

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

**IDENTIFICAÇÃO E CLONAGEM DE R- GENES
CANDIDATOS POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA
RESISTÊNCIA AO CANCRO CÍTRICO (*Xanthomonas
citri* subsp. *citri*)**

Gisele Lopes Braga

Bióloga

JABOTICABAL- SÃO PAULO- BRASIL

JUNHO DE 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS
AGRÁRIA E VETERINÁRIAS CÂMPUS JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO E CLONAGEM DE R- GENES
CANDIDATOS POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA
RESISTÊNCIA AO CANCRO CÍTRICO (*Xanthomonas
citri* subsp. *citri*)**

Gisele Lopes Braga

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro

Co –orientador: Dr. José Belasque Junior

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Agronomia (Microbiologia
Agropecuária).

JABOTICABAL- SÃO PAULO- BRASIL

JUNHO DE 2010

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GISELE LOPES BRAGA- nascida em 03 de outubro de 1984, em Araraquara, São Paulo, Brasil, filha de Newton Gilberto Pereira Lopes e Eliana do Carmo Sant'Anna Lopes. Bióloga formada em fevereiro de 2008 pelo Centro Universitário de Araraquara- UNIARA. Ingressou em março do mesmo ano no curso de Mestrado, área de concentração em Microbiologia Agropecuária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

“Nenhum sucesso na vida compensa o fracasso no lar”

David O. McKay

Aos amores da minha vida

meu filho, Vitor Hugo;

meu marido, Fernando

À minha família

meus pais, Newton e Eliana;

meus irmãos, Walison e Wilian;

meus avós, Carlos e Cassilda

por serem o meu porto seguro,

onde posso ancorar sempre que precisar.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Pai Celestial por ter me dotado de saúde e inteligência.

A Maria Inês T. Ferro, por ter depositado confiança em mim e tornado um sonho realidade, muito obrigada!

Ao José Belasque Jr. Pelos ensinamentos, confiança, orientação e por todo tempo dedicado a esse trabalho. Serei eternamente grata.

À Elaine C. Martins, pelos inúmeros ensinamentos e colaboração durante esses anos.

À Teresa Cofre, por toda ajuda prestada no laboratório, amizade e competência.

Aos meus amigos Fabrício, Dênis, Michele, Júlio, Ana Paula, Matheus e todos outros que não foram citados, mas que sempre tornaram o ambiente de trabalho agradável, animado, sempre me ajudando a ser perseverante mediante as barreiras enfrentadas durante esses anos.

Imensamente grato ao colega Davi Rinaldo, pelas caronas até a faculdade, tornando o peso que eu carregava mais leve. Jamais esquecerei.

Ao Prifº Goes, pelos momentos descontraídos durante a disciplina, apoio e dedicação dispensados a mim.

Ao meu marido Fernando, por sempre estar do meu lado agindo como um verdadeiro companheiro, me dando força e incentivo nas horas difíceis.

Aos meus pais Newton e Eliana, pelo apoio financeiro, emocional e por todos os ensinamentos dados ao longo dos anos de minha vida, o que sou hoje devo a eles.

Ao vereador Valderico Jõe, pelo apoio financeiro, custeando as passagens até a faculdade durante o primeiro ano desse trabalho.

Ao meu filho Vitor Hugo, que foi gerado durante o primeiro ano desse trabalho, enchendo a minha vida de graça, alegria, e me dando forças para continuar.

Por fim ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
Histórico da citricultura no Brasil.....	3
Cancro cítrico- importância, distribuição e controle.....	4
O agente causal do cancro cítrico <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	5
Resistência de citros e relativos ao cancro cítrico.....	6
Interação patógeno- hospedeiro e genes de resistência a doenças.....	7
MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
Material Vegetal.....	10
Extração de DNA vegetal.....	10
Desenhos de oligonucleotídeos e reações de PCR.....	11
Clonagens e sequências de interesse.....	17
Sequenciamento.....	18
Análise das sequências.....	19
RESULTADOS.....	20
Amplificações de sequências.....	20
Análise das sequências.....	26
DISCUSSÃO.....	42
CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

IDENTIFICAÇÃO E CLONAGEM DE R-GENES CANDIDATOS POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA AO CANCRO CÍTRICO (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*)

RESUMO- O cancro cítrico é uma das mais graves doenças da cultura dos citros e seu agente causal (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) encontra-se distribuído em dezenas de países localizados na Oceania, Ásia e América. Poucas informações estão disponíveis na literatura científica concernente à caracterização e clonagem de genes de resistência ao cancro cítrico. Sessenta um genótipos, desde altamente suscetíveis até os de plantas não hospedeiras, foram utilizados no presente estudo na tentativa de identificar possíveis R-genes envolvidos na resistência a essa doença. Quatro oligonucleotídeos, desenhados com base em R-genes de *Arabidopsis thaliana* e *Malus floribunda*, foram empregados na amplificação de amostras de DNA, clonagem e sequenciamento. Algumas sequências foram amplificadas unicamente em fenótipos altamente resistentes ou de plantas não hospedeiras, ou apresentaram homologia com sequências de genes envolvidas na resistência de plantas a estresses bióticos e abióticos. Algumas sequências traduzidas, encontradas em *Citrus mitis*, *Citrus reticulata* e *Poncirus trifoliata*, apresentaram mesmos aminoácidos presentes em domínios conservados de R-genes do tipo NBS-LRR.

Palavras-chave: Interação patógeno-hospedeiro, Rutaceae, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

**IDENTIFICATION AND CLONING OF R- GENES CANDIDATES
POTENTIALLY INVOLVED IN RESISTANCE TO CITRUS CANCKER
(*Xanthomonas citri* subsp. *citri*)**

SUMMARY- Citrus canker is one of the most important citrus diseases worldwide. Its pathogen is the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* that is presented in Ocean, Asia and America continents. Almost no information is available in the scientific literature about the genetic resistant against citrus canker. In the present work we developed and used primers in the tentative identification of genes involved in the resistance of citrus and other rutaceous genotypes against this disease. Sixty one genotypes, presenting complete resistant or extremely susceptible phenotypes, were tested with four primers developed based on R-genes from *Arabidopsis thaliana* and *Malus floribunda*. Some cloned sequences were identified only in resistant or non-host phenotypes or were similar with translated sequences homologues from genes involved in responses against biotic and abiotic stresses. Other translated sequences, identified in *Citrus mitis*, *Citrus reticulata* and *Poncirus trifoliata* species, presented some predicted aminoacids from conserved domains of R-genes type NBS-LRR.

Keywords Plant-pathogen interaction, Rutaceae, *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*

I- Introdução

A história da citricultura brasileira está intimamente ligada à própria história do país. Poucos anos após a descoberta do Brasil, entre 1530 e 1540, os portugueses introduziram as primeiras sementes de laranja doce nos Estados da Bahia e São Paulo. Dadas às condições ecológicas favoráveis, as plantas produziram satisfatoriamente, a ponto de os frutos da laranja 'Bahia' serem reconhecidos ainda no Brasil Colônia como maiores, mais sucosos e de excelente qualidade do que os produzidos em Portugal. Mas, somente a partir dos anos 30 do século passado, a citricultura começou a ser implantada comercialmente nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia, tendo apresentado maiores índices de crescimento nos estados do Sudeste e Sul.

No Brasil, a área plantada com frutas cítricas está ao redor de 1 milhão de hectares e a produção supera 19 milhões de toneladas, a maior no mundo há alguns anos. O país é o maior exportador de suco concentrado congelado de laranja, cujo valor das exportações, juntamente com as de outros derivados, tem gerado cerca de 1,5 bilhão de dólares anuais.

O cancro cítrico é uma das mais graves doenças da cultura dos citros. Seu agente causal, a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, encontra-se distribuído em dezenas de países localizados na Oceania, Ásia e América, infectando plantas da família Rutaceae. Trata-se de uma doença quarentenária e o comércio mundial de cítricos é regulado por medidas de exclusão que visam impedir a entrada do patógeno em áreas livres da doença. No Brasil a doença está presente pelo menos desde a década de 50, e medidas de exclusão e erradicação são adotadas desde sua primeira detecção em 1957 no estado de São Paulo.

Em patossistemas vegetais a interação patógeno-hospedeiro é denominada "incompatível" quando o hospedeiro tem seus mecanismos de defesa ativados e o patógeno não consegue desenvolver-se em seu interior. Interações "compatíveis" envolvem tanto a multiplicação do patógeno à custa do hospedeiro quanto, na maioria dos casos, a indução dos sintomas da doença. A ativação da defesa do hospedeiro ocorre após o reconhecimento do patógeno. Em muitas interações entre

plantas e patógenos biotróficos esse reconhecimento envolve um par de genes complementares presentes nos dois organismos – genes de resistência no hospedeiro (R-genes) e genes de avirulência (*avr*) no patógeno. O reconhecimento do patógeno não ocorre na ausência de R-genes no hospedeiro ou de *avr* no patógeno. Esse fenômeno de reconhecimento é resultante da evolução conjunta do hospedeiro e do patógeno.

Os primeiros estudos realizados quanto à resistência de cítricos ao cancro cítrico ocorreram quase cem anos atrás. Há uma extensa variação quanto à resistência, havendo rutáceas que se apresentam como totalmente resistentes até altamente suscetíveis. Mais recentemente alguns autores avaliaram as reações de genótipos (espécies e variedades) de cítricos comercialmente usados na produção de frutas. De modo geral, limas ácidas e limões mostram-se mais suscetíveis ao cancro cítrico, enquanto tangerinas mostram-se mais resistentes. Numa posição intermediária estão localizadas algumas das laranjas doces, com diferenças de suscetibilidade entre elas. Nos últimos anos foram geradas plantas transgênicas de laranjas doces, empregando-se genes que codificam peptídeos antibacterianos, no entanto esses genes não foram extraídos de material vegetal e sim de espécies do reino animal. Os transformantes mais promissores apresentaram reduções de 55 a 60% na severidade do cancro cítrico.

A maioria dos R-genes codificam proteínas citoplasmáticas contendo uma região *nucleotide binding* central (NBS) e um domínio carboxil rico em leucina (*leucine rich repeat*-LRR), geralmente denominados genes NBS-LRR. As sequências de genes de resistência a doenças de plantas clonados mostram que, apesar de conferirem resistência a vírus, bactérias e fungos, contém sequências similares e codificam peptídeos com semelhanças estruturais. R-genes bastante conhecidos, como os genes *RPS2* de *Arabidopsis* e *N* de *Nicotiana*, apresentam sequências NBS bem conservadas, tanto entre R-genes da mesma espécie botânica quanto entre espécies taxonomicamente distantes. O fato de R-genes ser parcialmente conservados representa algumas vantagens na identificação e clonagem dos mesmos.

O controle de doenças de plantas por resistência varietal constitui-se num dos métodos de controle mais efetivos e de baixo custo que a pesquisa pode oferecer à

agricultura moderna. Mas poucas informações estão disponíveis na literatura científica concernente à caracterização e clonagem de genes de resistência ao cancro cítrico. Os recentes trabalhos publicados relacionados à geração de transgênicos com resistência a essa doença empregaram, sem exceção, peptídeos anti-bacterianos exógenos, ou seja, não originários de membros da família Rutaceae. Ambas estratégias podem ser adotadas na construção de transformantes com resistência à patógenos, mas a identificação e clonagem de genes de resistência originários de espécies taxonomicamente próximas de Rutáceas é mais desejável comercialmente.

Visto que a descoberta e clonagem de genes de resistência ao cancro cítrico permitirão a transformação genética de variedades e espécies cítricas de uso comercial, gerando como resultado novas estratégias de controle da doença, o presente trabalho teve como proposta desenvolver oligonucleotídeos baseados em sequência de R-genes de outras espécies, testá-los em citros e espécies pertencentes à família Rutaceae, e encontrar sequências de genes que possam estar relacionadas à resistência ao cancro cítrico.

II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da citricultura no Brasil

Encontrando no Brasil melhores condições para vegetar e produzir do que nas próprias regiões de origem, as plantas cítricas se expandiram para todo o País, tornando-se até supostamente “nativas” em certos lugares, como no Mato Grosso (MATOS JUNIOR et al., 2005). Inicialmente, a citricultura desenvolveu-se mais nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia. Na região central, as missões religiosas e os bandeirantes que avançavam pelo interior do País, tiveram certamente influência na implantação dos laranjais por toda a parte (TAUNAY, 1923). A importância que teria a citricultura brasileira no início do século XXI era um fato que não podia sequer ser imaginado há algumas dezenas de anos. Cerca de 98% do suco é exportado principalmente para os Estados Unidos e União Européia,

além do Japão e outros 45 países (MATOS JUNIOR et al., 2005). A principal variedade é a laranja Pêra, seguida de Natal e Valência. A de limões é liderada pela lima ácida Tahiti, sendo pequena a produção de limões verdadeiros, tipo Siciliano (MATOS JUNIOR et al., 2005).

2.2 Cancro cítrico – importância, distribuição e controle

O cancro cítrico asiático, também denominado cancrose A, é uma das mais graves doenças da cultura dos citros (GOTTWALD et al., 2001; GOTTWALD et al., 2002; STALI & SEYMOUR, 1983). Seu agente causal, a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, encontra-se distribuído em dezenas de países localizados na Oceania, Ásia e América, infectando plantas da família Rutaceae (CIVEROLO, 1984). O provável centro de origem desta doença é a Ásia, onde é endêmica (KOIZUMI, 1985). Trata-se de uma doença quarentenária e o comércio mundial de cítricos é regulado por medidas de exclusão e erradicação que visam impedir a entrada do patógeno em áreas livres da doença (CIVEROLO, 1985; GOTTWALD et al., 2001; SCHOULTIES et al., 1987). A primeira ocorrência desta doença no Brasil foi em 1957, no município de Presidente Prudente, São Paulo (BITANCOURT, 1957).

Medidas de exclusão e erradicação foram adotadas neste mesmo ano e foi iniciada uma campanha de erradicação do cancro cítrico, que permanece ativa até os dias atuais (GIMENES-FERNANDES et al., 2000). Apesar dos esforços iniciais, já em 1957 a doença foi encontrada nos estados de Mato Grosso do Sul e Paraná (AMARAL, 1957). Atualmente o cancro cítrico está presente nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Roraima.

Os sintomas constituem-se em lesões circulares, corticosas, salientes, de coloração amarronzada, aspecto eruptivo e rodeado por anasarca, presentes em folhas, ramos e frutos (BITANCOURT, 1957; ROSSETTI, 2001). Nas folhas e frutos é comum o aparecimento de um halo amarelo circundando a área necrosada. Em altas severidades pode ocorrer desfolha, queda de frutos e seca de ramos, sendo mais comuns em hospedeiros mais suscetíveis (GOTTWALD et al., 1988; GOTTWALD et al., 1989). Plantas cítricas afetadas constituem-se como principal fonte de inóculo da doença já que a sobrevivência da bactéria é curta em qualquer

outro substrato (GRAHAM et al., 1987; GRAHAM et al., 1989; GRAHAM et al., 2000). Sob condições naturais de infecção a disseminação ocorre principalmente pela ação de respingos de chuvas e de chuvas associadas com ventos, e a disseminação a longas distâncias dá-se pelo transporte de material vegetal infectado (CIVEROLO, 1985; DANÓS et al., 1984; GOTTWALD et al., 1988; GOTTWALD et al., 1989). Atividades culturais como poda, colheita e pulverizações podem disseminar a bactéria entre plantas de um mesmo pomar (CIVEROLO, 1985; DANÓS et al., 1984; GOTTWALD et al., 1988). A infecção ocorre em tecidos jovens (GOTO, 1990; GRAHAM et al., 1992), durante períodos de crescimento do hospedeiro (LEE, 1921).

No Brasil o controle do cancro cítrico baseia-se principalmente em medidas de exclusão e erradicação, e há medidas regulatórias determinantes da erradicação de plantas quando afetados pela doença (BARBOSA et al., 2001; BELASQUE JR. et al., 2009). Constatada a presença de cancro cítrico, a legislação federal determina a eliminação das plantas doentes e a adoção de um raio mínimo de trinta metros a partir das plantas doentes. As plantas contidas no raio, consideradas como suspeitas de infecção, devem ser completamente eliminadas, receberem uma poda drástica nos ramos, ou uma desfolha química (um dos três métodos). No Estado do Paraná a erradicação de plantas doentes, e das suspeitas de infecção, não é obrigatória e é permitida a adoção de práticas de manejo da doença, como a pulverização de cúpricos e implantação de cortinas quebra-vento (LEITE JÚNIOR & MOHAN, 1990).

2.3 O agente causal do cancro cítrico *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Seis diferentes tipos de cancro cítrico ou cancroses estão descritos na literatura (GABRIEL et al., 1989; SCHOULTIES et al., 1987). O cancro cítrico asiático, cancro cítrico ou cancrose A, é o tipo mais comum, sendo endêmico em algumas regiões da Ásia, América e Oceania. Essa doença é causada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) (synonim. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*). Esse é o patógeno que incita o cancro cítrico nas principais regiões produtoras de citros no mundo, como Brasil e Flórida, e nas quais há programas oficiais de erradicação (São Paulo) ou apenas a adoção de estratégias de manejo (demais

países da América do Sul, estados brasileiros e Flórida). Cancro em ramos, folhas e frutos de árvores cítricas são as estruturas que abrigam a bactéria Xac. Além do tecido hospedeiro, a sobrevivência do inóculo pode também ser garantida após a queda dos órgãos infectados, embora, no solo, a bactéria não consiga sobreviver por muito tempo. Nas épocas quentes e chuvosas, uma massa de talos bacterianos exsuda destes cancos e é dispersa pela água e chuvas acompanhada de ventos fortes (LEITE & MOHAN, 1998). O cancro cítrico B, ou cancrose B, possui uma gama mais restrita de hospedeiros. É patogênico somente em *Citrus limon* e *Citrus aurantifolia* e somente foi encontrado na Argentina, Uruguai e Paraguai. Cancro cítrico C, ou cancrose C, é limitado ao estado de São Paulo e afeta somente *C. aurantifolia*. Esses dois últimos tipos de cancro cítrico (B e C) são induzidos por *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (synonim. *X. a. pv. aurantifolia*). Por último tem-se a Mancha bacteriana dos citros, cujo agente causal é a bactéria *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (synonim. *X. a. pv. citrumelo*). Ocorre em viveiros na Flórida, somente tendo sido encontrado infectando citrumelo 'Swingle' (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*) (HARTUNG & CIVEROLO, 1989). Há também dois outros tipos bacterianos, formados por isolados da espécie *citri* com patogenicidade diferenciada e restrita basicamente à *C. aurantifolia*, o primeiro encontrado no sudoeste asiático (tipo A*) (VERNIÈRE et al., 1998) e o segundo na Flórida (tipo A^w) (SUN et al., 2000; SUN et al., 2004).

2.4 Resistência de citros e relativos ao cancro cítrico

Paradoxalmente, os primeiros resultados divulgados de estudos realizados quanto à resistência de citros e relativos ao cancro cítrico ocorreram nas primeiras décadas do século XX (JEHLE, 1917; JEHL, 1918; LEE, 1918; MCLEAN & LEE, 1921; PELTIER, 1918). Esses autores estudaram a resistência/suscetibilidade de diferentes espécies de rutáceas. Dentre as espécies avaliadas, há genótipos que não apresentam sintomas (resistência total), como algumas espécies da tribo *Citrae* e outras distantes do gênero *Citrus*.

Mais recentemente alguns autores avaliaram as reações de genótipos (espécies e variedades) de citros usados comercialmente na produção da cultura

(LEITE JR. & MOHAN, 1984; GOTTWALD et al., 1993; ZUBRZYCKI & ZUBRZYCKI, 1981). Limas ácidas e limões mostram-se mais suscetíveis ao cancro cítrico, enquanto tangerinas mostram-se mais resistentes. Numa posição intermediária estão localizadas algumas das laranjas doces, com diferenças de suscetibilidade entre elas.

Em recente trabalho PAVAN et al. (2007) observaram redução de 70% na severidade do cancro cítrico em híbridos somáticos de laranja doce 'Hamlin' e tangerina 'Montenegrina', em comparação com plantas de laranja doce 'Hamlin'. Resultados semelhantes também foram observados por BOSCARIOL et al. (2006). Esses autores transformaram laranja doce 'Hamlin' com o gene *Atacina A* que codifica peptídeos com atividade antibacteriana. Os transformantes mais promissores apresentaram reduções de 55 a 60% na severidade do cancro cítrico.

2.5 Interação patógeno-hospedeiro e genes de resistência a doenças de plantas.

Em patossistemas vegetais a interação patógeno-hospedeiro é denominada "incompatível" quando o hospedeiro tem seus mecanismos de defesa ativados e o patógeno não consegue desenvolver-se em seu interior (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996). Nesse caso não há indução de sintomas da doença. Por outro lado, interações "compatíveis" envolvem tanto a multiplicação do patógeno à custa do hospedeiro quanto, na maioria dos casos, a indução dos sintomas da doença. A ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro pode ocorrer tanto nas interações compatíveis quanto incompatíveis, mas dá-se em magnitude e velocidade diferentes para cada tipo de interação. A ativação da defesa do hospedeiro ocorre após o reconhecimento do patógeno. Em muitas interações entre plantas e patógenos biotróficos, esse reconhecimento envolve um par de genes complementares presentes nos dois organismos – genes de resistência no hospedeiro (*R*-genes) e genes de avirulência (*avr*) no patógeno (BOYES et al., 1996; Flor, 1971; STASKAWICZ et al., 1995). O reconhecimento do patógeno não ocorre na ausência de *R*-genes no hospedeiro ou de *avr* no patógeno. Esse fenômeno de reconhecimento é resultante da evolução conjunta do hospedeiro e do patógeno

(HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996). O primeiro adquirindo a capacidade de reconhecer o patógeno, e consequentemente, barrá-lo em seus tecidos. Em relação ao patógeno, a evolução é na capacidade de não ser reconhecido pelo hospedeiro, e consequentemente, infectá-lo e seguir seu ciclo de vida.

A maioria dos *R*-genes codifica proteínas citoplasmáticas contendo um *nucleotide binding* central (NBS) e um domínio carboxil rico em leucina (*leucine rich repeat*-LRR), geralmente denominados genes NBS-LRR (BAKER et al, 1997; TOR et al., 2004). Há ainda, para esse grupo, duas subdivisões: a) com domínio amino terminal *coiled-coil* (CC-NBS-LRR), como exemplos *RPS2*, *RPM1*, *RPS5*, *RPP13* e *RPP8* (BITTNER-EDDY et al., 2000; MCDOWELL et al., 1998); e b) aqueles contendo um domínio amino terminal semelhante a um domínio sinalizador citoplasmático com receptores trans-membrana tipo Toll e interleucina-1 (TIR) (TIR-NBS-LRR), como exemplos *RPS4*, *RPP1*, *RPP5* e *N* (DANGL & JONES, 2001; TOR et al., 2004; WHITHAM et al., 1994).

As seqüências de genes de resistência a doenças de plantas clonados mostram que, apesar de conferirem resistência a vírus, bactérias e fungos, os mesmos contêm seqüências similares e codificam peptídeos com semelhanças estruturais (KANAZIN et al., 1996). Outra característica comum de *R*-genes é a presença em *clusters*, o que pode ser resultado de um mecanismo genético comum envolvido na evolução desses genes (ELLIS et al., 1995; SUDAPAK et al., 1996). *R*-genes em *clusters* foram observados em cevada (JORGENSEN, 1994), alface (HULBERT & MICHELMORE, 1985), ervilha (ELLIS et al., 1995), tomate (DIXON et al., 1996; JONES et al., 1994), milho (RICHTER et al., 1995), citros (DENG et al., 2000), maçã (CALENGE et al., 2005), mandioca (LÓPEZ et al., 2003), *Arapdopsis* (DING et al., 2007), dentre outras espécies de plantas de interesse econômico ou científico. O primeiro gene de resistência a doenças em plantas clonado foi o *Pto* de tomate (MARTIN et al., 1993), o qual codifica uma proteína Ser/Thr quinase. Muitos outros genes de resistência clonados codificam proteínas contendo domínios tipo LRR (BENT, 1996; JONES & JONES, 1996). Exemplos de *R*-genes com LRR são *Cf-9*, *Cf-2* e *Xa21*, que codificam LRR extra-citoplasmático (DIXON et al., 1996; JONES et al., 1994; SONG et al., 1995). Uma segunda categoria de *R*-genes com LRR são aqueles que codificam LRR citoplasmáticos. Exemplos desses últimos são

os genes *RPS2*, *RPP5*, *N* e *L6* (Bent et al., 1994; Lawrence et al., 1995; Parker et al., 1997; Whitham et al., 1994).

DENG & GMITTER (2003), fazendo uso de oligonucleotídeos degenerados desenhados a partir de seqüências conservadas de *Xa21* e *Pto*, identificaram genes em citros similares a R-genes com domínio tipo proteína quinase identificados de outras espécies. A genotipagem fazendo uso de seqüências NBS (*nucleotide binding site*) é um exemplo de técnica utilizada na busca de genes de resistência e análogos de R-genes (RGAs) com oligonucleotídeos degenerados baseados em seqüências conservadas da classe de genes NBS-LRR (NBS *leucine rich-repeat*) (VAN DER LINDEN et al., 2004). Essa técnica foi utilizada com sucesso na identificação de *loci* de R-genes e RGAs em genótipos de macieira, alface, batata e cevada (VAN DER LINDEN et al., 2004; CALENGE et al., 2005; SYED et al., 2006). Muitas das seqüências identificadas com NBS revelaram similaridade com seqüências conhecidas de NBS de R-genes de várias espécies. Assim, técnicas moleculares que utilizam domínios NBS como seqüências alvo podem gerar marcadores polimórficos associados com genes de resistências envolvidos na interação patógeno-hospedeiro. Como discutido por VAN DER LINDEN et al. (2004), a genotipagem de acessos de espécies de plantas de interesse econômico com seqüências NBS pode ser útil na identificação e clonagem de novos *loci* de R-genes. DENG et al. (2000) afirmam que R-genes em citros começaram a ser identificados e mapeados apenas recentemente (em 1996) e ainda não foram extensivamente estudados.

III- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Para a realização deste estudo foram utilizados sessenta e um genótipos de materiais vegetais. Com exceção das espécies *Murraya* ssp; *Zanthoxylum rugosum*; *Zanthoxylum lindelianum* e *Severinia* spp , fornecidas pelo Fundo de Defesa da Citricultura-FUNDECITRUS, São Paulo, Brasil, todos os demais genótipos foram

cedidos pelo Banco Ativo de Germoplasma da Estação Experimental de Bebedouro, São Paulo, Brasil. A escolha dos genótipos foi baseada em resultados apresentados por autores que avaliaram a resistência e suscetibilidade de diferentes espécies da família Rutácea (MCLEEAN & LEE, 1921; PELTIER, 1918;) e estudos mais recentes que avaliaram as reações de resistência e suscetibilidade entre espécies e variedades de citros utilizadas comercialmente (ZUBRZYCHI & ZUBRZYCHI, 1981; LEITE JR. & MOHAN, 1984; GOTTWALD et al., 1993).

3.2 Extração de DNA vegetal

A extração de DNA vegetal foi realizada a partir de 500 mg da nervura central de dez folhas de cada uma das espécies, maceradas em homogeneizador Homex 6 (Bio-Rad), usando o método de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) descrito por MURRAY & THOMPSON (1980). As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro e mantidas a – 20°C.

3.3 Desenhos de oligonucleotídeos e reações de PCR

Devido o genoma de citros não estar disponível ao acesso público, foram utilizadas sequências de genes de outras espécies para o desenho de doze oligonucleotídeos, sendo estas de *Arabidopsis thaliana* e *Malus floribunda*, não pertencentes à família Rutacea. No entanto GUIDETTI-GONZALES & CARRER (2007) encontraram domínios de resistência conservados em plantas cítricas, similares a sequências pertencentes a essas duas espécies *A. thaliana* e *M. floribunda*. Além desses, outros cinco pares de oligonucleotídeos degenerados descritos por KANAZIN et al. (1998), DENG et al. (2000) e DENG & GMITTER (2003) foram testados, totalizando em dezessete pares de oligonucleotídeos utilizados neste trabalho. Na Tabela 1 estão apresentadas apenas informações dos oligonucleotídeos que apresentaram resultados, como os números de acesso (Genbank) dos R-genes utilizados para desenho dos oligonucleotídeos, as sequências dos mesmos e temperaturas de anelamento para amplificação dos genótipos avaliados no presente estudo.

Tabela 1. Números de acesso e espécie de origem das sequências de R-genes utilizadas para desenho dos oligonucleotídeos CAC, CAA, AAF e NP e temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos na PCR.

Nº Acesso GenBank	Oligonucleotídeo	Sequência	Temperatura de anelamento
CAA72178 <i>Arabidopsis thaliana</i>	CAA_F	CCGGAGATTTTCACTGTGGT	58°C
	CAA_R	AACTCGGTCAGGTCCATCAC	
AAF78445 <i>Arabidopsis thaliana</i>	AAF_F	GCGACAAATGTGCTTCTTGA	62°C
	AAF_R	TCAGCTTCACGTTTCACCAG	
NP_1950562 <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_F	TACAAAAACACCGCCAAACA	62°C
	NP_R	ACCTTTCCCAATTCCAATCC	
CAC 40827 <i>Malus floribunda</i>	CAC_F	GTTTTCCGGAAGCATACCAA	58°C
	CAC_R	CAGCAAAGAACCAAGCACAA	

Os oligonucleotídeos foram desenhados com o auxílio do software Primer 3 (v.0.4.0) e as regiões de anelamento dos mesmos estão representadas nas Figuras 1, 2, 3 e 4.

ATGGAGAGAACCATGAGAGTTGTTATACTACTAACCAGGTTTCTAGCCATTGCAACCATTACTTTCAGTATTGGT
TTATGCAATGGAAATCCCGGTTGGCCTCCACTTTGCAAAGAAAGCGAAAGACAAGCACTTCTGATGTTCAAGCAA
GATCTCAAGGACCCAAACCAATCGGCTTGCATCGTGGGTTGCAGAGGAAGATTCAGATTGAGACTGTTGCAGTTGG
ACAGGAGTTGTCTGTGATCACACAACCGGCCACATCCACGAGCTGCACCTTAATAATACCGACCCTTTTTTGGAT
TTGAAATCTTCTTCGGTGGTAAGATAAATCCTTCTTTGCTCAGTTTAAAGCATCTCAACTTCTTGGACTTGAGT
AACAATTATTTCTATCCAACACAAATTCCTAGTTTCTTTGGTTCATGACAAGTTTAACACACCTTAACCTTGCA
TACTCAAGGTTTGGTGGAATAATTCCTCATAAACTAGGAAATCTCTCCAGTCTACGCTATCTCAATCTCAGTAGT
AATAGTATCTATCTGAAGGTAGAGAACCTTCAGTGGATTTCTGGTCTTTCTCTGCTGAAACACTTGGACTTGAGT
GGTGTAATCTTAGCAAAGCATCTGACTGGTTGCAAGTTACAAACATGCTCCCTTCTTTGGTAAAGTTAATTATG
TCTGATTGTCAACTTTATCAAATTCCTTCTACCCACCACAAATTTTACTTCCCTGGTCGTCCTTGATCTTTCT
TTCAACAATTTTAATTCTTTGATGCCGAGGTGGGTTTTTCAGTCTTAAAAATCTAGTTTCTATTCATCTCAGTGAT
TGTGGTTTCCAAGGTCCAATTCCTAGCATTTTCACAGAATATCACATATTTGAGGGAAATTGATTTGTCAGATAAC
AATTTACGGTTCAAAGACCATCCGAAATCTTTGAAAGTTTGTCCAGATGTGGTCCAGATGGAATAAAGTCATTG
TCGTTGAGGAATACTAATGTATCAGGTCACATTCGAATGTCACTAAGAAATCTGTCAAGCTTAGAAAAATTGGAC
ATATCTGTAAATCAATTTAATGGAACCTTTCACAGAAGTTATTGGTCAACTCAAAATGCTAACGTATTTGGATATA
TCTTATAATTCGTTAGAAAAGTGCAATGTCCGGAAGTTACTTTTAGCAACCTTACAAAGTTGAAGAATTTTGTGGC

AAAGGAACTCATTGACTCTGAAAAGTAGTCGAGATTGGGTTCCCTCTTTTCAACTTGAAATTTTGCATCTGGAT
 TCCTGGCATTGGGGCCTAAATGGCCAATGTGGTTGCGAACACAAACGCAATTAAGAAGTAAGCTTGTCTGGT
 ACAGGAATTTCAAGTACTATTCCAACCTGGTTTTGGAACCTTAACCTCCCAAGTAGAGTATCTGAATCTCTCTCGC
 AATCAGTTGTATGGGCAGATTCAAAATATAGTTGCTGGTCCTTCTTCAGTGGTTGATCTTAGTTCTAACCAATTC
 ACTGGTGCATTGCCTATTGTTCCACCTCATTATTTTTTCTAGATCTTTCCAGGTCATCATTTTTCTGAATCTGTT
 TTCCACTTCTTCTGTGATAGGCCGGATGAACCAAAGCAACTTTCTGTTCTTAATCTCGGGAACAATCTTCTCACT
 GGAAAAGTACCCGATTGTTGGATGAGTTGGCAACACTTGAGATTCTTAAATTTAGAAAACAACAACCTAACTGGG
 AATGTCCCAATGTCCATGGGATACTTGCAATATCTGGGATCCCTGCACCTGCGCAATAATCACCTGTACGGAGAA
 TTGCCACATTCCCTGCAGAACTGTACCTGGTTGTCAGTTGTTGACCTTAGTGAAAATGGGTTTTCCGGAAGCATA
CCAATATGGATAGGGAAAAGCCTTTCAGGGTTGAATGTTCTTAACCTTCGTTCAAATAAGTTTGAAGGAGATATT
 CCTAATGAAGTTTGTATTGTTGAAAAGTCTCCAGATATTGGACCTTGACATAACAACTCTCAGGAATGATACCG
 AGATGCTTCCACAATTTGAGCGCCTTGGCTGATTTTTTCAGAATCATTTTATCCAACCTAGTTATTGGGGTACAAAT
 TGGTCTGAACCTTTCAGAGAATGCAATCTTGGTAACGAAAGGGATAGAAATGGAATATAGCAAGATTCTGGGATTC
 GTAAAAGTCATGGACCTTTCATGCAACTTTATGTATGGAGAGATCCCTGAAGAACTTACCGGCCTCCTCGCATTG
 CAGTCACTCAATTTATCTAATAATCGCTTCACTGGAAGAATTCCTTCAAATATTGGTAATATGGCATGGTTAGAA
 TCTCTCGATTTTTCCATGAACCAACTTGATGGTGAAATTCCTCCAAGCATGACGAATTTGACATTTCTGAGTCAC
 TTAAACTTGTCTTACAACAATTTGACGGGACGAATTCGGGAAAGCACTCAACTGCAGAGCCTTGATCAGTCGAGC
 TTCGTCGGCAACAACTATGCGGAGCTCCACTCAACAAGAATTGCAGCACGAATGGGGTGATACCGCCACCAACA
 GTTGAAGCAAGACGGAGGAGGAGGATACCGTTTACTCGAAGACGAGTGGTTCTACGTGAGCTTGGGAGTTGGATTC
 TTCACGGGGTTTTGGATTGTGCTTGGTTCTTTGCTGGTAAACATGCCATGGAGCATCTCTCTTTCACAGTTGCTG
 AATAGGATAGTGCTTAAATGTATCATGTAATTGTTGAATATGTTTAG-3'

Figura 1. Representação esquemática do pareamento do oligonucleotídeo CAC de *Malus floribunda* na sequência utilizada para o desenho dos iniciadores. As regiões em vermelho indicam a região de pareamento do oligonucleotídeo e as setas o sentido da amplificação.

5' ATGGGTTTCTTTTTCTCGACCCGAAAGGTCTTCTTCTCATCATCTTCATTTGCTTGGATATTTTCGGATCAA
 ATGCTCAACTTTTGCCAGAAGATGAAGTTCAAACATTGCGAACGATCTTTAGAAAGCTTCAAACCAAACAGTGA
 ACATCGAAAGAACTTCTTGTGTTGGACAGAAAATGGAACCTTTGTTGCCGAGTCAACCTCCAAGCTACCAACCAGTA
 ACATTACCTGCGACTGTACTTTCAACGCCAGCTCAGTCTGTCGTGTCACAAACATACAGCTTAGAGGTTTCAATT
 TGCGAGGAATTATACCGCCTGAATTCGGGAACCTCACACGTCTTACAGAGATGGCTGTAACCGGAAACCGACTCT
 CTGGACCATTTCTCCTCAGCTCGGACAGATTACTACACTTACTGATGTGATTATGGAAAGTAATTTATTCACAG
 GACAACTTCTCCAAACCTAGGGAACCTAAGAAGCTTGAAAAGATTGCTAATCTCTTCAAATAACATCACGGGTC
 GGATCCCTGAGTCCTTGAGCAATCTCAAGAATTTGACTAATTTTCGGATTGATGGAACTCTCTATCTGGGAAGA
 TACCTGATTTTATTGGAACTGGACTCGGCTCGTTAGGCTAGACCTCCAAGGCACATCAATGGAAGGTCCTATTC
 CAGCTTCGATTTCAAACCTTGAAAAACCTGACTGAATTGAGGATAACAGATTTGCGTGGACCAACTTCTCCTTTTC
 CAGACCTTCAAAATATGACGAATATGGAAAGATTGGTACTAAGAACTGTTTGATAAGGGAACCTATACCGGAGT
 ACATCGGTACTTCCATGACTATGTTGAAGTTACTAGATTTAAGCTCAAACATGTTAAATGGTACAATTCCAGACA
 CATTTCCGAGTCTGAACGCATTCAACTTTATGTATCTGAATAATAACTCATTGACTGGTCCAGTTCTCAGTTCA

TTCTTGATAGTAAACAAAAACATTGTCCAATGGTGCTTAAGAAAGGATCTTCCGTGTCCTGGAGACGCACACCATT
 CTTCCCTTGTTCACTTAAGTGTGGAGGAAACCGACTCAAGGTTGATAAAGACGAGTATGCGGATGACTTAAACAAAA
 GAGGAGCATCAACATTCTCTCTGTCTCTGAAAGATGGGGATACAGTAGTTCTGGAGCTTGGTTAGGCAATGACG
 GTGCCACTTACTTAGCAACAGATACGTTTAACTTGATCAATGAATCAACTCCAGAGTATTACAAAACAGCCCGTC
 TCGCTTCACAATCACTCAAGTACTATGGACTATGCATGAGAAGAGGAAGTTACAAAGTTCAGCTCTATTTTGCAG
 AGATAATGTTCTCAAATGATCAGACTTATAGTAGCTTAGGGCGGCGACTATTTCGACATTTATGTTCAAGGGATTT
 TGTGGAGAGGGACTTTAACATAGCACAGAGAGCAGGTGGAGTTGGTAAACCGTTCCTAAGGCAAGTTGATGAAG
 TTCAAGTGAATGGAAGTACGTTGGAGATTCAATTTGAAGTGGACAGGAAAAGGCACAAACGTAATACCAACAAGAG
 GTGTTTACGGGCCTCTCATATCCGCTATAACCGTCACACCGAATTTCAAGGTTGATACCGGAAAACCATTTGTCCA
 ATGGAGTAGTTGCAGGCATTGTAATCGCAGCGTGTGTAGCTTTTCGGGTTGCTGGTACTTGTAACTCCTCAGGCTAA
 CAGGTTACTTAGGTGGAAAAAGAGTGGATGAAAAATGAAGAGCTTCGGGGACTCGATTTGCAGACAGGATCGTTCA
 CATTGAAGCAAAATCAAACGTGCTACTAACAACCTTTGATCCAGAAAACAAGATTGGAGAAGGAGGATTTGGACCGG
 TTTATAAGGGTGTCTCGCTGATGGGATGACCATAGCGGTGAAGCAGCTTTCATCGAAATCTAAGCAAGGAAACC
 GAGAATTTGTGACTGAGATCGGTATGATATCTGCGTTGCAACACCCTAATCTTGTGAACTTTATGGTTGTTGCA
 TCGAAGGGAAAGAGCTTTTGCTTGTGTATGAATACTTAGAGAACAACAGTCTCGCTCGCGCACTCTTTGGCACAG
 AGAAACAAAGACTTCACTTGGATTGGTCCACGAGGAACAAGGTATGCATAGGGATTGCGAAAGGATTGGCTTATC
 TACACGAGGAATCAAGGCTGAAGATTGTGCACAGAGACATTAAGCGCACAAATGTGCTTCTTGATCTGTCTCTAA
 ATGCTAAGATCTCTGATTTTGGTCTAGCGAAACTCGATGAAGAAGAGAATACACATATCAGCACAAGGATTGCAG
 GAACAATAGGTTACATGGCTCCAGAGTATGCAATGAGAGGTTACTTAACAGACAAAGCAGATGTTTATAGCTTCG
 GTGTAGTCTGTTTAGAGATTGTTAGCGGAAAGAGCAACACAAATTACAGACCAAAGAAGAGTTTATTTACCTTC
 TTGACTGGGCATATGTCTTGCAAGAACAAGGGAGTCTTCTAGAACTCGTGGATCCAGATCTCGGTACAAGCTTTT
 CGAAGAAAGAAGCAATGAGGATGTTGAACATAGCTTTACTCTGTACAAACCCATCTCCAACATTGAGACCACCGA
 TGTCTCTGTTGTAAGTATGCTACAAGGAAAAATCAAAGTCCAACCACCACTGGTGAAACGTGAAGCTGATCCAA
 GTGGTTTACGCCCAATGAGGTTTAAAGGCCTTAGAGCATTTGTACACAAGACAGCGAGTCACAAGTCTCAACCTATA
 CAAGAAACAAAGAACACAAAAGCTCCTCCTCGATGGACGGTCTTGGGTCGATTCTTCTCTCTGATCCGAGCA
 AAGATGTTAGCCTATTACAGCAAGAAGAAGGAAATTCATCATCTTCGTCGAGGAGACTGTTAGATGATCTTACTG
 ATGTGGAGATTGAGTAA-3'

Figura 2. Representação esquemática do pareamento do oligonucleotídeo CAA de *Arabidopsis thaliana* na sequência utilizada para desenho dos iniciadores. As regiões em vermelho indicam a região de pareamento do oligonucleotídeo e as setas o sentido da amplificação.

5' ATGGGTTTCTTTTCTCGACCCGAAAGGTCTTCTTCTCATCATCTTCATTTGCTTGGATATTTTCGGATCAA
 ATGCTCAACTTTTGCCAGAAGATGAAGTTCAAACATTGCGAACGATCTTTAGAAAGCTTCAAACCAAACAGTGA
 ACATCGAAAGAACTTCTTGTGTTGGACAGAAAAATGGAACCTTGTGTCGAGTCAACCTCCAAGCTACCAACCAGTA
 ACATTACCTGCGACTGTACTTTCAACGCCAGCTCAGTCTGTCTGTACAAACATACAGCTTAGAGGTTTCAATT
 TGCGAGGAATTATACCGCCTGAATTCGGGAACCTCACACGTCTTACAGAGATGGCTGTAACCGGAAACCGACTCT
 CTGGACCATTTCCTCCTCAGCTCGGACAGATTACTACACTTACTGATGTGATTATGGAAAGTAATTTATTCACAG
 GACAACTTCCTCCAAACCTAGGGAACTTAAGAAGCTTGAAAAGATTGCTAATCTCTTCAAATAACATCACGGGTC

GGATCCCTGAGTCCTTGAGCAATCTCAAGAATTTGACTAATTTTCGGATTGATGGAACTCTCTATCTGGGAAGA
 TACCTGATTTTATTGGAACTGGACTCGGCTCGTTAGGCTAGACCTCCAAGGCACATCAATGGAAGTCTTATTC
 CAGCTTCGATTTCAAACCTTGAAAAACCTGACTGAATTGAGGATAACAGATTTGCGTGGACCAACTTCTCCTTTTC
 CAGACCTTCAAAATATGACGAATATGGAAAGATTGGTACTAAGAACTGTTTGATAAGGGAACCTATACCGGAGT
 ACATCGGTACTTCCATGACTATGTTGAAGTTACTAGATTTAAGCTCAAACATGTTAAATGGTACAATTCCAGACA
 CATTTCGGAGTCTGAACGCATTCAACTTTATGTATCTGAATAATAACTCATTGACTGGTCCAGTTCCTCAGTTCA
 TTCTTGATAGTAAACAAAACATTGTCCAATGGTGCTTAAGAAAGGATCTTCCGTGTCCTGGAGACGCACACCATT
 CTTCCCTGTTCAATTAAGTGTGGAGGAAACCGACTCAAGGTTGATAAAGACGAGTATGCGGATGACTTAAACAAA
 GAGGAGCATCAACATTCTCTTCTGTCTCTGAAAGATGGGGATACAGTAGTTCTGGAGCTTGGTTAGGCAATGACG
 GTGCCACTTACTTAGCAACAGATACGTTTAACTTGATCAATGAATCAACTCCAGAGTATTACAAAACAGCCCGTC
 TCGCTTCACAATCACTCAAGTACTATGGACTATGCATGAGAAGAGGAAGTTACAAAGTTCAGCTCTATTTTGCAG
 AGATAATGTTCTCAAATGATCAGACTTATAGTAGCTTAGGGCGGCGACTATTTCGACATTTATGTTCAAGGGATTT
 TGTTGGAGAGGGACTTTAACATAGCACAGAGAGCAGGTGGAGTTGGTAAACCGTTCCTAAGGCAAGTTGATGAAG
 TTCAAGTGAATGGAAGTACGTTGGAGATTCATTTGAAGTGGACAGGAAAAGGCACAAACGTAATACCAACAAGAG
 GTGTTTACGGGCCTCTCATATCCGCTATAACCGTCACACCGAATTTCAAGGTTGATACCGGAAAACCATTTGTCCA
 ATGGAGTAGTTGCAGGCATTGTAATCGCAGCGTGTGTAGCTTTTCGGGTTGCTGGTACTTGTAACTCCTCAGGCTAA
 CAGGTTACTTAGGTGGAAAAAGTGGATGAAAAAGAGAGCTTCGGGGACTCGATTTGCAGACAGGATCGTTCA
 CATTGAAGCAAATCAAACGTGCTACTAACAACTTTGATCCAGAAAACAAGATTGGAGAAGGAGGATTTGGACCGG
 TTTATAAGGGTGTCTCGCTGATGGGATGACCATAGCGGTGAAGCAGCTTTCATCGAAATCTAAGCAAGGAAACC
 GAGAATTTGTGACTGAGATCGGTATGATATCTGCGTTGCAACACCCTAATCTTGTGAACTTTATGGTTGTTGCA
 TCGAAGGGAAAGAGCTTTTGCTTGTGTATGAATACTTAGAGAACAACAGTCTCGCTCGCGCACCTCTTTGGCACAG
 AGAAACAAAGACTTCACTTGGATTGGTCCACGAGGAACAAGGTATGCATAGGGATTGCGAAAGGATTGGCTTATC
 TACACGAGGAATCAAGGCTGAAGATTGTGCACAGAGACATTAAAGCGACAAATGTGCTCTCTAA
 ATGCTAAGATCTCTGATTTTGGTCTAGCGAAACTCGATGAAGAAGAGAATACACATATCAGCACAAAGGATTGCAG
 GAACAATAGGTTACATGGCTCCAGAGTATGCAATGAGAGGTTACTTAACAGACAAAGCAGATGTTTATAGCTTCG
 GTGTAGTCTGTTTAGAGATTGTTAGCGGAAAGAGCAACACAAATTACAGACCAAAGAAGAGTTTATTTACCTTC
 TTGACTGGGCATATGTCTTGCAAGAACAAGGGAGTCTTCTAGAACTCGTGGATCCAGATCTCGGTACAAGCTTTT
 CGAAGAAAGAAGCAATGAGGATGTTGAACATAGCTTTACTCTGTACAAACCCATCTCCAACATTGAGACCACCGA
 TGTCATCTGTTGTAAGTATGCTACAAGGAAAAATCAAAGTCCAACCACCACTGGTGAACGTGAAGCTGATCCAA
 GTGGTTCAGCCGCAATGAGGTTTAAGGCCTTAGAGCATTTGTCACAAGACAGCGAGTCACAAGTCTCAACCTATA
 CAAGAAACAAAGAACACAAAAGCTCCTCCTCGATGGACGGTCTTGGGTCGATTCTTCCTTCTCTGATCCGAGCA
 AAGATGTTAGCCTATTACAGCAAGAAGAAGGAAATTCATCATCTTCGTCGAGGAGACTGTTAGATGATCTTACTG
 ATGTGGAGATTGAGTAA-3'

Figura 3. Representação esquemática do pareamento do oligonucleotídeo AAF de *Arabidopsis thaliana* na sequência utilizada para desenho dos iniciadores. As regiões em vermelho indicam a região de pareamento do oligonucleotídeo e as setas o sentido da amplificação.

ATGGCCATCACCGATTTTTTCGCCGGTGAAATTGCGACGGAGCTCCTGAAGCAGCTCTTTACGATATCTACAACG
 GCGTGGAGATACAAAAACACCGCCAAACA ACTCCTCACCTTGATCGATAGCATTTCGACCGACGATCAAGGAGATT
 CAATACAGCGGCGTGAGCTTCCTGCTCACCGCCAAGCTCAAATCGGTATGCTCTTCGATACTTTAGAGAAAGGC
 AAGAAGCTCACTGACAAAGTCCTTAGCTCTAAGCGATGGAATTTATATCGACAGCTAACCCTAGCCAGAAAAATG
 GAGAAGCTAGAGAAGACCATCTCTAATTTCCCTTAAAAATGAGGTCTTTACACATATCCTCGCTGACGTTTCATCAT
 CTCCGGGCCGATACCAAGTGTGCGTTTGGATCGGGTTGACATGAGCCTCGACAGGGTGATTAGCAAGTGGGTTC
 ATGAAAATTGGGGGAGGTGGCTTGATATCAGAGGCCATGAAGAGAGCCGAGGCTATGGAGATTGAGACCAACGAC
 GATTTCGAGAAAATTTGGGGTTGGATTGGAATTGGGAAAGGTTAAGGTTAAGAAGATGATGTTTCAATCTCAAGGA
 GGGGTTTTTGGGATCAGTGAATGGGCGGTGTTGGTAAACCACCTCTTGCCAAAGAACTTCAACGGGACCATGAA
 GTCCAATGTCACCTTTGAGAACCGGATTTTGTCTGACTGTATCACAATCTCCGCTTCTTGAGGAGCTGAGGGAA
 CTTATATGGGGTTTCTTATCTGGTTGTGAAGCTGGAAATCCTGTTCTGACTGTAATTTCCGTTTGATGGCGCG
 CGTAAGCTCGTGATTCTTGATGATGTTTGGACCACACAGGCCCTGGACCGCTTGACCTCGTTTAAGTTTCTGGT
 TGCACAACTCTTGTGGTCTCACGATCCAAACTCACTGAGCCTAAATTCACCTATGATGTCGAAGTACTGAGTGAA
 GATGAAGCAATCTCTCTCTGTCTCTGTGCTTTCGGTCAGAAATCTATCCCTCTTGGTTTCTGCAAAGATCTG
 GTTAAGCAGGTTGCTAATGAATGTAAAGGGCTTCCTTTAGCTCTCAAAGTCACGGGTGCTTCATTAAATGGCAA
 CCTGAAATGTACTGGAAGGGCGTATTGCAGAGGTTATCAAAGGTGAACCTGCTGATGACTCTCACGAGAGTAGA
 TTGCTTCGTCAAATGGAAGCTAGTCTAGACAACTCGACCAGACGACCAAAGATTGTTTCTTGGATCTTGGCGCC
 TTCCCTGAAGACAGGAAGATTCCCTCTTGATGTTCTCATCAACATTTGGATTGAGTTACATGATATAGATGAAGGA
 AATGCTTTTGCCATCCTTGTTGATTTGTACACAAGAATCTCCTTACTCTTGGGAAGGATCCACGGCTTGGCTCT
 TTGTACGCAAGCCACTATGATATATTTGTGACACAGCATGATGTTCTGCGAGACCTAGCTCTTCATTTAAGCAAT
 GCAGGGAAAGTAAACAGAAGAAAGCGGTTGCTGATGCCGAAAAGAGAGTTAGATCTTCCAGGAGATTGGGAAAGG
 AACAATGATGAGCATTACATTGCCAGATTGTCTCTATTCTACTGGGAAATGAATGAAATGCAATGGTTTGAC
 ATGGAGTTCCCCAAGGCAGAGATTCTAATATTGAACTTCTCTTCAGACAAGTATGTTCTTCCGCCTTTTATCAGT
 AAGATGAGCCGGCTTAAGGTCCTAGTGATTATCAACAACGGCATGTCTCCCGCGGTTCTCCATGACTTTTCAATA
 TTTGCTCATTTGTGCAAACTAAGAAGTCTCTGGCTAGAGAGGGTTCACGTCCCTCAACTCTCCAACCTCAACCACC
 CCCTTGAAAAATCTCCACAAGATGTCTTTGATTCTGTGCAAGATCAATAAAAGTTTTTGATCAAACCGGACTTGAC
 GTGGCAGATATCTTCCCAAAATTGGGCGATCTGACAATAGATCACTGTGATGATCTCGTGGCCTACCTTCAAGC
 ATTTGCGGACTGACCTCCCTTAGCTGCTTAAGCATAACAAATTGTCCACGCCTCGGTGAATTGCCCAAGAACCTC
 AGTAAGCTACAAGCTCTCGAAATCTTAAGGCTATATGCTTGGCCTGAGCTAAAGACATTACCTGGAGAAATATGT
 GAGCTTCTGGGCTTAAGTATCTCGACATCTCACAATGTGTGAGCCTGAGTTGTCTTCCAGAGGAAATAGGAAAG
 CTAAAGAAGCTTGAGAAGATCGACATGAGAGAATGTTGCTTCTCGGATAGACCGAGCTCTGCTGTTTCACTGAAG
 TCTCTGCGCCATGTAATCTGCGATACCGACGTTGCATTTATGTGGGAAGAAGTTGAGAAGGCTGTTCCAGGGTTA
 AAGATCGAAGCTGCTGAGAAATGCTTCAGCCTAGACTGGCTTGACGAATA-3'

Figura 4. Representação esquemática do pareamento do oligonucleotídeo NP de *Arabidopsis thaliana* na sequência utilizada para desenho dos iniciadores. As regiões em vermelho indicam a região de pareamento do oligonucleotídeo e as setas o sentido da amplificação.

As reações de PCR foram realizadas com amostras de DNA concentradas a 150 ng/μL. Cada reação foi elaborada com 20 μL de volume final. As reações com os oligonucleotídeos NP, AAF e CAA continham 2 U da enzima Taq DNA polimerase, tampão da enzima diluído 1X; 2 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTPs (2'-desoxinucleotídeos 5'-trifosfatos) e 1 μM de oligonucleotídeos. A desnaturação inicial ocorreu a uma temperatura de 95°C por 2 min.; seguida de 34 ciclos de 1min. a 92°C, 1min. na temperatura de anelamento (Tabela 1) e 1,5 min. a 72°C, o ciclo de extensão final ocorreu a 72°C por 4min. Para o oligonucleotídeo CAC, utilizou-se as mesmas condições descritas anteriormente alterando somente a concentração de MgCl₂ (1,5 mM). Para confirmação dos resultados obtidos as amplificações foram realizadas em duplicatas. Os fragmentos gerados foram separados em gel de agarose a 1,0%, corados em solução de brometo de etídeo, visualizados sob iluminação UV em fotodocumentador e comparados ao padrão de tamanho molecular 1 Kb Plus DNA Ladder. Depois de comparados, alguns fragmentos escolhidos foram extraídos do gel e purificados com o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean- UP System (Promega) para clonagem e sequenciamento.

3.4 Clonagens de sequências de interesse

Para a clonagem foram selecionados fragmentos de cada grupo de resistência os quais foram inseridos em vetor plasmidial de *Escherichia coli* (PGEM® T Easy Vector Systems - Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Na reação de ligação de volume final 10 μL foram utilizados 3 μL de inserto, 1 μL de vetor, 1 μL de T4 DNA ligase e 5 μL de tampão de reação 10X,. Em seguida as reações foram incubadas por 20 horas a 4°C. Os produtos gerados foram usados para transformar *E. coli* DH5α competentes por choque elétrico (eletroporação).

A transformação bacteriana foi realizada em 50 μL de células eletrocompetentes às quais foram adicionados 2 μL de reação de ligação. Após 5 min. no gelo as reações foram eletroporadas em equipamento GenePulser (Bio-Rad) a 1,8 kV, 200 Ω. Depois de aplicado o pulso elétrico, as células foram inoculadas em 800 μL de meio de cultura LB e incubadas a 37°C sob agitação (100 rpm) por 1 hora. As bactérias foram então semeadas em meio LB sólido contendo 50 μg/mL de

ampicilina, 0,5 mM de IPTG (isopropiltiogalactosídeo) e 50 mg/mL de X-GAL (5—bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo) e incubadas a 37°C por 16 horas. A clonagem com o vetor PGEM[®]-T Easy envolveu a inativação do gene lacZ' que codifica parte da enzima β -galactosidase. A seleção dos transformantes foi realizada em meio com ampicilina e a identificação dos recombinantes foi possível pela ausência da atividade da β -galactosidase na presença de X-gal. Colônias não recombinantes apresentaram coloração azul, enquanto as recombinantes incapazes de produzir β -galactosidase eram brancas.

Depois de identificadas as colônias transformadas, estas foram cultivadas em meio LB suplementado com ampicilina (100 μ g/mL) por aproximadamente 16 horas a 37°C sob agitação (200 rpm). Para extração de DNA plasmidial utilizou-se o Kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) de acordo com recomendações do fabricante, a análise da presença do inserto foi realizada através da digestão com a endonuclease de restrição (EcoRI, Invitrogen).

3.5 Sequenciamento

Para as reações de sequenciamento foram utilizados 100 ng de DNA plasmidial; 3,0 μ L de tampão de seqüenciamento (200 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH 9.0); 1,0 μ L de BigDye v3.1 (Applied Biosystems); 10 picomoles do oligonucleotídeo iniciador e água bi-destilada estéril para um volume final de 10 μ L. As amostras foram submetidas ao ciclo de desnaturação inicial a uma temperatura de 95°C por 2 min., 34 ciclos de 1min. a 92°C, 1min. na temperatura de anelamento (Tabela 1) e 1,5 min. a 72°C; e extensão final de 4 min. a 72°C. Ao término do ciclo as amostras foram mantidas a 4 °C até início do processo de precipitação. A precipitação foi realizada adicionando-se em cada reação 80 μ L de isopropanol 75%, após 15 min. em temperatura ambiente. Em seguida as reações foram centrifugadas a 4.000 rpm em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich) com rotor para microplacas por 30 min. a 20 °C. Após precipitação do DNA o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas com 200 μ L de etanol 70%, centrifugadas a 4.000 rpm por 10 min. a 20 °C (processo repetido 2 vezes). As amostras foram secadas a vácuo, resuspendidas em 10 μ L de formamida, desnaturadas por 5 min. a

95°C e submetidas ao sequenciamento no sequenciador automático ABI 3100 conforme recomendações do fabricante (Applied Biosystems).

3.6 Análise das sequências

As análises das sequências obtidas da clonagem, assim como retirada de nucleotídeos pertencentes ao vetor, foram realizadas com o auxílio do software Chromas Lite (v. 2.01). Para os alinhamentos de sequências de nucleotídeos, tradução para aminoácidos e alinhamento de sequências de aminoácidos, utilizou-se como ferramenta o aplicativo ClustalW2/EBI disponível no site www.ebi.ac.uk/clustalw/. As sequências de nucleotídeos obtidas com cada oligonucleotídeo foram alinhadas duas a duas com o objetivo de analisar a similaridade entre as mesmas, as sequências que quando alinhadas apresentaram a porcentagem de “score” maior ou igual a 70% foram classificadas como similares, portanto pertencentes ao mesmo grupo de similaridade, enquanto que sequências de “score” menores de 70% foram consideradas como sequências únicas.

As análises de blast foram realizadas com o objetivo de verificar se as sequências clonadas possuíam homologia com proteínas envolvidas no mecanismo de defesa. Os resultados do Blastp foram gerados no NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para cada sequência foram analisados os seis frames possíveis. Como resultados estão apresentados as homologias encontradas relacionadas a mecanismos de defesa de plantas ou, quando ausente, aos menores E-values.

Para análise de regiões conservadas de *R*-genes, foram utilizados trabalhos publicados por VINATZER et al. (2001) de *Malus floribunda*; TRUONG et al. (1997); GRANT et al. (2003) e DIXON et al. (1998) de *Arabidopsis thaliana* cujos resultados apresentaram regiões de proteínas conservadas em espécies utilizadas neste estudo para o desenho de oligonucleotídeos. As sequências molde utilizadas para desenhos dos oligonucleotídeos conforme apresentadas nas Figuras 1 a 4, foram traduzidas em aminoácidos e de acordo com os trabalhos citados acima, foram buscadas as regiões conservadas nestas, quando encontradas, estas foram marcadas a fim de comparação com as sequências clonadas pertencentes a famílias

Rutaceae. Os alinhamentos de aminoácidos foram realizados com os seis frames possíveis de cada sequência de citros e relativos.

IV- RESULTADOS

4.1 Amplificações de sequências

De acordo com os testes realizados com os dezessete oligonucleotídeos, quatro destes (não degenerados) apresentaram resultados de amplificação. Com o oligonucleotídeo CAC o fragmento de aproximadamente 1300 pb foi visualizados em todos os genótipo, exceção para *Zanthoxylum lindelianum* e *Citrus reticulata* Ponkan. Os resultados estão apresentados na Figura 5 e Tabela 2.

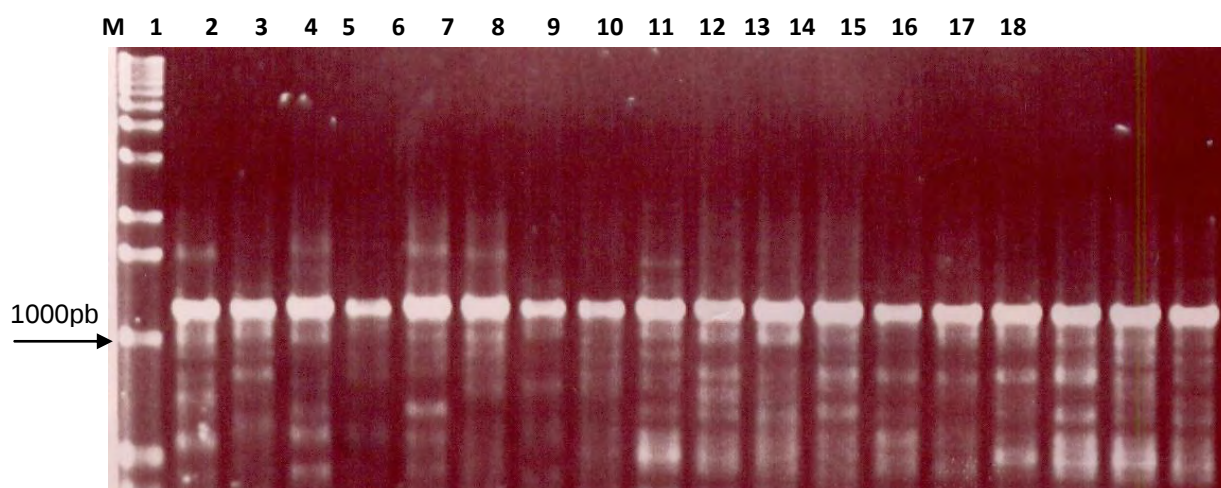


Figura 5. Fragmentos gerados com o oligonucleotídeo CAC (~1300 pb). Amostras de 1 a 8 correspondem a espécie *Citrus reticulata* das variedades Clementina, Emperor, Fremont, Nova, Page, Tangerina Cravo, Temple e Willowleaf, respectivamente; amostras de 9 a 18 correspondem a espécie *Citrus sinensis* das variedades Cadenera, Folha Murcha, Gardner, Laranja Berna, Lima, Midsweet, Moro, Natal, Navelina e Navelina ISA 315. (M) Marcador de massa molecular de 1000 pb (Invitrogen).

Tabela 2. Genótipos de rutáceas, respectivos fenótipos quanto à resistência ao cancro cítrico, e fragmentos amplificados após PCR (em pares de base, pb) com o oligonucleotídeo CAC.

Espécie	Nome comum	Fenótipo	CAC
<i>Zanthoxylum rugosum</i>	<i>Zanthoxylum rugosum</i>		1300
<i>Zanthoxylum lindleyanum</i>	<i>Zanthoxylum lindleyanum</i>	Não hospedeiro	-
<i>Severinia</i> spp.	Severinia		1300*
<i>Murraya</i> spp.	Murta		1300

<i>Citrus nobilis</i>	Rodeking		1300
<i>Fortunella japonica</i>	Kumquat comprido		1300
<i>Fortunella margarita</i>	Kumquat redondo	Altamente resistente	1300*
<i>Citrus mitis</i>	Calamondin variegado		1300
<i>C. unshiu</i>	Satsuma		1300
<i>C. reticulata</i>	Ponkan		-
<i>C. reticulata</i>	Sunki		1300
<i>C. deliciosa</i>	Mexerica do Rio		1300*
<i>C. reticulata</i>	Cleopatra		1300*
<i>C. reticulata</i>	Sunki Maravilha	Resistente	1300
<i>C. reticulata</i>	Sunki Tropical		1300
<i>C. reticulata</i>	Clementina		1300
<i>C. reticulata</i>	Emperor		1300
<i>C. reticulata</i>	Fremont		1300
<i>C. reticulata</i>	Nova		1300
<i>C. reticulata</i>	Page		1300*
<i>C. reticulata</i>	Tangerina Cravo		1300
<i>C. reticulata</i>	Temple		1300
<i>C. reticulata</i>	Willowleaf		1300
<i>C. sinensis</i>	Cadenera	Moderadamente suscetível	1300
<i>C. sinensis</i>	Folha Murcha		1300
<i>C. sinensis</i>	Gardner		1300
<i>C. sinensis</i>	Laranja Berna		1300
<i>C. sinensis</i>	Lima		1300
<i>C. sinensis</i>	Midsweet		1300
<i>C. sinensis</i>	Moro		1300
<i>C. sinensis</i>	Natal		1300
<i>C. sinensis</i>	Navelina		1300*
<i>C. sinensis</i>	Navelina ISA 315		1300
<i>C. sinensis</i>	Salustiana		1300
<i>C. sinensis</i>	Sunstar		1300
<i>C. sinensis</i>	Valencia		1300
<i>Citrus aurantium</i>	Laranja azeda		1300
<i>C. sinensis</i>	lapar 73		1300
<i>Citrus limonia</i>	Limão cravo		1300
<i>C. sinensis</i>	Pera		1300
<i>C. paradisi</i> x <i>P. trifoliata</i>	Citrumelo		1300
<i>C. latifolia</i>	Tahiti		1300*
<i>C. limon</i>	Fino		1300
<i>C. sinensis</i>	Baianinha		1300
<i>C. sinensis</i>	Hamlin		1300
<i>C. sinensis</i>	Marrs		1300
<i>C. sinensis</i>	Navels		1300
<i>C. sinensis</i>	Pineapple	Suscetível	1300
<i>C. sinensis</i>	Rubi		1300
<i>C. sinensis</i>	Seleta Vermelha		1300
<i>C. sinensis</i>	Tarocco		1300
<i>C. sinensis</i>	Westin		1300
<i>Citrus paradisi</i>	Toranja		1300
<i>P. trifoliata</i> X <i>Citrus sinensis</i>	Citrango C-32 SRA		1300*
<i>P. trifoliata</i> X <i>Citrus sinensis</i>	Citrango C-13 SRA		1300
<i>Poncirus trifoliata</i>	David's A		1300
<i>Poncirus trifoliata</i>	Flying Dragon		1300
<i>C. aurantifolia</i>	Galego	Altamente suscetível	1300
<i>C. paradisi</i>	Grapefruit		1300
<i>Citrus medica</i>	Cidra		1300*

*Fragmentos clonados e sequenciados.

Reações com o oligonucleotídeo CAA geraram três fragmentos com tamanhos aproximados de 350, 390 e 650 pb, os quais foram observados nas espécies *Fortunella japonica* e *Citrus mitis*, dois materiais altamente resistentes. Outros dezoito genótipos, pertencentes a todos os grupos de resistência, apresentaram apenas o fragmento de 650 pb (Tabela 3).

Tabela 3. Genótipos de rutáceas, respectivos fenótipos quanto à resistência ao cancro cítrico, e fragmentos amplificados após PCR (em pares de base, pb) com o oligonucleotídeo CAA.

Espécie	Nome comum	Fenótipo	CAA
<i>Zanthoxylum rugosum</i>	<i>Zanthoxylum rugosum</i>		-
<i>Zanthoxylum lindleyanum</i>	<i>Zanthoxylum lindleyanum</i>	Não hospedeiro	-
<i>Severinia</i> spp.	<i>Severinia</i>		-
<i>Murraya</i> spp.	Murta		-
<i>Citrus nobilis</i>	Rodeking		-
<i>Fortunella japonica</i>	Kumquat comprido		350*;390*;650*
<i>Fortunella margarita</i>	Kumquat redondo	Altamente resistente	650
<i>Citrus mitis</i>	Calamondin variegado		350;390;650*
<i>C. unshiu</i>	Satsuma		-
<i>C. reticulata</i>	Ponkan		-
<i>C. reticulata</i>	Sunki		650
<i>C. deliciosa</i>	Mexerica do Rio		-
<i>C. reticulata</i>	Cleopatra		-
<i>C. reticulata</i>	Sunki Maravilha	Resistente	-
<i>C. reticulata</i>	Sunki Tropical		650
<i>C. reticulata</i>	Clementina		-
<i>C. reticulata</i>	Emperor		-
<i>C. reticulata</i>	Fremont		650
<i>C. reticulata</i>	Nova		650
<i>C. reticulata</i>	Page		650
<i>C. reticulata</i>	Tangerina Cravo		-
<i>C. reticulata</i>	Temple		650
<i>C. reticulata</i>	Willowleaf		-
<i>C. sinensis</i>	Cadenera	Moderadamente suscetível	-
<i>C. sinensis</i>	Folha Murcha		650
<i>C. sinensis</i>	Gardner		650
<i>C. sinensis</i>	Laranja Berna		650
<i>C. sinensis</i>	Lima		650
<i>C. sinensis</i>	Midsweet		-
<i>C. sinensis</i>	Moro		-
<i>C. sinensis</i>	Natal		-
<i>C. sinensis</i>	Navelina		-
<i>C. sinensis</i>	Navelina ISA 315		-
<i>C. sinensis</i>	Salustiana		-
<i>C. sinensis</i>	Sunstar		-
<i>C. sinensis</i>	Valencia		-
<i>Citrus aurantium</i>	Laranja azeda		-
<i>C. sinensis</i>	Iapar 73		-
<i>Citrus limonia</i>	Limão cravo		-
<i>C. sinensis</i>	Pera		-
<i>C. paradisi</i> x <i>P. trifoliata</i>	Citrumelo		650
<i>C. latifolia</i>	Tahiti	Resistente	-
<i>C. limon</i>	Fino		650

<i>C. sinensis</i>	Baianinha		-
<i>C. sinensis</i>	Hamlin		-
<i>C. sinensis</i>	Marrs		-
<i>C. sinensis</i>	Navels		650
<i>C. sinensis</i>	Pineapple	Suscetível	-
<i>C. sinensis</i>	Rubi		-
<i>C. sinensis</i>	Seleta Vermelha		-
<i>C. sinensis</i>	Tarocco		-
<i>C. sinensis</i>	Westin		650
<i>Citrus paradisi</i>	Toranja		-
<i>P.trifoliata</i> X <i>Citrus sinensis</i>	Citrango C-32 SRA		-
<i>P.trifoliata</i> X <i>Citrus sinensis</i>	Citrango C-13 SRA		-
<i>Poncirus trifoliata</i>	David's A		-
<i>Poncirus trifoliata</i>	Flying Dragon		650
<i>C. aurantifolia</i>	Galego	Altamente	-
<i>C. paradisi</i>	Grapefruit	suscetível	650
<i>Citrus medica</i>	Cidra		650

*Fragmentos clonados e sequenciados.

Reações com o oligonucleotídeo AAF resultaram em um único fragmento de aproximadamente 1000 pb em genótipos pertencentes a diferentes grupos de resistência, exceção dos altamente suscetíveis (Tabela 4).

Tabela 4. Genótipos de rutáceas, respectivos fenótipos quanto à resistência ao cancro cítrico, e fragmentos amplificados após PCR (em pares de base, pb) com o oligonucleotídeo AAF.

Espécie	Nome comum	Fenótipo	AAF
<i>Zanthoxylum rugosum</i>	<i>Zanthoxylum rugosum</i>		-
<i>Zanthoxylum lindleyanum</i>	<i>Zanthoxylum lindleyanum</i>	Não hospedeiro	-
<i>Severinia</i> spp.	<i>Severinia</i>		-
<i>Murraya</i> spp.	Murta		-
<i>Citrus nobilis</i>	Rodeking		1000
<i>Fortunella japonica</i>	Kumquat comprido		1000
<i>Fortunella margarita</i>	Kumquat redondo	Altamente	1000*
<i>Citrus mitis</i>	Calamondin variegado	resistente	1000*
<i>C. unshiu</i>	Satsuma		-
<i>C. reticulata</i>	Ponkan		-
<i>C. reticulata</i>	Sunki		1000
<i>C. deliciosa</i>	Mexerica do Rio		-
<i>C. reticulata</i>	Cleopatra		1000
<i>C. reticulata</i>	Sunki Maravilha	Resistente	1000
<i>C. reticulata</i>	Sunki Tropical		1000
<i>C. reticulata</i>	Clementina		-
<i>C. reticulata</i>	Emperor		-
<i>C. reticulata</i>	Fremont		-
<i>C. reticulata</i>	Nova		-
<i>C. reticulata</i>	Page	Moderadamente	-
<i>C. reticulata</i>	Tangerina Cravo	suscetível	1000
<i>C. reticulata</i>	Temple		1000
<i>C. reticulata</i>	Willowleaf		-
<i>C. sinensis</i>	Cadenera		-
<i>C. sinensis</i>	Folha Murcha		1000

<i>C. sinensis</i>	Gardner		-
<i>C. sinensis</i>	Laranja Berna		1000
<i>C. sinensis</i>	Lima		-
<i>C. sinensis</i>	Midsweet		1000
<i>C. sinensis</i>	Moro	Moderadamente	-
<i>C. sinensis</i>	Natal	suscetível	1000
<i>C. sinensis</i>	Navelina		1000
<i>C. sinensis</i>	Navelina ISA 315		1000
<i>C. sinensis</i>	Salustiana		1000
<i>C. sinensis</i>	Sunstar		-
<i>C. sinensis</i>	Valencia		-
<i>Citrus aurantium</i>	Laranja azeda		-
<i>C. sinensis</i>	lapar 73		-
<i>Citrus limonia</i>	Limão cravo		-
<i>C. sinensis</i>	Pera		-
<i>C. paradisi</i> x <i>P. trifoliata</i>	Citrumelo		-
<i>C. latifolia</i>	Tahiti		-
<i>C. limon</i>	Fino		-
<i>C. sinensis</i>	Baianinha		-
<i>C. sinensis</i>	Hamlin		-
<i>C. sinensis</i>	Marrs		-
<i>C. sinensis</i>	Navel		1000
<i>C. sinensis</i>	Pineapple	Suscetível	-
<i>C. sinensis</i>	Rubi		-
<i>C. sinensis</i>	Seleta Vermelha		-
<i>C. sinensis</i>	Tarocco		-
<i>C. sinensis</i>	Westin		-
<i>Citrus paradisi</i>	Toranja		-
<i>P. trifoliata</i> X <i>Citrus sinensis</i>	Citrange C-32 SRA		1000
<i>P. trifoliata</i> X <i>Citrus sinensis</i>	Citrange C-13 SRA		-
<i>Poncirus trifoliata</i>	David's A		-
<i>Poncirus trifoliata</i>	Flying Dragon		-
<i>C. aurantifolia</i>	Galego	Altamente	-
<i>C. paradisi</i>	Grapefruit	suscetível	-
<i>Citrus medica</i>	Cidra		-

*Fragmentos clonados e sequenciados.

A reações com o oligonucleotideo NP geraram três fragmentos com tamanhos aproximados de 300, 500 e 650 pb. Vinte genótipos, a maioria deles da espécie *Citrus sinensis*, apresentaram um fragmento de aproximadamente 500 pb. Esse fragmento, e outro de 650 pb, foram observados para as espécies *Citrus nobilis* e *Fortunela margarita*; *Citrus sinensis* (Gardner e Pera) e *Citrus aurantium*, altamente resistentes e moderadamente suscetível, respectivamente. Um terceiro perfil, com fragmentos de 300 e 500 pb, foi observado nas reações de PCR com a espécie *Citrus sinensis* (laranjas Berna, Midsweet, Moro e Westin). Fragmentos de 650 pb não foram observados nos grupos classificados como resistentes, suscetível e altamente suscetível, enquanto que fragmentos de 300 pb não foram amplificados em espécies dos grupos altamente resistente, resistente e altamente suscetível. O

oligonucleotídeo NP não apresentou amplificações no grupo resistente. Três genótipos apresentaram fragmentos em reações com os quatro oligonucleotídeos: *Fortunella margarita*, do grupo altamente resistente e *Citrus sinensis* das variedades Berna e Navels, dos grupos moderadamente suscetível e suscetível, respectivamente. Outros dois materiais não apresentaram fragmentos amplificados em quaisquer das reações realizadas: *Zanthoxylum lindleyanum* e *Citrus reticulata* Ponkan, ambos pertencentes ao grupo altamente resistente. Os resultados podem ser verificados na Tabela 5.

Tabela 5. Genótipos de rutáceas, respectivos fenótipos quanto à resistência ao cancro cítrico, e fragmentos amplificados após PCR (em pares de base, pb) com o oligonucleotídeo NP.

Espécie	Nome comum	Fenótipo	NP
<i>Zanthoxylum rugosum</i>	<i>Zanthoxylum rugosum</i>	Não hospedeiro	-
<i>Zanthoxylum lindleyanum</i>	<i>Zanthoxylum lindleyanum</i>		-
<i>Severinia</i> spp.	<i>Severinia</i>		-
<i>Murraya</i> spp.	Murta		-
<i>Citrus nobilis</i>	Rodeking	Altamente resistente	650; 500
<i>Fortunella japonica</i>	Kumquat comprido		-
<i>Fortunella margarita</i>	Kumquat redondo		650; 500
<i>Citrus mitis</i>	Calamondin variegado		-
<i>C. unshiu</i>	Satsuma		-
<i>C. reticulata</i>	Ponkan		-
<i>C. reticulata</i>	Sunki		-
<i>C. deliciosa</i>	Mexerica do Rio	Resistente	-
<i>C. reticulata</i>	Cleopatra		-
<i>C. reticulata</i>	Sunki Maravilha		-
<i>C. reticulata</i>	Sunki Tropical		-
<i>C. reticulata</i>	Clementina	Moderadamente suscetível	-
<i>C. reticulata</i>	Emperor		-
<i>C. reticulata</i>	Fremont		-
<i>C. reticulata</i>	Nova		-
<i>C. reticulata</i>	Page		-
<i>C. reticulata</i>	Tangerina Cravo		-
<i>C. reticulata</i>	Temple		-
<i>C. reticulata</i>	Willowleaf		-
<i>C. sinensis</i>	Cadenera		500
<i>C. sinensis</i>	Folha Murcha		500
<i>C. sinensis</i>	Gardner		650*; 500*
<i>C. sinensis</i>	Laranja Berna		500*; 300*
<i>C. sinensis</i>	Lima		500
<i>C. sinensis</i>	Midsweet		500; 300
<i>C. sinensis</i>	Moro		500; 300
<i>C. sinensis</i>	Natal		500
<i>C. sinensis</i>	Navelina		-
<i>C. sinensis</i>	Navelina ISA 315		500
<i>C. sinensis</i>	Salustiana		500
<i>C. sinensis</i>	Sunstar		500
<i>C. sinensis</i>	Valencia		500
<i>Citrus aurantium</i>	Laranja azeda		650*; 500*

<i>C. sinensis</i>	lapar 73	Moderadamente	500
<i>Citrus limonia</i>	Limão cravo	suscetível	-
<i>C. sinensis</i>	Pera		650*; 500*
<i>C. paradisi</i> x <i>P. trifoliata</i>	Citrumelo		-
<i>C. latifolia</i>	Tahiti		-
<i>C. limon</i>	Fino		-
<i>C. sinensis</i>	Baianinha		500
<i>C. sinensis</i>	Hamlin		500
<i>C. sinensis</i>	Marrs		500
<i>C. sinensis</i>	Navels		500
<i>C. sinensis</i>	Pineapple	Suscetível	500
<i>C. sinensis</i>	Rubi		500
<i>C. sinensis</i>	Seleta Vermelha		500
<i>C. sinensis</i>	Tarocco		500
<i>C. sinensis</i>	Westin		500; 300
<i>Citrus paradisi</i>	Toranja		500
<i>P.trifoliata</i> X <i>Citrus sinensis</i>	Citrange C-32 SRA		500*
<i>P.trifoliata</i> X <i>Citrus sinensis</i>	Citrange C-13 SRA		-
<i>Poncirus trifoliata</i>	David's A		-
<i>Poncirus trifoliata</i>	Flying Dragon		-
<i>C. aurantifolia</i>	Galego	Altamente	-
<i>C. paradisi</i>	Grapefruit	suscetível	500*
<i>Citrus medica</i>	Cidra		-

*Fragmentos clonados e sequenciados.

Vinte e cinco fragmentos foram escolhidos para clonagem conforme indicado na Tabela 2, oito pertencentes ao grupo altamente resistente, dois deles do resistente, dez deles do grupo moderadamente suscetível, três do suscetível e dois do grupo altamente suscetível, para fins de comparação. Os 25 fragmentos selecionados geraram 49 clones sequenciados; sendo 16 clones com o oligonucleotídeo CAC, seis com CAA, três com AAF e 24 com NP.

4.2 Análises das sequências

Todas as sequências de nucleotídeos obtidas em reações com os mesmos oligonucleotídeos foram comparadas entre si. As porcentagens de similaridade entre as sequências, comparadas duas a duas, estão apresentadas nas Tabelas 6 a 8, exceto os resultados de AAF. Para as sequências obtidas de fragmentos gerados com o oligonucleotídeo CAC, CAA e NP observaram-se similaridades que variaram de 1 a 100%.

Dos clones obtidos após amplificação com CAC três grupos de similaridades foram formados com mais de um clone cada, oriundos dos seguintes genótipos: 1) *Citrus mitis*, *Murraya* spp., *Citrus nobilis* var. *deliciosa* e *Citrus reticulata* Cleopatra

com similaridades de 98 e 99%; 2) *Citrus reticulata* Cleopatra e Page com similaridade de 96%; e 3) *Citrus reticulata* Cleopatra, *Citrus sinensis* Navelina, *Citrus latifolia*, *Poncirus trifoliata* Citrange C-32 SRA e *Citrus medica*, com similaridades de 97 a 100% (Tabela 6 e Fig. 6). Outras três sequências se apresentaram com similaridades de 1 e 5%, originadas dos genótipos *C. reticulata* Cleopatra e *Poncirus trifoliata* Citrange C-32 SRA.

Tabela 6. Clones sequenciados após amplificação com o oligonucleotídeo CAC e similaridades (%) nas comparações das sequências de todos os clones, dois a dois. Os números inteiros de cada clone correspondem ao genótipo de origem: 2 a *Citrus mitis*, 4 a *Murraya* spp, 5 a *Citrus deliciosa*, 6 a *Citrus reticulata* Cleopatra, 7 a *Citrus reticulata* Page, 8 a *Citrus sinensis* Navelina, 10 a *Citrus limonia* Tahiti, 11a *Poncirus trifoliata* Citrange C32 SRA e 13 a *Citrus medica* Cidra do Comércio.

	2.2	4.1	5.2	6.1	6.2	6.3	6.4	7.2	8.1	10.1	11.1	11.2	11.3	13.1	13.2	13.3
2.2	-															
4.1	98	-														
5.2	98	99	-													
6.1	1	1	2	-												
6.2	1	1	1	2	-											
6.3	98	99	98	3	1	-										
6.4	1	1	1	3	1	1	-									
7.2	1	2	1	96	5	5	5	-								
8.1	1	1	1	3	1	1	99	5	-							
10.1	1	1	1	2	1	1	97	2	97	-						
11.1	1	1	2	2	1	1	3	2	3	1	-					
11.2	2	1	1	3	1	1	2	3	1	1	4	-				
11.3	1	1	1	3	1	1	99	5	99	97	3	1	-			
13.1	1	1	1	2	1	1	98	2	98	99	1	1	97	-		
13.2	1	1	1	2	1	1	98	2	98	99	1	1	97	99	-	
13.3	1	1	1	2	1	1	98	2	98	99	1	1	97	100	99	-

Similaridade CAC

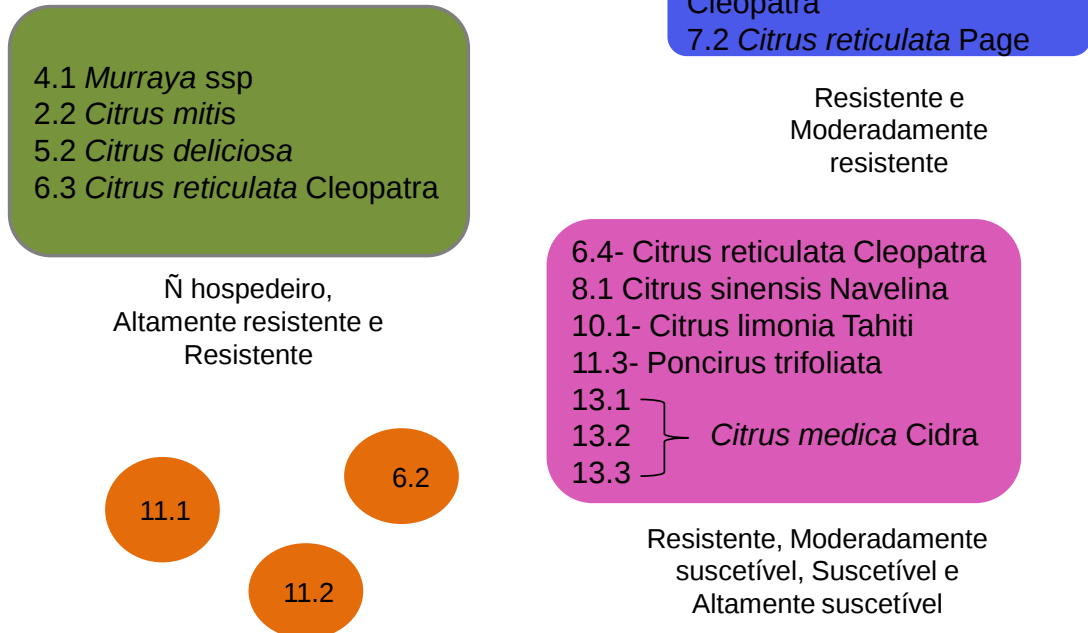


Figura 6. Ilustração dos grupos formados em relação à similaridade das sequências obtida com o oligonucleotídeo CAC.

Três sequências clonadas de *Fortunella japonica* após amplificação com CAA apresentaram-se similaridades de 94 a 99%, enquanto sequências de outros clones de *Fortunella japonica* e *Citrus mitis* apresentaram-se com similaridades de 3 a 8% (Fig 7 e Tabela. 7).

Similaridade CAA

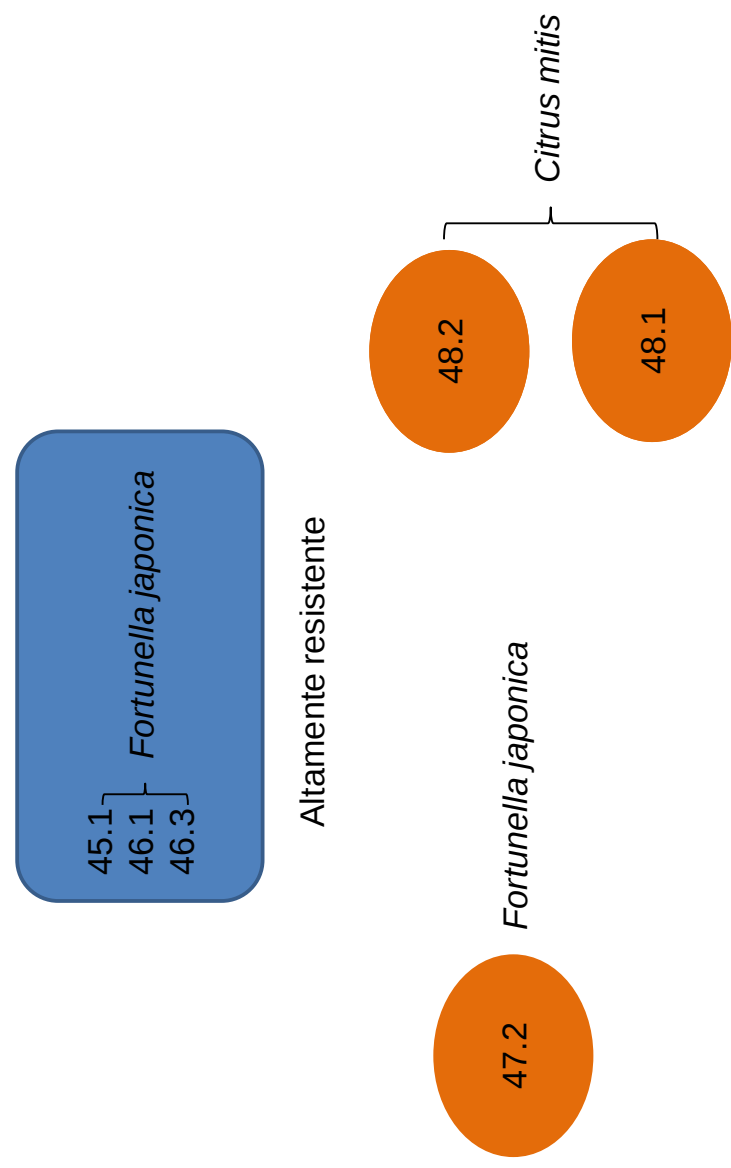


Figura 7. Ilustração dos grupos formados em relação à similaridade das sequências obtidas com o oligonucleotídeo CAA.

Tabela 7. Clones sequenciados após amplificação com o oligonucleotídeo CAA e similaridades (%) nas comparações das sequências de todos os clones, dois a dois. Os números inteiros de cada clone correspondem ao genótipo de origem: 45 a 47 a *Fortunella japonica* e 48 a *Citrus mitis*.

	45.1	46.1	46.3	47.2	48.1	48.2
45.1	-					
46.1	99	-				
46.3	94	94	-			
47.2	6	6	4	-		
48.1	3	4	5	7	-	
48.2	8	8	3	5	5	-

As três sequências clonadas de *Fortunella margarita* e *Citrus mitis* após amplificação com AAF apresentaram similaridades inferiores a 3%.

As sequências dos clones gerados com NP foram agrupadas em: 1) *Citrus sinensis* Gardner, *Citrus sinensis* Pera e *Citrus aurantium* com similaridades de 77 a 100%; 2) *Citrus sinensis* Gardner e *Citrus sinensis* Pera com similaridades de 99 e 100%; 3) *Citrus sinensis* Laranja Berna, *Citrus aurantium*, *Poncirus trifoliata* Citrange C-32 e *Citrus paradisi* com similaridades de 95 e 99%; e 4) *Citrus sinensis* Laranja Berna, *Poncirus trifoliata* Citrange C-32 e *Citrus paradisi* com similaridades de 100% (Fig. 8 e Tabela 8). Outras sequências de *Citrus sinensis* Gardner e *Citrus sinensis* Berna apresentaram similaridades de 3 a 21% entre sequências.

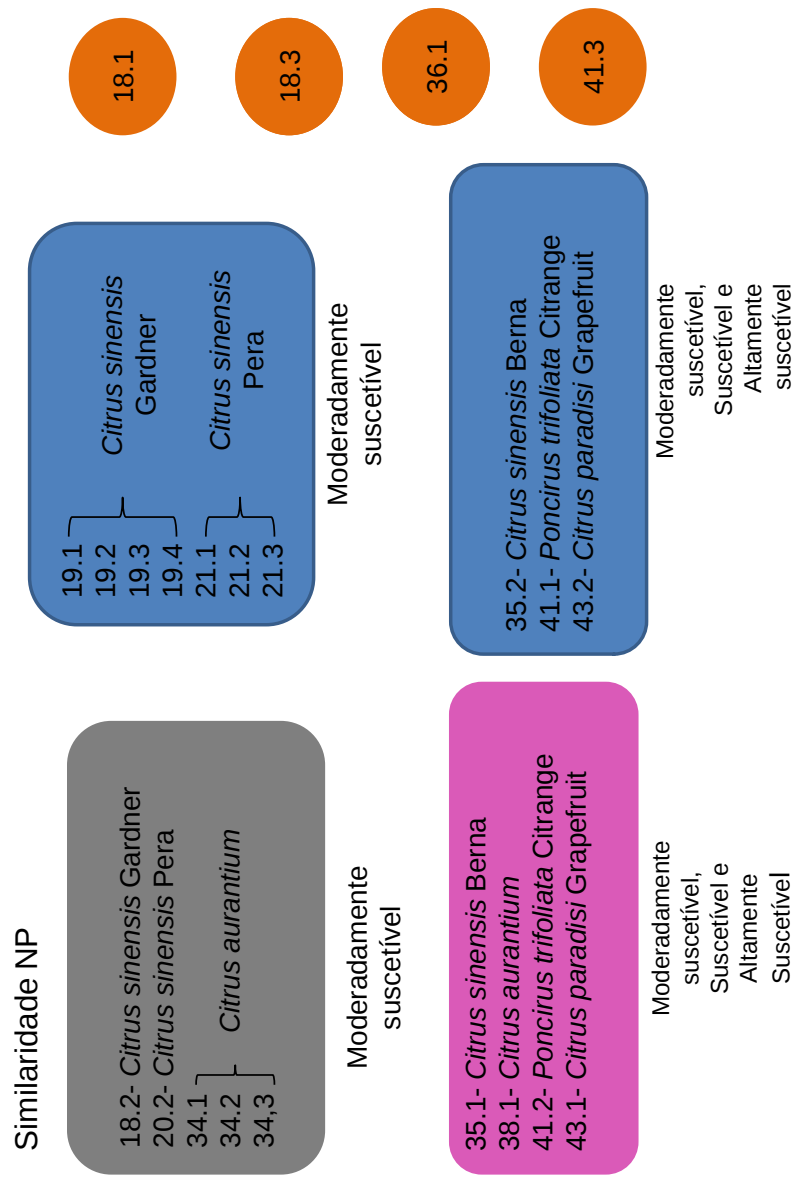


Figura 8. Ilustração dos grupos formados em relação à similaridade das sequências obtidas com o oligonucleotídeo NP.

Tabela 8. Clones sequenciados após amplificação com o oligonucleotídeo NP e similaridades (%) nas comparações das sequências de todos os clones, dois a dois. Os números inteiros de cada clone correspondem ao genótipo de origem: 18 e 19 a *Citrus sinensis* Gardner; 20 e 21 a *Citrus sinensis* Pera; 34 e 38 a *Citrus aurantium*; 35 e 36 a *Citrus sinensis* Berna; 41 a *Poncirus trifoliata* Citrange C-32 SRA e 43 a *Citrus paradisi* Grapefruit.

	18.1	18.2	18.3	19.1	19.2	19.3	19.4	20.1	20.2	21.1	21.2	21.3	34.1	34.2	34.3	35.1	35.2	36.1	38.1	41.1	41.2	41.3	43.1
18.1	-																						
18.2	3	-																					
18.3	6	10	-																				
19.1	13	12	22	-																			
19.2	16	14	24	99	-																		
19.3	13	12	20	99	99	-																	
19.4	13	12	20	99	99	99	-																
20.1	5	77	7	4	11	4	4	-															
20.2	3	91	8	14	16	14	14	86	-														
21.1	13	12	20	99	99	99	99	4	14	-													
21.2	13	12	20	99	99	100	99	4	14	99	-												
21.3	13	12	20	100	99	100	99	4	14	99	99	-											
34.1	3	90	8	12	14	12	12	86	97	12	12	12	-										
34.2	3	90	6	15	17	15	15	86	98	15	15	15	99	-									
34.3	2	90	8	15	18	15	15	86	98	15	15	15	99	99	-								
35.1	3	3	10	4	5	4	4	4	3	4	4	4	3	3	11	-							
35.2	3	4	4	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-						
36.1	5	12	6	6	21	6	6	12	12	6	6	6	6	6	17	6	6	-					
38.1	3	4	7	4	7	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	95	4	6	-				
41.1	3	4	4	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	100	6	4	-			
41.2	4	4	3	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	99	4	6	99	4	-		
41.3	2	2	5	3	3	3	3	6	2	3	3	3	2	2	5	6	5	3	5	5	5	-	
43.1	4	4	3	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	99	4	6	99	4	99	5	-
43.2	3	4	4	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	100	6	4	100	4	5	4

De acordo com os resultados do blastp realizado para verificar a possível homologia das sequências obtidas da família Rutaceae, com proteínas envolvidas na defesa, algumas das sequências obtidas após amplificação com CAC, AAF e NP, quando traduzidas para os seis possíveis frames, apresentaram homologia a proteínas envolvidas na resistência de plantas a patógenos como EIX2 (Ron & Avni, 2004), proteína quinase e NBS-LRR. Essas sequências foram obtidas após reações de amplificação de genótipos de diferentes grupos de resistência (desde altamente resistentes até altamente suscetíveis). Outras sequências apresentaram homologia com proteínas envolvidas com transporte trans-membrana de purina (ATPUP4), diferenciação de tecidos (PWWP) e proteínas ligadas a estresse abiótico (AN1), além de outras com similaridade a proteínas desconhecidas ou sem confirmação biológica. Esses resultados podem ser verificados na tabela 9.

Para buscar regiões de proteínas de resistência conservadas nas sequências obtidas da família Rutaceae, primeiramente essas regiões foram encontradas nas sequências moldes (utilizada para o desenho dos oligonucleotídeos), dentro das regiões de amplificação, conforme ilustrado na figura 9. Devido à região de pareamento dos oligonucleotídeos, apenas na sequência de *Malus floribunda* foi possível encontrar regiões conservadas. Cada sequência de Rutaceae foi traduzida para os seis frames e comparada com a região de amplificação da sequência molde. As comparações das sequências de aminoácidos traduzidos revelaram a existência de regiões conservadas reconhecidas em R-genes do tipo LRR com domínio trans-membrana, como por exemplo, *Cf-9* de tomate (*Lycopersion esculentum*). Nas Figuras 10 a 12 estão ilustradas as regiões conservadas das sequências obtidas nesse estudo.

Tabela 9. Resultados da comparação tipo blastp para as sequências de clones de Rutáceas amplificadas com os oligonucleotídeos CAC, CAA, NP e AAF.

Clones	Genótipo	Oligonucleotídeo	Homologia	Espécie homóloga	E-valor	Acesso (GenBank)
2.1	<i>Citrus mitis</i>	CAC	ATPUP4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5E-104	NP_564365.1
4.1	<i>Murraya spp.</i>	CAC	ATPUP4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-46	NP_564365.1
5.1	<i>Citrus nobilis</i>	CAC	ATPUP4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3E-47	NP_564365.1
6.3	<i>Citrus reticulata</i>	CAC	ATPUP4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3E-53	NP_564365.1
6.1	<i>Citrus reticulata</i>	CAC	AN1	<i>Solanum pennellii</i>	3E-37	ACM68458.1
7.2	<i>Citrus reticulata</i>	CAC	AN1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4E-47	NP656844.1
6.4	<i>Citrus reticulata</i>	CAC	EIX2	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2E-53	AAR28378.1
8.1	<i>Citrus sinensis</i>	CAC	EIX2	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1E-07	AAR28378.1
10.1	<i>Citrus latifolia</i>	CAC	EIX2	<i>Lycopersicon esculentum</i>	3E-14	AAR28378.1
11.3	<i>Poncirus trifoliata</i>	CAC	EIX2	<i>Lycopersicon esculentum</i>	3E-47	AAR28378.1
13.1	<i>Citrus medica</i>	CAC	EIX2	<i>Lycopersicon esculentum</i>	3E-47	AAR28378.1
13.2	<i>Citrus medica</i>	CAC	EIX2	<i>Lycopersicon esculentum</i>	3E-47	AAR28378.1
13.3	<i>Citrus medica</i>	CAC	EIX2	<i>Lycopersicon esculentum</i>	3E-47	AAR28378.1
6.2	<i>Citrus reticulata</i>	CAC	Proteína hipotética	<i>Oryza sativa</i>	6E-19	EEE60061.1
11.1	<i>Poncirus trifoliata</i>	CAC	PWWP	<i>Medicago truncatula</i>	2E-34	ABN08037.1
11.2	<i>Poncirus trifoliata</i>	CAC	ATPU4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-14	NP_564365.1
46.3	<i>Fortunella japonica</i>	CAA	Proteína hipotética	<i>Populus trichocarpa</i>	1E-09	XP_002300320.1
47.1	<i>Fortunella japonica</i>	CAA	Proteína hipotética	<i>Populus trichocarpa</i>	5E-17	XP_002308834.1
48.1	<i>Citrus mitis</i>	CAA	WD-40	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2E-32	NP_182078.1
48.2	<i>Citrus mitis</i>	CAA	Proteína hipotética	<i>Populus trichocarpa</i>	2E-09	XP_002300320.1
46.1	<i>Fortunella margarita</i>	CAA	-	-	-	-
22.1	<i>Fortunella margarita</i>	AAF	Serine/Theonina Kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-22	AAF75093.1
23.2	<i>Citrus mitis</i>	AAF	Proteína hipotética	<i>Vitis vinifera</i>	5E-52	XP_002272332.1
18.1	<i>Citrus sinensis</i>	NP	-	-	-	-
18.2	<i>Citrus sinensis</i>	NP	-	-	-	-
18.3	<i>Citrus sinensis</i>	NP	-	-	-	-
19.1	<i>Citrus sinensis</i>	NP	-	-	-	-
20.1	<i>Citrus sinensis</i>	NP	-	-	-	-
20.2	<i>Citrus sinensis</i>	NP	-	-	-	-
21.1	<i>Citrus sinensis</i>	NP	-	-	-	-
34.1	<i>Citrus aurantium</i>	NP	-	-	-	-
35.1	<i>Citrus sinensis</i>	NP	NBS-LRR	<i>Musa textilis</i>	0.5	CAP66362.1
35.2	<i>Citrus sinensis</i>	NP	-	-	-	-
36.1	<i>Citrus sinensis</i>	NP	Proteína hipotética	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7.7	BAE99711.1
38.1	<i>Citrus aurantium</i>	NP	NBS-LRR	<i>Musa textilis</i>	0.5	CAP66362.1
41.1	<i>P. trifoliata</i> X. <i>Csinensis</i>	NP	-	-	-	-
41.2	<i>P. trifoliata</i> X. <i>Csinensis</i>	NP	-	-	-	-
41.3	<i>Poncirus trifoliata</i>	NP	Proteína hipotética	<i>Oryza sativa</i>	9E-05	EAY85527.1
43.1	<i>Citrus paradisi</i>	NP	-	-	-	-
43.2	<i>Citrus paradisi</i>	NP	-	-	-	-

MERTMRVVILLTRFLAIATITFSIGLCNGNPGWPPPLCKESERQALLMFKQD
 LKDPTNRLASWVAEEDSDSDCCSWTGVVCDHTTGHIHELHLNNTDPFLD
 LKSSFGGKINPSLLSLKHLNFLDLSNNYFYPTQIPSFSGMTSLTHLNLAYSRF
 GGIIPHKLGNLSSLRYLNLSNSIYLKVENLQWISGLSLLKHLDLSGVNLKA
 SDWLQVTNMLPSLVKLIMSDCQLYQIPPLPTTNFTSLVVLDLSFNNFNLSM
 PRWVFSKLNLSIHLSDCGFQGPISISQNITYLREIDLSDNNFTVQRPSEIF
 ELSRCGPDGIKSLSRNTNVSGHIPMSLRNLSSLEKLDISVNQFNGTFTTEVI
 GQLKMLTYLDISYNSLESAMSEVTFSNLTKLKNFVAKGNSLTLTSTRDWVP
 PFQLEILHLDLSDWHLGPKWPMWLRTQTQLKELSLSGTGISSTIPTWFWNLT
 SQVEYLNLSRNQLYGQIQNIVAGPSSVVDLSSNQFTGALPIVPTSLFFLDLSR
 SSFSESVFHFFCDRPDEPKQLSVNLGNLLTGKVPDCWMSWQHRLFLNL
 ENNNLTGNVPMMSMGYLQYLGSLLHRLNNHLYGELPHSLQNCTWLSVVDLS
 ENGFSGSIPIWIGKSLSGNLVNLNLSNKFEGDIPNEVCYLKSLQILDLAHNKL
 SGMIPRCFHNLSALADFSESYFPTSYWGTNWSSELSNAILVTKGIEMEYSKI
 LGFVKVMDLSCNFMYGEIPEELTGLLALQSLNLSNNRFTGRIPSNIGNMA
 WLESDFSMNQLDGEIPPSMTNLTFLSHLNLNNLTGRIPE **STQLQSLDQ**
SSFVGNKLCGAPLNKNCS **TNGVIPPPTVEQDGGGGYR** **LLEDEW** **FVSLGV**
GFFTGF **WIVLGSLLVNMPWSILLSQLLN** **RIVLKM** **YHV** **IVEYV**

Figura 9. Sequência molde de *Malus floribunda* traduzida em aminoácidos, as regiões em preto e vermelho correspondem a região de amplificação do oligonucleotídeo CAC, as regiões em vermelho correspondem as proteínas conservadas encontradas.

A	LNLSYNNLTGRIPE	STQLQSLDQSS	SSFVGNKLCGAPLNKNCS	TNGVIPPPTVEQDGGGGYR	240					
B	LNL-LCNLAIFTTAVT	T	NOFLTPVKKLVVSMSPRTFHSAAESPKSNIETKNQTHVKSESY		182					
C	SST-FFAIWQYSPPLSRKTNFH	QSR	SWYRCL	QELFT----NKVPQN	Q	QNPTKPRIKLTNP	181			
D	PEP-SLQFGNIHHRCHVKPIFD	TSQE	VGSIDVSKNFSLIKCRRIPKIQHRNQESNSRKIR				188			
E	MDLSYNNLSGKIPSGT	QLO	SFST	SMYAGNEL	LCGLPLPNK	CP	EDSAP	EG	EGKDDANTSEDE	200
F	CHG--LVIQQLVRQNSVGHS	T	SELQHFNVCWKTLRPPTSK-VSRRLSSRSRQRCKHFRRG							187
G	CHT--TTCPAKFRRALNFRASALQCMLEMNFAASHFQISVQMKTQLQVQAKM-MQTLQKM									190
H	SST-FFAIWQYSPPLSRKTNFH	QSR	SCSIDVSKNFSLIK	CRRIPQ	Q	QQR-NQESNSRKIR				182
I	PEP-SLQFGNIHHRCHVKPIFD	TSQE	VVSMSPRTFHSAAESPKSNKETKNQ--TPVKSE							184
J	LNL-LCNLAIFTTAVT	T	NOFLTPVKKLYRCL	QELFT	NK	VQPQNPPNPTKKPRIKLTNPRVI				185
L	CHG--LVIQQLVRQNSVGHS	T	SELQHFNVCWKTLRPPTSK-VSRRLSSRSRQRCKHFRRG							186
M	CHT--TTCPAKFRRALNFRASALQCMLEMNFAASHFQISVQMKTQLQVQAKM-MQTLQKM									190
N	MDLSYNNLSGKIPSGT	QLO	SFST	SMYAGNEL	LCGLPLPNK	CP	EDSAP	EG	EGKDDANTSEDE	200
O	SST-FFAIWQYSPPLSRKTNFY	QSR	SCSTDVSKNFSLIK	CHRIPR	Q	QQR-NQESNSRKIR				187
P	PEP-SLQFGNIHHRCHVKPIFD	TSQE	VVLSMSPRTFHSATESPESNKETKNQ--THVKSE							181
Q	LNL-LCNLAIFTTAVT	T	NOFLIPVKKLY-CL	QELFT	NK	VQPQNPPNPTKKPRIKLTNPRVI				179

R CHG--LVIQQQLVRQNSVGHSTPGLQHFNCWKTLPPTSKSVQMKTQLQVQAKMMTLQKM 187
 S CHT--TTCPAKFRRALNSRASALQCMLEMNFAASHFQKCPEDSAPGEGKDD-VNTSEDE 190
 T MDLSYNNLSGKIPSGTQQLQGFSTSMYAGNELCGLPLPKVSRRLSSRS---RQRCKHFRRG 197
 U SST-FFAIWQYSPPLSRKTNFHQSRWYRCLQELFT----NKVPQIPKS-TRTQIKLTNP 178
 V PEP-SLQFGNIHHRCHVKPIFDTSQEVGSDVSKNFSFLIKCRRSPNPQEPS--NSRKIR 184
 Y LNL-LCNLAIFTTAVT-NQFLTPVKKLVSMSPRTFHSAAD--PQTHKNPDQTHVKSESY 183
 Z CHG--LVIQQQLVRQNSVGHSTSELQHFNCWKTLPPTSK-VSRRLSSRSRQRCKHFRRG 186
 X CHT--TTCPAKFRRALNFRASALQCMLEMNFAASHFQISVQMKTQLQVQAKM-MQTLQKM 190
 W MDLSYNNLSGKIPSGTQQLQSFSTSMYAGNELCGLPLPNKCPEDSAPGEGKDDANTSEDE 200
 AA SST-FFAIWQYSPPLSRKTNFYQSRSCSTDVSKNFSFLIKCHRIPRIQQR-NQESNSRKNP 187
 AB PEP-SLQFGNIHHRCHVKPIFDTSQEVVVPMSPRTFHSATESPESNKETKNQ--THVKIR 181
 AC LNL-LCNLAIFTTAVT-NQFLIPVKKLYRCLQELFTNKVPQNPQNPTKKPRIKLTKSESY 180
 AD CHG--LVIQQQLVRQNSVGHSTPGLQHFNCWKTLPPTSK-VSRRLSSRSRQRCKHFRRG 186
 AE CHT--TTCPAKFRRALNSRASALQCMLEMNFAASHFQISVQMKTQLQVQAKM-MQTLQKM 190
 AF MDLSYNNLSGKIPSGTQQLQGFSTSMYAGNELCGLPLPNKCPEDSAPGEGKDDANTSEDE 200

A -LLEDEWFYVSLGVGFFTGFWIVLGSLLVNMPWSILLSQLLN---RIVLK---MYHVIV 292
 B KILIFSVCIIFAWTWSVFIWTLIWKEAAKFISSIHSAEALKLSARRNFAGQVVQVHD 242
 C RVINSSSSEVFASSLPGPGAESSSGHLFGSGRPQSSFPAYIEVLK-LSVPDGILPDKLLY 240
 D ELIDPHLLKCLHHLCLDLELSLHLDITYLEVGGRKVHFQHTLKCSSEVECPTEFCRTSCCM 248
 E DQFITLGFYVSLILGFFVGFWGFCGTLIVKSSWRHRYYQLLDWCQKLVLKRDSGGEYCQIA 260
 F SIYN-SRILREFDSWFLCWILGILRHFISE--KFLETSSILPTSLVSKIGFTQRWILPNCK 244
 G RINLLSDFTVFLVS--MLDFG--DSAAIYKVLGDIIDTTNFLTGVKNWFYVTAVVNIAKLQ 246
 H EFINSSSSEVFASSLPGPGAESSSGHLFGSGRPQSSFPAYIEVLK-LSVPDGILPDKLLY 241
 I ELIDPHLLKCLHHLCLDLELSLHLDITYLEVGGRKVHFQHTLKCSSEVECPTEFCRTSCCM 244
 J KILIFSVCIIFAWTWSVFIWTLIWKEAAKFISSIHSAEALKLSARRNFAGQVVQVHD 245
 L SIYKLSDFTVGVFLVSLD--LGDSAAIY----KVLGDIIDTTSLVSKIGFTQRWILPNCK 240
 M RINLTGIFYGSLILGFFVGFWGFCGTLIVKSSWRHRYYNFLTGVKNWFYVTAVVNIAKLQ 250
 N DQFINSRILREFDSWFLCWILGILRHFISEKFLETSSILQLLDWCQKLVLKRDSGGEYCQIA 260
 O ELIDPHLLKCLHH-LCLDLELSLHLDITFGSGRPQSSFPAYIEVLKPWSVPDGILPDKLLY 246
 P SYK--LILIFSUYIIFAWTWSVFIWTLLEVGGRKVHFQHTLKCSPGVECPTEFCRTSCCM 239
 Q NSSSSEVFTSSLPGPGAESSSGHFWKEAAKFISSIHSAEALSLARRNFAGQVVQVHD 239
 R RINLLSDFTVFLVSLD--SGDSAAIY----KVLGDIIDTTSLVSKIGFTQRWILPNCK 240
 S DQFITLGFYVSLILGFFVGFWGFCGTLIVKSSWRHQYYNFLTGIKNWFYVTAVVNIAKLQ 250
 T SIYNSR-ILREFDSWFLCWILGILWHFISEKFLETSSVLQLLDWYQKLVLRDSDSGGEYCQIA 256
 U RVINSSSSEVFASSLPGPGAESSSGHLFGSGRPQSSFPAYIEVLK-LSVPDGILPDKLLY 237
 V ELIDPHLLKCLHHLCLDLELSLHLDITYLEVGGRKVHFQHTLKCSSEVECPTEFCRTSCCM 244

X KILIFSVCIIFAWTWSVFIWTLIWKEAAKFIS^{SIHS}SAEALKLSARRNFAGQVVVQ^{VHD} 243
 Z SIYN-SRILREFDL^GSCG--FGD^LRHFISE--KFLET^SILPTSLVSKIGFTQRWILPNCK 241
 Y RINLLSDE^T---VSG^FLWIWG---SAALYKVLGDIDTTF^LTGVKNWFYVTAVVNIAKLQ 244
 W DQFITLGE^{FYVSL}-IWVLVDLG-ICG^TLLVKSS^{WRHRY}Q^{LL}DWCQKL^{VLR}DSGGEY^{CQTA} 258
 AA RVINSSSSE^VFASSLPGP^GAESSSG^HLFGSGRPQSSFPAYIEVLKPWSVPDGILPKLLY 247
 AB ELIDPHLLKCLHHLCLDLELSLH^LDTY^LEVGGRKVHFQHT^LKCSPGVECPTEFCRTSCCM 241
 AC KILIFSVCIIFAWTWSVFIWTLIWKEAAKFIS^{SIHS}SAEAL^{ELS}SARRNFAGQVVVQ^{VHD} 240
 AD SIYNSRI^FT-VFL^VSLLD--SGDSVAL^Y----KVLGDIGTTTSLVSKIGFTQRWILPNCK 239
 AE RINLLSDE^{FYVSL}ILG^{FF}V^{GFW}GFC^TLLVKSS^{WRHRY}N^FL^TGIKNWFYVTAVVNIAKLQ 250
 AF DQFITLGE^FLREFDSW^FLCWILGILWHFISEKFLET^SVL^QLLDWYQKL^{VLR}DSGGEY^{CQTA} 260

A EYV----- 295
 B TKTTQLRKARNASEKLISRQIEEIQR-----FLTNLWSNLSSSVSKIQGNQSRKIHNL 296
 C DKSMTLRRLNERLEGMLPKNF^LDKSRKSKDFNP^IFGVICPVKVFLERFKAINPARSIISS 300
 D TSPHDDSTEKGLKECFRKTDF^TNRGN-PKILTDQSLEFVQLK^CFLKDSRQSIP-QDPSLL 306
 E KKV^QELIGNTSSPCDLR-EKLC^SFSMLIF-LKYSSFTLSSSMIYFLKKLMLFHF--FFFF 316
 F E^GSGTNWYFLT-LLRLERVKIIVMLIYANFPIFLKFYSFQFHDLLSQKTNAFSF-FFLFS 302
 G RRF^RNLVILPH-PVKTESENNCNAHLVCFSLN^LKVLLFPVPFTFSKNCF^FIFFSFFFHY 305
 H DKSMTLRRLNERLEGMLPKNF^LDKSRKSKDFNP^IFGVICPVKVFLERFKAINPARSIISS 301
 I TSPHDDSTEKGLKECFRKTDF^TNRGN-PKILTDQSLEFVQLK^CFLKDSRQSIP-QDPSLL 302
 J TKTTQLRKARNASEKLISRQIEEIQR-----FLTNLWSNLSSSVSKIQGNQSRKIHNL 299
 L E^GSGTNWYFLT-CDLREKLCSFSMLIFLKY^S-SFTLSSSMIYFLKKLMLFHFFF-FFLSL 297
 M RRF^RNLVILPH-LLRLERVKIIVMLIYANFPIFLKFYSFQFHDLLSQKTNAFSF-FFLFS 308
 N KKV^QELIGNTSSPVKTESENNCNAHLVCFSLN^LKVLLFPVPFTFSKN-CFFIF--FSFF 317
 O DKSMTLRRLNERLEGMP^PKNF^LDKSRKSKDFNP^IFGVICPVKVFLERFKAINPARSIISS 306
 P TSPHDDSTEKGLKECL^RRKTDF^TNRGN-PKILTDQSLEFVQLK^CFLKDSRQSIP-QDPSLL 297
 Q TKTTQLRKARNASEKLISRQIEEIQR-----FLTNLWSNLSSSVSKIQGNQSRKIHNL 293
 R E^GSGTNWYFLT-CDLREKLCSFSMLIFLN^LKSFTLSSSMIYFLKKLMLFHFFS-FCFHY 298
 S RRF^RNLVILPH-LLRLERVKIIVMLIYANFP-YSKFYSFQFHDLLSQETYAFSF-FFFL- 306
 T KKV^QELIGNTSSPVKTESENNCNAHLVCFSLIFLKVLLFPVPFTFSRNL^CFFIF--FLFA 314
 U DKSMTLRRLNERLEGMLPKNF^LDKSRKSKDFNP^IFGVICPVKVFLERFKAINPARSIISS 297
 V TSPHDDSTEKGLKECFRKTDF^TNRGN-PKILTDQSLEFVQLK^CFLKDSRQSIP-QDPSLL 302
 X TKTTQLRKARNASEKLISRQIEEIQR-----FLTNLWSNLSSSVSKIQGNQSRKIHNL 297
 Z E^GSGTNWYFLT-CDLREKLCSFSMLIFLKY^S-SFTLSSSMIYFLKKLMLFHFFF-FFLSL 298
 Y RRF^RNLVILPH-LLRLERVKIIVMLIYANFPIFLKFYSFQFHDLLSQKTNAFSF-FFLFS 302
 W KKV^QELIGNTSSPVKTESENNCNAHLVCFSLN^LKVLLFPVPFTFSKN-CFFIF--FSFF 315
 AA DKSMTLRRLNERLEGMP^PKNF^LDKSRKSKDFNP^IFGVICPVKVFLERFKAINPARSIISS 307

AB TSPHDDSTEKGLKECLRKTDFTNRGN-PKILTDQSLEFVQLKCFKDSRQSIP-QDPSLL 299
 AC TKTTQLRKARNASEKLISRQIEEIQR-----FLTNLWSNLSSSVSKIQGNQSRKIHNLF 294
 AD EGSGTNWYFLT-CDLREKLCSFSMLIFLNILKSFTLSSSMIYFLKKLMLFHFFS-FCFHY 297
 AE RRFRNLVILPH-LLRLERVKIIVMLIYANFP-YSKFYSFQFHDLLSQETYAFSF-FFFL- 306
 AF KKVQELIGNTSSPVKTESENNCNAHLVCFSLIFLKVLLFPVPFTFSRNLCFFIF--FLFA 318

Figura 10. Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene CAC de *Malus floribunda* (A) e de sequências traduzidas de (B a G) *Citrus reticulata* Cleopatra, (H a N) *Citrus sinensis* Navelina, (O a T) *Citrus latifolia* Tahiti, (U a W) *Poncirus trifoliata* Citrange C-32, (AA a AF) *Citrus medica*. Regiões circuladas em azul correspondem a uma proteína desconhecida, regiões circuladas em verde ao domínio ácido, regiões sublinhadas em amarelo correspondem ao domínio hidrofóbico transmembrana e regiões sublinhadas em rosa correspondem ao C-terminal. Os números apresentados ao fim de cada linha indicam a posição do primeiro aminoácido da linha dentro da região amplificada da sequência molde (A) e das demais sequências da família Rutaceae (B a AF).

A G---EIPPSMTNLTFLSHLNLSYNNLTGRIPESTQLQSLDQSSFVGNKLCG----- 213
 B ---QSSKKSPSQISTVVILLTLSSGSPARAMTS---LLTCPNR-NISGFF----ALLVLAC 216
 C --HNSKAKNHLLKSQWLFFP--AQALSPRLGP--QVSLAQIEIFHRVFLHCWCWLVICF 227
 D -IIVKQKITFSNLNCGYSFN-PKLRLLALGSGHDKSPDLPKSKYFIGFFCTVGAGLLFAL 232
 E R---AAG---KNN--HSDLRRFFALLLLR-KRGIGAEMIRGGLKLRPANMSYP----- 201
 F K---SLSLGLKEP-QLRFEKVIFCFTIMTEKTRLNRSDDKRRAEVETGKYELPQEKRRLF 213
 G ELRVKRITTVIEIGDFLLYYYDENEVEELREEGSDRQIIVTPREEKIVAEAYQ----- 215
 H VIVKQKITFSNLQCLFFP-LSSVLLALGSGP--XGSLAQIEIFHRVFLHCWCWLVICF 225
 I VIVKQKITFSNLQCLFFP-LSSVLLALGSGP--XGSLAQIEIFHRVFLHCWCWLVICF 225
 J -HNSKAKNHLLKSSTVFILLTPKLSALSPRLGPMTRLLTCPNRNISGFF----ALLVLAC 229
 L A---GEHAGLKET--QLKIEGDFLLYYYDEKRGIGAEMIRGGLKLRPANMSYP----- 206
 M R---ALSLGVKRI-NTVEDLRRFFALLLLRKTRLNRSDDKRRAEVETGKYELPQEKRRLF 223
 N ----NKHSRFEKVIFCFTIMTEKNEVEELREEGSDRQIIVTPREEKIVAEAYQ----- 218
 O ---QSSKKSPSQISTVXFFPAQCS--PARAMTS---LLTCPIG-IFHRVFLHVGAGLLFAL 219
 P --HNSKAKNHLLKSQXYSFNPKLSALSPRLGP--XVSLAQSEYFIG-FFCMLVLACYLL 228
 Q -IIVKQKITFSNLNCXILLT-LSSVLLALGSGHDXSPDLPNRNISG--FFACWCWLVICF 230
 R R---ALSLGLKEX--HSDLRRFFALLLLR-KRGIGAEMIRGGLKLRPANMSYP----- 208
 S K---STELRVKRIXQLRFEKVIFCFTIMTEKTRLNRSDDKRRAEVETGKYELPQEKRRLF 214
 T ---AGKNXTVEIEGDFLLYYYDENEVEELREEGSDRQIIVTPREEKIVAEAYQ----- 206
 U ---QSSKKSPSQISTVLFPPAQCS--PARAMTS---LPDLPKSKYFIGFFCTVGAGLLFAL 221
 V -HNSKAKNHLLKSQLCYSFNPKLSALSPRLGP--QVSLTCPNRNISGFFALLVLACYLL 228
 X -IIVKQKITFSNLNCVILLT-LSSVLLALGSGHDKSP-LAQIEIFHRVFLHCWCWLVICF 228
 Z R---ALSLGLKE---HSDLRRFFALLLLR-KRGIGAEMIRGGLKLRPANMSYP----- 208

Y K---STELRVKRITQLRFKVFIFCFTIMTEKTRLNRSDDKRAE**V**ETGKYELPRDEK--- 211
 W ---AGKNNTVEIEGDFLLYYYDENEVEELREEGSDR**Q**IVT**Q**REDCLSLEEAYQ----- 208

 A -----**APLNKNCSTNGVIPPPPTVEQDGGGGYRLLEDEWFYVSLGVGFFTG** 258
 B YLLCICQSWRFTRKFTATQWWKCS---WWRLPPRRWPQSGW**R**TA----GIRRRERHRR 269
 C VFASHGDDLQESLLLLNGDGN**A**AGD**G**DCRHGVGHSRD**G**VGR**R**VS**G**E**E**ERGTDGLRQRV**G** 287
 D YLPVMEMIYKKVYCYSMVEMQL---**V**MEIAATALAT**V**GMASDGGYPAKKREAQTVYD**K** 289
 E ---KRREDCLGLRGGL**P**RLTRGPWSARMDVARCTRGN**K**GR**L**VGGV**E**ESRRIEPKWRP**N**G 258
 F RPKRRPTKIDKVRTLVVKCEN**G**RRSVHLKRGRKIGGRSRGKPAHTQVETQRLEPLLKYFE 273
 G ---DQGEDLGSEVREWTS**L**GALEEVIREEDWWE**E**RKA**G**ALNPSGDPTAAF**V**IE**V**VLEQAC 272
 H VFASHGDDLQESLLLLNGDGN**A**AGD**G**DCRHGVGHRRN**G**VGR**R**VS**G**D**E**KERGTDGLRQRA**G** 285
 I VFASHGDDLQESLLLLNGDGN**A**AGD**G**DCRHGVGHRRN**G**VGR**R**VS**G**D**E**KERGTDGLRQRA**G** 285
 J YLLCICQSWRFTRKFTATQWWKCS--WWRL**P**PRWPPSEWR**R**TAG--IRRERHRRFT**T**K 285
 L ---KRREDCLSLRGGL**P**RLTRGPWSVRMDVARCTRGN**K**GR**L**VGGV**E**ESRRIEPKWRP**N**G 263
 M KPKRRPTKIDKVRTLVVKCEN**G**RRSVHLKRGRKIGGRSRGKPAHTQVETQRLEPLLKYFE 283
 N ---DQGEDLGSEV-EWTS**L**GALEEVIREEDWWE**E**RKA**G**ALNPSGDPTAAF**V**IE**V**VLEQAC 274
 O YLPVMEMIYKKVYCYSMVEMQL----VMEIAATALATVGMASD-----GYPEMKREAQT 271
 P C**I**CQ**S**-----WR**F**TRKFTATQWWKCSWWRLPPR-----RWPPSEWRRTAGIRRRERH 275
 Q VFASHGDDLQESLLLLNGDGN**A**AGD**G**DCRHGVGHRRN**G**VGR**R**VS**G**D**E**ERGTDGLRQRA**G** 290
 R ---KRREDCLSLRGGL**P**RLTRGPWSVRMDVARCTRGN**K**GR**L**VGGV**E**ESRRIEPKWRP**N**G 265
 S KPKRRPTKIDKVRTLVVKCEN**G**RRSVHLKRGRKIGGRSRGKPAHTQVETQRLEPLLKYFE 274
 T ---DQGEDLGSEV-EWTS**L**GALEEVIREEDWWE**E**RKA**G**ALNPSGDPTAAF**V**IE**V**VLEQAC 262
 U YLPVMEMIYKKVYCYSMVEMQL----VMEIAATALATVGMASD-----GYPEMKREAQT 273
 V C**I**CQ**S**-----WR**F**TRKFTATQWWKCSWWRLPPR-----RWPPSEWRRTAGIQRRERH 275
 X VFASHGDDLQESLLLLNGDGN**A**AGD**G**DCRHGVGHRRN**G**VGR**R**VS**R**D**E**ERGTDGLRQRA**G** 288
 Z ---EMRR-LFKPRGGL**P**RLTRGPWSVRMDVARCTRGN**K**GR**L**VGGV**E**ESRRIEPKWRP**N**G 264
 Y IVARRPTKIDKVRTLVVKCEN**G**RRSVHLKRGRKIGGRSRGKPAHTQVETQRLEPLLKYFE 271
 W ---DQGEDLGSEV-EWTS**L**GALEEVIREEDWWE**E**RKA**G**ALNPSGDPTAAF**V**IE**V**VLEQAC 264

 A **FWIVLGSLLVNMPWSILLSQLLNRIVLKMYHVIIVEYV**----- 295
 B --FTTKGRWFTAR**L**SAMCLGSFASW**V**IRGWCSRRRREG-----SARRFWPT-LSPGSWFT 321
 C --LLPDDYRQCADLA**A**LLHG**Y**CGD**G**V**P**DVVVDGRDQHD-----GDFGHERY-RRGRGLRR 339
 D -SV**V**YCLTIIGNVLTW**Q**LCFMGTAGMVFLTSSLTGGI-----SMTAILAMNVIAGVVY 342
 E LSLCDS**S**T**L**RASLLRL**S**L**Q**RGRDSWPRERDSSCLSWPFGLLVHATGFLLVVLLLLRSC 318
 F SKLAETEPTKRQRLVTKRTR**LL**VLAFWSSTPCPCN-----WVLVGGVVAVAVLFISM 326

```

G DAYKEAEIVGDQENEIALACLGLLVLVLSLSMQLGSC-----WWCCCCCGLVHLYEWER 325
H --LLPDDYRQCGDLAALLHGYCGDGVDP--VVVDGRDQ-----HDGDFGHERYRRRGRGLR 336
I --LLPDDYRQCGDLAALLHGYCGDGVDP--VVVDGRDQ-----HDGDFGHERYRRRGRGLR 336
J --GRWFTARLS---AMWLGSFASWVLRGWCSRRRREGS-----ARRFWPTLS--PGSWFT 333
L LSLCDSSTLRASLLRLSRQGRDSDWPRERDSSCLSWPFGPLLLVHATGFLLVVLLLLLRSC 323
M SKLAETEPTKRQRLVTKRTRLLLVLAFWSSTPCPCN-----WVLVGGVVAVAVLFISM 336
N DADKEAEIVGDQENEIALACLGLLVLVLSLSMQLGSC-----WWCCCCCGLVHLYEWER 327
O --VYDKG---PVVYCLTIIGNVVTWQLC-FMGTAGMVF-----LTSSLTGG-ISMTAILA 319
P RRFTTKGRWFTARLSAMWLGSFASWVLRGWCSRRRREG-----SARFWPT-LSPGSWFT 329
Q --LLPDDYRQCGDLAALLHGYCGDGVDPVVVDGRDQHD-----GDFGHERYR--RGRGLR 341
R LSLCDSSTLRASLLRLSRQGRDSDWPREPDSSCLSWPFGPLLLVHATGFLLVVLLLLLRSC 325
S SKLAETEPTKRQRLVTKRTRLLLVLAFWSSTPCPCN-----WVLVGGVVAVAVLFISM 327
T DADKEAEIVGDQENQIALACLGLLVLVLSLSMQLGSC-----WWCCCCCGLVHLYEWER 315
U --VYDKG---PVVYCLTIIGNVVTWQLC-FMGTAGMVF-----LTSSLTGG-ISMTAILA 321
V RRFTTKGRWFTARLSAMWLGSFASWVLRGWCSRRRREG-----SARFWPT-LSPGSWFT 329
X --LLPDDYRQCGDLAALLHGYCGDGVDPVVVDGRDQHD-----GDFGHERYR--RGRGLR 339
Z LSLCDSSTLRASLLRLSRQGRDSDWPRERDSSCLSWPFGPLLLVHATGFLLVVLLLLLRSC 324
Y SKLAETEPTKRQRLVTKRTRLLLVLAFWSSTPCPCN-----WVLVGGVVAVAVLFISM 324
W DADKEAEIVGDQENEIALACLGLLVLVLSLSMQLGSC-----WWCCCCCGLVHLYEWER 317

```

Figura 11. Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene CAC de *Malus floribunda* (A) e de sequências traduzidas de (B a G) *Cinthus mitis*, (H a N) *Murraya* spp, (O a T) *Citrus nobilis*, (U a W) *Citrus reticulata* Cleopatra. Regiões circuladas em azul correspondem a uma proteína desconhecida, regiões circuladas em verde ao domínio ácido, regiões sublinhadas em amarelo correspondem ao domínio hidrofóbico trans-membrana e regiões sublinhadas em rosa correspondem ao C-terminal. Os números apresentados ao fim de cada linha indicam a posição do primeiro aminoácido da linha dentro da região amplificada da sequência molde (A) e das demais sequências da família Rutaceae (B a W).

```

A PPSMTN-----LTFLSHLNLNLSYNNLTGRIPESTQLQSLDQSSFFVG--- 208
B YFLKRN-----EIRTGGIKSSRASRLSKDLEQSPLGQAS-NQTSIRASPGTGGSH--- 215
C MRSGRG-----ESNLLELLGFDQRISSNLLSAKLEIKRASVLLLRVPVGPTEDG--- 211
D DPDG-----GNQIFSSFSALIKGLARAISSRPSFLKSNEHPCFSG--- 204
E FDSRPDLISF-EIKTSCNQRRQDRTSGHAGSMVDKYSLFFFFLNFN---FGFWLF---F 212
F FLGNKD-----VVS-----TSSGPYIWSCLRLDGIFSLFLFSFFLIRLILAFFFMH--- 217
G FRKRR-----RVINVVRTVHLMPEARWLINILSFSFFLI-LIFNKVNFGFFFLN--- 217
H DPDG-----GNQIFSSFSALIKGLARAISSRPTFLKSNEHPCFSG--- 208
I HFXKSN-----EIRTVGKSSRASRLSKDLEQSPLGQPS-NQTSIRASPGTGGSH--- 211
J MRSGRW-----ESNLLELLGFDQRISSNLLSANLLEIKRASVLLLRVPVGPTEDG--- 215

```

L FXKRR-----RVITSSGPYIRSCLMVDKYSLFFFSFFLIRLILAS SFFLFL FLN--- 221
M FDSHRPDLITFXEMKTS CNHVVRTVHPVMPDGIFS LF-LFFLILIFNKVNF GFF FFSFSF 222
N FLXNED-----VVSRRQDR TSGHAWLINILSFS-FFLNFNF GFWLL-LFFFFFF FMH--- 223

A -----NKLCGAPLNKNCS TNGVIP PPTV 231
B ---RRWSRTCTNPSTRSVSYKPNTDSA AAAAAAAAA---RRPQRRHPYLRSLPAG RLED 269
C ---PAPALET RQDPDFPTNRTPIRLRWLLLLLLL---DDHSHVGIL ISVHFRO GQWRIGE 265
D ---YRWVPQKMVPHLHLKPVNPIRFLQTEHRFGCGG---CCCCSTTTATSASLS PFTSG 258
E FKCMKVWVKKKLGGGF--IQFRVDFIFISGVR---EVGLEFF ARVKTACA ANHEN PISMD 267
F ----VKSLGKKIGRRFHPIPCRFLNLHFGSER----SWFGVLICSCENC MCGQSE PHLNG 269
G -ACKKFGLKKNWEEVS--SNS---VIFKSSFREE-KLVWSFDLLVKLHVRPIMRT PSQWM 270
H ---YRWVPQKMVPHLHLKPVNPIRFLQTEHRFGCGGCCCC CCCCSTTTATSASLS PLTSG 265
I ---RRWSRTCTNPSTRSVSYKPNTDSA AAAAAAAAAAARRPQRRHPYLR-LPAG PKLED 267
J ---PAPALET RQDPDFPTNRTPIRLRWLLLLLLLLLLDDHSHVGIL ISVDFRQ GQWRIGE 272
L -ACKKFGLKKKLGGGF--IQFRVDYIFISRVREVG YLVWIFDLLVKLHVRPIMRT PTQWM 278
M FKCMKVWVKKEIGRRFHPIPCRLLNLHFESERSW-LLGLDFF ARVKTACA ANHEN PNSMD 281
N ----VKSLGKRNWEEVSSN-SVIKSSFREEKLV--TWFGFLICSCENC MCGQSE PQLNG 276
A EQDGGGGYRLLEDEW FYVSLGVGFFTGFWIVLGSLLVNMPWSILLSQLLN RIVLKMYHVI 291
B RGEIRGTGR--MTKEERP KENSQPSSSTLV VAPDSLGSISNRDS SPYFRRSRSLRRA 327
C RSEERGGRR--RRGRKRILNRRLDRRLLLLLLETVIS VAFRTEIHRRTSEEAAVCAEPV 323
D RAKAGGSGRDP RN GADDEGGEAEREFTSVVLIDACCCSLRQSRHFEQRFIVAVLPKKPQL 318
E AAHFQKLYSIFFFFFFLPSWIENRKVGLCTYT-LLACCYWTLKIEVFIFMPLGRCMNQL 326
F CCPFSKVVFYFFFFF FFTQLDRKLKKG RFVYLHVVGMLLLDAQNGLHFHAIRMHESVVC 329
G LPIFKSCILFFFFFFFY P--VGKIKERV CVLTRCCWHVAIGRSKLRSSFSCHVDAISCLC 328
H RAKAGGSGRDP RN GADDEGGEAEREFTSVVLIDACCCSLRQSRHFEQRFIVAVLPKKPQL 325
I RGEIRGTGR--MTKEEKP KENSQPSSSTLV VAPDSLGSISNRDS SPYFRRSRSLRRA 325
J RSEERGGRR--RRSRKRILNRRLDRRLLLLLLETVIS VAFRTEIHRRTSEEAAVCAEPV 330
L LPIFKSCI----FFYFY P--VGKIKERV CVLTRCCWHVAIGRSRIEVFIFMPLGRCMNQL 332
M AAHFQKLY----FFLLLP SWIENRKVGLCTYT-LLACCYWTLKDGLHFHAIRMHES 333
N CCPFSKVVF----FFTFTQLDRKLKKG RFVYLHVVGMLLLDAQ-GLRSSFSCHVDAISC 331

A VEYV----- 295
B CALLVLGSL----- 337
C PFLCLVLC----- 331
D FAQSLCPSCAWFFA- 332

```

E  FVLGSLL----- 333
F  AWX-FAX----- 335
G  LXLGX----- 333
H  FAQSLCPSCAWFFAX 340
I  CALLVLGSLL----- 335
J  PFLCLVLCX----- 339
L  FVLGXLL----- 339
M  VVCAWXFAX----- 342
N  LCLGICX----- 338

```

Figura 12. Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene CAC de *Malus floribunda* (A) e de sequências traduzidas de (B a G) *Citrus reticulata* Cleopatra e de (H a N) *Citrus reticulata* Page. Regiões circuladas em azul correspondem a uma proteína desconhecida, regiões circuladas em verde ao domínio ácido, regiões sublinhadas em amarelo correspondem ao domínio hidrofóbico trans-membrana e regiões sublinhadas em rosa correspondem ao C-terminal. Os números apresentados ao fim de cada linha indicam a posição do primeiro aminoácido da linha dentro da região amplificada da sequência molde (A) e das demais sequências da família Rutaceae (B a N).

V- DISCUSSÃO

Os quatro oligonucleotídeos utilizados geraram fragmentos amplificados de espécies de citros e outras espécies pertencentes à família Rutácea. Os tamanhos e número de fragmentos obtidos após amplificação variaram entre os genótipos avaliados. O emprego do oligonucleotídeo AAF não resultou em amplificações em genótipos altamente suscetíveis ao cancro cítrico, enquanto alguns genótipos altamente resistentes ou imunes tiveram regiões amplificadas. Resultados similares foram observados com CAA e NP. Como exemplos, o emprego do oligonucleotídeo CAA resultou em dois fragmentos, de 350 pb e 390 pb, presentes apenas em materiais altamente resistentes (*Fortunella margarita* e *Citrus mitis*), e um fragmento de 650 pb, resultante de reações com NP, não identificado em materiais suscetíveis ou altamente suscetíveis. Apesar da identificação de fragmentos presentes em genótipos pertencentes a um ou outro grupo de resistência ao cancro cítrico, reações únicas de PCR com qualquer um dos quatro oligonucleotídeos nem sempre resultaram na separação dos fenótipos testados.

Foi possível verificar que cada um dos oligonucleotídeos alinhou em regiões diferentes dos genomas de vários dos genótipos. Vários clones, alguns deles obtidos de um mesmo fragmento amplificado, apresentaram sequências relativamente dissimilares entre si. Esse fato deveu-se provavelmente a baixa especificidade dos oligonucleotídeos, desenhados com base em sequências de R-genes de *A. thaliana* e *M. floribunda*. Após comparação das sequências traduzidas de aminoácidos desses genótipos com sequências de R-genes conhecidos tipo NBS-LRR, observou-se que algumas das sequências obtidas com o oligonucleotídeo CAC demonstraram conter aminoácidos de regiões conservadas. Exemplos de R-genes com LRR são *Cf-9*, *Cf-2* e *Xa21*, que codificam LRR extra-citoplasmático (DIXON et al., 1996; SONG et al., 1995). Uma segunda categoria de R-genes com LRR são aqueles que codificam LRR citoplasmáticos. Exemplos desses últimos são os genes *RPS2*, *RPP5*, *N* e *L6* (LAWRENCE et al., 1995; PARKER et al., 1997; WHITHAM et al., 1994).

Apesar de muitos R-genes clonados possuírem grande similaridade nas sequências LRR, os mesmos podem ser altamente divergentes quando a comparação dá-se pelas sequências completas de nucleotídeos desse genes (BENT, 1996; BOTELLA et al., 1998). Muitos desses genes apresentam-se estruturados em multifamílias, o que facilita a identificação desses genes em outras espécies de plantas (BENT, 1996). Considerando muitos dos R-genes clonados, há evidências não somente quanto a conservação e similaridade das sequências de DNA desses genes, mas também quanto a conservação da funcionalidade dos mesmos, o que pode ser observado nas comparações das sequências de aminoácidos e na estrutura física das proteínas codificadas (LAWRENCE et al., 1995; MEYERS et al., 1998). Comparações das sequências LRR de peptídeos de proteínas codificadas por R-genes revelaram porções C-terminal altamente conservadas, enquanto N-terminal hipervariáveis (MEYERS et al., 1998). A detecção de regiões hipervariáveis no domínio LRR em vários tipos de R-genes sugere a existência de um padrão biológico, talvez evolutivo e de funcionalidade, nessa classe de genes em plantas (MEYERS et al., 1998).

Um dos menores R-genes conhecidos possui tamanho superior a 900 pb e as sequências obtidas no presente trabalho variaram entre 350 e 1300 pb. Portanto,

caso os fragmentos estejam envolvidos na codificação de proteínas de resistência ao patógeno supõe-se que os mesmos sejam somente uma parte desses genes. Como exemplos, o R-gene *Pto*, que confere resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em tomate, possui 963 pb (MARTIN et al., 1993), enquanto o R-gene *RPM1* de *Arabidopsis* possui um tamanho aproximado de 3000 pb (GRANT et al., 2003). Um dos mais estudados R-genes, o *N* de *Nicotiana* spp., envolvido na resistência de tabaco ao *Tobacco mosaic virus* (TMV), possui tamanho aproximado de 3500 pb (WHITHAM et al, 1994).

Os resultados aqui apresentados não permitem afirmar que as sequências encontradas correspondem a R-genes efetivos a *X. citri*. Primeiro, algumas sequências foram identificadas em materiais parcialmente suscetíveis ao patógeno, o que descarta a interação do tipo incompatível (resistência de não hospedeiro). Além disso, desconhecesse se as sequências identificadas pertencem a genes que codificam proteínas envolvidas na resistência ao patógeno, mesmo que uma resistência parcial. Nesse sentido, as sequências encontradas em materiais não hospedeiros como das espécies *Severinia* spp. e *Murraya* spp., além de sequências encontradas em materiais altamente resistentes como *Fortunella margarita*, *Fortunella japônica* e outras espécies pertencentes a esses grupos que apresentaram resultados de amplificação, servirão como sequências promissoras para o desenho de novos oligonucleotídeos para uso com a técnica de *genoma walking*, objetivando-se analisar uma região mais abrangente desses genótipos de interesse. Essas novas sequências serão utilizadas para a avaliação da expressão gênica na presença e ausência do patógeno, o que permitirá o reconhecimento do envolvimento das mesmas na resistência ao cancro cítrico.

VI- CONCLUSÃO

A tentativa de se identificar genes candidatos potencialmente envolvidos na resistência de Rutaceae a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* permitiu a amplificação e clonagem de sequências com ≤ 1300 pb relativamente similares a R-genes do tipo

NBS-LRR ou com homologia a genes envolvidos na resistência de plantas a estresses bióticos e abióticos.

VII- REFERÊNCIAS

- AMARAL, S.F. 1957. Providências para a erradicação do cancro cítrico. **O Biológico** 23:112-123.
- BELASQUE JR. J.; GIMENES-FERNANDES N.; MASSARI C.A. O sucesso da campanha de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo, Brasil. **Summa phytophthologica** 35:91-92. 2009.
- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.,; STASKAWICZ, B.J.; DINESH-KUMAR, S.P. Signaling in plant-microbe interaction. **Science** 276:726-733. 1997.
- BARBOSA, J.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; MASSARI, C.A.; AYRES, A.J. Incidência e distribuição de cancro cítrico em pomares comerciais do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica** 27:30-35. 2001.
- BENT, A.F. Plant disease resistance genes: Function meets structure. **The Plant Cell** 8:1757-1771. 1996.
- BENT, A.F.; KUNDEL, B.N.; DAHLBECK, D.; BROWN, K.L.; SCHMIDT, R. ; GIRAUDAT, J.; LEUNG, J.; STASKAWICS, B.J. *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. **Science** 265:1856-1860. 1994.
- BITANCOURT, A.A. O cancro cítrico. **Biológico** 23:101-111.1957.
- BITTNER-EDDY, .PD.; CRUTE, .JR.; HOLUB, E.B.; BEYNON, J.L. *RPP13* is a simple locus in *Arabidopsis thaliana* for alleles that pecify downy mildew resistance to different avirulence determinants in *Peronospora parasitica*. **Plant J** . 21:177-188. 2000.

BOSCARIOL, R.L.; MONTEIRO, M.; TAKAHASHI, E.K.; CHABREGAS, S.M.; VIEIRA, M.L.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, L.F.P.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; CARDOSO, S.C.; CHRISTIANO, R.S.C.; BERGAMIN FILHO, A.; BARBOSA, J.M.; AZEVEDO, F.A.; MENDES, B.M.J. *Attacin A* gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* 'Hamlin'. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 13:530-536. 2006.

BOYES, D.C.; MCDOWELL, J.M.; DANG, L. J.L. Plant pathology: Many roads lead to resistance. **Current Biology** 6:634-637. 1996.

CALENGE, F.; VAN DER LINDE, C.G.; VAN DE WEG, E.; SCHOUTEN, H.J.; VAN ARKEL, G.; DENANCÉ, C.; DURE, L. C.E. Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. **Theor. Appl. Genet.** 110:660-668. 2005.

CIVEROLO, E.L. Citrus bacterial canker disease: The bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. In: Citrus canker: An international perspective. **Citrus Research and Education Center, University of Florida, Lake Alfred.** pp.11-17. 1985.

CIVEROLO, E.L. Bacterial canker disease of citrus. **Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society.** 37:127-146. 1984.

DANGL, J.L.; JONES, J.D. Plant pathogenesis and integrated defense responses to infection. **Nature.** 411:826-833. 2001.

DANÓS, E.; BERGER, R.D.; STALL, R.E. Temporal and spatial spread of citrus canker within groves. **Phytopathology.** 74:904-908. 1984.

DENG, Z.; GMITTER, F.G. Cloning and characterization of receptor kinase class disease resistance gene candidates in citrus. **Theor. Appl. Genet.** 108:53-61. 2003.

DENG, Z.; HUANG, S.; LING, P.; CHEN, C.; YU, C.; WEBER, C.A.; MOORE, G.A.; GMITTER JR, F.G. Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance–gene candidate sequence in citrus. **Theor. Appl. Genet.** 101:814-822. 2000.

- DING, J.; ZHANG, W.; JING, Z.; CHEN, J.; TIAN, D. Unique pattern of *R*-gene variation within populations in *Arabidopsis*. **Mol. Genet. Genomics**. 277:619-629. 2007.
- DIXON, M.S.; JONES, D.A.; KEDDIE, J.S.; THOMAS, C.M.; HARRISON, K.; JONES, J.D.G. The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. **Cell**. 84:451-459. 1996.
- ELLIS, J.G.; LAWRENCE, E.J.; FINNEGAN, E.J.; ANDERSON, P.A. Contrasting complexity of two rust resistance loci in flax. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92:4185-4188. 1995.
- FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annu. Rev. Phytopathol.** 9:275-276. 1971.
- GABRIEL, D.W.; KINGSLEY, M.T.; HUNTER, J.E.; GOTTWALD, T.R. 1989. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 39: 14-22.
- GOTO, M. 1990. Fundamentals of bacterial plant pathology. **San Diego: Academic Press**. 342p.
- GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; SCHUBERT, T.S. Citrus canker: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**. DOI:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV. 2002.
- GOTTWALD, T.R.; HUGHES, G.; GRAHAM, J.H.; SUN, X.; RILEY, T. The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. **Phytopathology**. 91:30-34. 2001.
- GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; CIVEROLO, E.L.; BARRET, H.C.; HEARN, C.J. Differential host range reaction of citrus and citrus relatives to citrus canker and citrus bacterial spot determined by leaf mesophyll susceptibility. **Plant Disease**. 77:1004-1009. 1993.

GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W.; MCGUIRE, R.G. Analysis of disease progress of citrus canker in nurseries in Argentina. **Phytopathology**. 79:1276-1283. 1989.

GOTTWALD, T.R.; MCGUIRE, R.G.; GARRAN, S. Asiatic citrus canker: spatial and temporal spread in simulated new planting situations in Argentina. **Phytopathology**. 78:739-745. 1988.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; RILEY, T.D.; CUBERO, J.; DROUILLARD, D.L. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Xcc) on various surfaces and chemical control of asiatic citrus canker (ACC). In: International Citrus Canker Research Workshop, Fort Pierce, 2000. <http://www.doacs.state.fl.us/canker>. **Proceedings**, Fort Pierce. 2000.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; RILEY, T.D.; ACHOR, D. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**. 82:1319-1325. 1992.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; CIVEROLO, E.L.; MCGUIRE, R.G. Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* in soil in nurseries in Maryland and Argentina. **Plant Disease**. 73:423-427. 1989

GRAHAM, J.H.; MCGUIRE, R.G.; MILLER, J.W. 1987. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in citrus plant debris and soil in Florida and Argentina. **Plant Disease**. 71:1094-1098.

GRANT J.J, CHINI A, BASU D, LOAKE GJ. Targeted Activation Tagging of the *Arabidopsis* NBS-LRR gene, *ADR1*, conveys resistance to virulent pathogens. **MPMI**. 16 : 669–680. 2003.

CHINI, A.; LOAKE, G.J. Motifs specific for the ADR1 NBS-LRR protein family in *Arabidopsis* are conserved among NBS-LRR sequences from both dicotyledonous and monocotyledonous plants. **Planta**. 221(4):597-601. 2005.

GUIDETTI-GONZALEZ, S.; CARRER, H. Putative resistance genes in the CitEST database. **Genetics and Molecular Biology**. 30:931-942. 2007.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant Cell**. 8:1773-1791. 1996.

HARTUNG, J.S.; CIVEROLO, E.L. Restriction fragment length polymorphism distinguish *Xanthomonas campestris* strains isolated from Florida citrus nurseries from X.c. pv. citri. **Phytopathology**. 79:793-799. 1989.

HULBERT, S.H.; MICHELMORE, R.W. Linkage analysis of genes for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa*). **Theor. Appl. Genet.** 70:520-528. 1985.

INNES RW, BISGROVE SR, SMITH NM, BENT AF, STASKAWICZ BJ, LIU YC. Identification of a disease resistance locus in *Arabidopsis* that is functionally homologous to the RPG1 locus of soybean. **Plant J**. 4:813-820. 1993

JEHLE, R.A. Susceptibility of *Zanthoxylum clava-hercules* to *Bacterium citri*. **Phytopathology**. 8:34-35. 1918.

JEHLE, R.A. Susceptibility of non-citrus plants to *Bacterium citri*. **Phytopathology**. 7: 339-344. 1917.

JONES, D.A.; JONES, J.D.G. The roles of leucine-rich repeat proteins in plant defenses. **Adv. Plant Pathol**. 24:90-167. 1996.

JONES, D.A.; THOMAS, C.M.; HAMMOND-KUSACK, K.E.; BALINT-KURTI, P.J.; JONES, J.D. Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. **Science**. 266:789-793. 1994.

JORGENSEN, J.H. Genetics of powdery mildew resistance in barley. **Crit. Rev. Plant. Sci**. 13:97-119. 1994.

KANAZIN, V.; MABEK, L.F.; SHOEMAKER, R.C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93:11746-11750. 1996.

KOIZUMI, M. Citrus canker: The world situation. In: Citrus canker: An international perspective. **Citrus Research and Education Center, University of Florida, Lake Alfred.** pp.2-7. 1985.

LAWRENCE, G.J.; FINNEGAN, E.J.; AYLIFFE, M.A.; ELLIS, J.G. The L6 gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*. **The Plant Cell.** 7:1195-1206. 1995.

LEE, H.A. Further data on the susceptibility of rutaceous plants to citrus-canker. **Journal of Agricultural Research.** 15:661-665. 1918.

LEE, H.A. The increase in resistance to citrus canker with the advance in maturity of citrus trees. **Phytopathology.** 11:70-73. 1921.

LEITE JR, R.P.; MOHAN, S.K. Evaluation of citrus cultivars for resistance to canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye in the State of Paraná, Brazil. Proc. Int. Soc. **Citriculture.** 1:385-389. 1984

LEITE JR., R.P.; MOHAN, S.K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná, Brazil. **Crop Protection.** 9:3-7. 1990.

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

MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.R.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros.** Capinas: Instituto Agronômico e Fundag, p 6-13. 2005.

MCDOWELL, J.M.; DHANDAYDHAM, M.; LONG, T.A.; AARTS, M.G.M.; GOFF, S.; HOLUB, E.B.; DANGL, J.L. Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the *RPP8* locus of *Arabidopsis*. **The Plant Cell.** 10:1861-1874. 1998.

MCLEAN, T.; LEE, H.A. The resistance to citrus canker of *Citrus nobilis* and a suggestion to the production of resistant varieties in other citrus species. **Phytopathology**. 11:109-114. 1921.

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

PARKE, R. J.E.; COLEMAN, M.J.; SZABO, V.; FROST, L.N.; SCHMIDT, R.; VAN DE BIEZEN, E.A.; MOORES, T.; DEAN, C.; DANIEL, M.J.; JONES, J.D.G. The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene *RPP5* share similarity to the toll and interleukin-1 receptors with *N* and *L6*. **The Plant Cell**. 9:879-894. 1997.

PAVAN, A.; CALIXTO, M.C.; CARDOSO, S.C.; MENDES, B.M.J.; BERGAMIN FILHO, A.; LOPES, J.R.S.; CARVALHO, C.R.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Evaluation of 'Hamlin' sweet orange + 'Montenegrina' mandarin somatic hybrid for tolerance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xylella fastidiosa*. **Scientia Horticulturae**. 113:278-285. 2007.

PELTIE, R. G.L. Susceptibility and resistance to citrus-canker of the wild relatives, citrus fruits, and hybrids of the genus citrus. **Journal of Agricultural Research**. 14:337-357. 1918.

RICHTER, T.E.; PRYOR, T.J.; BENNETZEN, J.L.; HULBERT, S.H. New rust resistance specificities associated with recombination in the *Rp1* complex in maize. **Genetics**. 141:373-381. 1995.

RON, M.; AVNI, A. The Receptor for the Fungal Elicitor Ethylene-Inducing Xylanase Is a Member of a Resistance-Like Gene Family in Tomato. **The Plant Cell**. 16:1604-1615. 2004.

SONG, W.Y.; WANG, G.L.; CHEN, L.L.; KIM, H.S.; PI, L.Y. HOLSTEN, T.; GARDNER, J.; WANG, B.; ZHAI, W.X.; ZHU, L.H. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa21*. **Science**. 270:1804-1805. 1995.

SCHOULTIES, C.L.; CIVEROLO, E.L.; MILLER, J.W.; STALL, R.E.; KRASS, C.J.; POE, S.R.; DUCHARME, E.P. Citrus canker in Florida. **Plant Disease**. 71:388-395. 1987.

STASKAWICZ, B.J.; AUSUBEL, F.; BAKER, B.; ELLIS, J.G.; JONES, J.D. **Science**. 268:661-667. 1995.

STALL, R.E.; SEYMOUR, C.P. Canker, a threat to citrus in the gulf-coast states. **Plant Disease**. 67:581-585. 1983.

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

SCHOULTIES, C.L.; CIVEROLO, E.L.; MILLER, J.W.; STALL, R.E.; KRASS, C.J.; POE, S.R.; DUCHARME, E.P. Citrus canker in Florida. **Plant Disease**. 71:388-395. 1987.

SUDAPAK, M.A.; BENNETZEN, J.L.; HULBERT, S.H. **Genetics**. 132:119-125. 1996.

SUN, X.; STALL, R.E.; CUBERO, J.; GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; DIXON, W.D.; SCHUBERT, T.S.; PEACOCK, M.E.; DICHSTEIN, E.R.; CHALOUX, P.H. Detection of a unique isolate of citrus canker bacterium from Key lime in Wellington and Lake Worth, Florida. In: International Citrus Canker Research Workshop, Fort Pierce. 2000. <http://www.doacs.state.fl.us/canker>. **Proceedings**, Fort Pierce, 2000.

SUN, X.; STALL, R.E.; JONES, J.B.; CUBERO, J.; GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; DIXON, W.D.; SCHUBERT, T.S.; CHALOUX, P.H.; STROMBERG, V.K.; LACY, G.H.; SUTTON, B.D. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from key/mexican lime and alemow in South Florida. **Plant Disease**. 88:1179-1188. 2004.

SYED, N.H.; SORENSEN, A.P.; ANTONISE, R.; VAN DE WIE, L. C.; VAN DER LINDEN, C.G.; VAN'T WESTENDE, W.; HOOFTMAN, D.A.P.; DEN NIJS, H.C.M.; FLAVELL, A.J. A detailed linkage map of lettuce based on SSAP, AFLP, and NBS markers. **Theor. Appl. Genet.** 112:517-527. 2006.

TAUNAY, A.E. **A retirada da Laguna**. 8.d. São Paulo: Cia. Melhoramentos, 1923.

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

TRUONG, H.N.; CABOCHE, M.; DANIEL-VEDELE, F. Sequence and characterization of two *Arabidopsis thaliana* cDNAs isolated by functional complementation of a yeast *gln3 gdh1* mutant. **FEBS Lett.** 410(2-3):213-8. 1997

VAN DER LINDEN, .CG.; WOUTERS, C.A.E.; MIHALKA, V.; KOCHIEVA, E.Z.; SMULDERS, M.J.M.; VOSMAN, B. Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. **Theor. Appl. Genet.** 109:384-393. 2004.

VERNIÈRE, C.J; HARTUNG, J.S.; PRUVOST, O.; CIVEROLO, E.L.; ALVAREZ, A.M.; MAESTRI, P.; LUISETTI, J. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. **European Journal of Plant Pathology.** 104:477-487. 1998

VINATZER, B.A.; PATOCCHI, A.; GIANFRANCESCHI, L.; TARTARINI, S.; ZHANG, H.B.; GESSLER, C.; SANSAVINI, S. Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with *Vf* apple scab resistance. **Mol Plant Microbe Interact.** 14(4):508-15. 2001.

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

ZUBRZYCKI, H.M.; ZUBRZYCKI, A.D. Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dowson in oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Proc. Int. Soc. Citriculture** 1:405-409. 1981.