-Prep”)

A repicagem foi realizada em placas “deep well” também de 96 poços, contendo 1 mL de meio CG em cada poço acrescido de Canamicina (50 µg/ml). Os clones foram cultivados em agitador (New Brunswick Scientific) a 37°C por 24 h, sob uma agitação de 300 rpm. Em seguida, centrifugou-se o inóculo a 2.700 xg por 8 min, a 20°C, descartou-se o sobrenadante, ficando somente o precipitado de bactérias na placa. Aos precipitados foram adicionados 25 µL de água ultrapura autoclavada. Posteriormente foi realizado uma agitação vigorosa em vortex e completa homogeneização. Iniciou-se a preparação da solução STET (200 µL de NaCl 5M; 0,65 g de Tween 20; 22 µL EDTA

0,5M - pH 8,0; 160 μ L Tris-HCl 1M - pH 8,0; água ultrapura autoclavada/q.s.p. 10 mL). Foram acrescentados ao STET 0,005g de lisozima e 240 μ L de RNase A (10 μ g/mL). Adicionou-se a cada poço 70 μ L da solução STET citada acima. Todas estas quantidades utilizadas equivalem a uma placa de 96 poços. Depois a placa foi agitada em vortex por 30 s, sendo incubada por 7 min em TA. Posteriormente a mesma foi submetida ao microondas (3 min e Potência 8) para fervura dos poços com o conteúdo, o que provoca o rompimento da parede bacteriana. Logo em seguida, 300 μ L de água ultrapura autoclavada foram adicionados em cada poço da placa, sendo agitada em vortex por 30 s e incubada por 10 min em gelo. Centrifugou-se a 4.000 xg por 30 min a 20°C. Foi retirado de cada poço da placa 60 μ L do sobrenadante, os quais foram transferidos para uma placa tipo ELISA de 96 poços (Evergreen/Costar), o DNA foi estocado a - 22°C até a montagem da reação de seqüenciamento.

A quantidade de DNA a ser utilizada na reação de seqüenciamento foi determinada através de eletroforese, com um gel 0,8% de agarose, para verificação da intensidade das bandas.

4.4.6.2 Reação de Seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada em microplacas utilizando o Kit “DNA Sequencing-Big Dye Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction ABI Prism” (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Inicialmente, foram montados dois “mix” da reação de seqüenciamento em eppendorfs de 1,5 mL. O “mixR” consistiu em: 200 μ L de “BigDye Terminator”, 350 μ L de Tampão “Save Money” (200 mM Tris pH 9,0; 5 mM $MgCl_2$) e 200 μ L de iniciador Big Dye, 3,2 pmol dos iniciadores M13/pUC 1201 (“reverse” 5'-AACAGCTATGACCATG -3'). Já o “mixF” foi preparado da mesma maneira, mas o iniciador utilizado foi M13/pUC 1211 (“forward” 5'- GTAAAACGACGGCCAGT -3').

A PCR foi realizada utilizando-se o método de terminação da cadeia por dideoxynucleotídeo (SANGER *et al.*, 1977) e a química do “BigDye Terminator”, da ABI, foi montada utilizando-se 6,0 μ L do “Mix” da reação de seqüenciamento, 3 μ L de água

ultrapura autoclavada e 1 μL de DNA, sendo esta quantidade estimada após verificação de intensidade das bandas em gel de agarose 0,8%. A reação foi submetida a amplificação no termociclador (MJ Research-Inc) com 1 ciclo a 96°C por 2 min (desnaturação inicial) e 35 ciclos de 96°C por 10 s (desnaturação), 52°C por 5 min (pareamento do oligo iniciador) e 60°C por 4 min (extensão), seguida por uma temperatura de 4°C por tempo indeterminado.

4.4.6.3 Lavagem das Amostras

As amostras foram lavadas inicialmente com a adição de 80 μL de Isopropanol 75% em cada poço. Selou-se a placa com alumínio e, após incubação por 15 min em local escuro   TA, centrifugou-se a 4.000 xg por 30 min a 20°C. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 200 μL de Etanol 70% em cada poço da placa. As amostras foram centrifugadas a 4.000 xg por 10 min a 20°C, o sobrenadante foi descartado novamente, sendo o processo anterior realizado mais uma vez. A placa foi centrifugada invertida por alguns segundos (aceleração e desaceleração 1), em seguida, colocada em bomba de vácuo por 5 min para a completa secagem das amostras.

4.4.6.4 Seqüenciamento

Foram seqüenciados aproximadamente 12 clones de cada gene estudado. O Seq enciador automático utilizado foi ABI PRISM 3700 DNA Analyzer, da Applied Biosystems. A própria máquina realiza a aplicação das amostras no seqüenciador automático ABI 3700 (Capilar), por meio de duas ponteiras do "Autoloader" que injetam as amostras de DNA diretamente nos capilares. Os DNAs "secos" das placas foram ressuspensos em 9,0 μL de formamida Hi - Di e desnaturados a 95°C por 5 min, sendo

mantidos em gelo por no mínimo 2 min, após foram seladas e colocadas no ABI 3700, para realização do processo.

4.4.6.5 Anotação das seqüências dos genes

A anotação das seqüências dos genes foi realizada no Laboratório de Bioinformática (LBM/FCAVJ/UNESP, 2006). Utilizou-se um “script” para a contagem de bases dos cromatogramas com qualidade e o critério utilizado foi de pelo menos 400 bases por seqüência com qualidade acima de 20. Os cromatogramas das seqüências foram analisados através do programa Phred/Phrap/Consed (GORDON *et al.*, 1998). Este programa localizou e retirou das seqüências as regiões do vetor. Assim, realizou-se o alinhamento das seqüências similares, produzindo os “contigs” e suas seqüências consensos. Foi realizado um Blast automático comparando cada seqüência ao banco de dados público GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (NCBI, 2006), sendo considerados apenas os alinhamentos que obtiveram e-value inferior a e^{-10} .

4.4.7 Preparação de DNA de plasmídeo

A preparação de DNA em pequena escala foi realizada em tubo falcon de 15 mL. Uma colônia de bactérias recombinantes foi inoculada em tubo contendo 4 mL de meio 2xTY e 20 μ L de Canamicina (50 μ g/mL) e o inóculo foi incubado sob agitação (New Brunswick Scientific) a 250rpm, 37°C por 16 h. Após isto, todo o conteúdo da cultura de bactérias foi transferido aos poucos para um eppendorf de 1,5 mL, seguido de centrifugação em microcentrífuga por 1 min a temperatura ambiente. Após cada centrifugação o sobrenadante foi descartado, adicionando-se mais cultura, de modo que somente o precipitado de bactérias ficasse no fundo do eppendorf, referente a 4,5mL de cultura bacteriana.

O precipitado de bactérias foi ressuspenso em 100 μL de tampão gelado Tris HCl 25 mM pH 8,0 contendo glicose 50 mM e EDTA 10 mM, em seguida adicionou-se 200 μL de uma solução de lise contendo NaOH 0,2N e SDS 1%. Lentamente a amostra foi homogeneizada por inversão do tubo e incubada por 5 min a 4°C. A amostra foi então centrifugada por 5 min a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Acrescentou-se ao sobrenadante igual volume de feno e clorofórmio 1:1, seguido de homogeneização em agitador e centrifugação em microcentrífuga por 1 min. O sobrenadante, o qual contém o DNA, foi precipitado com a adição de duas vezes o volume de etanol absoluto, mantido em freezer -80°C por 10 min. Posteriormente, o DNA foi centrifugado por 15 min, lavado com etanol 80%, seco em temperatura ambiente por 10 min e ressuspenso em 30 μL de TE contendo RNAase A (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Ao final deste processo, foi realizado uma eletroforese com gel de agarose a 0,8% para verificação da integridade do material, para isto, foram utilizados apenas 2 μL de DNA.

4.4.8 Digestão com *EcoRI*

Inicialmente as seqüências consensos de cada gene foram digeridas *in silico* com o auxílio do programa NEB cutter V2.0 (NEB, 2006), o qual permitiu verificar possíveis sítios de restrição para a enzima *EcoRI*. A análise dos mapas de restrição de cada gene possibilitou a utilização desta enzima para todos os genes em estudo.

Todos os DNAs plasmidiais foram digeridos com *EcoRI*. A reação consistiu de 15 μL de água ultrapura autoclavada, 17,6 μg de DNA plasmidial, 5 μL de tampão 10xH e 2 μL de enzima *EcoRI* (12U/ μL)-Amersham Life Sciences, respectivamente. O volume final da reação foi de 50 μL . Os tubos foram mantidos em banho-maria a 37°C por no mínimo 3 h. Após isto, realizou-se uma eletroforese em um gel de agarose a 1%, a quantidade de amostra de DNA aplicada no gel foi de 2 μL . A realização desta digestão possibilitou a purificação dos DNAs das sondas a partir de um gel de agarose (**Tabela 2**).

Genes	Tamanho do fragmento de cDNA	Tamanho do fragmento digerido
β -1,3-glucanase	991	1589
Aleno oxido sintase	1007	1000
Chalcona sintase	678	700
Fenilalanina amônia liase	592	520

Tabela 2. Tamanhos dos fragmentos gênicos de cDNA e dos fragmentos após a digestão realizada com a enzima *EcoRI*.

4.4.9 Extração de DNA a partir de gel de agarose

Todo o volume restante da amostra digerida com *EcoRI* foi utilizado para a eletroforese da extração de DNA, em um gel de agarose a 1%. A banda contendo o fragmento de DNA desejado foi cortada do gel, pesada e colocada dentro de um eppendorf de 1,5 mL conforme as recomendações do fabricante do Kit de purificação “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” - Promega. Adicionou-se 10 μ L de “Men Bind Solution” por 10mg de gel (o kit recomenda no máximo 400 mg de gel por coluna). A amostra foi agitada em vortex e em seguida incubada em banho-maria a 65°C até dissolver toda a agarose, o tempo da incubação foi de aproximadamente 20 min. Após isto, realizou-se a montagem da coluna e o gel dissolvido foi transferido para a coluna e incubado por 1 min em temperatura ambiente. Centrifugou-se a amostra a 16.000xg por 1 min, o eluido foi descartado (o DNA permanece no filtro) e a coluna foi recolocada no tubo que estava a amostra. A partir deste processo iniciou-se as lavagens: adicionou-se 700 μ L de “Wash Solution”, o tubo foi centrifugado a 16.000xg por 1 min, o eluido foi descartado novamente e a coluna foi re-inserida no tubo, já a segunda lavagem foi realizada com 500 μ L de “Wash Solution”, a centrifugação foi por 5 min a 16.000g. Logo após, a coluna foi transferida para um eppendorf de 1,5 mL e adicionado 50 μ L de água do kit, o tubo foi então centrifugado a 16.000xg por 1 min, descartou-se a coluna e a amostra purificada foi estocada a -20°C.

4.5 “Northern blot”

Membranas de náilon foram confeccionadas para investigar a expressão de genes representantes de vias de resistência da planta ativadas na interação *Xaa-C/citros*, e o comportamento destes genes na interação *Xac-A/citros* (onde sintomas do cancro cítrico são induzidos). As sondas foram obtidas a partir de DNA genômico correspondendo aos genes de interesse clonados a partir de citros.

4.5.1 Preparo das amostras e eletroforese

As amostras de RNA total foram descongeladas e quantificadas, utilizou 15 µg de RNA total de cada ponto da cinética de infecção de cada interação estudada. Após isto, as amostras foram secas em liofilizador e depois preparadas pela adição de 80,5% de Tampão de Amostra (66,7% formamida deionizada, 13,3% de tampão de corrida 10X, 8% formaldeído, 0,25% azul de bromofenol e 11,75% de água DEPC), 16,7% de H₂O DEPC e 2,8% de Brometo de etídeo (SAMBROOK *et al.*, 1989), as quais foram aplicadas em gel de agarose desnaturante 1,5%, perfazendo uma corrida de 3 h a 60V. Terminado este processo, o gel foi analisado em luz UV, fotografado e em seguida o mesmo recebeu uma série de lavagens sob agitação suave: 1ª lavagem, água DEPC por 10 min (remoção da formamida); 2ª lavagem, NaOH 0,05N (diluído em DEPC) por 20 min (fragmentação do RNA total) este tratamento permite a hidrólise parcial do RNA total para uma maior eficiência na transferência; enxaguou-se o gel novamente com água DEPC e a última lavagem foi realizada com SSC 20X durante 45 min (preparação do gel para a transferência) (SAMBROOK *et al.*, 1989).

4.5.2 Preparo da transferência

As amostras de RNA total separadas por eletroforese foram transferidas para a membrana de náilon (Hybond H⁺) conforme descrito por SAMBROOK *et al.* (1989).

Este método permite que os RNAs sejam transferidos por capilaridade utilizando-se uma solução de SSC 10X, durante um período de 16 h. Passado este período, a membrana foi retirada, observada sob luz UV e fotografada para a confirmação da eficiência da transferência. Em seguida, lavou-se a membrana duas vezes com uma solução de SSC 5X por 5 min sob agitação suave. Após, a membrana foi revestida com filme plástico e levada ao aparelho de “crosslink” (exposição a luz UV para fixação dos RNAs na membrana), o filme foi retirado e a membrana foi agora revestida com um envelope de papel 3 MM para maior proteção, sendo levada a estufa a 80 °C por 2 h.

4.5.3 Preparo das sondas

As sondas foram marcadas utilizando-se o Kit Random Primers DNA Labeling System da Invitrogen. Inicialmente, o DNA (25ng) foi desnaturado em água fervente (100 °C) por 5 min, sendo logo em seguida transferido para o gelo. Após isto, adicionou-se os seguintes reagentes: dATP, dGTP, dTTP (0,5 mM), random primers, tampão de reação, aproximadamente 25 µCi [α -³² P] dCTP e 3 unidades de Klenow Fragment, respectivamente. A reação foi misturada gentilmente e brevemente centrifugada, sendo incubada a 25 °C por aproximadamente 3 h. A mesma foi interrompida pela adição de 5 µL de “Stop buffer”. Posteriormente, as sondas passaram por um processo de purificação em coluna de Sephadex G-50, a qual permite a retirada dos nucleotídeos não incorporados. As sondas foram desnaturadas novamente em água fervente por 5 min antes de serem adicionadas à solução de hibridização.

4.5.4 Pré-hibridização e hibridização

As membranas foram umedecidas em solução de SSC 2X e colocadas dentro de tubos de 300 mL, de modo a evitar bolhas entre a membrana e a parede interna do tubo. Então, adicionou-se 20 mL de solução de hibridização [monohidrogeno fosfato de sódio 1M (Na₂HPO₄), dihidrogeno fosfato de sódio 1M (NaH₂PO₄), BSA 5%, SDS 20%]

em cada tubo com suas respectivas membranas. A pré-hibridização ocorreu a 68°C durante 3 h em forno de hibridização marca “Hybaid”. Em seguida, a sonda foi adicionada à solução de hibridização e homogeneizada cuidadosamente, incubando-se a 68°C as sondas (*pr-2* e RNA ribossomal-18S) e 65°C as sondas (AOS, CHS e FAL) durante 16 h.

4.5.5 Lavagem da membrana

Inicialmente, a solução de hibridização foi descartada adequadamente (rejeito radioativo). As primeiras lavagens foram feitas com uma solução de baixa estringência (SSC 2X; SDS 0.05%) utilizando um volume de 200 mL, o processo se repetiu quatro vezes por 10 min para as sondas (*pr-2* e RNA ribossomal-18S), já as demais sondas (AOS, CHS e FAL) foram lavadas 2 vezes por 10 min. Após isto, as soluções foram descartadas adequadamente e uma segunda solução de lavagem pré-aquecida a 50°C com maior estringência foi utilizada (SSC 0,1X; SDS 0,1%), sendo realizada 2 vezes por 40 min nas sondas (*pr-2* e RNA ribossomal-18S) e 2 vezes por 20 min nas sondas (AOS, CHS e FAL), com o mesmo volume citado acima para cada lavagem. Posteriormente, a membrana foi selada em um filme de plástico, usando a própria solução da última lavagem para umedecê-la, foi então exposta a um filme de raio-X em cassete de exposição e colocada no freezer (-80°C). As membranas hibridizadas com a sonda do RNA ribossomal 18S (controle) foram reveladas com aproximadamente 1 h de exposição, as do gene *pr-2* foram reveladas após um período de 10 dias de exposição, já as membranas dos demais genes foram reveladas após um período de 20 dias de exposição. A quantificação do sinal produzido no filme foi realizada através de análise densitométrica das autorradiografias em um densitômetro Shimadzu modelo CS-9301, em um comprimento de onda de 550 nm, módulo de leitura em transmitância e zig zag. A área debaixo de cada pico foi calculada e representa a intensidade do sinal gerado em cada caso, que é o resultado da hibridização da sonda específica de cada gene com

o RNA fixado na membrana. Quanto maior a quantidade de RNA transcrito, maior o sinal produzido no filme.

4.5.6 Remoção da sonda

Para a remoção das sondas visando re-utilização das membranas, foi utilizado uma solução de SDS 0,5% a 100 °C, sendo que a mesma foi despejada em um recipiente contendo a membrana, permanecendo sob agitação suave até o resfriamento da solução. Em seguida, a membrana foi lavada com uma solução de SSC 2X e selada novamente em um filme de plástico, sendo exposta a um filme de raio-X em cassete de exposição e colocada no freezer (-80 °C). A membrana foi revelada após o período de exposição anteriormente.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 “Northern blot”

5.1.1 Extração de RNA total

A técnica de “Northern blot” foi utilizada para investigar a expressão de genes representantes de vias de resistência possivelmente ativados na interação *Xaa-C/citros* (resposta de resistência) e o comportamento destes genes na interação *Xac-A/citros* (onde sintomas do cancro cítrico são induzidos), como mostrado na **Figura 2**.

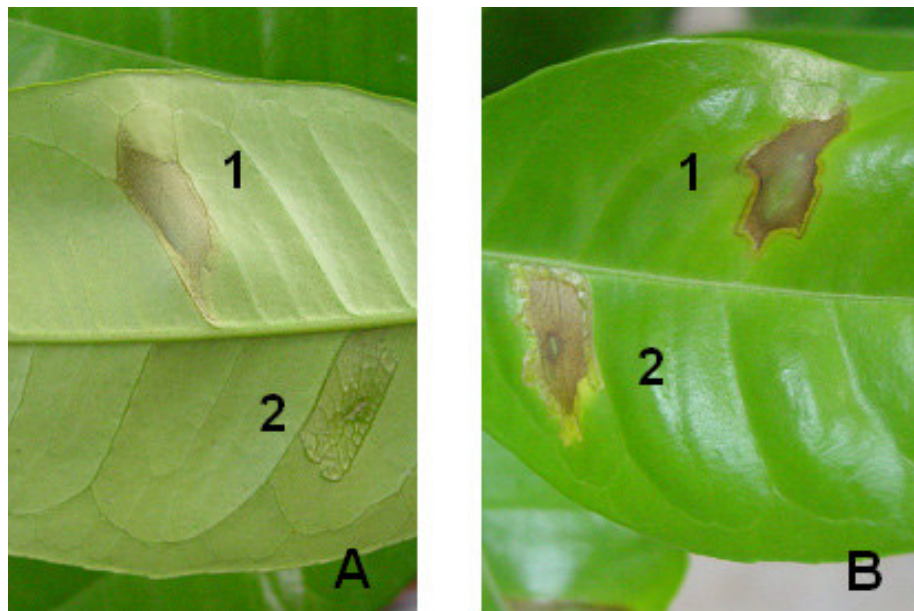


Figura 2- Sintomas induzidos em planta (*Citrus sinensis*), a 3 (A: parte abaxial da folha) e 8 (B: parte adaxial da folha) dias após inoculação. 1: Sintomas de resistência induzida na interação *Xaa-C/citros*. 2: Sintomas de cancro cítrico induzido na interação *Xac-A/citros*.

As amostras de RNA total foram extraídas do tecido foliar de laranja pêra conforme a cinética de infecção estudada; estas amostras foram utilizadas para a

confeção das membranas de náilon. A eficiência no processo de hibridização desta técnica depende principalmente da qualidade e da quantidade do RNA. Para isto, os RNAs totais foram quantificados em um espectrofotômetro e a sua integridade (visualização das bandas 28S e 18S) foi verificada por meio de uma eletroforese com um gel a 1,5% de agarose sob condições desnaturantes. Para este processo utilizou-se 2 μ L de RNA total de cada uma das amostras (**Figura 3**). Sendo assim, a presença das bandas ribossomais 28S e 18S, as quais se apresentaram íntegras, viabilizou a utilização destas amostras para a realização dos experimentos de “Northern blot”. A **Figura 4** ilustra um gel a 1,5% de agarose sob condições desnaturantes, com 15 μ g de RNA total em cada canaleta, todos os géis para os experimentos de Northern blot foram realizados nestas condições.

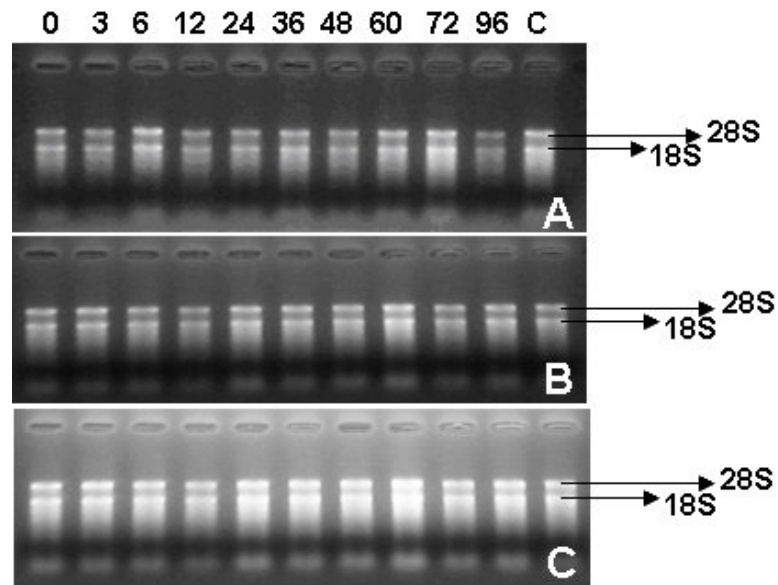


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1,5% (desnaturante) de amostras de RNA total extraídas de folha de laranja. Foram aplicados 2 μ L de RNA total conforme a cinética utilizada (0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96 h após inoculação) e (C) controle (planta não inoculada). A: RNA total de planta inoculada com água (“mock”). B: RNA total de planta inoculada com *Xaa-C*. C: RNA total de planta inoculada com *Xac-A*. As bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 18S e 28S estão indicadas.

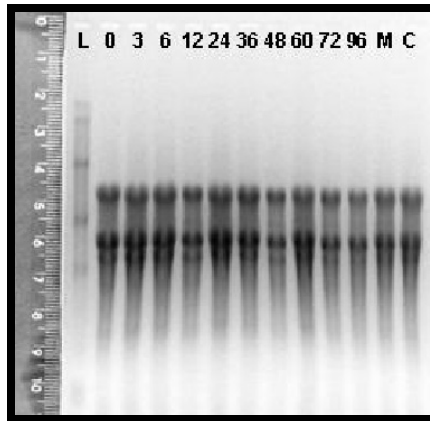


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose de RNA total de folhas de laranjeira inoculadas com bactéria, 15 μ g em cada canaleta (L) RNA Ladder: 0.24-9.5kb; (0h, 3h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, 96h) todas após inoculação, (M) mistura de todos os tempos do (“mock”) e (C) planta controle (planta não inoculada).

5.1.2 Sondas

Após a síntese dos oligonucleotídeos de interesse, foi realizado a extração de DNA genômico de plantas pelo método do CTAB (detergente). Este é o método mais utilizado com sucesso para diferentes espécies de plantas (ROMANO & BRASILEIRO, 1999). Esse detergente solubiliza as membranas, formando com o DNA um complexo que facilita uma posterior precipitação (WEISING *et al.*, 1995). A **Figura 5** mostra a eletroforese em gel de agarose do DNA genômico extraído das folhas das plantas. A partir desta amostra de DNA genômico foram realizadas as amplificações dos genes de interesse por PCR. Para analisar a amplificação destes fragmentos foi realizado uma eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando 3 μ L de cada amostra, cujo resultado pode ser observado na **Figura 6**. Para a confirmação das identidades dos genes utilizados na confecção das sondas, os mesmos foram submetidos ao sequenciamento, sendo que, a quantidade de DNA a ser utilizada na reação de seqüenciamento foi determinada através de eletroforese, com um gel 0,8% de agarose, para verificação da intensidade das bandas (**Figura 7**). Após a confirmação da identidade de cada gene, realizou-se uma preparação de DNA de plasmídeo em pequena escala de cada clone selecionado (**Figura 8**). Em seguida, todos estes DNAs plasmidiais foram digeridos com

a enzima de restrição *EcoRI*. A **Figura 9** mostra uma eletroforese em gel de agarose a 1%, com 2 μ L de DNA de cada amostra, os quais apresentam-se digeridos com *EcoRI*. Ademais, por meio da técnica de extração de DNA em gel de agarose (Kit de purificação “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” – Promega), obtivemos as sondas.

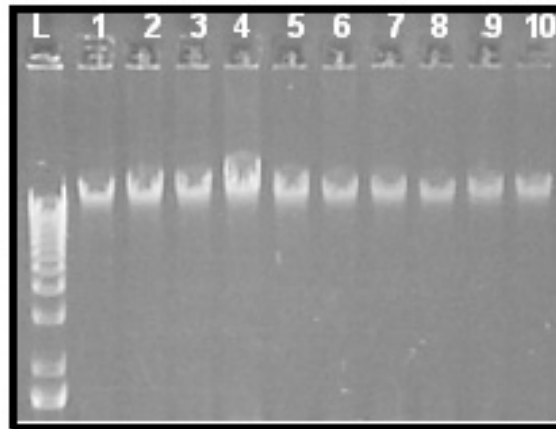


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose (1%) dos DNAs genômicos extraídos de folhas de laranja pêra. (L) DNA Ladder 1Kb; (1-10) amostras de DNA genômico de laranja pêra.

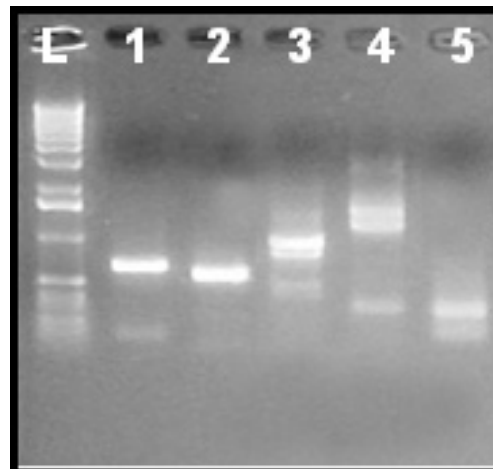


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose (1%) dos fragmentos dos genes por PCR. (L) DNA ladder 1Kb; (1) Chalcona sintase; (2) Fenilalanina amônia liase; (3) Aleno oxido sintase; (4) *pr-2* (β -1,3-glucanase); (5) Branco.

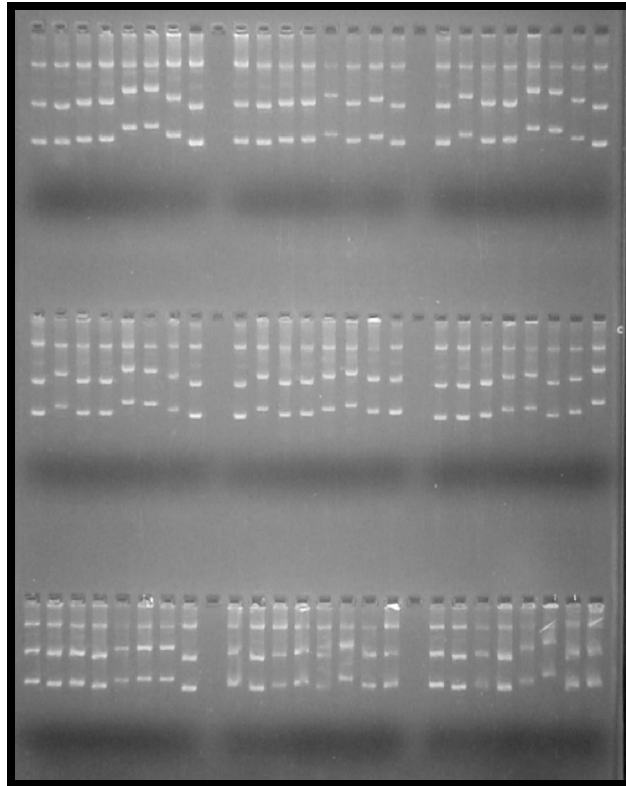


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) da micro-preparação de DNA plasmidial (“Boiling-Prep”).

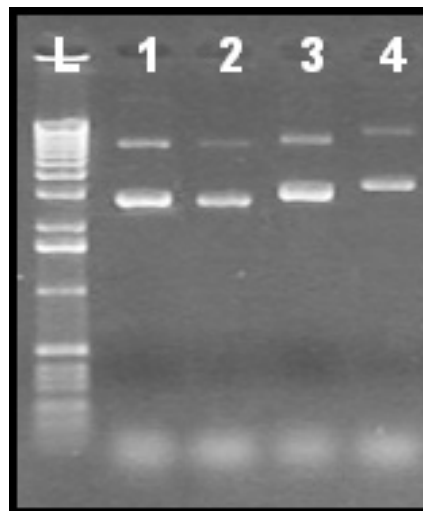


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose (1%) da preparação de DNA de plasmídeo em pequena escala. (L) DNA ladder 1Kb; (1) Chalcona sintase; (2) Fenilalanina amônia liase; (3) Aleno oxido sintase; (4) *pr-2* (β -1,3-glucanase).

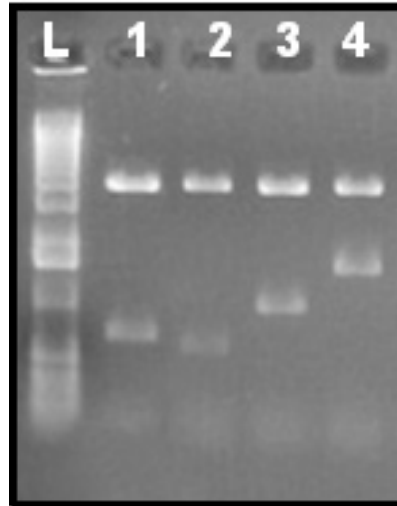


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose dos DNAs plasmidiais digeridos com *EcoRI*. (L) DNA ladder 1Kb; (1) Chalcona sintase; (2) Fenilalanina amônia liase; (3) Aleno oxido sintase; (4) *pr-2* (β -1,3-glucanase).

5.1.3 Seqüenciamento

Através da análise das seqüências de cada gene foi identificado a presença de um íntron na seqüência do fragmento do gene *pr-2*. Um fragmento de 1.589 pb do gene *pr-2* foi amplificado numa reação de PCR contendo os oligonucleotídeos específicos e DNA genômico de células da laranjeira *Citrus sinensis* e a digestão deste amplicon com *EcoRI* que liberou o inserto clonado no vetor plasmidial, pode ser visto na **Figura 10A**. No entanto, ocorreram diferenças, pois o esperado segundo o cDNA do gene que codifica a β -1,3-glucanase de *C. sinensis* era ter sido obtido um fragmento de 991 pb. O sequenciamento deste fragmento de PCR revelou a presença de um íntron de 598 pb no DNA genômico que codificou a β -1,3-glucanase, **Figura 10B**. Entretanto, as seqüências dos demais genes em estudo não apresentaram íntrons. A literatura relata que o gene da β -1,3-glucanase pode conter um íntron, que em plantas pode variar entre 400 e 600 pb (SHI, 2005), embora em *Nicotiana plumbaginifolia* tenham sido descritos 2 íntrons de 669 pb e 199 pb (CASTRESANA *et al.*, 1990).

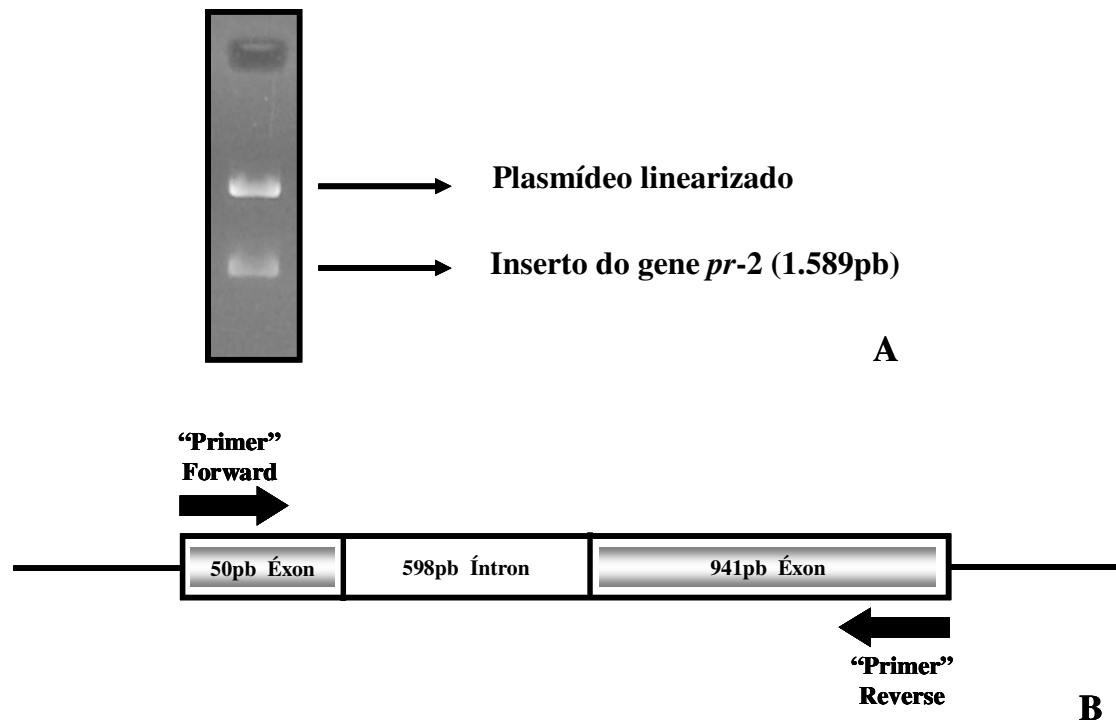


Figura 10. Resultado da digestão do clone contendo o fragmento do gene *pr-2* com *EcoRI*. A: Eletroforese em gel de agarose (1%) da construção de fragmento genômico clonado do vetor PCR-TOPO e digerido com *EcoRI*, as setas estão indicando o vetor e o fragmento clonado do gene *pr-2*. B: Esquema mostrando presença de um íntron de 598 pb no amplicon obtido.

5.1.4 Expressão dos genes de resposta de defesa da planta

Através da técnica de Northern blot, foi possível verificar a expressão do genes Chalcona sintase (CHS), Fenilalanina amônia liase (FAL), Aleno oxido sintase (AOS) e β -1,3-glucanase (*pr-2*). A **Figura 11**, mostra o perfil de expressão destes genes durante a cinética de infecção de plantas de laranjeiras inoculadas com *Xac-A* ou *Xaa-C*. A expressão do gene *pr-2* o gene codificador da β -1,3-glucanase na interação com a *Xac-A* (doença), que não apresentava expressão visível até 12 h de inoculação, passa a ser expresso em 24 h e prosseguiu assim por até 96 h, tendo sido detectado um aumento de expressão no período entre 48 até 96 h. O perfil de expressão do gene *pr-2* em

plantas de citros inoculadas com *Xaa-C* (resistência) mostrou-se distinto. A expressão gênica se iniciou precocemente com 3 h e prosseguiu até as 96 h. Embora não seja totalmente visível, na indução de *pr-2* entre 3 e 6 h de inoculação com *Xaa-C*, a expressão de *pr-2* começou a aumentar após 12 h e prosseguiu até as 96 h, com um máximo de expressão às 24 h do início da cinética de infecção e mantendo-se em nível elevado até 72 h, com posterior diminuição a partir deste ponto. Já os genes AOS e CHS tiveram uma expressão gênica durante toda a cinética de infecção, mas com uma intensidade maior nas interações de resistência *Xaa-C/Citrus*. Entretanto, o gene CHS teve um ponto máximo de expressão no tempo 3 h das duas interações estudadas e um outro ponto máximo no período de 96 h na interação de resistência. Já o gene da FAL apresentou-se com uma alta expressão na interação de doença *Xac-A/Citrus*, onde a expressão do gene teve um pico em 3 h e conforme o tempo foi passando a expressão do mesmo foi diminuindo até as 96 h. Mas na interação de resistência *Xaa-C/Citrus* o gene da FAL mostrou-se com uma expressão mais rápida e mais intensa nos tempos iniciais da cinética de infecção, sendo totalmente visível nos tempos de 3 h a 24 h, após este período, este gene apresentou uma queda no nível de expressão até as 96 h, porém constante. Para melhores resultados das autorradiografias, as mesmas foram submetidas à análise densitométrica num equipamento Shimadzu como descrito em Material e Métodos. Como exemplo, apresentamos apenas o resultado de uma das autorradiografias (*pr-2*), mostrado na **Figura 12**. Os resultados tanto das áreas da expressão de cada gene estudado quanto das áreas dos controles constitutivos (18S), gerados pelo densitômetro, foram exportados para uma planilha de Excel, possibilitando a construção de figuras que visualizassem as quantificações das áreas hibridizadas. Estes resultados estão apresentados nas **Figuras 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20**.

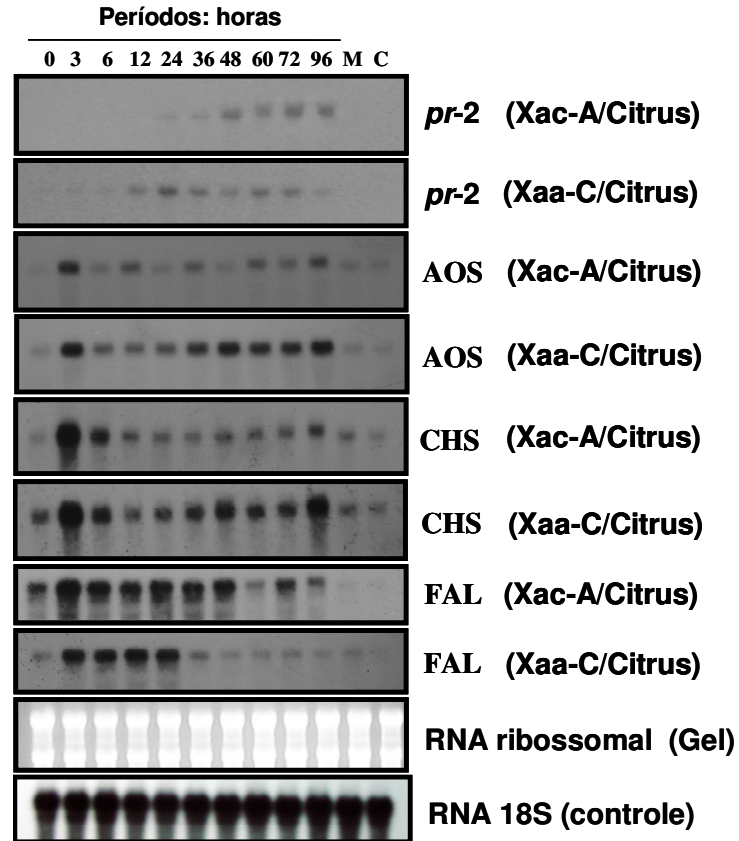
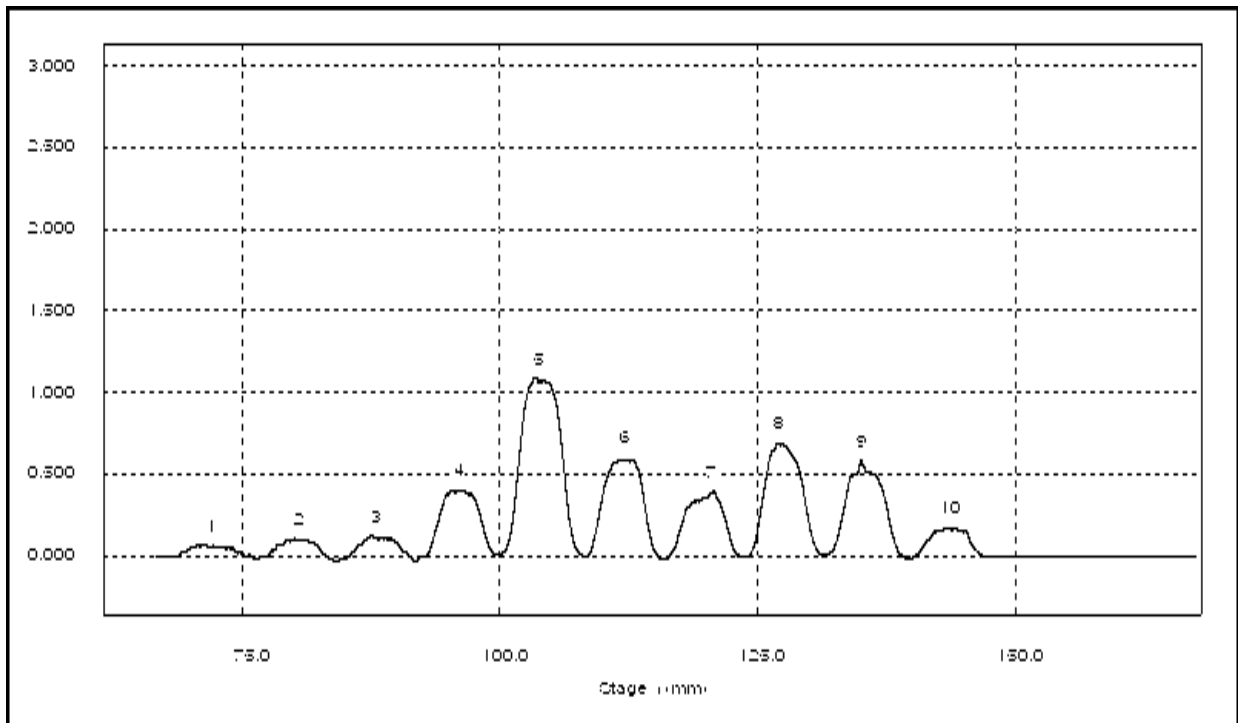


Figura 11. Perfil de expressão dos genes de resistência da planta nas interações entre 2 patovares distintos de *Xanthomonas axonopodis aurantifolii* e *citri* e *Citrus sinensis*. Northern blot dos genes *pr-2*, AOS, CHS e FAL nas interações *Xac-A/Citrus*, *Xaa-C/Citrus*, na planta inoculada com água (M, “mock”) e planta controle (C, não inoculada). Em cada canaleta foi aplicado 15µg de RNA total. A cinética de inoculação foi realizada nos períodos de 0h, 3h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, 96h após inoculação. A hibridização do RNA foi realizada com sondas específica de cada gene citado acima de *Citrus sinensis*, marcada radioativamente com ^{32}P .



NO.	Y(mm)	Area	Height	Mark	%
1	72.10	265.908	0.049	∨	1.546
2	80.70	335.477	0.092	∨	1.951
3	88.16	401.991	0.103	∨	2.337
4	96.20	1690.448	0.397	∨	9.829
5	103.94	4747.932	1.066	∨	27.608
6	112.26	2501.927	0.586	∨	14.548
7	120.58	1552.522	0.382	∨	9.027
8	127.18	2762.591	0.683	∨	16.064
9	135.21	2254.101	0.559	∨	13.107
10	143.82	685.002	0.159	∨	3.983
Total		17197.898			

Figura 12. Perfil densitométrico gerado pela leitura da autorradiografia pelo densitômetro. Autorradiografia do gene *pr-2* na interação *Xaa-C/Citrus*. Picos 1 (0h), 2 (3h), 3 (6h), 4 (12h), 5 (24h), 6 (36h), 7 (48h), 8 (60h), 9 (72h) e 10 (96h).

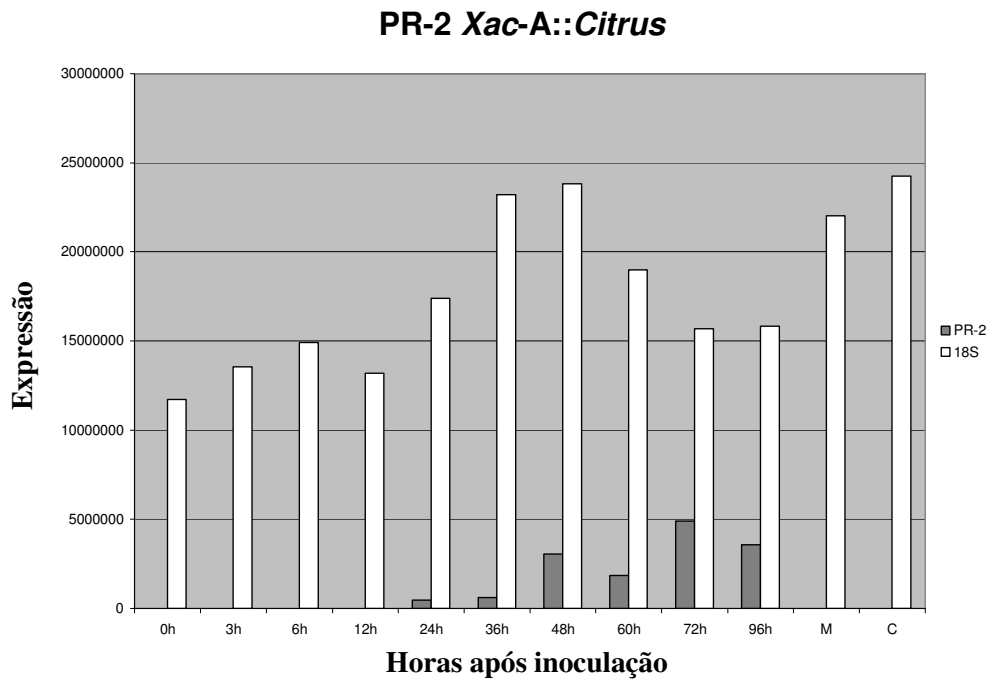


Figura 13. Área do traçado densitométrico do gene *pr-2* na interação *Xac-A::Citrus* comparada ao controle constitutivo 18S.

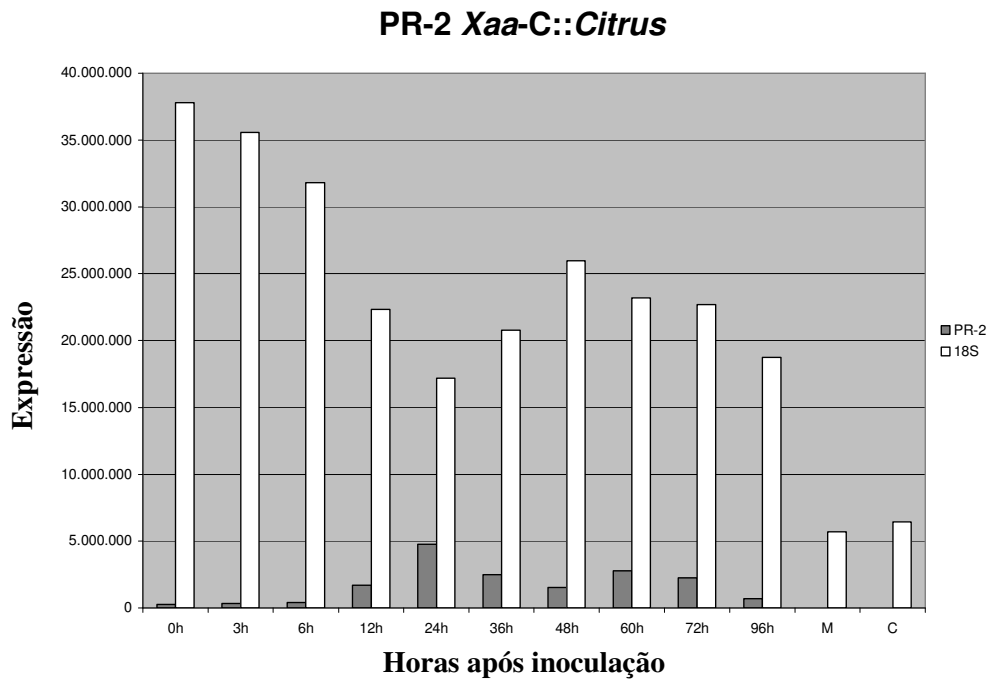


Figura 14. Área do traçado densitométrico do gene *pr-2* na interação *Xaa-C::Citrus* comparada ao controle constitutivo 18S.

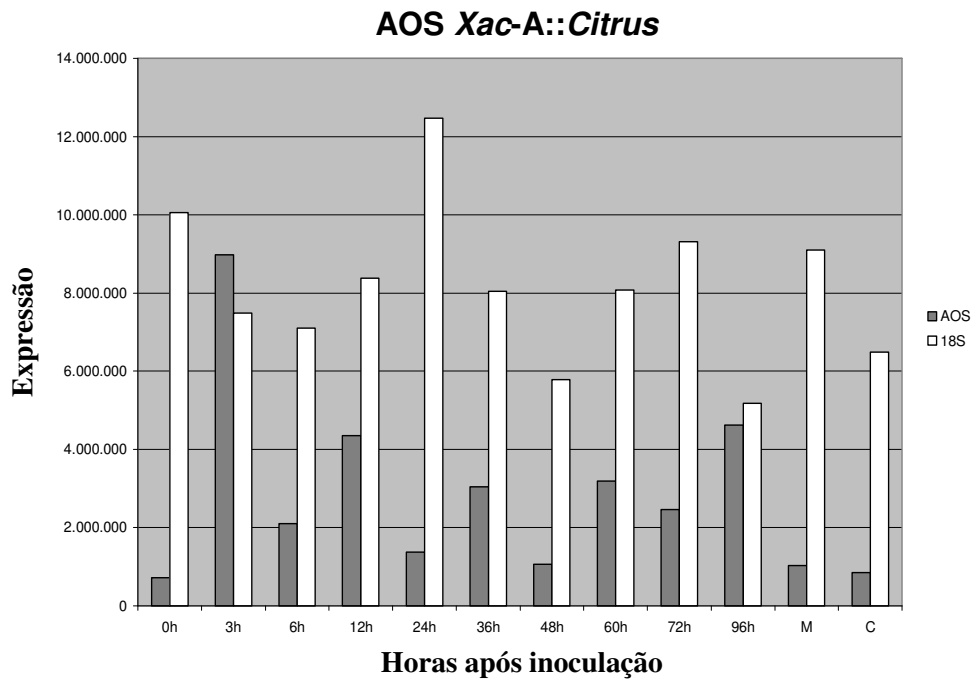


Figura 15. Área do traçado densitométrico do gene AOS na interação *Xac-A::Citrus* comparada ao controle constitutivo 18S.

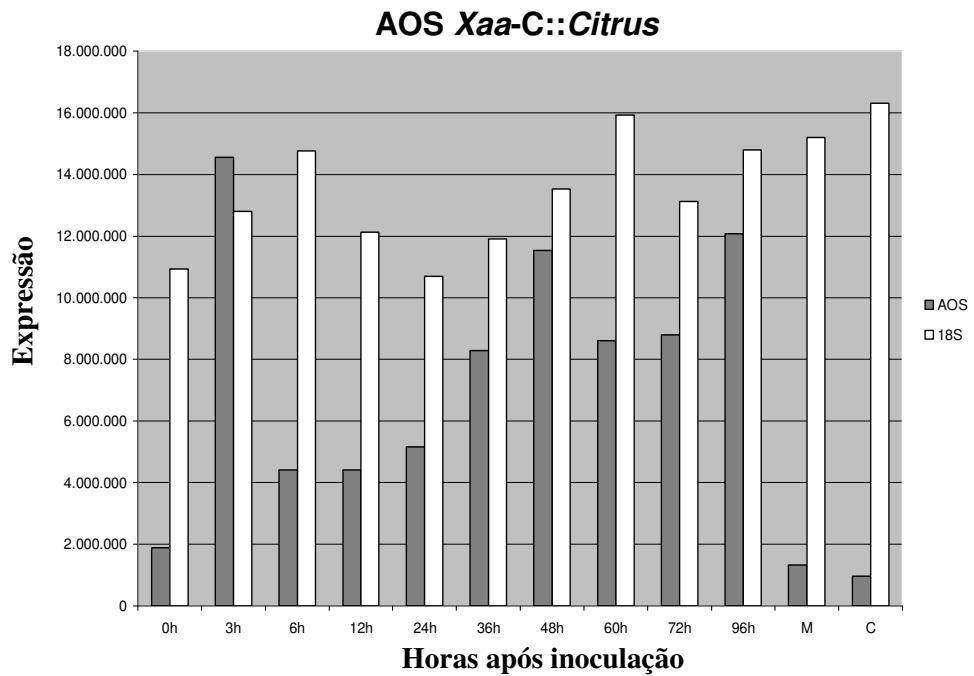


Figura 16. Área do traçado densitométrico do gene AOS na interação *Xaa-C::Citrus* comparada ao controle constitutivo 18S.

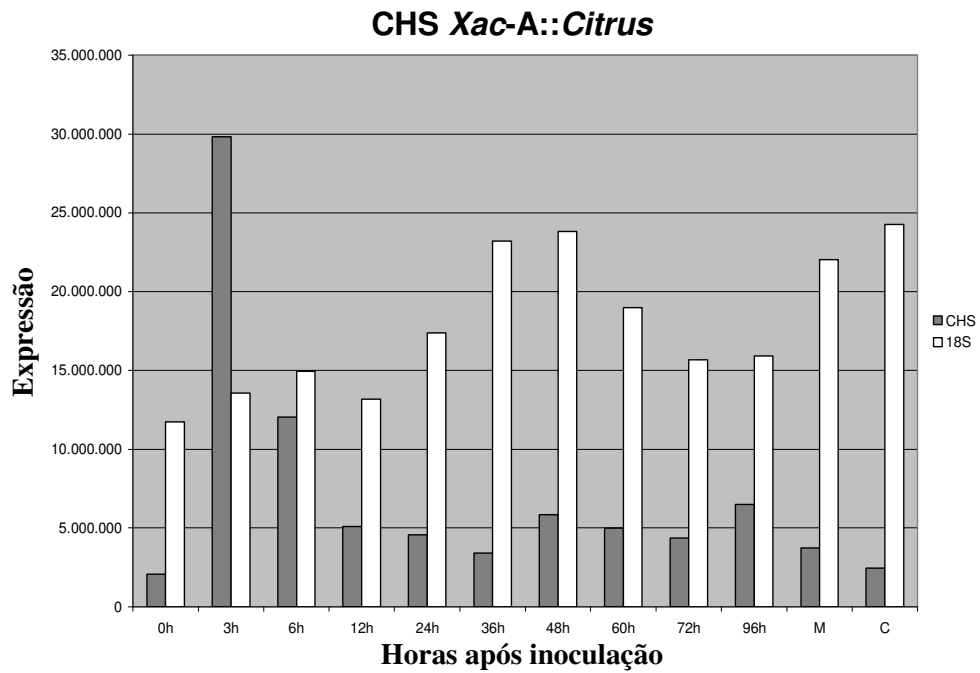


Figura 17. Área do traçado densitométrico do gene CHS na interação *Xac-A::Citrus* comparada ao controle constitutivo 18S.

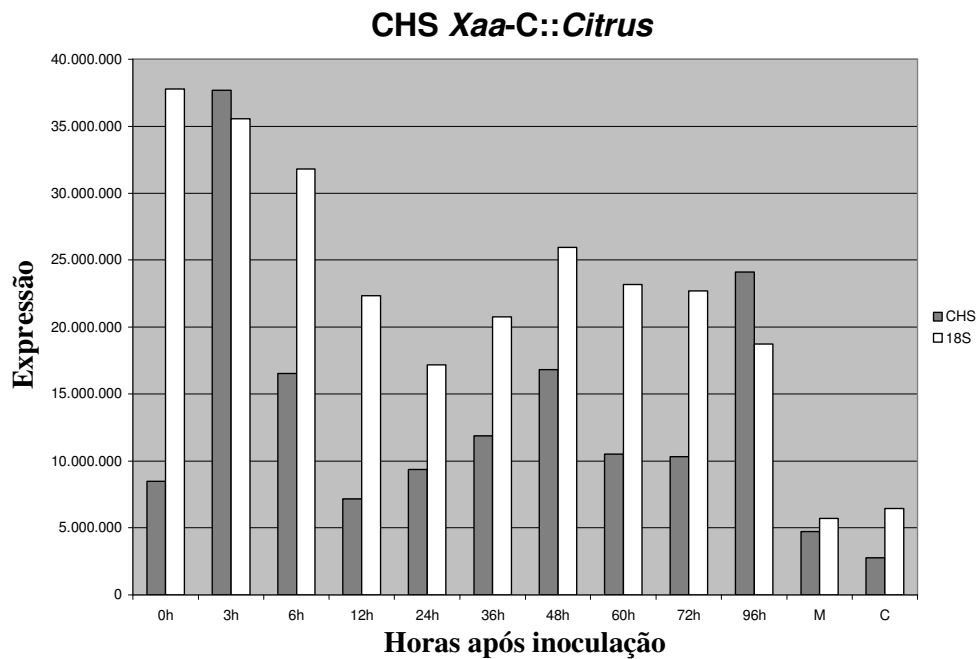


Figura 18. Área do traçado densitométrico do gene CHS na interação *Xaa-C::Citrus* comparada ao controle constitutivo 18S.

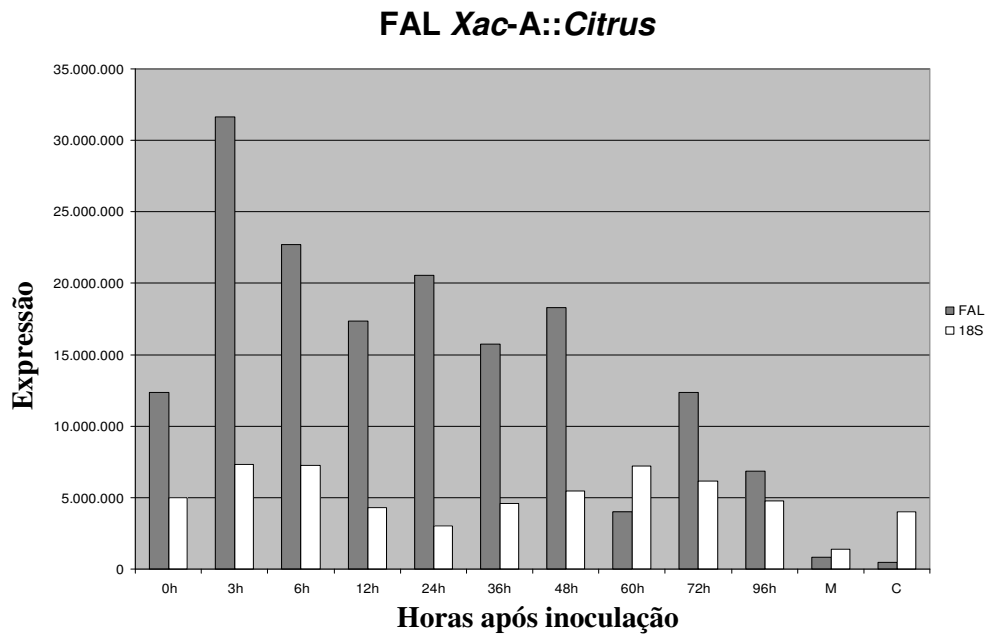


Figura 19. Área do traçado densitométrico do gene FAL na interação *Xac-A::Citrus* comparada ao controle constitutivo 18S.

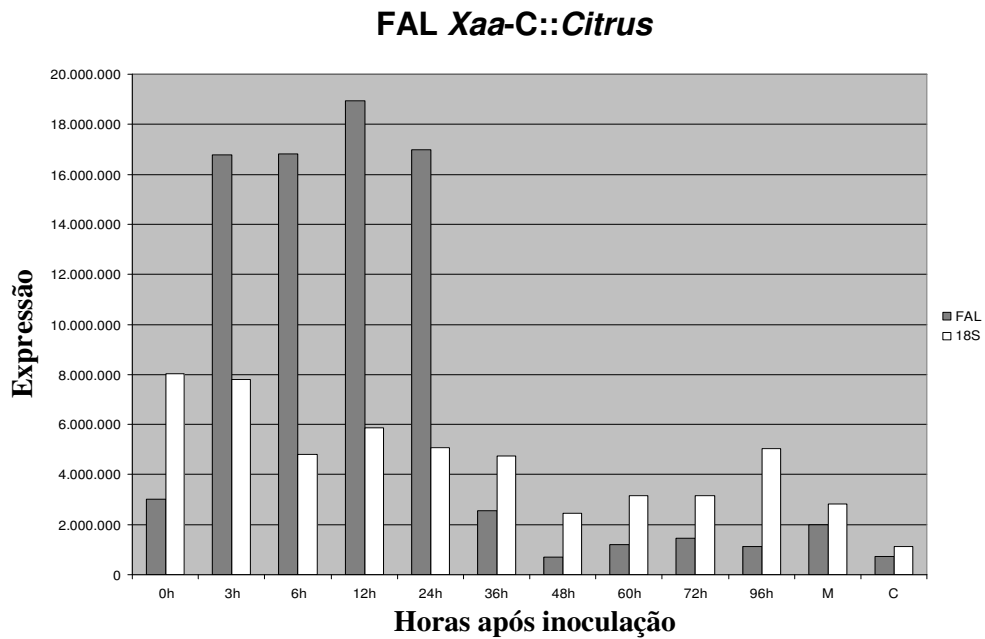


Figura 20. Área do traçado densitométrico do gene FAL na interação *Xaa-C::Citrus* comparada ao controle constitutivo 18S.

As **Figuras 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20** confirmam os resultados mostrados na **Figura 11**, onde os genes em estudo apresentaram diferenças de expressão conforme o período da cinética de infecção. Além disso, estes resultados minimizam possíveis erros na quantidade calculada de ácidos nucléicos, pipetagem, hibridização local, entre outros.

Pela análise do perfil de expressão do gene *pr-2* nas interações entre *Xac-A::Citrus* e *Xaa-C::Citrus* foi observado que a expressão gênica deste foi induzida de maneira mais rápida e intensamente nos períodos de 3 à 36 h na interação *Xaa-C::Citrus* (**Figura 13**), que levou ao desenvolvimento de uma reação de resistência do tipo HR e ausência de sintomas de cancro cítrico. Na interação com *Xaa-C* o gene codificador da β -1,3-glucanase mostrou-se induzido desde 12 h de inoculação enquanto na interação com *Xac-A* a indução foi verificada a partir das 48 h de infecção (**Figuras 13 e 14**). A ativação da expressão da β -1,3-glucanase (*pr-2*) como resposta de resistência a patógenos foi descrita para interações entre plantas e fungos patogênicos. Em plantas de tabaco infectadas com *Colletotrichum destructivum* e pimenteiras infectadas por *Colletotrichum coccodes* foi verificada a ativação do gene *pr-2* após 48 h de infecção (DEAN, 2002; HONG & HWANG, 2002). Em trigo inoculado com *Fusarium graminearum* níveis máximos de acúmulo de mRNA codificando a β -1,3-glucanase foram verificados após 24 h de infecção (LI *et al.*, 2001), assim como verificado neste trabalho para a interação entre *Xaa-C* e laranja-pêra doce (*C. sinensis*).

Entretanto, os genes AOS e CHS apresentaram uma expressão mais intensa na interação de resistência *Xaa-C::Citrus*. Na interação de *Xac-A::Citrus* a expressão do gene da AOS apresentou-se maior no período de 3 h, tendo uma oscilação na expressão até as 96 h, **Figura 15**. Entretanto, na interação de resistência (*Xaa-C::Citrus*) este gene também apresentou uma maior expressão no tempo de 3 h, mas a partir das 36 h a expressão aumenta, mantendo-se até as 96 h (**Figura 16**). A literatura relata que quando folhas de tomate são danificadas por herbívoros ou pelo simples mecanismo de ferimento, a sinalização do ácido jasmônico e a expressão dos genes de defesa são ativados sistematicamente dentro de horas (TURNER *et al.*, 2002). Em *Arabidopsis* a transcrição do gene AOS ocorre dentro de 2 horas após os tecidos serem

feridos, além de ocorrer em anteras e grãos de pólen (KUBIGSTELTIG *et al.*, 1999). Entretanto, a superexpressão da AOS em plantas transgênicas tanto de *Arabidopsis* quanto de tabaco não alterou os níveis básicos de ácido jasmônico, mas quando plantas transgênicas foram feridas, elas produziram altos níveis de ácido jasmônico quando comparadas a plantas controle feridas (LAUDERT *et al.*, 2000). A exposição de culturas de suspensão de células de *Rauvolfia canescens* e *E. californica* a elicitores de parede celular de fungo levou a uma rápida indução do ácido jasmônico endógeno e do metil jasmonato (GUNDLACH *et al.*, 1992); o ácido jasmônico e seus derivados têm uma função integral na cascata de eventos que ocorrem nos processos elicitores, causando tanto uma ativação direta quanto indireta dos genes do metabolismo secundário.

As enzimas chalcona sintase e fenilalanina amônia liase catalisam a biosíntese dos flavonóides e fenilpropanóides, respectivamente, as quais foram definidas por serem restritas a plantas (MOORE *et al.*, 2002). A CHS é uma das enzimas chave na rota de biossíntese de fenilpropanóides, como as fitoalexinas, compostos antimicrobianos de baixo peso molecular, sintetizados e acumulados nas plantas expostas a microrganismos, a certos patógenos ou outros estresses abióticos (PAIVA & DIXON, 1995). Em cana-de-açúcar foi avaliado o efeito do estresse causado por bactérias como *Herbaspirillum rubri* e *Gluconacetobater diazotrophicans*, constatou-se uma indução da expressão da chalcona sintase, sugerindo a ativação da via dos flavonóides em resposta a este estresse biológico (FRANÇA *et al.*, 2001). Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a CHS foi intensamente induzida na interação de resistência *Xaa-C::Citrus*, quando comparado à de doença, apresentando picos nos tempos 3h, 6h e 96h (**Figuras 17 e 18**). CHRISTENSEN *et al.* (1998) verificaram a expressão do transcrito HvCHS2 em folhas de cevada inoculadas com isolados de fungo virulento e avirulento, causadores da doença “mildew”. A acumulação do transcrito HvCHS2 foi detectada em resposta a inoculação com *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (Bgh) em ambas as interações, compatível e incompatível, as quais exibiram um fenótipo de resposta de hipersensibilidade. Nas duas interações, o gene da CHS começou a ser expresso com 24–36 h, podendo ser facilmente detectado em 48 h e

prossequindo até as 96 h após inoculação. Este padrão de acumulação da CHS difere de muitos outros transcritos induzidos por patógenos em cevada. Como exemplo, transcritos de proteínas relacionadas a patogenicidade, podem ser detectadas precocemente, 4 h após a inoculação, ocorrendo um máximo de expressão em 6, 12-24 h após a inoculação (GREGERSEN *et al.*, 1994; . GREGERSEN *et al.*, 1997).

Ademais, a transcrição da FAL é induzida por vários estímulos, como luz UV, ferimento, ataque por patógenos e durante o desenvolvimento (BEVAN *et al.*, 1990; LOIS *et al.*, 1989; OHL *et al.*, 1990). A FAL catalisa o primeiro passo na via dos fenilpropanóides em plantas, convertendo L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico (CA). O CA é o precursor de vários componentes associados com a via dos metabólitos secundários, ligninas, flavonóides e fitoalexinas (LOIS *et al.*, 1989). Devido a sua função, alguns patógenos desenvolveram mecanismos para reduzir a ativação deste gene e aumentar as chances em infectar as plantas. Para reduzir a atividade da FAL, os patógenos secretam supressores, os quais reduzem a transcrição da FAL e conseqüentemente, a atividade da enzima é reduzida e finalmente, resulta numa redução dos metabólitos secundários requeridos para a defesa de plantas contra patógenos (SCHMIDT *et al.*, 2004). Neste trabalho, observou-se uma redução na expressão da FAL na interação de doença (*Xac-A::Citrus*), ou seja, este patógeno (*Xac-A*) pode estar contribuindo para a redução da transcrição e da atividade da FAL. A **Figura 19** mostra esta redução da expressão da FAL, a qual se inicia no período de 6 h de infecção. Já na interação de resistência, a FAL mostrou-se com uma alta expressão nos tempos iniciais (3, 6, 12 e 24 horas de infecção), esta forte expressão precoce pode estar atuando na contenção deste patógeno, além de favorecer a ativação de outras vias metabólicas relacionadas à resistência da planta (**Figura 20**). Suspensões de células de Cassava (mandioca) tratadas com elicitores de *Colletotrichum lindemuthianum* exibiram um aumento progressivo da atividade da FAL; o pico máximo ocorreu em 15 h após a elicitação, sendo observado também acúmulo de mRNA de FAL nos tempos de 3 h e 9 h (GÓMEZ-VASQUEZ *et al.*, 2004). GUNDLACH *et al.* (1992) afirmam que culturas de células expostas a metil jasmonato apresentaram um aumento da expressão dos genes envolvidos no metabolismo secundário, verificado

pelo aumento nos níveis de RNA poli(A)+ da FAL, seguido de aumento da atividade enzimática da FAL, indicando transcrição *de novo*, tradução e biosíntese de flavonóides em culturas de células de soja elicidadas.

VI. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que o gene que codifica a proteína β -1,3-glucanase de *Citrus sinensis* apresentou um íntron de 589 pb.

A ativação precoce e intensa da expressão tanto da β -1,3-glucanase nas primeiras 36 horas quanto da Fenilalanina amônia liase nas primeiras 24 horas da interação *Xaa-C::Citrus*, podem estar auxiliando na contenção e eliminação do patógeno no sítio de infecção.

Os genes Aleno oxido sintase e Chalcona sintase apresentaram uma expressão mais intensa na interação de resistência *Xaa-C::Citrus* quando comparado à de doença *Xac-A::Citrus*. A ativação destes genes também pode estar contribuindo na contenção e eliminação do patógeno no sítio de infecção por uma reação de resistência do tipo reação de hipersensibilidade (HR), embora a ação de outros genes relacionados à resistência devam ser considerados.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECitrus. Disponível em http://www.abecitrus.com.br/faqs_br_resposta.asp?cod=70. Acesso: 14/07/2006.

ABLE, A.J.; SUTHERLAND, M. W.; GUEST, D. I. Production of reactive oxygen species during non-specific elicitation, non-host resistance and field resistance expression in cultures tobacco cells. **Functional Plant. Biology**, v. 30, p.91-99, 2003.

BALARDIN, R. S. Fundamentos da Resistência em Plantas. Disponível em <http://www.balardin.com>. Acesso: 14/07/2006.

BEVAN, M.; SHUFFLEBOTTOM, D.; EDWARDS, K.; JEFFERSON, R.; SCHUCH, W. Tissue- and cell-specific activity of a phenylalanine ammonia-lyase promoter in transgenic plants. **EMBO Journal**, v. 8, p. 1899–1906, 1990.

BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H. P.; MULLER, G. W.; SIQUEIRA, W. J. A tristeza dos citros e suas implicações no melhoramento genético de porta-enxertos. **Bragantia**, Campinas, v.62, n.3, p. 345-355, 2003.

BUCHER, G.L.; TARINA, C.; HEINLEIN, M.; DI SERIO, F.; MEINS JR., F.; IGLESIAS, V.A. Local expression of enzymatically active class I b-1, 3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. **The Plant Journal**, v.28, n.3, p.361-369, 2001.

CASTRESANA, C.; DE CARVALHO, F.; GHEYSEN, G.; HABETS, M.; INZE, D.; VAN MONTAGU, M. Tissue-specific and pathogen-induced regulation of a *Nicotiana plumbaginifolia* β -1,3-glucanase gene. **Plant Cell**, v. 2, p. 1131-1144, 1990.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, v.162, p.156-159, 1987.

CHRISTENSEN, A. B.; GREGERSEN, P. L.; SCHRÖDER, J.; COLLINGE, D. B. A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. **Plant Molecular Biology**, v. 37, p. 849–857, 1998.

CONTESSOTTO, M. G.G.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; MARIANI, P. D.S.C.; COUTINHO, L. L. A new member of the chalcone synthase (CHS) family in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 1-4; 257-261, 2001.

CORDEIRO, M. C. R., GROSSI DE SÁ, M. F. Biotecnologia e resistência à patógenos. **Revista biotecnologia**. v. 10, p. 34-39, 1999.

CREELMAN, R. A. & MULLET, J. E. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 92, p. 4114–4119, 1995.

CROZIER, A., KAMIYA, Y.; BISHOP, G.; YOKOTA, T. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 850-929, 2000.

CUI, Y., MAGILL, R., FREDERIKSEN, R.; MAGILL, C. Chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase mRNA levels following exposure of sorghum seedlings to three fungal pathogens. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v.49, p. 187-199, 1996.

DA SILVA, A. C.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, *et al.*. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, p. 459-463, 2002.

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

DEAN, J. D.; GOODWIN, P. H.; HSIANG, T. Comparison of Relative RT-PCR and Northern Blot Analyses to Measure Expression of β -1,3-Glucanase in *Nicotiana benthamiana* Infected With *Colltotrichum destructivum*. **Plant Molecular Biology**, v. 20, p. 347–356, 2002.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **American Society of Plant Physiologists**, v. 7, p. 1085-1097, 1995.

DOARES, S. H.; SYROVETS, T.; WEILER, E. W.; RYAN, C. A. Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 92, p. 4095–4098, 1995.

FRANÇA, S. C.; ROBERTO, P. G.; MARINS, M. A.; PUGA, R. D.; ROGRIGUES, A.; PEREIRA, J. O. Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 243-250, 2001.

FUNDECITRUS. Disponível em [http:// www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br). Acesso: 23/08/2006.

GENBANK - NCBI (National Center for Biotechnology Information). Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>. Acesso: 25/05/2006.

GÓMEZ-VÁSQUEZ, R.; DAY, R.; BUSCHMANN, H.; RANGLES, S.; BEECHING, J. R.; COOPER, R. M. Phenylpropanoids, Phenylalanine Ammonia Lyase and Peroxidases in Elicitor-challenged Cassava (*Manihot esculenta*) Suspension Cells and Leaves. **Annals of Botany**, v. 94, p. 87-97, 2004.

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

GREGERSEN, P. L.; CHRISTENSEN, A. B.; SOMMERKNUDSEN, J.; COLLINGE, D. B. A putative Omethyltransferase from barley is induced by fungal pathogens and UV light. **Plant Molecular Biology**, v. 26, p 1797–1806, 1994.

GREGERSEN, P. L.; THORDALCHRISTENSEN, H.; FÖRSTER, H.; COLLINGE, D. B. Differential gene transcript accumulation in barley leaf epidermis and mesophyll in response to attack by *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v. 51, p. 81–97, 1997.

GUNDLACH, H.; MULLER, M. J.; KUTCHAN, T. M.; ZENK, M. H. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures (*Eschscholtzia californica*/Rauvolfia canescens/Glycine max/benzophenanthridine alkaloid/flavonoid). **Plant Biology**, v. 89, p. 2389-2393, 1992.

HAMMERSCHMIDT, R. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 285–306, 1999.

HAMMOND-KOSAK, K. E. & JONES, J. D. G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 2-45, 1997.

HEATH, M. C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 315-319, 2000.

HOLUB, E. B.; COOPER, A. Matrix, reinvention in plants: how genetics is unveiling secrets of non-host disease resistance. **TRENDS in Plant Science**, v.9, n. 5, p. 211-214, May 2004.

HONG, J. K. & HWANG, B. K. Induction by pathogen, salt and drought of a basic class II chitinase mRNA and its in situ localization in pepper (*Capsicum annuum*). **Physiologia Plantarum**, v. 114, p. 549–558, 2002.

HUCKELHOVEN, R. *et al.* Non-host resistance of barley is associated with a hydrogen peroxide burst at sites of attempted penetration by wheat powdery mildew fungus. **Molecular Plant Pathology**, v2, p. 199-205, 2001.

KLOEK, A. P.; VERBSKY, M. L.; SHARMA, S. B.; SCHOELZ, J. E.; VOGEL, J.; KLESSIG, D. F.; KUNKEL, B. N. Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. **The Plant Journal**, v. 26, p. 509–522, 2001.

KOLLER, O. C. **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. Editora Rígel, Porto Alegre, p. 446, 1994.

KRAMELL, R.; ATZORN, R.; SCHNEIDER, G.; MIERSCH, O.; BRUCKNER, C.; SCHMIDT, J.; SEMBDNER, G.; PARTHIER, B. Occurrence and identification of jasmonic acid and its amino-acid conjugates induced by osmotic-stress in barley leaf tissue. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 14, p. 29–36, 1995.

KUBIGSTELTIG, I.; LAUDERT, D.; WEILER, E.W. Structure and regulation of the *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase gene. **Planta**, v. 208, p. 463–471, 1999.

LBM/FCAVJ/UNESP - LABORATÓRIO DE BIOINFORMÁTICA. Disponível em <http://www.lbm.fcav.unesp.br>. Acesso: 29/05/2006.

LAUDERT, D.; SCHALLER, F.; WEILER, E. W. Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing allene oxide synthase. **Planta**, v. 211, p. 163–165, 2000.

LAUDERT, D.; SCHALLER, F.; WEILER, E.W. Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing Alene oxide synthase. **Planta**, v. 211, p.163–165, 2000.

LEON, J.; ROJO, E.; SANCHEZ-SERRANO, J. J. Wound signalling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1–9, 2001.

LI, W. L.; FARIS, J. D.; MUTHUKRISHNAN, S.; LIU, D. J.; CHEN, P. D.; GILL, B. S. Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinases and β -1,3-glucanases from wheat spikes infected by *Fusarium graminearum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 353–362, 2001.

LOIS, R.; DIETRICH, A.; HAHLBROCK, K.; SCHULZ, W. A phenylalanine ammonia lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. **EMBO Journal**, v. 8, p. 1641–1648, 1989.

MARGIS-PINHEIRO, M; SANDRONI, M; LUMMERZHEIM, M; OLIVEIRA, D. E. A defesa das plantas contra as doenças. Disponível em <http://ich.unito.com.br/materia/resources/files/chmais/pass/ch147/planta.rtf>. Acesso: 19/06/2006.

MATTOS JUNIOR, D; DE NEGRI, J. D; FIGUEIREDO, J. O; POMPEU JUNIOR, J. Disponível em <http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Citros/Citros.htm>. Acesso em 17/17/2006.

MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue: II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and b-1,3-glucanase. **Plant Physiology**, v. 88, p. 936–942, 1988.

MOORE, B. S.; HERTWECK, C.; HOPKE, J. N.; IZUMIKAWA, M.; KALAITZIS, J. A.; NILSEN, G.; O'HARE, T.; PIEL, J.; SHIPLEY, P. R.; XIANG, L.; AUSTIN, M. B.; NOEL, J. P. Plant-like Biosynthetic Pathways in Bacteria: From Benzoic Acid to Chalcone. **Reviews Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1956-1962, 2002.

MYSORE, K. S. & RYU, C. M. Nonhost resistance: how much do we know? **TRENDS in Plant Science**. v. 9, n. 2, p. 97-104, February, 2004.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso 12/09/2005.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso 20/03/2006.

NEB CUTTER V2.0. Disponível em <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>. Acesso: 20/04/2006.

OHL, S.; HEDRICK, S. A.; CHORY, J.; LAMB, C. J. Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 2, p. 837–848, 1990.

PARCHMANN, S.; GUNDLACH, H.; MUELLER, M. J. Induction of 12- oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. **Plant Physiology**, v. 115, p. 1057–1064, 1997.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C. “Extração de DNA de plantas”. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, Ano 2, v.9, Julho/Agosto, 1999.

ROSSETTI, V. Manual ilustrativo de doenças dos citros. **FEALQ/FUNDECITROS**, 207pp, 2001.

ROSSETTI, V.; MULLER, G. W.; COSTA, A. S. Doenças dos citros causada por algas, fungos, bactérias e vírus. **Fundação Cargill**, 84 pp, 1993.

RYAN, C. A. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1477, p. 112–121, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Press. 1989.

SANDERS, P. M.; LEE, P. Y.; BIESGEN, C.; BOONE, J. D.; BEALS, T. P.; WEILERB, E. W.; GOLDBERG, R. B. The Arabidopsis *DELAYED DEHISCENCE1* gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. **Plant Cell**, v. 12, p. 1041–1062, 2000.

SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHALLER, F. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p. 11–23, 2001.

SCHLUMBAUM, A.; MAUSCH, F.; VOGELI, U.; BOLLER, T. **Nature** (London) 324, 365-367, 1986.

SCHMIDT, K.; HEBERLE, B.; KURRASCH, J.; NEHLS, R.; STAHL, D. J. Suppression of phenylalanine ammonia lyase expression in sugar beet by the fungal pathogen *Cercospora beticola* is mediated at the core promoter of the gene. **Plant Molecular Biology**, v. 55, p. 835–852, 2004.

SELA-BUURLAGE, M.; PONSTEIN, A. S.; BRES-VLOEMANS, S. A.; MELCHERS, L. S.; VAN DEN ELZEN, P. J. M.; CORNELISSEN, B. J. C. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. **Plant Physiology**, v. 101, p. 857–863, 1993.

SHI, Y. **Isolation, characterization, and expression analysis of β -1, 3-glucanase genes from strawberry plants**. 2005. 124 f. Dissertation (Doctor of Philosophy) - Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, 2005.

STASKAWICZ, B. J.; AUSUBEL, F. M.; BAKER, B. J.; ELLIS, J. G.; JONES, J. D. G. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, v. 268, p. 661-667, 1995.

STINTZI, A. & BROWSE, J. The Arabidopsis male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 97, p 10625–10630, 2000.

SUCEST. Disponível em <http://sucest.lad.dcc.unicamp.br/en/Downloads/html/Plasmid.html>. Acesso: 18/02/2006.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3^a ed., Porto Alegre: ARTMED Editora S.A., 2004.

TAKEMOTO, D.; YOSHIOKA, H.; DOKE, N.; KAWAKITA, K. Disease stress-inducible genes of tobacco: expression profile of elicitor-responsive genes isolated by subtractive hybridization. ***Physiologia Plantarum***, v118, p. 545–553, 2003.

TAO, Y.; XIE, Z.; CHEN, W.; GALZEBROOK, J.; CHANG, H.; HAN, B.; ZHU, T.; ZOU, G.; KATAGORI F. Quantitative nature os Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. ***Plant Cell***, v. 15, p. 317-330, 2003.

THOMMA, B. P.; NELISSEN, I.; EGGERMONT, K.; BROEKAERT, W. F. Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. ***The Plant Journal***, v. 19, p. 163–171, 1999.

TURNER, J. G.; ELLIS, C.; DEVOTO, A. The Jasmonate Signal Pathway. ***The Plant Cell***, v. 14, p. 153–164, 2002.

VAN LOON, L. C. Pathogenesis-related proteins ***Plant Molecular Biology***, v. 4, p. 111-116, 1985.

VICK, B. & ZIMMERMAN, D. Biosynthesis of jasmônico acid by several plant species. ***Plant Physiology***, v. 75, p. 458–461, 1984.

VLEESHOUWERS, V.; VAN DOOIJEWERT, W.; GOVERS, F.; KAMOUN, S.; COLON, L.T. The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. ***Planta***. v. 210, p. 853-864, 2000.

WANG, C.; AVDIUSHKO, S.; HILDEBRAND, D. F. Overexpression of a cytoplasm-localized allene oxide synthase promotes the wound-induced accumulation of jasmonic acid in transgenic tobacco. **Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 783–793, 1999.

WEISING K, NYBOM H, WOLFF K, MEYER W DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton, 1995.

WHITE, F. F.; UANG, B.; JOHNSON, L. B. Prospects for understanding avirulence gene function. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3(4), p. 291-298, 2000.

WHITE, R. F., RYBICKI, E. P., VON WECHMAR, M. B., DEKKER, J. L. & ANTONIW, J. F. **Journal of General Virology**, v. 68, p. 2043-2048, 1987.

WORRALL, D.; HIRD, D. L.; HODGE, R.; PAUL, W.; DRAPER, J.; SCOTT, R. Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. **Plant Cell**, v. 4, p. 759-771, 1992.

XIE, D. X.; FEYS, B. F.; JAMES, S.; NIETO-ROSTRO, M.; TURNER, J. G. COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. **Science**, v. 280, p. 1091–1094, 1998.

YAMADA, T.; HASHIMOTO, H.; SHIRASHI, T.; OKU, H. Suppression of pisatin, phenylalanine ammonia-lyase mRNA, and chalcone synthase mRNA accumulation by a putative pathogenicity factor from the fungus *Mycosphaerella pinodes*. **Molecular Plant Microbe Interact**, v. 2, p. 256–261, 1989.