

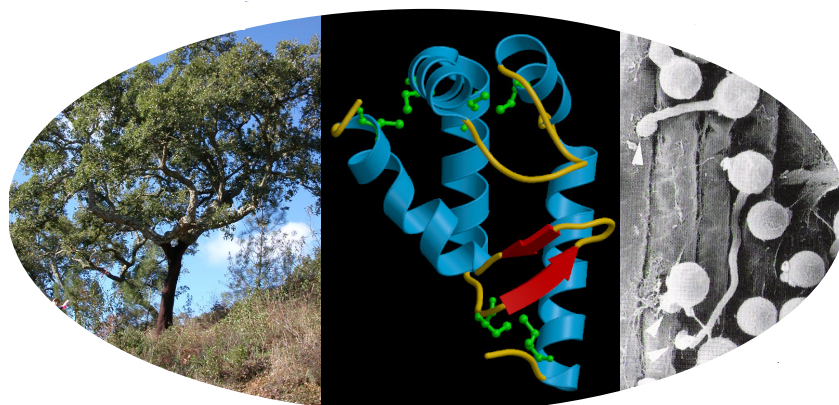


## UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Engenharia dos Recursos Naturais

# Estudo do papel biológico das elicinas de *Phytophthora cinnamomi* e do seu envolvimento no processo infeccioso

(Tese para a obtenção do grau de Doutor no ramo de Biologia,  
especialidade de Biologia Molecular)



**Marília do Rosário Gonçalves Horta**

Orientador: Doutor Alfredo Jaime Morais Cravador

Constituição do Júri:

Presidente: Doutor Pedro Ferré

Vogais: Doutora Maria Salomé Soares Pais Telles Antunes  
Doutor Cândido Pereira Pinto Ricardo  
Doutor José Ferreira Pereira Ferraz  
Doutor Alfredo Jaime Morais Cravador  
Doutor Gustavo Nuno Barbosa Nolasco  
Doutor Manuel Pedro Salema Fevereiro

FARO

2006



*Ao Chico Mesquita, meu companheiro de sempre...*



## AGRADECIMENTOS

Poucas serão as palavras para demonstrar a minha gratidão a todos quantos tornaram possível a elaboração desta tese. Mesmo assim, aqui fica um **obrigado muito especial** a...

... Ao Prof. Dr. Alfredo Cravador, orientador desta tese, pela oportunidade que me deu de desenvolver um trabalho tão interessante.

... Ao Dr. José Ferraz, por me ter iniciado no fascinante mundo da doença do declínio.

... Aos colegas Ana Coelho, Dina Neves, Nelson Sousa e Paula Caetano, pela amizade, ajuda e paciência a toda a prova.

... Ao Dr. Arnaud Bottin (UMR 5546 UPS-CNRS, Pôle de Biotechnologie Végétale Castanet-Tolosan, France), Dr. Alex Bollen e Dr. Edmond Godfroid (Laboratoire de Genetique Appliquée de L'Université Libré de Bruxelles, Belgique), Dr. Miguel Fevereiro (Laboratório Nacional de Investigação Veterinária) e Dr.<sup>a</sup> Sónia Negrão (ITQB), por me terem acolhido no seio dos respectivos grupos de trabalho, tornando possível a concretização de experiências essenciais.

... Ao Dr. Gustavo Nolasco, Dr. José Belo, Dr. José Leitão, Dr. Júlio Osório, bem como as respectivas equipas, por toda a colaboração prestada no decorrer deste trabalho.

... A todos os docentes e funcionários da Faculdade de Engenharia e Recursos Naturais da Universidade do Algarve que, de algum modo, contribuíram para a elaboração desta tese.

... Aos amigos Elisabete Malveiro, Elsie Guerreiro, Amélie Martins e Rui Machado, bem como todos os outros que não foram aqui mencionados, pelo extraordinário apoio que sempre me deram.

... Ao Chico, minha alma gémea, ao meu pai Severino e meu irmão Inácio e a todos das famílias Horta e Mesquita: sem vós, esta jornada não teria sido possível...

*Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), através da atribuição da bolsa SFRH/BD/1249/2000, e pelos projectos AGR/34389/99-00 e NATO SCIENCE FOR STABILITY - PO-CORK-OAK II.*



**Nome:** Marília do Rosário Gonçalves Horta.

**Faculdade:** Faculdade de Engenharia dos Recursos Naturais.

**Orientador:** Prof. Doutor Alfredo Cravador.

**Data:** 19 de Setembro de 2006.

**Título da Tese:** Estudo do papel biológico das elicinas de *Phytophthora cinnamomi* e do seu envolvimento no processo infeccioso.

## RESUMO

*Phytophthora cinnamomi*, oomiceta parasita das raízes de *Quercus suber*, excreta abundantemente cinamominas, proteínas da família das elicinas. Foi demonstrada a interacção destas proteínas com vários tipos de moléculas lipídicas mas desconhece-se o seu papel biológico.

Neste trabalho foi induzido o silenciamento do gene codificante para a  $\beta$ -cinamomina, após transformação genética de protoplastos por meios químicos (lipossomas e  $\text{CaCl}_2/\text{PEG}$ ) com uma sequência anti-sentido do gene  *$\beta$ cin*. A selecção dos transformantes foi realizada através da co-transformação com um gene que conferiu resistência à higromicina B. A presença dos transgenes foi certificada por *PCR*. A ausência da proteína em meios de cultura foi confirmada através de *western blotting*, aplicando anticorpos monoclonais anti- $\beta$ -cinamomina, e a ausência do respectivo RNAm foi comprovada com quantificação por *RT-PCR* em tempo real, observando-se também uma diminuição na expressão de genes codificantes para outras elicinas.

Testes de patogenicidade realizados em *Q. suber* com o único co-transformante estável obtido (resistente ao antibiótico e com gene  *$\beta$ cin* silenciado), com um transformante simples (resistente ao antibiótico) e com os respectivos isolamentos selvagens revelaram uma diminuição de patogenicidade na estirpe com o gene  *$\beta$ cin* silenciado, que não pode ser atribuída à simples presença do gene de resistência.

Perfis de expressão genética obtidos por cDNA-AFLP revelaram diferenças marcantes entre co-transformante e isolamento selvagem e a sequenciação de alguns fragmentos diferencialmente transcritos revelou que estes estão potencialmente associados à expressão do gene *cin $\beta$* , destacando-se entre eles um gene associado ao metabolismo de ácidos gordos.

**Palavras-chave:** *Phytophthora cinnamomi*, elicina, silenciamento genético, patogenicidade, *Quercus*.



## **Study of the biological role of the elicins of *Phytophthora cinnamomi* and of their involvement on the infectious process**

### **ABSTRACT**

*Phytophthora cinnamomi* is an oomycete parasite of *Quercus suber* roots. This pathogen secretes abundantly cinnamomins, proteins from the elicitin family. It was demonstrated that these proteins interact with several lipidic molecules, namely sterols but their biological role remains unknown.

In the present work the silencing of the gene coding for  $\beta$ -cinnamomin was induced by genetic transformation of protoplasts by chemical methods (liposomes and  $\text{CaCl}_2/\text{PEG}$ ) with an antisense sequence of the  *$\beta$ cin* gene. Selection of transformants was achieved through co-transformation with a gene conferring resistance to hygromycin B. The presence of the transgenes was certified by PCR. The absence of the protein in the culture media was confirmed through *western blotting* using monoclonal antibodies anti- $\beta$ -cinnamomin, and the absence of the coding mRNA was proven by means of real time RT-PCR quantification. The genetic expression of the genes coding for other elicins was shown to decreased as well.

Pathogenicity tests carried out in parallel in *Q. suber* with the only stable co-transformant obtained (antibiotic resistant and with the  *$\beta$ cin* gene silenced), with a simple transformant (antibiotic resistant) and with the wild type isolates revealed that the  *$\beta$ cin* silenced isolate has a decreased virulence; this impaired virulence could not be caused solely by the presence of the resistance gene.

Genetic expression profiles obtained by cDNA-AFLP disclosed marked differences between the co-transformant and the wild isolate. Sequencing of some fragments differentially expressed showed that these are potentially associated with the expression of the  *$\beta$ cin* gene; among them, a gene associated with the fatty acids metabolism is particularly important.

**Keywords:** *Phytophthora cinnamomi*, elicitin, genetic silencing, pathogenicity, *Quercus*.



## ABREVIATURAS

- aa aminoácido
- BCIP/NBT *5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate / Nitro Blue Tetrazolium*
- BSN Bjerrum e Schaffer-Nielsen (tampão de)
- cDNA ácido desoxiribonucleico complementar
- CDS *Coding Sequence*, Sequência Codificante
- CIN cinamomina (elicítina)
- dATP, A desoxiadenosina trifosfato, adenina
- dCTP, C desoxicitidina trifosfato, citosina
- dTTP, T desoxitimidina trifosfato, timina
- DEPC dietilpirocarbonato
- dGTP, G desoxiguanosina trifosfato, guanina
- DMSO Dimetilsulfóxido
- DNA *Deoxyribonucleic acid*, ácido desoxiribonucleico
- DTT ditioneitol
- EDTA ácido etilenodiaminotetracético
- ELI *ELicitin*, elicítina
- ELL *ELicitin-like*, semelhante a elicítina
- EST *Expressed Sequence Tags*
- *g* aceleração da gravidade, unidade de força centrífuga
- GFP *Green Fluorescent Protein*, proteína verde fluorescente
- GPI glicosilfosfatidilinositol
- HAE *Hyper Acidic Elicitin*, elicítina altamente ácida
- HEPES ácido etanosulfúrico hidroxietilpiperazina
- HPT Higromicina fosfotransferase
- HR *Hypersensitive Response*, Resposta Hipersensível
- HSP *Heat-Shock Proteins*, proteínas de choque térmico
- Ig Imunoglobulina
- INF Infestina (elicítina)
- kDa kiloDalton
- LAR *Localized Acquired Resistance*, resistência localizada adquirida
- LB Luria Bertani (meio)
- LPT *Lipid Transfer Proteins*, proteínas transportadoras de lípidos
- MAPKs *Mitogen-Activated Protein Kinases* (cinases proteicas)
- MOPS ácido 3-(*n*-morfolino)-propanosulfúrico
- mRNA ácido ribonucleico mensageiro
- MSE Meio de Secrecção de Elicinas

- NaAc acetato de sódio
- nt nucleótido
- °C grau Centígrado (Temperatura)
- ORF *Open Reading Frame*, Quadro de leitura aberta
- p/v, v/v peso/volume , volume/volume
- PAGE *Polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforese em gel de poliacrilamida
- pb pares de bases
- PBS-T *Phosphate Buffered Saline + Tween 20* (solução de)
- PCR *Polimerase Chain Reaction*, Reacção de Polimerização em Cadeia
- PEG Polietilenoglicol
- pI ponto Isoeléctrico
- PR *Pathogenesis related*, proteínas relacionadas com a patogénese
- psi *pound per square inch* (unidade de pressão)
- RNA *Ribonucleic acid*, ácido ribonucleico
- ROS *Reactive Oxygen Species*, espécies oxigenadas muito reactivas
- rpm rotações por minuto
- RT *Reverse transcription*, Transcrição reversa
- s, min, h segundo, minuto, hora
- SAR *Systemic Acquired Resistance*, Resistência sistémica adquirida
- SDS dodecilsulfato de sódio
- SSM Solução de Sais Minerais
- TBE Tris-borato EDTA
- TCA Ácido tricloro-acético
- TEMED N,N,N',N'-tetrametilenodiamina
- Tmv *Tobacco mosaic virus*, vírus do mosaico do tabaco
- Tris tris-hidroximetilaminometano
- TSS *Transcription Start Site*, Local de iniciação da transcrição
- U Unidade de actividade enzimática
- UTR *Untranslated Region*, Região não traduzida
- V<sub>8</sub>Ca sumo V<sub>8</sub> clarificado
- V<sub>8</sub>Ca sumo V<sub>8</sub> clarificado com agar
- X-gal 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	I
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	III
<b>RESUMO</b> .....	V
<b>ABSTRACT</b> .....	VII
<b>ABREVIATURAS</b> .....	IX
<b>ÍNDICE</b> .....	XI
<b>ENQUADRAMENTO GERAL DO TRABALHO</b> .....	1
<b>OBJECTIVOS</b> .....	3
<b>I. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> E SILENCIAMENTO DOS GENES DAS ELICITINAS</b> .....	5
<b>I.1. INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>I.1.1. Caracterização das elicitinas</b> .....	7
I.1.1.1. Classes dentro da família das elicitinas .....	8
I.1.1.2. Organização e estrutura dos genes das elicitinas .....	10
I.1.1.3. Estrutura tridimensional das elicitinas .....	11
I.1.1.4. Actividade molecular das elicitinas .....	11
I.1.1.5. Efeitos bioquímicos e fisiológicos induzidos em plantas por elicitinas .....	12
I.1.1.6. Expressão dos genes das elicitinas .....	24
I.1.1.7. Função biológica das elicitinas .....	28
<b>I.1.2. Transformação genética no género <i>Phytophthora</i></b> .....	29
I.1.2.1. Estratégias de transformação genética .....	29
I.1.2.2. Mecanismos de silenciamento genético .....	32
<b>I.1.3. As elicitinas de <i>Phytophthora cinnamomi</i></b> .....	34
<b>I.2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
<b>I.2.1. Selecção do material biológico</b> .....	35
<b>I.2.2. Cultura e manutenção dos isolamentos de <i>Phytophthora cinnamomi</i></b> .....	35
<b>I.2.3. Estudo da sensibilidade a antibióticos</b> .....	37
<b>I.2.4. Produção de zoósporos</b> .....	37
<b>I.2.5. Obtenção de protoplastos</b> .....	39
<b>I.2.6. Plasmídeos aplicados na transformação</b> .....	40
I.2.6.1. Descrição dos plasmídeos .....	40
I.2.6.2. Produção, extracção e purificação dos plasmídeos .....	43
I.2.6.3. Quantificação do DNA .....	44
I.2.6.4. Linearização dos plasmídeos .....	45
<b>I.2.7. Transformação genética</b> .....	45

I.2.7.1. Transformação com aplicação de lipossomas e CaCl <sub>2</sub> /PEG .....	45
I.2.7.2. Transformação com aplicação de electroporação .....	47
I.2.7.3. Transformação com aplicação de biolística .....	49
<b>I.2.8. Discriminação dos transformantes</b> .....	50
I.2.8.1. Extracção do DNA genómico .....	51
I.2.8.2. Reacções de amplificação .....	52
I.2.8.3. Amplificação de um fragmento do gene <i>hpt</i> .....	53
I.2.8.4. Amplificação de um fragmento <i>ham34 + fats</i> .....	53
I.2.8.5. Electroforese em gel de agarose .....	53
<b>I.2.9. Análise da produção de β-cinamomina</b> .....	54
I.2.9.1. Precipitação de proteínas de filtrados de meios de cultura .....	54
I.2.9.2. Electroforese de proteínas em gel SDS-PAGE .....	54
I.2.9.3. Detecção por coloração com azul de Coomassie .....	56
I.2.9.4. Detecção por <i>western blotting</i> .....	56
<b>I.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	59
<b>I.3.1. Selecção do material biológico</b> .....	59
<b>I.3.2. Estudo da sensibilidade a antibióticos</b> .....	59
<b>I.3.3. Produção de zoósporos</b> .....	60
<b>I.3.4. Obtenção de protoplastos</b> .....	61
<b>I.3.5. Transformação genética</b> .....	64
I.3.5.1. Transformação com aplicação de lipossomas e CaCl <sub>2</sub> /PEG .....	64
I.3.5.2. Transformação com aplicação de electroporação .....	68
I.3.5.3. Transformação com aplicação de biolística .....	70
<b>I.3.6. Discriminação dos transformantes</b> .....	70
I.3.6.1. Amplificação de um fragmento do gene <i>hpt</i> .....	71
I.3.6.2. Amplificação de um fragmento <i>ham34 + fats</i> .....	72
<b>I.3.7. Análise da produção de β-cinamomina</b> .....	72
<b>I.3.8. Taxas de crescimento, morfologia do micélio e zoosporogénese dos transformantes</b> ....	77
<b>II. TESTES DE PATOGENICIDADE COM MUTANTES DE <i>Phytophthora cinnamomi</i></b> .....	83
<b>II.1. INTRODUÇÃO</b> .....	85
<b>II.1.1. Caracterização de <i>Phytophthora cinnamomi</i></b> .....	85
<b>II.1.2. A doença do declínio do sobreiro e da azinheira</b> .....	87
<b>II.2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	91
<b>II.2.1. Infecção de material vegetal</b> .....	91
II.2.1.1. Cultura dos isolamentos de <i>P. cinnamomi</i> em maçã “ <i>Granny Smith</i> ” .....	91
II.2.1.2. Infecção de sementes germinadas de <i>Quercus suber</i> .....	92
II.2.1.2.1. <i>Ensaio de infecção directa</i> .....	93
II.2.1.2.1. <i>Ensaio de infecção indirecta 1</i> .....	93

II.2.1.2.3. Ensaio de infecção indirecta 2 .....	94
II.2.1.3. Infecção de folhas jovens de <i>Q. suber</i> .....	95
II.2.1.4. Infecção de plantas de <i>Q. suber</i> .....	95
II.2.1.4.1. Preparação do inóculo .....	95
II.2.1.4.2. Infestação de plantas .....	96
II.2.1.4.3. Condições de cultura .....	96
II.2.1.4.4. Avaliação das plantas .....	97
II.2.1.4.5. Análise estatística .....	97
II.2.1.4.6. Isolamento a partir de raízes .....	97
<b>II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	99
<b>II.3.1. Infecção de material vegetal</b> .....	99
II.3.1.1. Cultura dos isolamentos de <i>P. cinnamomi</i> em maçã “Granny Smith” .....	99
II.3.1.2. Infecção de sementes germinadas de <i>Q. suber</i> .....	101
II.3.1.2.1. Ensaio de infecção directa .....	101
II.3.1.2.2. Ensaio de infecção indirecta 1 .....	105
II.3.1.2.3. Ensaio de infecção indirecta 2 .....	107
II.3.1.3. Infecção de folhas jovens de <i>Q. suber</i> .....	110
II.3.1.4. Infecção de plantas de <i>Q. suber</i> .....	111
<b>III. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MUTANTES DE <i>Phytophthora cinnamomi</i></b> .....	119
<b>III.1. INTRODUÇÃO</b> .....	121
<b>III.1.1. Obtenção de perfis de expressão genética em <i>Phytophthora</i> spp</b> .....	122
<b>III.1.2. Quantificação da expressão genética em <i>Phytophthora</i> spp</b> .....	125
<b>III.2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	127
<b>III.2.1. Quantificação da expressão dos genes das elicinas: RT-PCR em tempo real</b> .....	127
III.2.1.1. Processamento de RNA .....	127
III.2.1.1.1. Extração e Purificação de RNA .....	128
III.2.1.1.2. Avaliação da integridade do RNA .....	129
III.2.1.1.3. Quantificação do RNA .....	130
III.2.1.1.4. Tratamento com DNase .....	130
III.2.1.2. Síntese de cDNA .....	130
III.2.1.2.1. Protocolo RT 1 .....	130
III.2.1.2.2. Protocolo RT 2 .....	131
III.2.1.3. Amplificação de um fragmento do gene da actina .....	131
III.2.1.4. Amplificação dos genes do <i>cluster</i> de elicinas .....	132
III.2.1.5. Clonagem de fragmentos de DNA .....	133
III.2.1.4.1. Análise dos clones de bactérias seleccionados .....	133
III.2.1.6. Sequenciação dos fragmentos de DNA clonados .....	134
III.2.1.7. Análise das sequências nucleotídicas clonadas .....	136

III.2.1.8. PCR Quantitativa em Tempo Real .....	136
<b>III.2.2. Obtenção de perfis de RNA mensageiro: cDNA-AFLP .....</b>	<b>138</b>
III.2.2.1. Síntese de cDNA .....	138
III.2.2.2. Digestão do cDNA e ligação de adaptadores sintéticos .....	139
III.2.2.3. Reações de pré-amplificação e amplificação .....	140
III.2.2.4. Separação dos fragmentos amplificados em gel de poliacrilamida .....	142
III.2.2.5. Recuperação, clonagem e sequenciação de fragmentos cDNA-AFLP .....	143
III.2.2.6. Análise das sequências nucleotídicas dos fragmentos cDNA-AFLP .....	144
<b>III.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>145</b>
<b>III.3.1. Quantificação da expressão dos genes das elicinas: RT-PCR em tempo real .....</b>	<b>145</b>
III.3.1.1. Amplificação de um fragmento do gene da actina e dos genes do <i>cluster</i> de elicinas ...	145
III.3.1.2. Clonagem dos fragmentos dos genes da actina e das elicinas .....	146
III.3.1.3. Análise das sequências nucleotídicas dos fragmentos clonados .....	147
III.3.1.4. Quantificação da expressão genética dos genes das elicinas .....	149
<b>III.3.2. Obtenção de perfis de RNA mensageiro: cDNA-AFLP .....</b>	<b>165</b>
III.3.2.1. Homologias das sequências de fragmentos cDNA-AFLP .....	168
<b>IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>177</b>
<b>V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>181</b>
<b>VI. ANEXOS .....</b>	<b>201</b>
<b>Anexo 1:</b> Alinhamento de Sequências dos Genes <i>Hpt</i> .....	203
<b>Anexo 2:</b> Teste de comparação de médias LSD (Mínima Diferença Significativa) das taxas de crescimento dos isolamentos .....	205
<b>Anexo 3:</b> Distribuição das plantas na estufa .....	207
<b>Anexo 4:</b> Avaliação das plantas de <i>Q. suber</i> envolvidas nos testes de patogenicidade .....	209
<b>Anexo 5:</b> Tecnologia <i>Taqman</i> e PCR em Tempo Real .....	213
<b>Anexo 6:</b> Alinhamento de genes codificantes para a actina .....	215
<b>Anexo 7:</b> Alinhamentos de sequências .....	217
<b>Anexo 8:</b> Resultados da quantificação por PCR em Tempo Real .....	227
<b>Anexo 9:</b> Bases da metodologia cDNA-AFLP .....	255
<b>Anexo 10:</b> Sequências nucleotídicas dos fragmentos cDNA-AFLP .....	257
<b>Anexo 11:</b> Lista de Figuras .....	261
<b>Anexo 12:</b> Lista de Tabelas .....	263

## ENQUADRAMENTO GERAL DO TRABALHO

A acentuada mortalidade e perda de vigor vegetativo observada na zona mediterrânica em árvores das espécies *Quercus suber* e *Q. ilex* subsp. *rotundifolia* na década de 1980s começou a levantar sérias preocupações, dada a elevada importância socio-económica e ecológica dos montados de sobro e azinho, nomeadamente para os países ibéricos. A sintomatologia apresentada pelas árvores doentes (essencialmente desfoliação da copa, exsudações no tronco e presença de rebentos epicórmicos) denunciava um mau funcionamento do sistema radicular, possivelmente provocado por agentes patogénicos presentes no solo (Figura 1). Uma equipa de investigação da Universidade do Algarve, dirigida pelo Professor José Ferraz, conduziu então, desde o início da década de 1990s, uma ampla pesquisa em locais de declínio, focando as suas observações nas raízes das plantas afectadas, que se apresentavam necrosadas e despojadas de raízes mais finas; delas foi isolado *Phytophthora cinnamomi*, um “fungo” oomiceta altamente agressivo, parasita de mais de 900 espécies de plantas lenhosas.



**Figura 1:** O declínio de *Quercus suber*.

a) Sobreiro doente;      b) Sobreiros mortos;  
(fotos recolhidas na zona do Ameixial, Algarve).

A partir dessa altura foram realizados vários trabalhos tendo em vista uma melhor caracterização e compreensão da doença. Hoje em dia, *P. cinnamomi* é considerado o factor principal da causa de morte do sobreiro e azinheira, mas ressalva-se que o declínio resulta de uma triangulação dinâmica entre o oomiceta (isolamentos com um potencial de virulência maior ou menor), o hospedeiro (que pode apresentar características de resistência ou

susceptibilidade) e o meio ambiente (com todos os seus factores bióticos e abióticos, que favorecem ora o hospedeiro ora o agente patogénico).

Na expectativa de encontrar informações que permitam um combate eficaz e racional da doença, o esforço de investigação continua, não só pela equipa da Universidade do Algarve, mas também por outros grupos, espalhados um pouco por todo o mundo, onde *P. cinnamomi* e outras espécies do género *Phytophthora* devassam colheitas agrícolas e florestais, com prejuízos muito avultados e ameaçam ecossistemas naturais de valor incalculável. Procuram-se plantas mais resistentes, boas práticas para evitar a propagação da doença, fungicidas eficazes, etc. Parte deste empenho é devotado ao aprofundar do conhecimento da biologia destes microrganismos, nomeadamente no que diz respeito aos aspectos moleculares da interacção planta-agente patogénico.

As **elicinas** são uma família única de proteínas de baixa massa molecular ( $\approx 10$  kDa) excretadas abundantemente por *Phytophthora* spp. Foram assim denominadas pela sua capacidade de estimular mecanismos de defesas em algumas plantas. Apesar de já ter sido descoberta uma actividade molecular para estas proteínas, como transportadoras de esteróis, o seu verdadeiro papel biológico ainda não está devidamente esclarecido, nomeadamente o seu envolvimento no processo infeccioso.

## OBJECTIVOS

Este trabalho visou contribuir para a elucidação da função biológica das elicinas através da obtenção de mutantes de *P. cinnamomi* em que foi inibida a expressão da  $\beta$ -cinamomina, uma das elicinas deste oomiceta. Esses mutantes foram usados em testes de patogenicidade, para avaliar as consequências da ausência dessa proteína na virulência. Foram ainda obtidos perfis de mRNA para identificar potenciais diferenças de expressão genética induzidas pela inibição da  $\beta$ -cinamomina.

Os objectivos concretos prosseguidos foram:

1. realizar a transformação genética de *P. cinnamomi* e silenciamento do gene da  $\beta$ -cinamomina (desenvolvido no Capítulo I);
2. conduzir testes de patogenicidade em iscos vegetais e em *Q. suber* com mutantes de *P. cinnamomi* (desenvolvido no Capítulo II);
3. efectuar a caracterização molecular de mutantes *P. cinnamomi* através de perfis de expressão genética (desenvolvido no Capítulo III).



## CAPÍTULO I

# TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Phytophthora cinnamomi* E SILENCIAMENTO DOS GENES DAS ELICITINAS



<b>INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	59
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	181



## I.1. INTRODUÇÃO

As elicitinas são um conjunto de proteínas que pode ser reunida numa única família altamente conservada. Os genes das elicitinas estão presentes em todas as espécies de *Phytophthora* analisadas e as elicitinas hoje em dia denominadas como “canônicas” são as proteínas mais abundantes nos filtrados de culturas (Ponchet *et al.*, 1999). Contudo, estas proteínas parecem estar limitadas aos oomicetas dos gêneros *Phytophthora* e *Pythium*, já que pesquisas no GENBANK e na base de dados de motivos proteicos Pfam não revelaram a existência de qualquer outro organismo com sequências parecidas com elicitinas (Jiang *et al.*, 2006). Foi investigada a presença de elicitinas noutros eucariotas filamentosos patogênicos para as plantas, nomeadamente em bibliotecas de EST (*Expressed Sequence Tags*)<sup>1</sup> de *Blumeria graminis*, *Cladosporium. fulvum* e *Magnaporthe grisea*, bem como no esboço da sequenciação do genoma de *M. grisea*; também foi pesquisado genoma completo de *Thalassiosira pseudonana*, um diátomo marinho pertencente à mesma linhagem Stramenopile que *Phytophthora* spp. Não foram encontradas quaisquer sequências de elicitinas ou sequências com elas relacionadas. (Jiang *et al.*, 2006). Por isso, é provável que as elicitinas possam ser responsáveis por novos mecanismos de interação, nomeadamente com as plantas.

### I.1.1. Caracterização das elicitinas

A inclusão de uma proteína na família das elicitinas depende da apresentação por parte dessa proteína do somatório de algumas características emblemáticas (Ponchet *et al.*, 1999):

- a ocorrência de uma assinatura típica das elicitinas, constituída por seis resíduos de cisteína localizados em posições conservadas e envolvidos em três ligações dissulfureto estruturalmente determinantes;
- uma estrutura primária global que representa uma sequência de aminoácidos (aa) única, definindo um domínio de 98 resíduos próprio das elicitinas.

As elicitinas apresentam uma composição em aa particular, marcada essencialmente pela ausência de triptofano, histidina e arginina, abundância de serina e treonina e, em menor grau, alanina e leucina.

---

<sup>1</sup> ESTs são sequências parciais de cDNA.

### I.1.1.1. Classes dentro da família das elicinas

Foi demonstrado que os genes das elicinas formam famílias complexas em várias espécies, tais como *P. infestans* (Kamoun *et al.*, 1997; Kamoun *et al.*, 1999b), *P. sojae* (Mao e Tyler, 1996; Qutob *et al.*, 2003), *P. cinnamomi* (Duclos *et al.*, 1998a), *P. cambivora* (Prévot, 2002; Pinto, 2001), *P. parasitica* (Panabières *et al.*, 2005) e *P. brassicae* (L. Belbahri e F. Mauch, comunicação pessoal citada em Jiang *et al.*, 2006). Foram construídas árvores filogenéticas a partir das sequências codificantes das elicinas que permitiram distinguir diferentes classes (Kamoun *et al.*, 1997a; Qutob *et al.*, 2003), abaixo brevemente descritas.

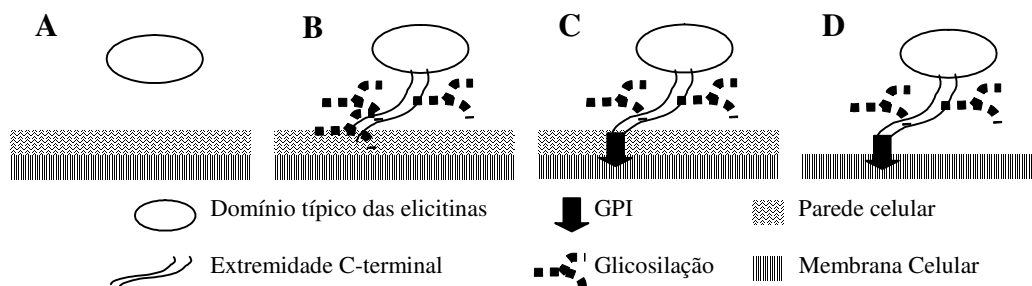
- Classe I: agrupa todas as elicinas constituídas apenas pelo domínio de 98 aa típico das elicinas e baixa massa molecular ( $\approx 10$  kDa). São proteínas solúveis, abundantemente produzidas e excretadas em culturas *in vitro*. Existem duas subclasses, IA e IB, caracterizadas pelo ponto isoelétrico (pI) dos seus membros: as elicinas ácidas, também denominadas  $\alpha$ -elicinas, possuem pI  $< 5$  e pertencem à subclasse IA; as elicinas básicas, também designadas como  $\beta$ -elicinas, têm pI  $> 7,5$  e correspondem à subclasse IB. São as elicinas “canónicas”, as primeiras a ser descobertas e também as mais estudadas.
- Classe Py: corresponde a elicinas ligeiramente divergentes da classe I produzidas por membros do género *Pythium*; possuem algumas características invulgares como a presença de resíduos de histidina e potenciais locais de glicosilação de asparagina.
- Classe II: contém as sequências codificantes para elicinas altamente ácidas (HAE, *Hyper Acidic Elicitins*); possuem 103-104 aa e, além do domínio conservado, possuem uma curta extremidade C-terminal hidrofílica.
- Classe III: reúne péptidos com 165-170 aa constituídos pelo domínio típico das elicinas seguidos de uma cauda C-terminal de composição rica em resíduos de serina, treonina e alanina, com arranjos sequenciais compatíveis com potenciais locais de glicosilação.

Contudo, também foram identificadas inúmeras sequências com divergências no domínio típico de elicinas e que não se enquadram em nenhuma das classes acima mencionadas, sendo referidas como “sequências semelhantes a elicinas” (Kamoun *et al.*, 1997a; Qutob *et al.*, 2003). Recentemente, Jiang *et al.*, (2006) propuseram um novo sistema para nomear/classificar as elicinas e as proteínas semelhantes a elicinas, de uma maneira

sistemática e consistente, baseando-se numa árvore filogenética alargada e com uma nomenclatura abreviada de três letras para as proteínas individuais. Deste modo, as elicitinas que partilham o domínio de 98 aa altamente conservados, com seis resíduos de cisteína espaçados segundo um padrão típico das elicitinas, são classificadas como ELIs (*ELIcitins*) e identificadas com as primeiras três ou quatro letras da espécie seguidas por um número. As proteínas semelhantes a elicitinas que possuam domínios mais curtos ou mais longos, divergentes ao nível das sequências conservadas em ELIs são classificadas como ELLs (*ELIcitins-Like*) e identificadas pelas duas ou três primeiras letras da espécie, seguidas de L e um número. Neste estudo filogenético foram usados 156 domínios derivados de sequências de ELIs e ELLs de *Phytophthora* e *Pythium*, que se agruparam em 17 conjuntos (quatro ELIs e treze ELLs). Os domínios típicos das elicitinas em ELIs e ELLs são de comprimento variável, mas todos eles possuem seis resíduos de cisteína em posições conservadas. Tendo por base o padrão de espaçamento das cisteínas, ELIs e ELLs podem ser classificadas em diferentes grupos, que coincidem com os conjuntos obtidos por reconstrução filogenética (Jiang *et al.*, 2006). Globalmente, todos os grupos filogenéticos de ELIs possuem um padrão de espaçamento do tipo C<sub>1</sub>-23-C<sub>2</sub>-23-C<sub>3</sub>-4-C<sub>4</sub>-14-C<sub>5</sub>-23-C<sub>6</sub>, ao passo que os grupos filogenéticos de ELLs apresentam um padrão do tipo C<sub>1</sub>-variável-C<sub>2</sub>-23-C<sub>3</sub>-4-C<sub>4</sub>-14-C<sub>5</sub>-variável-C<sub>6</sub> (Jiang *et al.*, 2006). As três ligações dissulfureto estabelecem-se sempre entre C<sub>1</sub> e C<sub>5</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>4</sub>, C<sub>3</sub> e C<sub>6</sub>.

A maior parte das ELIs e ELLs possui um péptido sinal na extremidade N-terminal, antes do domínio conservado, e muitas (à excepção das ELIs canónicas) possuem ainda uma extremidade C-terminal alongada, após o domínio conservado. Este prolongamento C-terminal aparenta ter uma composição particular, especialmente rica em resíduos de treonina, serina e prolina, sugerindo uma associação com a parede celular. Estes resíduos fazem muitas vezes parte de sequências repetidas, apresentando vários motivos para potenciais locais de glicosilação do tipo O-GalNAc e regiões hidrofóbicas com motivos para locais de ligação à membrana celular do tipo GPI, ligação lipídica glicosilfosfatidilinositol (GPI, *Glycosyl Phosphatidyl Inositol*) (Jiang *et al.*, 2006). De facto, foi experimentalmente demonstrado que INF2A é uma proteína associada à parede celular (Vleeshouwers e Govers, dados não publicados citados em Jiang *et al.*, 2006).

A Figura I.1 é uma representação esquemática dos vários tipos de ELIs e ELLs baseados na presença ou ausência de extremidade C-terminal e nos motivos estruturais encontrados nesse domínio C-terminal.



**Figura I.1:** Representação esquemática das ELIs e ELLs. (A) ELIs excretadas para o meio de cultura; (B) ELIs e ELLs que se prevê estarem ligadas à parede celular por extensa glicosilação da extremidade C-terminal; (C) ELLs que se julga estarem ligadas à membrana celular por GPI; (D) ELLs que se especula estarem ligadas à membrana celular de zoósporos de *Phytophthora*. (Figura adaptada de Jiang *et al.*, 2006)

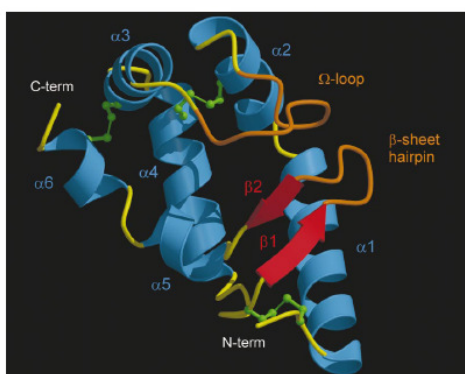
### I.1.1.2. Organização e estrutura dos genes das elicinas

Foi demonstrada a existência de *clusters* genômicos de genes *eli* em *P. cryptogea* (Panabières *et al.*, 1995), *P. cinnamomi* (Duclos *et al.*, 1998a), *P. infestans* (Jiang *et al.*, 2005, 2006), *P. sojae*, *P. ramorum* (Jiang *et al.*, 2006) e evidências experimentais apontam no mesmo sentido relativamente a *P. cambivora* (Prévot, 2002; Pinto 2001). O agrupamento de genes *ell* também foi observado em *P. sojae* e *P. ramorum* (Jiang *et al.*, 2006).

Os genes das elicinas caracterizados até agora não apresentam intrões (Panabières *et al.*, 1997; Panabières *et al.*, 1995; Duclos *et al.*, 1998a; Kamoun *et al.*, 1993). Tal como outras proteínas excretadas, as elicinas são sintetizadas como pré-proteínas que sofrem uma modificação após a tradução, com a remoção de um peptídeo sinal. Este peptídeo possui 18-20 aa e é altamente conservado, sugerindo que os precursores das elicinas são provavelmente processados e excretados segundo mecanismos similares (Panabières *et al.*, 1995; Panabières *et al.*, 1997; Kamoun *et al.*, 1993; Kamoun *et al.*, 1997a). A região não traduzida a jusante destes genes (5'UTR, 5'*UnTranslated Region*) possui 40-60 pares de bases (pb) e nela foi possível identificar uma curta sequência consensual de 17 pb que constitui o local de iniciação da transcrição (TSS, *Transcription Start Site*) (Kamoun *et al.*, 1993; Panabières *et al.*, 1995; Duclos *et al.*, 1998a). A região correspondente ao local de ligação do ribossoma apresenta um motivo CAAG conservado em alguns genes de elicinas e, globalmente, a zona 5'UTR parece apresentar semelhanças entre genes da mesma classe (Ponchet *et al.*, 1999). A região não traduzida a montante destes genes (3'UTR) contém 103-197 pb e é altamente variável; contudo foi possível identificar o local do sinal de poliadenilação, ATGAA (Ponchet *et al.*, 1999).

### I.1.1.3. Estrutura tridimensional das elicitinas

As estruturas terciárias de duas elicitinas canónicas básicas já foram determinadas e apresentam grandes semelhanças entre si:  $\beta$ -criptogeína (Boissy *et al.*, 1996; Fefeu *et al.*, 1997) e  $\beta$ -cinamomina (Rodrigues *et al.*, 2002). São proteínas globulares cuja organização tridimensional é única entre as estruturas terciárias actualmente conhecidas e caracteriza-se essencialmente pela existência de seis hélices  $\alpha$ , uma pequena folha  $\beta$  antiparalela e dois ganchos sobressaídos (o gancho da folha  $\beta$  e outro do tipo  $\Omega$ ) como enrolamentos secundários. Conforme mostra a Figura I.2, o gancho  $\Omega$ , a folha  $\beta$  e o seu respectivo gancho formam um motivo singular, semelhante a um bico. Três pontes dissulfureto forçam um enrolamento em que as extremidades N- e C- são mantidas presas e ligam as hélices  $\alpha 2$  e  $\alpha 4$ , estando presente também uma grande cavidade hidrofóbica no interior, ligada à superfície por um túnel. (Rodrigues *et al.*, 2002).



**Figura I.2:** Representação da estrutura secundária de um monómero de  $\beta$ -cinamomina. As hélices  $\alpha$  estão representadas a azul, as folhas  $\beta$  a vermelho e os resíduos de cisteína que formam as ligações dissulfureto a verde; o motivo semelhante a bico está representado a laranja (Figura adaptada de Rodrigues *et al.*, 2002).

A presença das ligações dissulfureto tem um papel importante na grande estabilidade das elicitinas face à degradação térmica e digestão por parte de exopeptidases nas plantas (Zanetti *et al.*, 1992).

Em solução aquosa, e a partir de determinadas concentrações, a criptogeína tem a capacidade de dimerizar (Gooley *et al.*, 1998).

### I.1.1.4. Actividade molecular das elicitinas

Os dados que permitiram a primeira atribuição de uma actividade molecular efectuada por elicitinas resultaram de estudos bioquímicos que revelaram que as elicitinas canónicas eram capazes de se ligar a esteróis (entre eles fitoesteróis produzidos pelas plantas) e de os transferir entre membranas fosfolipídicas artificiais (Mikes *et al.*, 1997; Mikes *et al.*, 1998).

Estes dados foram confirmados com a determinação da estrutura de um complexo elicitina/ergosterol (Boissy *et al.*, 1999), que mostraram uma molécula de ergosterol complexada na cavidade hidrofóbica da proteína. As elicitinias também possuem aptidão para capturar esteróis das membranas celulares de células vegetais (Vauthrin *et al.*, 1999). Foi demonstrado que as elicitinias são capazes de complexar ácidos gordos (principalmente não saturados), embora com menos afinidade (Osman *et al.*, 2001a), e que a cavidade hidrofóbica das elicitinias não é apta para receber triterpenos (Rodrigues *et al.*, 2006).

Outro dado relativo a uma possível actividade molecular de um membro da grande família das elicitinias tem origem em pesquisas em *P. capsici*, onde foram identificadas ELIs com actividade de fosfolipase (Nespoulos *et al.*, 1999). Contudo, essa propriedade não foi detectada na  $\gamma$ -megaspermina, ELI produzida por *P. megasperma* e que possui homologia com as ELIs fosfolipasas de *P. capsici* (Baillieul *et al.*, 2003).

### **I.1.1.5. Efeitos bioquímicos e fisiológicos induzidos em plantas por elicitinias**

As elicitinias foram assim denominadas pela sua capacidade de estimular mecanismos de defesas em (algumas) plantas. A resposta hipersensível (HR, *Hypersensitive Response*) é a característica mais vulgarmente associada com a resistência activa das plantas e segue-se ao ataque primário de um patogénio. A HR traduz-se numa série de eventos bioquímicos e fisiológicos que levam à morte rápida das células no local de infecção, resultando na restrição do patogénio em pequenas áreas que circundam as células inicialmente infectadas (lesões necróticas) (Ponchet *et al.*, 1999). Nalgumas situações, o desenvolvimento de HR é seguido pela indução de resistência localizada adquirida (LAR, *Localized Acquired Resistance*) e/ou resistência sistémica adquirida (SAR, *Systemic Acquired Resistance*), desencadeadas por sinais produzidos pela planta que se difundem a partir das células que exibem HR. Durante a LAR ocorre uma forte expressão de defesas de largo espectro, que criam localmente um ambiente altamente inóspito para o patogénio invasor. A SAR fornece um nível de resistência baixo, embora significativo, contra uma infecção subsequente. A SAR desenvolve-se para além dos tecidos que exibem a LAR, ocorrendo não só nas células da planta inicialmente infectadas mas também em todos os outros tecidos do hospedeiro (Baillieul *et al.*, 2003).

O conhecimento sobre os mecanismos de patogenicidade em oomicetas permanece fragmentário e o papel das elicitinias na virulência não está devidamente esclarecido. Estas proteínas são consideradas efectores, moléculas do patogénio que manipulam a estrutura e

funções celulares das células do hospedeiro e por esse meio facilitam a infecção e/ou induzem respostas de defesa (Kamoun, 2003). Os efectores podem ser toxinas e/ou eliciadores e no caso das elicinas existem evidências que suportam esta dualidade.

A actividade bioquímica das elicinas canónicas tem sido amplamente estudada em plantas e em culturas celulares, especialmente em *Nicotiana tabacum* (tabaco). Após o tratamento de células de tabaco com elicinas foi possível observar uma série de eventos:

- Aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , por influxo (Tavernier *et al.*, 1995a);
- Produção extracelular de espécies oxigenadas muito reactivas ( $\text{H}_2\text{O}_2$  e outros) (ROS, *Reactive Oxygen Species*) (Rustérucchi *et al.*, 1996; Simon-Plas *et al.*, 1997);
- Activação de proteínas MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998, 2001);
- Fosforilação de proteínas (Viard *et al.*, 1994; Tavernier *et al.*, 1995a; Lecourieux-Ouked *et al.*, 2000);
- Alcalinização do meio extracelular (Blein *et al.*, 1991);
- Acidificação do meio intracelular (Pugin *et al.*, 1997);
- Peroxidação de lípidos (Stallaert *et al.*, 1995);
- Alteração no conteúdo lipídico celular (Tavernier *et al.*, 1995b);
- Modificações na parede celular (Kieffer *et al.*, 2000);
- Produção de NO (Foissner *et al.*, 2000)
- Efluxo rápido de  $\text{NO}_3^-$  (Wendehenne *et al.*, 2002);
- Fragmentação do DNA (Sasabe *et al.*, 2000);
- Despolarização da membrana celular (Pugin *et al.*, 1997; Wendehenne *et al.*, 2002);
- Bloqueio do influxo de glucose (Bourque *et al.*, 2002);
- Quebra severa na rede microtubular que assegura o citoesqueleto (Binet *et al.*, 2001);
- Produção de etileno (Milat *et al.*, 1991b);
- Produção de fitoalexinas como o capsidiol (Milat *et al.*, 1991b) e a escopoletina (Baillieul *et al.*, 2003);

- Produção de proteínas relacionadas com a patogenicidade (proteínas PR, *Pathogenesis-Related*) (Suty *et al.*, 1995; Keller *et al.*, 1996 a, b);
- Aumento da expressão de subunidades específicas do proteossoma 26S (Dahan *et al.*, 2001).

Outras moléculas relacionadas com a resposta induzida por elicinas foram também identificadas, tais como proteínas relacionadas com choque térmico, (HSP, *Heat-Shock Proteins*) (Kanzaki *et al.*, 2003), e SGT1, uma ligase associada à ubiquitina (Peart *et al.*, 2002; Huitema *et al.*, 2005).

A sequência exacta dos eventos atrás mencionados, bem como as suas relações intrínsecas de dependência nas cascatas de sinalização que levam à morte celular e/ou a resistência, ainda não estão completamente esclarecidas. Contudo, é consensualmente aceite que o desencadear de todos eles passa pelo reconhecimento das elicinas efectuado por receptores localizados na membrana citoplasmática das células vegetais. Locais de ligação de alta afinidade das elicinas identificados em membranas celulares de tabaco (Wendehenne *et al.*, 1995; Bourque *et al.*, 1998) foram caracterizados bioquimicamente e revelaram um complexo glicoproteico composto com duas unidades de 162 e 50 kDa (Bourque *et al.*, 1999) que constitui o presumível receptor das elicinas.

A nível citológico também é possível observar fenómenos induzidos pela elicinas. Foi demonstrada a destruição de cloroplastos (Milat *et al.*, 1991; Heiser *et al.*, 1999) e modificações estruturais severas foram observadas em células de tabaco tratadas com filtrados de cultura de *P. quercina* ou com criptogéina (Oßwald *et al.*, 1999): perda de turgescência, desorganização das células do parênquima, alterações nas paredes celulares, degradação da membrana dos tilacóides e do envelope dos cloroplastos.

A capacidade de indução de necroses típicas da HR por tratamento com elicinas canónicas foi amplamente investigada em inúmeras famílias de plantas. Globalmente, as plantas são consideradas insensíveis às elicinas e as excepções a esta regra encontram-se no género *Nicotiana* e nalguns cultivares das espécies *Brassica campestris*, *Raphanus sativus* (Kamoun *et al.*, 1993a) e *B. napus* (Bonnet *et al.*, 1996). Nestes estudos, os sintomas observados nas plantas reactivas apresentavam grandes diferenças quantitativas entre cultivares distintos, que se apresentavam assim mais ou menos sensíveis aos tratamentos. Recentemente, a gama de plantas sensíveis ao tratamento com elicinas foi alargada:

Vleeshouwers *et al.* (2006) identificaram alguns clones das espécies *Solanum huancabambense* e *S. microdontum* que respondem às elicinas de *P. infestans*.

Duas cultivares de *B. rapa* foram tratadas com elicinas de *P. cinnamomi* e foi observado que uma das cultivares apresentava necroses severas e a outra não (Takemoto *et al.*, 2005). Macroscopicamente, estas cultivares constituiriam um exemplo de sensibilidade e insensibilidade às elicinas. Contudo, exames microscópicos revelaram morte celular localizada na cultivar supostamente “insensível” e a expressão de vários genes de defesa apresentou níveis idênticos em ambas cultivares. Também foram testadas várias espécies de *Nicotiana*, outras cultivares de *B. rapa* e *R. sativus* e verificou-se sempre a existência de morte celular microscópica após o tratamento com elicinas, indicando isto que a percepção das elicinas não é específica da cultivar/espécie. Testes efectuados com elicinas produzidas por outras espécies de *Phytophthora*, nomeadamente *P. megasperma*, *P. sojae*, *P. cryptogea*, *P. nicotianae* e *P. capsici*, nas duas cultivares de *B. rapa* e em *N. tabacum* revelaram actividades indutoras de necroses comparáveis, pelo que a percepção das elicinas parece ser um fenómeno específico da interacção género do patógeno (*Phytophthora*)/género da planta. Também foram testados 53 cultivares de *Arabidopsis* e uma cultivar de *Lycopersicon esculentum* (tomateiro) que não mostraram qualquer tipo de morte celular em resposta ao tratamento com elicinas, confirmando que este género não responde a estas proteínas e apontando diferenças fundamentais entre as espécies de plantas verdadeiramente insensíveis e as espécies/cultivares também chamadas “insensíveis” do género *Nicotiana*, *Brassica* e *Raphanus* (Takemoto *et al.*, 2005).

Os resultados das experiências sobre o poder necrótico das elicinas descritas anteriormente são os mais aceites; contudo surgiram publicações relatando trabalhos que configuram as elicinas como toxinas não específicas, indutoras de necroses em todas as plantas (Pernollet *et al.*, 1993; Huet *et al.*, 1994) ou que alargam o leque das plantas sensíveis a outros membros da família das Solanáceas (tomateiro, batateira, pimento) (Grant *et al.*, 1996). A palmivorina,  $\alpha$ -elicina produzida por *P. palmivora*, induziu necroses em folhas de tabaco e perda de peso fresco numa forma dependente do tempo e da dose de elicina usada no tratamento (Churngchow e Rattarasarn, 2000). Folhas da árvore-da-borracha (*Hevea brasiliensis*) representantes de dois cultivares distintos, um resistente e o outro susceptível, submetidas ao mesmo procedimento também apresentaram necroses e diminuição de peso, embora tenha sido verificado que a sensibilidade às elicinas era maior no caso do cultivar susceptível: a dose necessária para a detecção das necroses em tabaco e no cultivar *H.*

*brasiliensis* resistente foi cinco vezes mais elevada do que a dose necessária para identificar necroses no cultivar susceptível. As necroses bem limitadas nos tecidos resistentes apontam para uma resposta hipersensível dum hospedeiro resistente numa interacção incompatível; contudo a necrose severa e extensa observada nas folhas susceptíveis indica reacção compatível (Churngchow e Rattarasarn, 2000). Existem ainda outros casos em que as elicitinas parecem ter um papel de toxinas associadas a sintomas em plantas fora dos géneros que exibem a HR típica. A aplicação de  $\beta$ -cinamomina (elicitina produzida por *P. cinnamomi*) em folhas de sobreiro, provocou uma resposta constituída fenotipicamente por mudança de cor nas folhas, que se apresentaram totalmente amarelas ao fim de 4 dias de contacto com a elicitina (Aurélio, 1999) enquanto que filtrados de meios de cultura de *P. gonapodyides* e de *Pythium* grupo P provocaram o emurchecimento em plântulas de *Quercus robur* (Jung *et al.*, 1996). Nestas circunstâncias o papel da elicitina ainda permanece ambíguo, entre factor de avirulência ou patogenicidade.

Outro aspecto da acção das elicitinas que pode ser interpretado como papel de avirulência e virulência, simultaneamente, é a inibição imediata da absorção de glucose em células de tabaco tratadas com elicitinas e que não é atribuída à despolarização da membrana celular (Bourque *et al.*, 2002). A inibição dos transportadores de glucose apareceu associada a um forte decréscimo na taxa de oxigenação e a uma grande despolarização da membrana mitocondrial. Estes fenómenos poderão intervir na morte celular resultante da HR. Todavia, durante uma infecção, tanto a planta como o fitopatogénio competem para os solutos contidos no espaço apoplástico que os separa. Esta competição é particularmente importante no caso dos açúcares, que fornecem energia e são também elementos estruturais. Portanto, a capacidade relativa das plantas e dos microrganismos invasores controlarem a assimilação de açúcares e outros nutrientes do apoplasto pode ser determinante para o resultado final da interacção. Além da disponibilidade de carbono, esta competição pode ainda afectar a expressão genética dos elementos envolvidos na interacção, através da leitura das concentrações de açúcares no apoplasto e no protoplasma. Nas folhas infectadas que sofrem HR, a morte celular localizada induzida por um eliciador é crucial na activação das reacções de defesa dos tecidos circundantes, de modo a restringir o crescimento ulterior do patogénio. A rápida acção da criptogeína em células de tabaco indica que um dos primeiros passos neste processo é a paralisação da importação de hexoses a partir do apoplasto. Apesar desta fonte de carbono ficar completamente disponível para o invasor, a inibição da assimilação de glucose beneficiaria a planta pela aceleração das respostas mediadas pela morte celular. A acção dos

transportadores de glucose nas plantas parece uma encruzilhada nas estratégias do patogénio e da planta, que tentam ambos assegurar a sua sobrevivência e propagação (Bourque *et al.*, 2002).

Ainda não está esclarecida a razão pela qual algumas plantas reagem às elicitinias e outras não. Os supostos receptores de elicitinias estão presentes nas membranas plasmáticas de várias outras plantas, inclusive de espécies não reactivas às elicitinias (Bourque *et al.*, 1999). Especula-se que nas plantas não reactivas o receptor não seja funcional ou que um dos componentes da cascata de transdução do sinal iniciado pela ligação das elicitinias esteja ausente ou inactivo (Bourque *et al.*, 1999). Outro motivo poderá residir na adsorção destas proteínas às paredes celulares vegetais, impedindo-as de atingir os receptores na membrana. Esta interacção é muito forte no tomateiro, planta não reactiva, ao passo que essa mesma absorção é fraca no tabaco (Ponchet *et al.*, 1999). As plantas possuem pequenas proteínas transportadoras de lípidos (LPT, *Lipid Transfer Proteins*) para as quais foi demonstrada ligação ao mesmo receptor das elicitinias (Buhot *et al.*, 2001). A falta de reactividade da maioria das plantas face à exposição a elicitinias poderá dever-se à competição das LPTs endógenas e das elicitinias exógenas para os mesmos receptores (Blein *et al.*, 2002). Esta hipótese é reforçada pelo facto do conteúdo em LPTs de plantas não reactivas (tomateiro, por exemplo) ser aproximadamente dez vezes superior à concentração de LPTs presente nas plantas reactivas (tabaco, por exemplo). Em alternativa, a ligação das elicitinias pode reflectir um fenómeno que não está relacionado, ou que o está indirectamente, com a activação das defesas (Takemoto *et al.*, 2005).

Kadota *et al.* (2005) relataram que os eventos desencadeados pelas elicitinias em células vegetais estão relacionados com o ciclo celular, já que a transdução de sinais intracelulares depende da fase do ciclo celular em que essas células se encontram. Em células de tabaco com ciclos celulares sincronizados, a exposição à criptogéina de células nas fases G<sub>2</sub> e M não provocou um aumento significativo da concentração citosólica de Ca<sup>2+</sup> observado em células tratadas nas fases G<sub>1</sub> ou S. O tratamento das células com criptogéina durante as fases G<sub>2</sub> e M induziu uma fase transiente de activação rápida das MAPKs e produção rápida de ROS, ao passo que o tratamento durante as fases G<sub>1</sub> ou S desencadeou respostas difásicas (transientes/rápidas e prolongadas/lentas) na activação das MAPKs e produção de ROS. Também, só após o tratamento durante as fases G<sub>1</sub> ou S é que foram induzidas a paragem do ciclo celular e a expressão de genes relacionados com a defesa e a morte celular (Kadota *et al.*, 2004). O receptor membranar da criptogéina é um forte candidato para ser alvo de

regulação diferencial durante as diferentes fases do ciclo celular e para mediar os diferentes comportamentos acima mencionados (Kadota *et al.*, 2005). Estes resultados sugerem que zonas em divisão celular activa, como meristemas, folhas jovens e plântulas, poderão não induzir fortes reacções de defesa porque incluem células em fase G2 ou M (Kadota *et al.*, 2004), pelo que os resultados obtidos em tecidos vegetais juvenis tratados com elicitininas deverão ser cuidadosamente reavaliados.

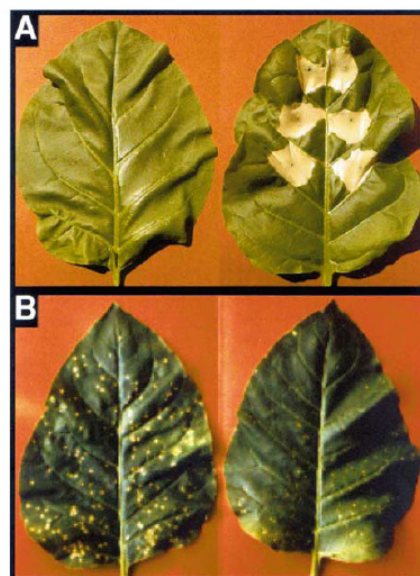
A competência de indução de SAR por tratamento com elicitininas foi observada contra uma grande variedade de agentes fitopatogénicos: fungos (Bonnet *et al.*, 1996; Blancard *et al.*, 1998; Picard *et al.*, 2000), bactérias (Kamoun *et al.*, 1993a; Ponchet *et al.*, 1999), vírus (Cordelier *et al.*, 2003, Figura I.3), fitoplasmas (Lherminier *et al.*, 2003) e oomicetas (Bonnet *et al.*, 1996; Lherminier *et al.*, 2003). Estudos citológicos demonstraram que esta resistência contra a infecção se manifesta com modificações conducentes ao reforço de barreiras físicas que evitem a entrada dos patogénios e restrinjam a colonização do tecido do hospedeiro, bem como a criação de ambientes tóxicos que prejudiquem o invasor (Lherminier *et al.*, 2003; Picard *et al.*, 2000). Assim, pesquisas citológicas revelaram, por exemplo, a deposição de calose na parede celular das plantas, impregnação com polímeros semelhantes a lenhina e compostos fenólicos e acréscimo em glicoproteínas ricas em hidroxiprolina. A nível bioquímico a SAR traduz-se essencialmente pela acumulação de fitoalexinas e proteínas PR (Baillieul *et al.*, 2003).

**Figura I.3:** SAR contra a infecção do vírus do mosaico do tabaco (Tmv, *Tobacco mosaic virus*) em plantas de tabaco tratadas com  $\gamma$ -megaspermina.

(A) Sintomas induzidos pela infiltração de água (folha da esquerda) ou elicitina (folha da direita).

(B) Folhas inoculadas com Tmv de uma planta tratada com água (esquerda) e de uma planta tratada com elicitina (direita).

(Figura adaptada de Cordelier *et al.*, 2003).



Segundo Huitema *et al.* (2005), a variação da resistência de *Nicotiana* spp a *P. infestans* é acompanhada por variação da resposta das plantas às proteínas INF. A capacidade

de *N. tabacum*, mas não de *N. benthamiana*, reagir a INF2B (Huitema *et al.*, 2005) poderia explicar as diferenças na resistência a *P. infestans* por parte destas duas espécies (Kamoun, 2001; Kamoun *et al.*, 1998b). Isolamentos de *P. infestans* que não expressam INF1 conseguiram colonizar *N. benthamiana* mas não outras *Nicotiana* spp, incluindo tabaco (Kamoun *et al.*, 1998b). Isto levou à hipótese de que a resistência a *P. infestans* em *N. benthamiana* é principalmente induzida por INF1, ao passo que a resistência observada em tabaco poderá envolver outros factores ou eliciadores (Kamoun, 2001; Kamoun *et al.*, 1998b), sendo INF2B um desses outros potenciais factores de avirulência (Huitema *et al.*, 2005). No entanto, Beckett *et al.* (2006) identificaram vários isolamentos de *P. infestans* com produção INF1 que mantêm a capacidade de infestar *N. benthamiana*, o que contradiz a possibilidade desta elicítina funcionar com factor de avirulência na interacção *P. infestans/N. benthamiana* (a menos que no futuro se venha a demonstrar a ausência de síntese de INF1 durante o processo de colonização dos tecidos).

Kamoun *et al.* (1997b) testaram nove espécies dentro do género *Solanum* (num total de dezanove representantes de vários cultivares com diferentes níveis de resistência a *P. infestans*) para a reactividade à INF1 (proteína da classe IA) e nenhuma delas apresentou HR. Assim, dentro do género *Solanum*, a resistência a *P. infestans* não parece ser mediada por uma resposta de defesa induzida por INF1. Dados que corroboram esta hipótese foram recentemente publicados por Vleeshouwers *et al.* (2006), que identificaram alguns clones susceptíveis das espécies *S. huancabambense* e *S. microdontum* que respondem às elicitinias INF1, INF2A e INF2B.

A elucidação de alguns dos mecanismos moleculares da defesa das plantas tornou possível a modificação genética das plantas com um nível de resistência a patógenos melhorado através da activação das suas respostas de defesa endógenas. A introdução nas plantas de genes que permitam a expressão de eliciadores, como as elicitinias, constitui uma hipótese para a obtenção de plantas com resistência duradoura. Foram obtidas plantas de tabaco transgénicas onde a expressão do gene da criptogéina induziu resistência de largo espectro, não só contra *P. nicotianae* (Tepfer *et al.*, 1998; Keller *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2004), mas também contra fungos (Jiang *et al.*, 2004; Keller *et al.*, 1999) e bactérias (Jiang *et al.*, 2004). Estas plantas também exibiram tolerância ao stress salino, devido ao facto da criptogéina também activar a expressão de genes envolvidos nos processos de stress abióticos, como seca e salinidade (Jiang *et al.*, 2004).

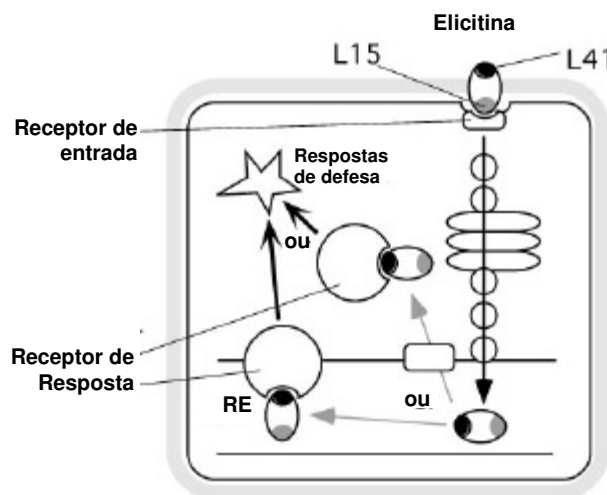
O desenvolvimento de necroses e o estabelecimento de SAR são duas respostas distintas às elicinas, que se desenvolvem com parâmetros cinéticos e quantitativos próprios, mas ambas dependentes do reconhecimento inicial das elicinas. Em plantas que demonstraram um potencial de produção de necrose em resposta às elicinas, não foi possível estabelecer uma relação quantitativa entre a extensão das necroses e a intensidade da SAR, quando diferentes genótipos e diferentes elicinas foram usados. Por exemplo, elicinas acídicas induziram resistência em tabaco e não provocaram necroses, ao passo que não foi possível induzir SAR em cultivares de *B. napus* que apresentavam necroses (Bonnet *et al.*, 1996). Oligandrina, elicina produzida por *Pythium oligandrum*, não provoca HR em folhas de tomateiro mas confere resistência desta planta à invasão por *Phytophthora parasitica* (Picard *et al.*, 2000) e *Fusarium oxysporum* (Benhamou *et al.*, 2001). A sojeína, elicina ácida produzida por *P. sojae*, induz HR em tabaco mas não em plantas de soja, apesar de activar a expressão de genes de defesa nesta planta (Becker *et al.*, 2000).

Os estudos de indução de HR e SAR foram efectuados com aplicação local das elicinas por infiltração nos tecidos de folhas ou por administração das mesmas em ápices (caules ou raízes) decapitados e pecíolos de folhas destacadas. As necroses nos locais de infiltração são resultado do contacto directo das elicinas com as células que sofrem HR e a necrose distal (provocada em locais distantes da zona de aplicação da proteína) deve-se ao facto destas proteínas serem transportadas no sistema vascular das plantas (Devergne *et al.*, 1992; Zanetti *et al.*, 1992). Contudo, a SAR não é consequência deste movimento sistémico. Quando infiltradas, as elicinas permanecem estritamente localizadas (Baillieul *et al.*, 1996; Keller *et al.*, 1996) e o desenvolvimento de SAR nessas circunstâncias só pode dever-se à difusão sistémica de sinais produzidos pela própria planta em resposta ao contacto com as elicinas (Dorey *et al.*, 1997; Cordelier *et al.*, 2003; Baillieul *et al.*, 2003).

Dada a capacidade de translocação das elicinas através do sistema vascular das plantas, pareceu plausível que elas fossem responsáveis pelo aparecimento de sintomatologia em partes da planta não infectadas pelo patógeno. Contudo, o tratamento de folhas de *Fagus sylvatica* (faia) com citricolina não fomentou a redução precoce da taxa de fotossíntese ou alterações nas relações hídricas, fenómenos observados neste mesmo tipo de folhas após a infecção de raízes de plântulas de faia por *P. citricola* e em folhas de tabaco tratadas com esta elicina (Fleischmann *et al.*, 2005). Num ensaio com folhas de castanheiro, a criptogéina e a parasiticeína também não alteraram a condutância estomática (Maurel *et al.*, 2004). Estas observações excluem as elicinas como sinais sistémicos das plantas infectadas insensíveis.

A actividade necrótica das elicitinias varia consoante a classe em que estão incluídas e a dose em que são aplicadas. As elicitinias básicas demonstraram ser mais activas que as elicitinias ácidas. As  $\beta$ -elicitinias induzem mais HR distal que as  $\alpha$ -elicitinias (Kamoun *et al.*, 1993a; Bourque *et al.*, 1998; Baillieul *et al.*, 2003) e em ensaios por infiltração com doses decrescentes de elicitinias, foi observado que a concentração mínima para as  $\beta$ -elicitinias induzirem necroses é menor que a das  $\alpha$ -elicitinias (Baillieul *et al.*, 2003). Esta diferença de actividade também foi observada a nível da indução de respostas bioquímicas em culturas celulares (Dorey *et al.*, 1999; Koehl *et al.*, 2003; Fleischmann *et al.*, 2005). Um motivo apontado para estas diferenças entre elicitinias básicas e ácidas foi a diferença nas respectivas cargas eléctricas. Um ponto isoeléctrico ácido poderia restringir a difusão da elicitina no pH fisiológico ácido registado ao nível da parede celular carregada negativamente, resultando em menores quantidades de elicitina ácida a interagir com a membrana celular (Kamoun *et al.*, 1993a; Baillieul *et al.*, 2003).

Segundo Tyler (2002) existem evidências que as elicitinias podem entrar dentro das células de tabaco na ausência do patogénio e podem ligar-se a factores de transcrição envolvidos na expressão dos genes de defesa, uma propriedade que aponta para um papel positivo das elicitinias na patogenicidade. Além disso, este autor propôs um modelo para a entrada das elicitinias nas células via endocitose mediada por um receptor (Figura I.4).



**Figura I.4:** Modelo de entrada das elicitinias em células de tabaco por endocitose mediada por um receptor e interação com receptor intracelular.

O receptor intracelular pode estar no retículo endoplasmático (RE) ou então a elicitina pode entrar para o citoplasma, via translocação retrógrada, e interagir com o receptor citoplasmático. L15 e L41 indicam regiões distintas na superfície da molécula de elicitina (vide texto abaixo).

(Figura adaptada de Tyler, 2002)

Foram efectuados estudos de mutagénese dirigida para averiguar quais as responsáveis pelas diversas características das elicitinias, nomeadamente o seu poder necrótico (O'Donohue *et al.*, 1995; Perez *et al.*, 1997, 1999), capacidade de induzir resistência, captura de esteróis (Osman *et al.*, 2001b). Nestas pesquisas, foi observado, por exemplo, que o resíduo na

posição 13 é o principal, embora não o único, responsável pela diferença no poder necrótico verificada entre  $\beta$ - e  $\alpha$ -elicitinias (O'Donohue *et al.*, 1995). Doyle (2000) identificou dois locais na superfície da molécula de elicitina centrados nos resíduos de leucina (L) nas posições 15 e 21, que são importantes para a actividade eliciadora mas não afectam a ligação aos esteróis. A falha na resposta de defesa provocada por mutações na zona L15 poderia ser eliminada se a proteína fosse expressa no interior das células mas a falha provocada por mutações na região L41 não (Doyle, McClean e Tyler, resultados não publicados citados em Tyler, 2002). Esta observação levantou a hipótese da região L15 ser necessária para a entrada na célula, ao passo que a zona L41 estaria envolvida na ligação ao receptor interno, conforme o modelo proposto na Figura I.4. As diferenças nas actividades biológicas das elicitinias básicas e ácidas poderão dever-se à sua diferente afinidade para a ligação de esteróis (mais eficiente para as  $\beta$ -elicitinias), pois foi sugerido que a complexação de esteróis é necessária para a interacção das elicitinias com locais de ligação de alta afinidade (Osman *et al.*, 2001b). Todavia, foi observado que não existe diferença significativa do efeito necrótico em folhas de tabaco entre a  $\beta$ -cinamomina na forma livre e a sua forma complexada com ergosterol (Rodrigues *et al.*, 2006) o que remete o papel dos complexos para os acontecimentos que precedem o arranque das respostas de defesa das plantas. Hirasawa *et al.* (2004) produziram mutações em criptogéina que impediram ou diminuíram a capacidade de ligação a esteróis e relataram que a forma livre das elicitinias é capaz de induzir alcalinização do meio extracelular, mas que só a forma complexada com lípidos consegue provocar produção de ROS e morte celular em células de tabaco. Lochamn *et al.* (2005) construíram formas mutantes da criptogéina cujas modificações se localizam essencialmente ao nível dos resíduos da cavidade hidrofóbica, visando uma alteração na capacidade para a complexação de lípidos. A indução da síntese de ROS e modificações de pH (eventos precoces) em células de tabaco por parte destas proteínas mutadas foi proporcional à sua capacidade de ligação a esteróis mas não a ácidos gordos. Apesar de o complexo elicitina-esterol ter sido indicado como a forma capaz de iniciar a reacção de defesa em tabaco, algumas proteínas incapazes de complexar esteróis induziram os eventos precoces. Experiências de modelação mostraram que as alterações de conformação verificadas após a introdução de alguns resíduos volumosos são semelhantes às alterações de conformação resultantes da ligação ao estero. Estas mudanças de configuração poderão ser necessárias à iniciação da síntese de ROS e à indução de variações de pH pelas elicitinias. Contudo, foi verificado que as capacidades de estimular necroses e expressão de proteínas de defesa não estavam relacionadas, nem com a capacidade

de ligação a lípidos, nem com a capacidade de iniciar eventos precoces (Lochamn *et al.*, 2005). Isto pode ser explicado pelo facto da interacção da criptogéina com células de tabaco activar MAPKs do tipo Tir que não estão ligadas à produção de ROS (Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000), ao passo que a via sinalizadora do receptor à produção eventos precoces não inclui cinases proteicas do tipo Tir (Kasparovsky *et al.*, 2004). Além disso, a capacidade de indução de SAR pode não estar ligada aos sintomas necróticos (Picard *et al.*, 2000; Benhamou *et al.*, 2001) e a extensão das necroses também aparenta não estar relacionada com o nível de resistência (Bonnet *et al.*, 1996), devendo a actividade protectora depender do número de resíduos básicos que contribuem para a carga da elicitina (O'Donohue *et al.*, 1995). Assim, as elicitinias poderão estimular duas vias de sinalização distintas. A primeira induz necroses e expressão de proteínas PR, incluindo cinases proteicas do tipo Tir e MAP-cinases, e depende da estrutura global e carga da proteína; a segunda via é mediada pelas fosfolipase C e cinase proteica C, induzindo a síntese de ROS e modificações de pH, sendo dependente da capacidade das elicitinias complexarem esteróis (Lochamn *et al.*, 2005).

Além dos estudos de mutagénesse dirigida, a análise sistemática das elicitinias naturais também nos fornece pistas importantes na dissecação das funções das diferentes regiões das moléculas das elicitinias. Os sintomas necróticos característicos da resposta hipersensível e a indução de genes de defesa revelaram diferenças significativas de intensidade, especificidade e consistência nas análises comparativas da capacidade eliciadora de INF1 (elicitina pertencente à classe IA), INF2A e INF2B (classe III) (Huitema *et al.*, 2005). Em tabaco, estas três elicitinias provocaram rapidamente lesões necróticas localizadas, ao passo que INF2B não induziu sintomas visíveis em *N. benthamiana*. Além destas diferenças qualitativas, foi constatado que as lesões provocadas por INF2A eram mais pequenas e menos frequentes, o que sugere que esta elicitina poderá ser um eliciador mais fraco que INF1 e INF2B. Esta hipótese foi reforçada pelo facto de, também em tabaco, a expressão dos genes das proteínas de defesa, *PR1a* e *Bgl2* ser detectada após indução apenas com INF1 e INF2B (Huitema *et al.*, 2005). A ligação do ergosterol à criptogéina ocorre na cavidade hidrofóbica e envolve quinze aa, conservados em várias elicitinias da classe I (Boissy *et al.*, 1999). Contudo, seis desses quinze aa são diferentes em INF2A e INF2B (elicitinias da classe III), incluindo o resíduo de tirosina na posição 87 (substituído por leucina), o qual foi demonstrado experimentalmente ser importante na ligação ao esterol e indução de resposta hipersensível por criptogéina (Osman *et al.*, 2001b). Esta variação acentuada na composição em aa da cavidade hidrofóbica sugere que as proteínas INF2 poderão ligar-se a substratos diferentes das elicitinias da classe I

(talvez outras moléculas lipídicas que não esteróis). A variação na ligação ao substrato também poderá explicar a diferença na actividade eliciadora entre as elicinas INF2 e as de classe I, dado que a complexação com o esterol é importante para a ligação específica ao receptor na membrana plasmática e indução de resposta hipersensível em tabaco (Osman *et al.*, 2001b). Foram observadas diferenças de actividade entre INF2A e INF2B, apesar dos seus domínios apenas diferirem em três aa. Em INF2B, o resíduo de serina na posição 65 foi substituído por glicina e a glutamina na posição 93 trocada por lisina. Ambos os resíduos estão localizados nas hélices  $\alpha$ , e não estão envolvidos na ligação ao esterol. Contudo, prevê-se que estejam expostos à superfície das proteínas e são variáveis nas elicinas de classe I, existindo evidências que estes resíduos são importantes para a actividade específica de indução de resposta hipersensível em *N. benthamiana* e a acção eliciadora global em tabaco (Huitema *et al.*, 2005).

Diversos trabalhos comprovam a capacidade de indução de HR por parte das ELIs em plantas do género *Nicotiana* (Kamoun *et al.*, 1998; Qutob *et al.*, 2003; Huitema *et al.*, 2005; Kamoun *et al.*, 2003). Contudo, apenas algumas ELLs foram testadas para essa actividade (Kamoun *et al.*, 2003; Qutob *et al.*, 2003; Marshall, Hardham e Govers, dados não publicados citados em Jiang *et al.*, 2006) e nenhuma delas a apresentou. Em *P. infestans* existem duas regiões da estrutura primária das ELLs que foram total ou parcialmente eliminadas em relação às ELIs, provocando também diferenças a nível do padrão de espaçamento das seis cisteínas. Na estrutura terciária da criptogéina, uma ELI de *P. cryptogea*, resíduos dessas duas regiões variáveis estão localizados à superfície. Isto sugere que os resíduos expostos ao exterior nas ELLs podem ser variáveis ou eliminados devido a pressão de selecção, possivelmente imposta pelas plantas. Também a maioria dos aa, que na criptogéina se sabem ser intervenientes na ligação ao esterol são divergentes nas ELLs, levantando a questão da capacidade de ligação a esteróis por parte das ELLs (Jiang *et al.*, 2006).

#### **I.1.1.6. Expressão dos genes das elicinas**

Estudos filogenéticos sugerem que a diversidade genética observada na família das elicinas é anterior ao fenómeno de especiação e que nas diferentes espécies de *Phytophthora* esta variedade é mantida por selecção purificante (Jiang *et al.*, 2006). Daqui pode deduzir-se que os diferentes grupos de elicinas possuem funções distintas, sendo esta hipótese corroborada pela sua expressão diferencial e específica.

Em *P. infestans*, os genes *eli* que se encontram em *cluster* mostram padrões de expressão similares, com um elevado nível de expressão em micélio: foi proposto que o agrupamento destes genes é importante para a sua expressão simultânea (Jiang *et al.*, 2006).

Os membros da família das elicitinias apresentam uma expressão diferencial no espaço e no tempo, tal como foi demonstrado em diversos estudos focalizados em padrões de expressão específica. Os genes *eli* e *ell* são diferencialmente expressos ao longo do ciclo de vida de *Phytophthora* (exposto na introdução do Capítulo II), tal como foi demonstrado através da contagem de transcritos em bibliotecas de ESTs provenientes de zoósporos, esporângios e micélio de *P. infestans* e *P. sojae* e hibridações de mRNA isolado de micélio, esporângios, zoósporos, quistos e quistos germinados de *P. infestans* e *P. parasitica* (Jiang *et al.*, 2006). Também, os níveis de expressão dos genes *eli* e *ell* diferem significativamente. Globalmente, a expressão dos genes *eli* parece ser mais elevada do que os genes *ell*, com a excepção de *sol3a*, que é um dos genes mais expressos nos zoósporos de *P. sojae*. (Jiang *et al.*, 2006). A diferença nos níveis de expressão entre os genes *eli* e *ell* também poderá estar relacionada com diferenças no conteúdo GC3 (codões com G ou C na terceira posição) das regiões codificantes. Numa extensa pesquisa realizada em *P. sojae* foi verificado que os genes mais expressos possuem geralmente um conteúdo GC3 mais elevado que os genes menos expressos (Jiang e Govers, dados não publicados citados em Jiang *et al.*, 2006). Em *P. brassicae*, *P. infestans*, *P. ramorum* e *P. sojae*, o GC3 médio dos genes *eli* é de 86%, mais alto que os 75% dos genes *ell*, em concordância com os níveis mais altos de expressão dos genes *eli* quando comparados aos dos genes *ell* (Jiang *et al.*, 2006).

Quotob *et al.* (2003) também analisaram a expressão genética das elicitinias em ESTs derivadas de micélio cultivado *in vitro*, de locais de infecção e de zoósporos e observaram que em *P. sojae*, elicitinias das classes IA, IB, II e III foram detectadas apenas em micélio e locais de infecção e as elicitinias com sequências primárias mais divergentes apenas se expressavam em zoósporos.

Panabières *et al.* (1998) expressaram o gene da  $\beta$ -criptogeína em *P. infestans* e verificaram que os promotores das elicitinias são funcionais e podem ser regulados por factores idênticos em várias espécies, pois a quantidade de  $\beta$ -criptogeína produzida na estirpe de *P. infestans* transformada foi semelhante à produzida no isolamento de *P. cryptogea* que forneceu o transgene. Também observaram que a produção global de elicitinias canónicas é constante dentro de um dado isolamento e que as elicitinias das classes IA e IB podem ser

substituídas entre si, mesmo que sejam elicitinias de outra espécie, sem aparente modificação fenotípica do patógeno (à exceção do comportamento em tabaco, que passou de não necrosante a necrosante). O papel das elicitinias canónicas parece assim ser comum nas várias espécies de *Phytophthora* e idêntico para as classes IA e IB.

A expressão dos genes *inf* foi analisada por *Northern blotting* em várias situações. *Inf1* foi abundantemente expresso *in vitro*, em micélio cultivado em vários meios de cultura e a sua expressão não foi detectada em esporângios, zoósporos, quistos ou quistos em germinação (Kamoun *et al.*, 1997b). *In planta*, durante a primeira fase de infecção da batateira (correspondente a uma relação de biotrofia), a expressão do gene *inf1* não foi detectada. O transcrito *inf1* só foi detectado 3 dias após a infecção e os seus níveis mais altos ocorreram aos dias 5 e 6, quando o patógeno se encontrava em esporulação e era constatada necrose dos tecidos. Nos dias seguintes, o nível de *inf1* decresceu (Kamoun *et al.*, 1997b). Noutro estudo, a presença dos genes *inf1* e *inf2* (codificantes para elicitinias da classe III) foi revelada, por RT-PCR semi-quantitativa, durante a infecção de tomateiro: *inf* e *inf2B* foram detectados logo após um dia da inoculação, ao passo que *inf2A* foi detectado três dias após a inoculação (Huitema *et al.*, 2005). Os picos de expressão também foram atingidos em tempos distintos, sendo que *inf1* atingiu um máximo numa fase mais tardia da infecção, ao quarto dia, enquanto que *inf2A* obteve o auge ao terceiro dia e *inf2B* ao terceiro e quarto dias, indicando que estas proteínas são funcionalmente relevantes para a patogenicidade de *P. infestans* (Huitema *et al.*, 2005). Foi demonstrado que os dois isolamentos de *P. infestans* para os quais foi evidenciada ausência natural de produção de INF1 (Kamoun *et al.*, 1998a) expressam genes *inf2* (Huitema *et al.*, 2005).

Foi demonstrado que isolamentos de *P. parasitica* produtores de elicitinias *in vitro* e virulentos em tabaco sofrem uma diminuição de expressão destes genes *in planta*, durante interacções compatíveis com tabaco ou outras plantas (Colas *et al.*, 2001). Esta sub-regulação parece estar ligada exclusivamente aos isolamentos patogénicos para o tabaco já que os isolamentos avirulentos para tabaco e patogénicos para outros vegetais continuam a expressar o gene durante a infecção (Colas *et al.*, 2001). Assim, a redução de produção de elicitinias durante a invasão de tabaco por *P. parasitica* pode constituir um meio de evasão do reconhecimento do sistema específico de defesa do tabaco, sendo as possíveis funções das elicitinias asseguradas por uma quantidade ínfima de proteínas (Colas *et al.*, 2001), cuja presença não seria detectável pelo hospedeiro. Esta estratégia de evasão terá sido levada ao limite por isolamentos de *P. parasitica* de tabaco que, apesar de reterem os genes das

elicitinias, não as expressam *in vitro* (Kamoun *et al.*, 1993b). Curiosamente, também foi encontrado um isolamento de tomateiro onde não foram detectados genes de elicitinias, que se tornou totalmente avirulento em tomate e tabaco (Kamoun *et al.*, 1993b) e que não apresenta esporulação sexuada ou assexuada (M: Coffey, comunicação pessoal citada em Kamoun *et al.*, 1994). Por outro lado, os isolamentos de *P. infestans* para os quais foi evidenciada ausência de produção de INF1 (Kamoun *et al.*, 1998a) mas que expressam os genes *inf2* (Huitema *et al.*, 2005) apresentam variações fenotípicas relativamente à capacidade de esporulação, com culturas com e sem esporulação (Kamoun *et al.*, 1998a).

Métodos imunológicos também foram utilizados para analisar a presença de elicitinias durante interações compatíveis. Foram detectadas elicitinias um ou dois dias depois da inoculação das plantas nos casos das interações *P. capsici*/tomateiro, *P. capsici*/pimento e *P. parasitica*/tomateiro, num padrão que comprova que o patógeno sintetiza as elicitinias à medida que coloniza a planta (Devergne *et al.*, 1994). Brummer *et al.* (2002) provaram por meios imunocitoquímicos que o padrão de produção de quercinina durante o processo de infecção de raízes de *Quercus robur* acompanha o padrão de crescimento do patógeno durante os primeiros 5 dias após a infecção. Esta elicitina foi localizada à volta das hifas, no espaço apoplástico e dentro das células invadidas do hospedeiro. Estes resultados indicam que as elicitinias também poderão actuar como toxinas, de modo a enfraquecer o tecido do hospedeiro.

A expressão do gene da citricolina, elicitina de *P. citricola*, durante a interacção do patógeno com plântulas de faia foi quantificada por RT-PCR em tempo real (Fleischmann *et al.*, 2005). Durante o crescimento do patógeno nas raízes finas do hospedeiro, o gene foi induzido três dias após a inoculação, numa altura em que é esperada a esporulação. O pico de expressão foi atingido ao quinto dia e após 7 dias a presença do gene já era muito baixa, embora o crescimento do oomiceta tivesse progredido ainda durante mais algum tempo. Isto é semelhante ao padrão de expressão encontrado para o gene *infl* de *P. infestans*, que foi elevada após a infecção das folhas e durante a esporulação, mas reduzida pouco antes da destruição dos tecidos (Kamoun *et al.*, 1997b). Contudo, o colapso das raízes não foi observado em faia.

### I.1.1.7. Função biológica das elicitinias

Dado que a resposta hipersensível nas plantas bloqueia o crescimento dos patógenios biotróficos, a actividade indutora de HR não é certamente a função primária das ELIs em *Phytophthora*. Dados bioquímicos comprovam a ideia, hoje em dia geralmente aceite, que a função biológica intrínseca das ELIs está relacionada com a ligação e/ou processamento de lípidos. A criptogeína, por exemplo, liga-se a esteróis e funciona como uma proteína transportadora de esteróis (Mikes *et al.*, 1997; Vauthrin *et al.*, 1999), ao passo que em *P. capsici* foram identificadas ELIs com actividade de fosfolipase (Nespoulos *et al.*, 1999). A função biológica intrínseca das ELLs é desconhecida, ignorando-se a capacidade de se ligarem a esteróis. Contudo, foi colocada a hipótese de uma ELL funcionar em relação com as hormonas semelhantes a esteróis envolvidas na reprodução sexuada: trata-se do factor M-25, codificado por um gene especificamente expresso e altamente induzido em culturas sob desenvolvimento sexual (Fabritius *et al.*, 2002).

O facto das elicitinias canónicas complexarem esteróis constitui uma importante faceta destas proteínas, já que os membros dos géneros *Phytophthora* e *Pythium* não sintetizam estes lípidos (Hendrix, 1970). O problema é que a necessidade de esteróis na fisiologia destes oomicetas continua em debate. Como componentes de membranas celulares, os esteróis podem ser substituídos por substâncias endógenas bioquímica e estruturalmente semelhantes (Nes *et al.* 1981; Nes, 1988). Como estimuladores da reprodução sexuada, os esteróis já não são considerados essenciais: foi demonstrado que outros compostos exógenos podem conduzir à reprodução sexuada e até, que algumas espécies são capazes de sintetizar as substâncias necessárias, desde que submetidas a certos factores de stress, como envelhecimento ou privação de nutrientes (Ko, 1998; Jee *et al.*, 2002). Os estimulantes exógenos apenas encurtariam o tempo de formação dos oósporos. Ponchet *et al.* (1999) propuseram outra explicação para uma função biológica das elicitinias, relacionando-a com o facto das elicitinias capturarem esteróis e outras moléculas lipídicas (consideradas não essenciais à sua sobrevivência e reprodução): as elicitinias poderão funcionar como sensores. Estas proteínas poderão estar distribuídas no ambiente do patógeno para capturar substâncias lipídicas que, por regresso dos complexos ao micélio informará o oomiceta da presença de potenciais hospedeiros. Entretanto, foi recentemente isolado ergosterol de micélio de *P. drechsleri* (Trigos *et al.*, 2005). Em qualquer dos casos, do ponto de vista da captura de esteróis, as elicitinias devem constituir-se como factores de patogenicidade na relação *Phytophthora*/hospedeiro; a interacção *Phytophthora/Nicotiana* assume contornos especiais,

fruto de uma co-evolução em que as elicinas passaram a ter também um papel com factor de avirulência.

Outros papéis biológicos sugeridos para as elicinas são como antibióticos (Grant *et al.*, 1996) ou componentes estruturais (Templeton *et al.*, 1994; Yu., 1995), mesmo que restritos a fases específicas do ciclo de vida de *Phytophthora* spp. (Kamoun *et al.*, 1997; Qutob *et al.*, 2003). De facto, prevê-se que a maior parte das ELLs e algumas ELIs não possuam capacidade de se ligar a esteróis, apresentando características que se supõe ligá-las à parede e membrana celulares (Qutob *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2006).

Em resumo, pode dizer-se que os membros da grande e variada família das elicinas fazem parte do puzzle biológico dos oomicetas dos géneros *Phytophthora* e *Pythium*: estas peças são diferentes umas das outras e não encaixam todas no mesmo local, mas decerto são essenciais para completar a imagem que nos permitirá compreender em pleno estes agentes patogénicos.

## **I.1.2. Transformação genética no género *Phytophthora***

Técnicas fiáveis e reprodutíveis para realizar manipulação molecular genética são essenciais para a determinação das funções de genes e proteínas identificados nos mais diversos organismos. A transformação genética é uma ferramenta chave para alcançar este objectivo. No caso dos microrganismos patogénicos como os oomicetas, a transformação fornece ainda um método de seguir o crescimento dos mesmos nos hospedeiros, através da aplicação de genes marcadores, como a proteína fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*), permitindo ampliar os conhecimentos sobre a biologia destes patógenos.

### **I.1.2.1. Estratégias de transformação genética**

Os vectores normalmente usados na transformação genética de fungos não se mostraram adequados para oomicetas, provavelmente devido a diferenças nas sequências necessárias para activar a transcrição dos genes (Judelson *et al.*, 1992). Assim, novos vectores e protocolos para transformação tiveram de ser desenvolvidos. Os promotores dos genes

*ham34*<sup>2</sup> e *hsp70*<sup>2</sup> do oomiceta *Bremia lactucae* mostraram forte actividade em ensaios de transformação transiente de *P. infestans* (Judelson e Michelmore, 1991) e foram subsequentemente incorporados em vectores de transformação usados na obtenção de transformantes estáveis (Judelson *et al.*, 1991). Estes promotores continuam a ser habitualmente usados na expressão de transgenes em *Phytophthora* spp porque mostraram níveis mais altos de actividade do que certas sequências reguladoras próprias de *Phytophthora*, como sejam os promotores de genes de expressão constitutiva, como a actina (Judelson *et al.*, 1993a).

O protocolo de transformação padrão é baseado na transformação de protoplastos por métodos químicos, mediada por lipossomas e/ou tratamento com CaCl<sub>2</sub>/polietilenoglicol (PEG), seguida de regeneração e selecção com antibióticos em meio sólido (Judelson *et al.*, 1991; Judelson *et al.*, 1993b). Também foi relatada a transformação de zoósporos por métodos químicos semelhantes (Érsek *et al.*, 1994).

Foram observadas altas taxas de co-transformação (até 50%), especialmente se os dois plasmídeos forem linearizados com enzimas de restrição com extremidades compatíveis (Judelson, 1993). Assim, é relativamente rápido clonar um gene de interesse numa cassette de expressão adequada e cotransformar com o plasmídeo de selecção.

Apesar da maioria dos ensaios de transformação se terem centrado em *P. infestans* (Panabières *et al.*, 1998; Kamoun *et al.*, 1998b; Randall e Judelson, 1999), outros oomicetas foram transformados com o protocolo de transformação induzida quimicamente: *P. sojae* (Judelson *et al.*, 1993b), *P. capsici* (Érsek *et al.*, 1994), *P. palmivora* (Van West *et al.*, 1998, 1999), *P. parasitica* (Bottin *et al.*, 1999; Gaulin *et al.*, 2002), *P. brassicae* (Si-Ammour *et al.*, 2003) e *Saprolegnia monoica* (Mort-Bontemps e Fevre, 1997). Recentemente, também foi descrita a transformação de *P. cinnamomi* por métodos químicos (McCarren, 2006).

Outras técnicas de transformação foram usadas em *Phytophthora* spp, fazendo uso do bombardeamento com micropartículas aceleradas sobre micélio, esporângios ou zoósporos (Bailey *et al.*, 1993; Cvitanich e Judelson, 2003a,b), co-cultivo de zoósporos com *Agrobacterium tumefaciens* (Vijn e Govers, 2003) e electroporação de zoósporos (Latijnhouwers e Govers, 2003; Latijnhouwers *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2005) e protoplastos (Judelson e Michelmore, 1991). Também foi obtida a transformação de protoplastos de

---

<sup>2</sup> *Ham34* codifica uma potencial proteína estrutural; *HSP70* pertence à família das denominadas *heat shock proteins*, proteínas expressas em resposta a uma elevação da temperatura ou outras situações de stress.

*Pythium aphanidermatum* por electroporação (Weiland, 2003) e de *Pythium ultimum* com co-cultivo de zoósporos e *Agrobacterium tumefaciens* (Vijn e Govers, 2003).

Diversos genes repórter foram usados na transformação de *Phytophthora* spp, entre eles o gene codificante para a  $\beta$ -glucuronidase e a GFP. Os transformantes foram, depois, usados no seguimento da progressão da doença *in planta*, na avaliação de resistência à doença, estudo de promotores e visualização de estruturas durante o desenvolvimento (Judelson *et al.*, 1993a; Judelson, 1997; Kamoun *et al.*, 1998c; West *et al.*, 1998, 1999; Bottin *et al.*, 1999; Fong e Judelson, 2003; Si-Ammour *et al.*, 2003; Cvitanich e Judelson, 2003a; McLeod *et al.*, 2004; McCarren, 2006).

Até à data não foram relatados quaisquer eventos de recombinação homóloga e o DNA introduzido é integrado no genoma através de recombinação heteróloga (Judelson *et al.*, 1993a; Kamoun, 2003). Por isso, o silenciamento genético baseado na interrupção de genes não é adequado em *Phytophthora*, até porque, dada a natureza diplóide destes organismos, seriam necessárias duas disrupções consecutivas para silenciar um dado gene (Judelson *et al.*, 1993a). A abolição da expressão genética foi inicialmente testada na inibição de transgenes, com base numa estratégia de silenciamento genético de expressão de sequências anti-sentido dos genes que se pretendiam silenciar (Judelson *et al.*, 1993a); a observada redução dos níveis de mRNA sentido foi, inicialmente, atribuída à degradação de complexos RNA de cadeia dupla, compostos pela hibridação das sequências sentido e anti-sentido. Contudo, foi também demonstrada a acção de silenciamento de sequências transgênicas sentido, homólogas do gene a silenciar e, até, de sequências desprovidas de sequências promotoras (Kamoun *et al.*, 1998b), o que coloca de lado a hipótese da degradação de complexos de RNA de cadeia dupla. Foi, então, proposto um novo mecanismo para explicar este tipo de inibição da expressão genética (West *et al.*, 1999a). Entretanto, o silenciamento com aplicação de sequências transgênicas anti-sentido ou sentido já permitiu obter estirpes deficientes em determinados produtos de genes nativos (Gaulin *et al.*, 2002; Latijnhouwers e Govers, 2003; Latijnhouwers *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2005).

Recentemente foi relatada a primeira aplicação de RNA de cadeia dupla na mediação de silenciamento em *P. infestans* (Whisson *et al.*, 2005), mas as bases deste ensaio de transformação transiente, ainda necessitam de ser clarificadas. Esta técnica, também conhecida como RNAi (RNA de interferência) faz uso de pequenas moléculas de RNA de cadeia dupla para induzir o silenciamento de genes com os quais apresenta homologia.

### I.1.2.2. Mecanismos de silenciamento genético

Já foi aqui mencionado um trabalho onde a adoção de uma estratégia de silenciamento genético levou à obtenção de transformantes de *P. infestans* em que a produção de *INF1* foi abolida (Kamoun *et al.*, 1998b). Convém agora analisar os resultados de uma outra pesquisa que, aprofundando o trabalho anterior, levou à clarificação de alguns aspectos dos mecanismos de silenciamento em *P. infestans* (West *et al.*, 1999a).

A introdução de construções plasmídicas contendo sequências sentido e anti-sentido do gene *infl* levou à inibição de produção da proteína INF1 em 11% a 20% dos transformantes. Foi demonstrado que as sequências promotoras presentes nos transgenes não são necessárias para a indução do silenciamento, visto que, também foram obtidos transformantes silenciados através da introdução de construções com a sequência sentido do gene *infl* e sem a zona promotora.

A ausência de produção da proteína INF1 deveu-se à falta de produção do mRNA correspondente. Aparentemente, a introdução das construções baseadas no gene *infl* provocaram o silenciamento de ambos os genes (endógeno e transgene). O silenciamento observado foi específico para a sequência do gene *infl*, pois o gene *inf2b* (que pertence a uma classe diferente da família de genes das elicinas mas partilha 60% de homologia com o gene *infl* na região ORF) continuou a expressar-se em níveis idênticos nos transformantes e não transformantes.

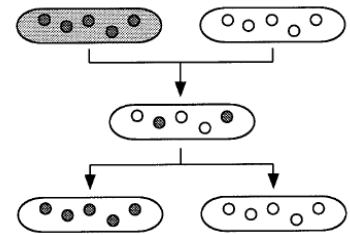
Uma vez que, apenas uma parte dos transformantes se mostrou silenciada, a introdução dos transgenes não parece ser ela própria a responsável pelo despoletar do silenciamento observado. Este, também não se deve, nem à interrupção do gene *infl*, nem a mutações pontuais, mas sim a uma inibição da sua transcrição e é independente do número de integrações do transgene num dado local do genoma. O fenómeno de hipermetilação do DNA não está envolvido no mecanismo de inibição da transcrição.

O silenciamento permanece em heterocariotas (resultantes da fusão de protoplastos derivados de diferentes estirpes homocariotas) contendo núcleos transgênicos e não transgênicos, o que demonstrou que o silenciamento é dominante e actua em *trans* para silenciar o gene alvo nos núcleos transformados e não transformados. Além disso, o silenciamento é mantido, de maneira estável, em estirpes homocariotas obtidas a seguir à separação dos núcleos dos heterocariotas silenciados, mesmo na ausência dos transgenes (Figura I.5). Uma vez que não foi possível demonstrar a cariogamia (fusão dos núcleos), não é

provável que o estado silenciado do gene *infl* seja transmitido de um núcleo para outro por interações DNA-DNA específicas, já que, mesmo durante as divisões mitóticas o envelope nuclear permanece intacto na maior parte dos oomicetas (Heath, 1980).

Face a estas observações, os autores propuseram um novo modelo para explicar o fenómeno de silenciamento em *P. infestans*, o qual baptizaram de “silenciamento genético internuclear” e em que está envolvido um factor de silenciamento difusível.

**Figura 1.5:** Ilustração esquemática da transferência do silenciamento genético internuclear em *Phytophthora*. A fusão de protoplastos de uma estirpe silenciada com sequências antisentido (núcleos e citoplasma brancos) e um isolamento selvagem (núcleos e citoplasma cinzentos) resulta numa estirpe heterocariota (com núcleos brancos e cinzentos) que exhibe silenciamento genético (citoplasma branco). A separação nuclear, através de cultura de zoósporos derivados da estirpe heterocariota, resulta em estirpes silenciadas (citoplasma branco) independentemente da presença do transgene. (Figura adaptada de Kamoun, 2003).



O novo modelo de silenciamento apresenta diferenças nos mecanismos relativamente aos fenómenos de *quelling* (observado em *Neurospora crassa*) (Cogoni *et al.*, 1996) e MIP (Metilação Induzida Pré-meioticamente, observada em *Ascobolus immersus*) (Colot *et al.*, 1996) mas é muito similar ao fenómeno de paramutação (Meyer *et al.*, 1993; Hollick *et al.*, 1997). Em resumo, a forte redução da transcrição nas estirpes de *P. infestans* homocariotas não transgênicas deve ser consequência de fenómenos de paramutação que provocam uma modificação da expressão do gene *infl*, herdada geneticamente e resultantes possivelmente de alterações conformacionais da estrutura da cromatina nuclear. Pode-se especular que o factor de silenciamento que actua em *trans* e se move entre núcleos pode ser uma proteína (Pirrota, 1997, 1998; Sherman e Pillus, 1997), uma molécula de RNA aberrante (Wasseneger *et al.*, 1994; Matzke *et al.*, 1996; Schuurts *et al.*, 1997) ou um complexo formado por RNA e proteína.

Em ensaios por *Northern blotting*, Latijnhouwers e Govers (2003) observaram que nalguns dos transformantes de *P. infestans* obtidos por silenciamento do gene *pigpb1*<sup>3</sup>, um rasto de RNA (conhecido, vulgarmente, como *smear*) substituiu a banda bem definida que representa o mRNA do gene no isolamento selvagem. Este resultado não se deveu a degradação generalizada do RNA dado que não foi observado em transformantes com o gene *pigpa1* silenciado. Assim, as autoras colocam a hipótese de existir outro mecanismo de

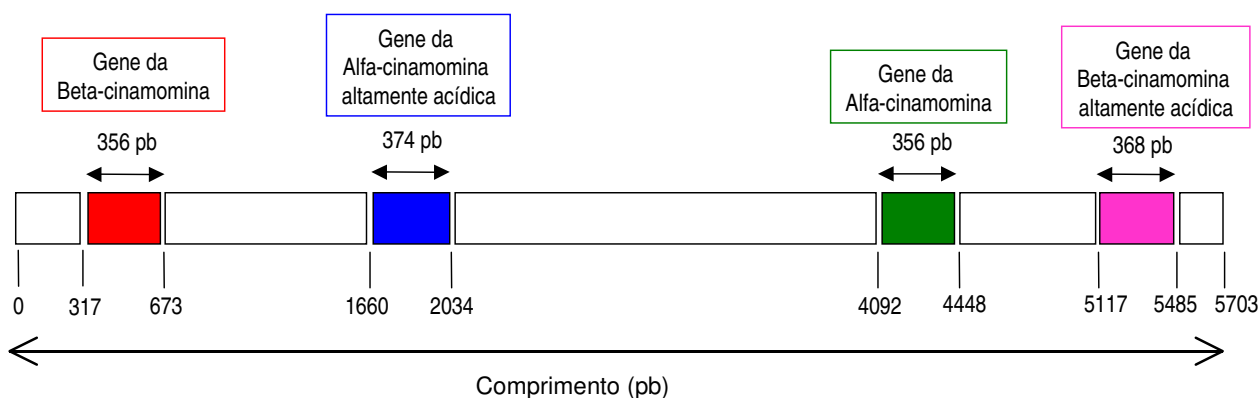
<sup>3</sup> *Pigpa* e *Pigpb* são genes codificantes para subunidades das proteínas denominadas G, envolvidas em vários processos de regulação celular.

silenciamento genético em *Phytophthora*, baseado na degradação específica do mRNA que sofreu silenciamento. O mecanismo proposto por West *et al.* (1999a) funciona a nível pré-transcricional, ao passo que esta nova via de silenciamento funcionaria a nível pós-transcrição.

### I.1.3. As elicinas de *Phytophthora cinnamomi*

O *cluster* genómico composto por genes de elicinas, identificado em *P. cinnamomi* (Duclos *et al.*, 1998a) está representado na Figura I.6.

A presença da  $\beta$ -cinamomina e da  $\alpha$ -cinamomina foi já comprovada em filtrados de culturas *in vitro* (Pernollet *et al.*, 1993) e a expressão de todos os genes, inclusivamente os codificantes para as elicinas altamente acídicas, foi detectada por RT-PCR em micélio cultivado *in vitro* (Duclos *et al.*, 1998b).



**Figura I.6:** Representação da organização do *cluster* genómico das elicinas de *P. cinnamomi*.  
(Nº de acesso à base de dados EMBL: AJ000071)

## I.2. MATERIAL E MÉTODOS

### I.2.1. Selecção do material biológico

Os trabalhos foram iniciados com uma selecção dos isolamentos de *Phytophthora cinnamomi* que estão identificados na Tabela I.1.

**Tabela I.1:** Identificação dos isolamentos de *P. cinnamomi*.

Designação	Local de isolamento	Amostra	Data
PA20	S. Brás de Alportel	Solo, sobreiro	Novembro 1995
PA37	Lagos	Solo, sobreiro	Maió 1995
PA45	S: Brás de Alportel	Solo, sobreiro	Maió 2000
PE62	Huelva	Solo, azinheira	Julho 1998
PE95	S. Brás	Raiz, azinheira	Junho 2000

Os isolamentos utilizados neste estudo foram obtidos de amostras de solo ou raízes recolhidas em locais de declínio de sobreiro ou azinheira. Foram isolados pelo método da “planta armadilha” (maçã *Granny Smith* numa suspensão de solo e/ou raízes) e identificados pelos métodos clássicos (crescimento em meio selectivo e observação das características morfológicas) (Moreira-Marcelino, 2001) e pelo método molecular colorimétrico (Coelho *et al.*, 1997).

### I.2.2. Cultura e manutenção dos isolamentos de *Phytophthora cinnamomi*

Os isolamentos foram cultivados em meio sólido de agar V<sub>8</sub>Ca (sumo V<sub>8</sub> clarificado com agar), em meio líquido V<sub>8</sub>C (sumo V<sub>8</sub> clarificado) ou em meio MSE (Meio de Secreção de Elicitinas). Foram retirados pequenos pedaços de agar (2 - 3 mm<sup>2</sup>) das colónias de origem com uma ansa esterilizada e foram inoculadas placas de *Petri* com meio sólido ou com meio líquido (15 ml/placa). As placas foram mantidas numa estufa a 25°C, no escuro.

O meio de crescimento V<sub>8</sub>C, preparado num *Erlenmeyer* pela dissolução de 4,5 g de CaCO<sub>3</sub> em 330 ml de sumo V<sub>8</sub> (Campbell Soup Company), foi agitado numa placa de agitação magnética durante 30 min. O meio foi mudado para um frasco próprio para centrífuga e centrifugado a 2500 g, durante 15 min, a 20°C. O sobrenadante foi decantado cuidadosamente para um novo frasco e centrifugado de novo a 2500 g durante 15 min. O

sobrenadante foi decantado para um novo frasco, diluído de 1:10 com água destilada e autoclavado durante 20 min a 121°C.

Para preparar meio sólido, foram adicionados ao meio líquido 15 g de agar por litro antes da autoclavagem. Depois da autoclavagem o meio foi distribuído por placas, solidificando por arrefecimento.

Os componentes do meio MSE [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05% (p/v); MgSO<sub>4</sub> 0,025% (p/v); asparagina 0,1% (p/v); tiamina 1 mg/l; extracto de levedura 0,05% (p/v); glucose 2% (p/v)] foram dissolvidos em água destilada e a solução esterilizada por filtração com membranas de poro Ø 22 µm.

Todos os meios foram mantidos a 4°C até serem utilizados.

Aos meios utilizados para o crescimento das estirpes transformadas do oomiceta foi adicionado o antibiótico higromicina B (250 µg de antibiótico por ml no meio de selecção inicial; 300µl/ml nos meios de crescimento pós-selecção dos transformantes). A higromicina B foi adicionada no momento de utilização dos meios. No caso do meio V<sub>8</sub>Ca, o antibiótico foi adicionado antes da sua distribuição por placas, numa fase em que o meio ainda se mantinha líquido (permitindo uma boa mistura com antibiótico) mas já não se encontrava a uma temperatura muito elevada (à volta de 40 a 45°C), para que o antibiótico mantivesse toda a sua actividade biológica.

Foram determinadas as taxas de crescimento das estirpes transformadas e dos respectivos isolamentos selvagens. De cada isolamento com crescimento activo em meio V<sub>8</sub>Ca, foi retirado, com um furador de rolhas, um disco de 8 mm de diâmetro que foi depois colocado no centro de uma nova placa de *Petri* de 9 cm de diâmetro com meio V<sub>8</sub>Ca. As placas foram mantidas numa estufa a 25°C, no escuro e foi medido o maior e o menor diâmetro das colónias do primeiro ao quarto dia de crescimento. Às medidas do diâmetro da colónia obtidas, foram subtraídos os 8 mm do diâmetro do disco de agar e foi calculada a taxa de crescimento para cada placa, dividindo o diâmetro médio da colónia pelo número de dias transcorridos. Para cada isolamento foram preparadas quatro placas e a taxa de crescimento do isolamento foi apresentada como a média das quatro placas. Este ensaio foi repetido três vezes, calculando-se depois a taxa média dos três ensaios para cada isolamento. Os valores das taxas de crescimento obtidas foram submetidos a uma análise de variância pelo teste de comparação de médias LSD (Mínima Diferença Significativa) de Fisher, para p < 0,05 (Steel

e Torrie, 1985) com o auxílio do programa informático estatístico "SPSS 14,0" para Windows.

Toda a manipulação dos isolamentos para operações relacionadas com a manutenção de culturas ou preparação da transformação genética foi realizada em condições de assépsia.

### I.2.3. Estudo da sensibilidade a antibióticos

Ao meio V<sub>8</sub>Ca foram adicionadas quantidades crescentes de higromicina B, conforme indicado na Tabela I.2. Foram retirados pequenos pedaços de agar das colónias de origem dos isolamentos e foram inoculadas placas de *Petri* contendo meio com antibiótico. As placas inoculadas foram incubadas numa estufa, a 25°C, no escuro, durante dez dias, e o crescimento verificado diariamente.

**Tabela I.2:** Concentrações de higromicina B aplicadas no teste de sensibilidade.

Concentração de higromicina B (µg/ml)	0	50	70	100	150	200	250	300
---------------------------------------	---	----	----	-----	-----	-----	-----	-----

### I.2.4. Produção de zoósporos

A produção de zoósporos foi efectuada segundo uma adaptação do protocolo de Byrt e Grant (1979). Um único inóculo foi colocado em meio V<sub>8</sub>Ca e incubado a 25°C, no escuro, durante três dias. Cinco pequenos pedaços de agar foram retirados da margem da colónia em crescimento activo e colocados num disco de membrana *Miracloth* (Calbiochem) previamente preparada e colocada numa nova placa de meio V<sub>8</sub>Ca. A cultura foi incubada a 25°C, no escuro, durante cinco dias. A membrana sobre a qual o micélio cresceu foi transferida assepticamente para um *Erlenmeyer* de 250 ml contendo uma mistura de 50 ml de meio V<sub>8</sub>C e 50 ml de água destilada esterilizada. Esta cultura foi incubada durante 16 h num agitador orbital (90 rpm), a 25°C e sob luz fluorescente suspensa a 40 cm do *Erlenmeyer*. Após a incubação o meio foi decantado e a membrana lavada quatro vezes em intervalos de 15 min com 100 ml de uma solução de sais minerais (SSM). A cultura foi incubada durante 20 h em 100 ml de SSM, a 25°C, sob luz fluorescente e agitação. A SSM usada foi decantada e a membrana lavada com 50 ml de SSM fresca. O disco *Miracloth* foi então removido do *Erlenmeyer* e colocado numa caixa de *Petri*, coberto com 20 ml de SSM e incubado a 18°C durante 2 a 3 h, até à libertação dos zoósporos (observada num microscópio óptico).

Preparação dos discos *Miracloth*: a membrana foi cortada em círculos com 8 cm de diâmetro e os discos foram imersos em água da rede durante 20 min e depois fervidos durante 10 min. A água da fervura foi decantada e a membrana lavada com água destilada. O procedimento de fervura/lavagem foi repetido por mais duas vezes. Os discos foram colocados numa caixa de *Petri* de vidro, cobertos com água destilada e autoclavados a 121°C durante 20 min.

Preparação da Solução de Sais Minerais (SSM): o nitrato de cálcio, o nitrato de potássio e o sulfato de magnésio foram dissolvidos em água destilada [ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,01 M;  $\text{KNO}_3$  0,005 M;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,004 M] e esta solução inicial foi autoclavada a 121°C durante 20 min. Após o arrefecimento, foi adicionado 1 ml de uma solução de Fe-EDTA 0,1 M (esterilizada por filtração em membranas de poro  $\varnothing$  22  $\mu\text{m}$ ) por cada litro da solução inicial.

Alíquotas da suspensão obtida após a libertação dos zoósporos foram colocadas numa câmara de contagem e aquecidas brevemente (10 s, com lume de isqueiro) para induzir o enquistamento dos zoósporos na câmara; as contagens foram efectuadas numa câmara de contagem do tipo Fuchs-Rosenthal.

Todos os isolamentos selvagens foram testados, pelo menos, uma vez e em duas ocasiões, foram feitas concentrações dos zoósporos obtidos com o isolamento PA45 em gradientes de *Percoll*.

As estirpes geneticamente transformadas foram submetidas a este ensaio na presença ou na ausência de higromicina B (300  $\mu\text{g/ml}$ ) nas várias fases de cultura.

Concentração de zoósporos em gradientes de *Percoll*: após a fase de libertação dos zoósporos, a solução das placas foi recolhida e colocada em tubos *Falcon* de 50 ml ( $\approx$  40 ml por tubo). Depois foi adicionado (1/50) do volume em LiCl 5M; o tubo foi invertido gentilmente 5-6 vezes e logo de seguida, com o auxílio do pipetador eléctrico, 5 ml de solução de *Percoll* a 33% v/v foram colocados no fundo do tubo, por baixo da solução de zoósporos. Depois, 5 ml de *Percoll* 133%<sup>4</sup> v/v foram injectados por baixo da camada de *Percoll* 33%. Cinco minutos após a adição do LiCl os tubos foram centrifugados a 800 g durante 5 min a 4°C. Foi procurada uma fina camada castanha clara na interface entre as duas camadas de

<sup>4</sup> *Percoll* a 33%: 3.3 ml de *Percoll* 100%; 200  $\mu\text{l}$  de solução de *Petri* modificada (50X concentrada); 25  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  100 mM, 6.6 ml de água

*Percoll* a 133%: 8.9 ml de *Percoll* 150%; 200  $\mu\text{l}$  de solução de *Petri* modificada (50X concentrada); 25  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  100 mM, 1 ml de água.

Solução de *Petri* modificada:  $\text{CaCl}_2$  0.25 mM;  $\text{MgSO}_4$  1 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 mM, KCl 0.8 mM.

*Percoll* (33% e 133%), onde ficariam concentrados os zoósporos. A camada de *Percoll* a 133%, localizada abaixo dos zoósporos, foi removida delicadamente por aspiração com o pipetador eléctrico e de seguida foi colhida a camada dos zoósporos ( $\approx 2,5$  ml). Uma alíquota desta última camada foi colhida para contagem das células. Durante todas as operações os tubos com os zoósporos foram mantidos em gelo.

### I.2.5. Obtenção de protoplastos

O micélio referente a 4 placas (4 inóculos por placa) e cultivado durante três dias em meio V<sub>8</sub>C foi recolhido com o auxílio de pinças esterilizadas e transferido para uma caixa de *Petri* onde foi lavado com 15 ml de Solução de Equilíbrio (ver composição na Tabela I.3). Este líquido foi eliminado por pipetagem, a lavagem foi repetida e depois foram adicionados 15 ml de mistura de enzimas (ver composição na Tabela I.4). A mistura de enzimas foi preparada dissolvendo as enzimas no mesmo tipo de solução de equilíbrio utilizada nas lavagens do micélio.

**Tabela I.3:** Composição dos vários tipos de Soluções de Equilíbrio.

	Composição da Solução de Equilíbrio
1	KCl 0,64 M CaCl <sub>2</sub> 0,2 M Citrato de sódio 20 mM, pH 5,8
2	Manitol 1 M MgSO <sub>4</sub> 7 mM Citrato de sódio 20 mM, pH 5,8
3	KCl 0,64 M CaCl <sub>2</sub> 0,2 M
4	Manitol 1 M MgSO <sub>4</sub> 7 mM

**Tabela I.4:** Composição das soluções de enzimas.

	Combinações de enzimas
A	Driselase <sup>5</sup> (Sigma) - 2,5 mg/ml Lysing enzymes - L1412 <sup>6</sup> (Sigma) - 5 mg/ml
B	Driselase - 2,5 mg/ml Celulase (Sigma) - 5 mg/ml
C	Driselase - 10 mg/ml Caylase C3 <sup>7</sup> (Cayla) - 1 mg/ml
D	Driselase - 7 mg/ml Caylase C3 - 7 mg/ml Celulase Onozuka - 7 mg/ml
E	Driselase - 7 mg/ml Celulase Onozuka - 7 mg/ml
F	Driselase - 7 mg/ml Cellulase (Sigma) - 7 mg/ml

<sup>5</sup> Driselase é uma mistura enzimática composta por celulases, laminarinases e xilanases

<sup>6</sup> Lysing enzymes – L1412 é uma mistura enzimática composta por celulases, proteases e quitinases

<sup>7</sup> Caylase C3 é uma mistura de glucanases e quitinases

Cada uma das soluções da Tabela I.3 (1 a 4) foi testada com todas as misturas da Tabela I.4 (A a F).

O micélio foi dilacerado com a ajuda de dois bisturis esterilizados. A digestão do micélio ocorreu a 25°C, na obscuridade e sob agitação lenta ( $\approx 20$  rpm). Foram efectuados ensaios com tempos de digestão que variaram entre os 30 e os 300 min.

Os protoplastos foram recolhidos por filtração da suspensão de digestão através de um filtro *Scrynel* ( $\varnothing$  poro = 48  $\mu\text{m}$ ) montado num funil de *Buckner* associado a um *Kitasato*. A caixa de digestão e o filtro foram lavados com 10 ml de solução de equilíbrio e os protoplastos recolhidos num tubo *Falcon* de 50 ml. A suspensão foi centrifugada a 2000 *g* durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de protoplastos ressuspensos suavemente e lavado com 5 ml de solução de equilíbrio. A centrifugação e a lavagem foram repetidas. A optimização das condições de obtenção dos protoplastos foi avaliada determinando o número de protoplastos em pontos de controlo efectuados de 30 em 30 min ao longo de todo o tempo de digestão e antes da centrifugação final, através de contagem de alíquotas da suspensão de digestão numa câmara de contagem Fuchs-Rosenthal. Depois da contagem, a suspensão foi centrifugada a 2000 *g* durante 10 min, os protoplastos foram ressuspensos em 10 ml de uma solução de manitol (1 M)/meio V<sub>8</sub>C (4/1) e incubados durante 16 horas, a 25°C, no escuro. A percentagem de viabilidade dos protoplastos foi determinada através da contagem do número de protoplastos germinados após o período de incubação.

Estes ensaios foram realizados pelo menos duas vezes para cada um dos isolamentos seleccionados para os trabalhos.

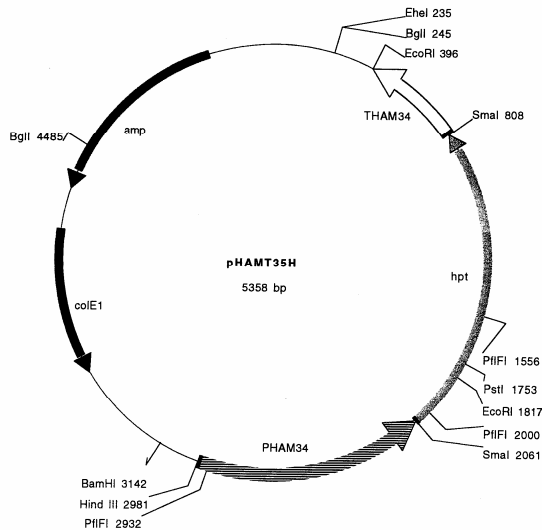
Após a optimização do processo de obtenção de protoplastos, foi ainda testado o efeito da substituição do micélio derivado de inóculos tradicionais (pedaços de agar) cultivado durante três dias por micélio derivado da germinação de uma suspensão de zoósporos em meio V<sub>8</sub>C durante três dias.

## **I.2.6. Plasmídeos aplicados na transformação**

### **I.2.6.1. Descrição dos Plasmídeos**

Para permitir a expressão de transgenes nos transformantes de *P. cinnamomi*, as sequências regulatórias a serem usadas devem, preferencialmente, ser próprias ao microrganismo em causa. As sequências mais referidas na literatura e constantemente

utilizadas na transformação de *Phytophthora* spp foram desenvolvidas na forma de vector plasmídico por Howard Judelson, que amavelmente no-las disponibilizou clonadas em duas construções distintas: o plasmídeo pHAMT35H e o plasmídeo pTH210 (Figuras I.7 e I.8 respectivamente).

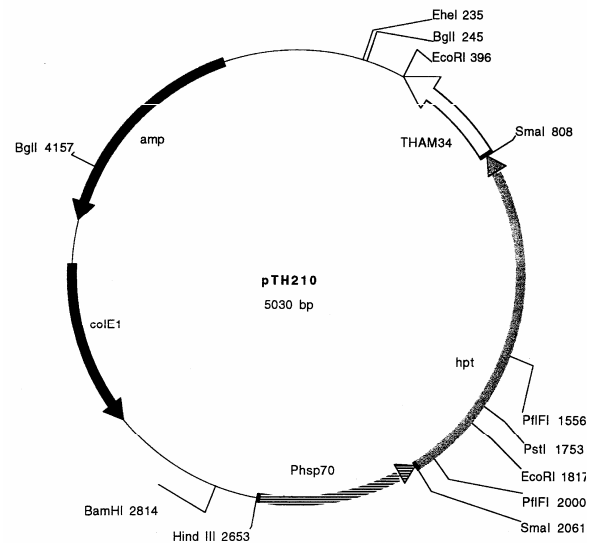


**Figura I.8:** Plasmídeo pTH210.

Esta construção, baseada no plasmídeo pUC19, contém a cassete de expressão do gene para a resistência à higromicina B clonada na forma de um fragmento *SmaI-SmaI* de 1253 pb, regulada pelo promotor do gene *hsp70* (EMBL GenBank, accession number: M27825), clonado na forma de um fragmento *HindIII-SmaI* de 590 pb, e pelo terminador do gene *ham34* (EMBL GenBank, accession number: X16984), clonado na forma de um fragmento *SmaI-EcoRI* de 550 pb.

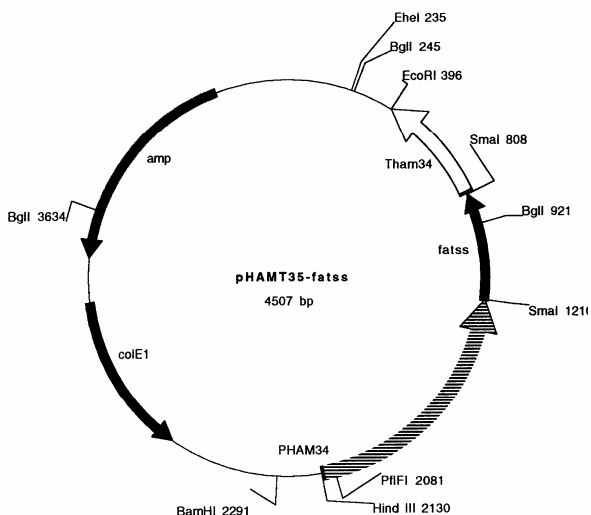
**Figura I.7:** Plasmídeo pHAMT35H.

Esta construção, baseada no plasmídeo pUC19, contém a cassete de expressão do gene para a resistência à higromicina B (higromicina fosfotransferase-HPT) clonada na forma de um fragmento *SmaI-SmaI* de 1253 pb, regulada pelo promotor do gene *ham34* de *Bremia lacatuae* (EMBL gene bank, accession number X16984), clonado na forma de um fragmento *Hind III-SmaI* de 920 pb, e pelo terminador do gene *ham34*, clonado na forma de um fragmento *SmaI-EcoRI* de 550 pb.



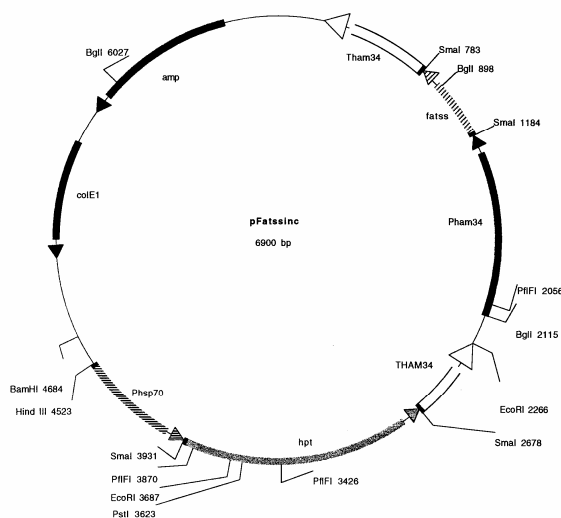
Por uma questão de organização de trabalho foi decidido inibir apenas a expressão de uma das elicitinias de *P. cinnamomi*, a  $\beta$ -cinamomina, com recurso à estratégia de RNA anti-sentido. Esta estratégia consistiu em duas abordagens distintas: a primeira visa a síntese de um transcrito anti-sentido completo do gene da  $\beta$ -cinamomina. Este RNA consiste num fragmento com 400 pb, correspondente à região 273-673 do *cluster* das elicitinias, composta pela cadeia de leitura aberta completa do gene da  $\beta$ -cinamomina mais a região não traduzida situada a jusante do promotor deste gene. O fragmento foi clonado em pHAMT35H,

originando pHAMT35-fatss, para a sequência completa anti-sentido (representado na Figura I.9) e pHAMT35-fss para a sequência completa sentido; a clonagem do mesmo fragmento em pTH210 deu origem a pFatssInc (representado na Figura I.10) para a sequência completa anti-sentido e pFssInc para sequência completa sentido (Sancho, 1999).



**Figura I.10:** Representação do mapa genético do plasmídeo pFatssInc.

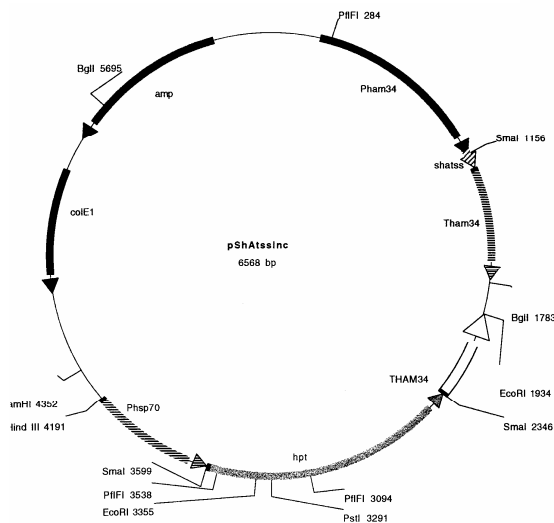
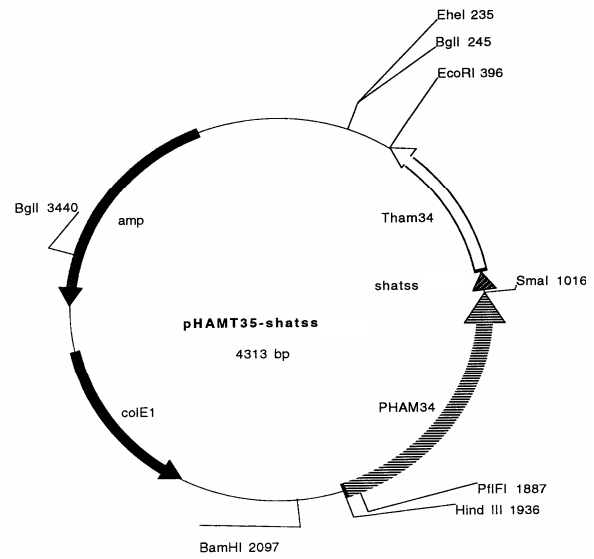
**Figura I.9:** Representação do mapa genético do plasmídeo pHAMT35-Fatss.



A segunda abordagem visa a produção de um curto oligonucleótido anti-sentido compreendido no RNA da  $\beta$ -cinamomina. Este fragmento tem um comprimento de 61 nucleótidos (correspondentes à região 274-334 do *cluster* genômico). 43 nucleótidos são complementares da região não traduzida situada a jusante do promotor deste gene. Os restantes 18 nucleótidos são complementares aos primeiros 6 codões do mRNA da  $\beta$ -cinamomina. O fragmento foi clonado em pHAMT35H, originando pHAMT35-shatss para a sequência curta anti-sentido (representado na Figura I.11) e pHAMT35-shss para a sequência curta sentido normal; a clonagem do mesmo fragmento em pTH210 deu origem a pShAtssInc

para a sequência curta anti-sentido (representado na Figura I.12) e pShSenseInc para sequência curta sentido normal) (Sancho, 1999).

**Figura I.11:** Representação do mapa genético do plasmídeo pHAMT35-shatss.



**Figura I.12:** Representação do mapa genético do plasmídeo pShAtssInc.

### I.2.6.2. Produção, extracção e purificação dos plasmídeos

Os plasmídeos foram produzidos em *Escherichia coli* (*TOP 10 F' Cells*, Invitrogen). As culturas foram mantidas em glicerol, a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até ao seu plaqueamento em meio Luria-Bertani sólido [LB *broth* 2% (p/v); agar 1,5% (p/v)] com ampicilina a uma concentração de 50  $\mu\text{g/ml}$ .

Uma única colónia referente a cada um dos plasmídeos foi usada para iniciar a respectiva mini-cultura em 3 ml de meio LB líquido com ampicilina (50 $\mu\text{g/ml}$ ). A cultura foi incubada durante 8 horas, a  $37^{\circ}\text{C}$  e sob vigorosa agitação (300 rpm). A mini-cultura foi depois diluída de 1/500 em meio LB selectivo, de modo a inocular 25 ml de meio (num *Erlenmeyer* de 200 ml). Seguiu-se mais um período de crescimento durante 12 a 16 horas, a  $37^{\circ}\text{C}$  e sob

agitação vigorosa, até a cultura atingir uma densidade de 3 a 4 x 10<sup>9</sup> células/ml. As células bacterianas foram então recolhidas por centrifugação a 6000 g durante 10 min, a 4° C. O *pellet* foi ressuspenso em 4 ml de tampão de ressuspensão do *Qiagen Plasmid Midi Kit* (Qiagen) (Tris-Cl 50 mM; EDTA 10 mM, pH 8,0; RNase A 100 µg/ml) e em seguida foram adicionados à mistura 4 ml do tampão de lise [NaOH 200 mM; SDS 1% (p/v)]; os componentes foram misturados suavemente invertendo quatro a seis vezes; a mistura foi mantida durante 5 min a 22°C. Foram adicionados 4 ml de tampão de neutralização previamente arrefecido a 4°C (acetato de potássio 3,0 M, pH 5,5); a mistura foi homogeneizada suavemente invertendo o tubo quatro a seis vezes e arrefecida em gelo durante 15 min. Procedeu-se depois a uma centrifugação a 20000 g durante 30 min, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido imediatamente e novamente centrifugado a 20000 g durante 15 min, a 4°C. O DNA plasmídico presente no sobrenadante foi purificado por cromatografia de troca aniônica através da aplicação do sobrenadante numa coluna *Qiagen-tip 100*, previamente equilibrada com 4 ml de tampão QBT [NaCl 750 mM; MOPS 50 mM, pH 7,0; isopropanol 15% (v/v); Triton X-100 0,15% (v/v)]. A coluna foi lavada por duas vezes com 10 ml de tampão QC (NaCl 1,0 M; MOPS 50 mM, pH 7,0; isopropanol 15% (v/v)) e o DNA plasmídico eluído da coluna com 5 ml de tampão QF [NaCl 1,25 M; Tris-Cl 50 mM, pH 8,5; isopropanol 15% (v/v)]. Ao volume eluído foram adicionados 3,5 ml de isopropanol, a 22°C, a mistura foi homogeneizada e centrifugada imediatamente a 15000 g durante 30 min, a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente decantado, o *pellet* lavado com 2 ml de etanol (70% v/v) a 22°C e centrifugado a 15000 g durante 10 min. O sobrenadante foi decantado sem perturbação do *pellet* o qual foi depois seco ao ar durante 5 a 10 min e ressuspenso em 105 µl de água. O DNA foi quantificado por leitura de absorvência a 260 nm e conservado a 4°C.

### I.2.6.3. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi realizada por leitura de absorvência a 260 nm de uma alíquota do produto de extração num espectrofotómetro *MBA 2000* (Perkin Elmer). Também foram calculados os *ratio* de (absorvência a 260 nm)/(absorvência a 280 nm) e registados os espectros de absorvência entre 220 e 350 nm, para avaliação da pureza das amostras.

#### I.2.6.4. Linearização dos plasmídeos

Uma das condições testada durante os ensaios de transformação foi o estado dos plasmídeos que foram utilizados sob a forma circular ou sob a forma linearizada. Para a linearização, os plasmídeos foram digeridos com *HindIII*. A digestão foi realizada num volume final de 30  $\mu$ l, na presença de 1  $\mu$ l de enzima *HindIII* (10 U/ $\mu$ l, Roche) por cada 15  $\mu$ g de DNA, 3  $\mu$ l de tampão da enzima 10X concentrado (NaCl 500 mM; Tris-HCl 100 mM; MgCl<sub>2</sub> 100 mM; DTT 10 mM; pH 7,9) e água. A reacção decorreu a 37°C durante 2 horas. A enzima foi desactivada por aquecimento a 65°C durante 15 min.

#### I.2.7. Transformação genética

##### I.2.7.1. Transformação com aplicação de lipossomas e CaCl<sub>2</sub>/PEG

Os protoplastos foram lavados com 10 ml de solução MTC (ver composição na Tabela I.5), contados e depois centrifugados a 2000 *g* durante 10 min. O *pellet* foi ressuspensão em MTC de forma a atingir uma concentração de 10<sup>7</sup> células/600  $\mu$ l.

Tabela I.5: Composição das soluções MTC.

Composição das soluções MTC		
MTC – 10	MTC - 20	MTC - 50
Manitol 1,0 M	Manitol 1,0 M	Manitol 1,0 M
Tris-HCl 10 mM, pH 7,5	Tris-HCl 10 mM, pH 7,5	Tris-HCl 10 mM, pH 7,5
CaCl <sub>2</sub> 10 mM	CaCl <sub>2</sub> 20 mM	CaCl <sub>2</sub> 50 mM

Num tubo *Eppendorf*, 30  $\mu$ g de DNA (constituídos por um único tipo de plasmídeo ou constituídos por 15  $\mu$ g de cada um dos plasmídeos nos casos de co-transformação, conforme indicado na Tabela I.6) foram incubados com um agente de transfectão (ver Tabela I.7), num volume máximo de 60  $\mu$ l, durante 10 min. Esta mistura foi, em seguida, adicionada delicadamente a 600  $\mu$ l da suspensão de protoplastos e novamente incubada durante 10 min. Foram adicionados, de um modo suave e lento, 600  $\mu$ l de uma solução PEG 6000/MTC-20 (ver composição na Tabela I.8) e a mistura foi incubada durante 10 min. Foram adicionados 8,8 ml de uma solução de manitol (1 M)/meio V<sub>8</sub>C (4/1) e a cultura foi incubada em posição horizontal durante  $\approx$  16 horas, a 25°C, no escuro.

A cultura foi centrifugada a 3400 g, durante 30 min. O sobrenadante foi eliminado e o *pellet* ressuspenso em 500 µl de uma solução de manitol (1 M) / meio V<sub>8</sub>C (4/1). A suspensão foi plaqueada em meio V<sub>8</sub>Ca com higromicina B (250 µg/ml). Esperou-se o aparecimento de transformantes durante um período máximo de 10 dias após o ensaio.

Estes ensaios foram efectuados pelo menos duas vezes com cada um dos isolamentos seleccionados.

**Tabela I.6:** Plasmídeos utilizados nos ensaios de transformação.

Tipo de Plasmídeo	Forma do Plasmídeo
pHMT35H	Linearizado
	Não linearizado
pTH210	Linearizado
	Não linearizado
pHMT35-fatss + pHMT35H	Linearizado
	Não linearizado
pFatssinc	Linearizado
	Não linearizado
pHMT35-shatss + pHMT35H	Linearizado
	Não linearizado
pShAtssInc	Linearizado
	Não linearizado

**Tabela I.7:** Agentes de transfecção testados na transformação.

Agente de transfecção
100 µg de <i>Escort</i> <sup>a</sup> (Sigma) / 30 µg de DNA plasmídico
40 µg de <i>Fugene 6</i> <sup>a</sup> (Boehringer-Mannheim) / 30 µg de DNA plasmídico
40 µg de <i>Lipofectin</i> <sup>a</sup> (Life-Technologies) / 30 µg de DNA plasmídico
60 µg de DNA de esperma de arenque (Life-Technologies) / 30 µg de DNA plasmídico

(a) Lipossoma catiónico

**Tabela I.8:** Composição das soluções PEG 6000.

Composição das soluções PEG 6000	
PEG 6000/MTC-20 - A	PEG 6000/MTC-20 - B
PEG 6000 40%(p/v)	PEG 6000 50%(p/v)
Manitol 1,0 M	Manitol 1,0 M
Tris-HCl 10 mM, pH 7,5	Tris-HCl 10 mM, pH 7,5
CaCl <sub>2</sub> 20 mM	CaCl <sub>2</sub> 20 mM

### I.2.7.2. Transformação com aplicação de electroporação

Foram realizados vários ensaios de transformação com um aparelho electroporador *Gene Pulser* (BIORAD). As células usadas para a transformação foram protoplastos sujeitos a um de dois tratamentos alternativos:

- O *pellet* de protoplastos foi ressuspensão em tampão de electroporação a 20°C, lavado e preparado para electroporação;

- O *pellet* de protoplastos foi ressuspensão numa solução de manitol 1,0 M / meio V<sub>8</sub>C (4/1) e os protoplastos foram regenerados durante 16 h, a 25°C, no escuro. Após a incubação foram recolhidos por centrifugação a 2800 g durante 15 min, lavados com tampão de electroporação a 20°C e preparados para electroporação.

Um resumo das condições testadas é apresentado na Tabela I.9.

Os tampões de electroporação utilizados foram uma solução MTC-20 (manitol 1 M; Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; CaCl<sub>2</sub> 20 mM), uma solução de *Petri* modificada (CaCl<sub>2</sub> 0,25 mM; MgSO<sub>4</sub> 1 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM; KCl 0,8 mM) ou uma solução de HEPES 1mM, manitol 50 mM.

Os protoplastos (regenerados ou não) foram ressuspensos em 1200 µl de tampão de electroporação a 4°C. Uma alíquota de 300 µl foi colocada na cuvette (previamente esterilizada por irradiação UV e arrefecida a 4°C), bem como 10 µg de DNA plasmídico, sob a forma circular ou linearizada por digestão com *HindIII*. Após a aplicação do impulso eléctrico, a suspensão foi arrefecida durante 10 min em gelo. Foi adicionado 1 ml de uma solução de manitol 1,0 M / meio V<sub>8</sub>C (4/1) e a mistura foi transferida para um tubo *Eppendorf* de 2 ml e incubada a 25°C. A recuperação imposta às células electroporadas antes de ser exercida pressão de selecção também foi testada em dois períodos: 3 ou 16 h. Após o período de recuperação, as células electroporadas foram plaqueadas em meio selectivo (V<sub>8</sub>Ca com 250 µg/ml de higromicina B). Esperou-se o aparecimento de transformantes durante um período até 10 dias após o ensaio.

**Tabela I.9:** Resumo das condições aplicadas nos ensaios de electroporação (decaimento exponencial). O DNA plasmídico usado nestes ensaios foi uma combinação de pHAMT35H e pHAMT35-fats. Cada um destes ensaios foi repetido pelo menos duas vezes para os isolamentos PA45 e PA37.  
Capacitância em todos os ensaios: 50 µF.

Intensidade	Forma do Plasmídeo	Tampão de Electroporação		
		MTC-20	<i>Petri</i> modificada	HEPES/manitol
0,5 kV/cm	Linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados
	Não linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados
1,0 kV/cm	Linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados
	Não linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados
1,5 kV/cm	Linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados
	Não linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados
2,0 kV/cm	Linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados
	Não linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados
2,5 kV/cm	Linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados
	Não linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados
2,75 kV/cm	Linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados
	Não linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados
3,75 kV/cm	Linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados
	Não linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados
5,0 kV/cm	Linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados
	Não linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados
6,0 kV/cm	Linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados
	Não linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados
7,5 kV/cm	Linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados
	Não linearizado	Protoplastos	Protoplastos	Protoplastos
		Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados	Protoplastos regenerados

### I.2.7.3. Transformação com aplicação de biolística

O aparelho para o bombardeamento e os demais componentes que foram utilizados nestes ensaios são da marca BIORAD e a preparação dos mesmos foi realizada de acordo com instruções do fabricante.

Para a preparação das micropartículas (quantidade suficiente para cerca de 100 bombardeamentos), foram pesadas 30 mg de micropartículas de ouro ( $\varnothing = 0,6 \mu\text{m}$ ) para um tubo *Eppendorf* de 1,5 ml e adicionaram-se 500  $\mu\text{l}$  de etanol (70%). A mistura foi vigorosamente agitada no vórtex durante 15 min e deixada em repouso durante 15 min. A suspensão foi brevemente centrifugada durante 5 s e o sobrenadante descartado. Ao *pellet* foram adicionados 500  $\mu\text{l}$  de água destilada esterilizada; seguiu-se 1 min de agitação no vórtex, 1 min para assentamento das partículas, 3 s de centrifugação e remoção do sobrenadante. Estes passos de lavagem com água foram repetidos por mais duas vezes. Por fim, foram adicionados 500  $\mu\text{l}$  de glicerol (50%) (concentração de  $\approx 60$  mg de partículas/ml). As partículas assim preparadas foram guardadas a 20°C.

De seguida, foi efectuada a aderência do DNA plasmídico às micropartículas e aderência dos micropartículas aos macrotransportadores. As micropartículas, previamente preparadas, foram agitadas no vórtex durante 5 min. Foram removidos 100  $\mu\text{l}$  de micropartículas para um tubo de 1,5 ml e, agitando continuamente, foram adicionados por esta ordem: 10  $\mu\text{l}$  de DNA (2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de plasmídeo pHAMT35H ou pTH210), 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  2,5 M e 40  $\mu\text{l}$  de espermidina 0,1 M. Seguiu-se um período de agitação de 3 min no vórtex e um minuto para assentamento das partículas. As partículas foram precipitadas por centrifugação durante 2 s e o sobrenadante removido. Sem perturbar o *pellet*, foram adicionados 280  $\mu\text{l}$  de etanol 70% (v/v); o líquido foi removido cuidadosamente e novamente foram adicionados 280  $\mu\text{l}$  de etanol 70% (v/v); e o líquido descartado. Adicionaram-se 100  $\mu\text{l}$  de etanol 100% (v/v) e o *pellet* foi ressuspenso suavemente. Desta suspensão foram removidas alíquotas de 10  $\mu\text{l}$  e transferidas para o centro de macrotransportadores. O líquido foi seco ao ar.

O bombardeamento foi efectuada num aparelho PDS-1000/He aplicando condições de distância/pressão referidas na Tabela I.10.

Protoplastos foram plaqueados em meio  $\text{V}_8\text{Ca}$  de modo a permitir um crescimento homogéneo e simultâneo em toda a placa. As placas foram incubadas durante 1 ou 3 dias,

permitindo a obtenção de placas com protoplastos regenerados ou placas de micélio em crescimento activo, respectivamente. Foram efectuados 48 disparos (um por cada uma das combinações distância/pressão/plasmídeo/placa/isolamento).

**Tabela I.10:** Resumo das condições de bombardeamento utilizadas nos ensaios de transformação biolística. Os disparos foram efectuados sob condições de pressão reduzida (28 mmHg). Estes ensaios foram efectuados com os isolamentos PA45 e PA37 e com os plasmídeos pHAMT35H e pTH210.

Distância do écran de paragem	Pressão de disparo	Placa
6 cm	900 psi	Micélio
		Protoplastos regenerados
	1100 psi	Micélio
		Protoplastos regenerados
	1350 psi	Micélio
		Protoplastos regenerados
9 cm	1350 psi	Micélio
		Protoplastos regenerados
	1550 psi	Micélio
		Protoplastos regenerados
	1800 psi	Micélio
		Protoplastos regenerados

Após o bombardeamento as placas foram incubadas durante 24 horas, a 25°C na obscuridade. Em seguida, o conteúdo das placas foi dividido em pequenos pedaços que serviram de inóculo para placas de meio selectivo V<sub>8</sub>Ca com higromicina B (250 µg/ml). Esperou-se o aparecimento de transformantes durante um período até 10 dias após o ensaio.

### I.2.8. Discriminação dos transformantes

A amplificação de um fragmento do gene da higromicina fosfotransferase (*hpt*) a partir de DNA extraído de estirpes obtidas sob pressão de selecção do antibiótico confirma a ocorrência da transformação genética.

A amplificação de um fragmento *ham34 + fats*, proveniente da sequência usada para induzir o silenciamento, a partir de DNA extraído de transformantes permite fazer a distinção entre transformantes simples (em que apenas o plasmídeo com o gene de resistência ao antibiótico está presente) e os co-transformantes (em que, além do plasmídeo com o gene *hpt*, também está presente o plasmídeo com o fragmento de sequência anti-sentido da beta β-cinamomina).

### I.2.8.1. Extração do DNA genómico

O micélio, cultivado em meio líquido durante 4 dias, foi recolhido e lavado cuidadosamente com água destilada esterilizada para retirar todos os vestígios de meio. O excesso de humidade foi retirado através do contacto com papel absorvente. O micélio foi colocado num almofariz e reduzido a pó fino, pela pressão exercida contra as paredes do recipiente com um pilão, após a adição de pequenas quantidades de azoto líquido. A massa macerada e congelada foi pesada e dividida em amostras de 100 mg e transferida para tubos *Eppendorf* de 1,5 ml com o auxílio de uma espátula gelada.

Foram, depois, adicionados 400 µl de tampão *API*<sup>8</sup> do kit *DNeasy*<sup>TM</sup> *Plant* (Qiagen) e 20 µl de uma solução de RNase (20 mg/ml). Esta mistura foi agitada vigorosamente no vórtex, de modo a desfazer os aglomerados, aquecida durante 15 min a 65°C num banho termostático; durante a reacção a mistura foi energicamente agitada três a quatro vezes. Após este passo de lise, 130 µl de tampão *AP2*<sup>8</sup> foram adicionados e misturados com o lisado, que foi em seguida arrefecido 5 min em gelo, de modo a precipitar proteínas e polissacáridos.

O lisado, bastante viscoso e contendo DNA, foi aplicado na coluna *QIAshredder*. A recolha do eluente foi feita num tubo *Eppendorf* de 2 ml, através de uma centrifugação a 16000 g, durante 2 min.

O sobrenadante recolhido foi, em seguida, transferido para um novo tubo, onde lhe foi adicionado metade do seu volume em tampão *AP3*<sup>8</sup> e igual volume de etanol a 100%. 650 µl da mistura anterior (incluindo precipitados) foram aplicados numa coluna *DNeasy*. Esta foi sujeita a uma centrifugação durante 1 min a 6000 g e o eluente eliminado. O passo anterior foi repetido para o restante volume da amostra. Por fim, a coluna *DNeasy* foi colocada num novo tubo, foi lavada com 500 µl de tampão *AW*<sup>8</sup> e centrifugada a 6000 g, durante 1 min. O eluente foi eliminado, 500 µl de tampão *AW* foram adicionados e a coluna centrifugada a 16000 g, durante 2 min, para secar a membrana da coluna.

A coluna foi transferida para um novo tubo *Eppendorf*. 50 µl de tampão *AE*<sup>8</sup>, previamente aquecido a 65°C, foram directamente pipetados para a membrana da coluna, que foi, em seguida, mantida durante 5 min a ≈ 20°C e centrifugada a 16000 g durante 1 min. A

---

<sup>8</sup> Os tampões indicados fazem parte do kit *DNeasy*<sup>TM</sup> *Plant* (QIAGEN) e a sua composição não é descrita pelo fabricante.

lavagem da coluna foi repetida para recolher o DNA restante. O DNA foi quantificado por leitura de absorvência a 260 nm e conservado a 4°C.

### I.2.8.2. Reacções de amplificação

As amplificações foram efectuadas em tubos *Eppendorf* de 500 µl, num volume final de 50 µl numa solução contendo:

- 0,4 µM de cada *primer* específico
- 10 mM de uma mistura de desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
- tampão de reacção (Tris-HCl 10 mM; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM)
- *Taq* DNA Polimerase (2,5 U) (Boehringer Mannheim)
- 100 ng de DNA genómico ou 1 ng de DNA plasmídico.

As temperaturas gerais e o número de ciclos das reacções de PCR estão indicados na Tabela I.11.

**Tabela I.11** : Esquema de ciclos e temperaturas de PCR.

N.º de ciclos	Função	Temperatura (°C)	Tempo
1	Desnaturação inicial da amostra	94	3 min
30	Desnaturação do DNA	94	45 s
	Hibridação dos <i>primers</i>	X	45 s
	Polimerização das cadeias de DNA	72	45 s
1	Polimerização final	72	7 min
1	Conservação	4	∞

Os *primers* específicos foram sintetizados pela firma *GENSET SA*. Todos os outros reagentes utilizados foram encomendados a *Boehringer Mannheim*.

A temperatura de hibridação dos *primers* (X) foi definida para cada caso.

O controlo negativo das reacções foi constituído por 10 µl de água ultrapura (Milli-Q).

Os tubos *Eppendorf* com a mistura de reacção foram mantidos a 0°C até serem colocados no termociclador (modelo *UNOII* da *Biometra*).

### I.2.8.3. Amplificação de um fragmento do gene *hpt*

O fragmento a ser amplificado foi definido numa zona da sequência codificante (CDS, *Coding Sequence*). São conhecidas várias sequências para o gene *hpt*. Como não se sabia qual delas foi usada na construção dos plasmídeos usados na transformação, os *primers* foram escolhidos numa zona de homologia das CDSs entre quatro desses genes publicados no *GenBank* (Números de Acesso: U09715, U40398, AF294982 e AF354045) (Ver Anexo 1, Figura 2).

- Sequência do *primer* directo: (5' → 3') (18 nt): CGCCGATGGTTTCTACAA
- Sequência do *primer* reverso: (3' → 5') (18 nt): TATCACCTTTGGCTGCGG
- Temperatura de hibridação na PCR: 65°C. Tamanho do fragmento esperado: 839 pb.

### I.2.8.4. Amplificação de um fragmento *ham34 + fatss*

O fragmento cuja presença se pretende confirmar foi definido de modo a amplificar uma parte do promotor do gene *ham34* e toda a sequência anti-sentido *fatss*.

- Sequência do *primer* directo: (5' → 3') (23 nt): CTTTTGCGTCCTACCATCCGTTA  
Localização: 398 pb – 420 pb no promotor do gene *ham34*
- Sequência do *primer* reverso: (3' → 5') (25 nt): CTACCGCACGCACACTGCCTCGGGG  
Localização: 382 pb – 406 pb no fragmento *fatss*
- Temperatura de hibridação na PCR: 65°C. Tamanho do fragmento esperado: 754 pb.

### I.2.8.5. Electroforese em gel de agarose

Os produtos da amplificação por PCR foram analisados por separação electroforética em gel de agarose (1% p/v). Foi adicionado 1 g de agarose em pó a 100 ml de tampão TBE, num *Erlenmeyer*, e a mistura foi aquecida num forno de microondas até à dissolução da agarose. A solução foi arrefecida até, aproximadamente, 70°C e foram adicionados 5 µl de uma solução *stock* de brometo de etídio (10 mg/ml em água). O gel foi vertido no molde, previamente selado e onde foi montado, em seguida um pente (molde dos poços). O gel tinha uma espessura de aproximadamente 5 mm. Após a solidificação do gel, o pente foi retirado e o gel colocado num tanque de electroforese modelo *Sub Cell GT* (BIORAD). Foi adicionado tampão TBE em volume suficiente para cobrir o gel.

As amostras de DNA foram misturadas com tampão de amostras (solução de azul de bromofenol com glicerol, 10 µl de amostra + 2 µl de tampão) e colocadas cuidadosamente dentro dos poços, de modo a evitar misturas entre amostras. Para avaliar o comprimento de cada fragmento separado no gel, foi utilizado um marcador de massa molecular de 123 pb ou 1000 pb, em concentrações de 0,1 µg/µl (Invitrogen, 1 µg/µl).

As condições de corrida do gel foram 150 mA (ou 300 V) durante 20 min.

As bandas correspondentes aos fragmentos de DNA foram visualizadas por acção de radiação ultravioleta num transiluminador modelo *Gel DOC 2000* (BIORAD). Sempre que a situação o justificava, o gel foi fotografado e analisado com auxílio do programa *Quantity One* (BIORAD).

### **I.2.9. Análise da produção de β-cinamomina**

A análise da produção da elicina foi efectuada em filtrados de meios de cultura dos isolamentos selvagens (PA45 e PA37) e transformados geneticamente (FATSS e 13C), cultivados em meio V<sub>8</sub>C ou MSE, durante 5 ou 15 dias.

#### **I.2.9.1. Precipitação de proteínas de filtrados de meios de cultura**

Num tubo *Eppendorf* de 1,5 ml foram colocados 1 ml de meio de cultura e 250 µl duma solução de ácido tricloroacético (100% p/v), misturando por pipetagem. Seguiu-se um período de arrefecimento de 30 min em gelo. A mistura foi depois centrifugada a 16000 g durante 10 min. O sobrenadante foi eliminado e o *pellet* lavado com 1 ml de acetona (100%) e, em seguida, com 1 ml de éter dietílico (100%). Por fim, o *pellet* foi ressuspensão em 16 µl de uma solução 1,0 M Tris pH 9,5.

#### **I.2.9.2. Electroforese de proteínas em gel SDS-PAGE**

A electroforese foi realizada no sistema *Mini Protean II* (BIORAD). A “*sandwich*” constituída pelas placas de vidro e espaçadores foi montada e colocada no suporte. A solução do Gel de Separação [Acrilamida 17,5% (p/v)] foi, cuidadosamente, introduzida na *sandwich*, de modo a evitar a formação de bolhas de ar. Após ter sido adicionada a quantidade apropriada de gel de separação (até o topo do gel atingir o nível de 1 cm abaixo do topo do vidro mais pequeno), foi colocada uma camada de etanol (100%) no topo do gel, de modo a

assegurar que a superfície do gel ficasse lisa e sem declives. A polimerização do gel ocorreu à temperatura ambiente durante 45 min. Em seguida, o etanol foi retirado e no seu lugar foi introduzida a solução do Gel de Concentração [Acrilamida 4% (p/v)]. O pente foi montado na *sandwich* e o seguiu-se mais um período de polimerização durante 30 min. De seguida, a *sandwich* foi colocada no eléctrodo e este foi inserido no tanque de electroforese; foi adicionado tampão de corrida no interior e no exterior do eléctrodo, assegurando que, tanto a base como o topo do gel, se encontravam imersos em tampão. O pente foi retirado e a integridade dos poços foi verificada.

Preparação da solução do gel de separação: foram misturados 5,830 ml de solução Acrilamida/Bis-acrilamida [Acrilamida 30% (p/v); Bis-acrilamida 0,8% (p/v)], 3,750 ml de Tris-HCl 1,0M pH 8,8 , 50 µl de solução SDS 20% (p/v), 337 µl de água destilada estéril e 25 µl de solução persulfato de amónia 20% (p/v) (solução preparada no momento da preparação do gel). Imediatamente antes de verter a mistura na *sandwich*, foram adicionados 10 µl de TEMED.

Preparação da solução do gel de separação: foram misturados 5,830 ml de solução Acrilamida/Bis-acrilamida [Acrilamida 30% (p/v); Bis-acrilamida 0,8% (p/v)]; 3,750 ml de Tris-HCl 1,0 M, pH 8,8; 50 µl de solução SDS 20% (p/v); 337 µl de água destilada esterilizada e 25 µl de uma solução de persulfato de amónia 20% (p/v) (solução preparada no momento da preparação do gel). Imediatamente antes de verter a mistura na *sandwich* foram adicionados 10 µl de TEMED.

Preparação da solução do gel de concentração: foram misturados 1,665 ml de solução Acrilamida/Bis-acrilamida [Acrilamida 30% (p/v); Bis-acrilamida 0,8% (p/v)]; 1,25 ml de Tris-HCl 1,0 M, pH 8,8; 50 µl de solução SDS 20% (p/v), 7 ml de água destilada esterilizada e 25 µl de uma solução de persulfato de amónia 20% (p/v) (solução preparada no momento da preparação do gel). Imediatamente antes de verter a mistura na *sandwich*, foram adicionados 25 µl de TEMED.

Preparação do tampão de corrida: a 800 ml de água destilada foram adicionados 14,4 g de glicina, 6 g de Tris e 5 ml de solução SDS 20% (p/v). Foi acrescentada água destilada até perfazer um litro de tampão.

Preparação do tampão redutor: foram misturados 10 ml de uma solução Tri-HCl 1,0 M, 12,5 ml de glicerol, 2,5 g de SDS, 1,93 g de DTT e 250 mg de azul de bromofenol. Foram preparadas alíquotas para preservação do tampão a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

16  $\mu\text{l}$  de cada amostra foram misturados com 4  $\mu\text{l}$  de tampão redutor. As amostras foram aquecidas a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 5 min e aplicadas no gel.

A corrida foi realizada a 120 V até a frente de migração atingir o gel de separação; a restante corrida foi realizada a 175 V.

### **I.2.9.3. Detecção por coloração com azul de Coomassie**

Após o final da corrida electroforética, o gel foi retirado da *sandwich*, imerso em solução de coloração de Coomassie e agitado nessa mesma solução durante 30 min. Em seguida, o gel foi lavado com água destilada e agitado em solução de descoloração (que foi mudada várias vezes). O tempo de descoloração foi variável (de 1 h a períodos de uma noite), dependendo do momento em que se considerava que a coloração não específica já não interferia na leitura dos resultados. Após a descoloração, o gel foi fotografado.

Preparação de solução de coloração de Coomassie: foram misturados 500 ml de etanol, 100 ml de ácido acético e 3 g de azul de Coomassie R-250. Foi acrescentada água destilada até perfazer um litro de solução.

Preparação de solução de descoloração: foram misturados 100 ml de metanol, 100 ml de ácido acético e 800 ml de água destilada.

### **I.2.9.4. Detecção por *Western blotting***

O procedimento de transferência capilar das proteínas do gel para a membrana foi realizado com o auxílio do sistema *Trans-Blot SD semi-dry transfer cell* (BIORAD), de acordo com instruções do fabricante.

Dois pedaços de papel *Extra Thick Blot* (BIORAD) e uma membrana *Trans-Blot Transfer Medium* (nitrocelulose, 0,2  $\mu\text{m}$ ) (BIORAD) foram cortados com tamanho semelhante ao gel. O gel e a membrana foram equilibrados com o tampão de transferência Bjerrum e Schaffer-Nielsen (BSN) (48 mM Tris, 39 mM glicina, 20 % metanol, pH 9,2) durante 15 min. A *sandwich* de transferência foi montada sobrepondo, sucessivamente, em

cima do ânodo de platina do aparelho, um pedaço de papel *Extra Thick Blot*, a membrana, o gel SDS-PAGE e finalmente o outro pedaço de papel *extra thick blot*. As bolhas de ar foram excluídas a cada colocação de um novo elemento na *sandwich* através do movimento de rotação de uma pipeta limpa em cima da cada nova camada. Foram colocados 10 ml de tampão BSN no topo da *sandwich* e o excesso removido da placa do ânodo. A placa do cátodo foi montada sem perturbar o empilhamento. A tampa de segurança foi fechada e o aparelho foi ligado com os parâmetros de potência de acordo com o tamanho e natureza do gel: 15 V durante 20 min.

Para avaliar o sucesso da transferência, a membrana foi corada com uma solução Ponceau S [Ponceau S 0.5 % (p/v), ácido acético 1% (v/v)] durante 8 min, com agitação suave. As bandas do marcador molecular foram assinaladas com cortes de chisato. A coloração foi, depois, removida com uma lavagem com água destilada, durante 8 min com agitação suave.

Para a detecção das proteínas, a superfície da membrana que não continha proteínas foi bloqueada, de modo a evitar ligações não específicas: a membrana foi tratada com um solução de PBS-T [1 litro de *Phosphate Buffered Saline* (Sigma) + 500 µl Tween 20], durante 30 min, sob agitação suave.

A membrana foi depois tratada durante 16 h, a 4°C, com o anticorpo primário contra a  $\beta$ -cinamomina (cedido por Carlos Novo) diluído 1000x em solução PBS-T. Após este período, a membrana foi lavada três vezes com solução PBS-T, durante 10 min sob agitação suave.

A membrana foi, em seguida, tratada durante 2 h, sob agitação suave, com o anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina anti Ig G de coelho, diluído 6700x em solução de PBS-T. Após este período, a membrana foi lavada três vezes com solução PBS-T, durante 10 min sob agitação suave.

Finalmente, a membrana foi imersa em solução de revelação, BCIP/NBT (*5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate / Nitro Blue Tetrazolium*) (Sigma), e mantida no escuro durante, aproximadamente, 10 min. Posteriormente, foi lavada com água destilada, seca e fotografada.

**Nota 1**

Segurança Biológica: todos os materiais infectados (meios de cultura, material de laboratório, etc.) foram autoclavados durante 1 h a 121°C, antes de serem colocados no lixo, para inativação dos propágulos bacterianos e de *P. cinnamomi* usados neste trabalho.

**Nota 2**

Quando não especificada outra referência, os procedimentos básicos de biologia molecular atrás descritos seguiram as recomendações de Sambrook *et al.*, (1989).

## **I.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **I.3.1. Selecção do material biológico**

Os trabalhos foram iniciados com a selecção de isolamentos de *P. cinnamomi*, que estão indicados na Tabela I.I. A necessidade de trabalhar com isolamentos diferentes justifica-se pelo facto destes poderem apresentar características distintas a nível do seu potencial patogénico, perdendo virulência ao longo de sucessivas repicagens em meios de cultura, quando mantidos em condições laboratoriais durante muito tempo (P. Caetano, comunicação pessoal). É a razão pela qual foram seleccionados isolamentos com diferentes períodos de permanência em meio laboratorial (com isolamentos realizados nos anos de 1995, 1998 e 2000). Por outro lado, a receptividade aos diferentes procedimentos necessários aos trabalhos de transformação genética poderia também diferir entre isolamentos recolhidos em tempos diferentes.

A utilização de isolamentos provenientes de diferentes hospedeiros (PA, sobreiro e PE, azinheira) também foi tida em consideração como potencial factor de diferenciação de receptividade à manipulação genética, já que foram caracterizadas algumas diferenças morfológicas e fisiológicas entre isolamentos de hospedeiros diferentes (P. Caetano, comunicação pessoal).

### **I.3.2. Estudo da sensibilidade a antibióticos**

A aplicação de uma metodologia de transformação implica necessariamente a existência de um processo de selecção dos transformantes. A higromicina B já foi usada, anteriormente, como agente de selecção em ensaios de transformação genética de *Phytophthora* spp (Judelson *et al.*, 1991b; Bottin *et al.*, 1999) e foi este o antibiótico escolhido, pois estava disponível um vector de transformação com a respectiva cassette de resistência, já clonada com as sequências reguladoras apropriadas. Foi então efectuado um estudo para determinar a resistência natural à higromicina dos isolamentos de *P. cinnamomi* seleccionados para realização dos trabalhos. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela I.12.

**Tabela I.12:** Resultados do ensaio de sensibilidade dos isolamentos de *P. cinnamomi* ao antibiótico higromicina B efectuados em meio V<sub>8</sub>Ca.

Concentração de higromicina B (µg/ml de meio)	Crescimento do Isolamento				
	PA20	PA37	PA45	PE62	PE95
0	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
50	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
70	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
100	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
150	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
200	Não	Sim	Sim	Não	Sim
250	Não	Não	Não	Não	Não
300	Não	Não	Não	Não	Não

Face aos resultados obtidos, foi decidido usar uma concentração de higromicina B de 250 µg/ml para realizar a selecção inicial dos transformantes. A resistência natural destes isolamentos de *P. cinnamomi* revelou-se relativamente elevada, já que concentrações de 70 µg/ml de higromicina foram usadas na selecção de transformantes de *P. infestans* (Judelson *et al.*, 1991b) e *P. parasitica* (Bottin *et al.*, 1999).

### I.3.3. Produção de zoósporos

A necessidade de obter zoósporos, livres de contaminações e em grande número, de *P. cinnamomi* baseou-se em trabalhos anteriores que referem a transformação de outras espécies de *Phytophthora* nesta forma (Érsek *et al.*, 1994; Latijnhouwers *et al.*, 2003) ou que aplicam zoósporos como parte do método para melhorar a taxa de regeneração do material biológico tratado (Judelson *et al.*, 1993).

A metodologia para a produção de zoósporos em culturas puras de *P. cinnamomi* foi descrita por Byrt e Grant (1979) e baseia-se, essencialmente, num período de carência nutricional, agitação/arejamento, exposição a luminosidade e diminuição da temperatura de crescimento em meio aquoso. Em meio natural, provavelmente, são estes mesmos factores, ou a combinação deles, que desencadeiam a esporulação; o esgotamento de nutrientes essenciais num tecido necrosado de um hospedeiro induz intensa esporulação que leva a infecção a outros tecidos ou hospedeiros saudáveis, novas fontes de alimento para o patogénio. A exposição à luminosidade de um microrganismo que infecta raízes, no solo, pode induzir um estímulo da esporulação, enquanto sistema de “fuga” a condições adversas e “busca” do seu

ambiente natural - as raízes, num ambiente privado de luz; a disponibilidade de água, que constitui um meio de propagação para os zoósporos que nela nadam até aos seus hospedeiros, é mais abundante no Inverno, uma estação fria.

A aplicação do protocolo de Byrt e Grant aos isolamentos selvagens em estudo resultou na produção abundante de esporângios e conseqüente libertação de zoósporos, conforme foi possível observar ao microscópio óptico. Contudo, não foi possível quantificar a abundância verificada em números concretos e fiáveis. As diversas tentativas de contagem efectuadas em suspensões de zoósporos apresentaram grandes variações em alíquotas retiradas de uma mesma placa de *Petri* onde fora induzida a libertação de zoósporos (entre 700 a 80000 zoósporos/ml). A contagem de células dotadas de mobilidade própria, como os zoósporos, apresenta dificuldades, nomeadamente, na retirada de alíquotas representativas da suspensão; os zoósporos tendem a congregar-se à superfície do líquido e uma dispersão forçada pode levar ao seu enquistamento e agregação, entre si ou à superfície do recipiente que contém a suspensão. Byrt e Grant obtiveram rendimentos em produção de zoósporos na ordem dos  $10^5$  a  $10^4$  zoósporos/ml e estimaram que os erros de amostragem nestas contagens se situariam entre os 10 e os 20%. Tendo em conta este problema, a aplicação de zoósporos ficou limitada a ensaios em que a sua quantificação absoluta não fosse determinante para a compreensão dos resultados.

### **I.3.4. Obtenção de protoplastos**

A esmagadora maioria dos protocolos de transformação descritos para organismos do género *Phytophthora* baseia-se na introdução de transgenes em protoplastos (células desprovidas de parede celular) (Judelson *et al.*, 1991; Judelson *et al.*, 1993; Panabières *et al.*, 1998; Kamoun *et al.*, 1998b; West *et al.*, 1998, 1999; Bottin *et al.*, 1999; Gaulin *et al.*, 2002; Si-Ammour *et al.*, 2003). Assim, e como condição prévia a qualquer tentativa de transformação, tornou-se obrigatória a obtenção de protoplastos com condições de viabilidade e em número suficiente.

Para assegurar a digestão da parede celular do micélio de *P. cinnamomi*, foram testadas algumas variações dos parâmetros de digestão:

- testaram-se diversas combinações de enzimas (tipicamente usadas para a obtenção de protoplastos de outras espécies de *Phytophthora*), em várias concentrações;

- foram testados tempos de digestão distintos;

-usaram-se diferentes tampões de digestão (para assegurar a integridade dos protoplastos face à pressão osmótica do meio).

Os melhores resultados foram atingidos digerindo micélio com três dias de idade durante 150-180 min, com uma combinação das enzimas Driselase (7 mg/ml) e Celulase Onozuka (7 mg/ml) numa solução de KCl 0,64 M e CaCl<sub>2</sub> 0,2 M. Os resultados foram avaliados condicionados a um compromisso entre um número elevado de células obtidas e a viabilidade das mesmas. Atingiram-se valores na ordem dos 12 milhões de células, a partir de micélio proveniente do crescimento em quatro placas de *Petri* ( $\emptyset = 9\text{cm}$ ), com uma viabilidade de 40%.

As paredes celulares dos oomicetas são compostas basicamente por glucanos com ligações  $\beta(1\rightarrow3)$  e  $\beta(1\rightarrow6)$ ; a presença adicional de celulose [glucanos com ligações  $\beta(1\rightarrow4)$ ] e a ausência de quitina são as características que marcam a diferença com as paredes celulares dos fungos verdadeiros (Bartnicki-Garcia, 1987). As enzimas escolhidas para a digestão do micélio e obtenção de protoplastos tiveram em conta esta composição, bem como as variações de eficiência que se observam para uma mesma enzima comercializada por diferentes marcas ou formulações. A natureza da parede celular de *P. cinnamomi* deve diferir significativamente das outras espécies de *Phytophthora* já testadas para a obtenção de protoplastos, já que as condições necessárias para a digestão de micélio tiveram de ser mais agressivas do que as anteriormente descritas.

A composição das soluções de enzimas A, B e C foi escolhida com base em trabalhos anteriormente descritos (West *et al.*, 1998; Bottin *et al.*, 1999). Contudo, a sua aplicação não produziu protoplastos em número significativo. Aumentou-se, então, a sua concentração nas soluções D, E e F e só nestas condições se começaram a observar protoplastos em elevado número, sendo a maior eficiência observada para a solução E [Driselase (7 mg/ml) e Celulase Onozuka (7 mg/ml)].

As hifas de *P. infestans* e outras espécies libertam protoplastos abundantes após períodos de digestão que variam entre os 15 e os 60 min (West *et al.*, 1998; Whisson *et al.*, 2005). O tempo necessário para a digestão de micélio de *P. cinnamomi* revelou-se mais longo do que para outras espécies; antes de 1 h de digestão não foi observada uma concentração de protoplastos relevante. Após esse período, o número de protoplastos aumentou até aos 240 min, diminuindo depois disso. Contudo, a maior percentagem de viabilidade dos

protoplastos, traduzida em termos de germinação, foi alcançada por volta dos 150-180 min de digestão; tempos superiores fizeram diminuir a percentagem de protoplastos viáveis.

Também, as soluções de equilíbrio (usadas para evitar a lise dos protoplastos), testadas a partir de protocolos já estabelecidos (Judelson *et al.*, 1991b; Judelson *et al.*, 1992; Judelson *et al.*, 1993b) se revelaram um factor a ter conta na obtenção de protoplastos viáveis, pois apenas a solução 3 (KCl 0,64 M e CaCl<sub>2</sub> 0,2 M) mostrou ser adequada. As soluções 1 (KCl 0,64 M e CaCl<sub>2</sub> 0,2 M citrato de sódio 20 mM, pH 5,8) e 2 (manitol 1M, MgSO<sub>4</sub> 7mM, citrato de sódio 20 mM, pH 5,8) exerceram efeitos negativos sobre a eficiência de digestão do micélio e a solução 4 (manitol 1M, MgSO<sub>4</sub> 7mM, citrato de sódio 20 mM, pH 5,8) revelou-se prejudicial à viabilidade dos protoplastos.

Um dos problemas colocados durante a obtenção de protoplastos é a formação de resíduos celulares abundantes, fragmentos de micélio não digeridos cuja presença dificulta a transformação genética. De facto, os investigadores que trabalham nesta área procuram os isolamentos que produzam menos resíduos durante a digestão de micélio para evitar futuros problemas (Whisson *et al.*, 2005). No presente trabalho, as condições acima descritas como óptimas foram, também, aquelas que produziram menos resíduos. Além disso, a maioria dos fragmentos de micélio não digerido que escapou à fase de filtração foi removida “manualmente” durante as fases de lavagem e centrifugação. Após a primeira centrifugação, o *pellet* formado apresentava-se com duas zonas distintas, uma, inferior, mais clara, composta essencialmente por protoplastos e outra, superior, mais escura, composta por resíduos da digestão; usando uma ansa esterilizada foi possível remover delicadamente a maior parte da fase superior do *pellet*, sem perturbar a fase inferior dos protoplastos. Esta operação, repetida após a centrifugação seguinte, permitiu a obtenção de uma suspensão de protoplastos, praticamente, limpa de fragmentos celulares indesejáveis.

O micélio vegetativo dos oomicetas é constituído por hifas não septadas com núcleos aleatoriamente dispersos no citoplasma (Zentmeyer, 1980). Os protoplastos formam-se por fuga de porções de protoplasma através dos orifícios formados pela digestão enzimática da parede celular. Os protoplastos podem não conter qualquer núcleo ou podem possuir mais do que um (Layton e Kuhn, 1988). Por consequência, a viabilidade dos protoplastos gerados depende, também, do facto do protoplasto ser nucleado ou não. Em micélio jovem, em crescimento muito activo, a abundância de núcleos é mais elevada e, por isso, a probabilidade de gerar protoplastos sem núcleo é menor. Judelson *et al.* (1993) relatam que a taxa de

viabilidade dos protoplastos é superior quando estes são obtidos a partir de micélio juvenil gerado por zoósporos germinados. Contudo, ensaios de digestão efectuados com zoósporos de *P. cinnamomi* germinados culminaram na acumulação de inúmeros resíduos celulares e poucos protoplastos.

Mesmo nas condições optimizadas, a quantidade de protoplastos de *P. cinnamomi* obtida a partir da mesma quantidade de micélio utilizada em outras espécies de *Phytophthora*, nomeadamente *P. parasitica* var. *nicotianae*, é muito menor (aproximadamente quatro vezes). Contudo, os protoplastos de *P. cinnamomi* apresentam uma maior taxa de regeneração que os protoplastos de *P. parasitica* var. *nicotianae* (A. Bottin, comunicação pessoal) e os de *P. sojae* (Judelson *et al.*, 1993b), ambos com 20% de protoplastos viáveis. Assim, foi considerado que o protocolo optimizado era adequado para a obtenção de protoplastos a usar nos ensaios de transformação, já que um menor número seria compensado por uma maior viabilidade.

### **I.3.5. Transformação genética**

Dos inúmeros ensaios de transformação que foram levados a cabo resultaram apenas dois transformantes com características de estabilidade.

#### **I.3.5.1. Transformação com aplicação de lipossomas e CaCl<sub>2</sub>/PEG**

Finchman (1989) reviu os principais aspectos da transformação de fungos. No processo de transformação genética por métodos químicos, os cations cálcio têm a função de eliminar as repulsões electrostáticas dos elementos envolvidos; nomeadamente, neutralizam as cargas negativas das membranas citoplasmáticas e das moléculas de DNA transgénicas, de modo a permitir a sua entrada nas células. O PEG tem o papel de criar condições mais favoráveis à entrada do DNA na célula, reduzindo o volume do meio, favorecendo a agregação das células e aumentando a permeabilidade das membranas celulares. O encapsulamento do DNA em lipossomas (vesículas artificialmente construídas, de natureza lipídica) também pode facilitar a captura de DNA por parte das células.

Os protocolos de transformação descritos para diferentes espécies de *Phytophthora* ou para a mesma espécie, mas descritos por diferentes autores, apresentam variações em alguns pontos-chave: na composição do tampão de lavagem e ressuspensão dos protoplastos, na natureza e concentração do agente de transfecção aplicado, na quantidade de vector de

transformação usada em cada ensaio e na composição da solução PEG usada para estabilizar os transformantes recém-formados. As várias técnicas testadas durante as tentativas de transformação de *P. cinnamomi* foram baseadas nessas diferenças de procedimento, as quais foram aplicadas em várias combinações, em diferentes ensaios de transformação discriminados pelo tipo de vector aplicado em cada ensaio.

Inicialmente, foram obtidos alguns resultados com a aplicação da combinação de solução MTC-20 (Manitol 1,0 M; Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; CaCl<sub>2</sub> 20 mM) na lavagem e ressuspensão dos protoplastos, incubação de 40 µg de *Fugene 6* (Boehringer-Mannheim) com 30 µg de DNA plasmídico por ensaio de transformação e incubação dos potenciais transformantes com uma solução de PEG 6000/MTC-20 (PEG 6000 40% p/v; Manitol 1,0 M; Tris-HCl 10 mM pH 7,5; CaCl<sub>2</sub> 20 mM). Nomeadamente, quatro dias após o plaqueamento dos potenciais transformantes em meio selectivo foi obtido um transformante do isolamento PA45 capaz de crescer em meio V<sub>8</sub>Ca com higromicina B (250 µg/ml), transformado com o plasmídeo pHAMT35H não linearizado. No entanto, este transformante não resistiu à segunda repicagem em meio selectivo.

As tentativas de transformação prosseguiram, sempre com resultados negativos. Até que, numa série de ensaios em que foram aplicadas concentrações de vectores de transformação diferentes das inicialmente previstas (nomeadamente, metade e o dobro de DNA plasmídico, acompanhado pela proporcional variação em agente de transfecção), voltaram a obter-se resultados positivos. A aplicação da combinação de solução MTC-20 na lavagem e ressuspensão dos protoplastos derivados do isolamento PA45, incubação de 80 µg de *Lipofectin* (Life Technologies) com 60 µg de DNA plasmídico por ensaio de transformação e incubação dos potenciais transformantes com uma solução de PEG 6000 (40%v/v)/MTC-20, resultou na obtenção de um transformante derivado do uso da combinação de vectores pHAMT35-fatss e pHAMT35H não linearizados. Este transformante foi seleccionado seis dias após crescimento em meio V<sub>8</sub>Ca com higromicina B (250 µg/ml) e foi, depois, repicado sucessivamente, em meio V<sub>8</sub>Ca com higromicina B (300 µg/ml) (tendo mesmo sido cultivado em meio com 400 µg/ml de antibiótico). Este transformante foi denominado FATSS.

Após a obtenção deste transformante estável, as tentativas de obter novos transformantes continuaram, usando apenas as condições que permitiram a obtenção do FATSS. Após vários ensaios infrutíferos com o isolamento PA45, a mesma metodologia foi

também aplicada aos outros isolamentos seleccionados e logo foram obtidos transformantes com o isolamento PA37 (14 transformantes) e com o isolamento PE62 (16 transformantes). As colónias apareceram em meio selectivo quatro a cinco dias após o plaqueamento mas, após repicagem, apenas um transformante derivado do isolamento PA37, que foi denominado 13C, manteve o seu crescimento.

Posteriormente, as tentativas de transformação efectuadas resultaram na obtenção de mais transformantes (3 para o isolamento PA45, 1 para o isolamento PA37, 17 para o isolamento PE62) que se revelaram instáveis e foram perdidos após repicagem.

Dado que não foi possível estabelecer um protocolo de transformação química de *P. cinnamomi* reprodutível e que produzisse transformantes estáveis em números razoáveis e, uma vez que as análises efectuadas (descritas abaixo) revelaram que FATSS era um co-transformante resistente à higromicina B e com produção de  $\beta$ -cinamomina suprimida e que 13C era um transformante simples, resistente à higromicina, foi decidido não prolongar por mais tempo as tentativas de transformação e encetar os ensaios possíveis com os transformantes disponíveis.

A transformação genética de *Phytophthora* é um meio importante para alargar as oportunidades de análise genética destes microrganismos. Em todo o mundo, vários grupos se têm dedicado a otimizar as técnicas de transformação mas, contrariamente ao que seria de esperar, ainda não surgiu um protocolo unificador da metodologia, antes pelo contrário. A diversificação das técnicas de transformação para este tipo de microrganismo tem sido a pedra angular da investigação neste domínio e este facto é revelador das dificuldades encontradas neste campo. Uma técnica que deveria ser essencialmente usada como um instrumento de investigação é ela própria o alvo de pesquisa intensa.

A eficiência de transformação de *Phytophthora* spp é mais baixa do que a observada para os fungos filamentosos verdadeiros (Judelson *et al.*, 1991) e mesmo em *P. infestans*, a espécie que foi mais vezes sujeita a transformação genética. Parte dessa falta de eficácia poderá ser explicada pelas, já mencionadas, baixas taxas de regeneração de protoplastos, mas a análise dos outros componentes a ter em linha de conta nos ensaios de transformação, revela-se confusa e contraditória.

Inúmeras variações na composição das soluções de transformação, nomeadamente no que diz respeito à concentração de  $\text{CaCl}_2$  e concentração de PEG, foram apresentadas na literatura como as mais adequadas para aumentar a taxa de transformação e foram relatados

efeitos opostos na aplicação de lipossomas, ora influenciando positivamente a taxa de transformação (Judelson *et al.*, 1993b; Si-Ammour *et al.*, 2003), ora actuando negativamente na obtenção de transformantes (Judelson *et al.*, 1993b; Latijnhouwers e Govers, 2003). Apesar da sua utilidade no processo de transformação, o PEG é um composto altamente tóxico para *Phytophthora* (Prell *et al.*, 1991) e, possivelmente, também contribuiu para a redução da capacidade de regeneração dos protoplastos após a transformação.

Também, a linearização dos plasmídeos foi apontada como sendo um factor que pode auxiliar ou dificultar eventos de transformação, embora Judelson (1993) tenham observado que, em *P. infestans*, a linearização não influenciou, quer positiva quer negativamente, a transformação. No entanto, este autor refere que os fenómenos de ligação intermolecular, que ocorrem entre diferentes plasmídeos linearizados com enzimas de restrição que criem extremidades compatíveis aumentam a taxa de co-transformação. No presente trabalho, os transformantes obtidos derivaram de ensaios com plasmídeos não linearizados.

Para além da entrada do DNA nos protoplastos, a expressão do transgene também tem muita importância na transformação. As sequências reguladoras da expressão usadas neste trabalho eram provenientes do oomiceta *Bremia lactucae*. Os promotores aplicados foram os dos genes *hsp70* e *ham34*, ambos com resultados positivos descritos relativamente à expressão constitutiva de transgenes em várias espécies de *Phytophthora* (Judelson e Micheltore, 1991; Judelson *et al.*, 1991b; Judelson *et al.*, 1992; West *et al.*, 1999). Como sequência de terminação foi sempre usada a do gene *ham34*, pois, transformações com vectores que incluíam terminadores do gene *hsp70* revelaram-se menos eficientes, sendo essa menor eficiência atribuída a um menor tempo de semi-vida dos mRNA dos genes com esse tipo de terminador (Judelson e Micheltore, 1991). No presente trabalho, não foram obtidos quaisquer transformantes com vectores construídos para controlar a expressão do transgene pelo promotor do gene *hsp70* (plasmídeo pTH210 e derivados); apenas vectores com promotores do gene *ham34* conduziram ao aparecimento de transformantes (plasmídeo pHAM35TH e pHAM35TH-fatss). Apesar da reduzida taxa de transformação obtida para o promotor *ham34*, pode afirmar-se que este promotor é funcional em *P. cinnamomi* (pois existem dois transformantes estáveis que o comprovam) mas não é possível afirmar que o promotor *hsp70* não funciona em *P. cinnamomi*, podendo a falta de transformantes com vectores *hsp70* ser atribuída a outros factores. Por outro lado, já foi demonstrado que o promotor do gene *hsp70* não funciona convenientemente em *P. sojae* (Judelson *et al.*, 1993b).

O principal problema associado à incapacidade de transformação dos oomicetas não é atribuído à falha na entrada do DNA nas células (Judelson e Michelmore, 1991); esta reduzida taxa de transformação foi imputada à acção de nucleases não específicas, que actuam após a entrada de DNA exógeno nas células; contudo, a administração dos vectores sob a acção protectora de DNA de transporte (DNA de esperma de arenque) não facilitou a transformação neste trabalho. Aparentemente, a causa principal da reduzida taxa de transformação em *P. cinnamomi* é a instabilidade dos transformantes, manifestada após a primeira repicagem de meio selectivo ou, ainda, mais prematuramente, nem sequer permitindo o crescimento inicial no meio de selecção. Esta instabilidade precoce poderá dever-se à perda do vector de transformação, à semelhança do que foi observado com *P. sojae* (Judelson *et al.*, 1993b). A transformação de *P. cinnamomi* com um gene da GFP, também revelou estas características de instabilidade na maioria dos transformantes (McCarren, 2006). Existem evidências de que a integração de transgenes no genoma de *Phytophthora* só acontece horas depois da entrada do DNA exógeno na célula (Cvitanich e Judelson, 2003) o que permitirá uma acção prolongada das nucleases sobre os vectores de transformação. Possivelmente, existirá em *P. cinnamomi* um mecanismo mais eficiente na inactivação dos transgenes, que actua sobre os vectores de transformação antes destes poderem expressar os seus genes e serem estavelmente integrados no genoma. O facto da maioria dos transformantes (quer estáveis quer instáveis) ter sido conseguido com a aplicação de uma quantidade inusitada de vector (60 µg), corrobora esta hipótese, já que, deste modo, algumas unidades dos vectores teriam “escapado” ao mecanismo de inactivação e conseguido integrar o genoma, resultando em transformantes estáveis; no caso dos transformantes instáveis, alguns vectores teriam conseguido expressar os seus genes numa forma transiente, permitindo o crescimento no meio selectivo inicial, antes de serem desactivados, com a consequente falha nas repicagens no segundo meio de selecção.

### **I.3.5.2. Transformação com aplicação de electroporação**

Paralelamente aos ensaios de transformação química de protoplastos, foi decidido tentar a transformação por electroporação. Esta técnica envolve a aplicação de fortes campos eléctricos a células desprovidas de parede celular de modo a promover rearranjos temporários na membrana celular, com formação de poros que permitem a entrada de DNA exógeno (Watson *et al.*, 1996). Foi descrita a obtenção de transformantes de *P. infestans* através da electroporação de zoósporos (Latijnhouwers *et al.*, 2004). Contudo, a produção de uma

solução concentrada de zoósporos, adequada ao processo de transformação, é mais simples em *P. infestans* do que em *P. cinnamomi*. Em *P. infestans*, é possível recolher os esporângios antes da libertação dos zoósporos, concentrando-os num pequeno volume e obtendo elevadas concentrações de zoósporos logo numa fase inicial (entre 400 000 a 1 250 000/ml). Aplicando, de seguida, uma nova concentração dos zoósporos através de gradientes de *Percoll*, foi possível atingir 20 000 000/ml. Ora, em *P. cinnamomi*, os esporângios não são caducos e não é possível recolhê-los a partir do micélio, pelo que a concentração inicial é bem mais baixa (nos presentes ensaios, os melhores resultados configuraram concentrações de zoósporos na ordem dos 80 000/ml). Com estas concentrações iniciais de zoósporos, nem a concentração através de gradientes de *Percoll* permitiu a obtenção de números razoáveis para a transformação: após a centrifugação diferencial não foi visível a banda típica composta por zoósporos na interface entre as duas camadas de *Percoll* com concentrações distintas. Face a esta dificuldade, foi abandonada a tentativa de transformar zoósporos de *P. cinnamomi* por electroporação.

As tentativas de transformação de protoplastos por electroporação também não foram bem sucedidas, muito embora tenham sido testadas diversas voltagens (de 0,5 kV a 3,75 kV) descritas como adequadas para a transformação dos zoósporos (Latijnhouwers *et al.*, 2004), de protoplastos de *Phytophthora* (Judelson e Michelmore, 1991a) e *Pythium* (Weiland, 2003) e de protoplastos de fungos verdadeiros (segundo o manual de instruções do equipamento usado na electroporação, Gene Pulser, BIORAD).

Também, a modificação dos tampões de electroporação (usados para manter o equilíbrio osmótico dos protoplastos) e o estado do plasmídeo (linearizado ou não linearizado) não facilitaram a obtenção de transformantes.

Observações ao microscópio óptico de alíquotas de suspensões celulares electroporadas mostraram uma elevada ruptura dos protoplastos não regenerados, com electroporações aplicando 1,5 kV ou mais; os protoplastos regenerados mostraram mais resistência e capacidade de regeneração pós-electroporação, apresentando destruição relevante apenas a partir dos 2,75 kV.

### I.3.5.3. Transformação com aplicação de biolística

A transformação por bombardeamento com micropartículas de ouro aceleradas e cobertas com DNA também foi descrita para *Phytophthora* spp (Bailey *et al.*, 1993; Cvitanich e Judelson, 2003) Contudo, as experiências relatadas por Bailey *et al.* (1993) com *P. cinnamomi*, *P. capsici*, *P. citricola* e *P. citrophthora* foram realizadas com vectores plasmídicos contendo sequências reguladoras geralmente usadas na transformação de plantas (nomeadamente o promotor do vírus vegetal CaMV 35S) e sequências reguladoras do fungo *Ustilago maydis* (promotor do gene *hsp70*), sequências estas que não tiveram sucesso na expressão de transgenes em *P. infestans* (Judelson *et al.*, 1992) nem voltaram a ser mencionadas em novos trabalhos publicados. Além disso, Bailey *et al.* (1993) não encontraram quaisquer diferenças na eficiência de transformação nas várias condições testadas (pressões de disparo de 800 e 1200 psi; distâncias do ecrã de paragem de 8 e 12 cm), pelo que foi decidido testar os mesmos parâmetros aplicados por Judelson *et al.* (2003) (descritos na secção I.2.7.3).

Contudo, destas experiências não resultaram quaisquer transformantes.

### I.3.6. Discriminação dos transformantes

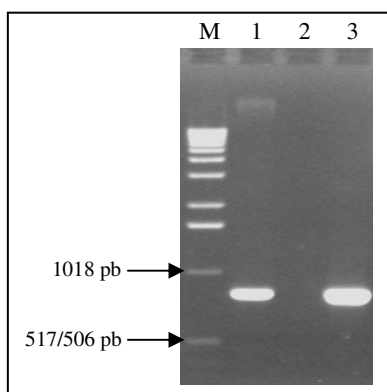
À semelhança do que foi descrito por Kamoun *et al.*, (1998b), a presença dos transgenes nos transformantes foi confirmada através da amplificação por PCR de sequências específicas dos plasmídeos usados na transformação, em DNA genómico extraído dos transformantes. Não foram efectuadas análises por *Southern blotting*, dado que as diferenças de expressão de vários transgenes observadas entre transformantes de *Phytophthora* obtidos com o mesmo vector de expressão não puderam ser atribuídas ao número de cópias dos transgenes inseridos no genoma receptor (Judelson *et al.*, 1993a,b; West *et al.*, 1999a). Assim, foi considerado que a informação fornecida por este tipo de metodologia não acrescentaria nada de relevante para o presente trabalho, pois a indicação de integração dos transgenes no genoma receptor pôde ser inferida a partir da conjugação das seguintes observações:

- os vectores de transformação aplicados neste trabalho são desprovidos de sequências de replicação autónoma em *Phytophthora*, pelo que a transmissão dos transgenes à descendência, através de mitoses, só pode ser garantida se eles estiverem integrados no genoma hospedeiro (Fincham, 1989);

- crescimento continuado de transformantes com mais de cinco subculturas sucessivas em meio selectivo;
- amplificação por PCR de sequências específicas dos transgenes em DNA genómico extraído dos transformantes.

### I.3.6.1. Amplificação de um fragmento do gene *hpt*

As Figuras I.13 e I.14 mostram o resultado da amplificação de um fragmento com cerca de 839 pb, do gene da higromicina fosfotransferase (*hpt*), a partir de DNA extraído dos transformantes FATSS e 13C, confirmando a hipótese da ocorrência de transformação que foi colocada aquando do crescimento destas estirpes em meio de selecção com antibiótico.

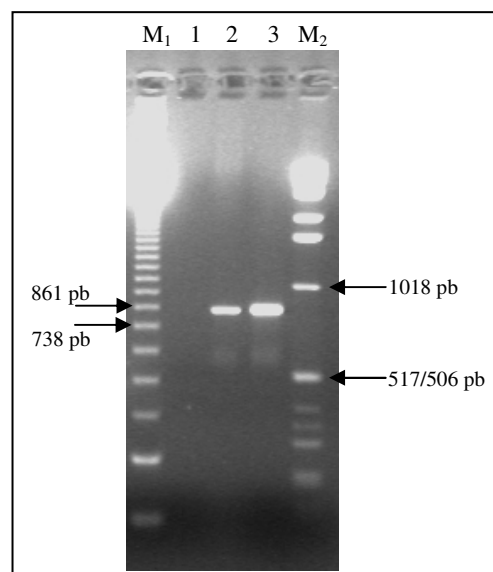


**Figura I.13:** Separação electroforética em gel de agarose (1%) do produto de amplificação de um fragmento do gene da higromicina fosfotransferase a partir de DNA genómico da estirpe FATSS.

- (1) = DNA genómico proveniente do transformante FATSS;  
(2) = DNA genómico proveniente do isolamento PA45;  
(3) = DNA plasmídico (pHAMT35H);  
(M) = Marcador molecular (*1 kb DNA Ladder*, Invitrogen)

**Figura I.14:** Separação electroforética em gel de agarose (1%), do produto de amplificação de um fragmento do gene da higromicina fosfotransferase a partir de DNA genómico da estirpe 13C.

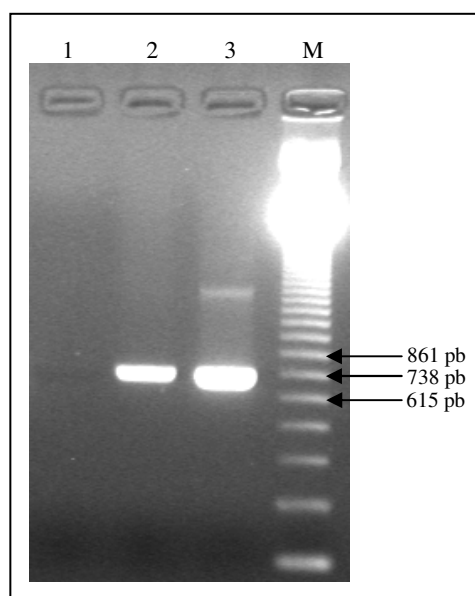
- (1) = DNA genómico proveniente do isolamento PA37;  
(2) = DNA genómico proveniente do transformante 13C;  
(3) = DNA plasmídico (pHAMT35H);  
(M<sub>1</sub>) = Marcador molecular (*123 pb DNA Ladder*, Invitrogen)  
(M<sub>2</sub>) = Marcador molecular (*1 kb DNA Ladder*, Invitrogen)



### I.3.6.2. Amplificação de um fragmento *ham34 + fats*

A amplificação deste fragmento *ham34 + fats* específico, com cerca de 754 pb, a partir de DNA genómico extraído de transformantes, permitiu fazer a distinção entre transformantes simples (em que apenas o plasmídeo com o gene de resistência ao antibiótico estava presente) e os co-transformantes (em que, além do plasmídeo com o gene *hpt*, também estava presente o plasmídeo com a sequência anti-sentido do gene da  $\beta$ -cinamomina).

A Figura I.15 mostra o resultado da amplificação do fragmento *ham34+fats* a partir de DNA extraído do transformante FATSS. Ficou, assim, demonstrado que o plasmídeo com a sequência anti-sentido da  $\beta$ -cinamomina foi inserido na estirpe FATSS e que não se trata de um transformante simples, mas sim de um co-transformante.



**Figura I.15:** Separação electroforética, em gel de agarose (1%), dos produtos de amplificação do fragmento *ham34+fats*.

(1) = DNA genómico proveniente do isolamento PA45;  
(2) = DNA genómico proveniente do transformante FATSS;  
(3) = DNA plasmídico (pHAMT35-*fats*);  
(M) = Marcador molecular. (123bp DNA Ladder, Invitrogen)

As amplificações dos fragmentos *hpt* e *ham34+fats* repetidas a partir de DNA genómico extraído das estirpes transformadas após sucessivas repicagens em meio selectivo e após passagem por meio não selectivo, apresentaram resultados idênticos aos atrás mencionados, mostrando que os transgenes se mantiveram presentes e estáveis.

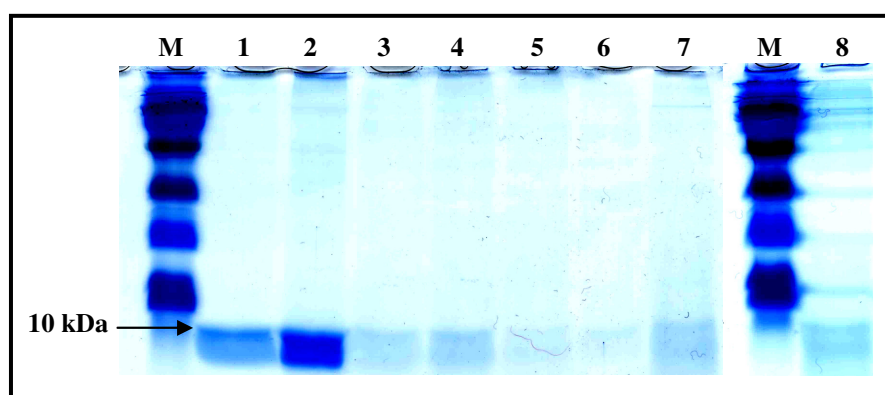
### I.3.7. Análise da produção de $\beta$ -cinamomina

A primeira verificação da acção da sequência transgénica anti-sentido do gene da  $\beta$ -cinamomina no silenciamento do gene endógeno da  $\beta$ -cinamomina, da estirpe co-transformada, foi realizada a nível da síntese de elicinas em meio líquido MSE, um meio

definido, simples, descrito como o mais adequado em vários trabalhos relacionados com a produção e isolamento destas proteínas (Kamoun *et al.*, 1994).

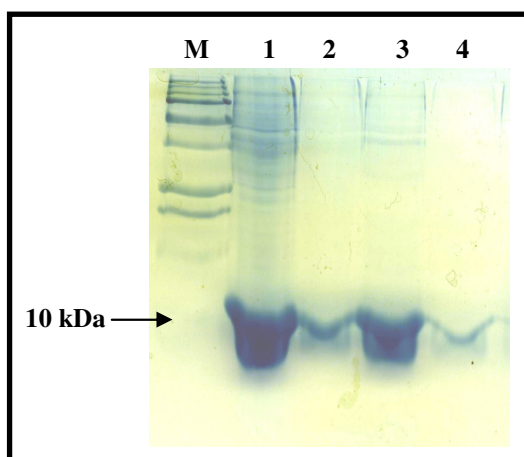
Do estabelecimento das culturas em meio MSE surgiu a primeira observação interessante de comportamento distinto do co-transformante FATSS; esta estirpe revelou-se incapaz de crescer em meio MSE na presença de higromicina B. Contudo, apresentou crescimento no mesmo meio sem antibiótico. Já o transformante simples 13C não apresentou diferenças de crescimento em MSE, com ou sem higromicina.

Nas Figuras I.16. e I.17 estão exemplificados os resultados das análises de proteínas excretadas para meios de cultura pelos isolamentos PA45 e FATSS.



**Figura I.16:** Análise (1) da presença de elicinas em filtrados de meios de cultura dos isolamentos PA45 e FATSS por electroforese de proteínas em gel SDS-PAGE (17,5%) corado com azul de coomassie. A seta assinala a posição das elicinas.

- 1 = PA45 cultivado em MSE durante 5 dias      2 = PA45 cultivado em MSE durante 15 dias  
 3 = PA45 cultivado em V<sub>8</sub>C durante 5 dias      4 = PA45 cultivado em V<sub>8</sub>C durante 15 dias  
 5 = FATSS cultivado em MSE sem higromicina durante 5 dias  
 6 = FATSS cultivado em MSE sem higromicina durante 15 dias  
 7 = FATSS cultivado em V<sub>8</sub>C com higromicina durante 5 dias  
 8 = FATSS cultivado em V<sub>8</sub>C com higromicina durante 15 dias  
 M = Marcador de proteínas (*Precision Plus Protein Standards All Blue*, BIORAD)

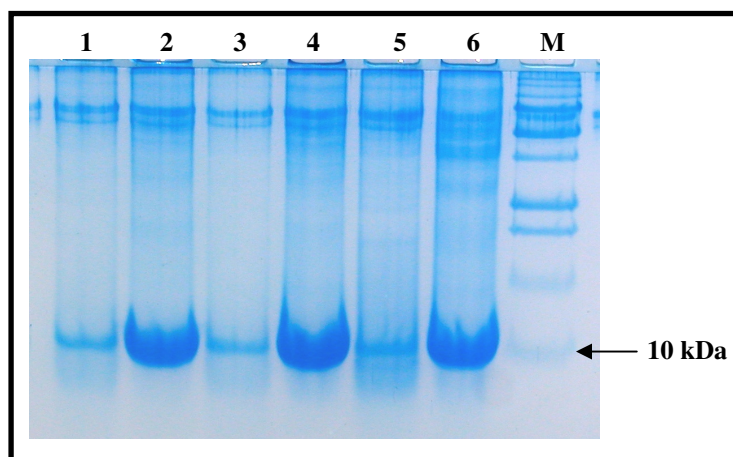


**Figura I.17:** Análise (2) da presença de elicinas em filtrados de meios de cultura dos isolamentos PA45 e FATSS por electroforese de proteínas em gel SDS-PAGE (17,5%) corado com azul de coomassie. A seta assinala a posição das elicinas.

- 1 = PA45 cultivado em MSE durante 15 dias  
 2 = FATSS cultivado em MSE sem higromicina durante 15 dias  
 3 = PA45 cultivado em MSE durante 5 dias  
 4 = FATSS cultivado em MSE sem higromicina durante 5 dias  
 M = Marcador de proteínas (*Precision Plus Protein Standards All Blue*, BIORAD)

No isolamento selvagem PA45, a produção de proteínas com o peso molecular típico das elicitinias foi detectada no meio MSE logo após 5 dias de cultura; após 15 dias a quantidade destas proteínas presente foi ainda mais abundante. A estirpe transformada FATSS mostra uma redução significativa da produção de elicitinias. Estes resultados apontam para uma supressão, pelo menos parcial, da síntese da  $\beta$ -cinamomina e/ou, inclusivamente, da síntese de outras elicitinias, nesta estirpe transformada de *P. cinnamomi*. Os filtrados de culturas em meio V<sub>8</sub>C mostraram apenas uma tênue presença de proteínas. Esta ausência pode ser real ou, simplesmente, revelar que o método de precipitação de proteínas usado não é adequado a este meio complexo. Por outro lado, Tercé-Laforge *et al.* (1992) demonstraram a existência de acumulação de criptogéina no micélio de *P. cryptogea*. Possivelmente, as elicitinias produzidas em meio V<sub>8</sub>C, além de serem produzidas em menor quantidade, poderão, também, ter ficado retidas no micélio, não sendo excretadas para o meio.

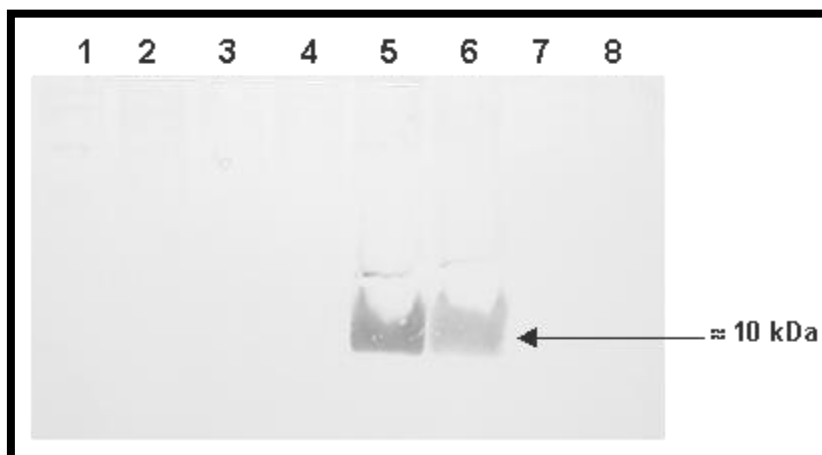
Por outro lado, os isolamentos PA37 e 13C não revelaram diferenças significativas na quantidade total de elicitinias produzidas por ambos, em períodos de cultura idênticos (Figura I.18).



**Figura I.18:** Análise da presença de elicitinias em filtrados de meios de cultura dos isolamentos PA37 e 13C por electroforese de proteínas em gel SDS-PAGE (17,5%) corado com azul de coomassie. A seta assinala a posição das elicitinias.

- 1 = PA37 cultivado em MSE durante 5 dias
- 2 = PA37 cultivado em MSE durante 15 dias
- 3 = 13C cultivado em MSE sem higromicina durante 5 dias
- 4 = 13C cultivado em MSE sem higromicina durante 15 dias
- 5 = 13C cultivado em MSE com higromicina durante 5 dias
- 6 = 13C cultivado em MSE com higromicina durante 15 dias
- M = Marcador de proteínas (*Precision Plus Protein Standards All Blue*, BIORAD)

A natureza das proteínas detectadas nos meios de cultura por electroforese de proteínas em gel SDS-PAGE (17,5%), corado com azul de coomassie, foi confirmada com ensaios de detecção por *western blotting*, aplicando anticorpos anti- $\beta$ -cinamomina (Figuras I.19 e I.20).



**Figura I.19:** Análise por *western blotting* da produção de  $\beta$ -cinamomina em filtrados de meios de cultura dos isolamentos PA45 e FATSS. A seta negra assinala a posição das elicitinias.

- 1 = FATSS cultivado em MSE sem higromicina durante 5 dias
- 2 = FATSS cultivado em MSE sem higromicina durante 15 dias
- 3 = FATSS cultivado em V<sub>8</sub>C com higromicina durante 5 dias
- 4 = FATSS cultivado em V<sub>8</sub>C com higromicina durante 15 dias
- 5 = PA45 cultivado em MSE durante 15 dias
- 6 = PA45 cultivado em MSE durante 5 dias
- 7 = PA45 cultivado em V<sub>8</sub>C durante 15 dias
- 8 = PA45 cultivado em V<sub>8</sub>C durante 5 dias

A análise dos filtrados de culturas em MSE, por SDS-PAGE, seguida de imunodeteção com anticorpos monoclonais anti- $\beta$ -cinamomina, revelou uma presença abundante de proteína nos filtrados das culturas do isolamento selvagem PA45, ao passo que no co-transformante FATSS a síntese de  $\beta$ -cinamomina não foi detectada.

Na análise realizada por SDS-PAGE, seguida de coloração com azul de coomassie, foi possível observar uma relativamente reduzida quantidade de proteína, com uma massa molecular de 10 kDa, produzida pela estirpe FATSS; a não detecção pelo anti-corpo anti- $\beta$ -cinamomina dessa proteína aponta para a hipótese de não se tratar desta elicitina. A presença de  $\beta$ -cinamomina e  $\alpha$ -cinamomina foi já comprovada em filtrados de culturas *in vitro* (Pernollet *et al.*, 1993). As cinamominas  $\beta$  e  $\alpha$  partilham uma homologia de 82,4% a nível da sua estrutura primária<sup>9</sup> e a conservação na  $\alpha$ -cinamomina das sequências envolvidas nos motivos típicos da conformação tridimensional da  $\beta$ -cinamomina indicia que a  $\alpha$ -cinamomina

<sup>9</sup> Informação derivada do alinhamento de sequências apresentado na secção III.3.1

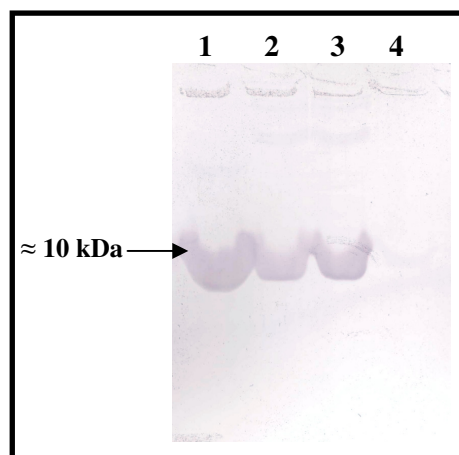
apresentará uma estrutura terciária semelhante. Portanto, os epítomos que são reconhecidos por este anticorpo na  $\beta$ -cinamomina poderão também estar presentes na  $\alpha$ -cinamomina. De facto, o anticorpo usado neste trabalho para detectar a  $\beta$ -cinamomina também foi utilizado por Sousa (2004) na detecção de  $\alpha$ -cinamomina recombinante; o não reconhecimento das proteínas produzidas pela estirpe FATSS pelo anticorpo colocou assim a hipótese da banda também não ser constituída por  $\alpha$ -cinamomina, estando presente em reduzida quantidade outra(s) proteína(s) não reconhecida(s) pelo anticorpo. Por exemplo, Li *et al.*, (2000) relatam a existência de um gene em *P. cinnamomi*, codificante para uma potencial  $\alpha$ -cinamomina, cuja sequência difere significativamente de todas as sequências do *cluster* genómico de elicitinias de *P. cinnamomi* identificado por Duclos *et al.* (1998). Por outro lado, Baillieul *et al.*, (1996) obtiveram um anticorpo que apenas reconhece  $\beta$ -elicitinias e não  $\alpha$ -elicitinias. O reconhecimento da  $\alpha$ -cinamomina recombinante por um anticorpo inicialmente levantado contra a  $\beta$ -cinamomina poderá ter ficado a dever-se a alguma perda de especificidade relacionada com condições menos restritivas durante o *western blotting*; também é possível que o anticorpo, embora possuindo maior afinidade para a  $\beta$ -cinamomina, também reconheça a  $\alpha$ -cinamomina de uma forma menos específica ligada à concentração de proteína presente. Nos filtrados de cultura usados na produção da proteína recombinante a concentração de  $\alpha$ -cinamomina seria mais elevada do que no filtrado da estirpe FATSS, tendo dado origem à detecção no primeiro mas não no segundo.

Os filtrados de culturas em meio V<sub>8</sub>C mostraram a ausência de  $\beta$ -cinamomina em ambos isolamentos (pelo menos a níveis detectáveis pela hibridação com o anticorpo).

Nos isolamentos PA37 e 13C foi observada uma produção abundante de  $\beta$ -cinamomina, em meio MSE, semelhante para ambos (Figura I.20), provando que a ausência de elicitina na estirpe FATSS não se deve à transformação com o plasmídeo com a cassette de resistência à higromicina.

**Figura I.20:** Análise por *western blotting* da produção de  $\beta$ -cinamomina em filtrados de meios de cultura dos isolamentos PA37 e 13C. A seta negra assinala a posição das elicitinias.

- 1 = PA37 cultivado em MSE durante 15 dias.
- 2 = 13C cultivado em MSE sem higromicina durante 15 dias.
- 2 = 13C cultivado em MSE com higromicina durante 15 dias.
- 4 = PA37 cultivado em V<sub>8</sub>C durante 15 dias.



Kamoun *et al.* (1998b), também obtiveram transformantes onde foi abolida a síntese de uma elicitina, a infestina,  $\alpha$ -elicitina de *P. infestans*.

Os resultados da análise por *western blotting* confirmaram a abolição da síntese da  $\beta$ -cinamomina na estirpe FATSS transformada com uma sequência anti-sentido do gene da  $\beta$ -cinamomina; esta sequência anti-sentido terá induzido um silenciamento da expressão do gene da  $\beta$ -cinamomina por mecanismos que serão abordados no Capítulo III.

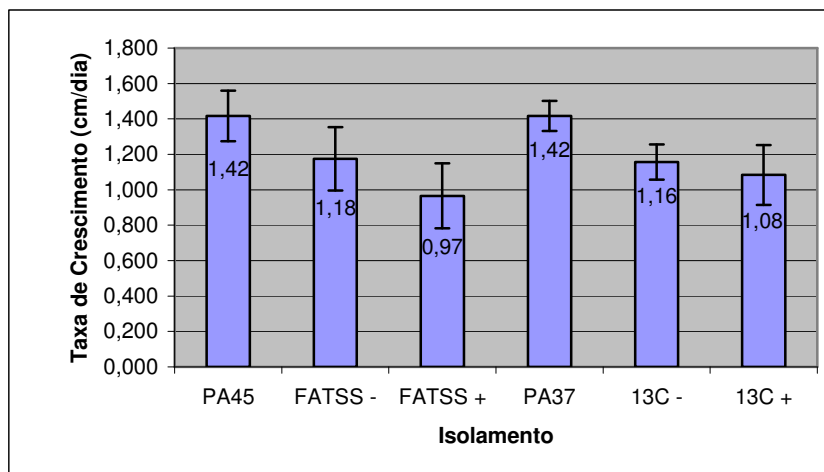
Estas análises sobre a produção de elicitinias foram repetidas várias vezes ao longo das sucessivas repicagens dos isolamentos e foram observados resultados idênticos, demonstrando que a supressão da síntese de  $\beta$ -cinamomina é permanente.

A incapacidade da estirpe FATSS crescer em meio MSE com o antibiótico higromicina B (MSE-Hig<sup>+</sup>) denota uma deficiência específica desta estirpe, que o impede de sobreviver na presença do antibiótico neste meio simples e definido, pois a estirpe 13C não apresentou este problema. Fragmentos de micélio provenientes de FATSS cultivado em MSE sem higromicina (MSE-Hig<sup>-</sup>) cresceram em meio V<sub>8</sub>C com higromicina (V<sub>8</sub>C-Hig<sup>+</sup>), pelo que um possível silenciamento espontâneo do transgene *hpt* não pode ser apontado como a causa desta deficiência de crescimento. Não foi possível esclarecer se esta falha na resistência ao antibiótico foi induzida por uma potencial alteração noutro gene importante para a resistência eficaz neste meio específico (provocada, por exemplo, pela interrupção desse gene por inserção aleatória de um dos plasmídeos de transformação no genoma) ou se está relacionada com a deficiência na produção de  $\beta$ -cinamomina. A natureza diplóide do genoma de *Phytophthora* indica que a primeira hipótese só será válida se tiver havido uma, pouco provável, dupla interrupção simultânea dos dois alelos do gene ou, em caso de uma única interrupção, que esta tenha ocorrido num alelo dominante de um *locus* heterozigótico. A segunda hipótese poderá ser confirmada caso se obtenham mais transformantes com a produção de  $\beta$ -cinamomina inibida e esses transformantes também não apresentem crescimento em MSE na presença do antibiótico.

### **I.3.8. Taxas de crescimento, morfologia do micélio e zoosporogênese dos transformantes**

As estirpes FATSS e 13C mostraram um crescimento de micélio *in vitro* mais lento do que os respectivos isolamentos selvagens. Para quantificar estas diferenças foi calculada a

taxa de crescimento diário dos isolamentos, medindo a expansão das colónias em meio V<sub>8</sub>Ca. No caso das estirpes transformadas, o crescimento foi avaliado em meio com e sem higromicina B. A Figura I.21 resume os resultados obtidos.



**Figura I.21:** Gráfico da taxa de crescimento dos isolamentos. O valor observado resulta da média obtida a partir de três ensaios independentes. Em cada ensaio foi medida a expansão das colónias em quatro placas durante os primeiros quatro dias após a inoculação dos meios. As barras de erro assinalam os valores de desvio padrão associados a cada taxa; (+) e (-) assinalam, respectivamente, a presença ou ausência de higromicina B no meio de crescimento dos transformantes.

Da observação directa das taxas de crescimento médias é possível obter uma percentagem de redução de crescimento dos transformantes em relação aos respectivos isolamentos selvagens: para a estirpe FATSS é de 16,9% em meio sem antibiótico e 31,7% em meio com antibiótico; para a estirpe 13C é de 18,3% em meio sem antibiótico e 23,9% em meio com antibiótico. Uma análise de variância foi efectuada e os valores das taxas de crescimento observadas nos ensaios independentes foram comparados entre os vários isolamentos mediante o teste de comparação de médias LSD (Mínima Diferença Significativa) de Fisher, para  $p < 0,05$  (Steel e Torrie, 1985) com o auxílio do programa informático estatístico "SPSS 14,0" para Windows. Esta análise, cujos resultados figuram no Anexo 2, revelou que as diferenças observadas só são verdadeiramente significativas quando comparamos os pares:

- PA45 e FATSS (+);                      - PA45 e 13C (+);
- PA37 e FATSS (+);                      - PA37 e 13C (+);

O facto de existir uma diferença significativa entre os isolamentos selvagens e as estirpes transformadas cultivadas em meio com higromicina B não é inesperado e poderá ser explicado pela desvantagem provocada pela presença do antibiótico. Si-Ammour *et al.* (2003)

também observaram uma redução de crescimento em algumas estirpes transformadas de *P. infestans* e *P. brassicae*, quando comparados com os respectivos isolamentos selvagens. No entanto, estes autores também encontraram transformantes com crescimento similar às linhas selvagens que lhes deram origem. A obtenção de mais transformantes de *P. cinnamomi* teria permitido a pesquisa de estirpes sem reduções de crescimento. Os dois transformantes de *P. cinnamomi* analisados por McCarren (2006) também mostraram este tipo de redução na taxa de crescimento. Contudo, é de salientar no presente trabalho as diferenças existentes entre o crescimento das estirpes transformadas em meio livre de antibiótico e os isolamentos selvagens não foram consideradas estatisticamente significativas.

Geralmente, foi possível repicar sucessivamente as estirpes FATSS e 13C em meio V<sub>8</sub>Ca com higromicina (V<sub>8</sub>Ca-Hig<sup>+</sup>). Contudo, algumas dessas tentativas de propagação falharam para a estirpe FATSS e o transformante não cresceu, mesmo quando os inóculos foram retirados de placas V<sub>8</sub>Ca-Hig<sup>+</sup> em que a estirpe apresentava crescimento activo. Para contornar este problema, novas repicagens a partir da mesma placa-mãe original foram efectuadas:

- com inóculos colhidos em zonas imediatamente adjacentes às zonas usadas nas repicagens falhadas; em meio com higromicina voltaram a não originar crescimento e em meio sem higromicina originaram, por vezes, crescimento.

- com inóculos colhidos em zonas diferentes das usadas nas repicagens falhadas em meio com higromicina, e que originaram, na sua grande maioria, crescimento.

A observação destas diferenças foi intrigante. McCarren (2006) relata que as colónias de transformantes de *P. cinnamomi* por si obtidos cessam sempre o seu crescimento antes do micélio preencher por completo a placa de crescimento; uma repicagem dessas culturas para meio selectivo fresco permite um novo crescimento que volta a parar quando o diâmetro das colónias atinge 45-65 mm. McCarren (2006) sugere que estas falhas de crescimento se devem à acumulação de produtos metabólicos nocivos. Contudo, esta explicação não é adequada para as observações registadas no presente trabalho, pois as falhas aqui registadas são pontuais e os inóculos colocados em meio fresco nem sempre originaram novas colónias. Se as falhas de repicagem em meio selectivo se devessem a uma simples perda local de viabilidade do micélio, inóculos colhidos na mesma zona colocados em meio sem antibiótico também não deveriam ter apresentado crescimento. Por consequência, existem falhas de crescimento que estão directamente relacionadas com a resistência à higromicina.

A existência de mecanismos de silenciamento espontâneo de transgenes em transformantes aparentemente estáveis já foi relatada em *P. infestans* (Judelson *et al.*, 1993a; Judelson e Whittaker, 1995; Vijn e Govers, 2003). Estes mecanismos constituem a primeira hipótese de explicação para a falha na expressão da cassete de resistência à higromicina na estirpe FATSS, com a consequente perda de capacidade de crescimento em meio selectivo. Esse silenciamento espontâneo nem sempre envolve mutação, metilação ou eliminação dos transgenes (Judelson *et al.*, 1993a). Foram relatadas grandes diferenças de expressão de vários transgenes entre transformantes obtidos com o mesmo vector de expressão (Judelson *et al.*, 1993a,b); essas diferenças não foram atribuídas ao número de cópias dos transgenes inseridos no genoma receptor mas, sim, a efeitos derivados do posicionamento desses transgenes nos cromossomas. Por analogia, o silenciamento espontâneo também poderá residir em fenómenos ligados à integração dos transgenes em localizações específicas do genoma hospedeiro; essas integrações diferem, possivelmente, em cada transformante, pois eventos de recombinação homóloga ainda não foram observados em ensaios de transformação de *Phytophthora* spp. Estes dados explicariam porque existem falhas de crescimento no transformante FATSS e não no 13C. Contudo, não deixa de ser curioso que inóculos colhidos em zonas diferentes das usadas nas repicagens falhadas da estirpe FATSS originassem crescimento em meio com higromicina. Portanto, o silenciamento espontâneo, a existir, será um mecanismo complexo, desencadeado por fenómenos ligados à integração específica do transgene numa dada localização do genoma hospedeiro e que não afecta igualmente a totalidade dos transgenes presentes nos núcleos de uma dada colónia desse transformante.

Outra causa plausível para a falha na expressão da cassete de resistência à higromicina na estirpe FATSS poderá residir na influência que o tipo de hifas não septadas e multinucleadas poderá ter tido na transformação genética. Durante a digestão do micélio podem surgir protoplastos não nucleados, uninucleados ou mesmo multinucleados. Se a transformação se der apenas nalguns dos núcleos de um protoplasto multinucleado, os núcleos não transformados continuam viáveis e a dividir-se, pois a sobrevivência do citoplasma comum estará assegurada pelos núcleos transformados resistentes ao antibiótico. Também é possível que tenham existido fenómenos de fusão de protoplastos transformados e não transformados. A existência de heterocariotas, com núcleos transformados e não transformados, também já foi relatada por outros investigadores (Cvitanich e Judelson, 2003b) e os núcleos não transformados não são eliminados por crescimento contínuo em meio selectivo. Nas repicagens da estirpe FATSS cujo crescimento falhou em meio com

antibiótico, provavelmente foi recolhida para propagação uma zona em que são mais abundantes os núcleos não transformados que assim não foram capazes de se multiplicar num novo meio com antibiótico, fora da acção protectora dos núcleos transformados. Estas falhas na repicagem só foram observadas quando a estirpe foi repicada para meio com higromicina, não havendo falhas de propagação para meio sem antibiótico. A estirpe 13C não apresentou este tipo de problema, possivelmente porque se trata de um transformante homocariota.

Além das diferenças nas taxas de crescimento, verificaram-se outras dissemelhanças, nomeadamente a nível morfológico e na zoosporogénese da estirpe FATSS.

Para além da incapacidade, atrás mencionada, de crescer em meio MSE na presença de higromicina B, esta estirpe apresentava pouco micélio aéreo e as suas hifas em meio líquido mostravam um menor número das típicas dilatações (*hyphal swellings*) de *P. cinnamomi*, quando comparado com o isolamento selvagem PA45. A estirpe 13C não mostrou alterações destas características.

Fracassaram várias tentativas de produção abundante de zoósporos<sup>10</sup> pelas estirpes transformadas. A observação ao microscópio óptico dos micélios destas estirpes, na fase final do processo de indução da zoosporogénese, revelou a presença de um reduzido número de esporângios e zoósporos. De facto, em análises intensivas destas hifas nunca foram encontrados mais que cinco esporângios visíveis por placa. Érsek *et al.* (1994) e Gaulin *et al.* (2002), na sequência de experiências efectuadas em *P. capsici* e *P. parasitica* var. *nicotianae*, associaram este defeito de esporulação à presença de higromicina no meio de cultura e da cassette de resistência no genoma de transformantes: o gene de resistência *hpt* continua a expressar-se mesmo na ausência do antibiótico (Judelson *et al.*, 1991). Contudo, esta associação não foi mencionada por outros investigadores que trabalharam com transformantes de *Phytophthora* resistentes a antibióticos e apresentavam zoosporogénese normal (West *et al.*, 1998; Kamoun *et al.*, 1998b; West *et al.*, 1999b; Latijnhouwers e Govers, 2003; Blanco e Judelson, 2005). Novas repetições do processo de produção de zoósporos, omitindo o antibiótico, voltaram a mostrar dificuldades de esporulação em todos os ensaios com a estirpe 13C e na maioria dos ensaios com FATSS. Por duas ocasiões nestes novos testes, a zoosporogénese da estirpe FATSS mostrou uma melhoria substancial; ao microscópio óptico, a abundância de esporângios e zoósporos aparentou ser semelhante à do isolamento selvagem PA45. Esta zoosporogénese “normal”, observada esporadicamente, na estirpe FATSS poderá

<sup>10</sup> Descrito na secção I.2.4. Produção de zoósporos. Na fase de crescimento em V<sub>8</sub>Ca, o meio continha higromicina B.

ser compreendida à luz das mesmas hipóteses colocadas para as falhas esporádicas de crescimento da estirpe em meio selectivo: silenciamento espontâneo do transgene *hpt*, responsável pela resistência à higromicina, ou estirpe FATSS de natureza heterocariota, em que zonas de micélio com maior abundância de núcleos não transformados foram seleccionadas para propagação e iniciação do processo de zoosporogénese. Em qualquer dos casos, a não expressão da resistência ao antibiótico conduziria a esporulação normal.

Quando foram observadas as falhas esporádicas de crescimento da estirpe FATSS em meio  $V_8Ca-Hig^+$ , com desenvolvimento de inóculos da mesma origem apenas em  $V_8Ca-Hig^-$ , a co-transformação foi encarada como um fenómeno global, em que a perda de resistência ao antibiótico seria um sinal de instabilidade do transformante, com silenciamento de ambos transgenes, *hpt* e sequência anti-sentido da  $\beta$ -cinamomina. Com base neste raciocínio, as culturas sem resistência ao antibiótico foram consideradas sem utilidade e descartadas de mais análises. Contudo, quando este fenómeno ocorrer futuramente, ou quando for observada uma zoosporogénese normal em FATSS, a produção de  $\beta$ -cinamomina deverá ser analisada para esclarecer se o silenciamento espontâneo afectou ambos os transgenes ou se se continua a verificar a supressão de produção da elicitina ou, ainda, comprovar que o transformante FATSS tem uma natureza heterocariota resultante da transformação. Caso se verifique esta última hipótese, as sequências transgénicas estarão ausentes e, ou é confirmada a manutenção da supressão da síntese de  $\beta$ -cinamomina, e isso será mais uma evidência da transferência do silenciamento genético internuclear em *Phytophthora*, proposta por West *et al.* (1999), ou é observada a síntese da elicitina, constituindo um exemplo que existem outros mecanismos de silenciamento que dependem da presença dos transgenes.

Foi, pois, conseguida a obtenção de uma estirpe transformante relativamente estável com ausência de produção de  $\beta$ -cinamomina, ou pelo menos com redução substancial da sua produção em relação ao isolamento selvagem que lhe deu origem. Apesar de se tratar de uma única estirpe, esta foi considerada um importante instrumento para a prossecução do objectivo global deste trabalho, que visa contribuir para a elucidação do papel biológico das elicitinas no processo infeccioso, e consubstancia a concretização do primeiro objectivo: transformação genética de *P. cinnamomi* e silenciamento do gene da  $\beta$ -cinamomina.

## CAPÍTULO II

### TESTES DE PATOGENICIDADE COM MUTANTES DE *Phytophthora cinnamomi*



<b>INTRODUÇÃO</b> .....	85
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	91
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	99
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	181



## II.1. INTRODUÇÃO

Apesar da grande quantidade de informação já existente sobre as elicinas a nível de sequências genéticas (Panabières *et al.*, 1995; Kamoun *et al.*, 1997a; Duclos *et al.*, 1998a; Qutob *et al.*, 2003), estrutura tridimensional (Boissy *et al.*, 1996; Rodrigues *et al.*, 2002) e actividade molecular (Mikes *et al.*, 1997, 1998), a(s) sua(s) função(s) biológica(s) intrínseca(s) continua(m) por clarificar. As suas propriedades eliciadoras, manifestadas num restrito número de plantas (Bonnet *et al.*, 1996; Kamoun *et al.*, 1998), e a sua expressão *in planta* (Brummer *et al.*, 2002; Colas *et al.*, 2001; Fleischmann *et al.*, 2005; Kamoun *et al.*, 1997b) apontam para um papel na patogenicidade de *Phytophthora* spp. A inibição da expressão de um gene com este tipo de atributo num parasita não obrigatório cultivável *in vitro* não será letal, mas espera-se que provoque uma mudança fenotípica no seu comportamento de virulência.

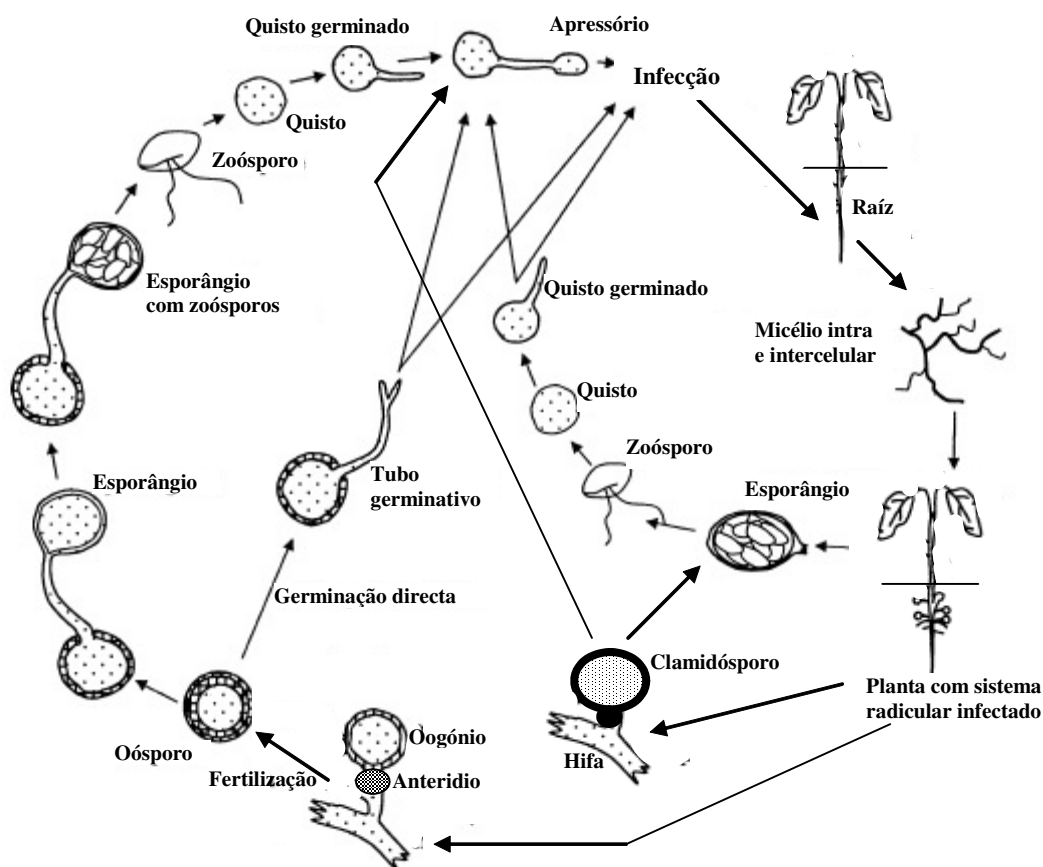
### II.1.1. Caracterização de *Phytophthora cinnamomi*

Os oomicetas são um grupo de organismos que, apesar de apresentarem um crescimento com hifas e modos de vida semelhantes a fungos, representam uma linha evolutiva única, distante dos fungos verdadeiros. As principais diferenças incluem a estrutura dos flagelos presentes nos zoósporos (Barr, 1983) e a presença de celulose em vez de quitina na parede celular (Bartnicki-Garcia, 1987), entre outras divergências bioquímicas e estruturais. De facto, análises filogenéticas moleculares colocam os oomicetas numa posição mais próxima das algas heterocontes (Sogin e Silberman, 1998).

*Phytophthora cinnamomi* é um oomiceta do solo que infecta essencialmente as raízes das plantas hospedeiras. Este fitopatogénio originário da região da Papua Nova Guiné (Zentmeyer, 1980) tem agora uma distribuição global. O seu ciclo de vida (revisto por Hardham, 2005 e West *et al.*, 2003) está representado na Figura II.1 e consiste essencialmente em duas fases de natureza sexuada e assexuada, normalmente estimuladas por condições ambientais distintas.

A fase assexual é caracterizada pela produção de esporângios. Estes podem germinar directamente em meio líquido ou sobre uma superfície, produzindo um tubo germinativo (germinação directa), ou podem sofrer um processo de diferenciação para formar zoósporos biflagelados (germinação indirecta). Estes zoósporos são libertados e nadam em meio aquoso

à procura de raízes de plantas hospedeiras, onde se fixam e enquistam. O quisto germina desenvolvendo um tubo germinativo que pode penetrar directamente no hospedeiro ou através de um apressório (dilatação da hifa, Figura II.2). Usando os nutrientes adquiridos no tecido do hospedeiro susceptível, as hifas desenvolvem-se inter e intracelularmente, formando uma rede de micélio absortivo, a partir do qual ocorre esporulação, repetindo o ciclo assexual. Esta etapa pode ser repetida muitas vezes, numa sucessão rápida que amplifica significativamente o inóculo na área infectada e acaba por provocar a necrose dos tecidos.

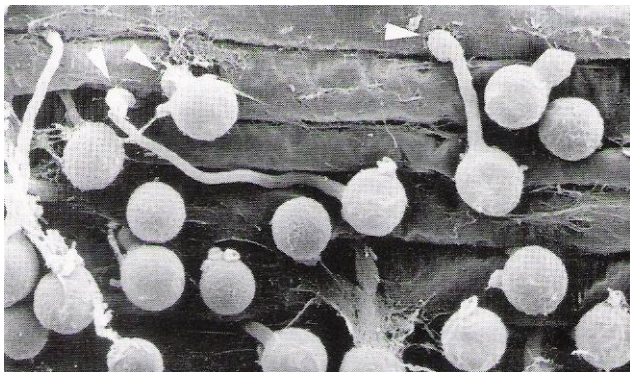


**Figura II.1:** Ciclo de vida de *Phytophthora cinnamomi*  
(Figura adaptada de Van West *et al.*, 2003, com alterações).

As hifas somáticas também produzem clamidósporos, estruturas resistentes que permitem a sobrevivência do parasita no solo ou em material vegetal morto, num estado de dormência. Quando as condições são favoráveis, os clamidósporos germinam (directa ou indirectamente) e reiniciam o processo infeccioso.

A etapa sexual gera oósporos, também dotados de alguma resistência a condições ambientais adversas. A oosporogénese envolve a produção de um oógonio feminino e um

anterídio masculino, que dada a natureza heterotática de *P. cinnamomi* apenas são formados na presença dos dois tipos de hifas compatíveis, A1 e A2. Após a fertilização, os oósporos podem entrar em dormência ou germinar imediatamente, desencadeando a fase assexuada.



**Figura II.2:** Quistos germinados de *P. cinnamomi*. Em muitos casos, o tubo germinativo não é visível, tendo provavelmente penetrado na superfície da raiz por baixo do quisto. As setas indicam o apressório.

(Figura adaptada de Hardam, 2001).

### II.1.2. A doença do declínio do sobreiro e da azinheira

Na Península Ibérica os montados de sobreiro e azinheira apresentam uma importância económica e social muito relevante, constituindo sistemas explorados a nível da agricultura, silvicultura, pecuária, cinegética, turismo e apicultura, passíveis de fixar populações nas zonas onde se encontram implantados. Nomeadamente, a cortiça produzida em Portugal representa 51% da produção mundial (Ferreira *et al.*, 2000) e é um dos principais produtos de exportação do nosso país. Os montados são ainda um habitat ecológico muito importante e com características únicas, cuja biodiversidade em fauna e flora é indispensável preservar (Correia, 1993).

O declínio e morte do sobreiro (*Quercus suber*) foram observados em Portugal desde os finais do século XIX (Almeida, 1898; Câmara-Pestana, 1898). Dadas as semelhanças com a doença da tinta do castanheiro, Tavares (1927) propôs ser *Phytophthora cinnamomi* Rands a causa da morte dos sobreiros. Contudo, apenas em 1947 é que este patógeno foi isolado de árvores doentes (Pimentel, 1947) e a sua associação ao declínio só foi verdadeiramente colocada a partir de 1992, após uma intensa pesquisa epidemiológica que revelou a sua presença sistemática em locais afectados pela doença (Brasier, 1992; Brasier *et al.*, 1993). Actualmente, *P. cinnamomi* é considerado um dos principais responsáveis pela quebra de vitalidade e morte nas espécies *Q. suber* e *Q. ilex* (azinheira) em toda a zona da bacia mediterrânica (Cobos *et al.*, 1993; Brasier, 1996; Gallego *et al.*, 1996; Robin *et al.*, 1998; Sanchez *et al.*, 2002), embora o impacto de *P. cinnamomi* na doença do declínio seja

modulado por diversos factores bióticos e abióticos, tais como parâmetros edáficos dos solos infestados (Moreira e Martins, 2005), disponibilidade de água para o patógeno e hospedeiro (Moreira-Marcelino, 2001), diferentes graus de resistência dentro das espécies hospedeiras (Coelho, 2003), entre outros.

A doença do declínio manifesta-se em montados de sobre ou azinho, em árvores isoladas ou grupos de maior ou menor extensão, afectando plantas de todas as idades (Moreira-Marcelino, 2001). A sintomatologia geralmente visível caracteriza-se por redução no tamanho e clorose das folhas, seguida da sua queda gradual, presença de ramos parcial ou totalmente desfolhados, rebentos epicórmicos, aparecimento de exsudações no tronco e redução no crescimento da árvore. A nível do sistema radicular, as raízes finas, responsáveis pela nutrição da planta, apresentam-se secas, com necroses e muitas vezes simplesmente ausentes, embora as raízes principais aparentemente não apresentem sintomas. Este declínio ocorre lentamente, demorando anos a matar a árvore. Contudo, um processo rápido de morte “súbita” das árvores também pode ocorrer, geralmente a seguir ao Verão, denunciado pela presença de folhas castanhas em toda a copa das árvores (Moreira-Marcelino, 2001).

A situação actual dos montados apresenta-se delicada e as perspectivas não são nada animadoras. Para além de afectar árvores já estabelecidas, *P. cinnamomi* também demonstrou ter um papel na fraca regeneração natural dos montados (Rodríguez-Molina *et al.*, 2002) e recentemente foi demonstrada a sua presença em plantas de *Q. ilex* cultivadas em viveiros (Sanchez *et al.*, 2005). Este último facto poderá representar, futuramente, o aparecimento de novos focos da doença, nomeadamente em zonas recentemente reflorestadas artificialmente.

Para além do declínio provocado em *Q. suber* e *Q. ilex* na região mediterrânica, *P. cinnamomi* também é responsável pela grande devastação observada na *Jarrah*, floresta natural de eucaliptos típica da Austrália (Shearer e Tippet, 1989) e pela decadência de outras espécies de *Quercus* no México (Tainter, 2000) e em França (Robin *et al.*, 1994). Aliás, várias outras espécies do género *Phytophthora* também têm sido responsabilizadas pelas altas taxas de mortalidade verificadas em *Quercus* e outras espécies florestais, no centro da Europa (Jung *et al.*, 1996, 2000), em Itália (Vettraino *et al.*, 2002), Turquia (Balci e Halmschlager, 2003) e nos Estados Unidos da América (Rizzo *et al.*, 2001, 2005), bem como na quebra de produção agrícola da várias culturas importantes, como por exemplo a batata, tomate, soja ou cacau (Kamoun, 2001).

“*Phytophthora*” é uma palavra proveniente da língua grega que significa “*destruidor de plantas*”. É urgente, senão eliminar, pelo menos travar a acção nefasta destes microrganismos, cuja acção já se faz sentir a nível mundial e da qual não nos podemos isentar de culpas, pois somos os responsáveis pela disseminação rápida destes patogénios. Se não o fizermos, arriscamo-nos a consequências terríveis, não só para o meio ambiente, pela destruição da flora natural, mas também a nível do modo de vida humano, tal como aconteceu no século XIX, no triste episódio da Grande Fome verificada na Irlanda, provocada pela destruição da cultura de batata por *P. infestans* (Fry e Goodwin, 1997).



## II.2. MATERIAL E MÉTODOS

As estirpes de *P. cinnamomi* aplicadas nos testes de patogenicidade foram as transformadas geneticamente, obtidas no decorrer dos trabalhos referidos no capítulo I, bem como os isolamentos selvagens que lhes deram origem:

- 13C, estirpe transformada com resistência à higromicina e o seu homólogo selvagem, PA37;
- FATSS, estirpe transformada com resistência à higromicina e em que também foi abolida a expressão da  $\beta$ -cinamomina e o seu homólogo selvagem, PA45.

### II.2.1. Infecção de material vegetal

#### II.2.1.1. Cultura dos isolamentos de *P. cinnamomi* em maçã “Granny Smith”

Foram seleccionadas maçãs verdes da variedade *Granny Smith* que não apresentassem qualquer tipo de manchas. As maçãs foram lavadas e a sua superfície exterior brevemente desinfectada por uma lavagem com uma solução de etanol 96% (v/v).

Com o auxílio de um bisturi esterilizado, cada uma das maçãs foi perfurada em três locais distintos, efectuando-se buracos de forma triangular. Retiraram-se, cuidadosamente, os pedaços de maçã resultantes e em cada orifício foi colocado um pequeno pedaço de agar (4 a 5 mm<sup>2</sup>) infectado com um dos isolamentos de *P. cinnamomi*. Os pedaços de maçã foram recolocados nos orifícios e estes foram selados por envolvimento da maçã em parafilme. Os frutos assim tratados foram colocados numa estufa, a 25°C, no escuro, por um período de oito a quinze dias, até ao aparecimento de manchas exteriores em locais distantes dos orifícios.

Para re-isolar o oomiceta, pequenas porções de tecido necrosado foram excisadas e colocadas em placas com meio V<sub>8</sub>Ca<sup>11</sup> (com ou sem higromicina, consoante a maçã tivesse sido infectada com uma estirpe transformada ou selvagem). Três dias após a inoculação, as placas foram observadas e a identificação de *P. cinnamomi* nas colónias presentes foi efectuada por análise ao microscópio óptico. As colónias positivas para *P. cinnamomi* foram repicadas para novas placas, de modo a prosseguirem o seu crescimento livre de possíveis contaminações.

---

<sup>11</sup> Descrito no ponto I.2.2., Cultura e manutenção dos isolamentos de *Phytophthora cinnamomi*.

Este procedimento foi realizado várias vezes para cada um dos isolamentos, enquanto procedimento de rotina para verificar a estabilidade dos transformantes ao longo do tempo e recuperar características de vitalidade de todos os isolamentos, que por vezes são perdidas durante as repicagens em laboratório.

### II.2.1.2. Infecção de sementes germinadas de *Quercus suber*

A espécie *Q. suber* (sobreiro) é hospedeira de *P. cinnamomi* (Moreira-Marcelino, 2001) e os ensaios realizados com esta planta destinaram-se a averiguar a existência de alterações na virulência das estirpes transformadas face aos isolamentos selvagens.

Bolotas colhidas de um único sobreiro (sobreiro 295, S. Brás de Alportel<sup>12</sup>) foram sujeitas a uma selecção prévia, eliminando todas aquelas que apresentavam orifícios provocados por insectos ou cuja coloração pudesse indicar um grau de maturação insuficiente para uma germinação rápida. As bolotas seleccionadas foram desinfestadas superficialmente por imersão durante 10 min numa solução a 10% de lixívia comercial (concentração de cloro activo  $\approx 50 \text{ g/dm}^3$ ). Em seguida, foram lavadas abundantemente com água corrente e mantidas dentro de água durante 20 min. As bolotas foram deixadas a secar à temperatura ambiente ( $\approx 20^\circ\text{C}$ ) e foram semeadas em copos de plástico com 200 ml com vermiculite esterilizada (Figura II.3.A) ou em vasos com 25 cm de altura, numa mistura de turfa/vermiculite autoclavada com um volume de  $\approx 4 \text{ dm}^3$  (Figura II.3.B). Os copos e os vasos foram regados e colocados numa estufa com temperatura média de  $25^\circ\text{C}$  e iluminação natural. Foi, regularmente, adicionada água aos substratos de modo a que estes permanecessem constantemente húmidos, favorecendo a germinação.



**Figura II.3:** Germinação de bolotas de *Q. suber* em copos (A) ou em vasos (B).

<sup>12</sup> Este sobreiro faz parte de um grupo de 195 enquadrados num projecto, que ainda decorre e em que a autora participa, de pesquisa de plantas potencialmente resistentes a *P. cinnamomi*. Dados preliminares indicam que o sobreiro 295 está incluído no *ranking* dos 20 sobreiros mais tolerantes do grupo estudado.

Às bolotas germinadas em copos, esperaram-se que as raízes atingissem aproximadamente 5 a 6 cm de comprimento antes da sua colheita. Às bolotas germinadas em vasos esperaram-se que as raízes atingissem aproximadamente 10 a 15 cm de comprimento.

Após o crescimento pretendido, as raízes foram limpas de substrato e usadas, de seguida, para ensaios de infecção.

#### **II.2.1.2.1. Ensaio de infecção directa**

Foram colocadas tiras de V<sub>8</sub>Ca colonizadas com *P. cinnamomi* sobre raízes com 5 a 6 cm de comprimento (Figura II.4). Também foram constituídos controlos negativos de raízes em contacto com agar não colonizado. Por debaixo das raízes foi colocado um algodão embebido com água esterilizada, para manter a hidratação das mesmas. Seguiu-se um período de incubação durante um ou dois dias, no escuro, a 25°C.



**Figura II.4:** Infecção de raízes pelo método directo.

As raízes inoculadas foram limpas de agar e micélio exterior e examinadas para detectar a presença e a extensão de necroses.

Pequenas porções de tecido necrosado foram excisadas e colocadas em placas com meio V<sub>8</sub>Ca, para re-isolamento do oomiceta, conforme descrito anteriormente.

Foram efectuados três ensaios, com três bolotas por isolamento.

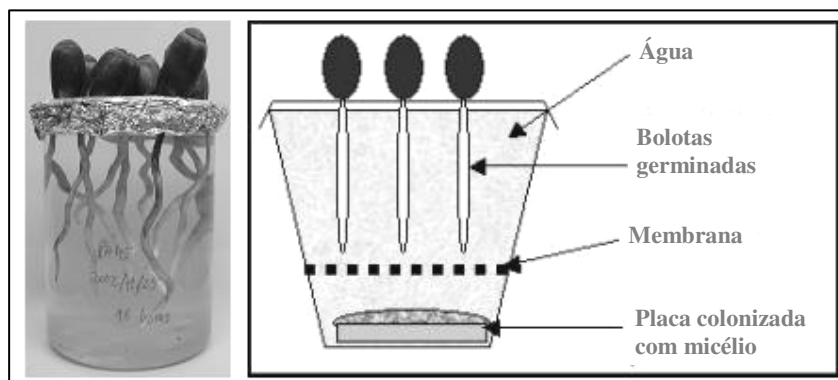
Raízes não infectadas e infectadas por este método foram recolhidas, limpas e congeladas a -80°C para posterior análise molecular 12, 24 e 36 h após a infecção.

#### **II.2.1.2.2. Ensaio de infecção indirecta 1**

As raízes (5 a 6 cm de comprimento) foram introduzidas num copo vidro contendo 500 ml de água destilada esterilizada. Uma placa de V<sub>8</sub>Ca totalmente colonizada por *P. cinnamomi* e envolvida em filtro Scrynel ( $\varnothing$  poro = 48  $\mu$ m) foi fixa no fundo do recipiente, de modo a não haver contacto directo entre o micélio, no agar e as raízes (Figura II.5). O recipiente foi tapado com papel de alumínio (que serviu de suporte para as bolotas) e deixado na bancada, à temperatura ambiente ( $\approx$  20°C), durante 36 h, exposto à luz solar indirecta por períodos de 6 a 8 h. Os copos foram, depois, mantidos durante 1 h a 4°C, e em seguida a 25°C

durante dois dias, no escuro. Foram constituídos controlos negativos com raízes tratadas com placas não colonizadas.

**Figura II.5:** Infecção de raízes pelo método indirecto 1.



As raízes foram enxugadas, sendo o excesso de água retirado com papel absorvente, e examinadas para detectar a presença e extensão de necroses.

Pequenas porções de tecido necrosado foram excisadas e colocadas em placas com meio V<sub>8</sub>Ca para re-isolamento do oomiceta, conforme descrito anteriormente.

Foi efectuado um ensaio, com oito bolotas por isolamento.

### II.2.1.2.3. Ensaio de infecção indirecta 2

As raízes (10 a 15 cm de comprimento) foram introduzidas numa proveta de vidro de 25 ml contendo 20 ml de solução SSM com zoósporos<sup>13</sup> e mantidas durante um ou dois dias, a 25°C, no escuro (Figura II.6).

**Figura II.6:** Infecção de raízes pelo método indirecto 2.



As raízes foram enxugadas, sendo o excesso de água retirado com papel absorvente, e examinadas para detectar a presença e extensão de necroses.

Pequenas porções de tecido necrosado foram excisadas e colocadas em placas com meio V<sub>8</sub>Ca para re-isolamento do oomiceta, conforme descrito anteriormente.

Foram efectuados três ensaios, com duas bolotas por isolamento.

<sup>13</sup> Ver ponto I.2.4., Produção de zoósporos.

### II.2.1.3. Infecção de folhas jovens de *Q. suber*

Folhas jovens de sobreiro foram colhidas de várias plantas mantidas em estufa. Quinze a vinte folhas foram colocadas num copo de vidro contendo 500 ml de água destilada esterilizada. As folhas mantiveram-se à superfície e uma placa de V<sub>8</sub>Ca totalmente colonizada por *P. cinnamomi* e envolvida em filtro Scrynel ( $\emptyset$  poro = 48  $\mu$ m) foi fixa no fundo do recipiente, de modo a não haver contacto directo entre o micélio, no agar e as folhas. O recipiente foi tapado com parafilme e deixado na bancada, à temperatura ambiente ( $\approx$  20°C) e exposto durante dois dias à luz solar indirecta, por períodos de 6 a 8 horas.

No fim deste período, as folhas que apresentavam toda a sua superfície necrosada foram rejeitadas (Figura II.7); as folhas que apresentavam algumas secções necrosadas foram recolhidas, o excesso de água retirado com papel absorvente e pequenas porções de tecido necrosado foram excisadas e utilizadas para re-isolar o oomiceta.



Figura II.7: Folhas infectadas.

### II.2.1.4. Infecção de plantas de *Q. suber*

As plantas de sobreiro com 12-18 meses usadas neste ensaio foram cedidas pelos viveiros da Direcção Geral de Florestas, em Montegordo e apresentavam-se em vasos do tipo alvéolo. Foram infectadas 12 plantas por cada um dos isolamentos e 12 plantas foram usadas como controlo.

Abaixo são descritas as várias etapas que fizeram parte deste ensaio.

#### II.2.1.4.1. Preparação do inóculo

O inóculo usado neste ensaio foi constituído por uma suspensão aquosa de micélio (Dhingra e Sinclair, 1995). Para a obter, os isolamentos foram cultivados em meio líquido V<sub>8</sub>C<sup>14</sup>, em placas de *Petri* com 20 ml de meio, durante 25 dias, a 25°C, no escuro. Após este período o micélio ocupava toda a placa.

O micélio foi separado do meio nutritivo por filtração, sendo depois lavado abundantemente com água desionizada. Em seguida, o micélio foi suspenso em água

<sup>14</sup> Descrito no ponto I.2.2., Cultura e manutenção dos isolamentos de *Phytophthora cinnamomi*.

desionizada e homogeneizado com a ajuda de um batedor eléctrico. Ao conteúdo de três placas foi adicionada água até se atingir 100 ml suspensão de micélio.

#### **II.2.1.4.2. Infestação de plantas**

A infestação das plantas realizou-se em simultâneo com a operação de transplante para vasos de 4 dm<sup>3</sup>, aplicando directamente 100 ml de inóculo sobre o torrão constituído pela terra e raízes de cada uma das plantas extraídas dos alvéolos, para que toda a superfície do torrão fosse regada com o inóculo. O substrato de cultivo foi preparado com uma mistura de turfa e areia (4/1) não esterilizada. Nas plantas testemunhas o inóculo foi substituído por água desionizada. Todas as plantas foram regadas a seguir ao transplante.

#### **II.2.1.4.3. Condições de cultura**

Os vasos com as plantas inoculadas foram colocados em tabuleiros para que em cada tabuleiro só houvesse plantas inoculadas com o mesmo isolamento, para evitar contaminações cruzadas. As plantas foram colocadas em estufa, onde foram regadas e pulverizadas com água durante a primeira semana do ensaio, para evitar o stress do transplante.

Os tabuleiros foram inundados de forma a que o nível de água se situasse 2-3 cm abaixo da superfície do solo nos vasos (Figura II.8). As plantas foram sujeitas a um regime de encharcamento durante dois dias por semana.



**Figura II.8:** Plantas de *Q. suber* durante os testes de patogenicidade.

As condições na estufa foram de luz natural e as temperaturas registadas variaram entre os 12°C e os 31°C. Para tentar eliminar o efeito de algumas flutuações das condições dentro da estufa, cada um dos conjuntos infestados por um dado isolamento foi dividido ao meio em subgrupos que ficaram em zonas diferentes na estufa. O Anexo 3 mostra como ficaram distribuídas as plantas na estufa.

#### II.2.1.4.4. Avaliação das plantas

O ensaio foi concluído 3 meses após a infestação das plantas. Nessa altura, as plantas foram retiradas dos vasos e as raízes foram cuidadosamente lavadas com água da torneira, sendo-lhes retirada toda a terra.

A avaliação das plantas foi realizada através da observação do grau de desfoliação da parte aérea, bem como da observação de necroses e ausência de raízes finas no sistema radicular. Após a observação dos sintomas, foi atribuído um valor à gravidade dos mesmos, numa escala de 0 a 4 descrita na Tabela II.1. (Sanchez *et al.*, 2002).

**Tabela II.1:** Escala para classificação da severidade dos sintomas

Classificação	Proporção da planta afectada
0	0 % (plantas sem sintomas)
1	1 - 33 %
2	34 - 66 %
3	67 - 99 %
4	100 % (parte aérea ou raiz morta)

Foram, também, utilizados valores intermédios em cada uma das classes principais, em função da gravidade dos sintomas: 0.3 = leve, 0.5 = moderado, 0.7 = grave.

#### II.2.1.4.5. Análise estatística

Aos resultados da avaliação das plantas foi aplicada uma análise de variância. Os valores médios da severidade dos sintomas de cada tratamento compararam-se entre si e com as testemunhas, mediante o teste de comparação de médias LSD (Mínima Diferença Significativa) de Fisher, para  $p < 0,05$  (Steel e Torrie, 1985) com o auxílio do programa informático estatístico "SPSS 14,0" para Windows

#### II.2.1.4.6. Isolamento a partir de raízes

O re-isolamento do patogénio a partir das raízes das plantas deste ensaio foi efectuado em meio selectivo PARPH e não em  $V_8Ca$ , como nos ensaios anteriormente descritos. Isto deve-se ao facto das hipóteses de contaminação das culturas por outros microrganismos serem mais elevadas neste caso, já que o substrato de cultivo das plantas não foi esterilizado e a duração da experiência foi mais longa. Assim, foram recolhidas amostras de raízes que, após selecção, foram lavadas para desprender partículas grossas de solo e depois colocadas dentro

de uma bolsa de tule e lavadas em água durante 2-3 horas. Posteriormente, as raízes foram fragmentadas em troços sempre menores que 1 cm de comprimento. Estes segmentos foram colocados em placas de *Petri* com meio selectivo PARPH [meio constituído por "Corn Meal Agar" (17 g/l), os antibióticos Pimaricina (5 ml/l), Ampicilina (250 ml/l) e Rifampicina (10 ml/l) e os fungicidas Pentacloronitrobenzeno - PCNB (100mg/l) e Himexazol (50 mg/l)] (Jeffers e Martin, 1986). Três dias após a inoculação, as placas foram observadas e a identificação de *P. cinnamomi* nas colónias presentes foi efectuada por análise ao microscópio óptico. As colónias positivas para *P. cinnamomi* foram repicadas para placas de meio V<sub>8</sub>Ca (com ou sem antibiótico com ou sem higromicina, consoante se se tratasse de uma estirpe transformada ou selvagem), de modo a prosseguirem o seu crescimento livre de possíveis contaminações.

**Nota 1**

Segurança Biológica: todos os materiais infectados (meios de cultura, material de laboratório, etc.) foram autoclavados durante 1 h a 121°C, antes de serem colocados no lixo, para inactivação dos propágulos bacterianos e de *P. cinnamomi* usados neste trabalho.

## II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os trabalhos experimentais descritos neste capítulo visaram responder a três questões fundamentais sobre as estirpes de *P. cinnamomi* transformadas geneticamente:

- Saber se mantinham a capacidade de infectar tecido vegetal;
- Averiguar se a transformação genética se mantinha estável após cultura das estirpes em material vegetal;
- Investigar se existiam diferenças de patogenicidade entre os isolamentos selvagens e as estirpes transformadas.

### II.3.1. Infecção de material vegetal

#### II.3.1.1. Cultura dos isolamentos de *P. cinnamomi* em maçã “Granny Smith”

A passagem dos oomicetas do género *Phytophthora* por uma cultura em maçãs da variedade *Granny Smith* é um procedimento vulgarmente utilizado nos laboratórios de fitopatologia e que tem por objectivo uma “revitalização” dos isolamentos mantidos em condições de cultura *in vitro* durante longos períodos. A manutenção prolongada em meios de crescimento artificiais leva por vezes a alterações nas características fenotípicas, nomeadamente no grau de virulência. Normalmente, após esta passagem por tecido vegetal, que simula uma planta hospedeira, os oomicetas apresentam mais vigor, um crescimento mais acelerado depois de voltarem a ser repicados para meios artificiais (P. Caetano e A.C. Moreira, comunicações pessoais).

Neste caso, o re-isolamento a partir de tecidos colonizados de maçã também foi realizado com outros objectivos: determinar se as estirpes transformadas eram capazes de invadir o material vegetal e saber se as transformações eram estáveis sob várias condições de crescimento.

Os resultados dos re-isolamentos a partir de tecidos de maçãs estão expostos na Tabela II.2.

Relativamente aos isolamentos selvagens PA5 e PA37, os re-isolamentos foram quase sempre bem sucedidos (com percentagens de sucesso de 83,3 e 87,5%, respectivamente); por vezes, foram acompanhados de contaminações variadas (bacterianas e fúngicas); nesses casos, as colónias provenientes dos re-isolamentos em meio V<sub>8</sub>Ca foram repicadas em meio PARPH

para obtenção de culturas puras dos isolamentos. Algumas vezes, os inóculos de tecido necrosado apenas apresentaram crescimento de outros microrganismos. As novas culturas dos isolamentos não apresentaram sinais de crescimento mais rápido em relação às culturas originais, antes da passagem por maçã.

**Tabela II.2:** Re-isolamento a partir de tecido necrosado de maçãs.

Isolamento	Passagens por maçãs	Total de tentativas de re-isolamento*	Com crescimento	Sem crescimento	Porcentagem de re-isolamento
PA45	2	24	20	4	83,33%
FATSS	4	48	36	12	75%
PA37	2	24	21	3	87,50%
13C	4	48	39	9	81,25

(\*) Em cada ensaio foram usadas duas maçãs, nas quais foram efectuados três orifícios para inoculação do isolamento; dois inóculos foram retirados do tecido necrosado à volta de cada orifício, num total de 12 tentativas de re-isolamento por isolamento em cada ensaio de passagem por maçã. O re-isolamento foi efectuado em meio V<sub>8</sub>Ca, suplementado com higromicina B (250 µg/ml) nas placas usadas para as estirpes transformadas.

As estirpes FATSS e 13C também foram capazes de invadir os tecidos do fruto e o seu re-isolamento de volta a meio selectivo com higromicina B teve sucesso, na maioria das ocasiões, indicando que o alívio da pressão de selecção por crescimento *in planta* não provocou a perda da resistência ao antibiótico.

Aparentemente, a quantidade e a extensão das necroses nas maçãs infectadas com a estirpe FATSS foi semelhante à dos outros isolamentos, embora a percentagem de re-isolamento se apresentasse menor. Num ensaio suplementar (cujos resultados não estão incluídos na Tabela II.2), foram infectadas maçãs com as estirpes 13C e FATSS, e o re-isolamento foi efectuado em meio sem antibiótico; em todos os inóculos foi possível re-isolar os respectivos transformantes e a sua posterior transferência para meio com antibiótico também foi bem sempre bem sucedida. A menor percentagem de re-isolamento observada para a estirpe FATSS em meio selectivo foi atribuída aos mesmos fenómenos que induziram as falhas de crescimento discutidas no Capítulo I (silenciamento espontâneo do gene *hpt* ou selecção de inóculo rico em núcleos não transformados do transformante FATSS heterocariota).

Após cada uma das passagens por cultura em maçã indicadas na Tabela II.2, um dos re-isolamentos bem sucedidos para cada isolamento foi seleccionado, aleatoriamente, para verificação da produção de elicinas em MSE. A presença de β-cinamomina nos filtrados de cultura seguiu os padrões apresentados na análise presente na secção I.3.7, com produção

abundante nos isolamentos PA45, PA37 e 13C e ausência/diminuição na estirpe FATSS. Portanto, a supressão da síntese de  $\beta$ -cinamomina não foi afectada pela cultura em material vegetal.

### **II.3.1.2. Infecção de sementes germinadas de *Q. suber***

#### ***II.3.1.2.1. Ensaio de infecção directa***

No córtex radicular das plantas hospedeiras, as hifas de *P. cinnamomi* podem crescer intercelularmente, no espaço entre as células ou “intracelularmente”, abrindo caminho através da secreção de enzimas que degradam as paredes celulares do hospedeiro. No denominado crescimento intracelular, o patogénio penetra na parede celular mas permanece rodeado pela membrana celular do hospedeiro, formando hifas intracelulares nucleadas ou simples prolongamentos, não nucleados, das hifas intercelulares. Independentemente de outros mecanismos de defesa, nos locais de contacto com o patogénio as plantas reforçam as paredes celulares, quer em interacções compatíveis, quer em interacções incompatíveis (revisto por Hardam, 2001, 2005). A virulência do patogénio pode ser avaliada pela facilidade e rapidez com que coloniza os tecidos, evitando possíveis respostas de defesa do hospedeiro.

Nos ensaios de infecção directa, foram colocadas tiras de V<sub>8</sub>Ca colonizadas com micélio de um dos isolamentos de *P. cinnamomi* em estudo, sobre raízes com 5 a 6 cm de comprimento (provenientes de bolotas de *Q. suber* recém-germinadas).

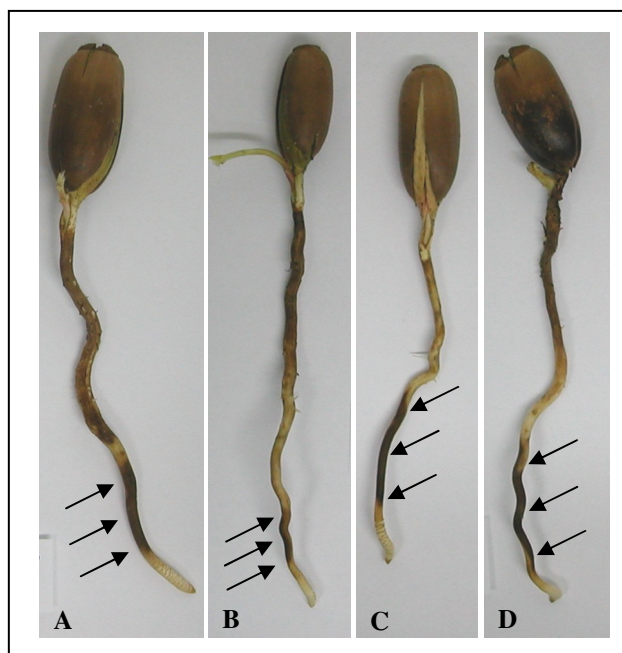
Doze horas após as inoculações foram observadas as primeiras lesões necróticas em raízes infectadas com os isolamentos PA45, PA37 e 13C, em zonas que tinham estado em contacto directo com micélio; as raízes inoculadas com FATSS não apresentavam alterações visíveis.

A Figura II.9 ilustra as alterações nas raízes perceptíveis 24 h depois das inoculações. As lesões iniciais alongaram-se, estendendo-se ao longo das raízes inoculadas com os isolamentos selvagens e transformante 13C (Figura II.9, A, C e D). No exemplo B da Figura II.9, podem observar-se as raízes infectadas com FATSS apresentando os primeiros sinais de necrose, num grau semelhante ao observado 12 h antes nas raízes infectadas com os isolamentos PA45, PA37 e 13C.

**Figura II.9:** Raízes infectadas pelo método directo, 24 h após a inoculação.

- (A) = Inoculação com isolamento PA45
- (B) = Inoculação com transformante FATSS
- (C) = Inoculação com isolamento PA37
- (D) = Inoculação com transformante 13C

As setas indicam as zonas de tecido necrótico.



Trinta e seis horas após as inoculações, as necroses das raízes provocadas por FATSS estenderam-se mas os danos provocados pelos outros isolamentos não aumentaram significativamente de tamanho, ficando restringidos à região não suberizada das raízes, que por sua vez começaram também a apresentar os primeiros sinais de desidratação.

Quarenta e oito horas depois das inoculações as lesões apresentavam-se indistinguíveis entre isolamentos, com o tecido radicular totalmente necrótico; apenas o grau de desidratação se mostrou mais acentuado nas raízes infectadas com os isolamentos PA45, PA37 e 13C. As raízes usadas como controlo apenas mostraram um ligeiro escurecimento, atribuível à oxidação provocada pela sua exposição ao ar.

As pequenas porções de tecido necrosado excisadas das raízes e colocadas em placas com meio V<sub>8</sub>Ca (com ou sem higromicina, consoante se se tratasse de uma estirpe transformada ou isolamento selvagem) permitiram o re-isolamento de todos os isolamentos.

No total, foram efectuados três ensaios independentes, com três bolotas recém-germinadas para cada um dos isolamentos, tendo-se observado um padrão de evolução das necroses idêntico ao atrás descrito. Todos os isolamentos foram considerados patogénicos para *Q. suber*, pois todos tiveram capacidade de colonizar o tecido radicular. Aparentemente, existiu um certo atraso na evolução da infecção provocada pela estirpe FATSS, mas 48 h mais tarde, a nível macroscópico, as lesões apresentavam um aspecto idêntico. A nível do crescimento *in vitro* foi observado que as estirpes FATSS e 13C tinham um crescimento

ligeiramente mais lento que os respectivos isolamentos selvagens<sup>15</sup>. A nível deste ensaio de desenvolvimento *in planta*, apenas a estirpe FATSS apresentou indícios desse crescimento mais lento, que, contudo, não modificou significativamente o desfecho final da infecção. Este desfecho, aparentemente igual para todos os isolamentos, deveu-se ao facto das raízes utilizadas neste ensaio serem pequenas e da colonização visível dos tecidos radiculares não avançar muito na região suberizada da raiz. As necroses provocadas pelos isolamentos PA37, PA45 e 13C rapidamente atingiram o limite da superfície radicular colonizável e, pouco mais tarde, a estirpe FATSS também atingiu igual extensão. A utilização de raízes maiores (10-15 cm) também não permitiria avaliar melhor uma possível taxa de extensão das necrose em cm/dia, porque a dimensão da zona colonizável é aproximadamente a mesma, devido ao facto de as zonas que permitem crescimento suberizarem à medida que a raiz se alonga. No meio natural este oomiceta instala-se preferencialmente nas raízes finas, não suberizadas, evitando as raízes principais (Moreira-Marcelino, 2001).

A estirpe FATSS mostra um ligeiro atraso de crescimento *in planta*. Este atraso, já observado *in vitro*, não pode ser directamente atribuído à transformação com o transgene *hpt*, já que a estirpe 13C não mostra esse fenótipo. As explicações possíveis para esta observação são as mesmas que foram apresentadas para o facto da estirpe 13C crescer no meio MSE com o antibiótico higromicina B e a estirpe FATSS não crescer nas mesmas condições (apesar da cassette de resistência continuar funcional). O ligeiro atraso de crescimento *in planta* da estirpe FATSS pode dever-se a uma potencial alteração em genes importantes para o crescimento *in planta* (provocada, por exemplo, pela interrupção desses genes por inserção aleatória de um dos plasmídeos de transformação no genoma) ou estar relacionada com a inibição da produção de  $\beta$ -cinamomina. A primeira hipótese poderia resultar, por exemplo da interrupção de uma cópia de um gene codificante para uma enzima responsável pela degradação da parede celular das células da raiz; a diminuição ou interrupção da expressão desse gene condicionaria a quantidade de enzima disponível para permitir a invasão dos tecidos, provocando um atraso na progressão da mesma. A segunda hipótese poderá ser confirmada caso se obtenham mais transformantes com a produção de  $\beta$ -cinamomina inibida e esses transformantes também apresentem um menor crescimento *in planta*.

Brummer *et al.* (2002) provaram por métodos imunocitoquímicos que o padrão de produção de quercinina por *P. quercina* durante o processo de infecção de raízes de *Q. robur*

---

<sup>15</sup> Discutido na secção I.3.8.

acompanha o padrão de crescimento do patogénio durante os primeiros cinco dias após a infecção. Esta elicítina foi localizada à volta das hifas, no espaço apoplástico e dentro das células invadidas do hospedeiro e os autores sugerem que as elicítinas poderão actuar como toxinas, de modo a enfraquecer o tecido do hospedeiro. Por outro lado, a expressão do gene da citricolina, durante a interacção de *P. citricola* com plântulas de *Fagus sylvatica* foi quantificada por RT-PCR em tempo real (Fleischmann *et al.*, 2005). Durante o crescimento do patogénio nas raízes finas do hospedeiro, o gene foi induzido três dias após a inoculação, numa altura em que é esperada a esporulação, tendo o pico de expressão sido atingido ao quinto dia. Este padrão de expressão genética é semelhante aos padrões de expressão encontrados para o gene da infestina, durante a interacção de *P. infestans* e a batateira (Kamoun *et al.*, 1997b), e para o gene da parasiticeína, durante a interacção de *P. parasitica* com o tomateiro (Colas *et al.*, 2001) e aponta para um papel das elicítinas na esporulação e não na invasão dos tecidos. Além disso, Kamoun *et al.* (1998b) obtiveram estirpes de *P. infestans* com abolição da produção de infestina que não mostraram alteração de virulência para com a batateira e estes autores não relatam dificuldades de esporulação das estirpes com o gene da infestina silenciado. Curiosamente, à semelhança da quercinina, a cinamomina cuja expressão foi suprimida neste trabalho é uma  $\beta$ -elicítina, ao passo que a citricolina, a infestina e a parasiticeína são  $\alpha$ -elicítinas. Fica assim em aberto a hipótese destas duas classes de elicítinas possuírem funções distintas.

As condições usadas neste ensaio diferiram bastante daquelas que seriam encontradas numa situação de infecção natural; foi usada uma grande quantidade de inóculo inicial (que praticamente condena à partida uma planta considerada hospedeira), numa fase do ciclo de vida do patogénio que não é a responsável pela infecção primária (hifas vegetativas normalmente não invadem as raízes, mas sim esporos assexuais ou sexuais, após a germinação) num ambiente praticamente esterilizado, e portanto sem concorrência para o oomiceta. Foram, assim, anuladas outras possíveis desigualdades de virulência inerentes ao processo de infecção natural, para além da rapidez de crescimento atrás mencionada. Por consequência, a partir dos resultados deste ensaio não foi possível afirmar categoricamente se existiam ou não diferenças de patogenicidade entre os isolamentos, apenas sendo possível afirmar que as transformações não afectaram significativamente a capacidade das hifas provenientes de estirpes transformadas invadirem os tecidos radiculares.

### II.3.1.2.2. Ensaio de infecção indirecta 1

O processo de infecção das plantas por *P. cinnamomi* é normalmente iniciado por zoósporos, células biflageladas móveis que são atraídas para as raízes de um potencial hospedeiro, guiadas através de gradientes químicos e eléctricos. Depois de atingirem a superfície radicular, os zoósporos orientam a sua superfície ventral na direcção da raiz e enquistam, num rápido processo em que perdem os flagelos, excretam compostos adesivos e formam a parede celular. A posterior penetração nos tecidos envolve a formação de um tubo germinativo e a produção de enzimas que degradam as paredes celulares do hospedeiro (revisto por Hardam, 2001, 2005).

De modo a simular o processo natural de infecção, foram efectuadas tentativas para a produção de zoósporos aplicando a metodologia descrita por Byrt e Grant (1979) para a espécie *P. cinnamomi*. Contudo, a aplicação deste método apenas obteve sucesso nos isolamentos selvagens PA45 e PA37, conduzindo à produção de um elevado número de zoósporos; nas estirpes transformadas FATSS e 13C não foi possível observar uma zoosporogénese abundante<sup>16</sup>.

Dado que o desenvolvimento de esporângios é estimulado pela redução dos nutrientes disponíveis e os zoósporos são atraídos por substâncias que fazem parte dos exsudados das raízes, foi testado um método de infecção indirecto, que visava a produção de zoósporos e a infecção de raízes de *Q. suber* no mesmo ensaio. Esperava-se que os poucos zoósporos produzidos pelos transformantes<sup>16</sup> fossem atraídos pelas raízes e que nelas estabelecessem uma infecção.

Trinta e seis horas após o início do processo de infecção, foram observadas necroses em cerca de metade das raízes tratadas com PA45 e PA37 (em 8 raízes tratadas para cada isolamento, 5 apresentavam sinais de necroses provocadas por PA45 e 3 provocadas por PA37). Ao mesmo tempo, foi também observada a infecção de uma das raízes tratadas com a estirpe 13C, enquanto que as raízes FATSS se apresentam semelhantes ao controlo. As Figuras II.10 e II.11 mostram o aspecto de algumas das raízes nessa altura do ensaio.

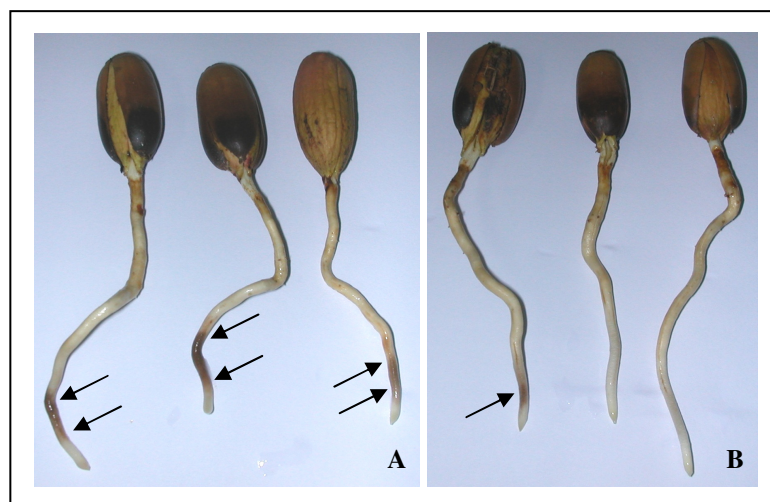
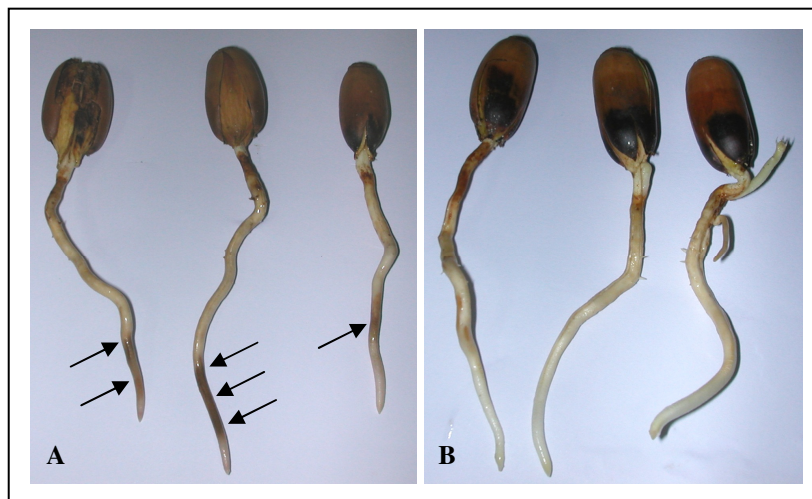
---

<sup>16</sup> Discutido na secção I.3.8.

**Figura II.10:** Raízes infectadas pelo método indirecto, 36 h após o início do processo.

(A) = Tratamento com PA45  
(B) = Tratamento com FATSS

As setas indicam as zonas de tecido necrótico.



**Figura II.11:** Raízes infectadas pelo método indirecto, 36 h após o início do processo.

(A) = Tratamento com PA37  
(B) = Tratamento com 13C

As setas indicam as zonas de tecido necrótico.

Sessenta horas após o início do processo de infecção, todas as raízes infectadas pelos isolamentos selvagens, bem como três raízes infectadas pela estirpe 13C, apresentavam lesões necróticas; as raízes submetidas ao tratamento com FATSS não se apresentaram diferentes dos controlos até 7 dias depois do início do processo.

Foi possível efectuar re-isolamentos de PA45, PA37 e 13C a partir do tecido radicular necrosado, confirmando que estes patogénios invadiram o hospedeiro.

Nos processos de indução de formação de esporângios e libertação de zoósporos realizados *in vitro* pelo método de Byrt e Grant, já tinham sido observadas dificuldades na esporulação das estirpes transformadas. Este ensaio confirmou, duma forma indirecta, esses resultados. Como seria de esperar para uma esporulação eficiente, todas as raízes tratadas com os isolamentos selvagens apresentaram infecção; também, como era previsto, a esporulação deficiente na estirpe 13C resultou num menor número de raízes infectadas. Contudo, a total

ausência de infecções nas raízes tratadas com a estirpe FATSS foi surpreendente, já que, apesar de serem em menor número, alguns zoósporos estavam presentes nos ensaios *in vitro*. Dadas estas observações, e não sendo possível confirmar se tinha havido ou não alguma zoosporogénese em FATSS, coloca-se a hipótese desta metodologia não estimular, de todo, a já de si fraca esporulação na estirpe FATSS.

#### ***II.3.1.2.3. Ensaio de infecção indirecta 2***

Uma vez que os ensaios de zoosporogénese apresentaram problemas nas estirpes transformadas, levando à formação de um reduzido número de esporângios visíveis por placa, não foi possível recolher os poucos zoósporos formados e infectar directamente as raízes. Por outro lado, o ensaio de infecção indirecta atrás mencionado pareceu não ter sido adequado para estimular a, já de si, fraca esporulação da estirpe FATSS. Assim, foi decidido submergir as raízes no conteúdo integral do volume de solução SSM usada durante a indução da libertação dos zoósporos, na expectativa de, apesar do seu reduzido número, os zoósporos presentes infectarem as raízes.

Em três ensaios de zoosporogénese com níveis normais de esporulação para os isolamentos selvagens PA45 e PA37 e esporulação reduzida nos transformados 13C e FATSS, foram incubadas raízes com 10 a 15 cm (duas por estirpe e por ensaio) na suspensão de zoósporos.

Doze horas mais tarde, todas as raízes tratadas com as suspensões de zoósporos de PA45 e de PA37 apresentaram sinais de necrose. As raízes incubadas com as suspensões de FATSS, de 13C e com a solução controlo SSM apresentavam-se sem modificações.

As raízes FATSS e as raízes controlo permaneceram sem alterações até cinco dias após o início das experiências; as lesões provocadas pelos isolamentos selvagens aumentaram, atingindo 2 a 3 cm acima dos ápices radiculares; em duas das seis raízes tratadas com suspensão de zoósporos 13C, também apareceram necroses (numa das raízes, no primeiro ensaio, 24 horas depois do início da incubação e numa raiz do terceiro ensaio, 36 horas após o início do tratamento).

Destes ensaios concluiu-se que o menor número de raízes infectadas pela estirpe 13C, comparativamente ao de raízes infectadas pelos isolamentos selvagens, estava relacionado com a abundância de zoósporos. Contudo, após ter sido confirmada a presença de alguns

zoósporos nas placas de indução da estirpe FATSS, estes não provocaram qualquer infecção nas raízes. Aparentemente existiam diferenças entre os (poucos) zoósporos da estirpe 13C e os da estirpe FATSS. Esta diferença foi confirmada pelos resultados do ensaio que a seguir se descreve.

Após os ensaios acima descritos, passou a omitir-se a higromicina B na propagação das culturas a usar nos ensaios de zoosporogênese das estirpes transformadas. Nestas novas condições, surgiram, em duas ocasiões, níveis de esporulação em FATSS, que se apresentavam semelhantes aos do respectivo isolamento selvagem. Numa dessas situações, ainda estavam disponíveis sementes germinadas<sup>17</sup>.

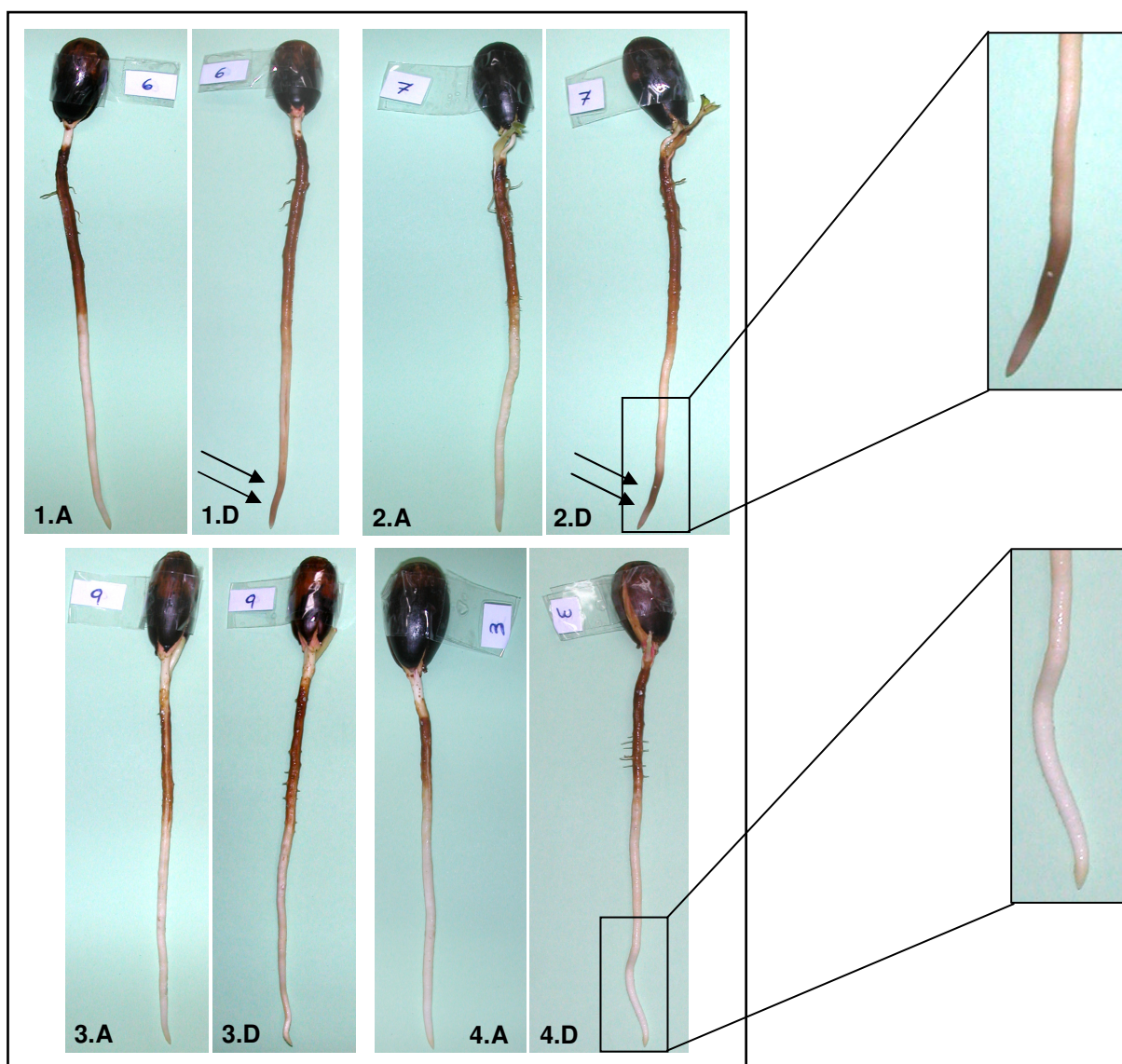
As sementes germinadas foram incubadas com as suspensões de zoósporos. Contudo, não foram observadas necroses provocadas por FATSS (Figura II.12).

A observação realizada ao microscópio durante a fase de libertação dos zoósporos nas placas de indução mostrou que FATSS produziu zoósporos aparentemente semelhantes aos observados nas placas PA45; contudo, não apareceram infecções nas raízes tratadas com os zoósporos FATSS. Estes resultados indicam que existem diferenças entre os zoósporos dos dois isolamentos, já que a capacidade de infecção das raízes é diferente. Essas diferenças podem situar-se, quer a nível do reconhecimento do potencial hospedeiro, quer a nível da capacidade de infectar os tecidos, e poderão ser atribuídas ou a alterações em genes importantes para o reconhecimento e/ou início da infecção (provocadas, por exemplo, pela interrupção desses genes por inserção aleatória de um dos plasmídeos de transformação no genoma) ou estarem relacionadas com a deficiência na produção de  $\beta$ -cinamomina.

Da primeira hipótese poderia resultar uma falha no reconhecimento da presença de um hospedeiro, provocada, por exemplo, pela interrupção do gene codificante dos receptores responsáveis pela taxias (química e eléctrica) que guiam os zoósporos até às raízes ou nos genes que controlam a secreção das substâncias adesivas, que seguram os zoósporos à superfície da raiz que pretendem infectar. Uma redução da velocidade de colonização dos tecidos já foi atrás referida. Essa redução poderá ter sido levada ao extremo nos zoósporos, impedindo-os de progredir logo numa fase precoce da infecção.

---

<sup>17</sup> As raízes usadas nestes ensaios são obtidas a partir de bolotas recém-germinadas e que são colhidas por volta do mês de Outubro e germinadas nas semanas seguintes. As bolotas podem ser armazenadas mas a taxa de germinação diminui muito rapidamente até chegar a valores nulos, depois de um a dois meses de armazenamento. Estes factores condicionaram as oportunidades para a realização de experiências com bolotas germinadas.



**Figura II.12:** Raízes antes (A) e depois (D) de imersas em suspensão de zoósporos. Raízes 1 e 2 incubadas com suspensão de zoósporos do isolamento selvagem PA45; raízes 3 e 4 incubadas com suspensão de zoósporos da estirpe FATSS num ensaio cuja zoosporogênese aparentou ser semelhante ao respectivo isolamento selvagem. As setas negras assinalam as necroses.

Só a obtenção de mais transformantes com a produção de  $\beta$ -cinamomina inibida, conjugada à constatação de que os zoósporos desses transformantes também apresentam dificuldades para iniciar a infecção, poderá confirmar um papel para a ausência da  $\beta$ -cinamomina nesta deficiência. O silenciamento da produção da  $\alpha$ -elicítina em *P. infestans* não teve qualquer efeito na capacidade de infecção de batateira por zoósporos nem do posterior desenvolvimento das hifas desta espécie no tecido infectado (Kamoun *et al.* 1998b), mas, possivelmente, o silenciamento da  $\beta$ -elicítina em *P. cinnamomi* acarretou consequências para a interação dos zoósporos com raízes de *Q. suber*, impedindo o normal desenrolar da infecção. Brummer *et al.* (2002) provaram, por meios imunocitoquímicos, que o padrão de

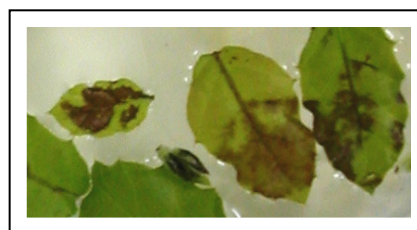
produção de  $\beta$ -quercinina durante o processo de infecção de raízes de *Q. robur* acompanha o padrão de crescimento do patogénio. Estes autores infectaram as raízes com zoósporos e provavelmente, não detectaram a elicítina logo nas primeiras horas de infecção da mesma forma que não detectaram a biomassa do patogénio. Além disso, os estudos de expressão genética de elicítinas, que apontam para a sua sub-expressão durante a primeira fase de infecção, só foram realizados com  $\alpha$ -elicítinas em espécies não produtoras de  $\beta$ -elicítinas (*P. infestans*, *P. parasitica*, *P. citricola*) (Kamoun *et al.*, 1997b; Huitema *et al.*, 2005; Colas *et al.*, 2001; Fleischmann *et al.*, 2005).

### II.3.1.3. Infecção de folhas jovens de *Q. suber*

As folhas jovens de *Q. suber*, bem como folhas jovens de outras plantas hospedeiras de *P. cinnamomi*, são vulgarmente utilizadas como “armadilha” no isolamento deste oomiceta. Suspensões de solo e/ou raízes são incubadas com as folhinhas e os propágulos do patogénio, presentes no solo ou nas raízes, são atraídos pelo tecido vegetal, colonizando-o e induzindo a formação de necroses. As zonas necróticas das folhas são depois transferidas para placas com meio de cultura apropriado para o isolamento de culturas puras. Contudo, este processo não é simples, pois as folhas podem apresentar necroses que não são devidas exclusivamente, ao oomiceta que se pretende isolar mas, também, à presença de outros agentes patogénicos presentes nas amostras de solo/raízes e mesmo nas folhas antes da incubação, pois não é possível esterilizá-las ou mesmo desinfestá-las, superficialmente, sem comprometer a sua eficácia como “armadilha”. Este método de isolamento não garante a detecção do oomiceta em todas as amostras positivas, mas é considerado uma técnica útil para a concentração de propágulos dispersos em amostras cujo volume as tornaria difícil de analisar de outra forma (Moreira-Marcelino, 2001).

Nos testes descritos na secção II.2.1.3, efectuados com PA45 e PA37 foi possível efectuar re-isolamentos a partir de fragmentos de folhas que apresentavam necroses semelhantes às ilustradas na Figura II.13.

**Figura II.13:** Aspecto das necroses presentes nas folhas usadas como armadilha.



A transferência de tecido vegetal necrótico dos ensaios onde foram aplicados as estirpes transformadas FATSS e 13C para meio selectivo não possibilitou re-isolamentos bem sucedidos (mesmo quando no meio de re-isolamento não foi colocada higromicina B). Estes re-isolamentos falhados poderão dever-se às, já atrás discutidas, dificuldades de esporulação destas estirpes, com a agravante de existirem outros microrganismos concorrentes para a colonização das folhas.

#### II.3.1.4. Infecção de plantas de *Q. suber*

Os testes de patogenicidade efectuados em plantas de sobreiro com 12-18 meses (12 plantas por isolamento) revelaram que existem diferenças de virulência entre os isolamentos selvagens e as estirpes transformadas.

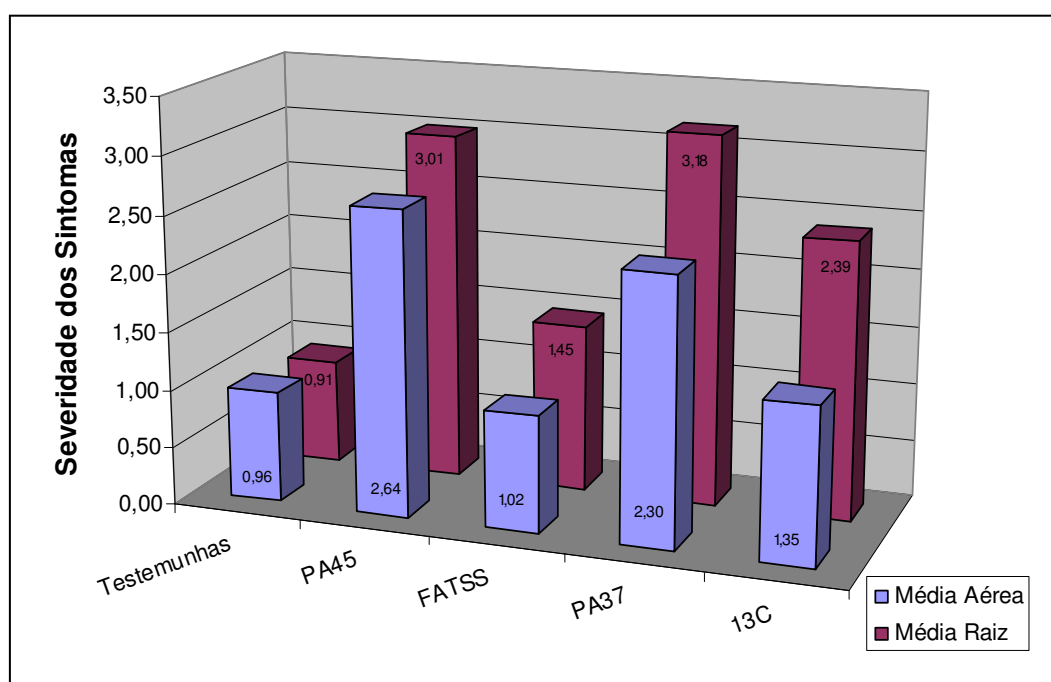
Após o final da experiência (três meses após a infecção), as plantas foram removidas dos vasos e os seus sistemas radiculares, bem como as partes aéreas, foram examinados visualmente para a atribuição de um grau de severidade dos sintomas na escala de 0-4 proposta por Sánchez *et al.* (2002). A Figura II.14 mostra plantas infectadas por cada um dos isolamentos em estudo, representativas do aspecto global dos grupos onde se inseriam.



**Figura II.14:** Aspecto global de plantas de *Q. suber* no final dos testes de patogenicidade.

(A) = Planta testemunha; (B) = Planta infectada com o isolamento selvagem PA45;  
(C) = Planta infectada com transformante FATSS; (D) = Planta infectada com o isolamento selvagem PA37;  
(E) = Planta infectada com o transformante 13C.

Numa observação superficial das plantas foram realçadas imediatamente as diferenças entre as plantas testemunha e as plantas infectadas com as estirpes transformadas e selvagens, quer na aparência da parte aérea, quer na parte subterrânea. As plantas infectadas pelas estirpes transformadas não pareciam muito diferentes das testemunhas, principalmente nos sintomas apresentados pela parte aérea. Contudo, a análise pormenorizada que se seguiu revelou que o sistema radicular das plantas infectadas com as estirpes 13C e FATSS, apesar de ainda apresentar bastantes raízes finas, estas mostravam numerosas necroses. Na Tabela 2 do Anexo 4 estão discriminadas as classificações individuais atribuídas a cada planta do ensaio de patogenicidade e a Figura II.15 mostra o gráfico que resume a quantificação da avaliação do grau de severidade médio dos sintomas dos grupos de plantas infectadas com diferentes isolamentos.



**Figura II.15:** Grau médio de severidade dos sintomas da parte aérea e do sistema radicular de plantas de *Q. suber* infectadas com diferentes isolamentos de *P. cinnamomi* selvagens (PA45 e PA37) e estirpes transformantes (FATSS e 13C).

Após a avaliação das plantas, foram retiradas amostras de raízes para re-isolamento dos patógenos usados na inoculação das plantas.

Das plantas infectadas com 13C e FATSS obtiveram-se culturas de *P. cinnamomi* com a característica capacidade de crescimento em meio com higromicina B, típica das estirpes transformadas; das plantas infectadas com PA45 e PA37 resultaram culturas com

características selvagens, incapazes de se desenvolverem na presença do antibiótico de selecção da transformação.

Surpreendentemente, foi possível re-isolar *P. cinnamomi* a partir de raízes de duas plantas testemunha (plantas 1 e 4 na Tabela 2, Anexo 4). Esta contaminação foi atribuída a uma de duas causas possíveis: ou ocorreram contaminações das testemunhas durante o decorrer do ensaio na estufa, através da água dos tabuleiros usados no encharcamento das plantas ou as plantas já vinham infectadas do viveiro; uma contaminação durante a fase de inoculação foi excluída porque as plantas testemunhas foram as primeiras a ser processadas na montagem do ensaio, num ambiente que ainda não tinha sido exposto à presença dos patogénios a testar, precisamente para evitar este tipo de problema. A contaminação através de misturas de águas de encharcamento pareceu pouco provável, pois, apesar das plantas 1 e 4 se encontrarem no mesmo tabuleiro foram as únicas desse recipiente das quais foi possível re-isolar o patogénio. Além disso, uma possível inoculação por contaminação das águas representaria uma quantidade mínima de propágulos, que dificilmente provocariam os danos observados nas raízes das plantas contaminadas durante o tempo do ensaio (as raízes inoculadas com os isolamentos selvagens foram expostas a uma quantidade de propágulos muito elevada e o grau de severidade dos sintomas radiculares foi semelhante aos das plantas testemunha contaminadas). Por outro lado, não é de estranhar encontrar podridão nas raízes de plantas que estão expostas ao stress provocado por encharcamentos periódicos. A distinção que se faz entre a podridão provocada pelo stress do encharcamento - ou pela acção de outros fitopatogénios radiculares eventualmente presentes - e a podridão provocada pelo oomiceta reside no facto deste patogénio colonizar preferencialmente tecido saudável (Morris e Gow, 1993); por isso, quando foi detectado o oomiceta, as necroses observadas foram-lhe atribuídas. A podridão provocada pelo alagamento poderá ter uma quota-parte de responsabilidade no grau atribuído para a severidade dos sintomas radiculares; contudo, uma vez que foi uma condição à qual todas as plantas estiveram sujeitas, as diferenças observadas entre grupos de plantas infectadas com diferentes isolamentos foram atribuídas a capacidades de virulência distintas.

Dada a hipótese de existirem mais plantas pré-contaminadas por *P. cinnamomi* que não foram detectadas pelos re-isolamentos, foi analisada a variação da sintomatologia dentro de um mesmo grupo, pois seria de esperar que essas plantas apresentassem um grau de gravidade da doença muito superior à média do grupo, já que teriam sido alvo de uma dupla infecção (uma no viveiro, outra na montagem do ensaio de patogenicidade). Como as plantas

utilizadas possuem uma diversidade genética desconhecida, a variação da sintomatologia dentro dos grupos de plantas também foi pesquisada no sentido de detectar alguma discrepância que se pudesse atribuir a uma potencial diferença de tolerância/susceptibilidade de determinada planta. Pretendeu-se, assim, homogeneizar os resultados obtidos dentro de um dado grupo, excluindo plantas que pudessem apresentar graus muito diferentes da média de severidade dos sintomas dos outros membros do grupo, provocados por infecções prévias e/ou resistência/susceptibilidade diferencial. Para tal, os valores individuais dos graus de severidade obtidos para o sistema radicular de cada grupo foram submetidos ao Teste de Grubbs, que permite identificar os chamados *outliers*, (valores muito diferentes dos outros). Estes cálculos foram efectuados recorrendo ao aplicativo informático disponível em <http://www.graphpad.com/quickcalcs/GrubbsHowTo.cfm> O resultado desses testes está exposto no Anexo 4, não tendo sido identificados verdadeiros *outliers*. Contudo, foram detectados valores de graus de severidade que se afastaram da média calculada com os restantes valores.

Tal como seria de esperar, dentro do grupo das testemunhas, as plantas 1 e 4, contaminadas, apresentaram os valores mais afastados do grupo. Foram excluídas da análise dos testes de patogenicidade.

Seguidamente, foi excluída de cada grupo a planta cujo valor do grau de severidade era mais distante da média dos outros dentro do mesmo grupo. Assim, no grupo PA45 foi eliminada a planta 10 (com valor distante, abaixo da média do grupo), no grupo FATSS foi rejeitada a planta 2 (com valor distante, acima da média do grupo) e no grupo 13C foi descartada a planta 6 (abaixo da média do grupo). No grupo PA37, duas plantas (1 e 12) mostraram-se, igualmente, afastadas (abaixo da média do grupo): foi então realizado o Teste de *Grubb* aos sintomas da parte aérea deste grupo, que apontou a planta 12 como a que apresentava valores mais afastados.

Após a exclusão das potenciais plantas problemáticas, foi efectuada uma análise de variância e os graus de severidade dos sintomas obtidos para cada planta foram comparados por grupos relacionados com o tipo de isolamento usado na infecção, mediante o teste de comparação de médias LSD (Mínima Diferença Significativa) de Fisher, para  $p < 0,05$  (Steel e Torrie, 1985) com o auxílio do programa informático estatístico "SPSS 14,0" para Windows. Os resultados desta análise figuram no Anexo 4.

A Tabela II.3 resume em que casos foram significativas as diferenças no grau de severidade dos sintomas observadas no gráfico da Figura II.15.

**Tabela II.3:** Existência de diferenças significativas entre a patogenicidade dos isolamentos.

Grupo 1 (Isolamento aplicado na infecção do grupo)	Grupo 2 (Isolamento aplicado na infecção do grupo)	Comparação entre grupos Sintomas radiculares (diferenças significativas)	Comparação entre grupos Sintomas da parte aérea (diferenças significativas)
Testemunhas (Não infectadas)	PA45	Sim	Sim
	FATSS	Não	Não
	PA37	Sim	Sim
	13C	Sim	Não
PA45	FATSS	Sim	Sim
	PA37	Não	Não
	13C	Sim	Sim
FATSS	PA37	Sim	Sim
	13C	Sim	Não
PA37	13C	Sim	Sim

Com base nos dados do gráfico da Figura II.15 e da Tabela II.3, relativamente ao grau de sintomatologia apresentado pelos sistemas radiculares, conclui-se que existem diferenças de virulência entre os isolamentos em estudo e que estes podem ser agrupados segundo a sua patogenicidade diferencial para plantas de *Q. suber*:

- Grupo I (isolamentos muito virulentos): PA37 e PA45;
- Grupo II (estirpe virulenta): 13C;
- Grupo III (estirpe pouco virulenta): FATSS.

Os sintomas das copas dividem os isolamentos em dois grupos:

- Grupo I (isolamentos muito virulentos): PA37 e PA45;
- Grupo III (estirpes pouco virulentas): 13C e FATSS.

Contudo, esta divisão é apenas aparente, porque os danos na parte aérea não reflectiram directamente o mau estado do sistema radicular no caso da estirpe 13C.

Os propágulos usados nesta experiência foram essencialmente clamidósporos, pois o micélio envelhecido tem pouca viabilidade. Após a inoculação, os clamidósporos em contacto directo com as raízes terão germinado e infectado directamente as plantas hospedeiras. Outros

clamidósporos, sem hospedeiros próximos, terão, nas condições de encharcamento em que decorreu a experiência, dado origem a esporângios com a consequente libertação de zoósporos, sendo estes que infectaram as raízes. Ao microscópio óptico, todos os isolamentos apresentavam formação de clamidósporos e, embora não tenham sido efectuadas contagens, o seu número aparentou ser semelhante.

Se se considerar a média do grau de sintomatologia apresentado pelos sistemas radiculares infectados com isolamentos selvagens (grau 3,1) como capacidade máxima de infecção (100%) verifica-se que houve uma redução dessa capacidade de infecção para as estirpes transformadas: 22,9% para a capacidade de infecção por 13C e 53,2% para o FATSS.

Será tentador associar imediatamente as diferenças de virulência observadas nas estirpes transformadas à diminuição das suas taxas de crescimento *in vitro*. Contudo, esta ligação não pode ser efectuada de um modo simples e directo. Enquanto que na estirpe 13C a redução da taxa de crescimento *in vitro* em meio sem antibiótico (18,3%) é, aproximadamente, similar à diminuição da patogenicidade (22,9%), no caso da estirpe FATSS a redução da taxa de crescimento *in vitro* em meio sem antibiótico (16,9%) é bastante menor que a diminuição da patogenicidade (53,2%). McCarren (2006) obteve transformantes de *P. cinnamomi* com expressão da GFP e observou que, em testes de patogenicidade realizados em raízes esterilizadas de tremoceiro, o transformante com maior redução da taxa de crescimento *in vitro* apresentou um maior grau de patogenicidade que o transformante com menor diminuição de crescimento *in vitro*. A alteração de virulência observada nas estirpes transformadas obtidas no presente trabalho terá, assim, origem noutras causas.

A diminuição do grau de severidade dos sintomas provocados pela estirpe 13C face aos isolamentos selvagens é atribuível à dificuldade de esporulação (provocada pela expressão da cassette de resistência); a capacidade de infectar novos tecidos terá ficado limitada e as raízes afectadas terão sido colonizadas, na sua grande maioria, através da germinação directa dos clamidósporos. Além disso, nesta experiência, no ambiente em que foram colocados os isolamentos existem outros microrganismos cuja acção terá sido maléfica, diminuindo a sobrevivência das várias formas dos oomicetas (clamidósporos, hifas ou zoósporos), quer no solo, quer nos próprios tecidos infectados. A capacidade de sobrevivência no solo também poderá ter sido reduzida na estirpe transformada 13C, quando comparada com a sobrevivência dos isolamentos selvagens.

Relativamente à diminuição do grau de severidade dos sintomas provocados pela estirpe FATSS, também poderá afirmar-se que dificuldades de esporulação originadas pela expressão da cassete de resistência terão dado a sua contribuição. Contudo, a diminuição de virulência foi muito mais acentuada na estirpe FATSS do que na estirpe 13C e vários factores poderão ter originado esta desigualdade, a saber:

- a esporulação em 13C terá ocorrido em números baixos mas terá dado origem a propágulos viáveis, ao passo que a esporulação em FATSS além de reduzida, terá dado origem a propágulos incapazes de infectar as raízes;

- um menor desenvolvimento das hifas da estirpe FATSS durante o crescimento *in planta* terá provocado menos lesões nas raízes;

- a capacidade de sobrevivência em ambiente natural também poderá ter sido reduzida mais acentuadamente na estirpe FATSS.

Os testes de patogenicidade com mutantes de *P. cinnamomi*, que constituíam o segundo objectivo deste trabalho, permitiram a constatação de diferenças na virulência entre os isolamentos selvagens e estirpes transformadas geneticamente e diferenças de virulência entre o transformante simples (transformado geneticamente com a cassete de resistência à higromicina B) e o co-transformante (transformado com a cassete de resistência à higromicina B e com supressão da produção de  $\beta$ -cinamomina).

O peso que o silenciamento da  $\beta$ -elicítina teve nas diferenças verificadas entre as estirpes FATSS e 13C só poderá ser definitivamente esclarecido com a obtenção de outros transformantes com o mesmo comportamento, já que as diferenças entre estas estirpes transformadas poderão eventualmente ter sido provocadas por interrupções de zonas codificantes importantes, por inserção aleatória dos vectores de transformação no genoma hospedeiro, e que terão ocorrido em locais diferentes do genoma em cada um dos transformantes.

No entanto, apesar das conclusões relativamente ao papel das elicítinas na virulência não serem totalmente esclarecedoras, estes isolamentos, selvagens e transformados, forneceram material para o estabelecimento de padrões de expressão genética em que, para além das diferenças provocadas pela diferente expressão dos genes das elicítinas, também puderam ser procuradas diferenças de expressão de genes associadas a uma diminuição de virulência.



## CAPÍTULO III

### CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MUTANTES DE *Phytophthora cinnamomi*



<b>INTRODUÇÃO</b> .....	121
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	127
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	145
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	181



### III.1. INTRODUÇÃO

Apesar de ser há muito reconhecido que *Phytophthora* spp constituem uma grande ameaça para as plantas, só muito recentemente é que os conhecimentos a nível genético dos elementos deste género começaram efectivamente a avançar. O isolamento de genes foi, inicialmente, efectuado recorrendo a técnicas de hibridação em bancos genómicos, que implicavam o conhecimento sequências totais ou parciais de genes homólogos doutros organismos (por exemplo: Dudler, 1990) ou das proteínas expressas por esses genes (Kamoun *et al.*, 1993b, por exemplo). Também se mostrou que a sequenciação mais ou menos aleatória dos genes isolados dos clones provenientes desses bancos genómicos por hibridação diferencial com sondas sintetizadas a partir de bancos de cDNA, era um método eficaz para descobrir novos genes em *Phytophthora* (por exemplo: Pieterse *et al.*, 1993). Ainda que estas abordagens tenham fornecido bons resultados, a quantidade de informação por elas gerada foi insuficiente para compreender totalmente a biologia destes patogénios. Actualmente, a informação genética está a aumentar significativamente: foram sequenciados os genomas de *P. ramorum* e *P. sojae* (disponíveis em <http://www.jgi.doe.gov>) e está em curso a sequenciação dos genomas de *P. infestans* e *P. capsici* (Gajendran *et al.*, 2006). Paralelamente, também foram e ainda estão a ser desenvolvidos projectos de sequenciação sistemática de bancos de cDNA (ESTs) (Kamoun *et al.*, 1999a; Qutob *et al.*, 2000; Panabières *et al.*, 2005; Randall *et al.*, 2005, entre outros). O genoma mitocondrial de *P. infestans* foi já sequenciado (Paquin *et al.*, 1997; Ávila-Adame *et al.*, 2006) e, para facilitar os estudos de mapeamento, foram constituídos bancos genómicos em cromossomas artificiais bacterianos (BACs, *Bacterial Artificial Chromossomes*) para *P. infestans* (Randall e Judelson, 1999; Whisson *et al.*, 2001) e *P. nicotianae* (Shan e Hardham, 2004).

As enormes quantidades de informação sobre sequências genómicas, hoje em dia disponíveis nas bases de dados, necessitam de instrumentos de análise e anotação apropriados, baseados nas estruturas típicas dos genes do organismo em estudo. Assim, também foram efectuados estudos para ajudar a definir essa estrutura no género *Phytophthora* (Win *et al.*, 2006) e revelar dados que permitam reconhecer sequências consenso associadas a determinadas características e que podem depois ser pesquisadas sistematicamente nas bases de dados, através de software adequado (Torto *et al.*, 2003).

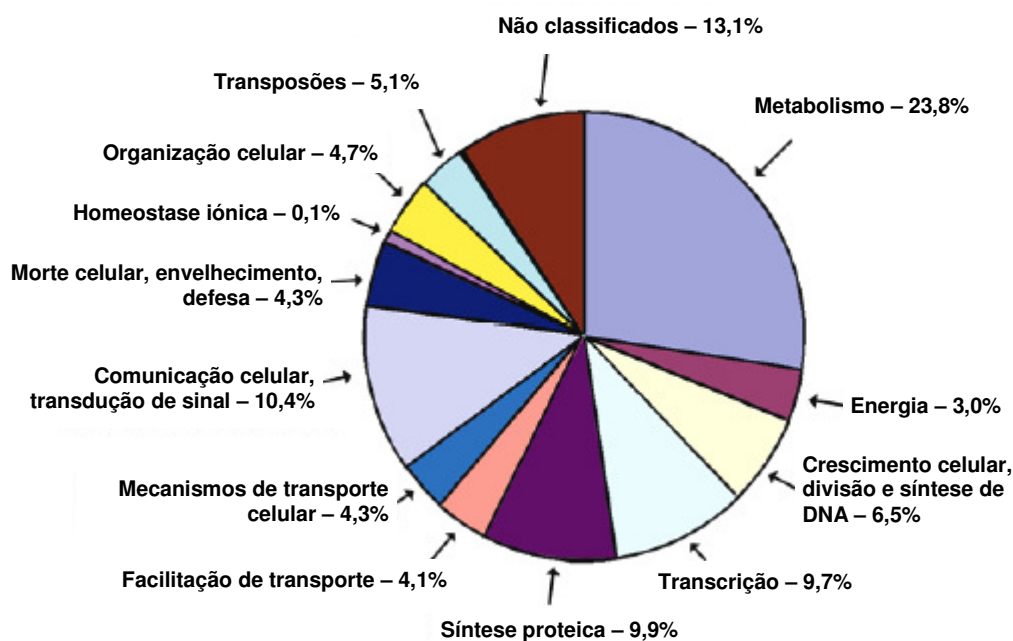
Contudo, a informação genómica não é suficiente. O comportamento celular no que diz respeito à sobrevivência, crescimento e diferenciação reflecte-se em padrões de expressão

genética distintos e a capacidade de quantificar os níveis de transcrição de genes específicos foi e será sempre uma questão central nas pesquisas das funções genéticas.

### III.1.1. Obtenção de perfis de expressão genética em *Phytophthora* spp

As várias fases do ciclo de vida de *Phytophthora* spp têm sido estudadas essencialmente a nível citológico (Hardham, 2001). A diferenciação ocorrida aquando de cada uma destas fases requer a expressão específica de muitos genes. Como o sucesso do processo infeccioso depende do desenvolvimento dos vários estados fisiológicos do patógeno, a descoberta dos processos moleculares que regulam o ciclo de vida de *Phytophthora* spp é importante para identificar os determinantes da patogenicidade e a partir daí desenvolver estratégias de controlo adequadas. Neste sentido, várias pesquisas foram efectuadas para estabelecer perfis de expressão genética associados às várias fases do ciclo de vida destes organismos, quer em culturas *in vitro*, quer durante a infecção de tecidos vegetais.

Uma operação em grande escala de descoberta de genes foi empreendida em *P. infestans*. Este estudo iniciou-se com uma avaliação prévia da diversidade da expressão genética, através da sequenciação aleatória de clones de um banco de cDNA gerado a partir de RNA extraído de micélio (Kamoun *et al.*, 1999a). Mil ESTs foram criadas (correspondentes a 760 sequências únicas) e a 419 foi possível atribuir uma identidade celular com função atribuída (através de comparação com sequências já conhecidas colocadas nas bases de dados públicas). Randall *et al.* (2005) ampliaram esta investigação com um grupo de 75.757 ESTs obtidas a partir de 20 bancos de cDNA representantes de um largo espectro de condições de crescimento, respostas a stresses e fases do ciclo de vida, incluindo interações de *P. infestans*/batateira e *P. infestans*/tomateiro. 18.256 ESTs representantes de sequências únicas foram caracterizadas em relação a potenciais funções (Figura III.1) e foram obtidos perfis específicos associados a cada uma das condições de crescimento/fases do ciclo de vida. Verificaram-se grandes diferenças entre os padrões de expressão de micélio vegetativo e as fases associadas à esporulação, bem como afinidades entre algumas condições de crescimento. Foi revelada a conservação de alguns elementos associados à patogenicidade nos fungos verdadeiros e a presença de alguns genes inesperados em oomicetas, como os das quitina-sintetases. Os dados obtidos foram depositados na Base de Dados de Genómica Funcional de *Phytophthora* (PFGD, *Phytophthora Functional Genomics Database*; <http://www.pfgd.org>) (Gajendran *et al.*, 2006), de acesso livre ao público.



**Figura III.1:** Classificação funcional dos genes em *P. infestans* (figura adaptada de Randall *et al.*, 2005).

Três bancos de cDNA foram construídos para *P. sojae*, a partir de zoósporos, micélio vegetativo e plantas de soja infectadas (Qutob *et al.*, 2000). 3.035 ESTs foram geradas e 2.189 corresponderam a sequências únicas que permitiram a obtenção de perfis bem distintos para cada uma das situações estudadas. As sequências, bem como as anotações referentes a putativas funções foram depositadas na PFGD.

Panabières *et al.* (2005) produziram 3.568 ESTs a partir de um banco de cDNA construído usando mRNA extraído de micélio de *P. parasitica* cultivado em meio sintético. Foi possível realizar uma categorização funcional correspondente a 65,45% dessas ESTs, muitas das quais codificantes para proteínas envolvidas em vias metabólicas comuns. As sequências mais relevantes corresponderam a elementos da família das elicinas (uns já conhecidos, outros revelados neste estudo) e a enzimas envolvidas no metabolismo dos lípidos. Vários genes potencialmente envolvidos na patogenicidade também foram identificados.

Uma das estratégias mais usadas para procurar genes especificamente expressos numa dada situação é a hibridação subtractiva supressiva (SSH, *Supression Subtractive Hybridization*) (Diatchenko *et al.*, 1996). Este método foi usado para identificar os genes expressos por *P. infestans* durante a interação com a batateira (Beyer, *et al.*, 2002) e durante o desenvolvimento sexual *in vitro* (Fabritius *et al.*, 2002). A SSH foi usada, também, para

identificar genes preferencialmente expressos em quistos germinados com desenvolvimento de apressórios (Greenville-Brigs *et al.*, 2005).

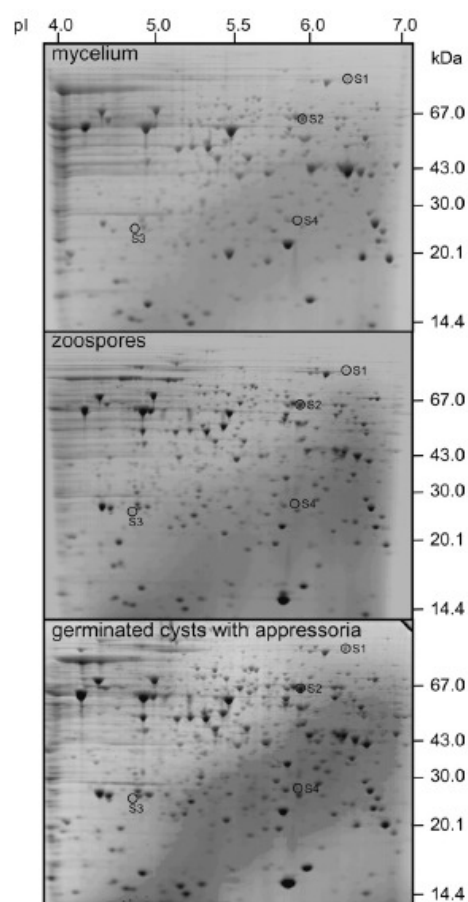
*Macroarrays* foram desenvolvidos para averiguar os genes expressos em esporângios e não em hifas vegetativas de *P. infestans* (Kim *et al.*, 2003) e genes expressos durante a zoosporogênese e não em esporângios (Tani *et al.*, 2004).

Foram preparados bancos de cDNA de zoósporos (Skalamera *et al.*, 2004) e de quistos germinados (Shan *et al.*, 2004) de *P. nicotianae* que foram sondados por hibridação diferencial e sequenciados para identificar os genes preferencialmente expressos nessas fases.

Foram estabelecidos perfis moleculares de cDNA em *P. infestans*, pela técnica de cDNA-AFLP (*Complementary DNA-Amplified Fragment Length Polymorphism*; Bachem *et al.*, 1996; Money *et al.*, 1996), antes e durante as primeiras fases de infecção em batateira (Avrova *et al.*, 2003), em micélio e esporângios de uma estirpe transformada com silenciamento de uma proteína envolvida em processos de sinalização (Dong *et al.*, 2004) e na identificação de marcadores de avirulência (Guo *et al.*, 2006).

A análise proteômica também já foi usada para caracterizar perfis típicos em *Phytophthora*. Foram estudadas as proteínas das membranas de zoósporos e quistos em *P. nicotianae* (Mitchell *et al.*, 2002), as fases do desenvolvimento assexuado (micélio, esporângios, zoósporos, quistos e quistos germinados) em *P. palmivora* (Shepard *et al.*, 2003) e *P. infestans* (Greenville-Brigs *et al.*, 2005) e quistos, quistos germinados e apressórios em *P. infestans* (Greenville-Brigs *et al.*, 2005; Ebstrup *et al.*, 2005).

**Figura III.2:** Géis de electroforese a duas dimensões, contendo proteínas de micélio, zoósporos e quistos germinados com apressórios. As bandas consideradas mais relevantes foram excisadas e analisadas. (Figura adaptada de Greenville-Brigs *et al.*, 2005).



### III.1.2. Quantificação da expressão genética em *Phytophthora* spp

A obtenção de perfis genéticos ou estudos individuais de genes baseados, simplesmente, na presença ou ausência desses genes em determinadas condições, nem sempre fornecem a totalidade da informação necessária para ajudar a compreender a função desses genes: o seu nível de expressão também possui um significado biológico importante. Muitas vezes, a obtenção de perfis de expressão completos com o objectivo de revelar toda a variedade de genes presentes implica passos de enriquecimento para que as sequências menos abundantes não passem despercebidas, viciando qualquer tentativa de quantificação. O inverso também se aplica, ou seja, perfis genéticos quantitativos têm muitas vezes tendência a subestimar a variedade genética real.

Várias metodologias, entre as diversas existentes, foram já usadas para a quantificação da expressão genética em *Phytophthora*. Tradicionalmente, a mais utilizada foi a fixação de RNA, ou de cDNA dele directamente derivado, a membranas que são depois exploradas por hibridação com sondas marcadas específicas do gene cujo nível de expressão se pretende avaliar (*northern blotting*). Posteriormente, a intensidade das “bandas” de hibridação presentes nas membranas é quantificada visualmente ou, de uma forma mais rigorosa, com o auxílio de equipamento adequado (Beyer *et al.*, 2002; Fabritius *et al.*, 2002; Latijnhouwers e Govers, 2003; Fong e Judelson, 2003; Kim *et al.*, 2003; Tani *et al.*, 2004; Shan *et al.*, 2004; Skalamera *et al.*, 2004).

A aplicação de *microarrays* permitiu efectuar a avaliação simultânea do nível de expressão de milhares de genes de *P. sojae* em tecidos infectados de soja (Moy *et al.*, 2004).

De maneira aproximada, a contagem de transcritos redundantes dentro das livrarias de ESTs também pode fornecer dados sugestivos acerca da expressão relativa dos genes (Randall *et al.*, 2005; Qutob *et al.*, 2000).

Recentemente, foram desenvolvidas as técnicas de PCR em tempo real (Higuchi *et al.*, 1993; Holland *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1993), cuja modalidade adaptada para a RT-PCR (Wang e Brown, 1999) forneceu um meio importante para realizar a quantificação da expressão genética e já foi aplicada em *Phytophthora* (Avrova *et al.*, 2003; Greenville-Brigs *et al.*, 2005).



## III.2. MATERIAL E MÉTODOS

### III.2.1. Quantificação da expressão dos genes das elicinas:

#### RT-PCR em tempo real

Pretendeu-se estudar a expressão do gene *βcin*, bem como dos genes codificantes para as outras elicinas do *cluster* de *P. cinnamomi*. A quantificação da expressão dos genes da elicinas foi realizada por RT-PCR em tempo real com sondas *Taqman*<sup>18</sup>, em amostras dos isolamentos selvagens PA45 e PA37 e dos respectivos transformantes, FATSS (resistente ao antibiótico higromicina e com inibição da síntese da β-cinamomina) e 13C (resistente à higromicina), cultivados em meio V<sub>8</sub>C ou *MSE*,<sup>19</sup> durante 3 ou 15 dias. Também foi analisada a expressão dos genes das elicinas *in planta*, em amostras de raízes de *Q. suber* infectadas directamente com micélio, 12, 24 e 36 h após a infecção<sup>20</sup>.

A comparação de níveis de expressão genética entre amostras diferentes impõe que o conteúdo de RNA presente nas amostras seja normalizado. Para tal foi necessário obter uma sonda baseada num gene expresso constitutivamente, pois os níveis de expressão deste tipo de genes estão directamente relacionados com a quantidade de biomassa presente e não com as condições a que o organismo está sujeito. Neste caso, foi seleccionado o gene da actina, já usado anteriormente em normalizações de amostras de RNA de *Phytophthora* (Kamoun *et al.*, 1997b; Avrova *et al.*, 2003).

A quantificação da expressão genética foi avaliada de forma absoluta; esta a abordagem absoluta implica a obtenção de curvas padrão para amostras em que é conhecido o número de cópias presente do gene em estudo. Para construir estas curvas, os genes das elicinas do *cluster* foram clonados individualmente em vectores plasmídicos.

#### III.2.1.1. Processamento do RNA

Em todos os procedimentos que envolviam a obtenção e manuseamento de RNA foram tomadas precauções para evitar contaminações com RNAses e consequente degradação do RNA. Assim, foram sempre usadas luvas de látex durante o manuseamento de reagentes e amostras; o material plástico descartável (pontas de pipetas, tubos *Eppendorf*, etc.) era

<sup>18</sup> Um resumo esquemático das bases do método PCR em tempo real está apresentado no Anexo 5.

<sup>19</sup> Meios descritos na secção I.2.2., Cultura e manutenção dos isolados de *Phytophthora cinnamomi*.

<sup>20</sup> Método de infecção descrito na secção II.2.1.2.1., Ensaio de infecção directa.

certificado como livre de RNAses; o material de vidro foi tratado por esterilização a seco a 140°C durante 4 horas; todas as soluções foram preparadas com água livre de RNAses obtida por tratamento com dietilpirocarbonato (DEPC<sup>21</sup>); os tanques de electroforese foram lavados com uma solução de 0,5% (p/v) SDS e enxaguados com água livre de RNAses. As amostras de RNA foram conservadas a -80°C e permaneceram em gelo durante a pipetagem de alíquotas para posterior processamento.

### **III.2.1.1.1. Extração e Purificação de RNA**

As amostras para extração foram de dois tipos: micélio cultivado *in vitro* ou material vegetal congelado (raízes de *Q. suber* infectadas e não infectadas). O micélio, cultivado em meio líquido, foi recolhido e lavado cuidadosamente com água destilada esterilizada, para retirar todos os vestígios de meio. O excesso de humidade foi retirado por contacto com papel absorvente. O material vegetal foi processado sem permitir o seu descongelamento.

A extração e purificação foram efectuadas com o kit RNeasy<sup>TM</sup> Mini (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. A amostra foi colocada num almofariz e reduzida a pó fino exercendo pressão contra as paredes do recipiente com um pilão, após a adição de pequenas quantidades de azoto líquido. A massa macerada e congelada foi pesada e dividida em amostras de 100 mg e transferida para tubos *Eppendorf* de 1,5 ml com o auxílio de uma espátula gelada. Foram depois adicionados 450 µl de tampão *RLC*<sup>22</sup>. Esta mistura foi agitada vigorosamente no vórtex, de modo a desfazer os aglomerados. O lisado, bastante viscoso, foi aplicado na coluna *QIAshredder*<sup>22</sup>. A recolha do eluente foi feita num tubo *Eppendorf* de 2 ml, através de uma centrifugação a 16000 g, durante 2 min. O sobrenadante recolhido foi transferido para um novo tubo, onde lhe foi adicionado metade do seu volume em etanol a 100%. (v/v). A mistura foi homogeneizada por pipetagem e 650 µl desta mistura (incluindo precipitados) foram aplicados numa coluna *RNeasy*<sup>22</sup>. Esta foi sujeita a uma centrifugação durante 15 s a 8000 g e o eluente eliminado. O passo anterior foi repetido para o restante volume da amostra. A coluna *RNeasy* foi colocada num novo tubo, lavada com 700 µl de tampão *RWI*<sup>22</sup> e centrifugada a 8000 g, durante 15 s. O eluente foi eliminado, a coluna *RNeasy* colocada num novo tubo, 500 µl de tampão *RPE*<sup>22</sup> foram adicionados e a coluna

<sup>21</sup> Tratamento da água com DEPC: a 1 litro de água destilada foi adicionado 1 ml de DEPC; a mistura foi agitada vigorosamente, aquecida durante 12 h a 37°C e autoclavada 15 min a 121°C.

<sup>22</sup> Os tampões e colunas indicados fazem parte do *RNeasy<sup>TM</sup> Mini Kit* (Qiagen) e a sua composição não é descrita pelo fabricante.

centrifugada a 8000 g, durante 15 s. O eluente foi eliminado e, novamente, 500 µl de tampão *RPE* foram adicionados e a coluna centrifugada a 8000 g, durante 2 min para secar a membrana da coluna. A coluna foi transferida para um novo tubo *Eppendorf*. 50 µl de água livre de RNAses foram directamente pipetados para a membrana da coluna que foi em seguida centrifugada a 8000 g durante 1 min. A lavagem da coluna foi repetida para recolher o restante RNA.

### ***III.2.1.1.2. Avaliação da integridade do RNA***

A integridade e distribuição de tamanho do RNA total extraído foram analisadas por electroforese em gel de agarose-formaldeído (AF) (1,2% p/v) desnaturante. Num *Erlenmeyer*, foram adicionados 1,2 g de agarose em pó a 10 ml de tampão AF 10 X concentrado (MOPS 200 mM; acetato de sódio 50 mM; EDTA 10 mM pH 7,0); foi adicionada água livre de RNAses até serem atingidos 100 ml de volume. A mistura foi aquecida no forno de microondas até à dissolução da agarose. A solução foi arrefecida até, aproximadamente, 65°C e foram adicionados 1,8 ml de uma solução de formaldeído (37% v/v) e 1 µl de uma solução *stock* de brometo de etídio (10 mg/ml). A mistura foi agitada e vertida no molde, previamente selado e onde foi montado um pente (molde dos poços). O gel tinha uma espessura de aproximadamente 5 mm. Após a solidificação do gel, o pente foi retirado e o gel colocado no tanque de electroforese. Foi adicionado um volume de tampão de electroforese suficiente para cobrir o gel. O tampão foi preparado misturando 100 ml de tampão AF 10 X concentrado, 20 ml de uma solução de formaldeído (37% v/v) e 880 ml de água livre de RNAses. O gel foi equilibrado em tampão de electroforese, pelo menos durante 30 min.

Quatro volumes de amostra de RNA foram misturados com 1 volume de tampão de amostra 5 X concentrado. Seguiu-se um aquecimento a 65°C durante 5 min e arrefecimento em gelo. O tampão de amostra foi preparado misturando 16 µl de solução aquosa saturada de azul de bromofenol, 80 µl de solução EDTA 500 mM pH 8,0, 720 µl de uma solução de formaldeído (37% v/v), 2 ml de glicerol, 3084 µl de formamida, 4 ml de tampão AF 10 X concentrado e água livre de RNAses até perfazer 10 ml de volume total. Finalmente, as amostras foram colocadas, cuidadosamente, dentro dos poços, de modo a evitar misturas. Para avaliar o comprimento dos fragmentos separados no gel, foi utilizado um marcador de massa molecular de 123 pb, com uma concentração de 0,1 µg/µl (Invitrogen, 1 µg/µl).

As condições de corrida electroforética foram 100 mA durante 40 min.

O gel foi visualizado por acção de radiação ultravioleta num transiluminador. Sempre que a situação o justificava, o gel foi fotografado.

#### **III.2.1.1.4. Quantificação do RNA**

A quantificação do RNA extraído foi realizada por leitura de absorvência a 260 nm de uma alíquota do produto de extracção num espectrofotómetro *MBA 2000* (Perkin Elmer).

#### **III.2.1.1.3. Tratamento com DNase**

A digestão do RNA total com enzima DNase foi efectuada num volume total de 20 µl de uma solução aquosa contendo 20 µg de RNA, 1 µl de DNase I (10 U/µl, Roche) e 2 µl de tampão de enzima (Tris-HCl 400 mM pH 8,0 ; MgSO<sub>4</sub> 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM). A reacção foi efectuada a 37°C durante 1 h. Foi adicionado 1 µl de solução EDTA 20 mM à mistura que foi, em seguida, aquecida a 65°C durante 10 min.

#### **III.2.1.2. Síntese de cDNA**

A reacção de transcrição reversa (RT, *Reverse Transcription*) foi efectuada por dois protocolos ligeiramente distintos, consoante o destino a dar ao cDNA resultante. Em ambos foi usado o *kit* de transcrição *SuperScript™ II RNase H* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante.

##### **III.2.1.2.1. Protocolo RT 1**

A síntese da primeira cadeia de cDNA foi preparada num volume total de 12 µl de uma solução contendo 1 µl de Oligo (dT)<sub>12-18</sub> (500 µl/ml), 5 µg de RNA total e 1 µl de dNTP Mix 10 mM (dATP 10 mM, dGTP 10 mM, dCTP 10 mM e dTTP 10 mM). Esta mistura foi aquecida a 65°C durante 5 min e rapidamente arrefecida em gelo. Em seguida foi brevemente centrifugada e foram-lhe adicionados 4 µl de tampão de enzima 5X concentrado (Tris-HCl 250 mM pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 2 µl de DTT 0,1 M e 1 µl de *RNaseOUT* (40 U/µl). Esta mistura foi aquecida a 42°C durante 2 min e foi-lhe adicionado 1 µl de transcriptase reversa *SuperScript™ II RNase H* (Invitrogen). A reacção foi mantida a 42°C durante 50 min e, em seguida, foi parada por aquecimento a 70°C durante 15 min. O RNA complementar ao cDNA foi removido por tratamento da mistura resultante da transcrição

reversa com 2 µl de *RNAse H* (1 U/µl), a 37°C, durante 20 min. O cDNA foi conservado a –20°C.

### **III.2.1.2.2. Protocolo RT 2**

A síntese da primeira cadeia de cDNA foi preparada num volume total de 22 µl de uma solução aquosa contendo 4 µl de *Random Hexanucleotides* 10 X (Roche) e 4 µg de RNA total. Esta mistura foi aquecida a 65°C durante 5 min e, rapidamente, arrefecida em gelo. Em seguida, foi brevemente centrifugada e foram-lhe adicionados 2 µl de dNTP Mix 10 mM (dATP 10 mM, dGTP 10 mM, dCTP 10 mM e dTTP 10 mM) (Invitrogen), 2 µl de enzima transcriptase reversa *SuperScript™ II RNAse H* (Invitrogen), 8 µl de tampão de enzima 5X concentrado (Tris-HCl 250 mM pH 8,3 ; KCl 375 mM; MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 4 µl de DTT 0,1 M e 2 µl de *RNAseOUT* (40 U/µl). A reacção desenrolou-se por um período de 60 min a 42°C. A inactivação da reacção foi realizada adicionando 1,5 µl de uma solução NaOH (1 N) e aquecendo a 70°C durante 15 min. Finalmente, foi adicionado 1,5 µl de solução de ácido acético (1 N) e o cDNA foi conservado a –20°C.

### **III.2.1.3. Amplificação de um fragmento do gene da actina**

O fragmento a ser amplificado foi definido de forma a estar localizado na CDS de um gene da actina de *P. cinnamomi*; como a(s) sequências do(s) gene(s) da actina são desconhecidas em *P. cinnamomi*, os *primers* foram escolhidos numa zona de homologia entre as CDS de genes codificantes para a actina conhecidos noutras espécies de *Phytophthora*, nomeadamente *P. infestans* (Unkles *et al.*, 1991) e *P. megasperma* (Dudler, 1990) (ver Anexo 6).

Localização do *primer* directo: 363 pb – 382 pb no gene *actA* de *P. infestans*.

Sequência: (5' → 3') (20 nt) GCCGGTGACGACGCCCCGCG

Localização do *primer* reverso: 869 pb – 889 pb no gene *actA* de *P. infestans*.

Sequência: (3' → 5') (21 nt) CTTCTAGGACTGCCTCGCACC

Temperatura de hibridação na *PCR*: 74°C. Tamanho do fragmento esperado: 527 pb.

A amplificação<sup>23</sup> do fragmento do gene da actina foi realizada em amostras de cDNA transcrito pelo protocolo RT 1, a partir de RNA extraído de isolamentos cultivados em meio V<sub>8</sub>C durante 5 dias.

### III.2.1.4. Amplificação dos genes do *cluster* de elicinas

O objectivo principal foi a amplificação de fragmentos que contivessem toda a CDS de cada uma das elicinas. Dado o grande grau de homologia entre cada um dos genes das elicinas na zona codificante, houve dificuldade em definir *primers* específicos nessa zona. Optou-se, pois, por aproveitar as diferenças existentes nas regiões UTR dos genes, impondo, no entanto, que os fragmentos amplificados estivessem contidos na sequência que se considerou ser transcrita. Assim, os *primers* directos definidos na 5' UTR foram escolhidos de forma a estarem localizados a jusante duma sequência consenso que foi encontrada noutros genes de oomicetas (GCTCATYYNCAWTTT, onde N = A ou C ou T ou G, W = A ou T e Y = C ou T) que, também, existe nos genes das elicinas de *P. cinnamomi*, e que flanqueia o local de início da transcrição (TSP, *Transcription Start Point*) nesses genes. Os *primers* reversos definidos na 3' UTR foram seleccionados de modo a estarem situados a montante da sequência consenso correspondente ao sinal de poliadenilação (ATGAA). Os *primers* foram escolhidos a partir da sequência do *cluster* de elicinas de *P. cinnamomi* publicado no *GenBank* (Número de Acesso: AJ000071) e as suas características estão resumidas na Tabela III.1.

**Tabela III.1:** Informação sobre os fragmentos de elicinas a amplificar e respectivos *primers*.

Designação e tamanho esperado do fragmento	Localização no <i>Cluster</i> de Elicinas de <i>P.cinnamomi</i>	<i>Primer</i> Directo Designação e Localização * Sequência (5' → 3')	<i>Primer</i> Reverso Designação e Localização * Sequência (3' → 5')	Temperatura de hibridação na PCR
Frag β Cin 490 nt	289 pb - 778 pb	6 Sense (289 pb - 309 pb) ACATCCAACCTCGCCACCTCC	MH2 (759 pb - 778 pb) AATGACTCCTACCTCCTCGT	66°C
Frag HAE α Cin 564 nt	1629 pb - 2192 pb	13 Sense (1629 pb - 1650 pb) CACCACTCAAGCCCCACTTCCG	MH4 (2173 pb - 2192 pb) CGAACCAATACTCCCGCTCG	74°C
Frag α Cin 537 nt	4065 pb - 4601 pb	16 Sense (4065 pb - 4085 pb) GCACCCTTCTCCCCACCACC	MH6 (4582 pb - 4601 pb) GCGAGCTCGCAAACATTTTCG	65°C
Frag HAE β Cin 523 nt	5089 pb - 5611 pb	17 Sense (5089 pb - 5110 pb) GCACAAACCTCTCACCCACCC	MH8 (5592 pb - 5611 pb) GTAACGTTTTCTGAATGGGC	65°C

(\*) A localização refere-se à posição dos *primers* no *cluster* de elicinas de *P. cinnamomi*.

<sup>23</sup> Reacções de amplificação descritas na secção I.2.8.2.

A amplificação dos genes das elicinas foi realizada em amostras de DNA genómico<sup>24</sup> extraído do isolamento PA45.

### III.2.1.5. Clonagem de fragmentos de DNA

Os produtos de amplificação dos genes das elicinas e da actina foram clonados com o Sistema *TOPO TA Cloning* (Invitrogen), segundo instruções do fabricante.

Num tubo *Eppendorf* esterilizado foram colocados 2 µl de produto PCR fresco, 1 µl de solução salina (NaCl 1,2 M; MgCl<sub>2</sub> 0,06 M), 2 µl de água destilada esterilizada e 1 µl de vector *PCR II-TOPO*. A mistura de reacção de clonagem foi homogeneizada suavemente, mantida durante 5 min à temperatura ambiente ( $\approx 20^{\circ}\text{C}$ ) e, seguidamente colocada em gelo. Para a transformação, 2 µl da reacção de clonagem foram adicionados a um tubo de bactérias *TOPO 10 - E. coli One Shot*<sup>®</sup> quimicamente competentes, misturando suavemente e sem pipetar. As bactérias foram, em seguida, incubadas em gelo durante 15 min e submetidas a um choque térmico, a 42°C, durante 30 s, sem agitação. O tubo foi transferido para gelo e foram adicionados 250 µl de meio SOC [triptona 2% (p/v); extracto de levedura 0,5% (p/v); NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; MgSO<sub>4</sub> 10 mM; glucose 20 mM] à temperatura ambiente ( $\approx 20^{\circ}\text{C}$ ). Em seguida, o tubo foi agitado (200 rpm) em posição horizontal durante 1 h, a 37°C. Para a detecção de clones de bactérias transformadas, foram retirados 50 µl e 100 µl da mistura agitada e plaqueadas duas caixas de *Petri* com meio LB, ao qual foi adicionado ampicilina (50 µg/ml) e 40 µl de uma solução X-Gal (400 mg de X-Gal em 10 ml de dimetilformamida). As placas foram incubadas invertidas, durante 18 h, a 37°C. Após esse período, as placas foram examinadas para detectar a presença de colónias brancas, indicadoras do sucesso da transformação com vector com inserto.

#### III.2.1.4.1. Análise dos clones de bactérias seleccionados

Para confirmar a presença dos insertos nas colónias brancas seleccionadas, foram repicadas 5 colónias para tubos *Greinner* com 5 ml de meio LB líquido contendo ampicilina (50 µg/ml). Seguiu-se uma incubação durante 14 h, a 37°C, sob vigorosa agitação ( $\approx 300$  rpm). Em seguida foi efectuada uma preparação rápida para isolamento de plasmídeos.

<sup>24</sup> Extração de DNA genómico descrita na secção I.2.8.1.

O DNA plasmídico foi clivado com *EcoRI*, analisado por electroforese em gel de agarose (1% p/v) e os clones seleccionados foram preservados em glicerol.

#### Preparação rápida de plasmídeos

Num tubo *Eppendorf*, 2 ml de cultura bacteriana foram centrifugados a 16000 g durante 30 s para precipitar as células. O sobrenadante foi eliminado, conservando 50 a 100 µl de meio com o *pellet* celular. As células foram ressuspensas por agitação no vórtex e em seguida, foram-lhes adicionados 300 µl de solução TENS [Tris 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM; NaOH 0,1 N; SDS 0,5% (p/v)]. A mistura foi agitada no vórtex durante 5 s. À solução viscosa foram adicionadas 150 µl de acetato de sódio 3,0 M, pH 5,2. A mistura foi novamente agitada no vórtex durante 5 s e em seguida centrifugada a 16000 g durante 15 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde lhe foram adicionados 900 µl de etanol (100% v/v) previamente arrefecido a -20°C. A solução foi centrifugada a 16000g durante 5 min, o sobrenadante foi eliminado e o *pellet* lavado duas vezes com 1 ml de etanol (70% v/v). Depois de seco sob vácuo, o *pellet* foi ressuspensado em 20 µl de água destilada esterilizada. Foi adicionado 1 µl de RNase (20 µg/µl), seguindo-se um período de reacção de 30 min a 37°C.

#### Reacção de clivagem enzimática

As moléculas de plasmídeo, num volume de 5 µl de solução, foram digeridos com 1 µl de *EcoRI* (10 U/µl) na presença de 1 µl de tampão de enzima (10 x concentrado) e 3 µl de água destilada esterilizada. A digestão foi efectuada durante 90 min a 37°C.

#### Preparação de gliceróis

As células bacterianas de *E.coli*, contendo as construções de interesse, foram conservadas pela inoculação de 1 ml de cultura (preparada em meio LB, durante 14 h a 37°C) em 1 ml de glicerol puro esterilizado. A mistura foi bem agitada e mantida a -80°C.

### **III.2.1.6. Sequenciação dos fragmentos de DNA clonados**

A sequenciação foi efectuada num sequenciador automático ABI-PE 377 (Perkin-Elmer) com aplicação do kit de sequenciação *ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Perkin Elmer/Applied Biosystems).

As reacções de sequenciação foram efectuadas em tubos *Eppendorf* de 500 µl, num volume final de 20 µl numa solução contendo:

- 8 µl de Solução do Terminador [A-DyeDeoxy 1,58 µM; 94, T-DyeDeoxy 74 µM; G-DyeDeoxy 0,42 µM; C-DyeDeoxy 47,37 µM; dITP 78,95 µM; dATP 15,75 µM; dCTP 15,79 µM; dTTP 15,79 µM; Tris-HCl 168,42 mM, pH 9,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4,21 mM; MgCl<sub>2</sub> 42,10 mM; 0,42 U/µl AmpliTaq Polimerase]

- 500 ng de DNA plasmídico

- 3,2 pmol de *primer*: M13 directo: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' ou  
M13 reverso: 3'-CAGTATCGACAAAGGAC-5'

As condições da reacção de sequenciação estão indicadas na Tabela III.2.

**Tabela III.2:** Esquema de ciclos e temperaturas da reacção de amplificação para sequenciação.

N.º de ciclos	Função	Temperatura (°C)	Tempo
25	Desnaturação do DNA	96	30 s
	Hibridação dos <i>primers</i>	50	15 s
	Polimerização das cadeias de DNA	60	4 min
1	Conservação	4	∞

Os produtos da reacção de sequenciação foram purificados, seguindo o procedimento abaixo descrito. Os 20 µl da mistura de reacção de sequenciação foram transferidos para um novo tubo *Eppendorf* contendo 2 µl de acetato de sódio 3,0 M e 50 µl de etanol (95% v/v). A solução foi agitada no vórtex e colocada a 0°C durante 10 min. A solução foi, depois, centrifugada a 16000 g durante 20 min. O etanol foi cuidadosamente aspirado sob vácuo e o *pellet* foi lavado com 250 µl de etanol (70% v/v). Seguiu-se nova centrifugação a 16000 g durante 20 min, aspiração sob vácuo do sobrenadante e por fim secagem do *pellet* sob vácuo.

Aos *pellets* preparados na etapa anterior foram adicionados 4 µl de uma mistura constituída por formamida desionizada e uma solução de EDTA 50 mM pH 8,0 na proporção de 1:4. As amostras foram centrifugadas um breve instante, aquecidas a 90°C durante 2 min e aplicadas no sequenciador, de acordo com as instruções do fabricante.

### III.2.1.7. Análise das sequências nucleotídicas dos fragmentos clonados

As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas com auxílio do programa *Vector NTI 8*<sup>®</sup> (InforMax<sup>®</sup> Inc, USA).

### III.2.1.8. PCR Quantitativa em Tempo Real

As amplificações foram efectuadas individualmente para cada gene em placas ópticas de 96 poços, num volume final de 25 µl numa solução aquosa contendo 12,5 µl de *qPCR*<sup>™</sup> *Master Mix* (EuroGentec) (dNTPs, *Hot GoldStar DNA polimerase*, MgCl<sub>2</sub>, Uracil-N-Glicosilase, estabilizadores, referência passiva), 300 nM de cada *primer* específico, 200 nM de sonda *Taqman* e 50 ng de cDNA ou 500 a 0,005 pg de DNA plasmídico (curvas padrão). As condições da reacção estão indicadas na Tabela III.3.

**Tabela III.3:** Esquema de ciclos e temperaturas usados na PCR quantitativa em tempo real.

N.º de ciclos	Função	Temperatura (°C)	Tempo
1	Passo inicial	50	2 min
1	Activação da enzima <i>Hot GoldStar</i>	95	10 min
50	Desnaturação do DNA Hibridação dos <i>primers</i> e Polimerização das cadeias de DNA	95	15 s
		60	1 min
1	Conservação	50	∞

Os *primers* específicos e as sondas *Taqman* foram seleccionados por software adequado para o efeito, nomeadamente pelo programa *Primer Express*<sup>®</sup> (Applied Biosystems) e estão indicados nas tabelas III.4 e III.5.

A extremidade 5' das sondas foi marcada com FAM (6-carboxifluoresceína) e a extremidade 3' foi marcada com TAMRA (tetra-metilcarboxirodamina). Todos os oligonucleóticos foram sintetizados pela Eurogentec.

O controlo negativo das reacções foi constituído por 10 µl de água ultrapura (Milli-Q).

As reacções de PCR Quantitativa foram efectuadas pelo equipamento *iCycler iQ Detection System* (BIORAD).

Nas reacções que visavam a quantificação material vegetal infectado, às amostras das curvas padrão foram adicionados 50 ng de cDNA obtido a partir de raízes de *Quercus suber* não infectadas.

**Tabela III.4:** Informação sobre *primers*, sonda e fragmento gerado para o gene da actina na reacção de PCR quantitativa em tempo real.

Designação e Tamanho do fragmento	<i>Primer Directo</i> Designação e Sequência (5' → 3')	<i>Primer Reverso</i> Designação e Sequência (3' → 5')
	Sonda <i>Taqman</i> Designação e Sequência (5' → 3')	
Frag Actina 65 nt	ActineFor CGTGGTGTGCTTACGCTGAA	ActineRev TGGTTGACCCTGCTGTACCT
	ActineProbe CCCCATCGAGCACGGCATGC	

**Tabela III.5:** Informação sobre *primers*, sondas e fragmentos gerados para os genes das elicinas na reacção de PCR quantitativa em tempo real.

Designação do fragmento Tamanho do fragmento amplificado Localização no cluster de elicinas de <i>P. cinnamomi</i>	<i>Primer Directo</i> Designação e Localização Sequência (5' → 3')	<i>Primer Reverso</i> Designação e Localização Sequência (3' → 5')
	Sonda <i>Taqman</i> Designação e Localização Sequência (5' → 3')	
Frag β Q 67 nt 398 pb - 464 pb	BetaFor 398pb – 414 pb CAGACCGCCGCGTACAA	BetaRev 444 pb – 464 pb GGAAGAGCGTCACGAGGTTCC
	BetaProbe 416 pb – 442 pb ACGCTCGTGAGTATCCTGTCCGAGTCG	
Frag HAE-α Q 75 nt 1955 pb - 2029 pb	HaeAlfaFor 1955 pb – 1976 pb GTTTGGTGATCAACGTGTACGA	HaeAlfaRev 2014 pb – 2029 pb AGCAGGAGCCGCAGCA
	HaeAlfaProbe 2003 pb - 1980 pb CACGTCGACACAAAGTCGTTTCGAG	
Frag α Q 67 nt 4282 pb - 4348 pb	AlfaFor 4282 pb – 4300 pb CGGCGCAGTACAAGCTCAT	AlfaRev 4327 pb – 4348 pb ACTAGTTCTTCTAGCACTGCGA
	AlfaProbe 4306 pb – 4325 pb CGTCGACGGCGTGCAACACC	
Frag HAE-β Q 68 nt 5305 pb - 5372 pb	HaeBetaFor 5305 pb – 5325 pb GGCCCAGTACAAGCTCATGTG	HaeBetaRev 5350 pb – 5372 pb CTAGTGA CTCTAGCAGAGCAACT
	HaeBetaProbe 5330 pb – 5348 pb TCGACGGCGTGCAACACCA	

A quantificação da expressão dos genes das elicinas foi realizada pelo método absoluto, com auxílio de curvas padrão geradas para cada gene em estudo e após normalização das amostras dada pelo nível de expressão do gene da actina.

De acordo com Edwards e Saunders, (2001) e Pfaffl *et al.* (2002), as curvas padrão foram geradas a partir da amplificação de diluições sucessivas dos plasmídeos usados na clonagem dos genes das elicinas e do fragmento do gene da actina e cuja concentração molecular era conhecida. Para obter essas diluições, os plasmídeos foram linearizados com um corte único pela enzima *NotI* (New England Biolabs)<sup>25</sup> e quantificados por cinco medições ópticas<sup>26</sup> em várias diluições. A concentração molecular de cada uma das soluções *stock* dos plasmídeos foi calculada usando a massa molecular do plasmídeo de cadeia simples, estimada com o auxílio do programa *Vector NTI 8*<sup>®</sup> (InforMax<sup>®</sup> Inc, USA). A partir das soluções-mãe de concentração molecular conhecida foram preparadas diluições precisas desde 10<sup>9</sup> moléculas/ $\mu$ l até 10 moléculas/ $\mu$ l.

### III.2.2. Obtenção de perfis de RNA mensageiro: cDNA-AFLP

Pretendeu-se estudar alterações de expressão genética associadas à sub-expressão/silenciamento do gene  *$\beta$ cin*. A abordagem seguida consistiu em obter perfis de RNA mensageiro com recurso à técnica de cDNA-AFLP<sup>27</sup>, em amostras dos isolamentos selvagens PA45 e PA37 e dos respectivos transformantes, FATSS (resistente ao antibiótico higromicina e com construção anti-sentido relativa à  $\beta$ -cinamomina) e 13C (resistente à higromicina), cultivados em meio V<sub>8</sub>C ou MSE,<sup>28</sup> durante 3 ou 15 dias.

#### III.2.2.1. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com o *cDNA Synthesis System* (Roche), com introdução de algumas modificações ao protocolo original que acompanhava o produto. A primeira cadeia de cDNA foi iniciada com o *primer* 5' AGT GAA TTC T<sub>12</sub>V 3' (V= A;C;G), composto por uma mistura equimolar dos três oligonucleótidos (Money *et al.*, 1996).

<sup>25</sup> De acordo com as condições descritas na secção I.2.6.4, substituindo a enzima *HindIII* pela *NotI*, bem como o respectivo tampão.

<sup>26</sup> Quantificação descrita na secção I.2.6.3.

<sup>27</sup> Um resumo esquemático das bases da técnica de cDNA-AFLP está presente no Anexo 9.

<sup>28</sup> Meios descritos na secção I.2.2., Cultura e manutenção dos isolamentos de *Phytophthora cinnamomi*.

O *primer* degenerado (400 pmol) foi adicionado a 4 µg de RNA total e a mistura foi mantida a 70°C durante 10 min. Após este período de hibridação, a mistura foi imediatamente colocada em gelo e foram-lhe adicionados 2 µl de AMV (transcriptase reversa; 25 U/µl), 4 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de inibidor de RNase (25 U/µl), 4 µl de dNTPs (mistura de desoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 mM cada), 8 µl de RT-*buffer* (tampão de reacção 5x concentrado que acompanha a transcriptase reversa) e água até perfazer 42 µl. A reacção decorreu a 42°C, durante 60 min.

Para sintetizar a segunda cadeia de cDNA adicionaram-se 6,5 µl de 2<sup>nd</sup> *strand enzyme blend* (mistura de DNA polimerase I, ligase de *E. coli*, RNase H), 1,5 µl de dNTPs (10 mM), 30 µl de 2<sup>nd</sup> *strand buffer* (tampão 5x concentrado que acompanha a mistura de enzimas) e 72 µl de água à mistura de reacção da síntese da primeira cadeia. A mistura foi mantida a 16°C durante 2 h. Por último, foram adicionados 20 µl de T4 DNA polimerase (1 U/µl) com arrefecimento a 16°C durante 5 min. A reacção foi terminada pela adição de 17 µl de EDTA (0,2 M; pH 8,0). O RNA residual foi digerido pela adição de 1,5 µl de RNase I (10 U/µl) a 37°C durante 30 min. Seguiu-se a adição de 5 µl de proteinase K (0,6 U/µl) e nova reacção a 37°C durante 30 min.

O cDNA sintetizado foi purificado com o *kit Qiaquick PCR purification* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Neste processo, a mistura final da síntese do cDNA foi aplicada numa coluna, onde só ficou retido o DNA bicatenário: os restantes componentes foram eliminados por lavagens da coluna. No final, o cDNA foi arrastado com 40 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8,5.

### III.2.2.2. Digestão do cDNA e ligação de adaptadores sintéticos

Esta fase recorreu aos componentes do *kit AFLP Core Reagente* (Invitrogen). Dezoito µl da solução de cDNA foram digeridos com 2 µl de uma mistura de duas enzimas de restrição, *EcoRI* e *MseI* (2,5 U de cada uma) na presença de 5 µl de tampão de reacção 5x concentrado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; AcMg 50 mM; AcK 250 mM). A reacção decorreu a 37°C durante 2 h, seguindo-se uma inactivação das enzimas por aquecimento a 70°C durante 15 min.

O cDNA fragmentado foi ligado a adaptadores complementares dos locais de restrição *EcoRI* e *MseI*:

Adaptadores *EcoRI*:           5' AATTGGTACGCAGTCTAC  
  CCATGCGTCAGATGCTC 5'

Adaptadores *MseI*:            5' TACTCAGGACTCAT  
  GAGTCCTGAGTAGCAG 5'

Esta reacção foi catalisada pela adição de 1 µl de T4 DNA ligase (1 U) e 24 µl de uma solução composta por adaptadores (5 pmol para o adaptador *EcoRI* e 50 pmol para o *MseI*) e ATP 0,4 mM, Tris-HCl pH 7,5, AcMg 10 mM e AcNa 50 mM. A ligação decorreu a 37°C durante 2 h.

### III.2.2.3. Reacções de pré-amplificação e amplificação

A reacção de pré-amplificação foi realizada num volume total de 50 µl com 5 µl de tampão 10x concentrado (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3; MgCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 500 mM), 0, 2 µl da enzima Taq DNA polimerase (5 U/µl; Boehringer Mannheim), 10 µl de solução de cDNA, 15 pmol de *primer EcoRI+0* (5' GACTGCGTACCAATTC 3') e 15 pmol de *primer MseI+0* (5'GATGAGTCCTGAGTAA 3').

As condições usadas na pré-amplificação estão descritas na Tabela III.6.

**Tabela III.6:** Esquema de ciclos e temperaturas na pré-amplificação.

N.º de ciclos	Função	Temperatura (°C)	Tempo
28	Desnaturação do DNA	94	30 s
	Hibridação dos <i>primers</i>	60	60 s
	Polimerização das cadeias de DNA	72	60 s

Em seguida, os produtos das pré-amplificações foram diluídos 10x e utilizaram-se 5 µl desta diluição como alvo das amplificações selectivas.

Foram realizados ensaios preliminares para verificar quais as combinações de *primers* que ofereciam uma melhor distinção de perfis nas reacções de amplificação selectiva. Dos vinte pares testados foram seleccionados oito:

I01 (*EcoRI* 5'GACTGCGTACCAATTC**ACC** 3'            *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAA**ATT** 3');  
 I02 (*EcoRI* 5'GACTGCGTACCAATTC**ACC** 3';        *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAA**ACC** 3');  
 I03 (*EcoRI* 5'GACTGCGTACCAATTC**ATG** 3'        *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAA**ACC** 3');

I09 ( <i>EcoRI</i> 5'GACTGCGTACCAATTCACC 3')	<i>MseI</i> 5' GATGAGTCCTGAGTAATGG 3';)
I10 ( <i>EcoRI</i> 5'GACTGCGTACCAATTCACC 3')	<i>MseI</i> 5' GATGAGTCCTGAGTAATTG 3';)
I17 ( <i>EcoRI</i> 5'GACTGCGTACCAATTC 3';	<i>MseI</i> 5' GATGAGTCCTGAGTAAATT 3';)
I18 ( <i>EcoRI</i> 5'GACTGCGTACCAATTC 3';	<i>MseI</i> 5' GATGAGTCCTGAGTAAACC 3';)
I19 ( <i>EcoRI</i> 5'GACTGCGTACCAATTC 3';	<i>MseI</i> 5' GATGAGTCCTGAGTAATGG 3';)
I20 ( <i>EcoRI</i> 5'GACTGCGTACCAATTCA 3';	<i>MseI</i> 5' GATGAGTCCTGAGTAATTG 3';)

Em todas as reacções de amplificação o *primer EcoRI-XXX* foi marcado radioactivamente com [ $\gamma^{33}\text{P}$ ] ATP (Redivue, Amersham Pharmacia), na extremidade 5'.

A reacção de marcação foi realizada num volume de 0,5  $\mu\text{l}$  (para cada uma das amplificações selectivas): 0,1  $\mu\text{l}$  de *primer* (50 ng/ $\mu\text{l}$ ); 0,02  $\mu\text{l}$  de enzima (10 U/ $\mu\text{l}$ ; T4 quinase polinucleotídica; T4 PNK, Invitrogen), 0,1  $\mu\text{l}$  do tampão de quinação [Forward Reaction Buffer: Tris-HCl 350 mM, pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; KCl 50 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM; Invitrogen] e 0,1  $\mu\text{l}$  [ $\gamma^{33}\text{P}$ ] ATP (2500 Ci/mmol). A reacção decorreu a 37°C, durante 40 min e em seguida, a enzima foi inactivada a 80°C, durante 15 min.

A reacção de amplificação selectiva foi realizada num volume de 20  $\mu\text{l}$  com 2  $\mu\text{l}$  de tampão 10x concentrado da enzima Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu\text{l}$ ; Boehringer Mannheim), 0,1  $\mu\text{l}$  da enzima, 25 ng do *primer EcoRI-XXX*, marcado com  $^{33}\text{P}$ , 30 ng do *primer MseI-XXX*, 0,4  $\mu\text{l}$  de dNTPs [mistura de desoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 5 mM cada, Boehringer Mannheim] e 5  $\mu\text{l}$  do produto da pré-amplificação. O programa de amplificação está descrito na Tabela III.7.

**Tabela III.7:** Esquema de ciclos e temperaturas na amplificação selectiva.

N.º de ciclos	Função	Temperatura (°C)	Tempo
13	Desnaturação do DNA	94	30 s
	Hibridação dos <i>primers</i>	65→56	30 s
	Polimerização das cadeias de DNA	72	60s
18	Desnaturação do DNA	94	30 s
	Hibridação dos <i>primers</i>	56	30 s
	Polimerização das cadeias de DNA	72	60s

### III.2.2.4. Separação dos fragmentos amplificados em gel de poliacrilamida

Aos produtos das reacções de amplificação foram adicionados 20 µl de corante de formamida (10 ml formamida, 10 mg de xileno cianol, 10 mg de azul de bromofenol, 200 µl de EDTA 0,5M) e esta mistura foi mantida a -20°C durante 24 h.

O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com o marcador de massa molecular 30-330 pb (*AFLP DNA Ladder*, Invitrogen), que foi marcado com [ $\gamma^{33}\text{P}$ ] ATP. A reacção foi efectuada num volume de 11 µl, com 5 µl de marcador 30-330 pb, 2 µl de enzima (10 U/µl; T4 quinase polinucleotídica; T4 PNK Invitrogen), 2 µl do tampão de quinação [*Exchange Reaction Buffer*: imidazole-HCl 250 mM, pH 6,4; MgCl<sub>2</sub> 60 mM; β-mercaptoetanol 5 mM; ADP 250 µM] e 0,1 µl [ $\gamma^{33}\text{P}$ ] ATP (2500 Ci/mmol). A reacção decorreu a 37°C, durante 10 min e em seguida, a enzima foi inactivada, a 80°C, durante 15 min. Por fim, à mistura de reacção foram adicionados 10 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, 50 µl do corante de formamida. O marcador foi depois guardado a -20°C.

Para a electroforese foi preparado gel desnaturante de poliacrilamida [*Gel Mix 6 Sequencing System* (acrilamida 5,7%; bisacrilamida 0,3%; ureia 7 M; Tris-borato 100 mM; EDTA 1 mM); TEMED 3 mM; pH 8,3; solução de persulfato de amónia 10%] e este foi aplicado no sistema de sequenciação da S2001 da Invitrogen/Life Technologies.

Foi preparado tampão de electroforese (TBE 0,5x: Tris-Borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3) e foi realizada uma pre-electroforese a 90 W, durante 30 min.

As amostras e o marcador foram desnaturados a 95°C durante 5 min e mantidos em gelo até à sua aplicação.

As amostras foram aplicadas em duplicado, sendo aplicados em cada poço do gel cinco µl dos produtos de amplificação.

A electroforese decorreu a 90 W e foi interrompida depois do corante azul de bromofenol (corante mais rápido) percorrer 40 cm e sair do gel ( $\approx$  70 min).

O gel de poliacrilamida foi transferido para papel *Whatman 3MM* e foi seco no secador de géis modelo 583 (BIORAD), sob vácuo.

Com um palito embebido em solução radioactiva, fizeram-se marcações no papel, em posições exteriores ao gel, necessárias para a orientação do gel com a película autorradiográfica.

O gel foi posto em contacto com a película, durante 40 h e a revelação foi efectuada manualmente, numa câmara escura. A película foi colocada 2 min em solução de revelação (Kodak LX-24 *X-ray developer*), 1 min em água e 4 min na solução de fixação (Kodak AL-4 *X-ray fixer*), com agitação suave. Por fim, a película foi lavada durante 15 min em água corrente e seca à temperatura ambiente.

### III.2.2.5. Recuperação, clonagem e sequenciação de fragmentos cDNA-AFLP

Depois da revelação da película, fizeram-se coincidir as marcas radioactivas no papel com o gel com as da película e recortaram-se as bandas correspondentes aos fragmentos amplificados diferencialmente, ou seja, aqueles que só estavam presentes num tipo, ou num grupo de amostras mas não em todas.

Os rectângulos de papel *Whatman* com o gel foram colocados em 40 µl de água e mantidos em gelo durante 10 min. Após hidratação, os tubos foram colocados a 95°C durante 15 min e transferidos logo em seguida, para gelo. A mistura foi centrifugada alguns segundos e o sobrenadante recuperado. Cinco microlitros deste sobrenadante foram utilizados como DNA alvo, em reacções de reamplificação (nas mesmas condições das reacções de amplificação, com excepção da utilização da marcação radioactiva do *primer*). Os produtos da reamplificação foram separados por electroforese em gel de agarose<sup>29</sup> a 2% (p/v).

Os fragmentos reamplificados com o tamanho esperado foram recortados do gel de agarose, purificados com o *kit Qiaquick PCR purification* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

Os fragmentos purificados foram clonados com o sistema *TOPO TA Cloning* (Invitrogen), segundo instruções do fabricante.

Os plasmídeos com os clones seleccionados foram enviados para a firma MACROGEN (Seoul, Coreia), para sequenciação.

---

<sup>29</sup> Gel de electroforese descrito na secção I.2.8.5.

### III.2.2.6. Análise das sequências nucleotídicas dos fragmentos cDNA-AFLP

As sequências nucleotídicas dos fragmentos de cDNA-AFLP clonados foram analisadas com recurso aos programas *Blast* (Altschul *et al.*, 1997) nas seguintes bases de dados<sup>30</sup>:

- GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
- JGI (Genomas de *P. sojae* e *P. ramorum*) (<http://www.jgi.doe.gov/genomes>)
- ESTs de *P. infestans* e *P. sojae* (<http://www.pfgd.org>)
- ESTs de *P. infestans*, *P. sojae* e diversos fungos fitopatogénicos (<http://cogeme.ex.ac.uk>)

---

<sup>30</sup> Última consulta: Julho de 2006

### III.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

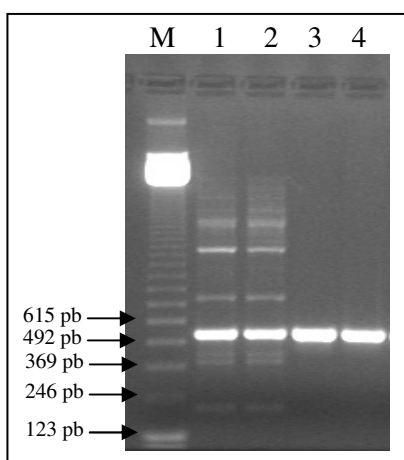
#### III.3.1. Quantificação da expressão dos genes das elicinas:

##### RT-PCR em tempo real

No Capítulo I foi descrita a análise comprovativa da inexistência/diminuição da proteína  $\beta$ -CIN nos meios de cultura do transformante FATSS. A análise dos padrões de expressão dos genes das elicinas a seguir descrita teve como objectivo clarificar se a ausência de proteína estava relacionada com a ausência do mRNA correspondente e quais os efeitos do silenciamento na expressão dos genes das outras elicinas.

##### III.3.1.1. Amplificação de um fragmento do gene da actina e dos genes do *cluster* de elicinas

A amplificação realizada a partir de cDNA obtido de dois isolamentos de *P. cinnamomi*, PA20 e PA45, com os primers escolhidos em zonas de homologia dos genes da actina de *P. infestans* e *P. megasperma*, levou à obtenção de um único fragmento com um tamanho dentro do que era esperado (aproximadamente 527 pb) (Figura III.3).



**Figura III.3:** Visualização, por electroforese em gel de agarose (1%), dos produtos de amplificação de um fragmento do gene da actina.

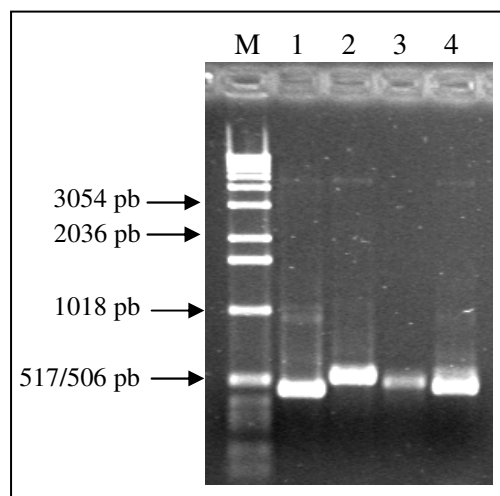
- (1) = DNA genómico proveniente do isolamento PA20;
- (2) = DNA genómico proveniente do isolamento PA45;
- (3) = cDNA proveniente do isolamento PA20;
- (4) = cDNA proveniente do isolamento PA45;
- (M) = Marcador molecular (*123pb DNA Ladder*, Invitrogen).

O aparecimento de vários fragmentos na amplificação a partir do DNA genómico pode ter várias explicações: a mais provável indicia amplificações não específicas; pode, ainda, resultar da existência de genes diferentes ou de arranjos *in tandem* de várias cópias do gene. Como os isolamentos PA45 e PA20 mostraram amplificação de um fragmento semelhante, foi decidido clonar apenas o resultante do PA45.

A amplificação específica de cada um dos genes das elicitinas, assegurada pela definição judiciosa de *primers*<sup>31</sup>, foi efectuada em DNA genómico do isolamento PA45 e dela resultaram fragmentos com o tamanho esperado (Figura III.4).

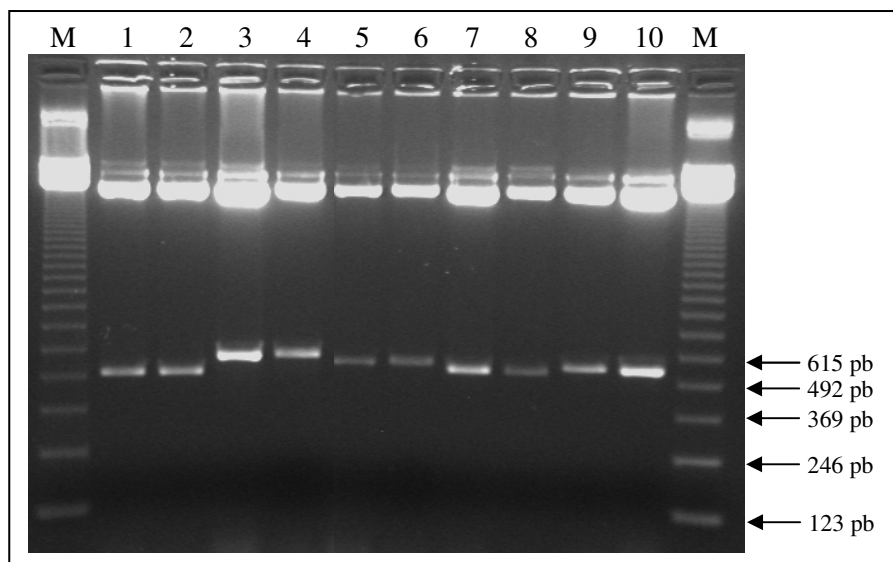
**Figura III.4:** Visualização, por electroforese em gel de agarose (1%), dos produtos de amplificação dos genes das elicitinas.

- (1) = gene da  $\beta$ -cinamomina ( *$\beta$ cin*);  
 (2) = gene da HAE- $\alpha$ -cinamomina (*HAEacin*);  
 (3) = gene da  $\alpha$ -cinamomina (*acin*);  
 (4) = gene da HAE- $\beta$ -cinamomina (*HAE $\beta$ cin*);  
 (M) = marcador molecular (*1kb DNA Ladder*, Invitrogen).



### III.3.1.2. Clonagem dos fragmentos dos genes da actina e das elicitinas

Os produtos das amplificações foram clonados e da digestão dos plasmídeos resultantes da selecção resultaram dois fragmentos correspondentes ao plasmídeo linearizado (3,9 kb) e ao fragmento de interesse (Figura III.5).



**Figura III.5:** Visualização, por electroforese em gel de agarose (1%), dos produtos de digestão com *Eco* RI, das moléculas de DNA plasmídico recombinante.

- (1) e (2) = Clones com o fragmento  *$\beta$ cin*; (3) e (4) = clones com o fragmento *HAEacin*;  
 (5) e (6) = clones com o fragmento *acin*; (7) e (8) = clones com o fragmento *HAE $\beta$ cin*;  
 (9) e (10) = clones com o fragmento do gene da actina;  
 (M) = marcador molecular (*123pb DNA Ladder*, Invitrogen).

<sup>31</sup> Descrita na secção III.2.1.4.

Para confirmação da natureza dos fragmentos, foram efectuadas reacções de amplificação cruzadas aplicando sucessivamente todos os pares de *primers* específicos em cada um dos plasmídeos; apenas se verificaram amplificações a partir dos plasmídeos com o inserto específico, com os *primers* que lhe eram específicos.

### III.3.1.3. Análise das sequências nucleotídicas dos fragmentos clonados

As sequências nucleotídicas obtidas figuram no Anexo 7, enquadradas em alinhamentos com sequências já conhecidas para os mesmos genes. O resumo dos resultados desses alinhamentos encontra-se nas Tabelas III.8 e III.9.

O fragmento do gene da actina de *P. cinnamomi* revelou maior homologia com a sequência do gene *actA* de *P. infestans* do que com a sequência de gene da actina de *P. megasperma* (Tabela III.8).

**Tabela III.8:** Resumo dos resultados obtidos em alinhamentos de sequências de genes da actina de *Phytophthora*. Os alinhamentos foram efectuados com o programa *Vector NTI 8*<sup>®</sup> (InforMax<sup>®</sup> Inc, USA).

<i>Sequências em Comparação</i>	<i>Homologia das sequências</i>
Alinhamento das sequências genéticas codificantes dos genes actina de <i>P. megasperma</i> , actina A e actina B de <i>P. infestans</i> .	73,0 %
Alinhamento das sequências genéticas codificantes dos genes actina de <i>P. megasperma</i> e actina A de <i>P. infestans</i>	79,8 %
Alinhamento das sequências genéticas codificantes dos genes actina de <i>P. megasperma</i> e actina B de <i>P. infestans</i>	84,3 %
Alinhamento das sequências genéticas codificantes dos genes actina A e actina B de <i>P. infestans</i>	78,3 %
Alinhamento da sequência genética codificante do gene actina de <i>P. megasperma</i> e o fragmento do gene actina obtido para o isolamento PA45 de <i>P. cinnamomi</i> .	86,5 % <sup>32</sup>
Alinhamento da sequência genética codificante do gene actina A de <i>P. infestans</i> e o fragmento do gene actina obtido para o isolamento PA45 de <i>P. cinnamomi</i>	93,0 % <sup>32</sup>
Alinhamento da sequência genética codificante do gene actina B de <i>P. infestans</i> e o fragmento do gene actina obtido para o isolamento PA45 de <i>P. cinnamomi</i>	81,2 % <sup>33</sup>

Relativamente aos genes das elicinas, foi verificada, tal como seria de esperar, uma grande homologia entre as sequências nucleotídicas encontradas para os genes no isolamento

<sup>32</sup> Homologia referente apenas ao alinhamento do fragmento obtido para *P. cinnamomi* com a zona correspondente na *CDS* do gene em comparação.

<sup>33</sup> Alinhamento apresentado no Anexo 7.

PA45 e outras previamente descritas (Duclos *et al.*, 1998). A exceção é a sequência do gene da cinamomina HAE  $\beta$ , cujas diferenças traduzem inclusivamente alterações da sequência em aminoácidos (Tabela III.9).

Kamoun *et al.* (1998b) observaram silenciamento de um gene de uma elicítina em *P. infestans* e esse silenciamento não afectou os genes de outras elicítinas que partilham 60% de homologia na região codificante. No presente trabalho, o gene  *$\beta$ cin* visado para silenciamento possui uma maior homologia com os genes das outras elicítinas conhecidas (77 a 83,5%).

**Tabela III.9:** Resumo dos resultados obtidos na comparação de alinhamentos de sequências de genes do *cluster* de elicítinas de *Phytophthora cinnamomi* publicado no *GenBank* (Número de Acesso: AJ000071) com os alinhamentos das novas sequências obtidas para o isolamento PA45. Os alinhamentos foram efectuados com o programa *Vector NTI 8*® (InforMax® Inc, USA).

<i>Sequências em Comparação</i>	<i>Homologia das sequências Alinhadas</i>		
	Zona 5' UTR + Sequências codificantes + Zona 3' UTR	Sequências codificantes (CDS)	Tradução das CDSs em aminoácidos
Alinhamento da sequência nucleotídica da $\beta$ -elicítina presente no <i>GenBank</i> com a sequência nucleotídica da $\beta$ -elicítina obtida para o isolamento PA45	99,2 %	100 %	100 %
Alinhamento da sequência nucleotídica da elicítina HAE- $\alpha$ presente no <i>GenBank</i> com a sequência nucleotídica da elicítina HAE- $\alpha$ obtida para o isolamento PA45	99,8 %	100 %	100 %
Alinhamento da sequência nucleotídica da $\alpha$ elicítina presente no <i>GenBank</i> com a sequência nucleotídica da $\alpha$ -elicítina obtida para o isolamento PA45	99,8 %	100 %	100 %
Alinhamento da sequência nucleotídica da elicítina HAE- $\beta$ presente no <i>GenBank</i> com a sequência nucleotídica da elicítina HAE- $\beta$ obtida para o isolamento PA45	92,4 %	94,3 %	92,7 %
Alinhamento das sequências nucleotídicas das elicítinas do <i>cluster</i> presentes no <i>GenBank</i>	48,2 %	66,9 %	63,2 %
Alinhamento das sequências nucleotídicas das elicítinas obtidas para o isolamento PA45	48,5 %	66,7 %	60,8 %
<b>Comparação entre sequências de diferentes tipos de elicítinas</b>			
Alinhamento da sequência nucleotídica da $\beta$ -elicítina com a sequência nucleotídica da elicítina HAE- $\alpha$ obtida para o isolamento PA45	-	77,1 %	74,4 %
Alinhamento da sequência nucleotídica da $\beta$ -elicítina com a sequência nucleotídica da $\alpha$ -elicítina obtida para o isolamento PA45	-	83,5 %	82,4 %
Alinhamento da sequência nucleotídica da $\beta$ -elicítina com a sequência nucleotídica da elicítina HAE- $\beta$ obtida para o isolamento PA45	-	81,2 %	79,0 %
Alinhamento da sequência nucleotídica da $\beta$ -elicítina com a sequência nucleotídica da elicítina HAE- $\beta$ presente no <i>GenBank</i>	-	79,3 %	79,0 %

Nestes trabalhos de amplificação, clonagem e sequenciação foi obtida informação que permitiu a escolha de *primers* e sondas adequados para a realização dos ensaios de quantificação em tempo real com a tecnologia *Taqman*. As novas sequências obtidas para as

elicinas do isolamento PA45 permitiram que a escolha dos oligonucleótidos recaísse em zonas que não apresentassem variações face às sequências presentes no *GenBank*, pretendendo-se assim diminuir as hipóteses de definição de sequências oligonucleotídicas que não funcionassem no isolamento em estudo. A sequenciação do fragmento da actina permitiu a definição de *primers* e sonda para as amplificações de normalização das amostras. Por último, os plasmídeos obtidos nas operações de clonagem foram usados para a obtenção de curvas padrão; as concentrações moleculares das diluições foram estimadas através das massas moleculares dos plasmídeos de cadeia simples, calculadas com o auxílio do programa *Vector NTI 8*<sup>®</sup> (InforMax<sup>®</sup> Inc, USA) e apresentadas na Tabela III.10.

**Tabela III.10:** Valores de massa molecular estimados para os plasmídeos utilizados para a obtenção das curvas padrão das reacções de PCR quantitativa em tempo real.

Inserto	Massa de 1 molécula do plasmídeo com o inserto	Inserto	Massa de 1 molécula do plasmídeo com o inserto
<i>βcin</i>	2,29 x 10 <sup>-9</sup> ng	HAE <i>acin</i>	2,33 x 10 <sup>-9</sup> ng
<i>acin</i>	2,32 x 10 <sup>-9</sup> ng	HAE <i>βcin</i>	2,30 x 10 <sup>-9</sup> ng
<i>Frag actina</i>	2,31 x 10 <sup>-9</sup> ng		

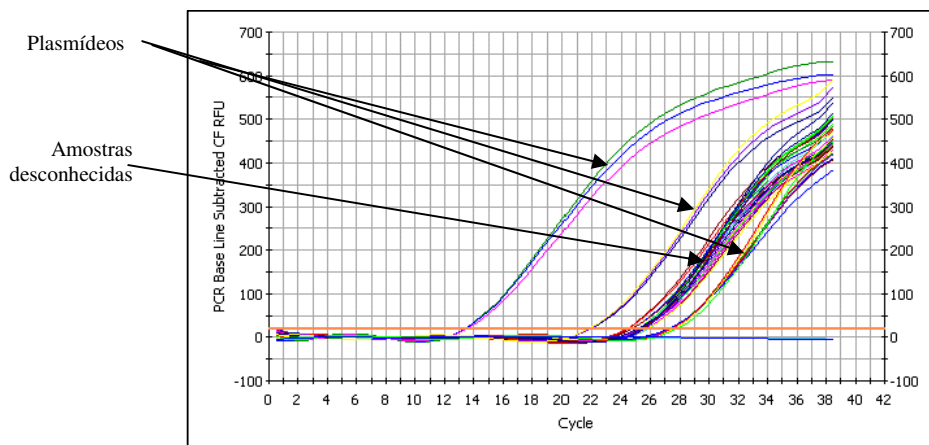
#### III.3.1.4. Quantificação da expressão genética dos genes das elicinas

Foram realizadas reacções que asseguraram que o conjunto de *primers* e sondas escolhidos para a quantificação de cada gene funcionava especificamente para esse gene e que estes oligonucleótidos, seleccionados com base em sequências do isolamento PA45, também funcionavam no isolamento PA37. Também, foi comprovado que o conjunto de oligonucleótidos seleccionados não quantificava amplificações não específicas em amostras de cDNA obtidas a partir de raízes de *Q. suber* não infectadas. Amostras de RNA não sujeitas a transcrição reversa não apresentaram sinais de amplificação, afastando assim qualquer hipótese de contaminação com DNA.

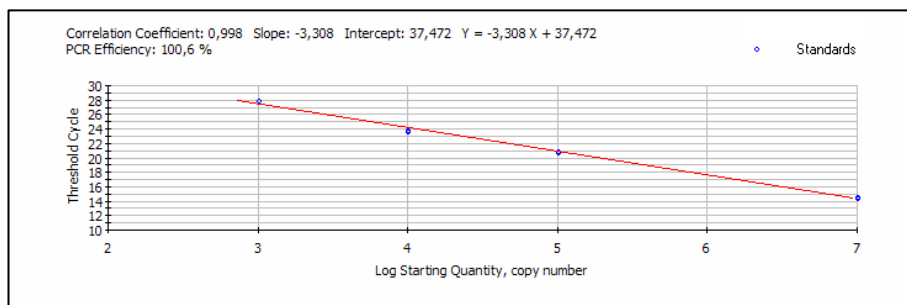
A quantificação da expressão dos genes das elicinas foi realizada em amostras dos isolamentos selvagens PA45 e PA37 e dos respectivos transformantes, FATSS (resistente ao antibiótico higromicina e com inibição da síntese da β-cinamomina) e 13C (resistente à higromicina), cultivados em meio V<sub>8</sub>C ou *MSE*,<sup>34</sup> durante 3 ou 15 dias. Também foi analisada a expressão dos genes das elicinas *in planta*, em amostras de raízes de *Q. suber* infectadas directamente com micélio, 12, 24 e 36 h após a infecção.

<sup>34</sup> Meios descritos na secção I.2.2., Cultura e manutenção dos isolamentos de *Phytophthora cinnamomi*.

As Figuras III.6 e III.7 exemplificam os gráficos gerados pelo software instalado no equipamento *iCycler iQ Detection System* (BIORAD) usado para realizar as reacções de quantificação por PCR em tempo real.



**Figura III.6:** Curvas de amplificação em tempo real do gene da actina em amostras de micélio com 3 dias e em amostras padrão constituídas por plasmídeos.



**Figura III.7:** Curva de calibração para a quantificação da expressão do gene da  $\beta$ -cinamomina.

No Anexo 8 são apresentados os resultados de cada um dos ensaios de quantificação, bem como todos os cálculos acessórios. As Tabelas III.11 e III.12 resumem os principais dados obtidos para as amostras de culturas *in vitro*.

**Tabela III.11:** Quantificação da expressão dos genes das elicinas em culturas *in vitro*. Os valores representam os valores médios obtidos para três ensaios independentes e estão expressos em número de cópias detectadas em 50 ng de cDNA. O número de cópias foi calculado pelo método absoluto da curva padrão e as amostras foram normalizadas relativamente à expressão da actina em micélio do isolamento PA45 cultivado em meio V<sub>8</sub>C durante três dias.

Isolamento, Meio de Cultura Tempo de cultura	Número de cópias do gene ( $\pm$ desvio padrão)			
	<i><math>\beta</math>cin</i>	<i>acin</i>	<i>HAE<math>\beta</math>cin</i>	<i>HAEacin</i>
PA45, V <sub>8</sub> C 3 dias	5,64 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 4,99 x 10 <sup>0</sup> )	7,80 x 10 <sup>2</sup> ( $\pm$ 8,55 x 10 <sup>1</sup> )	3,42 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 4,16 x 10 <sup>0</sup> )	6,48 x 10 <sup>0</sup> ( $\pm$ 2,85 x 10 <sup>0</sup> )
PA45, V <sub>8</sub> C 15 dias	3,25 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 3,17 x 10 <sup>0</sup> )	7,02 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 2,10 x 10 <sup>1</sup> )	1,60 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 4,15 x 10 <sup>0</sup> )	-
PA45, MSE 3 dias	7,48 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 8,91 x 10 <sup>2</sup> )	1,08 x 10 <sup>4</sup> ( $\pm$ 1,63 x 10 <sup>3</sup> )	5,77 x 10 <sup>2</sup> ( $\pm$ 1,93 x 10 <sup>2</sup> )	4,46 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 1,29 x 10 <sup>1</sup> )
PA45, MSE 15 dias	4,12 x 10 <sup>2</sup> ( $\pm$ 3,88 x 10 <sup>1</sup> )	6,08 x 10 <sup>2</sup> ( $\pm$ 1,36 x 10 <sup>2</sup> )	2,56 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 2,76 x 10 <sup>0</sup> )	-
FATSS, V <sub>8</sub> C 3 dias	-	4,36 x 10 <sup>2</sup> ( $\pm$ 7,41 x 10 <sup>1</sup> )	2,13 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 2,45 x 10 <sup>0</sup> )	-
FATSS, V <sub>8</sub> C 15 dias	-	3,69 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 1,36 x 10 <sup>1</sup> )	8,12 x 10 <sup>0</sup> ( $\pm$ 3,49 x 10 <sup>0</sup> )	-
FATSS, MSE 3 dias	-	2,16 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 4,05 x 10 <sup>2</sup> )	8,51 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 6,03 x 10 <sup>0</sup> )	-
FATSS, MSE 15 dias	-	5,56 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 1,25 x 10 <sup>1</sup> )	1,56 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 4,54 x 10 <sup>0</sup> )	-
PA37, V <sub>8</sub> C 3 dias	5,34 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 6,42 x 10 <sup>0</sup> )	8,13 x 10 <sup>2</sup> ( $\pm$ 7,84 x 10 <sup>1</sup> )	3,53 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 3,89 x 10 <sup>0</sup> )	5,32 x 10 <sup>0</sup> ( $\pm$ 3,27 x 10 <sup>0</sup> )
PA37, V <sub>8</sub> C 15 dias	3,26 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 3,23 x 10 <sup>0</sup> )	6,66 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 1,43 x 10 <sup>0</sup> )	1,67 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 3,15 x 10 <sup>0</sup> )	-
PA37, MSE 3 dias	7,63 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 8,79 x 10 <sup>2</sup> )	1,13 x 10 <sup>4</sup> ( $\pm$ 1,85 x 10 <sup>3</sup> )	6,18 x 10 <sup>2</sup> ( $\pm$ 1,85 x 10 <sup>2</sup> )	4,93 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 6,09 x 10 <sup>0</sup> )
PA37, MSE 15 dias	4,76 x 10 <sup>2</sup> ( $\pm$ 5,36 x 10 <sup>1</sup> )	6,63 x 10 <sup>2</sup> ( $\pm$ 1,59 x 10 <sup>2</sup> )	2,64 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 6,15 x 10 <sup>0</sup> )	-
13C, V <sub>8</sub> C 3 dias	4,76 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 3,66 x 10 <sup>0</sup> )	7,73 x 10 <sup>2</sup> ( $\pm$ 8,38 x 10 <sup>1</sup> )	3,56 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 6,22 x 10 <sup>0</sup> )	5,09 x 10 <sup>0</sup> ( $\pm$ 1,71 x 10 <sup>0</sup> )
13C, V <sub>8</sub> C 15 dias	3,34 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 3,35 x 10 <sup>0</sup> )	6,92 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 1,56 x 10 <sup>1</sup> )	2,052 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 5,85 x 10 <sup>0</sup> )	-
13C, MSE 3 dias	7,60 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 1,00 x 10 <sup>3</sup> )	1,18 x 10 <sup>4</sup> ( $\pm$ 2,29 x 10 <sup>3</sup> )	5,99 x 10 <sup>2</sup> ( $\pm$ 1,98 x 10 <sup>2</sup> )	5,31 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 6,22 x 10 <sup>0</sup> )
13C, MSE 15 dias	3,93 x 10 <sup>2</sup> ( $\pm$ 7,01 x 10 <sup>1</sup> )	6,12 x 10 <sup>2</sup> ( $\pm$ 1,33 x 10 <sup>2</sup> )	1,92 x 10 <sup>1</sup> ( $\pm$ 6,40 x 10 <sup>0</sup> )	-

(-) Não foram detectadas cópias do gene.

**Tabela III.12:** Regulação da expressão dos genes das elicinas em culturas *in vitro*. A expressão dos genes das elicinas pelo micélio do isolamento PA45 cultivado em V<sub>8</sub>C durante 3 dias foi utilizada como padrão para avaliar o comportamento desses genes noutras amostras, em termos de sobre- ou sub-expressão.

Isolamento, Meio de Cultura Tempo de cultura	Factor de Indução ( $\pm$ desvio padrão)			
	<i><math>\beta</math>cin</i>	<i>acin</i>	<i>HAE<math>\beta</math>cin</i>	<i>HAEacin</i>
PA45, V <sub>8</sub> C 3 dias	1,00 ( $\pm$ 0,122)	1,00 ( $\pm$ 0,138)	1,00 ( $\pm$ 0,147)	1,00 ( $\pm$ 0,447)
PA45, V <sub>8</sub> C 15 dias	0,58 ( $\pm$ 0,125)	0,09 ( $\pm$ 0,306)	0,47 ( $\pm$ 0,266)	-
PA45, MSE 3 dias	132,73 ( $\pm$ 0,121)	13,84 ( $\pm$ 0,148)	16,84 ( $\pm$ 0,326)	6,87 ( $\pm$ 0,280)
PA45, MSE 15 dias	7,31 ( $\pm$ 0,127)	0,78 ( $\pm$ 0,240)	0,75 ( $\pm$ 0,139)	-
FATSS, V <sub>8</sub> C 3 dias	-	0,56 ( $\pm$ 0,161)	0,62 ( $\pm$ 0,112)	-
FATSS, V <sub>8</sub> C 15 dias	-	0,05 ( $\pm$ 0,374)	0,24 ( $\pm$ 0,443)	-
FATSS, MSE 3 dias	-	2,77 ( $\pm$ 0,176)	2,49 ( $\pm$ 0,079)	-
FATSS, MSE 15 dias	-	0,07 ( $\pm$ 0,239)	0,46 ( $\pm$ 0,304)	-
PA37, V <sub>8</sub> C 3 dias	0,95 ( $\pm$ 0,157)	1,04 ( $\pm$ 0,139)	1,03 ( $\pm$ 0,150)	0,82 ( $\pm$ 0,629)
PA37, V <sub>8</sub> C 15 dias	0,58 ( $\pm$ 0,119)	0,09 ( $\pm$ 0,227)	0,49 ( $\pm$ 0,194)	-
PA37, MSE 3 dias	135,27 ( $\pm$ 0,117)	14,43 ( $\pm$ 0,160)	18,05 ( $\pm$ 0,284)	7,61 ( $\pm$ 0,129)
PA37, MSE 15 dias	8,44 ( $\pm$ 0,139)	0,85 ( $\pm$ 0,253)	0,77 ( $\pm$ 0,246)	-
13C, V <sub>8</sub> C 3 dias	0,84 ( $\pm$ 0,087)	0,99 ( $\pm$ 0,119)	1,04 ( $\pm$ 0,165)	0,78 ( $\pm$ 0,332)
13C, V <sub>8</sub> C 15 dias	0,59 ( $\pm$ 0,107)	0,09 ( $\pm$ 0,257)	0,60 ( $\pm$ 0,277)	-
13C, MSE 3 dias	134,87 ( $\pm$ 0,145)	15,10 ( $\pm$ 0,201)	17,50 ( $\pm$ 0,335)	8,19 ( $\pm$ 0,132)
13C, MSE 15 dias	6,99 ( $\pm$ 0,200)	0,78 ( $\pm$ 0,212)	0,56 ( $\pm$ 0,347)	-

(-) Não foram detectadas cópias do gene, pelo que não foi calculado factor de indução

A leitura dos dados em termos de números absolutos de cópias deve ser efectuada com algumas reservas. Nomeadamente, há que ter em conta que os cálculos do número de cópias das amostras padrão foram realizados com base em estimativas das massas moleculares e que, além de erros associados a essas estimativas, teremos de considerar a hipótese da influência de erros nas fases de quantificação espectrofotométrica dos plasmídeos. A reprodutibilidade é influenciada por parâmetros como a distribuição estatística (lei de Poisson), e os valores de Ct são menos reprodutíveis quando se trabalha com um número reduzido de cópias, devido aos efeitos estocásticos na quantificação de um pequeno número de moléculas; a estatística da distribuição de partículas prevê que seja necessário um número muito maior de replicados para diferenciar entre cinco e dez cópias do que para diferenciar entre 500 e 1000 (Bustin, 2000). Ora, os Cts dos replicados obtidos foram bastante reprodutíveis, inclusivamente quando foi detectado um reduzido número de cópias. Isso quer dizer que, provavelmente, esse número foi subestimado, o que por sua vez aponta para que as concentrações calculadas para as amostras padrão tenham sido subestimadas. No entanto, as relações proporcionais entre o número efectivamente presente de cópias mantêm-se, pelo que os resultados em termos de abundância relativa do número de cópias de uma amostra em relação a outra continuam válidos. Além disso, nos cálculos do factor de indução, as quantidades das amostras são divididas pela quantidade da amostra calibradora, pelo que as unidades da curva padrão desaparecem. Portanto, tudo o que é necessário das amostras que constituem a curva padrão é que a sua diluição relativa seja conhecida.

Da análise das Tabelas III.11 e III.12 salientam-se em seguida as observações mais importantes. No que diz respeito aos isolamentos selvagens PA45 e PA37 evidencia-se que:

- Em ambos os isolamentos foi detectada a expressão de todos os genes do *cluster* das elicinas nos dois meios em estudo, V<sub>8</sub>C e MSE.
- O gene mais expresso foi o *acin*; o segundo transcrito mais abundante foi o *βcin*. Embora detectados em menor número, seguiram-se o gene da *HAEβcin* e finalmente o gene *HAEacin*.
- A expressão dos genes aumenta significativamente em meio MSE, relativamente à expressão verificada em meio V<sub>8</sub>C e diminui, em ambos meios, com a idade da cultura.
- Em termos de indução da expressão observada em MSE, o gene que apresenta o maior aumento é o *βcin*, seguido dos genes *HAEβcin*, *acin* e, por último, *HAEacin*.

- A indução da expressão dos genes das elicinas foi ligeiramente mais elevada no isolamento PA37 do que no isolamento PA45.

Foi anteriormente observado que, relativamente aos genes presentes no *cluster* genómico de *P. cryptogea* o nível de expressão do gene codificante da elicina básica foi superior ao da elicina acídica em micélio com quatro dias cultivado num meio definido semelhante ao MSE (Panabières *et al.*, 1995). Esta observação estava de acordo com as taxas de produção dessas proteínas em filtrados de culturas *in vitro* (Le Berre *et al.*, 1994). Nos dois isolamentos de *P. cinnamomi* estudados no presente trabalho, os níveis do mRNA de  $\beta$ cin foram inferiores aos do *acin*, num resultado que está em discordância com obtido em *P. cryptogea*. Porém, a análise em *P. cryptogea* foi efectuada com base em sondas localizadas nas zonas 3' UTR dos genes, que apresentam maior variabilidade que as zonas codificantes. Desse modo, a detecção tornou-se mais específica para os transcritos originados a partir do *cluster* genómico. Aliás, foi confirmado pelos próprios autores (através de uma sonda constituída pela zona codificante do gene da elicina básica) que outros genes, para além daqueles presentes no *cluster*, eram expressos. Nos ensaios de PCR em tempo real efectuados em *P. cinnamomi*, os *primers* e as sondas foram escolhidos nas zonas codificantes, menos variáveis e, por isso, é possível que os transcritos detectados tivessem tido origem não só na transcrição dos genes do *cluster* genómico, mas também fossem provenientes da transcrição de cópias adicionais dos genes, presentes fora da estrutura do *cluster*. Por exemplo, poderá ter sido quantificada a expressão dos genes codificantes para isoformas ácidas identificados por Li *et al.* (2000). Infelizmente, não foram encontrados na literatura dados concretos relativamente à quantificação das cinamominas canónicas em filtrados de culturas, de modo a poder estabelecer uma correlação entre a abundância dos transcritos e as respectivas isoformas proteicas. Pernollet *et al.* (1993) relatam a presença de  $\alpha$ -cinamomina e  $\beta$ -cinamomina em filtrados de cultura analisados por cromatografia líquida de fase reversa; este mesmo método também mostrou a existência de duas isoformas em *P. megasperma* mas não permitiu fazer a distinção entre as isoformas de criptogéina, que só foram diferenciadas por cromatografia de exclusão-difusão através de Sephadex G50. Estas observações indicam que a abundância relativa das isoformas em *P. cinnamomi* será mais equilibrada do que em *P. cryptogea*, onde a produção da isoforma básica é predominante. Nos géis de focagem isoeléctrica realizados nesse estudo, também foi detectada a presença de uma proteína “contaminante”, uma segunda isoforma de  $\alpha$ -cinamomina, menos abundante que a proteína ácida dominante.

A detecção dos mRNAs correspondentes aos genes das elicitinias altamente acídicas de *P. cinnamomi* já tinha sido demonstrada através de RT-PCR com *primers* específicos, seguida de análise de restrição, para confirmação da natureza dos produtos amplificados (Duclos *et al.*, 1998b). Em *P. insólita*, também foram identificados cDNAs codificantes de péptidos altamente acídicos (Ponchet *et al.*, 1999). Os ensaios de quantificação agora efectuados permitiram confirmar os resultados obtidos anteriormente para *P. cinnamomi*, verificando-se novamente a presença de transcritos de *HAE*, embora com níveis de expressão muito inferiores aos dos observados para as elicitinias canónicas. Este reduzido número de cópias de cDNA contabilizado para os genes *HAE* poderá justificar a razão pela qual Panabières e colaboradores (1995) não detectaram a expressão desses mesmos genes em *P. cryptogea*, pois as análises de RNA foram efectuadas por *northern blot*; embora de uso generalizado, esta técnica possui um nível de sensibilidade inferior à RT-PCR em tempo real (Bustin, 2000). Contudo, ainda não foi demonstrada a efectiva tradução em proteínas destas sequências de elicitinias de classe II (Ponchet *et al.*, 1999).

O meio MSE é um meio de cultura que foi empiricamente considerado como o mais adequado em vários trabalhos relacionados com a produção e isolamento destas proteínas (Kamoun *et al.*, 1994). Foi verificado, experimentalmente, que estimula a produção e secreção das elicitinias canónicas mas não foi determinado qual o componente responsável por esse estímulo. Tal como seria de esperar, a expressão dos genes das elicitinias mostrou-se elevada nas amostras de micélio cultivadas neste meio, em concordância com a abundância de proteína nos respectivos filtrados de cultura. Apesar de ter sido detectada a expressão dos genes das elicitinias canónicas em micélio proveniente de culturas em meio V<sub>8</sub>C, a análise por electroforese de proteínas em gel SDS-PAGE não mostrou uma presença significativa de proteína nos filtrados dessas culturas. Possivelmente a mais fraca expressão dos genes não permitiu uma produção em quantidade suficiente para ser detectada nos filtrados, podendo, por exemplo, as elicitinias produzidas terem ficado retidas nas paredes celulares do micélio. Aplicando métodos imunocitoquímicos, Brummer *et al.* (2002) detectaram a presença de quercinina ( $\beta$ -elicítina de *P. quercina*) nas paredes celulares de hifas cultivadas em meio V<sub>8</sub>Ca. Pela mesma ordem de razão, as elicitinias altamente acídicas poderão não ter sido ainda detectadas em filtrados de meios de cultura devido à sua reduzida expressão e possível retenção a nível das paredes celulares. Tercé-Laforge *et al.* (1992) demonstraram a acumulação de criptogéina no micélio de *P. cryptogea*, bem como a presença de mRNAs da elicítina num período em que a síntese proteica não foi detectada. Deste modo, também as

HAE, tal como as elicinas canónicas no caso das culturas em V<sub>8</sub>C, podem ter ficado acumuladas no micélio.

A diminuição da expressão dos genes das elicinas nas culturas com quinze dias sugere uma ligação da expressão destas proteínas com a fase de crescimento activo do micélio. Com o envelhecimento das culturas, a quantidade de nutrientes torna-se limitante; o crescimento activo das hifas poderá estar apenas presente em algumas secções do micélio e começam a formar-se os clamidósporos, estruturas com actividade reduzida que permitem a sobrevivência deste oomiceta em condições menos favoráveis. O facto de serem detectadas grandes quantidades de elicinas nos filtrados das culturas MSE mais velhas resulta da acumulação, ao longo do tempo de cultura, das elicinas produzidas durante o desenvolvimento do micélio em crescimento activo. Foi demonstrado que a secreção de elicinas é iniciada mais tarde do que a sua síntese, e que termina mais cedo, em simultâneo com a paragem do crescimento do micélio por exaustão da fonte de azoto no meio (Tercé-Laforge *et al.*, 1992). Estes autores também provaram que, mesmo após o final da produção destas proteínas, continua a ser detectada a presença dos respectivos mRNAs.

Apesar da expressão do gene da actina ser correntemente usada como controlo interno na normalização de ensaios de expressão genética em *Phytophthora* (Avrova *et al.*, 2003; Greenville-Briggs *et al.*, 2005; West *et al.*, 1998), foi recentemente publicado um estudo que desaconselha a sua utilização, por comprovada variação de expressão nas várias fases de ciclo de vida de *P. parasitica* (Yan, H.-Z. e Liou, R.-F., 2006). De facto, já Unkles *et al.* (1991) tinham colocado a hipótese dos transcritos dos genes da actina de *P. infestans* serem mais abundantes em micélio do que em quistos germinados. As amostras obtidas a partir de micélio cultivado em meio MSE mostraram consistentemente um maior número de cópias de actina do que as amostras obtidas a partir de micélio cultivado em meio V<sub>8</sub>C; do mesmo modo, as culturas mais jovens (3 dias) mostraram um maior número de cópias de actina do que as culturas mais velhas (15 dias). Se essas diferenças não forem atribuíveis a diferenças da eficiência da reacção da transcrição reversa, então isso significa que a actina tem, efectivamente, expressão variável, não só nas diferentes fases do ciclo de vida do oomiceta, mas também em resposta a diferentes tratamentos, como cultura em diferentes meios, e não deverá ser usada na normalização. Assim, mesmo tendo em conta que estão presentes erros devido à falta de uma normalização das amostras rigorosa, pois, inevitavelmente, existem pequenas variações nas medições iniciais da quantidade de RNA usada na transcrição e, posteriormente, na quantidade de cDNA usada na PCR, que afectam a quantificação, pode ser

feita uma comparação da expressão dos genes das elicinas entre as amostras, sem normalização. Apesar da falta de normalização, verifica-se que se mantêm as conclusões anteriores: aumenta a expressão dos genes em meio MSE (embora se verifique que essa indução é mais acentuada sem a normalização) e diminuição da expressão quando a cultura envelhece (com repressão menos acentuada sem a normalização).

No que concerne às estirpes transformadas, destaca-se que:

- A estirpe 13C, transformada com a cassete de resistência à higromicina B, mostrou um padrão de expressão dos genes das elicinas semelhante ao seu homólogo selvagem, PA37.
- A estirpe FATSS revelou uma total ausência da presença do transcrito *βcin*, alvo do silenciamento, bem como do transcrito *HAEacin*.
- Na estirpe FATSS, o número de cópias detectado para os genes *acin* e *HAEβcin* foi inferior ao assinalado para o seu homólogo selvagem, PA45.

Foi já demonstrado, anteriormente, que o transformante 13C produziu quantidades de elicina semelhantes ao seu homólogo selvagem<sup>35</sup>, pelo que já era esperado que a estirpe 13C apresentasse um padrão de expressão dos genes de elicinas inalterado face ao isolamento selvagem que lhe deu origem. Kamoun *et al.* (1998b) também assinalaram a presença de níveis normais do gene *infl* em transformantes simples usados como controlo em ensaios de silenciamento da infestina ( $\alpha$  elicina de *P. infestans*).

A ausência do transcrito *βcin* na estirpe FATSS está em conformidade com a ausência de  $\beta$ -cinamomina nos respectivos filtrados de culturas, pelo que o silenciamento observado é fruto de um mecanismo que actua a nível da transcrição. Estes resultados são comparáveis aos obtidos noutros estudos que visavam a obtenção de estirpes deficientes em determinados produtos de genes nativos e que utilizaram sequências anti-sentido (Kamoun *et al.*, 1998b; Gaulin *et al.*, 2002; Latijnhouwers e Govers, 2003; Latijnhouwers *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2005). Possivelmente, o silenciamento do gene *βcin* poderá ser atribuído ao mecanismo proposto por West *et al.* (1999a), o denominado silenciamento genético internuclear; este modelo baseia-se em fenómenos de inactivação genética que actuam em *trans* e são inicialmente desencadeados pela interacção entre as sequências endógenas e transgênicas,

---

<sup>35</sup> Abordado na secção I.3.7. Análise da produção de  $\beta$ -cinamomina

num fenómeno que poderá ser comparado à paramutação (Meyer *et al.*, 1993; Hollick *et al.*, 1997).

O silenciamento genético pode afectar sequências de DNA com semelhanças superiores a 80% (Kamoun, 2003). No presente trabalho, foi utilizada uma sequência anti-sentido do gene da  $\beta cin$ , visando o silenciamento do gene endógeno; por sua vez, este partilha uma grande homologia com os outros genes das outras elicinas do *cluster*. A estirpe FATSS, além da ausência de transcritos  $\beta cin$ , também revelou ausência de transcritos *HAEacin* (77% de homologia com  $\beta cin$ ) e diminuição do número de cópias dos transcritos *acin* (83,5% de homologia) e *HAE $\beta cin$*  (81,2% de homologia). Parece, pois, contraditório que a sequência que menos homologia tem com o gene visado para silenciamento tenha sido aquela que mais sofreu os efeitos de uma possível inibição. Por outro lado, *HAEacin* é um gene cujo número de transcritos se revelou muito reduzido nos isolamentos selvagens, sendo mesmo o gene menos expresso daqueles que se encontram presentes no *cluster* de elicinas; por conseguinte, qualquer alteração que levasse a uma diminuição, mesmo ligeira, da transcrição deste gene poderá ter levado, pura e simplesmente, ao seu total silenciamento.

Foram observadas alterações na formação da heterocromatina nas regiões que rodeiam genes silenciados em *P. infestans* e é possível que essas alterações sejam as responsáveis pela não transcrição dos genes silenciados (Kamoun, 2003). Dada a organização do *cluster* genómico das elicinas de *P. cinnamomi*, o gene *HAEacin* é o que se localiza mais próximo do gene  $\beta cin$  silenciado<sup>36</sup>, o que leva à hipótese deste gene poder ter sofrido mais acentuadamente as consequências da mencionada modificação da cromatina, afecta ao silenciamento induzido no gene  $\beta cin$ . Por seu lado, os genes *acin* e *HAE $\beta cin$* , localizados a uma maior distância, não seriam tão afectados, ocorrendo apenas uma diminuição na sua expressão.

Panabières *et al.* (1998) expressaram o gene codificante da  $\beta$ -criptogeína em *P. infestans* e observaram que a quantidade produzida dessa proteína no transformante foi semelhante à quantidade produzida por *P. cryptogea*. Também verificaram que, nesse transformante, a quantidade de infestina endógena (uma  $\alpha$ -elicina) diminuiu de um valor tal que a quantidade total de elicinas produzida permaneceu sem alterações significativas em relação a um transformante que apenas continha o gene de resistência à higromicina B. Baseados nestas observações, estes autores concluíram que a quantidade global de elicinas

<sup>36</sup> Consultar Figura I.6 na secção I.1.3. As elicinas de *P. cinnamomi*.

sintetizadas por um dado isolamento é constante e sugeriram que o papel das elicinas é comum nas várias espécies de *Phytophthora* e que as elicinas da classe IA e IB partilham funções idênticas, podendo ser substituídas entre si sem aparente modificação fenotípica do patogénio (à excepção dos maiores efeitos necróticos exercidos pelas elicinas básicas). Contudo, a diminuição da produção de infestina no transformante de *P. infestans* que expressou a  $\beta$ -criptogeína não desceu abaixo dos níveis produzidos pelo isolamento selvagem, pelo que qualquer função específica da  $\alpha$ -elicina estaria sempre assegurada a níveis normais. Por outro lado, se as quantidades de elicinas canónicas dentro de um dado isolamento são constantes e os papéis biológicos das classes IA e IB são iguais, seria de esperar que a  $\alpha$ -cinamomina aumentasse de produção na estirpe FATSS, que não apresenta produção de  $\beta$ -cinamomina. É claro que, para se verificar esta hipótese, teria de se assumir que seria possível uma indução extra do gene *acin*, isto é, elevá-lo a um nível de expressão superior à normal para compensar a inibição do gene  *$\beta$ cin*. Porém, neste caso, a confirmação dessa hipótese não se afigura viável, já que o silenciamento também afectou parcialmente o gene *acin* e a sua expressão nem sequer atinge o seu nível habitual, observado nos isolamentos selvagens.

Na discussão dos resultados do capítulo I, foi colocada a hipótese do transformante FATSS ser heterocariota, com núcleos transformados com a presença dos transgenes, e núcleos não transformados, sem os transgenes. A supressão da produção de  $\beta$ -cinamomina por uma estirpe heterocariota deste tipo pode ser compreendida à luz do mecanismo proposto por West *et al.* (1999a), pois a teoria do silenciamento genético internuclear prevê a transmissão do estado silenciado de um gene, através de um factor difusível que, viajando de um núcleo transformado para um núcleo não transformado, induz neste último o silenciamento, mesmo na ausência do transgene.

As Tabelas III.13 e III.14 mostram os dados obtidos para as culturas *in planta*.

Na análise destes resultados continua a ser necessário ter em linha de conta as considerações mencionadas atrás acerca da quantificação de um reduzido número de transcritos.

**Tabela III.13:** Quantificação da expressão dos genes das elicinas *in planta*. O número de cópias foi calculado pelo método absoluto da curva padrão e as amostras foram normalizadas relativamente à expressão da actina em micélio do isolamento PA45 cultivado em meio V<sub>8</sub>C durante três dias. Os valores representam os valores médios obtidos para três ensaios independentes e estão expressos em número de cópias correspondentes a 50 ng de cDNA de *Phytophthora*.

Isolamento Tempo após inoculação	Número de cópias do gene ( $\pm$ desvio padrão)			
	<i><math>\beta</math>cin</i>	<i>acin</i>	<i>HAE<math>\beta</math>cin</i>	<i>HAEacin</i>
PA45 12 horas	8,80 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 9,44 x 10 <sup>2</sup> )	4,62 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 5,91 x 10 <sup>2</sup> )	-	3,68 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 2,14 x 10 <sup>2</sup> )
PA45 24 horas	7,55 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 7,61 x 10 <sup>2</sup> )	1,03 x 10 <sup>4</sup> ( $\pm$ 5,89 x 10 <sup>2</sup> )	-	1,35 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 3,72 x 10 <sup>2</sup> )
PA45 36 horas	6,86 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 3,59 x 10 <sup>2</sup> )	1,49 x 10 <sup>4</sup> ( $\pm$ 9,61 x 10 <sup>2</sup> )	1,01 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 4,74 x 10 <sup>2</sup> )	4,66 x 10 <sup>2</sup> ( $\pm$ 2,04 x 10 <sup>1</sup> )
FATSS 12 horas	-	-	-	-
FATSS 24 horas	-	6,00 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 1,94 x 10 <sup>3</sup> )	-	-
FATSS 36 horas	-	1,41 x 10 <sup>4</sup> ( $\pm$ 9,51 x 10 <sup>3</sup> )	1,53 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 1,19 x 10 <sup>3</sup> )	-
PA37 12 horas	8,90 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 9,59 x 10 <sup>2</sup> )	4,80 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 2,45 x 10 <sup>2</sup> )	-	2,77 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 5,65 x 10 <sup>2</sup> )
PA37 24 horas	7,85 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 1,09 x 10 <sup>3</sup> )	1,05 x 10 <sup>4</sup> ( $\pm$ 4,39 x 10 <sup>2</sup> )	-	7,27 x 10 <sup>2</sup> ( $\pm$ 8,25 x 10 <sup>1</sup> )
PA37 36 horas	6,99 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 5,90 x 10 <sup>2</sup> )	1,73 x 10 <sup>4</sup> ( $\pm$ 8,68 x 10 <sup>2</sup> )	1,08 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 2,48 x 10 <sup>2</sup> )	4,00 x 10 <sup>2</sup> ( $\pm$ 1,06 x 10 <sup>1</sup> )
13C 12 horas	8,38 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 4,4 x 10 <sup>2</sup> )	5,04 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 2,53 x 10 <sup>2</sup> )	-	3,52 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 1,16 x 10 <sup>3</sup> )
13C 24 horas	7,66 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 4,77 x 10 <sup>2</sup> )	1,02 x 10 <sup>4</sup> ( $\pm$ 3,78 x 10 <sup>2</sup> )	-	8,66 x 10 <sup>2</sup> ( $\pm$ 1,31 x 10 <sup>2</sup> )
13C 36 horas	7,18 x 10 <sup>3</sup> ( $\pm$ 5,13 x 10 <sup>1</sup> )	1,56 x 10 <sup>4</sup> ( $\pm$ 5,83 x 10 <sup>2</sup> )	9,57 x 10 <sup>2</sup> ( $\pm$ 2,24 x 10 <sup>2</sup> )	4,12 x 10 <sup>2</sup> ( $\pm$ 7,03 x 10 <sup>1</sup> )

(-) Não foram detectadas cópias do gene.

**Tabela III.14:** Regulação da expressão dos genes das elicinas *in planta*. A expressão dos genes das elicinas pelo micélio do isolamento PA45 cultivado em V<sub>8</sub>C durante 3 dias foi utilizado como padrão para avaliar o comportamento desses genes noutras amostras, em termos de sobre ou sub-expressão.

Isolamento Tempo após inoculação	Factor de Indução ( $\pm$ desvio padrão)			
	<i><math>\beta</math>cin</i>	<i>acin</i>	<i>HAE<math>\beta</math>cin</i>	<i>HAEacin</i>
PA45 12 horas	156,63 ( $\pm$ 0,383)	5,79 ( $\pm$ 0,296)	-	562,87 ( $\pm$ 0,337)
PA45 24 horas	137,24 ( $\pm$ 0,609)	13,12 ( $\pm$ 0,513)	-	194,62 ( $\pm$ 0,398)
PA45 36 horas	122,18 ( $\pm$ 3,069)	19,24 ( $\pm$ 0,320)	30,90 ( $\pm$ 0,665)	73,72 ( $\pm$ 0,621)
FATSS 12 horas	-	-	-	-
FATSS 24 horas	-	7,96 ( $\pm$ 0,516)	-	-
FATSS 36 horas	-	17,58 ( $\pm$ 0,730)	42,24 ( $\pm$ 0,833)	-
PA37 12 horas	155,31 ( $\pm$ 0,282)	6,11 ( $\pm$ 0,307)	-	420,72 ( $\pm$ 0,357)
PA37 24 horas	135,59 ( $\pm$ 0,437)	13,48 ( $\pm$ 0,497)	-	110,26 ( $\pm$ 0,455)
PA37 36 horas	123,07 ( $\pm$ 0,153)	22,22 ( $\pm$ 0,240)	31,10 ( $\pm$ 0,217)	61,90 ( $\pm$ 0,217)
13C 12 horas	149,95 ( $\pm$ 0,492)	6,40 ( $\pm$ 0,453)	-	505,39 ( $\pm$ 0,380)
13C 24 horas	136,81 ( $\pm$ 0,382)	13,01 ( $\pm$ 0,324)	-	130,92 ( $\pm$ 0,282)
13C 36 horas	127,82 ( $\pm$ 0,215)	19,93 ( $\pm$ 0,158)	28,27 ( $\pm$ 0,321)	63,99 ( $\pm$ 0,257)

(-) Não foram detectadas cópias do gene, pelo que não foi calculado factor de indução

Da análise das Tabelas III.13 e III.14 salienta-se, em seguida, os aspectos mais relevantes. No que diz respeito aos isolamentos PA45, PA37 e 13C sobressai que:

- Todos os genes são expressos durante o processo infeccioso e mostram uma indução de expressão em relação ao nível que apresentam durante o crescimento de micélio em meio V<sub>8</sub>C.

- O gene *βcin* é detectável logo após as primeiras horas de infecção, mas sofre uma diminuição de expressão ao longo do tempo, à medida que progride a colonização dos tecidos da raiz.
- O gene *acin* é detectável logo após as primeiras horas de infecção, mas sofre um aumento de expressão ao longo do tempo, à medida que progride a colonização dos tecidos da raiz.
- O gene *HAEβcin* só é detectável num estado avançado da infecção, quando os tecidos da raiz já se apresentam, na sua maior parte, colonizados.
- O gene *HAEacin* é detectável logo após as primeiras horas de infecção, mas sofre uma diminuição de expressão ao longo do tempo, à medida que progride a colonização dos tecidos da raiz.

O número de cópias de elicinas obtido, directamente, nos ensaios de PCR em tempo real para as amostras de tecido radicular infectado foram normalizados em relação à expressão do gene da actina. As mesmas considerações, acima referidas, sobre a pertinência da utilização do gene da actina na normalizações de expressão genética em *Phytophthora*, devem ser tidas em conta. Neste caso, nem sequer é possível usar a quantidade total de RNA utilizado na transcrição reversa como normalizador, ainda que grosseiro, pois esse RNA foi constituído por uma mistura de RNA de *Phytophthora* e RNA de *Q. suber*. Só pode ser tomado como certo que, nesta mistura, a porção correspondente ao RNA de *Phytophthora* aumenta progressivamente nas amostras de raízes infectadas há mais tempo, uma consequência lógica do aumento de biomassa do patógeno. O método de infecção das raízes utilizado neste trabalho consistiu no contacto directo de micélio com o tecido radicular, permitindo que a colonização se iniciasse sem a passagem pela fase de quistos germinados, que, em condições naturais, seriam as formas responsáveis pela invasão inicial do hospedeiro. Contudo, é possível que as hifas do micélio possam ter sofrido alterações morfológicas e fisiológicas durante o crescimento *in planta* e, conseqüentemente, que o nível de expressão da actina se tenha nelas modificado, relativamente ao nível normalmente expresso em hifas em cultura *in vitro*. As diferenças entre hifas *in planta* e hifas *in vitro* terão sido mais acentuadas no início da infecção, quando o patógeno invade os tecidos saudáveis. Após a fase de estabelecimento inicial das hifas no interior dos tecidos, é provável que o seu crescimento tenha mais semelhanças com o que se observa *in vitro*, pois, após ter vencido as barreiras que dificultam a penetração entre as células do hospedeiro, as hifas podem, em seguida focar toda

a sua maquinaria celular para a simples absorção dos nutrientes disponíveis à sua volta, tal como o fazem *in vitro*.

Brummer *et al.* (2002) pesquisaram a produção de  $\beta$ -quercinina por *P. quercina* em tecidos radiculares de *Q. robur* e provaram, por meios imunocitoquímicos, que esta elicítina estava presente nos tecidos durante toda a fase de crescimento do patógeno, acompanhando, de uma forma proporcional, o aumento de biomassa. A expressão do gene  *$\beta$ cin* apresentou uma diminuição ao longo da infecção. Embora estes resultados pareçam, à primeira vista, contraditórios, de facto não o são. No tempo pós-inoculação  $t$ , a quantificação directa da elicítina nos tecidos contabiliza a proteína formada no tempo  $t$ ; no tempo  $t+\delta t$  a elicítina quantificada será a soma da proteína neo-formada com a proteína já presente nos tecidos. A quantificação da biomassa segue a mesma linha. Ainda que afectada de algum erro, a expressão do gene da actina continua ligada à biomassa, e a quantificação do gene no tempo  $t+\delta t$  engloba a expressão nas hifas neo-formadas bem como nas hifas formadas no tempo  $t$ . O facto do gene  *$\beta$ cin* diminuir a sua expressão ao longo do processo de invasão dos tecidos significa que a sua expressão não tem uma relação proporcional com a biomassa total presente. Por outro lado, a expressão do gene da  $\beta$ -cinamomina no período inicial de colonização dos tecidos indica que a proteína tem um papel na patogénese. Provavelmente, a expressão do gene só ocorrerá nas hifas durante o período do primeiro contacto com os tecidos do hospedeiro, cessando posteriormente. O mRNA correspondente à expressão inicial será degradado mas a elicítina formada nesse período permanecerá nos tecidos, continuando a exercer, ou não, a função que tornou necessária a sua síntese. Portanto os transcritos detectados corresponderão à expressão em hifas que se encontram na “frente de batalha” com o hospedeiro.

Fleischmann *et al.* (2005) examinaram a expressão do gene da citricolina,  $\alpha$ -elicítina de *P. citricola*, em tecidos radiculares de *Fagus sylvatica* através de RT-PCR em tempo real. O gene foi detectado seis horas após a inoculação, mas apenas aumentou significativamente a sua expressão três dias após a inoculação, atingido um máximo de expressão ao quinto. Através de RT-PCR semi-quantitativa, Huitema *et al.* (2005) detectaram a presença do transcrito do gene da infestina,  $\alpha$ -elicítina de *P. infestans*, um dia após a infecção de folhas de tomateiro, verificando-se a expressão mais alta deste gene quatro dias após a inoculação. O gene *acin* apresentou uma expressão que aumentou ao longo do tempo, mostrando o valor mais alto trinta e seis horas após a infecção. Este resultado está, globalmente, de acordo com os outros estudos efectuados em  $\alpha$ -elicítinas: as diferenças na escala temporal devem-se ao

método de infecção usado. No presente trabalho, o inóculo inicial foi mais abundante, o que permitiu uma mais célere colonização dos tecidos. Assim, terão sido atingidas mais rapidamente as condições que induzem o aumento da expressão. A expressão máxima destas elicinas aparece associada ao aparecimento de tecidos necróticos, numa fase do processo infeccioso em que é de esperar esporulação e, possivelmente, a sua função estará relacionada com algum destes fenómenos ou ainda com a sobrevivência do oomiceta de um modo saprofítico.

Foi sugerido, com base na conservação observada das zonas 5'UTR e dos peptídeos sinal dos genes das elicinas, (entre genes da mesma classe), que estas sequências estariam envolvidas na regulação diferencial destes genes (Ponchet *et al.*, 1999). Por outro lado, foi proposto que o agrupamento dos genes em *cluster* pode ser importante para a sua expressão simultânea (Jiang *et al.*, 2006). Os isolamentos de *P. cinnamomi* investigados no presente trabalho apresentaram uma expressão diferencial dos genes do *cluster* das elicinas, pois a quantidade de transcritos das diferentes classes detectados nas várias condições de cultura foi distinto. Por outro lado, os diferentes genes mostraram padrões de indução/repressão concertados relativamente aos pares localizados, entre si, a menor distância no *cluster* (*βcin* – *HAEacin* e *acin* – *HAEβcin*). Ou seja, seria de esperar que os genes *HAE* sofressem padrões de indução semelhantes, o que não aconteceu, pois, aparentemente, a expressão destes genes está sob regulação dos mesmos factores que controlam a expressão do gene da elicina canónica situado a jusante no *cluster*. Esta observação coloca, assim, duas hipóteses: ou as elicinas *HAE* possuem uma função relacionada com a função da expressão das elicinas canónicas que são expressas em períodos idênticos ou os transcritos *HAE* poderão ser, apenas, o fruto de pseudogenes, que são expressos apenas pela acção de factores que, actuando preferencialmente sobre os genes das elicinas canónicas, acabam, também, por induzir a expressão dos genes *HAE* mais próximos.

Dos resultados obtidos para a estirpe FATSS destaca-se que:

- A expressão do gene *βcin* não é detectável, bem como o gene *HAEacin*.
- O gene *acin* só é detectável após um período mais longo pós-infecção e a sua indução é menos acentuada, quando comparada com a do isolamento selvagem PA45.
- O gene *HAEβcin* só é detectável num estado avançado da infecção mas a sua expressão apresentou-se mais elevada do que no isolamento selvagem PA45.

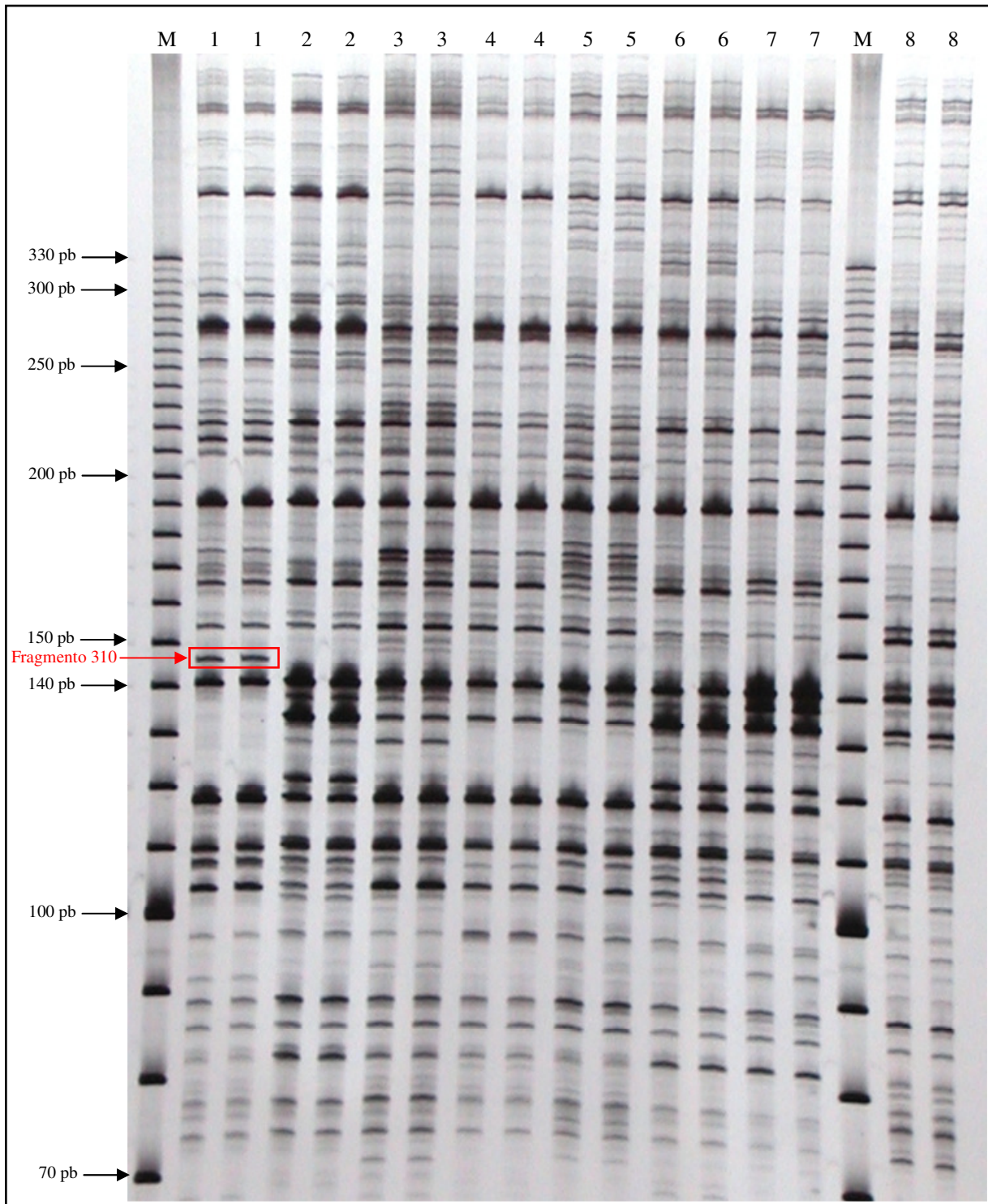
Os resultados mencionados nos dois primeiros pontos eram esperados, de acordo com o comportamento do co-transformante em culturas *in vitro*. O silenciamento do gene  $\beta cin$  manteve-se, assim, durante o crescimento *in planta*. Já o facto de gene  $HAE\beta cin$  apresentar uma expressão mais elevada do que no isolamento selvagem não era de prever. Contudo, este facto poderá dever-se aos erros na quantificação de um reduzido número de transcritos: nestes casos, as variações no valor de uma cópia podem levar a alterações significativas no resultado, dada a amplificação dessa variação no processo de normalização.

As principais conclusões retiradas destes trabalhos de quantificação de expressão dos genes das elicinas foram provenientes da análise dos isolamentos selvagens cultivados *in planta*. A expressão do gene da  $\beta$ -cinamomina no período inicial de colonização dos tecidos indica que esta proteína tem um papel a desempenhar no processo infeccioso. Por outro lado, a existência de padrões de expressão distintos para os genes da  $\beta$ - e da  $\alpha$ -cinamomina, que se manifestaram em fases diferentes do processo de patogénese, revela que estas proteínas, muito provavelmente, não possuem funções idênticas.

### III.3.2. Obtenção de perfis de RNA mensageiro: cDNA-AFLP

Na secção anterior deste capítulo foi descrita a quantificação da expressão dos genes das elicinas. Se estas proteínas estiverem relacionadas com uma função importante na biologia destes organismos, será lógico esperar que o silenciamento genético induzido ao gene  $\beta cin$  acarrete consequências a nível da expressão de outros genes, cujo papel esteja, de algum modo, associado ao das elicinas. Assim, a técnica de cDNA-AFLP foi usada tendo como objectivo primário a obtenção de perfis de expressão genética em que fosse possível identificar transcritos expressos de uma forma diferencial, como resultado da inibição da síntese de  $\beta$ -cinamomina.

A Figura III.8 exemplifica os perfis de expressão obtidos para algumas das amostras em estudo, com uma das combinações de *primers*.



**Figura III.8:** Um exemplo dos perfis de expressão obtidos por cDNA-AFLP gerados pela combinação de primers I19 (*EcoRI*-0; *MseI*-TGG). Na figura foi assinalado um dos fragmentos com expressão diferencial que foi clonado e sequenciado. As amostras foram corridas em duplicado para preservar intacto um perfil original após a excisão do fragmento.

(M) = Marcador molecular (30-330pb AFLP DNA Ladder, Invitrogen).

(1) = PA45, V<sub>8</sub>C, 15 dias

(2) = PA45, MSE, 15 dias

(3) = FATSS, V<sub>8</sub>C, 15 dias

(4) = PA37, V<sub>8</sub>C, 15 dias

(5) = PA45, V<sub>8</sub>C, 3 dias

(6) = PA45, MSE, 3 dias

(7) = FATSS, V<sub>8</sub>C, 3 dias

(8) = PA37, V<sub>8</sub>C, 3 dias

Como ponto de partida, seria de esperar que a expressão da cassete de resistência à higromicina desse origem a fragmentos que se iriam manifestar diferencialmente em relação aos isolamentos selvagens e estirpes transformadas. Contudo, o reconhecimento desses transcritos não era prioritário. Uma maneira de evitar a valorização desses transcritos seria identificar os transcritos ausentes em isolamentos selvagens mas presentes tanto na estirpe co-transformada (resistente ao antibiótico e com gene *βcin* silenciado) como na estirpe com transformação simples (resistente ao antibiótico). Porém, esta abordagem não se revelou viável, já que, nos trabalhos de transformação não foi possível gerar os dois tipos de transformantes a partir de um mesmo isolamento selvagem. Ou seja, como o co-transformante FATSS teve origem no isolamento selvagem PA45 e o transformante 13C derivou do isolamento selvagem PA37, não existia um fundo genético comum contra o qual se pudesse efectuar a subtracção de transcritos mencionada anteriormente. Estas diferenças foram confirmadas nos perfis genéticos obtidos para ambos os isolamentos selvagens, com o aparecimento de inúmeros polimorfismos, originados por expressão diferencial ou diferenças nas sequências de DNA. Por esse motivo, a análise focou-se essencialmente nos resultados alcançados para os isolamentos PA45 e FATSS.

Com base nos perfis obtidos com as oito combinações de primers utilizadas, foi possível identificar 348 fragmentos com uma expressão diferencial (presença/ausência da banda ou marcada diferença de intensidade) para os isolamentos PA45 e FATSS, nas condições estudadas (em meio V<sub>8</sub>C ou MSE, durante 3 ou 15 dias). A complexidade da distribuição destes fragmentos diferenciais revelou-se elevada. De entre estes transcritos, destacou-se a presença de:

- 19 fragmentos apenas presentes em PA45 cultivado em meio V<sub>8</sub>C durante 3 dias;
- 4 fragmentos apenas presentes em PA45 cultivado em meio V<sub>8</sub>C durante 15 dias;
- 5 fragmentos apenas presentes em PA45 cultivado em meio MSE durante 3 dias;
- 2 fragmentos apenas presentes em PA45 cultivado em meio MSE durante 15 dias;
- 6 fragmentos apenas presentes em FATSS cultivado em meio V<sub>8</sub>C durante 3 dias;
- 7 fragmentos apenas presentes em FATSS cultivado em meio V<sub>8</sub>C durante 15 dias;
- 2 fragmentos apenas presentes em PA45 cultivado em meio V<sub>8</sub>C (durante 3 e 15 dias);

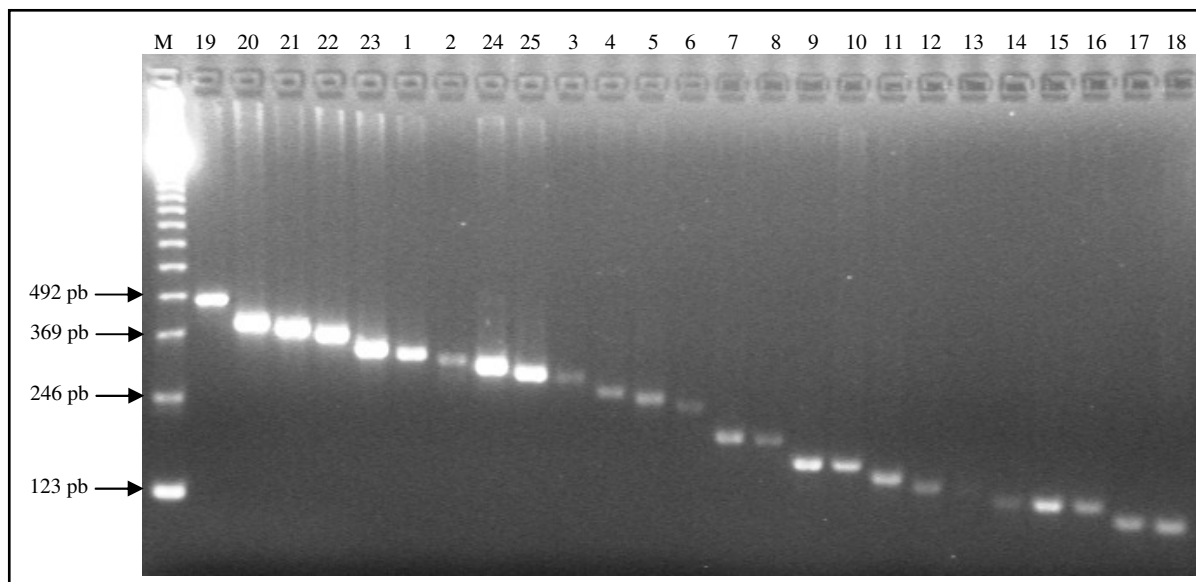
- 5 fragmentos apenas presentes em FATSS cultivado em meio V<sub>8</sub>C (durante 3 e 15 dias).

Muitas vezes a presença de transcritos diferenciais não mostrou uma lógica evidente, existindo, por exemplo, fragmentos apenas presentes nos perfis dos isolamentos PA45 cultivado em meio V<sub>8</sub>C durante 3 dias e do FATSS cultivado em meio V<sub>8</sub>C durante 15 dias ou fragmentos apenas presentes nos perfis dos isolamentos PA45 cultivado em meio MSE durante 15 dias e do FATSS cultivado em meio V<sub>8</sub>C durante 3 dias.

Apesar de certas associações de expressão serem, aparentemente, incongruentes, a técnica de cDNA-AFLP revelou-se um poderoso instrumento para abrir caminho na descoberta de genes cuja expressão está potencialmente associada à actividade das elicinas.

### III.3.2.1. Homologias das seqüências de fragmentos cDNA-AFLP

Todos os fragmentos cuja expressão se manifestou diferencial nos isolamentos e condições de cultura estudados foram excisados do gel e sujeitos a reamplificação. A Figura III.9 mostra um exemplo dos produtos obtidos.



**Figura III.9:** Visualização, por electroforese em gel de agarose (1%), dos produtos de reamplificação de 25 fragmentos cDNA-AFLP gerados diferencialmente pela combinação de *primers* I03 (*EcoRI*-ATG; *MseI*-ACC) e excisados do gel. Os números correspondem à identificação do fragmento. (M) = Marcador molecular (123pb *DNA Ladder*, Invitrogen).

Dos 50 fragmentos diferenciais referidos anteriormente, foi decidido iniciar a caracterização por sequenciação daqueles que, durante as reacções de reamplificação

apresentassem uma banda única, sem sinais de subprodutos não específicos. Nestas condições, foram identificados 37 transcritos, 22 dos quais foram aleatoriamente seleccionados e clonados.

As sequências nucleotídicas obtidas estão presentes no Anexo 10; três das sequências obtidas não apresentavam o tamanho esperado para o fragmento inicialmente clonado, nem sequer mostravam a presença dos adaptadores sintéticos. Não foi possível determinar as causas do falhanço destas sequenciações, pois todos os clones foram seleccionados com base em ensaios de restrição, que confirmaram a presença de insertos com o tamanho previsto.

A Tabela III.15 resume os dados obtidos para a pesquisa de homologias dos fragmentos sequenciados.

Na análise dos fragmentos diferencialmente expressos referidos adiante existe uma importante consideração a ser tida em atenção. O motivo da presença ou ausência de fragmentos de expressão diferencial que apenas estão presentes nos perfis obtidos a partir de um dos isolamentos (PA45 selvagem ou FATSS transformado) poderá residir em vários factores: na ausência da  $\beta$ -cinamomina ou nas alterações provocadas no metabolismo normal do patógeno derivadas da expressão da resistência ao antibiótico e/ou ainda, da inserção aleatória no genoma dos transgenes usados na transformação. Os polimorfismos observados entre os isolamentos PA45 e PA37 não permitiram o uso dos perfis obtidos para o transformante 13C na subtracção de fragmentos diferenciais derivados da expressão da resistência ao antibiótico e a existência de um só co-transformante derivado do isolamento PA45 não possibilita o afastamento da hipótese da inserção aleatória.

Apesar do grande aumento de informação genética disponível para o género *Phytophthora*, bem como para muitos outros organismos, para seis das sequências obtidas para os transcritos diferenciais não foi possível encontrar qualquer homologia. Guo *et al.* (2006), também, encontraram dificuldades na pesquisa de homologias para sequências derivadas de fragmentos de cDNA-AFLP obtidos em *P. infestans*: para 56% de 142 fragmentos sequenciados não foram obtidas semelhanças com sequências de EST já conhecidas e depositadas no GenBank ou nas bases de dados de EST de *P. infestans*. Pesquisas na base de dados portadora das sequências completas dos genomas de *P. sojae* e *P. ramorum* mostraram que mais de um terço dos transcritos não possui homólogos nestes organismos.

**Tabela III.15:** Homologias existentes entre fragmentos cDNA-AFLP que se expressam diferenciadamente e sequências presentes nas bases de dados.

Código do fragmento	Origem	Tamanho (pb) Combinação	Dados de Homologia Organismo; identificação da sequência Função associada Base de dados	Blast Score
2 A	PA45 – V <sub>8</sub> C, 3 dias	264 I03	<i>Phytophthora sojae</i> (Ps38061188) (mRNA) Proteína não classificada (função desconhecida) COGEME (TBLASTX)	5e <sup>-04</sup>
5 A	FATSS – V <sub>8</sub> C, 3 dias FATSS – V <sub>8</sub> C, 15 dias	203 I03	Homologia sem significado <sup>(1)</sup>	-
22 A	PA45 – V <sub>8</sub> C, 15 dias	319 I03	<i>Thiomicrospira crunogena</i> XCL-2 (ABB42016) (DNA) Hipotética proteína Tcr_1422 GENBANK (TBLASTX)	2e <sup>-10</sup>
29 A	FATSS – V <sub>8</sub> C, 15 dias	480 I01	Homologia sem significado <sup>(1)</sup>	-
45 C	PA45 – V <sub>8</sub> C, 3 dias	175 I01	<i>Phytophthora ramorum</i> (scaffold_122:156396-158296) (DNA) Carboxipeptidase lisossomal Pro-X <sup>(2)</sup> JGI (BLASTN)	1e <sup>-35</sup>
110 A	PA45 – V <sub>8</sub> C, 3 dias	644 I09	<i>Homo sapiens</i> (cromossoma 7)(NG_001333.1)(DNA) Zona não codificante GENBANK (BLASTN)	0
112 A	PA45 – V <sub>8</sub> C, 3 dias	558 I09	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (DQ172833.1) (DNA) Operão <i>Ant</i> (antranilato dioxigenase) GENBANK (BLASTN)	7e <sup>-180</sup>
119 C	FATSS – V <sub>8</sub> C, 3 dias FATSS – V <sub>8</sub> C, 15 dias	296 I09	<i>Phytophthora sojae</i> (scaffold_21:86281-88162) (DNA) Proteína semelhante a kanadaptina <sup>(2)</sup> JGI (BLASTN)	8e <sup>-31</sup>
150 E	FATSS – V <sub>8</sub> C, 3 dias FATSS – V <sub>8</sub> C, 15 dias	838 I10	<i>Phytophthora ramorum</i> (scaffold_36:139058-143071) (DNA) Proteína não classificada (função desconhecida) JGI (TBLASTX)	9e <sup>-45</sup>
169 B	FATSS – V <sub>8</sub> C, 3 dias	184 I10	Homologia sem significado <sup>(1)</sup>	-
175 D	PA45 – V <sub>8</sub> C, 3 dias	131 I10	Homologia sem significado <sup>(1)</sup>	-
185 A	FATSS – V <sub>8</sub> C, 3 dias	85 I10	Homologia sem significado <sup>(1)</sup>	-
204 A	FATSS – V <sub>8</sub> C, 15 dias	223 I17	<i>Homo sapiens</i> (BX571818)(DNA) Zona não codificante GENBANK (BLASTN)	2e <sup>-121</sup>
223 A	FATSS – V <sub>8</sub> C, 3 dias	566 I17	<i>Phytophthora sojae</i> (Ps_006_22629_Jun03) (RNAm) Citocromo c oxidase (subunidade 6b) PFGD (BLASTN)	e <sup>-113</sup>
255 A	PA45 – V <sub>8</sub> C, 3 dias	299 I18	<i>Propionibacterium acnes</i> KPA171202(AE017283)(DNA) Hipotética CoA ligase de ácido gordo de cadeia longa GENBANK (BLASTN)	4e <sup>-145</sup>
266 A	PA45 – V <sub>8</sub> C, 3 dias	206 I18	<i>Methylobacillus flagellatus</i> KT (CP000284.1)(DNA) Hipotética proteína Thi C (biossíntese da tiamina) GENBANK (BLASTN)	2e <sup>-32</sup>
267 A	PA45 – V <sub>8</sub> C, 3 dias PA45 – V <sub>8</sub> C, 15 dias	201 I18	<i>Homo sapiens</i> (AC026101)(DNA) Região de repetição GENBANK (BLASTN)	5e <sup>-94</sup>
275 B	FATSS – V <sub>8</sub> C, 15 dias	150 I18	<i>Homo sapiens</i> (AL592483.6)(DNA) Zona não codificante GENBANK (BLASTN)	5e <sup>-78</sup>
310 A	PA45 – V <sub>8</sub> C, 15 dias	113 I19	Homologia sem significado <sup>(1)</sup>	-

(1) As homologias foram consideradas sem significado sempre que  $\alpha \leq 10e^{-3}$ 

(2) Possível função do gene associado

A kanadaptina (*kidney anion exchanger adaptor protein*) foi identificada recentemente como sendo uma proteína com actividade de ligação ao domínio citoplasmático do transportador aniónico  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  independente de  $\text{Na}^+$  1, (kAE1, *kidney anion exchanger 1*) (Chen *et al.*, 1998). No entanto, a sua presença também foi abundantemente detectada em tecidos em que o kAE1 está ausente, pelo que esta proteína possuirá, muito presumivelmente, outras funções celulares (Hubner *et al.*, 2002). Esta hipótese é suportada pela sua estrutura com múltiplos domínios e com a existência de três agrupamentos de aminoácidos básicos que exibem semelhanças com sequências conhecidas para a localização nuclear de proteínas (NLSs, *Nuclear Localization Sequences*), que funcionam como sinais de translocação e retenção desta proteína para o núcleo, onde assumirá, possivelmente, um papel de sinalização. A kanadaptina é pois uma proteína cariofílica, capaz de residir tanto no núcleo como no citoplasma (Hubner *et al.*, 2000). O fragmento cDNA-AFLP 119 C codifica, hipoteticamente, uma proteína que apresenta semelhanças com a kanadaptina e foi identificado apenas em culturas da estirpe transformada FATSS e apresenta homologia com uma sequência derivada da sequenciação do genoma de *P. sojae*. Curiosamente, no modelo de silenciamento genético proposto por West *et al.* (1999a) para *P. infestans*, é considerada a intervenção de um factor de silenciamento difusível que actua em *trans* e se move entre núcleos. Este factor poderia ser uma proteína com as características acima mencionadas da kanadaptina.

A tiamina (vitamina B1) é amplamente conhecida como cofactor essencial de inúmeras enzimas envolvidas no metabolismo primário dos hidratos de carbono e aminoácidos, entre outras vias bioquímicas celulares. Erwin e Ribeiro (1996) efectuaram uma revisão das várias condições de cultura de *Phytophthora* spp, onde é reafirmada a exigência de uma fonte exógena de tiamina (vitamina B1) para o crescimento destes oomicetas. Por oposição, os membros do género *Pythium*, intimamente relacionado com *Phytophthora*, são capazes de sintetizar este composto. A dependência do fornecimento externo de tiamina em *Phytophthora* spp poderá, pois, derivar de uma mutação num dos genes intervenientes na via biossintética desta vitamina. O fragmento cDNA-AFLP 266 A apresenta uma sequência codificante para uma possível enzima envolvida na biossíntese da tiamina, expresso exclusivamente no meio V<sub>3</sub>C pelo isolamento selvagem PA45 com três dias de cultura. O facto da via biossintética da tiamina não estar completamente funcional no género *Phytophthora* não implica necessariamente que alguns dos seus componentes não continuem a expressar-se, nomeadamente num período em que o patogénio está numa fase de crescimento activo (com grandes exigências em cofactores) e o meio ambiente envolvente fornece os

estímulos adequados. Seria este o caso da jovem cultura do isolamento PA45 em meio complexo V<sub>8</sub>C. Dois dos genes mais abundantemente expressos pelo fungo fitopatogénico *Uromyces fabae* durante o seu crescimento *in planta* estão envolvidos na biossíntese da tiamina, indicando que este composto não está presente nas células do hospedeiro em quantidade suficiente para suportar o crescimento deste patogénio. (Hanh e Mendgen, 1997). Do mesmo modo, o micélio de *P. cinnamomi* poderá requerer maiores quantidades de vitamina B1 do que aquelas que o meio V<sub>8</sub>C fornece; a maquinaria celular predispõe-se a responder à chamada mas não chega ao produto final, e o crescimento observado resulta apenas das quantidades, limitantes, fornecidas externamente. O meio MSE é um meio definido e possui na sua composição tiamina; por isso, o fragmento 266 A não aparece nos perfis de expressão obtidos a partir de micélio nele cultivado, pois não existe a necessidade de activação da respectiva via biossintética; talvez seja este fornecimento exógeno de vitamina B1 que explique o aumento de biomassa mais acelerado tipicamente observado para micélio cultivado em MSE, quando comparado com micélio cultivado em V<sub>8</sub>C. As culturas com 15 dias também não apresentaram perfis com o fragmento 266 A porque são culturas envelhecidas, numa fase de crescimento quase nulo, em que a necessidade dos cofactores vitamínicos será diminuta. Seria interessante determinar a sequência completa do gene a partir do qual foi derivado este fragmento: isso permitiria desvendar se ele codifica para uma enzima não funcional ou se a interrupção da via biossintética da tiamina se localiza a outro nível. Por outro lado, é sempre possível que a enzima possa actuar sobre um substrato atípico e assuma funções diferentes daquela acima descrita.

A sequência do fragmento 255 A apresentou homologia com uma proteína CoA-ligase de ácidos gordos de cadeia longa e está ligada à biossíntese de lípidos. Em *Phytophthora* spp, como noutros microrganismos, a composição celular em ácidos gordos é fortemente influenciada por variáveis ambientais – substrato, tempo e temperatura de crescimento (Larkin e Groves, 2003). Será por isso de esperar que a transcrição de sequências relacionadas com as enzimas envolvidas na síntese desses lípidos também seja diferente, consoante as condições de crescimento, sendo esta a razão pela qual o fragmento 255 A foi apenas identificado no perfil de expressão obtido para o isolamento PA45 cultivado durante três dias em meio V<sub>8</sub>C e não nos perfis obtidos com meio MSE ou nas culturas com quinze dias do mesmo isolamento. Panabières *et al.* (2005) relataram a presença abundante de sequências relacionadas com a síntese de ácidos gordos (3,84%, 137 sequências num total de 3568) num banco de EST geradas a partir de micélio cultivado num meio sintético (semelhante ao MSE

usado no presente trabalho). Este facto é indicador de que o crescimento vegetativo observado *in vitro* é acompanhado por uma actividade de transcrição destinada à formação de reservas lipídicas. Estes autores também detectaram grande quantidade de transcritos de diferentes membros da família das elicitinas e, tendo em conta a função geral proposta para as elicitinas como proteínas ligantes de lípidos, foi sugerido que deveriam ser realizados estudos em várias condições fisiológicas de modo a determinar se existe uma expressão coordenada destes dois tipos de sequências: das elicitinas e de ESTs relevantes para o metabolismo dos lípidos. No presente trabalho foi constatada a ausência do transcrito 255 A, associado à síntese de ácidos gordos, nos perfis revelados para a estirpe transformada FATSS, que possui o gene *βcin* silenciado e apresenta uma diminuição na transcrição dos genes de outras elicitinas.

O excesso de aminoácidos, quer seja devido à sua presença enquanto nutriente fornecido pelo substrato de crescimento, quer seja pela degradação natural das proteínas celulares, leva muitas vezes à sua degradação. Os produtos do catabolismo das cadeias carbonadas dos aminoácidos convergem com as grandes vias do metabolismo; assim, a degradação dos aminoácidos pode gerar intermediários do ciclo do ácido cítrico, piruvato ou acetil-CoA. Por sua vez, estas moléculas vão alimentar a gluconeogénese (intermediários do ciclo do ácido cítrico) ou a formação de ácidos gordos ou corpos cetónicos (acetil-CoA) (Horton *et al.*, 1992). A sequência do fragmento 112 A, identificado apenas no perfil de expressão obtido para o isolamento PA45 cultivado durante três dias em meio V<sub>8</sub>C, apresentou homologia com a enzima antranilato dioxigenase, proteína envolvida numa via bacteriana de degradação do triptofano (Bundy *et al.*, 1998). O catabolismo do triptofano gera acetil-CoA (Horton *et al.*, 1992), pelo que está relacionado com a síntese de ácidos gordos. É de assinalar que foi observada a inexistência do transcrito 112 A, ligado, ainda que de uma forma indirecta, à síntese lipídica, nos perfis revelados para a estirpe transformada FATSS, que possui o gene *βcin* silenciado e apresenta uma diminuição na transcrição dos genes de outras elicitinas. A ausência do fragmento 112 A no perfil do isolamento PA45 cultivado em meio MSE durante três dias poderá apontar para o facto da via catabólica do triptofano estar inibida porque o triptofano disponível não atingiu os níveis de excesso celular ou porque a quantidade necessária de acetil-CoA está a ser fornecida ao micélio por outras vias bioquímicas. As culturas com 15 dias também não apresentaram perfis com o fragmento 112 A porque, sendo culturas envelhecidas, quer a quantidade de triptofano disponível, quer as possíveis carências nos intermediários gerados pela sua degradação, não serão assinaláveis e capazes de desencadear a via catabólica deste aminoácido.

A sequência do fragmento 223 A mostrou homologia com a subunidade 6b do complexo proteico citocromo c oxidase. Este complexo, que faz parte da cadeia transportadora de electrões localizada nas mitocôndrias, pode apresentar várias isoformas para algumas das suas subunidades e a expressão destas isoformas está sujeita a regulação (revisto por Grossmann e Lomax, 1997). O facto do transcrito 223 A apresentar expressão apenas no perfil obtido para a estirpe FATSS cultivada durante três dias em meio V<sub>8</sub>C pode significar que o micélio deste transformante cultivado nestas condições está sujeito a um desses mecanismos de regulação, que activa a transcrição de sequências associadas a esta subunidade 6b, o que não acontece para as outras culturas estudadas. A expressão diferencial de uma sequência com semelhanças a uma subunidade 6b da citocromo c oxidase também foi detectada num banco de EST gerado a partir de quistos germinados de *P. nicotianae* e não estava presente nos outros bancos de EST que foram gerados a partir de hifas em crescimento vegetativo, hifas em fase de esporulação, zoósporos ou tecidos infectados (Shan *et al.*, 2004).

A sequência do fragmento 45 C mostrou homologia com uma carboxipeptidase lisossomal, enzima associada à degradação de proteínas. A sua presença apenas identificada no perfil de expressão obtido para o isolamento PA45, cultivado durante três dias em meio V<sub>8</sub>C e não nos perfis obtidos com meio MSE ou nas culturas com quinze dias do mesmo isolamento, pode indicar uma actividade reguladora associada somente a certas circunstâncias. A estirpe transformada FATSS, sujeita às mesmas condições, não apresentou expressão deste transcrito, o que pode indicar uma deficiência a nível desses mecanismos de regulação.

Para os transcritos diferenciadamente expressos para os quais não foram encontradas homologias significativas ou que, mesmo mostrando homologia, não foi possível atribuir uma função celular, poucas considerações haverá a tecer. Possivelmente só a sequenciação completa dos genes associados a esses fragmentos poderá ajudar a elucidar os seus possíveis papéis biológicos, bem como uma nova consulta às bases de dados de sequências, que, estando em constante actualização, poderão vir a fornecer novas informações.

Resta acrescentar que, futuramente, deverá ser efectuada uma validação dos padrões de expressão do cDNA-AFLP obtidos. Isto é, a condição de transcrito diferencialmente obtido por cDNA-AFLP deverá ser confirmada por outros métodos, como por exemplo, *Northern blotting* ou amplificação RT-PCR específica.

Nesta fase do presente trabalho ficou demonstrado que o transformante FATSS possui alterações no seu perfil de expressão genética que vão para além da ausência de expressão do gene codificante da  $\beta$ -cinamomina. Fica por esclarecer em definitivo se os genes com expressão diferencial neste transformante têm funções em processos que são afectados pelo silenciamento desta elicítina. Nesta primeira fase de sequenciação foram identificados transcritos com funções particularmente interessantes e que apontam nesse sentido. Nomeadamente, os transcritos cujas sequências possuem homologias com genes potencialmente associados à biossíntese de lípidos poderão estar relacionados com a acção das elicítinas, já que a única função biológica atribuída, até à presente data, a esta família de proteínas, é a sua capacidade de ligação a moléculas do tipo lipídico.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS





## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Apesar da enorme quantidade de trabalhos publicados sobre os efeitos das elicinas nas plantas, poucos são os estudos divulgados sobre o papel intrínseco destas proteínas na biologia dos membros dos géneros produtores, *Phytophthora* e *Pythium*. A sua grande conservação e a sua síntese em condições de crescimento *in vitro* e *in planta* evidencia, sem dúvida, funções relevantes. O principal intuito dos trabalhos realizados no âmbito desta tese foi contribuir para o esclarecimento do papel biológico das elicinas durante o processo de patogénese.

A quantificação da expressão dos genes das elicinas efectuada em isolamentos selvagens de *P. cinnamomi*, cultivados *in planta*, mostrou que a transcrição dos genes da  $\beta$  e da  $\alpha$  cinamominas é activada em fases diferentes do processo infeccioso. Esta observação indica que estas proteínas, apesar de muito semelhantes, não possuem uma mesma função. Em alternativa, poderão funcionar como sucedâneos que melhor actuam em contextos distintos, face às alterações do meio circundante do patogénio que ocorrem durante a colonização dos tecidos. A expressão do gene da  $\beta$ -cinamomina no período inicial de infecção indica que esta elicina participa neste processo, nem que seja de uma forma indirecta.

O silenciamento genético constitui uma poderosa metodologia para a investigação de genes com função desconhecida. A sua aplicação ao gene  $\beta cin$  de *P. cinnamomi* foi alcançada, tendo sido possível verificar a ausência da proteína  $\beta$ -cinamomina em filtrados de meios de cultura e a ausência de expressão do respectivo mRNA no patogénio cultivado *in vitro* e *in planta*. Estes trabalhos, também forneceram mais uma evidência de que o mecanismo de silenciamento genético que actua em *Phytophthora* é localizado a nível da transcrição.

A estirpe transformada com o gene  $\beta cin$  silenciado manteve a capacidade de invadir e colonizar tecidos vegetais mas manifestou uma acentuada redução de virulência, deduzida pelo menor grau de gravidade dos sintomas de doença radicular apresentados por plantas de *Q. suber* infectadas com esta estirpe. Contudo, não foi possível provar que essa diminuição de patogenicidade se deveu à ausência da  $\beta$ -cinamomina, pois dificuldades na fase de transformação genética apenas permitiram a obtenção de um único transformante com o gene  $\beta cin$  silenciado. Por esse motivo, a inserção aleatória dos vectores plasmídicos, usados na transformação, no genoma hospedeiro, não poderá ser excluída das possíveis causas de quebra de virulência.

As modificações observadas no padrão de expressão genética da estirpe com o gene *βcin* silenciado permitiram identificar transcritos com expressão diferencial e cujas sequências possuem homologias com genes potencialmente associados à biossíntese de lípidos. Tendo em conta a actividade molecular demonstrada para as elicinas, de ligação e transporte de esteróis e outras moléculas de natureza lipídica, parece provável que pelo menos algumas das alterações no perfil genético do transformante estejam ligadas à ausência da  $\beta$ -cinamomina.

A maior dificuldade encontrada no decorrer destes trabalhos foi a recalcitrância à transformação genética observada nos isolamentos de *P. cinnamomi*. Ensaio futuros que recorram a esta metodologia neste microrganismo deverão fazer uso de novos vectores de transformação divulgados recentemente que, alegadamente, facilitam a transformação de oomicetas. Novas tentativas de silenciamento genético deverão recorrer à técnica de iRNA, que foi já demonstrada como exequível em *Phytophthora*. O uso de sequências curtas poderá facilitar o silenciamento conjunto de vários genes de uma mesma família, como é o caso das elicinas.

No enquadramento global em que se insere esta tese, estudo da doença do declínio do sobreiro e da azinheira provocada por *P. cinnamomi*, a existência de um transformante com patogenicidade reduzida é de grande utilidade. O estudo dos locais de inserção dos transgenes no genoma deste mutante e a continuação do trabalho de identificação e análise dos transcritos diferencialmente expressos poderá fornecer pistas importantes acerca da interacção planta-agente patogénico e, conseqüentemente, desvendar possíveis pontos de intervenção para o controlo da doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS





- Almeida, V. (1898). Acerca dos montados de sobro. *Agricultura contemporânea*. 8: 375-381.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schöffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25: 3389–3402.
- Aurélio, M.T. (1999) Expressão, purificação e actividade biológica da cinamomina  $\beta$  e de duas proteínas análogas. *Relatório de estágio da licenciatura em Bioquímica*. Universidade do Algarve, 110pp.
- Avila-Adame, C., Gomez-Alpizar, C., Zismann, V., Jones, K., Buell, C., Ristaino, J. (2006). Mitochondrial genome sequences and molecular evolution of the Irish potato famine pathogen. *Phytophthora infestans Current Genetics*. 49: 39–46.
- Avrova, A.O., Venter, E., Birch, P.R. and Whisson, S.C. (2003). Profiling and quantifying differential gene transcription in *Phytophthora infestans* prior to and during the early stages of potato infection. *Fungal Genetics and Biology*. 40, 4–14.
- Bachem, C.W.B., Oomen, R.J.F.J. and Visser, R.G.F. (1998). Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol. *Plant Molecular Biology Reports* 16: 157–173.
- Bachem, C.W.B., van der Hoeven, R.S., de Bruijn, S.M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M. and Visser, R.G.F. (1996). Visualisation of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal*. 9: 745–753.
- Bailey, A.M., Mena, G.L. and Herrera-Estrella, L. (1993). Transformation of four pathogenic *Phytophthora* spp by microprojectile bombardment on intact mycelia. *Current Genetics*. 23: 42-46.
- Baillieux, F., Fritig, B. and Kauffmann, S. (1996). Occurrence among *Phytophthora* species of a glycoprotein eliciting a hypersensitive response in tobacco and its relationships with elicitors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 9: 214-216.
- Baillieux, F., Genetet, I., Kopp, M., Saindrenan, P., Fritig, B. and Kauffmann, S. (1995). A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: a fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defence genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance. *Plant Journal*. 8: 551–560.
- Baillieux, F., Ruffray, P. and Kauffmann. (2003). Molecular cloning and biological activity of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -megaspermin, three elicitors secreted by *Phytophthora megasperma* H20. *Plant Physiology*. 131: 155-166.
- Balci, Y and Halmschlager, E. (2003). *Phytophthora* species in oak ecosystems in Turkey and their association with declining oak trees. *Plant Pathology*. 52:, 694–702.
- Barr DJS. The zoosporic grouping of plant pathogens—entity or nonentity. In: Buczaki ST, editor. Zoosporic Plant Pathogens, A modern Perspective. London: Academic Press, 1983. p. 43–83.
- Bartnicki-Garcia S. The cell wall: a crucial structure in fungal evolution. In: Rayner ADM, Brasier CM, Moore D, editors. Evolutionary Biology of the Fungi. UK: Cambridge University Press, 1987. p. 389–403.
- Becker, J., Nagel, S. and Tenhaken, R. (2000). Cloning, expression and characterization of protein elicitors from the soybean pathogenic fungus *Phytophthora sojae*. *Journal of Phytopathology*. 148: 161-167.
- Becktell, M. C., Smart, C.D., Haney, C.H. and Fry, W. E. (2006). Host-pathogen interactions between *Phytophthora infestans* and the Solanaceous hosts *Calibrachoa x hybridus*, *Petunia x hybrida* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Disease*. 90: 24-32.
- Benhamou, N., Belanger, R. R., Rey, P., and Tirilly, Y. (2001). Oligandrin, the elicitor-like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 39: 681-696.

- Beyer, K., Jimenez Jimenez, S., Randall, T.A., Lam, S., Binder, A., Boller, T., Collinge, M., (2002). Characterization of *Phytophthora infestans* genes regulated during the interaction with potato. *Molecular Plant Pathology*. 3: 473–485.
- Binet M., Humbert C., Lecourieux D., Vantard M., Pugin A. (2001). Disruption of microtubular cytoskeleton induced by cryptogein, an elicitor of hypersensitive response in tobacco cells. *Plant Physiology* 125: 564–572.
- Blancard D., Coubard C., Bonnet P., Lenoir M. and Ricci P. (1998). Mise en evidence d'une protection non spécifique induite par la cryptogéine sur tige et sur feuilles de tabac vis-a-vis de 5 champignons phytopathogènes. *Annales du Tabac*. 30: 11–20.
- Blanco, F. and Judelson, H. (2005). A bZIP transcription factor from *Phytophthora* interacts with a protein kinase and is required for zoospore motility and plant infection. *Molecular Microbiology*. 56: 638–648.
- Blein, J.-P., Coutos-Thévenot, P., Marion, D. and Ponchet, M. (2002). From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends in Plant Science*. 7: 293-296.
- Blein, J.P., Milat, M.L. and Ricci, P. (1991). Responses of cultured tobacco cells to cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Plant Physiology*. 95: 486-491.
- Boissy, G., de la Fortelle, E., Kahn, R., Huet, J.C., Bricogne, G., Pernollet, J.C. and Brunie, S. (1996). Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure*. 4:1429-1439.
- Boissy, G., O'Donohue, M., Gaudemer, Perez, V., Pernollet, J.C. and Brunie, S. (1999). The 2.1 Å structure of an elicitin-ergosterol complex: a recent addition to the sterol carrier protein family. *Protein Science*. 8: 1191-1199.
- Bonnet, P., Bourdon, E., Ponchet, M., Blein, J.P. and Ricci, P. (1996). Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *European Journal of Plant Pathology*. 102: 181-192.
- Bottin, A., Larche, L., Villalba, F., Gaulin, E., Esquerré-Tugayé, M.-T. and Rickauer, M. (1999). Green fluorescent protein (GFP) as gene expression reporter and vital marker for studying development and microbe-plant interaction in the tobacco pathogen *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *FEMS Microbiology Letters*. 176: 51-56.
- Bourque, S., Binet, M.-N., Ponchet, M. and Pugin, A. (1999). Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 34699-34705.
- Bourque, S., Lemoine, R., Sequeira-Légrand, A., Fayolle, L., Delrot, S. and Pugin, A. (2002). The elicitor cryptogein blocks glucose transport in tobacco cells. *Plant Physiology*. 130: 2177-2187.
- Bourque, S., Ponchet, M., Binet, M.N., Ricci, P., Pugin, A. and Lebrun-Garcia, A. (1998). Comparison of binding properties and early biological effects of elicitors in tobacco cells. *Plant Physiology*. 118:1317-1326.
- Brasier, C. M., (1996): *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Annals of Forest Science*. 53, 347–358.
- Brasier, C. M., Robredo, F., Ferraz, J. F. P., (1993): Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant Pathology*. 42, 140–145.
- Brasier, C.M. (1992). Oak tree mortality in Iberia. *Nature*. 360: 539.
- Brummer, M., Arend, M., Fromm, J., Schlenzig, A. and Oßwald, W.F. (2002). Ultrastructural changes and immunocytochemical localization of the elicitor quercinin in *Quercus robur* L. roots infected with *Phytophthora quercina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 61: 109-120.

- Buhot, N., Douliez, J. P., Jacquemard, A., Marion, D., Tran, V., Maume, B. F., Milat, M. L., Ponchet, M., Mikes, V., Kader, J. C., and Blein, J. P. (2001). A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses. *FEBS Letters*. 509: 27-30.
- Bundy, B.M., Cambell, A.L. and Neidle, E.L. (1998). Similarities between the antABC-encoded anthranilate dioxygenase and the benABC-encoded benzoate dioxygenase of *Acinetobacter* sp strain ADP1. *Journal of Bacteriology*. 180: 4466-4474.
- Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*. 25: 169-193.
- Byrt, P. and Grant, B.R. (1979). Some conditions governing zoospore production in axenic cultures of *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Australian Journal of Botany*. 27: 103-115.
- Câmara-Pestana, J. (1898). Nova doença dos sobreiros. *Arquivo Rural*. 36: 297-298.
- Charest, H. and Matlashewski, G. (1994). Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. *Molecular and Cellular Biology*. 14: 2975-2984.
- Chen, J., Vijayakumar, S., Li, X. and Al-Awqati, Q. (1998). Kanadaplin is a protein that interacts with the kudney but not the erythroid form of band 3. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 1038-1043.
- Chern, L.L., Tang, C.S. and Ko, W.H. (1999). Chemical characterization of  $\alpha$  hormones of *Phytophthora parasitica*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 40: 79-85.
- Churngchow, N. and Rattarasarn, M. (2000). The elicitin secreted by *Phytophthora palmivora*, a rubber tree pathogen. *Phytochemistry*. 54: 33-38.
- Cobos, J. M., Montoya, R., Tuset, J. J., (1993): New damage to *Quercus* woodlands in Spain. Preliminary evaluation of the possible implication of *Phytophthora cinnamomi*. In: Recent Advances in Studies on Oak Decline. Ed. by Luisi, N., Lerario, P., Vannini, A. Putignano: Tipolitografia Radio, pp. 163-170.
- Coelho, A.C. (2003). Estudo da biodiversidade molecular de *Quercus suber* e caracterização de genes envolvidos na resposta de defesa à infecção por *Phytophthora cinnamomi*. *Tese de Doutorado*, Universidade do Algarve, 389 pp.
- Coelho, A.C., Cravador, A., Bollen, A., Ferraz, J.F.P., Moreira, A.C., Fauconnier, A., Godfroid, E. (1997). Highly specific and sensitive non-radioactive identification of *Phytophthora cinnamomi*. *Mycological Research*. 101: 1499-1507.
- Cogoni, C., Ireland, J.T., Schumacher, M., Schmidhauser, T.J., Selker, E.U. and Macino, G. (1996). Transgene silencing of the al-1 gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *The EMBO Journal*. 15: 3153-3163.
- Colas, V., Conrod, S., Venard, P., Keller, H., Ricci, P. and Panabières, F. (2001). Elicitin genes expressed in vitro by certain tobacco isolates of *Phytophthora parasitica* are down regulated during compatible interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14: 326-335.
- Colot, V., Maloisel, L. and Rossignol, J.-L. (1996). Interchromosomal transfer of epigenetic states in *Ascobolus*: transfer of DNA methylation is mechanistically related to homologous recombination. *Cell*. 86: 855-864.
- Cordelier, S., Ruffray, P., Fritig, B. and Kauffmann, S. (2003). Biological and molecular comparison between localized and systemic acquired resistance induced in tobacco by a *Phytophthora megasperma* glycoprotein elicitin. *Plant Molecular Biology* 51: 109-118.
- Correia, T.P. (1993). Threatened landscape in Alentejo, Portugal: the “montado” and other “agro-silvo-pastoral” systems. *Landscape and Urban Planning*. 24: 43-48.

- Costet, L., Cordelier, S., Dorey, S., Baillieul, F., Fritig, B. and Kauffmann, S. (1999). Relationship between Localized Acquired Resistance (LAR) and the Hypersensitive Response (HR): HR is necessary for LAR to occur and salicylic acid is not sufficient to trigger LAR. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 12: 655-662.
- Cvitanich, C. and Judelson, H. (2003a). A gene expressed during sexual and asexual sporulation in *Phytophthora infestans* is a member of the Puf family of translational regulators. *Eukariotic Cell*. 2: 465-473.
- Cvitanich, C. and Judelson, H. (2003b). Stable transformation of the oomycete *Phytophthora infestans* using microprojectile bombardment. *Current Genetics*. 42: 228-235.
- Dahan, J., Etienne, P., Petitot, A.-S., Huot, V., Blein, J.-P. and Suty, L. (2001). Cryptogein affects expression of  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  and  $\beta 1$  20S proteasome subunits encoding genes in tobacco. *Journal of Experimental Botany*. 52: 1947-1948.
- Devergne J.-C., Bonnet P., Panabieres F., Blein J.-P. and Ricci, P. (1992). Migration of the fungal protein cryptogein within tobacco plants. *Plant Physiology*. 99: 843-847.
- Devergne, J.C., Fort, M.A., Bonnet, P., Ricci, P., Vergnet, C. Delaunay, T. and Grosclaude, J. (1994). Immunodetection of elicitors from *Phytophthora* spp. using monoclonal antibodies. *Plant Pathology*. 43: 885-896.
- Dhingra, O. and Sinclair, J. (1995). Basic Plant Pathology Methods. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Diatchenko, L., Lau, Y.-F., Campbel, A., Chenchik, A., Moqadam, F., Hyang, B., Lukyanov, S., Lukianov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. and Siebert, P. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue specific cDNAs probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 93: 6205-6030
- Dong, W.B., Latijnhouwers, M., Jiang, R.H.Y., Meijer, H.J.G., Govers, F. (2004). Downstream targets of the *Phytophthora infestans* G alpha subunit PiGPA1 revealed by cDNA-AFLP. *Molecular Plant Pathology*. 5: 483-494.
- Dorey, S., Baillieul, F., Pierrel, M.A., Saindrenan, P., Fritig, B. and Kauffmann, S. (1997). Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 10: 646-655.
- Dorey, S., Kopp, M., Geoffroy, P., Fritig, B. and Kauffmann, S. (1999). Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. *Plant Physiology*. 121: 163-171.
- Doyle EA. (2000). Structure-function analysis of *Phytophthora parasitica* elicitors. PhD thesis. University of California, Davis.
- Duclos, J., Fauconnier, A., Coelho, A.C., Bollen, A., Cravador, A. and Godfroid, E. (1998a). Identification of an elicitor gene cluster in *Phytophthora cinnamomi*. *DNA Sequence - Journal of Sequencing and Mapping*. 9: 231-237.
- Duclos, J., Trincão Aurélio, M., Graça, J., Coelho, A.C., Fauconnier, A., Jacquet, A., Bollen, A., Cravador, A., Biemans, R. and E. Godfroid, E. (1998b). Identification of an elicitor gene cluster in *Phytophthora cinnamomi* and analysis of the necrotic activity of a purified recombinant  $\beta$ -cinnamomin. *Med. Fac. Landbouww. Univv. Gent*, 63/4b.
- Dudler, R. (1990). The single-copy actin gene of *Phytophthora megasperma* encodes a protein considerably diverged from any other known actin. *Plant Molecular Biology*. 14: 415-422.
- Ebstrup, T., Saalbach, G. and Egsgaard, H. (2005). A proteomics study of in vitro cyst germination and appressoria formation in *Phytophthora infestans*. *Proteomics*. 5: 2839-2848.

- Edwards, K.J. and Saunders, N.A. (2001). Real-time PCR used to measure stress-induced changes in the expression of the genes of the alginate pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 29-37.
- Érsek, T., Schoelz, J.E., English, J.T. (1994). Characterization of selected drug resistant mutants of *Phytophthora capsici*, *P. parasitica* and *P. citrophthora*. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*. 29: 215-229.
- Erwin, D.C. and Ribeiro O.K. (1996). *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society Press, St Paul, Minnesota.
- Fabritius, A.-L., Cvitanich, C. and Judelson, H.S. (2002). Stage-specific gene expression during sexual development in *Phytophthora infestans*. *Molecular Microbiology*. 45: 1057-1066.
- Fefe, S., Bouaziz, S., Huet, J.C., Pernollet, J.C. and Guittet, E. (1997). Three-dimensional solution structure of  $\beta$ -cryptogein, a  $\beta$ -elicitin secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*. *Protein Science*. 6: 2279-2284.
- Ferreira, A., Lopes, F. and Pereira, H. (2000). Caracterisation de la croissance et de la qualité du liège dans une région de production. *Annals of Forest Science*. 57: 187-193.
- Fincham, J. (1989). Transformation in Fungi. *Microbiological Reviews*. 53: 148-170.
- Fleischmann, F., Koehl, J., Portz, R., Beltrame, A.B. and Oßwald, W. (2005). Physiological changes of *Fagus sylvatica* seedlings infected with *Phytophthora citricola* and the contribution of its elicitin "Citricolin" to pathogenesis. *Plant Biology*. 7: 650-658.
- Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C, Durner J (2000). Technical advance: in vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant Journal*. 23: 817-824.
- Fong, A.M. and Judelson, H.S. (2003). Cell cycle regulator Cdc 14 is expressed during sporulation but not hyphal growth in the fungus-like oomycete *Phytophthora infestans*. *Molecular Microbiology*. 50: 487-494.
- Fry, W.E. and Goodwin, S.B. (1997). Resurgence of the Irish potato famine fungus. *Bioscience*. 47: 363-371.
- Gajendran, K., Gonzales, M.D., Farmer, A., Archuleta, E., Win, J., Waugh, M.E. and Kamoun, S. (2006). *Phytophthora* functional genomics database (PFGD): functional genomics of *Phytophthora*-plant interactions. *Nucleic Acids Research*. Database issue D465-D470 doi:10.1093/nar/gkj119.
- Gallego, F. J., Perez de Algaba, A., Fernandez-Escobar, R., (1999): Etiology of oak decline in Spain. *European Journal of Forest Pathology*. 29: 17-27.
- Gaulin, E., Jauneau, A., Villalba, F., Rickauer, M., Esquerré-Tugayé, M.-T. and Bottin, A. (2002). The CBEL glycoprotein of *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae* is involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates. *Journal of Cell Science*. 115: 4565-4575.
- Gene Pulser* – Manual de Instruções. BIORAD.
- GeneAmp 5700 Sequence Detection System – User's Manual (1999). Perkin Elmer Corporation.
- Gooley, P.R., Keniry, M.A., Dimitrov, R.A., Marsh, D.E., Keizer, D.W., Gayler, K.R. and Grant, B.R. (1998). The NMR solution structure and characterization of pH dependent chemical shifts of the  $\beta$ -elicitin, cryptogein. *Journal of Biomolecular NMR*. 12: 523-534.
- Grant, B.R., Ebert, D. and Gaylerr K.R. (1996). Elicitins: proteins in search of a role? *Australasian Plant Pathology*. 25: 148-157.
- Grenville-Briggs, L., Avrova, A., Brucea, C.R., Williams, A., Whisson, S., Birch, P. and Van West, P. (2005). Elevated amino acid biosynthesis in *Phytophthora infestans* during appressorium formation and potato infection. *Fungal Genetics and Biology* 42: 244-256.

- Grossman, L.I. and Lomax, M.I. (1997). Nuclear genes for cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1352: 174-192.
- Guo, J., Jiang, R., Kamphuis, L., Govers, F. (2006). A cDNA-AFLP based strategy to identify transcripts associated with avirulence in *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology* 43: 111–123.
- Hahn, M. and Mendgen, K. (1997). Characterization of in planta-induced rust genes isolated from a haustorium-specific cDNA library. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 10: 427-437.
- Hardham, A. (2005). Pathogen profile: *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology*. 6: 589-604.
- Hardham, A.R. (2001). The cell biology behind *Phytophthora* pathogenicity. *Australasian Plant Pathology*. 30: 91–98.
- Heath, I.B. (1980). Variant mitosis in lower eukaryotes: indicators of the evolution of mitosis. *International Review of Cytology*. 64:1-80.
- Heiser, I., Fromm, J., Gieffing, M., Koehl, J., Jung, T., and Osswald, W. (1999). Investigations on the action of *Phytophthora quercina*, *P. citricola* and *P. gonapodyides* toxins on tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 37: 73–81.
- Hendrix, J.W. (1970). Sterols in growth and reproduction of fungi. *Annual Review of Phytopathology*. 8: 111-130.
- Hereford, L.M. and Rosbash, M. (1977). Number and distribution of polyadenylated RNA sequences in Yeast. *Cell*. 10: 453-462.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993). Kinetic PCR: real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11:1026–1030.
- Hirasawa, K., Amano, T. and Shioi Y. (2004). Lipid-binding form is a key conformation to induce a programmed cell death initiated in tobacco BY-2 cells by a proteinaceous elicitor of cryptogein. *Physiologia Plantarum*. 121: 196–203.
- Hirasawa, K., Amano, T. and Shioi Y. (2005). Effects of scavengers for active oxygen species on cell death by cryptogein. *Phytochemistry*. 66: 463–468.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., and Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 88: 7276–7280.
- Hollick, J.B., Dorweiler, J.E. and Chandler, V.L. (1997). Paramutation and related allelic interactions. *Trends en Genetics*. 13: 302-308.
- Horton, H. R., Moran, L. A., Ochs, R. S., Rawn, J. D. and Scrimgeour, K. G. (1992). *Principles of Biochemistry* (2<sup>nd</sup> Edn), Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Hubner, S., Jan, D.A., Xiao, C.-Y., John, A.P. and Drenckhahn, D. (2002). Signal- and importin-dependent nuclear targeting of the kidney anion exchanger 1-binding protein kanadaptin. *Biochemistry Journal*. 361: 287-296.
- Huet, J.C., Le Caer, J.P., Nespoulos, C. and Pernollet, J.C. (1995). The relationships between the toxicity and the primary and secondary structures of elicitinlike protein elicitors secreted by the phytopathogenic fungus *Pythium vexans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 8: 302-310.
- Huet, J.-C., Sallé-Tourne, M. and Pernollet, J.-C. (1994). Amino acid sequence and toxicity of the  $\alpha$ -elicitin secreted with ubiquitin by *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 7: 302-304.

- Huitema, E., Vleeshouwers, V.G.A.A., Cakir, C., Kamoun, S. and Govers, F. (2005). Differences in intensity and specificity of hypersensitive response induction in *Nicotiana* spp by INF1, INF2A and INF2B of *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18: 183-193.
- Jee, H.-J., Tang, C.-S. and Ko, W.-H. (2002). Characterization of phytochemicals stimulatory to sexual reproduction in *Phytophthora cactorum* and *P. parasitica*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 43: 203-210.
- Jeeffers, N. and Martins, J. (1986). Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease*. 70: 1038-1043.
- Jiang, D., Chen, X., Wu, K. and Guo, Z. (2004). Expression of cryptogein in tobacco plants exhibits enhanced disease resistance and tolerance to salt stress. *Chinese Science Bulletin*. 49: 803-809.
- Jiang, R.H.Y., Dawe, A.L., Weide, R., van Staveren, M., Peters, S., Nuss, D. and Govers, F. (2005). Elicitin genes in *Phytophthora infestans* are clustered and interspersed with various transposon-like elements. *Molecular Genetics and Genomics*. 273: 20-32.
- Jiang, R.H.Y., Tyler, B.M., Whisson, S.C., Hardham, A.R. and Govers, F. (2006). Ancient origin of elicitin gene clusters in *Phytophthora* genomes. *Molecular Biology and Evolution*. 23: 338-351.
- Judelson H. and Whittaker S. (1995). Inactivation of transgenes in *Phytophthora infestans* is not associated with their deletion, methylation, or mutation. *Current Genetics*. 28:571-579.
- Judelson, H. (1997). Expression and inheritance of sexual preference and selfing potential in *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology*. 21: 188-197.
- Judelson, H. J., B. M. Tyler, and R. W. Michelmore. (1992). Regulatory sequences for expressing genes in oomycete fungi. *Molecular. Genomics and Genetics*. 234: 138-146.
- Judelson, H. S. (1993). Intermolecular ligation mediates efficient cotransformation in *Phytophthora infestans*. *Molecular. Genomics and Genetics*. 239:241-250.
- Judelson, H., Dudler, R., Pieterse, C., Unkles, S. and Michelmore, E. (1993a). Expression and antisense inhibition of transgenes in *Phytophthora infestans* is modulated by choice of promoter and position effects. *Gene*. 133: 63-69.
- Judelson, H.S. (1996). Recent advances in the genetics of Oomycete plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 9: 443-449.
- Judelson, H.S. and Michelmore, R.W. (1991). Transient expression of genes in the oomycete *Phytophthora infestans* using *Bremia lactucae* regulatory sequences. *Current Genetics*. 19: 453-459.
- Judelson, H.S., Coffey, M.D., Arredondo, F.R. and Tyler, B.M. (1993b). Transformation of the oomycete pathogen *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* occurs by DNA integration into single or multiple chromosomes. *Current Genetics*. 23: 211-218.
- Judelson, H.S., Tyler, B.M. and Michelmore R.W. (1991). Transformation of the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 4: 602-607.
- Jung, T., Blaschke, H., Neumann, P. (1996). Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *European Journal of Forest Pathology*. 26: 253-272.
- Jung, T., Blaschke, H., Osswasld, W. (2000). Involvement of soilborne *Phytophthora* species in central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathology*. 49: 706-718.
- Kadota, Y., Watanabe, T., Fujii, S., Higashi, K., Sano, T., Nagata, T., Hasezawa, S. and Kuchitsu, K. (2004). Crosstalk between elicitor-induced cell death and cell cycle regulation in tobacco BY-2 cells. *The Plant Journal*. 40: 131-142.

- Kadota, Y., Watanabe, T., Fujii, S., Maeda, Y., Ohno, R., Higashi, K., Sano, T., Muto, S., Hasezawa, S. and Kuchitsu, K. (2005). Cell cycle dependence of elicitor-induced signal transduction in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiology*. 46: 156-165.
- Kamoun, S. (2001). Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Current Opinion in Plant Biology*. 4: 295–300.
- Kamoun, S. (2003). Molecular genetics of pathogenic Oomycetes. *Eukaryotic Cell*. 2: 191-199.
- Kamoun, S., Dong, S., Hamada, W., Huitema, E., Kinney, D., Morgan, W.R., Styer, A., Testa, A. and Torto, T.A. (2002). From sequence to phenotype: functional genomics of *Phytophthora*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 24: 6-9.
- Kamoun, S., Hamada, W. and Huitema, E. (2003). Agrosuppression: a bioassay for the hypersensitive response suited to high-throughput screening. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 16: 7-13.
- Kamoun, S., Hraber, P., Sobral, B., Nuss, D. and Govers, F. (1999a). Initial assesment of gene diversity for the oomycete pathogen *Phytophthora infestans* based on expressed sequences. *Fungal Genetics and Biology*. 28: 94-106.
- Kamoun, S., Huitema, E. and Vleeshouwers, V.G.A.A. (1999b). Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? *Trends in Plant Science*. 4: 196-200.
- Kamoun, S., Klucher, K.M., Coffey, M.D. and Tyler, B.M. (1993b). A gene encoding a host-specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 6: 573-581.
- Kamoun, S., Lindqvist, H. and Govers, F. (1997a). A novel class of elicitin-like genes from *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 10: 1028-1030.
- Kamoun, S., P. van West, and F. Govers. (1998c). Quantification of late blight resistance of potato using transgenic *Phytophthora infestans* expressing betaglucuronidase. *European Journal of Plant Pathology*. 104: 521–525.
- Kamoun, S., van der Lee, T., van den Berg, G., de Groot, K. E., and Govers, F. (1998a). Loss of production of the elicitor protein INF1 in the clonal lineage US-1 of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*. 88: 1315-1323.
- Kamoun, S., Van West, P., De Jong, A.J., De Groot, K.E., Vleeshouwers, V.G.A.A. and Govers, F. (1997b). A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 10: 13-20.
- Kamoun, S., van West, P., Vleeshouwers, V.G., de Groot, K.E. and Govers, F. (1998b). Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. *Plant Cell*. 10: 1413-1425.
- Kamoun, S., Young, M., Förster, H., Coffey, M.D. and Tyler, B. (1994). Potential role of elicitins in the interaction between *Phytophthora* species and tobacco. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 1593-1598.
- Kamoun, S., Young, M., Glascock, C. and Tyler, B. (1993a). Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 6:15-25.
- Kanzaki, H., Saitoh, H., Ito, A., Kamoun, S., Katou, S., Yoshioka, H. and Terauchi, R. (2003). Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Pathology*. 4: 383-391.
- Kasparovsky, T., Blein, J. P., and Mikes, V. (2004). Ergosterol elicits oxidative burst in tobacco cells via phospholipase A2 and protein kinase C signal pathway. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42, 429-435.

- Keller H, Bonnet P, Galiana E, Pruvot L, Friedrich L, Ryals J, Ricci P. (1996b). Salicylic acid mediates elicitin-induced systemic acquired resistance, but not necrosis in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 9: 696–703.
- Keller, H., Blein, J.P., Bonnet, P. and Ricci, P. (1996a). Physiological and molecular characteristics of elicitin-induced systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Physiology*. 110: 365–376.
- Keller, H., Pamboukdjian, N., Ponchet, M., Poupet, A., Delon, R., Verrier, J.L., Roby, D. and Ricci, P. (1999). Pathogen-induced elicitin production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *Plant Cell*. 11: 223-235.
- Kieffer F., Lherminier J., Simon-Plas F., Nicole M., Paynot M., Elmayan T. and Blein J.P. (2000) The fungal elicitor cryptogein induces cell wall modifications on tobacco cell suspension. *Journal of Experimental Botany*. 51: 1799–1811.
- Kim, K. S., and Judelson, H. S. (2003). Sporangia-specific gene expression in the oomyceteous phytopathogen *Phytophthora infestans*. *Eukaryotic Cell*. 2:1376-1385.
- Ko, W.-H. (1998). Chemical stimulation of sexual reproduction in *Phytophthora* and *Pythium*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 39: 81-86.
- Koehl, J., Osswald, W., Kohn, H., Elstner, E. F., and Heiser, I. (2003). Different responses of two tobacco cultivars and their cell suspension cultures to quercinin, a novel elicitor from *Phytophthora quercina*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 261–269.
- Larkin, R.P. and Groves C.L. (2003). Identification and characterization of isolates of *Phytophthora infestans* using fatty acid methyl ester (FAME) profiles. *Plant Disease*. 87: 1233-1243.
- Lascombe, M.B., Ponchet, M., Venard, P. Milat, M.L., Blein, J.P. and Pange, T. (2002). The 1.45 Å resolution structure of the cryptogein-cholesterol complex: a close-up view of a sterol carrier protein (SCP) active site. *Acta Crystallographica*. D58: 1442-1447.
- Latijnhouwers, M. and Govers, F. (2003). A *Phytophthora infestans* G-protein  $\beta$  subunit is involved in sporangium formation. *Eukaryotic Cell*. 2: 971–977.
- Latijnhouwers, M., Ligterink, W., Vleeshouwers, V.G., van West, P. and Govers, F. (2004). A G alpha subunit controls zoospore motility and virulence in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Microbiology*. 51: 925–936.
- Layton, A.C. and Kuhn, D.N. (1988). Heterokaryon formation by protoplast fusion of drug-resistant mutants in *Phytophthora megasperma* f.sp *glycinea*. *Experimental Mycology*. 12: 180: 194.
- Le Berre, J.Y., Panabières, F., Ponchet, F., Bonnet, P. Marais, A. and Ricci, P. (1994). Occurrence of multiple forms of elicitors in *Phytophthora cryptogea*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 32: 251-258.
- Lebrun-Garcia A, Ouaked F, Chiltz A, Pugin A (1998). Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant Journal*. 15: 773–781.
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R. and Pugin, A. (2002). Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *The Plant Cell*. 14: 2627–2641.
- Lecourieux-Ouaked, F., Pugin, A., and Lebrun-Garcia, A. (2000). Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco, *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 13: 821-829.
- Lee, L. G., Connell, C. R., and Bloch, W. (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Research* 21:3761–3766.

- Lherminier, J., Benhamou, N., Larrue, J., Milat, M.-L. Milat, Boudon-Padieu, E., Nicole, M., and Blein, J.-P. (2003). Cytological characterization of elicitin-induced protection in tobacco plants infected by *Phytophthora parasitica* or phytoplasma. *Phytopathology*. 93: 1308-1319.
- Li, B., Qian, X., Caruso, F.L., Singh, B., Sarkar, H. (2000). Cloning and sequence analysis of a *Phytophthora cinnamomi* gene which encodes for cinnamomin, a toxin with implications in root rot of cranberry. *Journal of Natural Toxins*. 9: 113-123.
- Lochman, J., Kasparovsky, T., Damborsky, J., Osman, H., Marais, A., Chaloupkova, R., Ponchet, M., Blein, J.P. and Mikes, V. (2005). Construction of cryptogein mutants, a proteinaceous elicitor of *Phytophthora*, with altered abilities to induce a defense reaction in tobacco cells. *Biochemistry*. 44: 6565-6572.
- Mao, Y. and Tyler, B.M. (1996). Cloning and sequence analysis of elicitin genes of *Phytophthora sojae*. *Fungal Genetics and Biology*. 20: 169-172.
- Matzke, M.A., Matzke, A.J.M. and Eggleston, W.B. (1996). Paramutation and transgene silencing, a common response to invasive DNA. *Trends in Plant Science*. 1: 382-388.
- Maurel, M., Robin, C., Simonneau, T., Loustau, D., Dreyer, E., and Desprez-Loustau, M. L. (2004). Stomatal conductance and root-to-shoot signalling in chestnut saplings exposed to *Phytophthora cinnamomi* or partial soil drying. *Functional Plant Biology*. 31: 41-51.
- McCarren, K. (2006). Saprophytic ability and the contribution of chlamydospores and oospores to the survival of *Phytophthora cinnamomi*. PhD thesis. University of Murdoch, Perth, Western Australia
- McLeod, A., Smart, C. and Fry, W. (2004). Core promoter structure in the oomycete *Phytophthora infestans*. *Eukaryotic Cell*. 3: 91-99.
- Meyer, P., Heidman, I. and Niedenhof, I. (1993). Differences in DNA methylation are associated with paramutation phenomenon in transgenic petunia. *Plant Journal*. 4: 86-100.
- Mikes, V., Milat, M.L., Ponchet, M., Panabières, F., Ricci, P. and Blein, J.-P. (1998). Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 245:133-139.
- Mikes, V., Milat, M.L., Ponchet, M., Ricci, P. and Blein, J.P. (1997). The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Letters*. 416: 190-192.
- Milat, M.L., Ducruet, J.M., Ricci, P., Marty, F., Blein, J.P. (1991). Physiological and structural changes in tobacco leaves treated with cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Phytopathology*. 81: 1364-1368.
- Mitchell, H.J., Kovac, K.A., Hardham, A.R. (2002). Characterisation of *Phytophthora Nicotianae* zoospore and cyst membrane. *Mycological Research*. 10: 1211-1223.
- Money, T., Reader, S., Qu, L., Dunford, R. and Moore, G. (1996). AFLP-based mRNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 24: 2616-2617.
- Moreira, A.C and Martins, J.M. (2005). Influence of site factors on the impact of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak stands in Portugal. *Forest Pathology*. 35: 145-162.
- Moreira-Marcelino, A.C.M. (2001). Aspectos da interação entre *Phytophthora cinnamomi* e a doença do declínio em *Q. suber* e *Q. rotundifolia*. *Tese de Doutorado*, Universidade do Algarve, 279 pp.
- Mort-Bontemps, M., and M. Fevre. 1997. Transformation of the oomycete *Saprolegnia monoica* to hygromycin-B resistance. *Current Genetics*. 31:272-275.
- Moy, P., Qutob, D., Chapman, P., Atkinson, I. and Gijzen, M. (2004). Patterns of gene expression upon infection of soybean plants by *Phytophthora sojae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17: 1051-1062.

- Murray, J.A.H. (1992). Antisense RNA and DNA. *Modern Cell Biology*.
- Mx4000™ Multiplex Quantitative PCR System Application Note #10 – Efficiency of PCR reactions. Stratagene.
- Nes, W. D. (1988). Phytophthorols – Novel lipids produced by *Phytophthora cactorum*. *Lipids*. 23: 9-16.
- Nes, W.D. and Heftmann, E. (1981). A comparison of triterpenoids with steroids as membrane components. *Journal of Natural Products*. 44: 377-400.
- Nespoulos, C., Gaudemer, O., Huet, J.C. and Pernollet, J.C. (1999). Characterization of elicitin-like phospholipases isolated from *Phytophthora capsici* culture filtrate. *FEBS Letters*. 452: 400-406.
- O'Donohue, M. J., Gousseau, H., Huet, J. C., Tepfer, D., and Pernollet, J. C. (1995). Chemical synthesis, expression and mutagenesis of a gene encoding beta-cryptogein, an elicitin produced by *Phytophthora cryptogea*. *Plant Molecular Biology*. 27: 577-586.
- Osman, H., Mikes, V., Milat, M. L., Ponchet, M., Marion, D., Prange, T., Maume, B. F., Vauthrin, S., and Blein, J. P. (2001a). Fatty acids bind to the fungal elicitor cryptogein and compete with sterols. *FEBS Letters*. 489:55-58.
- Osman, H., Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M. L., Panabieres, F., Marais, A., Brunie, S., Maume, B., Ponchet, M., and Blein, J. P. (2001b) Mediation of elicitin activity on tobacco is assumed by elicitin-sterol complexes. *Molecular Biology of the Cell*. 12: 2825–2834.
- Oßwald, W., Brummer, M., Fromm, J., Schlenzing, A., Koehl, J., Jung, T., Heiser, I. and Matyssek, R. (1999). Investigations on photosynthesis of oak seedlings infected with *Phytophthora quercina* and characterization of the *P. quercina* toxin quercinin. *Proceedings from the first international meeting on Phytophthoras in forest and wildland ecosystems*. Grant Pass, Oregon, pp 67-70.
- Panabières F., Ponchet M., Allasia V., Cardin L. and Ricci, P. (1997). Characterization of border species among Pythiaceae: several *Pythium* isolates produce elicitins, typical proteins from *Phytophthora* spp. *Mycological Research*. 101: 1459–1468.
- Panabières, F., Amselemb, J., Galiana, E. and Berre, J. (2005). Gene identification in the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica* during in vitro vegetative growth through expressed sequence tags. *Fungal Genetics and Biology* 42: 611–623.
- Panabières, F., Birch, P.R.J., Unkles, S.E., Ponchet, M., Lacourt, I., Venard, P., Keller, H., Allasia, V., Ricci, P. and Duncan, J.M. (1998). Heterologous expression of a basic elicitin from *Phytophthora cryptogea* in *Phytophthora infestans* increases its ability to cause leaf necrosis in tobacco. *Microbiology*. 144: 3343-3349.
- Panabières, F., Marais, A., Le Berre, J.-Y., Penot, I., Fournier, D. and Ricci, P. (1995). Characterization of a gene cluster of *Phytophthora cryptogea* which codes for elicitins, proteins inducing a hypersensitive-like response in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 8: 996-1003.
- Paquin, B., Laforest, M.-J., Forget, L., Roewer, I., Wang, Z., Longcore, J. and Lang, B.F. (1997). The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. *Current Genetics*. 31: 380–395.
- PE Biosystems. DNA/RNA Real Time Quantitative PCR.
- Peart, J. R., Lu, R., Sadanandom, A., Malcuit, I., Moffett, P., Brice, D. C., Schauser, L., Jaggard, D. A., Xiao, S., Coleman, M. J., Dow, M., Jones, J. D., Shirasu, K., and Baulcombe, D. C. (2002). Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 6: 10865-10869.
- Perez, V., Huet, J.C., Nespoulos, C. and Pernollet, J.C. (1997). Mapping the elicitor and necrotic sites of *Phytophthora* elicitins with synthetic peptides and reporter genes controlled by tobacco defense gene reporters. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 10: 750-760.

- Perez, V., Huet, J.C., O'Donohue, M.J., Nespoulos, C. and Pernollet, J.C. (1999) A novel elicitin necrotic site revealed by  $\alpha$ -cinnamomin sequence and site-directed mutagenesis. *Phytochemistry*. 50: 961-966.
- Pernollet, J.C., Sallatin, M., Sallé-Tourne, M. and Huet, J.C. (1993). Elicitin isoforms from seven *Phytophthora* species: comparison of their physico-chemical properties and toxicity to tobacco and other plant species. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 42: 53-67.
- Pfaffl, M. W. and Hageleit (2001). Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*. 23: 275-282.
- Pfaffl, M.W., Georgieva, T.M., I., Georgiev, I.P., Ontsouka, E., Hageleit, M., and Blum, J.W. (2002). Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. *Domestic Animal Endocrinology*. 22: 91-102.
- Pfaffl, M.W., Lange, I.G., Daxenberger, A. and Meyer, H.H.D. (2001). Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): quantification of ER( and ER( mRNA with Real-Time RT-PCR. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 109: 345-355.
- Picard, K., Ponchet, M., Blein, J. P., Rey, P., Tirilly, Y., and Benhamou, N. (2000). Oligandrin, a proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant Physiology*. 124: 379-395.
- Pieterse, C.M.J., Riach, M.B.R., Bleker, T., Van den Berg-Velthuis, G.C.M. and Govers, F. (1993). Isolation of putative pathogenicity gens of the potato blight fungus *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 43: 69-79.
- Pieterse, C.M.J., Van West, P., Verbakel, H.M., Brassé, P.W.H.M., Van den Berg-Velthuis, G.C.M. and Govers, F. (1994). Structure and genomic organization of the *ipiB* and *ipiO* gene clusters of *Phytophthora infestans*. *Genetics*. 138: 67-77.
- Pimentel, A. (1947). A *Phytophthora cinnamomi* Rands, um outro agente da tinta, extremamente virulento, da "Doença da tinta" do castanheiro. *Agronomia Lusitana*. 9: 181-191.
- Pinto, P. (2001). Identification and characterization of elicitins in *Phytophthora cambivora*. *Relatório de Estágio da Licenciatura em Engenharia Biotecnológica*, Universidade do Algarve, 53 pp.
- Pirrotta, V. (1997). Chromatin silencing mechanisms in *Drosophila* maintain patterns of expression. *Trends in Genetics*. 13: 314-318.
- Pirrotta, V. (1998) Polycomb the genome: PcG, TrxG and chromatin silencing. *Cell*. 93: 333-336.
- Ponchet, M., Panabières, F., Milat, M.-L., Mikes, V., Montillet, J.-L., Suty, L., Triantaphylides, C., Tirilly, Y. and Blein, J.-P. (1999). Are elicitins cryptograms in the plant –Oomycete communications? *Cellular and Molecular Life Sciences*. 56: 1020-1047.
- Prell, H. H., Karlovsky, P. and Bahnweg, G. (1991). Towards transformation in *Phytophthora nicotianae*. In "Phytophthora" (J. A. Lucas, R. C. Shattock, D. S. Shaw and L. R. Cooke, eds). pp 312-325. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Prévot, V. (2002). Isolation and characterization of the elicitin genes from *Phytophthora cambivora* and study of their expression in vivo. *Relatório de Estágio da Licenciatura em Engenharia Biotecnológica*, Universidade do Algarve, 96 pp.
- Pugin A, Frachisse JM, Tavernier E, Bligny R, Gout E, Douce R, Guern J (1997). Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant Cell*. 9: 2077-2091.

- Qutob, D., Hrabec, P. T., Sobral, B. W. S., and Gijzen, M. (2000). Comparative analysis of expressed sequences in *Phytophthora sojae*. *Plant Physiology*. 123: 243-253.
- Qutob, D., Huitema, E., Gijzen, M. and Kamoun, S. (2003). Variation in structure and activity among elicitors from *Phytophthora sojae*. *Molecular Plant Pathology*. 4: 119-124.
- Randall, T and Judelson, H. (1999). Construction of a artificial chromosome library of *Phytophthora infestans* and transformation of clones into *P. infestans*. *Fungal Genetics and Biology*. 28: 160-170.
- Randall, T.A., Dwyer, R.A., Huitema, E., Beyer, K., Cvitanich, C., Kelkar, H., Fong, A.M., Gates, K., Roberts, S., Yatzkan, E. *et al.* (2005). Large-scale gene discovery in the oomycete *Phytophthora infestans* reveals likely components of phytopathogenicity shared with true fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18: 229-243.
- Ricci, P. (1997). Induction of hypersensitive response and systemic acquired resistance by fungal proteins: the case of elicitors. In: *Plant-Microbe Interactions*, vol 3, pp 53-75, Stacey G. and Keen N.T. (eds), Chapman and Hall, New York.
- Ricci, P. Trentin, F., Bonnet, P., Venard, P., Mouton-Peronnet, F. and Bruneteau, M. (1992). Differential production of parasiticein, an elicitor of necrosis and resistance in tobacco, by isolates of *Phytophthora parasitica*. *Plant Pathology*. 41: 298-307.
- Ricci, P., Bonnet, P. Huet, J.C., Sallatin, M., Beauvais-Cante, F., Bruneteau, M., Billard, V., Micchel, G. and Pernollet, J.C. (1989). Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *European Journal of Biochemistry* 183: 555-563.
- Ricci, P., Panabières F. Bonnet, P., Mais, N., Ponchet, M., Devergne, J.-C. *et al.*, (1993). Proteinaceous elicitors of plant defense responses. In: *Mechanisms of plant defense responses*, pp 121-135, Fritig B. and Legrand M. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Rizzo, D.M., Garbelotto, M. and Hansen, E. (2005). *Phytophthora ramorum*: Integrative research and management of an emerging pathogen in California and Oregon Forests. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 309-335.
- Rizzo, D.M., Garbelotto, M., Davison, J.M., Slaughter, G.W. and Koike, S.T. (2001). A new *Phytophthora* canker disease as the probable cause of sudden oak death in California. *Phytopathology*. 91 (Suppl). S76 (Abst.).
- Robin, C., Desprez-Loustau, M. L., Capron, G., Delatour, C. (1998): First record of *Phytophthora cinnamomi* on cork and holm oaks in France and evidence of pathogenicity. *Annals of Forest Science*. 55, 869-883.
- Robin, C., Dupuis, F. and Desprez-Loustau, M. L. (1994). Seasonal changes in northern red oak susceptibility to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Disease*. 78: 369-374.
- Rodrigues, M.L., Archer, M., Martel, P., Jacquet, A., Cravador, A and Carrondo, M.A. (2002). Structure of  $\beta$ -cinnamomin, a protein toxic to some plant species. *Acta Crystallographica*. D58: 1314-1321.
- Rodrigues, M.L., Archer, M., Martel, P., Miranda, S., Thomaz, M., Enguita, F.J., Baptista, R.P., Melo, E.P., Sousa, N., Cravador, A., Carrondo, M.A. (2006). Crystal structures of the free and sterol-bound forms of  $\beta$ -cinnamomin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1764: 110-121.
- Rodriguez-Molina, M. C., Torres-Vila, L. M., Blanco-Santos, A., Palo-Nunez, E. J., Torres-Alvarez, E., 2002: Viability of holm and cork oak seedlings from acorns sown in soils naturally infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Forest Pathology*. 32, 365-372.
- Roussel, S., Nicole, M., Lopez, F., Ricci, P., Geiger, J.-P., Renard, M. and Brun, H. (1999). *Leptosphaeria maculans* and cryptogin induce similar vascular responses in tissues undergoing the hypersensitive reaction in *Brassica napus*. *Plant Science*. 144: 17-28.

- Rusterucci, C., Stallaert, V., Milat, M.-L., Pugin, A., Ricci, P., Blein, J.-P. (1996). Relationship between active oxygen species, lipid peroxides, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiology*. 111: 885–891.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanchez, M.E., Andicoberry, S. and Trapero, S. (2005). Pathogenicity of three *Phytophthora* spp causing late seedling rot of *Quercus ilex* ssp *ballota*. *Forest Pathology*. 35: 115-125.
- Sánchez, M.E., Caetano, P., Ferraz, J. and Trapero, A. (2002). *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in south-western Spain. *Forest Pathology*. 32: 5-18.
- Sancho, R. (1999). Contribution to the elucidation of the biological role of cinnamomin in *Phytophthora cinnamomi*. *Relatório de Estágio da Licenciatura em Engenharia Biotecnológica*. Universidade do Algarve. 63 pp.
- Sasabe, M., Takeuchi, K., Kamoun, S., Ichinose, Y., Govers, F., Toyoda, K., Shiraishi, T., Yamada, T. (2000). Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. *European Journal of Biochemistry*. 267: 5005–5013.
- Schmittgen, T.D. and Zakrajsek, B.A. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemistry and Biophysical Methods*. 46: 69-81.
- Schuurs, T.A., Schaeffer, A.M. and Wessels, J.G.H. (1997). Homology dependent silencing of the SC3 gene in *Schizophyllum commune*. *Genetics*. 147: 589-596.
- Shan, W. and Hardham, A.R. (2004). Construction of a bacterial artificial chromosome library, determination of genome size and characterization of an *Hsp70* gene family in *Phytophthora nicotianae*. *Fungal Genetics and Biology*. 41: 369-380.
- Shan, W., Marshall, J.S. and Hardham, A.R. (2004). Gene expression in germinated cysts of *Phytophthora nicotianae*. *Molecular Plant Pathology*. 5: 317–330.
- Sharma, P.C., Ito, A., Shimizu, T., Terauchi, R., Kamoun, S., Saitoh, H. (2003). Virus-induced silencing of WIPK and SIPK genes reduces resistance to bacterial pathogen, but has no effect on the INF1-induced hypersensitive response (HR) in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Genetics and Genomics*. 269: 583-591.
- Shearer, B. L., Tippett, J. T., (1989): Jarrah dieback: the dynamics and management of *Phytophthora cinnamomi* in the Jarrah (*Eucalyptus marginata*) forest of south-western Australia. *Western Australia Department of Conservation and Land Management Research Buletin*. 3: 1–76.
- Shepherd, S.J., van West, P., Gow, N.A.R., (2003). Proteomic analysis of asexual development of *Phytophthora palmivora*. *Mycological Research*. 103: 395–400.
- Sherman, J.M. and Pillus, L. (1997). An uncertain silence. *Trends in Genetics*. 13: 308-313.
- Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B. and Mauch, F. (2003). Quantification of induced resistance against *Phytophthora* species expressing GFP as a vital marker:  $\beta$ -aminobutyric acid but not BTH protects potato and Arabidopsis from infection. *Molecular Plant Pathology*. 4: 237–248.
- Simon-Plas F., Rusterucci C., Milat M.-L., Humbert C., Montillet J.-L. and Blein J.-P. (1997). Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Cell Environment*. 20: 1573–1579.
- Skalamera, D., Wasson, A.P., Hardham, A.R. (2004). Genes expressed in zoospores of *Phytophthora nicotianae*. *Molecular Genetics and Genomics*. 270: 549–557.

- Sogin M.L. and Silberman J.D. (1998). Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *International Journal for Parasitology*. 28: 11–20.
- Sousa, N. (2004). Produção de elicinas recombinantes de *Phytophthora cinnamomi*. *Tese de Mestrado*, Universidade do Algarve.
- Stallaert V. M., Ducruet J.-M., Tavernier E. and Blein J.-P. (1995). Lipid peroxidation in tobacco leaves treated with elicitor cryptogein: evaluation by high-temperature thermoluminescence emission and chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1229: 290–295.
- Steel, G. and Torrie, J. (1985). *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. Bogotá, MacGraw-Hill.
- Suty L., Blein J.P., Ricci P., Pugin, A. (1995). Early changes in gene expression in tobacco cells elicited with cryptogein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 8: 644–651.
- Tainter, F.H. (2000). *Phytophthora cinnamomi* as a cause of oak mortality in the state of Colima, México. *Plant Disease*. 84: 394-398.
- Takemoto, D., Hardham, A.R. and Jones, D.A. (2005). Differences in cell death induction by *Phytophthora* elicitors are determined by signal components downstream of MAK kinase kinase in different species of *Nicotiana* and cultivars of *Brassica rapa* and *Raphanus sativus*. *Plant Physiology*. 138: 1491-1504.
- Tani, S., Yatzkan, E., Judelson, H.S., (2004). Multiple pathways regulate the induction of genes during zoosporegenesis in *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 17: 330-337.
- Tavares, J.S. (1927). A doença dos castanheiros. *Brotéria*, Número especial sobre Agricultura. 15-17.
- Tavernier, E., Stallaert, V., Blein, J.P. and Pugin, A. (1995b). Changes in lipid composition in tobacco cells treated with cryptogein, an elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Plant Science*. 104: 117-125.
- Tavernier, E., Wendehenne, D., Blein, J.-P. and Pugin, A. (1995a). Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiology*. 109: 1025–1031.
- Templeton, M.D., Rikkerink, E.H.A. and Beever, R.E. (1994). Small, cystein-rich proteins and recognition in fungal-plant interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 3: 320-325.
- Tepfer, D., Boutteaux, C., Vigon, C. Aymes, S., Perez, V., O'Donohue, M., Huet, J.-C. and Pernollet, J.-C. (1998). *Phytophthora* resistance through production of a fungal protein elicitor ( $\beta$ -Cryptogein) in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 11: 64-67.
- Tercé-Laforge, T., Huet, J.-C., Pernollet, J.-C. (1992). Biosynthesis and secretion of cryptogein, a protein elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*. *Plant Physiology*. 98: 936-941.
- Torto, T.A., Li, S., Styer, A., Huitema, E., Testa, A., Gow, N.A., van West, P. and Kamoun, S. (2003). EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. *Genome Research*. 13: 1675–1685.
- Trigos, A., Castellanos-Onorio, O., Salinas, A. and Yanez-Morales, M.J. (2005). Ergosterol from *Phytophthora drechsleri*, a unusual metabolite of a member of this genus. *Mycopathologia*. 159: 469–471.
- Tyler, B. (2002). Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. *Annual Reviews of Phytopathology*. 40: 137-167.
- Tyler, B.M. (2001). Genetics and genomics of the Oomycete-host interface. *Trends in Genetics*. 17: 611-614.
- Unkles, S.E., Moon, R.P., Hawkins, A.R., Duncan, J.M. and Kinghorn, J.R. (1991). Actin in the oomycetous fungus *Phytophthora infestans* is the product of several genes. *Gene*. 100: 105-112.

- Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M.L., Ponchet, M., Maume, B., Osman, H. Blein, J.P. (1999). Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1419: 335-342.
- Velvescu, V.E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M.A., Basset Jr, D.E., Hieter, P., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1997). Characterization of the yeast transcriptome. *Cell*. 88: 243-251.
- Vettrai, A. M., Barzanti, G. P., Bianco, M. C., Ragazzi, A., Capretti, P., Paoletti, E., Luisi, N., Anselmi, N. and Vannini, A. (2002). Occurrence of *Phytophthora* species in oak stands in Italy and their association with declining oak trees. *Forest Pathology*. 32: 19–28.
- Viard, M.P., Martin, F., Pugin, A., Ricci, P. and Blein, J.P. (1994). Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. *Plant Physiology*. 104: 1245–1249.
- Vijn, I. and Govers, F. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology*. 4: 459-467.
- Vleeshouwers, V., Driesprong, J.-D., Kamphuis, L., Torto-Alalibo, T., Van't Slot, K., Govers, F., Visser, R., Jacobsen, E. and Kamoun, S. (2006). Agroinfection-based high-throughput screening reveals specific recognition of INF elicitors in *Solanum*. *Molecular Plant Pathology*. doi:10.1111/j.1364-3703.2006.00355.x
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van der Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23: 4407–4414.
- Wasseneger, M., Heimes, S., Riedel, L. and Sanger, H. (1994). RNA-mediated de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell*. 76: 567-576.
- Watson, J., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M. (1996). Recombinant DNA (2<sup>nd</sup>). Scientific American Books. Edition.
- Waugh, M., Hraber, P., Weller, J., Wu, Y., Chen, G., Inman, J. and Kiphart, D. and Sobral, B. (2000). The *Phytophthora* genome initiative database: informatics and analysis for distributed pathogenomic research. *Nucleic Acids Research*. 28: 87–90.
- Wendehenne, D. Binet, M.N., Blein, J.P., Ricci, P. and Pugin, A. (1995). Evidence for specific, high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. *FEBS Letters*. 374: 203-207.
- Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J.-M., Barbier-Brygoo, H. and Pugin, A. (2002). Nitrate efflux is an essential component signaling pathway leading to defense hypersensitive cell death in tobacco. *The Plant Cell*. 14: 1937–1951.
- West, P., Appiah, A. and Gow, N. (2003). Advances in research on oomycete root pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 62: 99–113.
- West, P., de Jong, A.J., Judelson, H.S., Emons, A.M.C. and Govers, F. (1998). The *ipiO* gene of *Phytophthora infestans* is highly expressed in invading hyphae during infection. *Fungal Genetics and Biology*. 23: 126-138.
- West, P., Kamoun, S., Van't Klooster, J.W. and Govers, F. (1999a). Internuclear gene silencing in *Phytophthora infestans*. *Molecular Cell*. 3: 339-348.
- West, P., Reid, B., Campbell, T.A., Sandrock, R.W., Fry, W.E., Kamoun, S. and Gow, N.A.R. (1999b). Green fluorescent protein (GFP) as a reporter gene for the plant pathogenic oomycete *Phytophthora palmivora*. *FEMS Microbiology Letters*. 178: 71-80.
- Whisson, S. C., van der Lee, T., Bryan, G. J., Waugh, R., Govers, F., and Birch, P. R. J. (2001). Physical mapping across an avirulence locus of *Phytophthora infestans* using a highly representative, large-insert bacterial artificial chromosome library. *Molecular Genetics and Genomics*. 266: 289-295.

- Whisson, S., Avrova, A., Van West, P. and Jones, J. (2005). A method for double-stranded RNA-mediated transient gene silencing in *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology*. 6:153–163.
- Win, J., Kanneganti, T.D., Torto-Alalibo, T., Kamoun, S. (2006). Computational and comparative analyses of 150 full-length cDNA sequences from the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology* 43: 20–33.
- Yan, H.-Z. and Liou, R.-F. (2006). Selection of internal control genes for real-time quantitative RT-PCR assays in the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*. *Fungal Genetics and Biology*. 43: 430–438.
- Yu, L.M. (1995). Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 92: 4088-4094.
- Zanetti, A., Beauvais, F., Huet, J. C., and Pernollet, J. C. (1992). Movement of elicitors, necrosis-inducing proteins secreted by *Phytophthora* spp, in tobacco. *Planta*. 187: 163–170.
- Zentmyer G.A. (1980). *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph No. 10. American Phytopathological Society, St Paul Minnesota, USA. pp 96.
- Zhang S, Du H, Klessig DF (1998). Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* 10: 435–449.
- Zhang S. and Klessig, D.F. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Science*. 6: 520–527.
- Zhang, S., Liu, Y. and Klessig, D.F. (2000). Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitors. *The Plant Journal*. 23: 339-347.



## ANEXOS





## Anexo 1 - Alinhamento de Sequências dos Genes *Hpt*

		1	60
hpt1 - U09715	(1)	-----ATGCCTGAACTCACC	CGACGCTCTGTCGAGAAGTTTCTGATCGAAAAAGTTCGAC
hpt2 - U40398	(1)	ATGAAAAGCCTGAACTCACC	CGACGCTCTGTCGAGAAGTTTCTGATCGAAAAAGTTCGAC
hpt3 - AF294982	(1)	ATGAAAAGCCTGAACTCACC	CGACGCTCTGTCGAGAAGTTTCTGATCGAAAAAGTTCGAC
Consensus	(1)	ATGAAAAGCCTGAACTCACC	CGACGCTCTGTCGAGAAGTTTCTGATCGAAAAAGTTCGAC
hpt1 - U09715	(55)	AGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTGCITTCAGCTTCGAT	120
hpt2 - U40398	(61)	AGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTGCITTCAGCTTCGAT	120
hpt3 - AF294982	(61)	AGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTGCITTCAGCTTCGAT	120
Consensus	(61)	AGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTGCITTCAGCTTCGAT	120
hpt1 - U09715	(115)	GTAGGAGGGCGTGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTCGCCGATGGTTTCTACAAAGAT	180
hpt2 - U40398	(121)	GTAGGAGGGCGTGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTCGCCGATGGTTTCTACAAAGAT	180
hpt3 - AF294982	(121)	GTAGGAGGGCGTGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTCGCCGATGGTTTCTACAAAGAT	180
Consensus	(121)	GTAGGAGGGCGTGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTCGCCGATGGTTTCTACAAAGAT	180
hpt1 - U09715	(175)	CGTTATGTTTTATCGGCACCTTTCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCITGACATT	240
hpt2 - U40398	(181)	CGTTATGTTTTATCGGCACCTTTCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCITGACATT	240
hpt3 - AF294982	(181)	CGTTATGTTTTATCGGCACCTTTCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCITGACATT	240
Consensus	(181)	CGTTATGTTTTATCGGCACCTTTCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCITGACATT	240
hpt1 - U09715	(235)	GGGGAATTAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTGTACAGTTG	300
hpt2 - U40398	(241)	GGGGAATTAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTGTACAGTTG	300
hpt3 - AF294982	(241)	GGGGAATTAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTGTACAGTTG	300
Consensus	(241)	GGGGAATTAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTGTACAGTTG	300
hpt1 - U09715	(295)	CAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTGCAGCCGGTTCGCGGAGGCCATGGAT	360
hpt2 - U40398	(301)	CAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTGCAGCCGGTTCGCGGAGGCCATGGAT	360
hpt3 - AF294982	(301)	CAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTGCAGCCGGTTCGCGGAGGCCATGGAT	360
Consensus	(301)	CAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTGCAGCCGGTTCGCGGAGGCCATGGAT	360
hpt1 - U09715	(355)	GCGATCGTGCAGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCCATTCGGACCGCAAGGA	420
hpt2 - U40398	(361)	GCGATCGTGCAGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCCATTCGGACCGCAAGGA	420
hpt3 - AF294982	(361)	GCGATCGTGCAGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCCATTCGGACCGCAAGGA	420
Consensus	(361)	GCGATCGTGCAGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCCATTCGGACCGCAAGGA	420
hpt1 - U09715	(415)	ATCGGTCAATAACTACACTACATGGCGTGATTTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTAT	480
hpt2 - U40398	(421)	ATCGGTCAATAACTACACTACATGGCGTGATTTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTAT	480
hpt3 - AF294982	(421)	ATCGGTCAATAACTACACTACATGGCGTGATTTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTAT	480
Consensus	(421)	ATCGGTCAATAACTACACTACATGGCGTGATTTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTAT	480
hpt1 - U09715	(475)	CACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAAGTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAG	540
hpt2 - U40398	(481)	CACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAAGTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAG	540
hpt3 - AF294982	(481)	CACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAAGTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAG	540
Consensus	(481)	CACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAAGTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAG	540
hpt1 - U09715	(535)	CTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCGAAGTCCGGCACCTCGTGCACGCGGATTCGGC	600
hpt2 - U40398	(541)	CTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCGAAGTCCGGCACCTCGTGCACGCGGATTCGGC	600
hpt3 - AF294982	(541)	CTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCGAAGTCCGGCACCTCGTGCACGCGGATTCGGC	600
Consensus	(541)	CTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCGAAGTCCGGCACCTCGTGCACGCGGATTCGGC	600
hpt1 - U09715	(595)	TCCAACAATGTCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTTCATTGACTGGAGCGAGGCG	660
hpt2 - U40398	(601)	TCCAACAATGTCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTTCATTGACTGGAGCGAGGCG	660
hpt3 - AF294982	(601)	TCCAACAATGTCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTTCATTGACTGGAGCGAGGCG	660
Consensus	(601)	TCCAACAATGTCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTTCATTGACTGGAGCGAGGCG	660
hpt1 - U09715	(655)	ATGTTTCGGGGATTCCTCAATACGAGGTCGCCAACATCTTCTTCTGGAGGCCGTGGTGGCT	720
hpt2 - U40398	(661)	ATGTTTCGGGGATTCCTCAATACGAGGTCGCCAACATCTTCTTCTGGAGGCCGTGGTGGCT	720
hpt3 - AF294982	(661)	ATGTTTCGGGGATTCCTCAATACGAGGTCGCCAACATCTTCTTCTGGAGGCCGTGGTGGCT	720
Consensus	(661)	ATGTTTCGGGGATTCCTCAATACGAGGTCGCCAACATCTTCTTCTGGAGGCCGTGGTGGCT	720
hpt1 - U09715	(715)	TGTATGGAGCAGCAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGCAGGATCGCC	780
hpt2 - U40398	(721)	TGTATGGAGCAGCAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGCAGGATCGCC	780
hpt3 - AF294982	(721)	TGTATGGAGCAGCAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGCAGGATCGCC	780
Consensus	(721)	TGTATGGAGCAGCAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGCAGGATCGCC	780
hpt1 - U09715	(775)	CGCTCCGGGCGTATATGCTCCGCATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGAC	840
hpt2 - U40398	(781)	CGCTCCGGGCGTATATGCTCCGCATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGAC	840
hpt3 - AF294982	(781)	CGCTCCGGGCGTATATGCTCCGCATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGAC	840
Consensus	(781)	CGCTCCGGGCGTATATGCTCCGCATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGAC	840

		841		900
hpt1 - U09715	(835)	GGCAATTCGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGA		
hpt2 - U40398	(841)	GGCAATTCGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGA		
hpt3 - AF294982	(841)	GGCAATTCGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGA		
Consensus	(841)	GGCAATTCGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGA		
		901		960
hpt1 - U09715	(895)	GCCGGGACTGTCGGGCGTACACAAATCGCCCCGAGAAGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGC		
hpt2 - U40398	(901)	GCCGGGACTGTCGGGCGTACACAAATCGCCCCGAGAAGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGC		
hpt3 - AF294982	(901)	GCCGGGACTGTCGGGCGTACACAAATCGCCCCGAGAAGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGC		
Consensus	(901)	GCCGGGACTGTCGGGCGTACACAAATCGCCCCGAGAAGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGC		
		961		1020
hpt1 - U09715	(955)	TGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAAACCGACGCCCCAGCACTCGTCCGA---GGGCA		
hpt2 - U40398	(961)	TGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAAACCGACGCCCCAGCACTCGTGGGATCGGGAG		
hpt3 - AF294982	(961)	TGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAAACCGACGCCCCAGCACTCGTCCGA---GGGCA		
Consensus	(961)	TGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAAACCGACGCCCCAGCACTCGTCCGA GGGCA		
		1021		1038
hpt1 - U09715	(1012)	AAGGAATAG-----		
hpt2 - U40398	(1021)	ATCGGGAGGCTAACTGA		
hpt3 - AF294982	(1018)	AAGGAATAG-----		
Consensus	(1021)	AAGGAATAG		

**Figura 2:** Alinhamento de sequências genéticas de genes *hpt* presentes no GenBank. A verde estão assinalados as zonas onde foram seleccionados *primers*.

## Anexo 2

### Teste de comparação de médias LSD (Mínima Diferença Significativa) das taxas de crescimento dos isolamentos

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Taxa de Crescimento

LSD

(I) Isolado	(J) Isolado	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PA45	FATSS -	,24233	,120875	,068	-,02103	,50570
	FATSS +	,45167*	,120875	,003	,18830	,71503
	PA37	,00100	,120875	,994	-,26236	,26436
	13C -	,26067	,120875	,052	-,00270	,52403
	13C +	,33300*	,120875	,017	,06964	,59636
FATSS -	PA45	-,24233	,120875	,068	-,50570	,02103
	FATSS +	,20933	,120875	,109	-,05403	,47270
	PA37	-,24133	,120875	,069	-,50470	,02203
	13C -	,01833	,120875	,882	-,24503	,28170
	13C +	,09067	,120875	,468	-,17270	,35403
FATSS +	PA45	-,45167*	,120875	,003	-,71503	-,18830
	FATSS -	-,20933	,120875	,109	-,47270	,05403
	PA37	-,45067*	,120875	,003	-,71403	-,18730
	13C -	-,19100	,120875	,140	-,45436	,07236
	13C +	-,11867	,120875	,346	-,38203	,14470
PA37	PA45	-,00100	,120875	,994	-,26436	,26236
	FATSS -	,24133	,120875	,069	-,02203	,50470
	FATSS +	,45067*	,120875	,003	,18730	,71403
	13C -	,25967	,120875	,053	-,00370	,52303
	13C +	,33200*	,120875	,018	,06864	,59536
13C -	PA45	-,26067	,120875	,052	-,52403	,00270
	FATSS -	-,01833	,120875	,882	-,28170	,24503
	FATSS +	,19100	,120875	,140	-,07236	,45436
	PA37	-,25967	,120875	,053	-,52303	,00370
	13C +	,07233	,120875	,561	-,19103	,33570
13C +	PA45	-,33300*	,120875	,017	-,59636	-,06964
	FATSS -	-,09067	,120875	,468	-,35403	,17270
	FATSS +	,11867	,120875	,346	-,14470	,38203
	PA37	-,33200*	,120875	,018	-,59536	-,06864
	13C -	-,07233	,120875	,561	-,33570	,19103

Based on observed means.

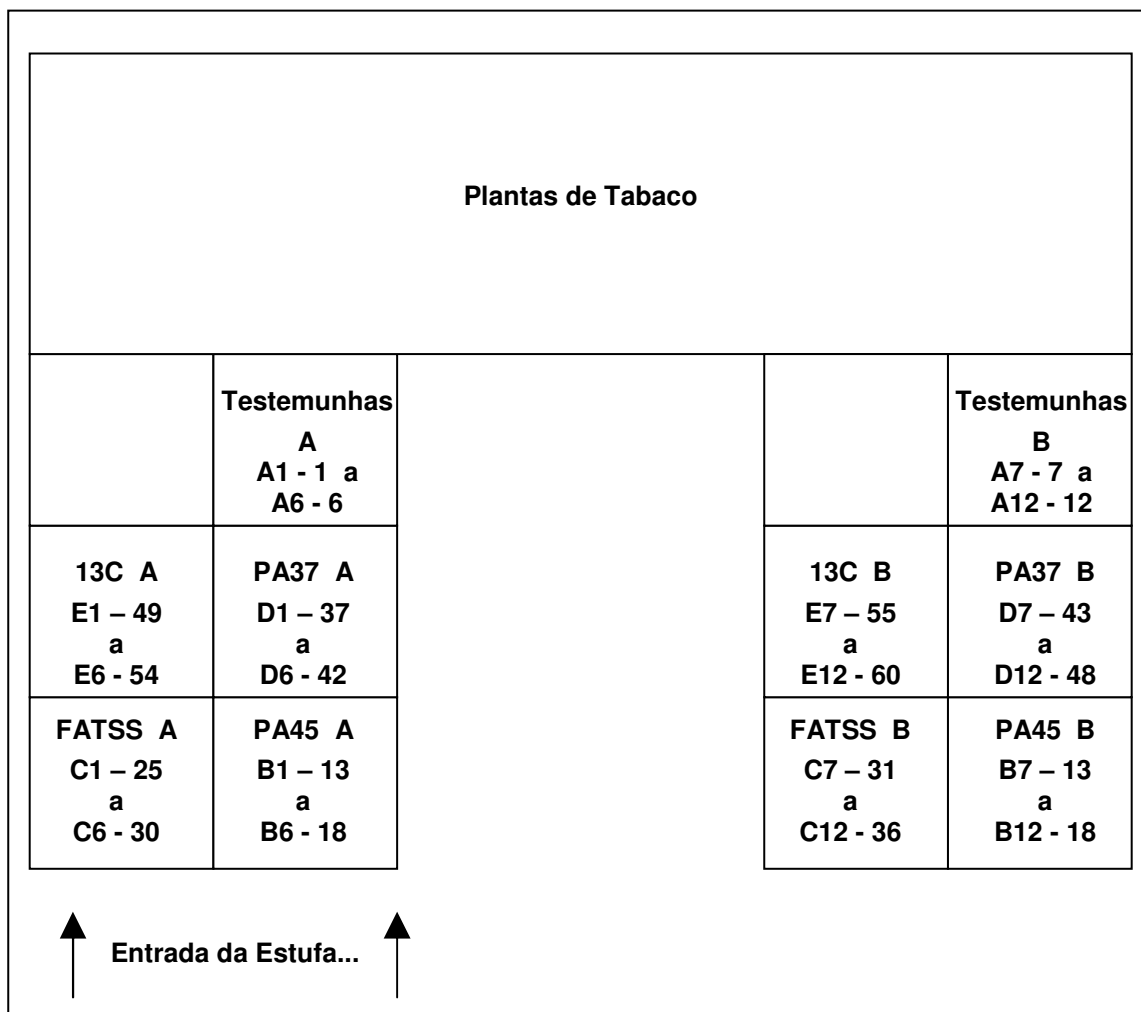
\*. The mean difference is significant at the ,05 level.

- Análise efectuada pelo programa SPSS 14,0 para Windows.
- Análise de variância efectuada a valores de taxas de crescimento dos isolamentos em meio V<sub>8</sub>Ca obtidas em três ensaios independentes (tabela das taxas de crescimento médias na página seguinte).
- (+) ou (-) junto da designação da estirpe significa presença ou ausência de higromicina B no meio de crescimento.

**Tabela 1:** Taxas de crescimento diárias para os isolamentos cultivados em meio V<sub>8</sub>Ca. (+) ou (-) junto da designação da estirpe significa presença ou ausência de higromicina B no meio de crescimento.

Isolamento	Taxa de crescimento média(cm/dia)				
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média Global	Desvio Padrão
PA45	1,383	1,574	1,295	1,417	0,143
FATSS -	1,028	1,373	1,124	1,175	0,178
FATSS +	0,817	1,171	0,909	0,966	0,184
PA37	1,393	1,510	1,346	1,416	0,085
13C -	0,974	1,279	1,000	1,084	0,169
13C +	1,086	1,271	1,113	1,157	0,100

### Anexo 3 - Distribuição das plantas na estufa



**Figura 3:** Esquema da distribuição das plantas de *Quercus suber* usadas nos testes de patogenicidade no espaço da estufa.

- 13C é a estirpe transformada com resistência à higromicina; PA37 é o seu homólogo selvagem.
- FATSS é a estirpe transformada com resistência à higromicina e em que também foi abolida a expressão da  $\beta$ -cinamomina; PA45 é o seu homólogo selvagem.
- Testemunhas são plantas não infestadas.
- As plantas foram numeradas de 1 a 60 numa contagem global e de 1 a 12 dentro de cada grupo de plantas infectadas com um dado isolamento.
- Cada grupo de plantas foi dividido nos subgrupos A e B, colocados em duas zonas distintas da estufa.



## Anexo 4

### Avaliação das plantas de *Q. suber* envolvidas nos testes de patogenicidade

Tabela 2: Graus de severidade dos sintomas obtidos para os testes de virulência em plantas de *Q. suber*.

Grupo	Planta	Parte Aérea	Raiz
Plantas Testemunha	1*	2	3
	2	0,3	0,7
	3	0,5	0,5
	4*	1	2,3
	5	3,5	2,0
	6	0,5	0,5
	7	0,7	1,0
	8	0,5	0,5
	9	0,7	0,5
	10	1,7	1,7
	11	0,5	1,0
	12	0,7	0,7
Plantas infectadas com o isolamento PA45	1	3,0	3,3
	2	2,0	3,0
	3	3,3	2,5
	4	1,7	3,5
	5	3,0	3,0
	6	3,5	3,0
	7	3,0	3,0
	8	2,5	3,3
	9	3,0	3,5
	10*	2,5	2
	11	3,0	2,5
	12	1,0	2,5
Plantas infectadas com a estirpe FATSS	1	1,5	3,0
	2*	3	3,3
	3	1,0	1,5
	4	0,7	2,0
	5	1,0	2,5
	6	1,0	0,7
	7	1,0	1,0
	8	1,0	0,7
	9	1,0	1,3
	10	1,0	0,7
	11	1,5	1,3
	12	0,5	1,3
Plantas infectadas com o isolamento PA37	1	1,7	2,5
	2	2,5	3,5
	3	1,7	3,0
	4	3,3	3,7
	5	2,7	3,0
	6	0,7	3,0
	7	3,0	3,0
	8	3,0	3,5
	9	2,3	3,5
	10	2,7	3,3
	11	1,7	3,0
	12*	0,7	2,5
Plantas infectadas com a estirpe 13C	1	3,0	3,7
	2	0,7	3,0
	3	1,0	1,5
	4	3,5	3,7
	5	2,7	3,7
	6*	0,3	0,7
	7	0,7	1,7
	8	0,5	2,0
	9	0,7	2,5
	10	0,7	2,0
	11	0,7	1,5
	12	0,7	1,0

(\*) Planta excluída da análise

## Resultados da detecção de *outliers* nos valores dos graus de severidade dos sintomas através do teste de Grubb

(Cálculos efectuados com o aplicativo disponível em <http://www.graphpad.com/quickcalcs/GrubbsHowTo.cfm>)

### Descriptive Statistics - Testemunhas - Raiz

Mean: 1.200

SD: 0.846

# of values: 12

Outlier detected? No

Significance level: 0.05 (two-sided)

Critical value of Z: 2.41155889919

Row	Value	Z	Significant Outlier?
1	3.0	2.127	Furthest from the rest, but not a significant outlier (P > 0.05).
2	0.7	0.591	
3	0.5	0.827	
4	2.3	1.300	
5	2.0	0.945	
6	0.5	0.827	
7	1.0	0.236	
8	0.5	0.827	
9	0.5	0.827	
10	1.7	0.591	
11	1.0	0.236	
12	0.7	0.591	

### Descriptive Statistics - PA45, Raiz

Mean: 2.925

SD: 0.463

# of values: 12

Outlier detected? No

Significance level: 0.05 (two-sided)

Critical value of Z: 2.41155889919

Row	Value	Z	Significant Outlier?
1	3.3	0.809	
2	3.0	0.162	
3	2.5	0.917	
4	3.5	1.241	
5	3.0	0.162	
6	3.0	0.162	
7	3.0	0.162	
8	3.3	0.809	
9	3.5	1.241	
10	2.0	1.996	Furthest from the rest, but not a significant outlier (P > 0.05).
11	2.5	0.917	
12	2.5	0.917	

### Descriptive Statistics - FATSS, Raiz

Mean: 1.608

SD: 0.899

# of values: 12

Outlier detected? No

Significance level: 0.05 (two-sided)

Critical value of Z: 2.41155889919

Row	Value	Z	Significant Outlier?
1	3.0	1.548	
2	3.3	1.882	Furthest from the rest, but not a significant outlier (P > 0.05)
3	1.5	0.121	
4	2.0	0.436	
5	2.5	0.992	
6	0.7	1.010	
7	1.0	0.677	
8	0.7	1.010	
9	1.3	0.343	
10	0.7	1.010	
11	1.3	0.343	
12	1.3	0.343	

**Descriptive Statistics - PA37, Raiz**

Mean: 3.125

SD: 0.386

# of values: 12

Outlier detected? No

Significance level: 0.05 (two-sided)

Critical value of Z: 2.41155889919

Row	Value	Z	Significant Outlier?
1	2.5	1.617	Furthest from the rest, but not a significant outlier (P > 0.05).
2	3.5	0.970	
3	3.0	0.323	
4	3.7	1.488	
5	3.0	0.323	
6	3.0	0.323	
7	3.0	0.323	
8	3.5	0.970	
9	3.5	0.970	
10	3.3	0.453	
11	3.0	0.323	
12	2.5	1.617	

**Descriptive Statistics - PA37, Aérea**

Mean: 2.167

SD: 0.870

# of values: 12

Outlier detected? No

Significance level: 0.05 (two-sided)

Critical value of Z: 2.41155889919

Row	Value	Z	Significant Outlier?
1	1.7	0.536	
2	2.5	0.383	
3	1.7	0.536	
4	3.3	1.303	
5	2.7	0.613	
6	0.7	1.686	Furthest from the rest, but not a significant outlier (P > 0.05).
7	3.0	0.958	
8	3.0	0.958	
9	2.3	0.153	
10	2.7	0.613	
11	1.7	0.536	
12	0.7	1.686	

**Descriptive Statistics - 13C, Raiz**

Mean: 2.250

SD: 1.064

# of values: 12

Outlier detected? No

Significance level: 0.05 (two-sided)

Critical value of Z: 2.41155889919

Row	Value	Z	Significant Outlier?
1	3.7	1.363	
2	3.0	0.705	
3	1.5	0.705	
4	3.7	1.363	
5	3.7	1.363	
6	0.7	1.457	Furthest from the rest, but not a significant outlier (P > 0.05).
7	1.7	0.517	
8	2.0	0.235	
9	2.5	0.235	
10	2.0	0.235	
11	1.5	0.705	
12	1.0	1.175	

## Teste de comparação de médias LSD (Mínima Diferença Significativa)

### para a avaliação da severidade dos sintomas das plantas

(Análise efectuada pelo programa SPSS 14,0 para Windows)

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Raiz

LSD

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
controlo	PA45	-2,099*	,2849	,000	-2,672	-1,527
	FATSS	-,545	,2849	,062	-1,117	,028
	PA37	-2,272*	,2849	,000	-2,844	-1,699
	13C	-1,481*	,2849	,000	-2,053	-,908
PA45	controlo	2,099*	,2849	,000	1,527	2,672
	FATSS	1,555*	,2780	,000	,996	2,113
	PA37	-,173	,2780	,537	-,731	,386
	13C	,618*	,2780	,031	,059	1,177
FATSS	controlo	,545	,2849	,062	-,028	1,117
	PA45	-1,555*	,2780	,000	-2,113	-,996
	PA37	-1,727*	,2780	,000	-2,286	-1,169
	13C	-,936*	,2780	,001	-1,495	-,378
PA37	controlo	2,272*	,2849	,000	1,699	2,844
	PA45	,173	,2780	,537	-,386	,731
	FATSS	1,727*	,2780	,000	1,169	2,286
	13C	,791*	,2780	,006	,232	1,350
13C	controlo	1,481*	,2849	,000	,908	2,053
	PA45	-,618*	,2780	,031	-1,177	-,059
	FATSS	,936*	,2780	,001	,378	1,495
	PA37	-,791*	,2780	,006	-1,350	-,232

Based on observed means.

\*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Dependent Variable: Aereo

LSD

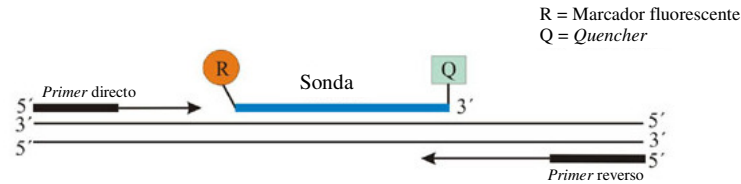
(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
controlo	PA45	-1,676*	,3622	,000	-2,404	-,948
	FATSS	-,058	,3622	,873	-,786	,670
	PA37	-1,340*	,3622	,001	-2,068	-,612
	13C	-,395	,3622	,281	-1,122	,333
PA45	controlo	1,676*	,3622	,000	,948	2,404
	FATSS	1,618*	,3535	,000	,908	2,329
	PA37	,336	,3535	,346	-,374	1,047
	13C	1,282*	,3535	,001	,571	1,992
FATSS	controlo	,058	,3622	,873	-,670	,786
	PA45	-1,618*	,3535	,000	-2,329	-,908
	PA37	-1,282*	,3535	,001	-1,992	-,571
	13C	-,336	,3535	,346	-1,047	,374
PA37	controlo	1,340*	,3622	,001	,612	2,068
	PA45	-,336	,3535	,346	-1,047	,374
	FATSS	1,282*	,3535	,001	,571	1,992
	13C	,945*	,3535	,010	,235	1,656
13C	controlo	,395	,3622	,281	-,333	1,122
	PA45	-1,282*	,3535	,001	-1,992	-,571
	FATSS	,336	,3535	,346	-,374	1,047
	PA37	-,945*	,3535	,010	-1,656	-,235

Based on observed means.

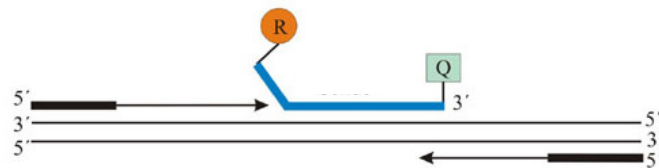
\*. The mean difference is significant at the ,05 level.

## Anexo 5 - Tecnologia *Taqman* e PCR em Tempo Real

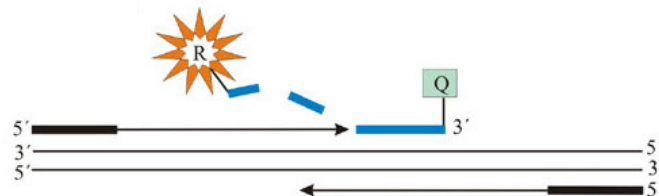
1. Hibridação específica dos *primers* e da sonda *Taqman*.



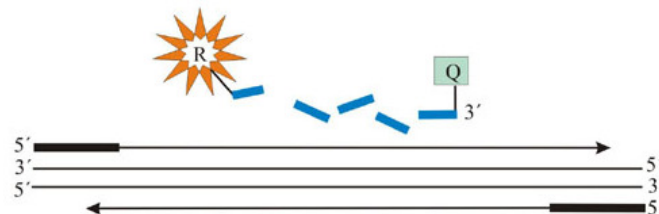
2. Extensão da cadeia e deslocação da sonda.



3. Separação do marcador repórter e emissão de fluorescência.



4. Clivagem da sonda e extensão final da cadeia.



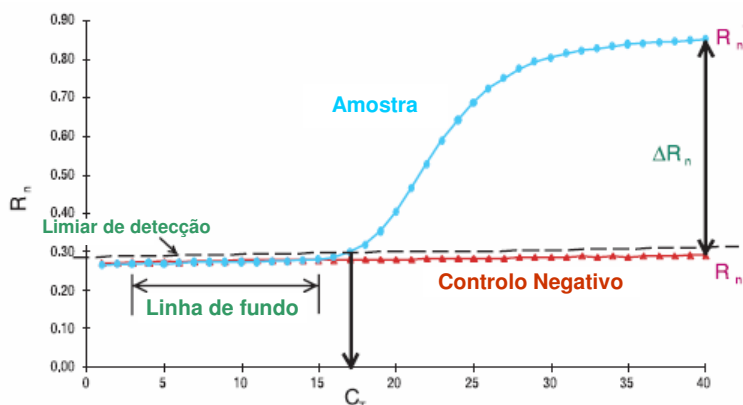
**Figura 4:** Actividade das sondas *Taqman*.

A sonda *Taqman* é um oligonucleótido com um marcador fluorescente ligado à sua extremidade 5' e um composto *quencher* ligado em 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* anula a emissão de fluorescência por parte do fluorocromo. O diagrama representado na Figura 4 ilustra o que acontece à sonda durante a fase de extensão da PCR. Se houver uma sequência alvo presente, a sonda vai ligar-se especificamente a ela, num local situado na zona amplificada pelos *primers*. Quando acontece a extensão do *primer*, a actividade de 5' exonuclease da *Taq* DNA polimerase vai clivar a sonda, separando o marcador do *quencher* e conduzindo à emissão de fluorescência. A clivagem remove a sonda da sequência alvo, permitindo que o alongamento da cadeia continue.

Em cada ciclo da PCR, mais sondas são clivadas, provocando um aumento de intensidade da fluorescência proporcional ao número de sequências alvo presentes.

As sondas *Taqman*, e outras tecnologias semelhantes, tornaram possível monitorizar o progresso de uma reacção PCR em tempo real e isso revolucionou completamente as abordagens de quantificação de DNA e RNA baseadas na PCR. As reacções são caracterizadas por um marco no tempo durante os ciclos quando a amplificação de um produto é inicialmente detectada em vez da quantidade de produto acumulada depois de um determinado número de ciclos. Quanto mais alto for o número inicial de cópias da sequência alvo, mais cedo é observado um aumento significativo da fluorescência.

A Figura 5 representa um gráfico de amplificação e define os termos usados na análise quantitativa. Um gráfico de amplificação representa a relação o sinal de fluorescência emitido pelas sondas e o número de ciclos da PCR. Nos primeiros ciclos não existe uma grande alteração no sinal de fluorescência. Isto define a linha de fundo do gráfico. Um aumento na fluorescência acima da linha de fundo indica a detecção de produto PCR acumulado. Um limiar de detecção (*threshold*) pode ser estabelecido acima da linha de fundo. O parâmetro  $C_t$  (*threshold cycle*, ciclo no limiar da detecção) é definido como o número do ciclo durante o qual o sinal de fluorescência ultrapassa o limiar de detecção. O logaritmo do número inicial de sequências alvo presentes é directamente proporcional aos respectivos valores  $C_t$ . A quantificação de uma amostra desconhecida é efectuado determinando o seu  $C_t$  e usando uma curva padrão para determinar o número de cópias inicial na amostra desconhecida.



**Figura 5:** Modelo de um gráfico de amplificação simples, mostrando os termos normalmente usados em PCR quantitativa em tempo real.

Hoje em dia existem no mercado vários equipamentos equipados com o software adequado para realizar todo o processo: efectuar a PCR, registar as alterações de fluorescência, calcular  $C_t$ s, preparar as curvas padrão e determinar o número de sequências alvo presentes em amostras desconhecidas.

(Fonte de Informação: DNA/RNA Real Time Quantitative PCR. PE Biosystems.)

## Anexo 6 – Alinhamento de genes codificantes para a actina

		1	65
CDS Pinfestans ActA	(1)	ATGGCTGACGATGATGTCAGGCTTGGTGGTTGACAACGGCTCGGATGTGCAAGGCCGGTTT	
CDS Pmegasperma Act	(1)	ATGG---AGGACGACATTCAGGCTGTTGGTGAATTGACAACGGCTCGGATGTGCAAGGCCGGTTT	
Consensus	(1)	ATGG A GA GA T CA GCT TGGT TTGACAACGGCTC GG ATGTGCAAGGC GG TT	
		66	130
CDS Pinfestans ActA	(66)	GCCGGTGACGACGCCCGGCGCCGTTTCCCCTCGATGTGGTTCGCCAAGCACTTGGGA	
CDS Pmegasperma Act	(63)	TGCCGGTGACGACGCCCGGCGCCGTTTCCCCTCATCTAGGCATGCCAAGCACTTGGGCA	
Consensus	(66)	GCCGGTGACGACGCCCGGCGCCGTTTCCCCTC AT GT GG CC AAGCACTTGGG A	
		131	195
CDS Pinfestans ActA	(131)	TCATGGTGGGCATGGACCAGAAAGATGCCTACGTCGGTACGAGGCCAGTCCAAAGCGTGGTGTG	
CDS Pmegasperma Act	(128)	TCATGGTGGGCATGAACCAGAAAAGACGCCTACATGGCAGCAAGCGAAGCGAAGCCGGTTC	
Consensus	(131)	TCATGGTGGGCATG ACCAGAA GA GCCTAC T GG GACGA GC CA C AAGCG GG GT	
		196	260
CDS Pinfestans ActA	(196)	CTGACGCTTAAGTACCCATTTGAGCACGGTATTTGTGACCAACTGGGACGACATGGAAGATCTGT	
CDS Pmegasperma Act	(193)	TTGACGCTGCGGTACCAATTCAGCACGGCATCTCAGCAACTGGGACGACATGGAAGATCTGT	
Consensus	(196)	TGACGCT GTACCC AT GAGCACGG AT GT AC AACTGGGACGACATGGA AAGATCTGT	
		261	325
CDS Pinfestans ActA	(261)	GCAACACACTTCTACAAAGAGTGCCTGTGGCCCCGAGGAGCACCCGGTGTGCTTACGAGG	
CDS Pmegasperma Act	(258)	GAGCCACACTTCTACAAAGAGTGCCTGTGGCCCCGAGAGAGCACCCGGTGTGCTTACGAGG	
Consensus	(261)	G CACAC TTCTACAA GAGTGCCTGTGGCCCC GA GAGCACCCGGTG T G T AC GAGG	
		326	390
CDS Pinfestans ActA	(326)	CCCTCTTAAACCGAAGGCCAACCGTGAGCGCATGACGCAGATCATGTTGAGACGTTCAACGTG	
CDS Pmegasperma Act	(323)	CTCCGCTGAAATCCCAAGGCCAACCGTGAGCGCATGACGCAGATCATGTTGAGACGTTCAACGTG	
Consensus	(326)	C CC CT AA CC AAGGCCAACCG GAGCGCATGACGCAGATCATGTT GAGACGTTCAACGTG	
		391	455
CDS Pinfestans ActA	(391)	CCCGCCATGTATGTGAACATCCAGCCGTGCTGTCCTGTACGCCCTCTGGCCGTACCACGGGCTGT	
CDS Pmegasperma Act	(388)	CCGCGCATGTATGTGAACATCCAGCCGTGCTGTCGTGTACGCCCTCTGGCCGTACCACGGGCTGT	
Consensus	(391)	CC GC ATGTATGTGAACATCCA GCCGTGCTGTC TGTACGC TCTGG CG ACCACGGGCTGT	
		456	520
CDS Pinfestans ActA	(456)	TGTGCTCGACTCTGGTACGGGTGTGTCACACATGTGCCATCTACGAGGGTACGCTCTTCTCTG	
CDS Pmegasperma Act	(453)	GTCTTGGACTCGGGGACGGGTGTGTCACACGGTGCCAATCTACGAGGCTACGCACTGCCCG	
Consensus	(456)	GT T GACTC GG GACGGTGT TC CACAC GTGCC ATCTACGA GG TACGC CT CC C	
		521	585
CDS Pinfestans ActA	(521)	ACGCTATCGTGGCTCTGGACTGGCTGGCCGCGACCTGACGACTACATGATGAAGATCCTGACG	
CDS Pmegasperma Act	(518)	ATGCCATTTGTGGCGTGGATCTGGCTGGACGAGACTTGACGACTACATGATGAAGATCCTGACG	
Consensus	(521)	A GC AT GTGCG CTGGA CTGGCTGG CG GAC TGAC GACTACATGATGAAGATCCTGACG	
		586	650
CDS Pinfestans ActA	(586)	GAGCGTGGTACTCGTTACGACCACGGCCGAGCGCGAAATGTGGCTGACATCAAGGAGAAAGCT	
CDS Pmegasperma Act	(583)	GAGCGTGGCTACTCGTTACGACCACGGCCGAGCGAGAAATCGTGGCGACATCAAGGAGAAACT	
Consensus	(586)	GAGCGTGG TACTCGTTAC ACCACGGC GAGCG GAAAT GTGCG GACATCAAGGAGAA CT	
		651	715
CDS Pinfestans ActA	(651)	GAGGTACATCGCCCTGACTTCGACAGGAGATGAAGACTGCCGCCGAGTCCGTGGGCTCTGGAGA	
CDS Pmegasperma Act	(648)	CACTATGTGCTATGAACTTTGACAGAGATGAGAAAGCTGCCAGCGTCCGTCTACTAGACA	
Consensus	(651)	AC TA T GC TG ACTT GAC A GAGATG AGA GC GC GTCGTC TCT GA A	
		716	780
CDS Pinfestans ActA	(716)	AGAGCTACGAGCTGCCCGATGGCAACGTTATTGTCATCGGTAACGAGCGTTCCCGTACCCCTGAG	
CDS Pmegasperma Act	(713)	AGTCCCTACGAACTGCCCGATGGCAACGTTATTGTCATCGGCAACGAGCGTTCCCGTACCCCTGAG	
Consensus	(716)	AG CTACGA CTGCCCGATGG AACGT ATTGT ATCGG AACGAGCG TTCCGTAC CCTGAG	
		781	845
CDS Pinfestans ActA	(781)	GTGCTGTTCCAGCCCTCGCTCATCGGTAAGGAAGCTTGGGTAATCCACGAGTGCAGCTTCCAGAG	
CDS Pmegasperma Act	(778)	GTACTGTTCAAGCCATGCAATGATGGCCCGCAGTGCAAGCGGCTCAGAGTGGCTTCCAGAG	
Consensus	(781)	GT CTGTT C AGCC TC T AT GG GA CGGG T CACGAGTGC C TTCCAGAG	
		846	910
CDS Pinfestans ActA	(846)	CATCATGAAGTGTGATGTGCAATCCGTAAGGACTTGTACTGCAACATTTGTCTCTCGGGTGGTA	
CDS Pmegasperma Act	(843)	GATATGAAGTGCATGTGCAATCCGCGGAGACTTGTACTGCAACAGTTGTCTCTCGGGTGGCT	
Consensus	(846)	AT ATGAAGTG GATGTGCA ATCCG GACTTGTACT CAAC TTGT CTCT C GGTGG	
		911	975
CDS Pinfestans ActA	(911)	CCACCATGTACCCGGCATTGGCGAGCGGATGACCAAGGAGCTTACGGCTGTGCCCGGTCAACC	
CDS Pmegasperma Act	(908)	CTACCATGTACCCGGTATTGGAGACCGCATGACCAAGGAGTACCAAGTACGCCCGCATCGCG	
Consensus	(911)	C ACCATGT CCC GG ATTGG GA CG ATGAC AAGGAG T AC CT GCCC C C	
		976	1040
CDS Pinfestans ActA	(976)	ATGAAAGTCAAGGTGGTGGCCCGCTGAGCGCAAGTACTGGTCTGGATCGGTGGTTCATCTCA	
CDS Pmegasperma Act	(973)	ATGAAAGTGAAGATTAATAGCCACCAGCGCAAGTACTCGTCTGGATTTGGCGGCTCTATCTT	
Consensus	(976)	ATGAA T AAG T T C CC CC GAGCGCAAGTACT GTCTGGAT GG GG TC ATC	
		1041	1105
CDS Pinfestans ActA	(1041)	GTGTCGCTGTGACGTTCCAGCAATGTGGATCTCGAAGCGCGAGTACGACGAGTCTGGACCTT	
CDS Pmegasperma Act	(1038)	GGCTTCGCTAGCCACGTTCCAGCAATGTGGATCTCGAAGCGCGAGTACGACGAGTCTGGACCTT	
Consensus	(1041)	G C TCGCT C ACGTTCCAGCA ATGTGGATCTCGAAG C GA TACGACGAGT C GG CC T	
		1106	1131
CDS Pinfestans ActA	(1106)	CGATCTGTGCAACCGCAAGTGCTTCTAA	
CDS Pmegasperma Act	(1103)	CCATTTGTGCAACCGCAAGTGCTTCTAA	
Consensus	(1106)	C AT GTGCA CGCAAGTGCTTCTAA	

**Figura 6:** Alinhamento das sequências genéticas codificantes dos genes actina de *Phytophthora megasperma* e actina A de *P. infestans*. Homologia entre as sequências: 79,8%. As sequências a verde representam os primers definidos para a amplificação de um fragmento de um gene da actina em *P. cinnamomi*.

## Anexo 7 – Alinhamentos de sequências

		1	60
Frag Act Pcinnamomi	(1)	-----	-----
CDS Pinfestans ActA	(1)	ATGGCTGACGATGATGTCCAAGCTTTGGTCTTGACAACGGCTCCGGTATGTGCAAGGCC	
Consensus	(1)		
		61	120
Frag Act Pcinnamomi	(1)	-----GCCGGTGACGACGCCCGCGCGCCGTGTTCCCGTCCATCGTGGGC	CGCCCCAAG
CDS Pinfestans ActA	(61)	GGTTCCGCCGGTGACGACGCCCGCGTCCCGTGTCCCGTCCGATGTGGGT	CGCCCCAAG
Consensus	(61)	GCCGGTGACGACGCCCGCGCGCCGTGTTCCCGTCCATCGTGGGC	CGCCCCAAG
		121	180
Frag Act Pcinnamomi	(55)	CACCTGGGCATCATGGTGGGCATGGACCAGAAGGACGC	TACGTGGGTGACGAGGCCAG
CDS Pinfestans ActA	(121)	CAGTTGGGAATCATGGTGGGCATGGACCAGAAGGATGC	TACGTGGGTGACGAGGCCAG
Consensus	(121)	CAC TGGG ATCATGGTGGGCATGGACCAGAAGGA GC TACGT GGTGACGAGGCCAG	
		181	240
Frag Act Pcinnamomi	(115)	TCCAAGCGTGGTGTGCTACGCTGAAGTACCCATCGAGCACGGCAT	CGTGACCAACTGG
CDS Pinfestans ActA	(181)	TCCAAGCGTGGTGTGCTGACGCTAAGTACCCATCGAGCACGGTAT	GTGACCAACTGG
Consensus	(181)	TCCAAGCGTGGTGTGCT ACGCT AAGTACCC AT GAGCACGG AT GTGACCAACTGG	
		241	300
Frag Act Pcinnamomi	(175)	GAGCAGATGGAGAGATCTGGCACCACAGTTCTACAACGAGCTGCG	CGTGC
CDS Pinfestans ActA	(241)	GAGCAGATGGAGAGATCTGGCACCACAGTTCTACAACGAGCTGCG	GTGC
Consensus	(241)	GAGCAGATGGAG AGATCTGGCACCACAG TTCTACAACGAGCTGCG GT GCCCCGAG	
		301	360
Frag Act Pcinnamomi	(235)	GAGCAGATGGAGAGATCTGGCACCACAGTTCTACAACGAGCTGCG	CGTGC
CDS Pinfestans ActA	(301)	GAGCAGATGGAGAGATCTGGCACCACAGTTCTACAACGAGCTGCG	GTGC
Consensus	(301)	GAGCAGATGGAG ATCTGGCACCACAG TTCTACAACGAGCTGCG GT GCCCCGAG	
		361	420
Frag Act Pcinnamomi	(295)	ACGCAGATCATGTTTCGAGACGTTCAACGTTGCCCGCCATGTA	CGTGAACATCCAGGCCGTG
CDS Pinfestans ActA	(361)	ACGCAGATCATGTTTCGAGACGTTCAACGTTGCCCGCCATGTA	GTGAACATCCAGGCCGTG
Consensus	(361)	ACGCAGATCATGTTTCGAGACGTTCAACGTTGCCCGCCATGTA GTGAACATCCAGGCCGTG	
		421	480
Frag Act Pcinnamomi	(355)	CTGTGCTGTGACGCTCTGGCCGTACCACGGGCTGCTGCTCGACTC	CGGTGACGGTGTG
CDS Pinfestans ActA	(421)	CTGTGCTGTGACGCTCTGGCCGTACCACGGGCTGCTGCTCGACTC	CGGTGACGGTGTG
Consensus	(421)	CTGTGCTGTGACGCTCTGGCCGTACCACGGGCTGCTGCTCGACTC	CGGTGACGGTGTG
		481	540
Frag Act Pcinnamomi	(415)	TCCCACACGTGCCCATCTACGAGGGTACGCTGCTGCGCACGC	CATCGTGCCTGGAC
CDS Pinfestans ActA	(481)	TCCCACACGTGCCCATCTACGAGGGTACGCTGCTGCGCACGC	CATCGTGCCTGGAC
Consensus	(481)	TCCCACAC GTGCCCATCTACGAGGG TACGCTCTGCTCACGC ATCGTGCCTGGAC	
		541	600
Frag Act Pcinnamomi	(475)	CTGGCCGCCCGACCTGACGGACTACATGATGAAGATCCTGACGGAGCGTGG	-----
CDS Pinfestans ActA	(541)	CTGGCTGGCCCGACCTGACGGACTACATGATGAAGATCCTGACGGAGCGTGG	TACTCTG
Consensus	(541)	CTGGC GCCCGACCTGACGGACTACATGATGAAGATCCTGACGGAGCGTGG	
		601	660
Frag Act Pcinnamomi	(528)	-----	-----
CDS Pinfestans ActA	(601)	TTCACGACCACGGCCGAGCGGAAATTTGTCGCTGACATCAAGGAGAAGCTGACGTACATC	
Consensus	(601)		
		661	720
Frag Act Pcinnamomi	(528)	-----	-----
CDS Pinfestans ActA	(661)	GCCCTGGACTTCGACCAGGAGATGAAGACTGCCCGGAGTCTGCGGGTCTGGAGAAGAGC	
Consensus	(661)		
		721	780
Frag Act Pcinnamomi	(528)	-----	-----
CDS Pinfestans ActA	(721)	TACGAGCTGCCCGATGGCAACGTTATTGTTCATCGGTAACGAGCGTTTCCGTACCCCTGAG	
Consensus	(721)		
		781	840
Frag Act Pcinnamomi	(528)	-----	-----
CDS Pinfestans ActA	(781)	GTGCTGTTCCAGCCCTCGCTCATCGGTAAGGAGCTTCGGGTATCCACGAGTGACGTTT	
Consensus	(781)		
		841	900
Frag Act Pcinnamomi	(528)	-----	-----
CDS Pinfestans ActA	(841)	CAGACCATCATGAAGTGTGATGTCGATATCCGTAAGGACTTGACTGCAACATTGTGCTC	
Consensus	(841)		
		901	960
Frag Act Pcinnamomi	(528)	-----	-----
CDS Pinfestans ActA	(901)	TCGGGTGGTACCACCATGTACCCGGGATGGCGAGCGGATGACCAAGGAGCTTACGGCT	
Consensus	(901)		
		961	1020
Frag Act Pcinnamomi	(528)	-----	-----
CDS Pinfestans ActA	(961)	CTGGCCCCGTCACCATGAAGATCAAGTGGTGGCCCCGCTGAGCGCAAGTACTCGGTC	
Consensus	(961)		
		1021	1080
Frag Act Pcinnamomi	(528)	-----	-----
CDS Pinfestans ActA	(1021)	TGGATCGGTGGTTCATCCAGTCTGCTGCTGTCGACGTTCCAGCAGATGTGGATCTCGAAG	
Consensus	(1021)		
		1081	1131
Frag Act Pcinnamomi	(528)	-----	-----
CDS Pinfestans ActA	(1081)	GCCGAGTACGACGAGTCTGGACCCTCGATCGTGACCCGCAAGTGCTTCTAA	
Consensus	(1081)		

**Figura 7:** Alinhamento da CDS do gene actina A de *Phytophthora infestans* e o fragmento do gene actina obtido para o isolamento PA45 de *P. cinnamomi*. Homologia entre as sequências: 93% (referente apenas ao alinhamento do fragmento obtido para *P. cinnamomi* com a zona correspondente na CDS do gene actina A).

			289		338
	Beta-NovaSeq	(1)	CGACATCCACTCGCCACCT	N	CACCCAAGATGAACTTCACCGTCTGCTCG
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(289)	CGACATCCACTCGCCACCT	C	CACCCAAGATGAACTTCACCGTCTGCTCG
	Consensus	(289)	CGACATCCACTCGCCACCT		CACCCAAGATGAACTTCACCGTCTGCTCG
			339		388
	Beta-NovaSeq	(51)	CTGCCGTCGCCGCGCCCTCGTCGGCTCCGCCAACGCCACGGCCTGCACG		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(339)	CTGCCGTCGCCGCGCCCTCGTCGGCTCCGCCAACGCCACGGCCTGCACG		
	Consensus	(339)	CTGCCGTCGCCGCGCCCTCGTCGGCTCCGCCAACGCCACGGCCTGCACG		
			389		438
	Beta-NovaSeq	(101)	GCCACCCAGCAGACCGCCGCGTACAAGACGCTCGTGAGTATCCTGTCCGA		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(389)	GCCACCCAGCAGACCGCCGCGTACAAGACGCTCGTGAGTATCCTGTCCGA		
	Consensus	(389)	GCCACCCAGCAGACCGCCGCGTACAAGACGCTCGTGAGTATCCTGTCCGA		
			439		488
	Beta-NovaSeq	(151)	GTCTCTTCTCGCAGTGTCCAAGGACTCGGGCTACTCCATGCTGACGG		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(439)	GTCTCTTCTCGCAGTGTCCAAGGACTCGGGCTACTCCATGCTGACGG		
	Consensus	(439)	GTCTCTTCTCGCAGTGTCCAAGGACTCGGGCTACTCCATGCTGACGG		
			489		538
	Beta-NovaSeq	(201)	CCACGGCACTGCCACCAACGCGCAGTACAAGCTCATGTGCGCGTCCACG		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(489)	CCACGGCACTGCCACCAACGCGCAGTACAAGCTCATGTGCGCGTCCACG		
	Consensus	(489)	CCACGGCACTGCCACCAACGCGCAGTACAAGCTCATGTGCGCGTCCACG		
			539		588
	Beta-NovaSeq	(251)	GCCTGCAACACCATGATCAAGAAGATCGTCGCGTGAACCCCTCCTGACTG		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(539)	GCCTGCAACACCATGATCAAGAAGATCGTCGCGTGAACCCCTCCTGACTG		
	Consensus	(539)	GCCTGCAACACCATGATCAAGAAGATCGTCGCGTGAACCCCTCCTGACTG		
			589		638
	Beta-NovaSeq	(301)	CGACCTGACCGTCCCGACCAAGCGGTCTCGTGTGGACGTGTACACGTACG		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(589)	CGACCTGACCGTCCCGACCAAGCGGTCTCGTGTGGACGTGTACACGTACG		
	Consensus	(589)	CGACCTGACCGTCCCGACCAAGCGGTCTCGTGTGGACGTGTACACGTACG		
			639		688
	Beta-NovaSeq	(351)	CCAACGGCTTCTCGTCCAAGTGCGCGTCTAAGTGTCTCCTCAAAC		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(639)	CCAACGGCTTCTCGTCCAAGTGCGCGTCTAAGTGTCTCCTCAAAC		
	Consensus	(639)	CCAACGGCTTCTCGTCCAAGTGCGCGTCTAAGTGTCTCCTCAAAC		
			689		738
	Beta-NovaSeq	(401)	TGATGGCGCTCCGAGTTTGAACGCGAGACTCCCGCTTGCGTACCTTCTC		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(689)	TGATGGCGCTCCGAGTTTGAACGCGAGACTCCCGCTTGCGTACCTTCTC		
	Consensus	(689)	TGATGGCGCTCCGAGTTTGAACGCGAGACTCCCGCTTGCGTACCTTCTC		
			739		778
	Beta-NovaSeq	(451)	TCTCTGTATCGGCTAGCCATTTACTGAGGCTGGAGGAGCA		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(739)	TCTCTGTATCGGCTAGCCATTTACTGAGGATGGAGGAGCA		
	Consensus	(739)	TCTCTGTATCGGCTAGCCATTTACTGAGG TGGAGGAGCA		

**Figura 8:** Alinhamento da sequência genética da  $\beta$ -cinamomina presente no *GenBank* (Número de Acesso: AJ000071) com a sequência genética da  $\beta$ - cinamomina obtida para o isolamento PA45. Alinhamento de sequências que inclui zonas 5' e 3' UTR. Homologia entre as sequências: 99,2 %.

			1629		1678
Cluster	HaeAlfa-NovaSeq	(1)	CACCACTCAAGCCCCACTTCCGCTCCCCAAGATGAACCTCGCCACCCCTCC		
	Elicitinas Pcinnamomi	(1629)	CACCACTCAAGCCCCACTTCCGCTCCCCAAGATGAACCTCGCCACCCCTCC		
	Consensus	(1629)	CACCACTCAAGCCCCACTTCCGCTCCCCAAGATGAACCTCGCCACCCCTCC		
			1679		1728
Cluster	HaeAlfa-NovaSeq	(51)	TCGCTGCCACCGCCGCCCTCGTCGGATCCGCTCTCCGCCACGGCCTGC		
	Elicitinas Pcinnamomi	(1679)	TCGCTGCCACCGCCGCCCTCGTCGGATCCGCTCTCCGCCACGGCCTGC		
	Consensus	(1679)	TCGCTGCCACCGCCGCCCTCGTCGGATCCGCTCTCCGCCACGGCCTGC		
			1729		1778
Cluster	HaeAlfa-NovaSeq	(101)	ACTTCCACCCAGCAGACCGCCGCTACGTCGCGCTCGTGAGCATCCTCTC		
	Elicitinas Pcinnamomi	(1729)	ACTTCCACCCAGCAGACCGCCGCTACGTCGCGCTCGTGAGCATCCTCTC		
	Consensus	(1729)	ACTTCCACCCAGCAGACCGCCGCTACGTCGCGCTCGTGAGCATCCTCTC		
			1779		1828
Cluster	HaeAlfa-NovaSeq	(151)	GGAGTCGTACTTCTCAACGTGCCACGCGACTCGGGCTACTCCATGCTGA		
	Elicitinas Pcinnamomi	(1779)	GGAGTCGTACTTCTCAACGTGCCACGCGACTCGGGCTACTCCATGCTGA		
	Consensus	(1779)	GGAGTCGTACTTCTCAACGTGCCACGCGACTCGGGCTACTCCATGCTGA		
			1829		1878
Cluster	HaeAlfa-NovaSeq	(201)	CGGCCACGGCGCTTCCCACGACGGCTCAGTACAAGCTCATGTGCGCGTCC		
	Elicitinas Pcinnamomi	(1829)	CGGCCACGGCGCTTCCCACGACGGCTCAGTACAAGCTCATGTGCGCGTCC		
	Consensus	(1829)	CGGCCACGGCGCTTCCCACGACGGCTCAGTACAAGCTCATGTGCGCGTCC		
			1879		1928
Cluster	HaeAlfa-NovaSeq	(251)	ACCGCGTGCCAGGAGATGATCACGGAGATCATCGCGCTGGACCCGCCGA		
	Elicitinas Pcinnamomi	(1879)	ACCGCGTGCCAGGAGATGATCACGGAGATCATCGCGCTGGACCCGCCGA		
	Consensus	(1879)	ACCGCGTGCCAGGAGATGATCACGGAGATCATCGCGCTGGACCCGCCGA		
			1929		1978
Cluster	HaeAlfa-NovaSeq	(301)	CTGCGACCTGACGGTGCCGACGAGCGGTTTGGTGATCAACGTGTACGAGT		
	Elicitinas Pcinnamomi	(1929)	CTGCGACCTGACGGTGCCGACGAGCGGTTTGGTGATCAACGTGTACGAGT		
	Consensus	(1929)	CTGCGACCTGACGGTGCCGACGAGCGGTTTGGTGATCAACGTGTACGAGT		
			1979		2028
Cluster	HaeAlfa-NovaSeq	(351)	ACTCGAACGACTTTGTGTCGACGTGCGCGTCGCTGTCCTCGCGCTCG		
	Elicitinas Pcinnamomi	(1979)	ACTCGAACGACTTTGTGTCGACGTGCGCGTCGCTGTCCTCGCGCTCG		
	Consensus	(1979)	ACTCGAACGACTTTGTGTCGACGTGCGCGTCGCTGTCCTCGCGCTCG		
			2029		2078
Cluster	HaeAlfa-NovaSeq	(401)	TCTTAAGCGCTGAAGCGCTGGTGGCGTGCCTTACCAGCGCGTGACGTCA		
	Elicitinas Pcinnamomi	(2029)	TCTTAAGCGCTGAAGCGCTGGTGGCGTGCCTTACCAGCGCGTGACGTCA		
	Consensus	(2029)	TCTTAAGCGCTGAAGCGCTGGTGGCGTGCCTTACCAGCGCGTGACGTCA		
			2079		2128
Cluster	HaeAlfa-NovaSeq	(451)	CTGGACTGAACGAATGTTCAAGGGTTGTCGCTTTTGGTAGCGCCACGATG		
	Elicitinas Pcinnamomi	(2079)	CTGGACTGAACGAATGTTCAAGGGTTGTCGCTTTTGGTAGCGCCACGATG		
	Consensus	(2079)	CTGGACTGAACGAATGTTCAAGGGTTGTCGCTTTTGGTAGCGCCACGATG		
			2129		2178
Cluster	HaeAlfa-NovaSeq	(501)	TCCAGACTGAAGTTTCAGGCGCTTCTTACGG-AATGGCCCGCCCGCTTGG		
	Elicitinas Pcinnamomi	(2129)	TCCAGACTGAAGTTTCAGGCGCTTCTTACGG-AATGGCCCGCCCGCTTGG		
	Consensus	(2129)	TCCAGACTGAAGTTTCAGGCGCTTCTTACGG AATGGCCCGCCCGCTTGG		
			2179	2192	
Cluster	HaeAlfa-NovaSeq	(550)	TTATGAGGGCGAGC		
	Elicitinas Pcinnamomi	(2179)	TTATGAGGGCGAGC		
	Consensus	(2179)	TTATGAGGGCGAGC		

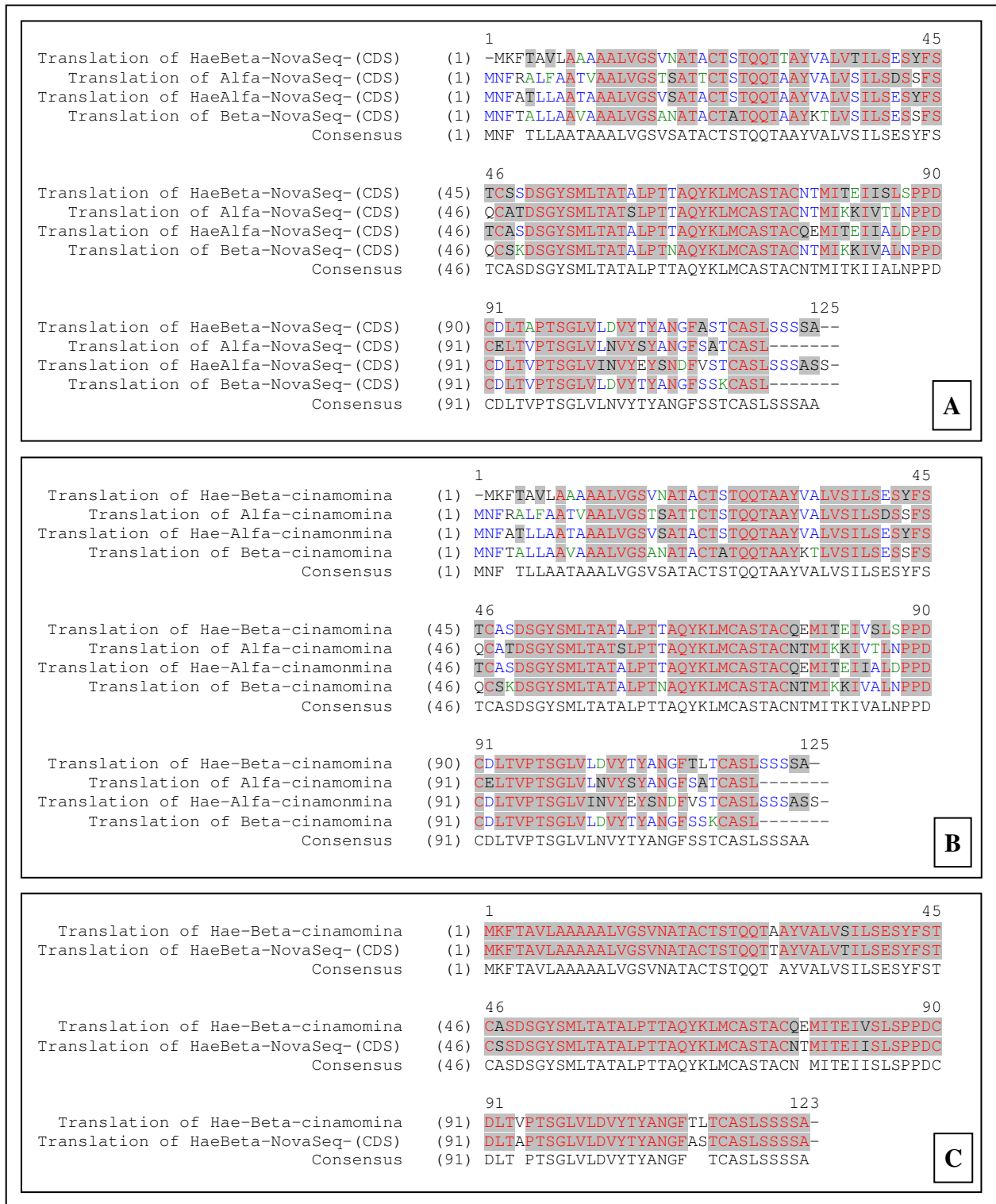
**Figura 9:** Alinhamento da sequência genética da HAE- $\alpha$  cinamomina presente no *GenBank* (Número de Acesso: AJ000071) com a sequência genética da HAE- $\alpha$  cinamomina obtida para o isolamento PA45. Alinhamento de sequências que incluem as zonas 5' e 3' UTR. Homologia entre as sequências: 99,8 %.

			4065		4114
	Alfa-NovaSeq	(1)	G C A C C C T T C C T C C C C A C C A C C T C C A C G A T G A A C T T C C G C G C T T T G T T C G G		
Cluster	Elicitinas Pcinnamomi	(4065)	G C A C C C T T C C T C C C C A C C A C C T C C A C G A T G A A C T T C C G C G C T T T G T T C G G		
	Consensus	(4065)	G C A C C C T T C C T C C C C A C C A C C T C C A C G A T G A A C T T C C G C G C T T T G T T C G G		
			4115		4164
	Alfa-NovaSeq	(51)	C G C C A C C G T C G C C G C G T C G T C G G T C C A C C T C G G C C A C C A C G T G C A C G T		
Cluster	Elicitinas Pcinnamomi	(4115)	C G C C A C C G T C G C C G C G T C G T C G G T C C A C C T C G G C C A C C A C G T G C A C G T		
	Consensus	(4115)	C G C C A C C G T C G C C G C G T C G T C G G T C C A C C T C G G C C A C C A C G T G C A C G T		
			4165		4214
	Alfa-NovaSeq	(101)	C G A C G C A G C A G A C C G C C G T A C G T G G C T C T G G T G A G C A T C C T C T C G G A C		
Cluster	Elicitinas Pcinnamomi	(4165)	C G A C G C A G C A G A C C G C C G T A C G T G G C T C T G G T G A G C A T C C T C T C G G A C		
	Consensus	(4165)	C G A C G C A G C A G A C C G C C G T A C G T G G C T C T G G T G A G C A T C C T C T C G G A C		
			4215		4264
	Alfa-NovaSeq	(151)	T C G T C G T T C A G C C A G T G C G C A C G G A C T C G G G T A C T C G A T G C T G A C G G C		
Cluster	Elicitinas Pcinnamomi	(4215)	T C G T C G T T C A G C C A G T G C G C A C G G A C T C G G G T A C T C G A T G C T G A C G G C		
	Consensus	(4215)	T C G T C G T T C A G C C A G T G C G C A C G G A C T C G G G T A C T C G A T G C T G A C G G C		
			4265		4314
	Alfa-NovaSeq	(201)	C A C C T C G T G C C C A C G A C G G C G C A G T A C A A G C T A T G T G C G C G T C G A C G G		
Cluster	Elicitinas Pcinnamomi	(4265)	C A C C T C G T G C C C A C G A C G G C G C A G T A C A A G C T A T G T G C G C G T C G A C G G		
	Consensus	(4265)	C A C C T C G T G C C C A C G A C G G C G C A G T A C A A G C T A T G T G C G C G T C G A C G G		
			4315		4364
	Alfa-NovaSeq	(251)	C G T G C A A C A C C A T G A T C A A G A A G A T C G T G A C G C T G A A C C C T C C T G A C T G C		
Cluster	Elicitinas Pcinnamomi	(4315)	C G T G C A A C A C C A T G A T C A A G A A G A T C G T G A C G C T G A A C C C T C C T G A C T G C		
	Consensus	(4315)	C G T G C A A C A C C A T G A T C A A G A A G A T C G T G A C G C T G A A C C C T C C T G A C T G C		
			4365		4414
	Alfa-NovaSeq	(301)	G A G T G A C G G T G C C C A C C A G C G G C C T G G T G C T A A C G T G T A C T C G T A C C G		
Cluster	Elicitinas Pcinnamomi	(4365)	G A G T G A C G G T G C C C A C C A G C G G C C T G G T G C T A A C G T G T A C T C G T A C C G		
	Consensus	(4365)	G A G T G A C G G T G C C C A C C A G C G G C C T G G T G C T A A C G T G T A C T C G T A C C G		
			4415		4464
	Alfa-NovaSeq	(351)	G A A C G G C T T C T C G G C C A C G T G C G C G T C G C T G T A A G C A G C T T C G T T C G T G T		
Cluster	Elicitinas Pcinnamomi	(4415)	G A A C G G C T T C T C G G C C A C G T G C G C G T C G C T G T A A G C A G C T T C G T T C G T G T		
	Consensus	(4415)	G A A C G G C T T C T C G G C C A C G T G C G C G T C G C T G T A A G C A G C T T C G T T C G T G T		
			4465		4514
	Alfa-NovaSeq	(401)	G A G T C G C C A C A C T G C G T C C A G C G T T T C A T C T A T A A G G T G C C G A T G C G T G T		
Cluster	Elicitinas Pcinnamomi	(4465)	G A G T C G C C A C A C T G C G T C C A G C G T T T C A T C T A T A A G G T G C C G A T G C G T G T		
	Consensus	(4465)	G A G T C G C C A C A C T G C G T C C A G C G T T T C A T C T A T A A G G T G C C G A T G C G T G T		
			4515		4564
	Alfa-NovaSeq	(451)	G G C A T G C T G A C T T G T C T T T G G G T C A A G T A C G C A G C T T G A G C A G A T A G T T T		
Cluster	Elicitinas Pcinnamomi	(4515)	G G C A T G C T G A C T T G T C T T T G G G T C A A G T A C G C A G C T T G A G C A G A T A G T T T		
	Consensus	(4515)	G G C A T G C T G A C T T G T C T T T G G G T C A A G T A C G C A G C T T G A G C A G A T A G T T T		
			4565		4601
	Alfa-NovaSeq	(501)	N G G C G T A A G T T G G C T G T C G C T C G A G C G T T T G T A A A G C		
Cluster	Elicitinas Pcinnamomi	(4565)	C G G C G T A A G T T G G C T G T C G C T C G A G C G T T T G T A A A G C		
	Consensus	(4565)	G G C G T A A G T T G G C T G T C G C T C G A G C G T T T G T A A A G C		

**Figura 10:** Alinhamento da sequência genética da  $\alpha$ - cinamomina presente no *GenBank* (Número de Acesso: AJ000071) com a sequência genética da  $\alpha$ - cinamomina obtida para o isolamento PA45. Alinhamento de sequências que incluem as zonas 5' e 3' UTR. Homologia entre as sequências: 99,8 %.

			5089		5138
	HaeBeta-NovaSeq	(1)	GCACAAACCTCTTCACCCACCCCTCCAAGATGAAGTTCACTGCCGTCCTCG		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(5089)	GCACAAACCTCTTCACCCACCCCTCCAAGATGAAGTTCACTGCTGTCCTCG		
	Consensus	(5089)	GCACAAACCTCTTCACCCACCCCTCCAAGATGAAGTTCACTGC GTCCTCG		
			5139		5188
	HaeBeta-NovaSeq	(51)	CCGCCGCCGCGGCCCTCGTCGGATCCGTCAACGCCACGGCCTGCCTTCC		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(5139)	CCGCCGCCGCGGCCCTCGTCGGATCCGTCAACGCCACGGCCTGCCTTCC		
	Consensus	(5139)	CCGCCGCCGCGGCCCTCGTCGGATCCGTCAACGCCACGGCCTGCCTTCC		
			5189		5238
	HaeBeta-NovaSeq	(101)	ACCCAGCAGACCAACCGCCTACGTCGGCTCGTGCATCTCTCGGAGTC		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(5189)	ACCCAGCAGACCAACCGCCTACGTCGGCTCGTGCATCTCTCGGAGTC		
	Consensus	(5189)	ACCCAGCAGACC CCGCCTACGTCGGCTCGTGA CATCTCTCGGAGTC		
			5239		5288
	HaeBeta-NovaSeq	(151)	GTACTTCTCAACGTGCTGAGCGACTCGGGCTACTCCATGCTGACGGCCA		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(5239)	GTACTTCTCAACGTGCTGAGCGACTCGGGCTACTCCATGCTGACGGCCA		
	Consensus	(5239)	GTACTTCTCAACGTGC C AGCGACTCGGGCTACTCCATGCTGACGGCCA		
			5289		5338
	HaeBeta-NovaSeq	(201)	CGGCACTTCCCACGACGGCCAGTACAAGCTCATGTGCGGCTCGACGGCG		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(5289)	CGGCACTTCCCACGACGGCCAGTACAAGCTCATGTGCGGCTCGACGGCG		
	Consensus	(5289)	CGGCACTTCCCACGACGGCCAGTACAAGCTCATGTGCGGCTCGAC GCG		
			5339		5388
	HaeBeta-NovaSeq	(251)	TGCACACCAATGATCACTGAGATCACTCTGTTGAGCCCGCTGACTGCGA		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(5339)	TGCACAGGATGATCACTGAGATCACTCTGTTGAGCCCGCTGACTGCGA		
	Consensus	(5339)	TGC A ATGATCACTGAGATC TCTCTGTTGAGCCCGCTGACTGCGA		
			5389		5438
	HaeBeta-NovaSeq	(301)	CCTGACCGCCCGACAGCGGCTCTCGTGTGGACGTGTACACGTACGCA		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(5389)	CCTGACGGTCCGACAGTGGCTCTCGTGTGGACGTGTACACGTACGCA		
	Consensus	(5389)	CCTGAC G CCGAC AG GG CTCGTGTGGACGTGTACACGTACGC A		
			5439		5488
	HaeBeta-NovaSeq	(351)	ACGGCTTTGGTCCGACGTGCGCGTCGCTGTCGTCGTCGGCCTAAGCT		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(5439)	ACGGCTTTACGTTGACGTGCGCGTCGCTGTCGTCGTCGGCCTAAGCT		
	Consensus	(5439)	ACGGCTTT CGT GACGTGCGCGTCGCTGTCGTCGTCGGCCTAAGCT		
			5489		5538
	HaeBeta-NovaSeq	(401)	TATGTTGACGTGCCCC-TGTGGTAGCGAAGTGCCTGTGGG-----		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(5489)	TATATGGGTGTGCCCCCTGTGGTAGCGAAGTGCCTGTGGTCTATTCT		
	Consensus	(5489)	T A TGG GTGCCCC TGTGG TAGCGAAGTGCCTGTGG G		
			5539		5588
	HaeBeta-NovaSeq	(443)	---GTTTCTCGAGTTCAAGGGCTCCTTACTCAGACCGAAGCTACAATG		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(5539)	CGAGTTTCTCGAGTTCAAGGGATCCTTACTCAGACCGAAGCTACAATG		
	Consensus	(5539)	GTTTCTCGAGTTCAAGGG TCCTTACTCAGACCGAAGCTACA ATG		
			5589	5611	
	HaeBeta-NovaSeq	(490)	CTTCATTGCAAAAAGACTTACCCG		
Cluster Elicitinas	Pcinnamomi	(5589)	CTTCATTGCAAAAAGACTTACCCG		
	Consensus	(5589)	CTTCATTGCAAAAAGACTTACCCG		

**Figura 11:** Alinhamento da sequência genética da HAE-β cinamomina presente no *GenBank* (Número de Acesso: AJ000071) com a sequência genética da elicitina HAE-β cinamomina obtida para o isolamento PA45. Alinhamento de sequências que incluem as zonas 5' e 3' UTR. Homologia entre as sequências: 92,4 %.



**Figura 12:** Alinhamentos da tradução em proteínas das CDS das cinamominas.

- A. Alinhamento da tradução das novas sequências das elicinas obtidas para o isolamento PA45. (Homologia de 60,8 %).
- B. Alinhamento da tradução das sequências das elicinas do *cluster* presentes no *GenBank* (Número de Acesso: AJ000071). (Homologia de 63,2%).
- C. Alinhamento da tradução das sequências correspondentes à elicina HAE- $\beta$ , a única que mostra diferenças entre a sequência presente no *GenBank* e a nova sequência obtida para o isolamento PA45. (Homologia de 92,7%).

		1	50
Alfa-cinamomina	(1)	ATGAACTTCGCGCTTTGTCGGCCGCCACCGTCCGCCGGCTCGTCCGGCTC	
Beta-cinamomina	(1)	ATGAACTTCACCGCTTGC TCGCTGCCGTCCGCCGGCCCTCGTCCGGCTC	
Hae-Alfa-cinamomina	(1)	ATGAACTTCGCCACCTCTCGCTGCCACCGCCGCCCTCGTCCGGATC	
Hae-Beta-cinamomina	(1)	ATGAACTTCACCTGCTGTC TCGCCGCC---CCGCCGGCCCTCGTCCGGATC	
Consensus	(1)	ATGAACTTCACCGCTTGC TCGCTGCCACCGCCGCCCTCGTCCGGCTC	
		51	100
Alfa-cinamomina	(51)	CACCTCGGCCACACGTGCACGTGACGCAGCAGACCGCCGGTACGTGG	
Beta-cinamomina	(51)	CGCCAACGCCACGGCTGCACGGCCACCCAGCAGACCGCCGGTACGAAGA	
Hae-Alfa-cinamomina	(51)	CGTCTCCGCCACGGCTGCACCTCCACCCAGCAGACCGCCGGCTACGTCC	
Hae-Beta-cinamomina	(48)	CGTCAACGCCACGGCTGCACCTCCACCCAGCAGACCGCCGGCTACGTCC	
Consensus	(51)	CGTCTCCGCCACGGCTGCACCTCCACCCAGCAGACCGCCGGTACGTGG	
		101	150
Alfa-cinamomina	(101)	CTCTGGTGAGCATCCTCTCGGACTCGTCTTACGCCAGTGGCGGACGGAC	
Beta-cinamomina	(101)	CGCTCGTGTATCCTGTCCGAGTCTCTTCTCGCAGTGTCCAGAGGAC	
Hae-Alfa-cinamomina	(101)	CGTCTGTGAGCATCCTCTCGGAGTCTGACTTCTCAACGTGGCGGACGGAC	
Hae-Beta-cinamomina	(98)	CGCTCGTGTGAGCATCCTCTCGGAGTCTGACTTCTCAACGTGGCGGACGGAC	
Consensus	(101)	CGTCTGTGAGCATCCTCTCGGAGTCTGACTTCTCAACGTGGCGGACGGAC	
		151	200
Alfa-cinamomina	(151)	TCGGGCTACTCGATGCTGACGGCCACTCGCTGCCACGCGGCAGTA	
Beta-cinamomina	(151)	TCGGGCTACTCCATGCTGACGGCCACGGCACTGCCACCAACCGCGAGTA	
Hae-Alfa-cinamomina	(151)	TCGGGCTACTCCATGCTGACGGCCACGGCTTCCCACGACGGTTCAGTA	
Hae-Beta-cinamomina	(148)	TCGGGCTACTCCATGCTGACGGCCACGGCACTTCCCACGACGGCCAGTA	
Consensus	(151)	TCGGGCTACTCCATGCTGACGGCCACGGCTTCCCACGACGGGCAGTA	
		201	250
Alfa-cinamomina	(201)	CAAGCTCATGTGCGCGTCGACGGCGTGCACCACTATGATCAAGAGATCG	
Beta-cinamomina	(201)	CAAGCTCATGTGCGCGTCCACGGCTGCACCACTATGATCAAGAGATCG	
Hae-Alfa-cinamomina	(201)	CAAGCTCATGTGCGCGTCGACCGGTGCCAGGAGATGATCACGGAGATCA	
Hae-Beta-cinamomina	(198)	CAAGCTCATGTGCGCGTCGACCGGTGCCAGGAGATGATCACTGAGATCG	
Consensus	(201)	CAAGCTCATGTGCGCGTCGACGGCGTGCCAGGCGATGATCACGGAGATCG	
		251	300
Alfa-cinamomina	(251)	TGACCGTGAACCCCTCTGACTGCGAGCTGACGGTGGCCACAGCGGCCTG	
Beta-cinamomina	(251)	TCGCGCTGAACCCCTCTGACTGCGACCTGACCGTCCCGACAGCGGTCTC	
Hae-Alfa-cinamomina	(251)	TCGCGCTGGAACCCGCTGACTGCGACCTGACGGTGGCCAGCGGCTTTC	
Hae-Beta-cinamomina	(248)	TCGCGTGAACCCGCTGACTGCGACCTGACGGTGGCCAGCGGCTGCTC	
Consensus	(251)	TCGCGCTGAACCCCTCTGACTGCGACCTGACGGTGGCCAGCGGCTCTC	
		301	350
Alfa-cinamomina	(301)	GTGCTCAACGTGTACTCGTACGCGAACGGCTTCTCGGCCACGTGCGCGTC	
Beta-cinamomina	(301)	GTGCTGGACGTGTACACGTACGCCAACGGCTTCTCGTCAAGTGCAGCGTC	
Hae-Alfa-cinamomina	(301)	GTGATCAACGTGTACGACTACTCGAACGACTTGTGTCGACGTGCGCGTC	
Hae-Beta-cinamomina	(298)	GTGCTGGACGTGTACACGTACGCCAACGGCTTACGTGACGTGCGCGTC	
Consensus	(301)	GTGCTGGACGTGTACACGTACGCCAACGGCTTTCGTGACGTGCGCGTC	
		351	375
Alfa-cinamomina	(351)	GCTGTA-----	
Beta-cinamomina	(351)	GCTGTA-----	
Hae-Alfa-cinamomina	(351)	GCTGCTGCTCGGCCGTCGCTTAA	
Hae-Beta-cinamomina	(348)	GCTGCTGCTCG---TCGGCTAA	
Consensus	(351)	GCTGCTGCTCG TCG C TAA	

**Figura 13:** Alinhamento de seqüências genéticas das elicinas do *cluster* presentes no *GenBank*. Alinhamento de seqüências codificantes. Homologia entre as seqüências: 66,9 %.

		1	50
HaeBeta-NovaSeq- (CDS)	(1)	ATGAACTTCAGTCCCGTCCTCGGCCGCC---GCCGGGCCCTCGTCGGATC	
Alfa-NovaSeq- (CDS)	(1)	ATGAACTTCGCGCTTTGTTCGGCCGCCACCGTCCGCCGCTCGTCGGCTC	
HaeAlfa-NovaSeq- (CDS)	(1)	ATGAACTTCGCCACCTCCTCGCTGCCACCGCCGCCCTCGTCGGATC	
Beta-NovaSeq- (CDS)	(1)	ATGAACTTCACCGCTCTGCTCGCTGCCGTGCCGCCGCCCTCGTCGGCTC	
Consensus	(1)	ATGAACTTCACCGCTCTGCTCGCTGCCACCGCCGCCCTCGTCGGCTC	
		51	100
HaeBeta-NovaSeq- (CDS)	(48)	CGTCAACGCCACGGCCTGCACTTCCACCAGCAGACCACCGCTACGTCG	
Alfa-NovaSeq- (CDS)	(51)	CACCTCGGCCACCACTGCACTTCGACGTCGACGAGCAGACCGCCGCTACGTCG	
HaeAlfa-NovaSeq- (CDS)	(51)	CGTCTCCGCCACGGCCTGCACTTCCACCAGCAGACCGCCGCTACGTCG	
Beta-NovaSeq- (CDS)	(51)	CGTCAACGCCACGGCCTGCACTGCCACCAGCAGACCGCCGCTACAGGA	
Consensus	(51)	CGTCTCCGCCACGGCCTGCACTTCCACCAGCAGACCGCCGCTACGTCG	
		101	150
HaeBeta-NovaSeq- (CDS)	(98)	CGTCGTGACCATCCTCTCGGAGTCGTACTTCTCAACGTGCTCGACGAC	
Alfa-NovaSeq- (CDS)	(101)	CTCTGTGAGCATCCTCTCGGACTCGTCTTCCAGCCAGTGCAGGACGGAC	
HaeAlfa-NovaSeq- (CDS)	(101)	CGTCGTGAGCATCCTCTCGGAGTCGTACTTCTCAACGTGCTCGACGAC	
Beta-NovaSeq- (CDS)	(101)	CGTCGTGAGTATCCTGTCCGAGTCGTCCTTCTCGAGTGTCTCAAGGAC	
Consensus	(101)	CGTCGTGAGCATCCTCTCGGAGTCGTCTTCTCACCGTGTCTGAGGGAC	
		151	200
HaeBeta-NovaSeq- (CDS)	(148)	TCGGGCTACTCCATGCTGACGGCCACGGCACTTCCCACGACGGCCAGTA	
Alfa-NovaSeq- (CDS)	(151)	TCGGGCTACTCGATGCTGACGGCCACTCGTGCACCACGCGCCAGTA	
HaeAlfa-NovaSeq- (CDS)	(151)	TCGGGCTACTCCATGCTGACGGCCACGGCGCTTCCCACGACGGCTCAGTA	
Beta-NovaSeq- (CDS)	(151)	TCGGGCTACTCCATGCTGACGGCCACGGCACTGCCACCAACGCGCAGTA	
Consensus	(151)	TCGGGCTACTCCATGCTGACGGCCACGGCGCTTCCCACGACGGCCAGTA	
		201	250
HaeBeta-NovaSeq- (CDS)	(198)	CAAGCTCATGTGCGCGTCGACGGCGTGCAACACCATGATCACTGAGATCA	
Alfa-NovaSeq- (CDS)	(201)	CAAGCTCATGTGCGCGTCGACGGCGTGCAACACCATGATCAAGAGATCG	
HaeAlfa-NovaSeq- (CDS)	(201)	CAAGCTCATGTGCGCGTCGACCGCGTGCCAGGAGATGATCACGGAGATCA	
Beta-NovaSeq- (CDS)	(201)	CAAGCTCATGTGCGCGTCACGGCTGCAACACCATGATCAAGAGATCG	
Consensus	(201)	CAAGCTCATGTGCGCGTCGACGGCGTGCAACACCATGATCACGGAGATCG	
		251	300
HaeBeta-NovaSeq- (CDS)	(248)	TCCTGTTGAGCCCGCCTGACTGCGACCTGACCGCCCGACACGGCTCTC	
Alfa-NovaSeq- (CDS)	(251)	TGACGCTGAACCTCCTGACTGCGAGCTGACGGTGCCACACGCGCCCTC	
HaeAlfa-NovaSeq- (CDS)	(251)	TCGCGCTGAACCCGCGCAGCTGCGACCTGACGGTGCCGACGAGCGTTTC	
Beta-NovaSeq- (CDS)	(251)	TCGCGCTGAACCTCCTGACTGCGACCTGACCGTCCGACACGGCTCTC	
Consensus	(251)	TCGCGCTGAACCTCCTGACTGCGACCTGACGGTGCCGACACGGCTCTC	
		301	350
HaeBeta-NovaSeq- (CDS)	(298)	GTGCTGGACGTGTACACGTACGCAACCGGCTTTCGCTCGACGTGCGCGTC	
Alfa-NovaSeq- (CDS)	(301)	GTGCTCAACGTGTACTCGTACCGCAACGGCTTCTCGCCACGTGCGCGTC	
HaeAlfa-NovaSeq- (CDS)	(301)	GTGATCAACGTGTACGAGTACTCGAACGACTTGTGTTCGACGTGCGCGTC	
Beta-NovaSeq- (CDS)	(301)	GTGCTGGACGTGTACACGTACGCAACCGGCTTCTCGTCAAGTGGCGGTC	
Consensus	(301)	GTGCTGGACGTGTACACGTACGCAACGGCTTTTCGTCGACGTGCGCGTC	
		351	375
HaeBeta-NovaSeq- (CDS)	(348)	GCTGTCGTCGTCG---TCGGCCATA	
Alfa-NovaSeq- (CDS)	(351)	GCTGTAA-----	
HaeAlfa-NovaSeq- (CDS)	(351)	GCTGTCGTCGTCGCGTCGCTTATA	
Beta-NovaSeq- (CDS)	(351)	GCTCAA-----	
Consensus	(351)	GCTGTCGTC TCG TCG C TAA	

**Figura 14:** Alinhamento de seqüências genéticas das elicitorinas obtidas para o isolamento PA45. Alinhamento de seqüências codificantes. Homologia entre as seqüências: 66,7 %.

		1	55
FragHaeBeta (5089-5611)	(1)	--GCACA-AACCTCTTACCCACCCTCCAAGATGAAGTTCACCTGCTGTCCTCGGC	
FragAlfa (4065-4601)	(1)	--GCACCCTTC-CTCCACCACCCTCC-ACGATGAACTTCGCGCTTGTTCGGC	
FragHaeAlfa (1629-2192)	(1)	CACCACTCAAGCCCACTTCCGCTCCCAAGATGAAGTTCACCCTCTCCTCGGT	
FragBeta (289-778)	(1)	---CGACATCCACTCCCACTCCACCAAGATGAAGTTCACCCTCTGCTCGCT	
Consensus	(1)	GCACCCTACCCTC CCACCACCCCAAGATGAAGTTCACCCTCTGCTCGT	
		56	110
FragHaeBeta (5089-5611)	(53)	GCC---GCCGCGGCCCTCGTCGGAATCCGTAAAGCCACGGCTGCACCTCCACC	
FragAlfa (4065-4601)	(52)	GCCACCGTCCGCGCGCTCGTCGGCTCCACCTCGGCCACAGTGCACGTGACGC	
FragHaeAlfa (1629-2192)	(56)	GCCACCGCCGCGCCCTCGTCGGAATCCGTCTCCGCCACGGCTGCACCTCCACC	
FragBeta (289-778)	(53)	GCCGTCCGCGCGCCCTCGTCGGCTCCGCAAGCCACGGCTGCAGGGCCACC	
Consensus	(56)	GCCACCGCCGCGCCCTCGTCGGCTCCGTCTCCGCCACGGCTGCACCTCCACC	
		111	165
FragHaeBeta (5089-5611)	(105)	AGCAGACCCGCGCTACGTCGCGCTCGTGAGCATCCTCTCGGAGTCGTACTTCTC	
FragAlfa (4065-4601)	(107)	AGCAGACCCGCGCGTACGTCGCTGTGTGAGCATCCTCTCGGACTCGTCTGAG	
FragHaeAlfa (1629-2192)	(111)	AGCAGACCCGCGCGTACGTCGCGCTCGTGAGCATCCTCTCGGAGTCGTACTTCTC	
FragBeta (289-778)	(108)	AGCAGACCCGCGCGTACAAAGCGCTCGTGAGTATCCTGTCCAGTCGTCCTTCTC	
Consensus	(111)	AGCAGACCCGCGCGTACGTCGCGCTCGTGAGCATCCTCTCGGAGTCGTCTTCTC	
		166	220
FragHaeBeta (5089-5611)	(160)	AACGTGCGCCAGCGACTCGGGCTACTCCATGCTGACGGCCACGGCACTCCACG	
FragAlfa (4065-4601)	(162)	CCAGTGGCGACCGACTCGGGCTACTGATGCTGACGGCCACTCGCTGCCACG	
FragHaeAlfa (1629-2192)	(166)	AACGTGCGCCAGCGACTCGGGCTACTCCATGCTGACGGCCACGGCGCTCCACG	
FragBeta (289-778)	(163)	GCAATGCTCCAGGACTCGGGCTACTCCATGCTGACGGCCACGGCACTGCCACG	
Consensus	(166)	ACCGTGGCGCAGGACTCGGGCTACTCCATGCTGACGGCCACGGCGCTTCCACG	
		221	275
FragHaeBeta (5089-5611)	(215)	ACGGCCAGTACAAGCTCATGTGCGCGTCGACCSCGTGCCAGGAGATGATCACTG	
FragAlfa (4065-4601)	(217)	ACGGCCAGTACAAGCTCATGTGCGCGTCGACGCGTGCACACCATGATGATCAAGA	
FragHaeAlfa (1629-2192)	(221)	ACGGCTCAGTACAAGCTCATGTGCGCGTCGACCSCGTGCCAGGAGATGATCAGG	
FragBeta (289-778)	(218)	AACCGCAGTACAAGCTCATGTGCGCGTCCAGGCCGTCACACCATGATGATCAAGA	
Consensus	(221)	ACGGCCAGTACAAGCTCATGTGCGCGTCGACGCGTGCACAGGCGATGATCAGG	
		276	330
FragHaeBeta (5089-5611)	(270)	AGATCGTCTCGTTGAGCCGCTGACTGCGACCTGACGGTGCCGACGAGTGGCCT	
FragAlfa (4065-4601)	(272)	AGATCGTGAACCGTGAACCTCCTGACTGCGAGCTGACGGTGCCGACGAGCGCT	
FragHaeAlfa (1629-2192)	(276)	AGATCATCGCGCTGACCCGCGCGACTGCGACCTGACGGTGCCGACGAGCGGTTT	
FragBeta (289-778)	(273)	AGATCGTCCGCTGAACCCCTCTGACTGCGACCTGACGCTCCGACAGCGGCTCT	
Consensus	(276)	AGATCGTCCGCTGAACCCCTCTGACTGCGACCTGACGGTGCCGACGAGCGGCTCT	
		331	385
FragHaeBeta (5089-5611)	(325)	CGTGCTGGACGTGTACAGTACGCGAACGGCTTACGTTGACGTGCGCGTCGCTG	
FragAlfa (4065-4601)	(327)	GGTGCTCAACGTGTACTCGTACGCGAACGGCTTCCGCGCCAGTGGCGCTCGCTG	
FragHaeAlfa (1629-2192)	(331)	GGTGATCAACGTGTAGGACTCGAACGACTTGTGTCGACGTGCGCGTCGCTG	
FragBeta (289-778)	(328)	CGTGCTGGACGTGTACAGTACGCGAACGGCTTCTGCTCAAGTGGCGCTCGCTC	
Consensus	(331)	GGTGCTGGACGTGTACAGTACGCGAACGGCTTTCGTCGACGTGCGCGTCGCTG	
		386	440
FragHaeBeta (5089-5611)	(380)	TCGTCGTCG---TCGGCTAAGCTTAA-----TGGGTGTGCCCTGTGCG	
FragAlfa (4065-4601)	(382)	TAAGCAGCTTCGTTCTGTGAGTCCGACAC-----TGCGTCCAGGTTTC-ATC	
FragHaeAlfa (1629-2192)	(386)	TCGTCGTCGCGTCGTTAAGCGCTGAAAGCGCTGGTGGCGTCCGCTTCAAGCGG	
FragBeta (289-778)	(383)	TAAG-----TGTGCTCCTCAAAC-----TGATGGCGTCCGA-GTT	
Consensus	(386)	TCGTC TCG CGTCGGC TGAGTCTCAAAC TGGGTGTCGCTTCTC GTC	
		441	495
FragHaeBeta (5089-5611)	(424)	--TAGCGA-AGTCCGCTGTGCTGCTATTCTCGAGTT-TCTCGAGTTCAAGG-GGA	
FragAlfa (4065-4601)	(431)	TATAAGGT---GCCGATGCGTGTGGATGTGACTTGTCTTTGGTCAAGTACGC	
FragHaeAlfa (1629-2192)	(441)	CGTAGCTCACTGGACTGAACGAATGTTCAAGGTTGTCGCTTTTGGTAGC-CC	
FragBeta (289-778)	(418)	TTGAACGC---GAGGCTCCCAATGCGTACCTTCTC-TCTCTGTATGGCTAGCC	
Consensus	(441)	T TAACGT A TGGGCTGCGGCT TCTTCCGAGTTGTCTCTGTTTCAAGTAGGC	
		496	550
FragHaeBeta (5089-5611)	(474)	TCCTTACTCAGACCAG---AGCTACAATGCTTCAAT-GCAAAAGACTTACCCG-	
FragAlfa (4065-4601)	(483)	AGTTTAGCAGATAGTTTCGGCTAAGTTGGCTGTCGCTCGAGCGTTTGTAAAGC	
FragHaeAlfa (1629-2192)	(495)	ACGATGTCCAGACTGA---AGTTTACGCGCTTCTTACGGGAAATGGCCCGCCG	
FragBeta (289-778)	(469)	ATTTACTGAGATGGA---GGAGCA-----	
Consensus	(496)	ACCTTGTGAGAT GA GGCTTCAAGTCTTCTT CGCGAA G CT CCCGC	
		551	568
FragHaeBeta (5089-5611)	(524)	-----	
FragAlfa (4065-4601)	(538)	-----	
FragHaeAlfa (1629-2192)	(547)	TTGGTTATGAGGGCGAGC	
FragBeta (289-778)	(491)	-----	
Consensus	(551)	-----	

**Figura 15:** Alinhamento de seqüências genéticas das elicinas do *cluster* presentes no *GenBank*. Alinhamento de seqüências que incluem as zonas 5' e 3' UTR. Homologia entre as seqüências: 48,2 %.

		1		55
HaeBeta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(1)	--GCACA-AACCTCTTACCGACCCCTCCAAGATGAAGTTCACTGCCGTCCTCGGC		
Alfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(1)	--GCACCCCTTC-CTCCCAACC-ACCTCCACGATGAAC TTCGCGCTTGTTCGGC		
HaeAlfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(1)	CACCACTCAAGCCCAATTCCGCTCCCAAGATGAAC TTCGCCACCTCCTCGCT		
Beta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(1)	---GAGATCCACTCGCCACCTNACCCAAGATGAAC TTCACCGCTCTGCTCGCT		
Consensus	(1)	GCACCTACCCTC CCACC CCCTCCAAGATGAAC TTCACCGCTCTGCTCGCT		
		56		110
HaeBeta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(53)	GCC---GCCGGGCCCTCGTGGATCCGTC AACGCCACGGCCTGCAC TTCACCC		
Alfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(52)	GCCACCGTCGCCCGGCTCGTCGGCTCCACCTCGGCCACAGGTGCACGTCGCACGC		
HaeAlfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(56)	GCCACCGGCCCGCCCTCGTGGATCCGTC TCCGCCACGGCCTGCAC TTCACCC		
Beta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(53)	GCCGTCCGCCCGCCCTCGTGGCTCCGCTAACGCCACGGCCTGCACGGCCACCC		
Consensus	(56)	GCCACCGCCGCCCTCGTCGGCTCCGCTTCCGCCACGGCTGCAC TTCACCC		
		111		165
HaeBeta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(105)	AGCAGACCA CCGCTACGTCGGCTCGTGA CCACTCTCTCGGAGTCGTA CTTC		
Alfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(107)	AGCAGACCGCCGCTACGTTGGCTGTGGTGA CCACTCTCTCGGAGTCGTA CTTC		
HaeAlfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(111)	AGCAGACCGCCGCTACGTCGGCTCGTGA CCACTCTCTCGGAGTCGTA CTTC		
Beta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(108)	AGCAGACCGCCGCTACAGACGCTCGTGA TACCTTGTCCGATGCTCTCTTC		
Consensus	(111)	AGCAGACCGCCGCTACGTTGGCTCGTGA CCACTCTCTCGGAGTCGTTCTCTC		
		166		220
HaeBeta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(160)	AACGTGCTCGAGC GACTCGGGTACTCCATGCTGACGGCCACGGCACTTCCACG		
Alfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(162)	CAAGTGGCGGACCGGACTCGGGTACTCGATGCTGACGGCCACCTGCTGCCACG		
HaeAlfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(166)	AACGTGCTCGAGC GACTCGGGTACTCCATGCTGACGGCCACGGCACTTCCACG		
Beta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(163)	GCAAGTGTCCAGGACTCGGGTACTCCATGCTGACGGCCACGGCACTGCCACG		
Consensus	(166)	ACCGTGTCTGAGGACTCGGGTACTCCATGCTGACGGCCACGGGCTTCCACG		
		221		275
HaeBeta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(215)	ACGGCCAGTACAAGCTCATGTGCGCGTCGACGGCGTGCAACACCATGATCAGT		
Alfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(217)	ACGGCCAGTACAAGCTCATGTGCGCGTCGACGGCGTGCAACACCATGATCAGT		
HaeAlfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(221)	ACGGCTCAGTACAAGCTCATGTGCGCGTCGACGGCGTGCAACACCATGATCAGT		
Beta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(218)	AACGGCAGTACAAGCTCATGTGCGCGTCACGGCCGCAACACCATGATCAGT		
Consensus	(221)	ACGGCCAGTACAAGCTCATGTGCGCGTCGACGGCGTGCAACACCATGATCAGG		
		276		330
HaeBeta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(270)	AGATCATCTCGTGAAGCCGCTGACTGCGACCTGACCCGCCGACCGGGTCT		
Alfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(272)	AGATCGTGAAGCTGAAACCTCCTGACTGCGAGCTGACGGTCCACCAGCGGCT		
HaeAlfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(276)	AGATCATCTCGGCTGACCCGCCGACTGCGACCTGACGGTCCGACGAGCGGTTT		
Beta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(273)	AGATCGTCCGCTGAAACCTCCTGACTGCGACCTGACCTCCGACCGGGTCT		
Consensus	(276)	AGATCGTCCGCTGAACCTCCTGACTGCGACCTGACGGTCCGACCGGGTCT		
		331		385
HaeBeta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(325)	CGTGCTGGACGTGTACACGTACGAAACGGCTTTCGTCGACGTGCGCGTGGCTG		
Alfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(327)	GGTGTCAACGTGTACTCGTACGCGAACGGCTTCTCGGCCAGTGGCCGCTCGCTG		
HaeAlfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(331)	GGTGATCAACGTGTACGACTACTCGAACGACTTGTGTCCGACGTGCGCGTGGCTG		
Beta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(328)	CGTGCTGGACGTGTACACGTACGCGAACGGCTTCTCGTCCAGTGGCGGTGGCTG		
Consensus	(331)	GGTGTGGACGTGTACACGTACGCGAACGGCTTTCGTCGACGTGCGCGTGGCTG		
		386		440
HaeBeta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(380)	TTCGTCGTCG---TCGGCTAAGC--TTAAGTGGACGTGCC-----CCTGT		
Alfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(382)	TAAGCAGCTTCGTTCGTGAGTGGCCACACTG-CGTCCAG-----CGTT		
HaeAlfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(386)	TCGTCCCGCGCTGCTTAAGCGCTGAAGCGTGGTGGCGTGCCTTCAACGGC		
Beta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(383)	TAAG-----TGTCTCTCAAACTT-GATGGCG-----CTCC		
Consensus	(386)	TCGTC TCG CGTGGC TGAGTCTCAAGCTG GGTGGC CCTGT		
		441		495
HaeBeta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(420)	GGTTAGCGAAGTCCGCTGTGG-----GGTTCTCGAGTTC--AGGGGCT		
Alfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(426)	TCATCTATAAGGTCCGATGGCTGTGG-CATGCTGACTGTGCTTTGGTCAAGTA		
HaeAlfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(441)	CGTGAAGTCACTGGACTGAACGAATGTTCAAGGGTTGTCGCTTTGGTAGCCCA		
Beta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(413)	GAGTTTGAACGCGAGACTCCCTTCG-TACCTTCTC-FCTCTGATTCGGCTA		
Consensus	(441)	GGTTAT TAAGTGGACTGTGG TGG CATGTTTCTGCTTTGG TGGGTA		
		496		550
HaeBeta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(464)	CTTACTAGACC GAAGCTACAGATGCTTCATTGCAAAAGACTTACCCG-----		
Alfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(480)	CGAAGCTTGAGCAGATAGTTTNGGCG-TAAGTTGGCTGTCGCTGAGCGTTTGTGA		
HaeAlfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(496)	CGATGTCAGACTGAAGTTTACAGCGCTTCTTACGGAAATGGCCGCGCGCTTGG		
Beta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(466)	GCCAA--TTTA-CTGAGGCTGGAGGAG-CA-----		
Consensus	(496)	CGCTGCTTAGACTGAAGTTCAGGCGCTTC TTGG AATGGCTCGCCG TTG		
		551		563
HaeBeta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(513)	-----		
Alfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(534)	AAGC-----		
HaeAlfa-NovaSeq- (CDS+UTR)	(551)	TATGAGGGCGAGC		
Beta-NovaSeq- (CDS+UTR)	(491)	-----		
Consensus	(551)	A		

**Figura 16:** Alinhamento de seqüências genéticas das elicinas obtidas para o isolamento PA45. Alinhamento de seqüências que incluem as zonas 5' e 3' UTR. Homologia entre as seqüências: 48,5 %.



## Anexo 8 – Resultados da quantificação por PCR em Tempo Real

- As tabelas seguintes apresentam os resultados para a quantificação, por PCR em tempo real com sondas *Taqman*, da expressão dos genes do *cluster* de elicinas de *P. cinnamomi*, bem como do gene da actina (referência).
- As amostras analisadas foram obtidas a partir ou de culturas *in vitro* (micélio cultivado em meio V<sub>8</sub>C ou meio MSE, por 3 ou 15 dias) ou culturas *in planta* (raízes de *Q. suber* infectadas com o patógeno, 12, 24 ou 36 h após a infecção).
- Para cada caso foram efectuados três ensaios independentes (cultura, extracção de RNA, transcrição reversa) e em cada reacção de quantificação foram efectuados três replicados por amostra.
- As tabelas tipo A apresentam os valores dos ciclos limiaries (Ct) para cada um dos replicados, bem como seu valor médio e o respectivo desvio padrão. Apresentam, também, o logaritmo do número de cópias e o número de cópias da sequência alvo presentes em cada amostra.
- O cálculo do número de cópias foi efectuado automaticamente pelo *software* do equipamento usado, o *iCycler iQ Detection System* (BIORAD), com base na leitura dos Cts das amostras de concentração conhecida.
- Estes cálculos baseiam-se nas equações geradas pelas curvas padrão, do tipo<sup>37</sup>:

$$y = mx + b$$

- O logaritmo do número de cópias presente na amostra foi obtido por:

$$\text{Log cópias} = (Ct-b)/m$$

De onde vem que

$$\text{Cópias} = 10^{(Ct-b)/m}$$

- Os factores de normalização das amostras são constantes que as relacionam com a amostra padrão, tendo por base a expressão de um gene referência cuja expressão se mantém invariável. Neste caso, é relacionado o número de cópias de actina presentes em cada amostra em estudo com a amostra padrão, micélio do isolamento PA45 cultivado em meio V<sub>8</sub>C durante 3 dias. Esta constante normaliza as quantidades de amostra em comparação e foi obtida por:

$$\text{Factor de normalização} = \frac{\text{Número de cópias de actina PA45, V}_8\text{C, 3 dias}}{\text{Número cópias de actina amostra em estudo}}$$

- A normalização das amostras foi obtida por:

$$\text{N}^\circ \text{ de cópias do gene em estudo normalizadas} = \text{Factor de normalização} \times \text{N}^\circ \text{ de cópias do gene em estudo}$$

- As eficiências das reacções PCR também foram calculadas pelo *software* a partir dos declives das curvas padrão:

$$\text{Eficiência} = ([10^{(-1/\text{declive})}] - 1) \times 100$$

<sup>37</sup> As relações matemáticas foram extraídas do ABI Prism 7700 Sequence Detection System – User Bulletin #2 (Applied Biosystems, 2001).

Amostras 1	Ct Actina	Ct Médio Actina	Desvio Padrão Ct Actina	Média Log Cópias Actina	Média Cópias Actina	Factor de Normalização das Amostras
PA45 - V8 - 3 dias	21.15	21,18	0,04	6,206	1,608E+06	1,000
	21.17					
	21.23					
PA45 -V8 - 15 dias	21.30	21,31	0,02	6,170	1,477E+06	1,089
	21.33					
	21.29					
PA45 - MSE - 3 dias	21.08	21,09	0,01	6,234	1,715E+06	0,938
	21.09					
	21.10					
PA45 - MSE - 15 dias	21.28	21,23	0,04	6,191	1,554E+06	1,035
	21.20					
	21.22					
FATSS - V8 - 3 dias	21.07	21,13	0,06	6,223	1,672E+06	0,962
	21.13					
	21.18					
FATSS -V8 - 15 dias	21.31	21,29	0,02	6,174	1,494E+06	1,076
	21.28					
	21.28					
FATSS - MSE - 3 dias	21.04	21,06	0,06	6,244	1,755E+06	0,917
	21.12					
	21.01					
FATSS - MSE - 15 dias	21.25	21,23	0,02	6,191	1,554E+06	1,035
	21.23					
	21.22					
PA37 - V8 - 3 dias	21.14	21,16	0,03	6,212	1,631E+06	0,986
	21.20					
	21.15					
PA37 - V8 - 15 dias	21.27	21,26	0,01	6,183	1,526E+06	1,054
	21.26					
	21.25					
PA37 - MSE - 3 dias	20.99	21,04	0,05	6,250	1,779E+06	0,904
	21.09					
	21.03					
PA37 - MSE - 15 dias	21.27	21,25	0,02	6,187	1,540E+06	1,045
	21.23					
	21.24					
13C - V8 - 3 dias	21.13	21,12	0,04	6,225	1,680E+06	0,957
	21.08					
	21.15					
13C - V8 - 15 dias	21.32	21,29	0,03	6,174	1,494E+06	1,076
	21.29					
	21.26					
13C - MSE - 3 dias	21.14	21,12	0,03	6,226	1,684E+06	0,955
	21.12					
	21.09					
13C - MSE - 15 dias	21.23	21,24	0,01	6,190	1,550E+06	1,037
	21.23					
	21.25					

**Tabela A1:** Quantificação da expressão do gene da actina em amostras de micélio (ensaio 1).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  
 $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,347 \times \text{Log} (N^\circ \text{ cópias}) + 41,956$$

Coefficiente de correlação = 0,999

Eficiência da reacção PCR: 99,0%

Amostras 2	Ct Actina	Ct Médio Actina	Desvio Padrão Ct Actina	Média Log Cópias Actina	Média Cópias Actina	Factor de Normalização das Amostras
PA45 - V8 - 3 dias	18.75	18,72	0,08	6,165	1,461E+06	1,000
	18.77					
	18.63					
PA45 -V8 - 15 dias	18.83	18,85	0,03	6,124	1,331E+06	1,098
	18.84					
	18.89					
PA45 - MSE - 3 dias	18.61	18,58	0,03	6,206	1,607E+06	0,909
	18.57					
	18.55					
PA45 - MSE - 15 dias	18.79	18,78	0,02	6,145	1,396E+06	1,047
	18.80					
	18.76					
FATSS - V8 - 3 dias	18.73	18,69	0,08	6,172	1,488E+06	0,982
	18.74					
	18.60					
FATSS -V8 - 15 dias	18.81	18,83	0,03	6,130	1,349E+06	1,083
	18.82					
	18.87					
FATSS - MSE - 3 dias	18.59	18,57	0,03	6,208	1,615E+06	0,905
	18.53					
	18.59					
FATSS - MSE - 15 dias	18.78	18,78	0,03	6,146	1,399E+06	1,044
	18.81					
	18.75					
PA37 - V8 - 3 dias	18.76	18,70	0,09	6,169	1,474E+06	0,991
	18.75					
	18.60					
PA37 - V8 - 15 dias	18.81	18,82	0,03	6,135	1,364E+06	1,071
	18.85					
	18.79					
PA37 - MSE - 3 dias	18.59	18,56	0,03	6,210	1,622E+06	0,901
	18.57					
	18.53					
PA37 - MSE - 15 dias	18.77	18,77	0,04	6,148	1,405E+06	1,039
	18.81					
	18.74					
13C - V8 - 3 dias	18.73	18,69	0,07	6,173	1,491E+06	0,980
	18.72					
	18.61					
13C - V8 - 15 dias	18.83	18,83	0,01	6,130	1,349E+06	1,083
	18.83					
	18.84					
13C - MSE - 3 dias	18.59	18,59	0,03	6,203	1,596E+06	0,915
	18.61					
	18.56					
13C - MSE - 15 dias	18.72	18,76	0,04	6,152	1,418E+06	1,030
	18.79					
	18.77					

**Tabela A2:** Quantificação da expressão do gene da actina em amostras de micélio (ensaio 2).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  
 $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,374 \times \text{Log} (N^\circ \text{ cópias}) + 39,516$$

Coefficiente de correlação = 0,995

Eficiência da reacção PCR: 97,9%

Amostras 3	Ct Actina	Ct Médio Actina	Desvio Padrão Ct Actina	Média Log Cópias Actina	Média Cópias Actina	Factor de Normalização das Amostras
PA45 - V8 - 3 dias	20,03	20,04	0,02	6,237	1,726E+06	1,000
	20,04					
	20,06					
PA45 - V8 - 15 dias	20,16	20,19	0,03	6,194	1,563E+06	1,105
	20,22					
	20,19					
PA45 - MSE - 3 dias	19,98	19,96	0,02	6,263	1,831E+06	0,943
	19,95					
	19,94					
PA45 - MSE - 15 dias	20,12	20,11	0,02	6,218	1,654E+06	1,044
	20,22					
	20,09					
FATSS - V8 - 3 dias	20,08	20,07	0,01	6,228	1,691E+06	1,021
	20,07					
	20,07					
FATSS - V8 - 15 dias	20,14	20,17	0,03	6,200	1,584E+06	1,090
	20,20					
	20,17					
FATSS - MSE - 3 dias	19,95	19,96	0,01	6,262	1,827E+06	0,945
	19,97					
	19,96					
FATSS - MSE - 15 dias	20,09	20,10	0,02	6,219	1,657E+06	1,042
	20,10					
	20,12					
PA37 - V8 - 3 dias	19,98	20,01	0,03	6,248	1,770E+06	0,975
	20,01					
	20,03					
PA37 - V8 - 15 dias	20,15	20,16	0,01	6,203	1,595E+06	1,082
	20,16					
	20,17					
PA37 - MSE - 3 dias	19,97	19,94	0,03	6,267	1,847E+06	0,934
	19,94					
	19,92					
PA37 - MSE - 15 dias	20,15	20,10	0,04	6,219	1,657E+06	1,042
	20,09					
	20,07					
13C - V8 - 3 dias	20,08	20,06	0,02	6,231	1,703E+06	1,014
	20,06					
	20,05					
13C - V8 - 15 dias	20,17	20,20	0,04	6,190	1,549E+06	1,115
	20,24					
	20,20					
13C - MSE - 3 dias	19,95	19,94	0,01	6,267	1,847E+06	0,934
	19,93					
	19,95					
13C - MSE - 15 dias	20,13	20,13	0,03	6,211	1,624E+06	1,063
	20,16					
	20,11					

**Tabela A3:** Quantificação da expressão do gene da actina em amostras de micélio (ensaio 3).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:

$10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,394 \times \text{Log} (\text{N}^\circ \text{ cópias}) + 41,212$$

Coefficiente de correlação = 0,999

Eficiência da reacção PCR: 97,1%

Amostras 1	Ct Beta	Ct Médio Beta	Desvio Padrão Ct Beta	Média Log Cópias Beta	Média Cópias Beta	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Beta Normalizadas
PA45 - V8 - 3 dias	32,06	32,03	0,03	1,742	5,517E+01	1,000	5,517E+01
	32,03						
	32,01						
PA45 - V8 - 15 dias	32,86	32,88	0,02	1,480	3,017E+01	1,089	3,284E+01
	32,89						
	32,90						
PA45 - MSE - 3 dias	25,01	25,06	0,06	3,894	7,829E+03	0,938	7,342E+03
	25,03						
	25,13						
PA45 - MSE - 15 dias	29,35	29,26	0,08	2,596	3,946E+02	1,035	4,084E+02
	29,23						
	29,21						
FATSS - V8 - 3 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	0,962	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - V8 - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,076	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - MSE - 3 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	0,917	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - MSE - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,035	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA37 - V8 - 3 dias	32,08	32,05	0,03	1,738	5,465E+01	0,986	5,391E+01
	32,04						
	32,02						
PA37 - V8 - 15 dias	33,02	32,92	0,09	1,469	2,946E+01	1,054	3,106E+01
	32,89						
	32,84						
PA37 - MSE - 3 dias	24,97	24,96	0,02	3,922	8,365E+03	0,904	7,562E+03
	24,94						
	24,98						
PA37 - MSE - 15 dias	29,14	29,08	0,06	2,654	4,505E+02	1,045	4,706E+02
	29,05						
	29,04						
13C - V8 - 3 dias	32,21	32,26	0,04	1,672	4,697E+01	0,957	4,497E+01
	32,28						
	32,29						
13C - V8 - 15 dias	32,94	32,93	0,05	1,465	2,918E+01	1,076	3,141E+01
	32,88						
	32,97						
13C - MSE - 3 dias	25,01	25,04	0,06	3,900	7,941E+03	0,955	7,585E+03
	25,11						
	24,99						
13C - MSE - 15 dias	29,14	29,08	0,06	2,652	4,484E+02	1,037	4,651E+02
	29,03						
	29,08						

**Tabela A4:** Quantificação da expressão do gene *βcin* em amostras de micélio (ensaio 1).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:

$10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,242 \times \text{Log} (\text{N}^\circ \text{ cópias}) + 37,680$$

Coefficiente de correlação = 0,999

Eficiência da reacção PCR: 103,5%

ND = Valor de Ct Não Detectado

#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras 2	Ct Beta	Ct Médio Beta	Desvio Padrão Ct Beta	Média Log Cópias Beta	Média Cópias Beta	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Beta Normalizadas
PA45 - V8 - 3 dias	34,47	34,43	0,03	1,716	5,206E+01	1,000	5,206E+01
	34,42						
	34,41						
PA45 - V8 - 15 dias	35,42	35,40	0,03	1,424	2,657E+01	1,098	2,917E+01
	35,37						
	35,40						
PA45 - MSE - 3 dias	27,38	27,34	0,04	3,866	7,339E+03	0,909	6,670E+03
	27,30						
	27,35						
PA45 - MSE - 15 dias	31,65	31,67	0,02	2,554	3,582E+02	1,047	3,749E+02
	31,69						
	31,67						
FATSS - V8 - 3 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	0,982	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - V8 - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,083	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - MSE - 3 dias	ND	42,30	#DIV/0!	-0,668	2,147E-01	0,905	1,943E-01
	42,30						
	ND						
FATSS - MSE - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,044	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA37 - V8 - 3 dias	34,63	34,58	0,05	1,673	4,710E+01	0,991	4,667E+01
	34,55						
	34,55						
PA37 - V8 - 15 dias	35,31	35,30	0,06	1,453	2,836E+01	1,071	3,037E+01
	35,24						
	35,36						
PA37 - MSE - 3 dias	27,32	27,31	0,02	3,877	7,529E+03	0,901	6,781E+03
	27,29						
	27,31						
PA37 - MSE - 15 dias	31,48	31,48	0,01	2,612	4,090E+02	1,039	4,251E+02
	31,49						
	31,47						
13C - V8 - 3 dias	34,59	34,58	0,02	1,673	4,710E+01	0,980	4,615E+01
	34,58						
	34,56						
13C - V8 - 15 dias	35,24	35,27	0,03	1,464	2,910E+01	1,083	3,151E+01
	35,27						
	35,29						
13C - MSE - 3 dias	27,34	27,37	0,03	3,859	7,220E+03	0,915	6,607E+03
	27,37						
	27,39						
13C - MSE - 15 dias	31,56	31,60	0,03	2,576	3,770E+02	1,030	3,883E+02
	31,61						
	31,62						

**Tabela A5:** Quantificação da expressão do gene *βcin* em amostras de micélio (ensaio 2).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  
 $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,299 \times \text{Log} (\text{N}^\circ \text{ cópias}) + 40,096$$

Coeficiente de correlação = 0,998

Eficiência da reacção PCR: 101,0%

ND = Valor de Ct Não Detectado  
 #DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras 3	Ct Beta	Ct Médio Beta	Desvio Padrão Ct Beta	Média Log Cópias Beta	Média Cópias Beta	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Beta Normalizadas
PA45 - V8 - 3 dias	31,54	31,55	0,01	1,791	6,183E+01	1,000	6,183E+01
	31,55						
	31,55						
PA45 - V8 - 15 dias	32,51	32,49	0,03	1,507	3,214E+01	1,105	3,550E+01
	32,46						
	32,49						
PA45 - MSE - 3 dias	24,46	24,40	0,06	3,952	8,946E+03	0,943	8,435E+03
	24,35						
	24,39						
PA45 - MSE - 15 dias	28,75	28,75	0,01	2,637	4,332E+02	1,044	4,522E+02
	28,74						
	28,76						
FATSS - V8 - 3 dias	38,91	38,94	0,06	-0,443	3,608E-01	1,021	3,682E-01
	38,89						
	39,01						
FATSS - V8 - 15 dias	39,50	39,50	#DIV/0!	-0,613	2,437E-01	1,090	2,656E-01
	ND						
	ND						
FATSS - MSE - 3 dias	39,00	39,04	0,05	-0,474	3,357E-01	0,945	3,173E-01
	39,02						
	39,10						
FATSS - MSE - 15 dias	39,07	39,10	0,04	-0,491	3,231E-01	1,042	3,365E-01
	ND						
	39,12						
PA37 - V8 - 3 dias	31,58	31,57	0,02	1,785	6,098E+01	0,975	5,948E+01
	31,57						
	31,55						
PA37 - V8 - 15 dias	32,38	32,43	0,04	1,525	3,351E+01	1,082	3,627E+01
	32,44						
	32,46						
PA37 - MSE - 3 dias	24,37	24,37	0,02	3,961	9,135E+03	0,934	8,536E+03
	24,39						
	24,35						
PA37 - MSE - 15 dias	28,51	28,51	0,02	2,708	5,107E+02	1,042	5,319E+02
	28,50						
	28,53						
13C - V8 - 3 dias	31,85	31,82	0,03	1,709	5,112E+01	1,014	5,182E+01
	31,82						
	31,79						
13C - V8 - 15 dias	32,45	32,43	0,02	1,524	3,343E+01	1,115	3,727E+01
	32,43						
	32,41						
13C - MSE - 3 dias	24,31	24,36	0,06	3,965	9,220E+03	0,934	8,615E+03
	24,42						
	24,34						
13C - MSE - 15 dias	29,28	29,25	0,03	2,485	3,058E+02	1,063	3,251E+02
	29,25						
	29,22						

**Tabela A6:** Quantificação da expressão do gene *βcin* em amostras de micélio (ensaio 3).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  
 $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,308 \times \text{Log} (\text{N}^\circ \text{ cópias}) + 37,472$$

Coeficiente de correlação = 0,998

Eficiência da reacção PCR: 100,6%

ND = Valor de Ct Não Detectado  
 #DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras 1	Ct Alfa	Ct Médio Alfa	Desvio Padrão Ct Alfa	Média Log Cópias Alfa	Média Cópias Alfa	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Alfa Normalizadas
PA45 - V8 - 3 dias	30,53	30,54	0,01	2,889	7,748E+02	1,000	7,748E+02
	30,55						
	30,54						
PA45 - V8 - 15 dias	34,28	34,37	0,03	1,799	6,294E+01	1,089	6,852E+01
	34,39						
	34,33						
PA45 - MSE - 3 dias	26,41	26,44	0,03	4,056	1,138E+04	0,938	1,068E+04
	26,46						
	26,46						
PA45 - MSE - 15 dias	31,03	30,98	0,04	2,764	5,805E+02	1,035	6,008E+02
	30,95						
	30,96						
FATSS - V8 - 3 dias	31,39	31,42	0,04	2,638	4,350E+02	0,962	4,183E+02
	31,40						
	31,47						
FATSS - V8 - 15 dias	35,22	35,26	0,06	1,543	3,495E+01	1,076	3,762E+01
	35,24						
	35,33						
FATSS - MSE - 3 dias	28,86	28,87	0,02	3,364	2,312E+03	0,917	2,119E+03
	28,89						
	28,87						
FATSS - MSE - 15 dias	34,72	34,73	0,03	1,696	4,970E+01	1,035	5,144E+01
	34,70						
	34,76						
PA37 - V8 - 3 dias	30,47	30,46	0,05	2,912	8,165E+02	0,986	8,054E+02
	30,50						
	30,41						
PA37 - V8 - 15 dias	34,22	34,27	0,04	1,826	6,706E+01	1,054	7,070E+01
	34,29						
	34,30						
PA37 - MSE - 3 dias	26,33	26,31	0,02	4,093	1,240E+04	0,904	1,121E+04
	26,31						
	26,30						
PA37 - MSE - 15 dias	30,96	30,93	0,03	2,778	5,999E+02	1,045	6,266E+02
	30,92						
	30,91						
13C - V8 - 3 dias	30,44	30,47	0,03	2,910	8,130E+02	0,957	7,783E+02
	30,49						
	30,47						
13C - V8 - 15 dias	34,19	34,22	0,03	1,841	6,930E+01	1,076	7,458E+01
	34,25						
	34,22						
13C - MSE - 3 dias	26,29	26,32	0,03	4,091	1,234E+04	0,955	1,179E+04
	26,35						
	26,32						
13C - MSE - 15 dias	31,00	30,97	0,04	2,768	5,856E+02	1,037	6,075E+02
	30,98						
	30,92						

**Tabela A7:** Quantificação da expressão do gene *acin* em amostras de micélio (ensaio 1).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  
 $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,510 \times \text{Log} (\text{N}^\circ \text{ cópias}) + 40,681$$

$$\text{Coeficiente de correlação} = 0,997$$

Eficiência da reacção PCR: 92,7%

Amostras 2	Ct Alfa	Ct Médio Alfa	Desvio Padrão Ct Alfa	Média Log Cópias Alfa	Média Cópias Alfa	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Alfa Normalizadas
PA45 - V8 - 3 dias	28,05	27,99	0,06	2,844	6,976E+02	1,000	6,976E+02
	27,94						
	27,99						
PA45 - V8 - 15 dias	32,16	32,16	0,03	1,659	4,556E+01	1,098	5,002E+01
	32,19						
	32,14						
PA45 - MSE - 3 dias	23,96	23,90	0,06	4,008	1,018E+04	0,909	9,253E+03
	23,84						
	23,89						
PA45 - MSE - 15 dias	28,67	28,65	0,06	2,658	4,549E+02	1,047	4,761E+02
	28,69						
	28,58						
FATSS - V8 - 3 dias	28,95	28,92	0,03	2,579	3,796E+02	0,982	3,728E+02
	28,89						
	28,93						
FATSS - V8 - 15 dias	33,30	33,33	0,04	1,327	2,124E+01	1,083	2,300E+01
	33,31						
	33,38						
FATSS - MSE - 3 dias	26,46	26,41	0,05	3,294	1,970E+03	0,905	1,782E+03
	26,38						
	26,38						
FATSS - MSE - 15 dias	32,22	32,22	0,04	1,642	4,381E+01	1,044	4,574E+01
	32,19						
	32,26						
PA37 - V8 - 3 dias	27,94	27,89	0,04	2,872	7,448E+02	0,991	7,380E+02
	27,88						
	27,86						
PA37 - V8 - 15 dias	32,11	32,11	0,02	1,675	4,728E+01	1,071	5,062E+01
	32,12						
	32,09						
PA37 - MSE - 3 dias	23,90	23,85	0,04	4,021	1,050E+04	0,901	9,453E+03
	23,82						
	23,83						
PA37 - MSE - 15 dias	28,55	28,49	0,07	2,703	5,051E+02	1,039	5,251E+02
	28,41						
	28,50						
13C - V8 - 3 dias	27,95	27,99	0,09	2,846	7,007E+02	0,980	6,865E+02
	27,82						
	28,00						
13C - V8 - 15 dias	32,10	32,16	0,07	1,659	4,556E+01	1,083	4,934E+01
	32,15						
	32,24						
13C - MSE - 3 dias	23,89	23,87	0,02	4,016	1,038E+04	0,915	9,501E+03
	23,86						
	23,85						
13C - MSE - 15 dias	28,60	28,60	0,01	2,670	4,680E+02	1,030	4,821E+02
	28,61						
	28,60						

**Tabela A8:** Quantificação da expressão do gene *acin* em amostras de micélio (ensaio 2).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  
 $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,519 \times \text{Log} (\text{N}^\circ \text{ cópias}) + 38,000$$

$$\text{Coeficiente de correlação} = 0,998$$

Eficiência da reacção PCR: 92,4%

Amostras 3	Ct Alfa	Ct Médio Alfa	Desvio Padrão Ct Alfa	Média Log Cópias Alfa	Média Cópias Alfa	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Alfa Normalizadas
PA45 - V8 - 3 dias	30,02	30,03	0,03	2,939	8,683E+02	1,000	8,683E+02
	30,07						
	30,01						
PA45 - V8 - 15 dias	33,92	33,62	0,54	1,920	8,327E+01	1,105	9,198E+01
	33,95						
	33,00						
PA45 - MSE - 3 dias	25,88	25,86	0,04	4,122	1,325E+04	0,943	1,249E+04
	25,89						
	25,81						
PA45 - MSE - 15 dias	30,31	30,33	0,03	2,855	7,169E+02	1,044	7,484E+02
	30,31						
	30,36						
FATSS - V8 - 3 dias	30,86	30,86	0,04	2,705	5,072E+02	1,021	5,176E+02
	30,89						
	30,82						
FATSS - V8 - 15 dias	34,56	34,53	0,03	1,663	4,606E+01	1,090	5,020E+01
	34,52						
	34,51						
FATSS - MSE - 3 dias	28,29	28,27	0,02	3,438	2,740E+03	0,945	2,590E+03
	28,27						
	28,26						
FATSS - MSE - 15 dias	34,03	33,96	0,06	1,825	6,684E+01	1,042	6,961E+01
	33,94						
	33,91						
PA37 - V8 - 3 dias	29,93	29,95	0,03	2,962	9,168E+02	0,975	8,943E+02
	29,94						
	29,98						
PA37 - V8 - 15 dias	33,76	33,84	0,07	1,860	7,244E+01	1,082	7,841E+01
	33,88						
	33,87						
PA37 - MSE - 3 dias	25,75	25,77	0,04	4,149	1,408E+04	0,934	1,316E+04
	25,81						
	25,74						
PA37 - MSE - 15 dias	30,11	30,15	0,04	2,905	8,028E+02	1,042	8,362E+02
	30,16						
	30,19						
13C - V8 - 3 dias	30,09	30,08	0,02	2,925	8,422E+02	1,014	8,537E+02
	30,06						
	30,09						
13C - V8 - 15 dias	33,79	33,78	0,02	1,875	7,501E+01	1,115	8,361E+01
	33,80						
	33,76						
13C - MSE - 3 dias	25,68	25,66	0,02	4,178	1,507E+04	0,934	1,408E+04
	25,66						
	25,65						
13C - MSE - 15 dias	30,40	30,36	0,04	2,847	7,030E+02	1,063	7,472E+02
	30,35						
	30,32						

**Tabela A9:** Quantificação da expressão do gene *acin* em amostras de micélio (ensaio 3).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,526 \times \text{Log} (N^\circ \text{ cópias}) + 40,395$$

Coefficiente de correlação = 1,000

Eficiência da reacção PCR: 92,1 %

Amostras 1	Ct Hae Beta	Ct Médio Hae Beta	Desvio Padrão Ct Hae Beta	Média Log Cópias Hae Beta	Média Cópias Hae Beta	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Hae Beta Normalizadas
PA45 - V8 - 3 dias	38,56	38,56	0,03	1,521	3,317E+01	1,000	3,317E+01
	38,58						
	38,53						
PA45 - V8 - 15 dias	39,90	39,92	0,03	1,121	1,321E+01	1,089	1,438E+01
	39,91						
	39,95						
PA45 - MSE - 3 dias	34,38	34,34	0,04	2,757	5,711E+02	0,938	5,356E+02
	34,35						
	34,30						
PA45 - MSE - 15 dias	39,00	38,96	0,04	1,402	2,526E+01	1,035	2,615E+01
	38,93						
	38,95						
FATSS - V8 - 3 dias	39,27	39,23	0,04	1,322	2,100E+01	0,962	2,020E+01
	39,23						
	39,20						
FATSS - V8 - 15 dias	40,32	40,16	0,16	1,051	1,126E+01	1,076	1,211E+01
	40,01						
	40,14						
FATSS - MSE - 3 dias	37,02	37,06	0,07	1,959	9,096E+01	0,917	8,337E+01
	37,03						
	37,14						
FATSS - MSE - 15 dias	39,53	39,55	0,02	1,230	1,700E+01	1,035	1,759E+01
	39,55						
	39,56						
PA37 - V8 - 3 dias	38,46	38,48	0,02	1,543	3,494E+01	0,986	3,446E+01
	38,48						
	38,50						
PA37 - V8 - 15 dias	39,83	39,85	0,02	1,141	1,385E+01	1,054	1,460E+01
	39,86						
	39,86						
PA37 - MSE - 3 dias	34,27	34,25	0,02	2,785	6,096E+02	0,904	5,511E+02
	34,24						
	34,23						
PA37 - MSE - 15 dias	38,95	38,91	0,03	1,416	2,607E+01	1,045	2,723E+01
	38,90						
	38,89						
13C - V8 - 3 dias	38,51	38,51	0,02	1,535	3,431E+01	0,957	3,285E+01
	38,49						
	38,52						
13C - V8 - 15 dias	39,84	39,87	0,03	1,135	1,363E+01	1,076	1,467E+01
	39,90						
	39,88						
13C - MSE - 3 dias	34,28	34,26	0,02	2,781	6,042E+02	0,955	5,771E+02
	34,25						
	34,24						
13C - MSE - 15 dias	39,02	38,94	0,07	1,408	2,561E+01	1,037	2,656E+01
	38,88						
	38,92						

**Tabela A10:** Quantificação da expressão do gene *Haeβcin* em amostras de micélio (ensaio 1).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,409 \times \text{Log} (N^\circ \text{ cópias}) + 43,741$$

Coefficiente de correlação = 0,990

Eficiência da reacção PCR: 96,5%

Amostras 2	Ct Hae Beta	Ct Médio Hae Beta	Desvio Padrão Ct Hae Beta	Média Log Cópias Hae Beta	Média Cópias Hae Beta	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Hae Beta Normalizadas
PA45 - V8 - 3 dias	38,33	38,33	0,03	1,486	3,059E+01	1,000	3,059E+01
	38,35						
	38,30						
PA45 - V8 - 15 dias	39,71	39,75	0,04	1,069	1,173E+01	1,098	1,288E+01
	39,76						
	39,78						
PA45 - MSE - 3 dias	34,30	34,34	0,04	2,652	4,484E+02	0,909	4,075E+02
	34,37						
	34,35						
PA45 - MSE - 15 dias	38,88	38,85	0,04	1,334	2,155E+01	1,047	2,256E+01
	38,81						
	38,85						
FATSS - V8 - 3 dias	38,92	38,96	0,04	1,299	1,993E+01	0,982	1,957E+01
	38,99						
	38,98						
FATSS - V8 - 15 dias	40,92	40,94	0,03	0,721	5,263E+00	1,083	5,700E+00
	40,93						
	40,97						
FATSS - MSE - 3 dias	36,68	36,75	0,07	1,947	8,846E+01	0,905	8,004E+01
	36,82						
	36,75						
FATSS - MSE - 15 dias	40,01	39,98	0,07	1,001	1,002E+01	1,044	1,047E+01
	40,04						
	39,90						
PA37 - V8 - 3 dias	38,22	38,25	0,04	1,507	3,214E+01	0,991	3,185E+01
	38,29						
	38,25						
PA37 - V8 - 15 dias	39,44	39,47	0,04	1,151	1,416E+01	1,071	1,517E+01
	39,46						
	39,51						
PA37 - MSE - 3 dias	34,13	34,09	0,04	2,724	5,294E+02	0,901	4,768E+02
	34,06						
	34,09						
PA37 - MSE - 15 dias	39,05	39,02	0,07	1,283	1,918E+01	1,039	1,994E+01
	39,07						
	38,94						
13C - V8 - 3 dias	38,26	38,26	0,06	1,504	3,193E+01	0,980	3,128E+01
	38,21						
	38,32						
13C - V8 - 15 dias	39,06	39,04	0,03	1,278	1,897E+01	1,083	2,054E+01
	39,04						
	39,01						
13C - MSE - 3 dias	34,34	34,33	0,02	2,654	4,504E+02	0,915	4,122E+02
	34,35						
	34,31						
13C - MSE - 15 dias	39,27	39,30	0,03	1,200	1,585E+01	1,030	1,632E+01
	39,33						
	39,31						

**Tabela A11:** Quantificação da expressão do gene *Haeβcin* em amostras de micélio (ensaio 2).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  
10<sup>7</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup> e 10<sup>3</sup> cópias da sequência alvo.

Ct = - 3,419 x Log (Nº cópias) + 43,406  
Coeficiente de correlação = 0,999

Eficiência da reacção PCR: 96,1%

Amostras 3	Ct Hae Beta	Ct Médio Hae Beta	Desvio Padrão Ct Hae Beta	Média Log Cópias Hae Beta	Média Cópias Hae Beta	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Hae Beta Normalizadas
PA45 - V8 - 3 dias	37,81	37,89	0,07	1,588	3,873E+01	1,000	3,873E+01
	37,90						
	37,95						
PA45 - V8 - 15 dias	38,98	38,97	0,02	1,273	1,873E+01	1,105	2,069E+01
	38,97						
	38,95						
PA45 - MSE - 3 dias	33,30	33,32	0,03	2,922	8,351E+02	0,943	7,874E+02
	33,35						
	33,31						
PA45 - MSE - 15 dias	38,41	38,43	0,02	1,428	2,681E+01	1,044	2,799E+01
	38,44						
	38,45						
FATSS - V8 - 3 dias	38,65	38,62	0,03	1,373	2,360E+01	1,021	2,408E+01
	38,62						
	38,60						
FATSS - V8 - 15 dias	40,65	40,66	0,04	0,778	5,998E+00	1,090	6,537E+00
	40,63						
	40,70						
FATSS - MSE - 3 dias	36,54	36,52	0,02	1,987	9,708E+01	0,945	9,175E+01
	36,50						
	36,52						
FATSS - MSE - 15 dias	38,97	39,01	0,04	1,259	1,815E+01	1,042	1,891E+01
	39,02						
	39,05						
PA37 - V8 - 3 dias	37,71	37,82	0,11	1,607	4,050E+01	0,975	3,951E+01
	37,83						
	37,92						
PA37 - V8 - 15 dias	38,93	38,96	0,03	1,274	1,877E+01	1,082	2,032E+01
	38,97						
	38,99						
PA37 - MSE - 3 dias	33,18	33,23	0,05	2,947	8,852E+02	0,934	8,271E+02
	33,27						
	33,25						
PA37 - MSE - 15 dias	38,29	38,22	0,06	1,490	3,088E+01	1,042	3,216E+01
	38,17						
	38,21						
13C - V8 - 3 dias	37,72	37,76	0,04	1,625	4,217E+01	1,014	4,275E+01
	37,76						
	37,80						
13C - V8 - 15 dias	38,54	38,62	0,07	1,374	2,365E+01	1,115	2,636E+01
	38,65						
	38,67						
13C - MSE - 3 dias	33,22	33,27	0,05	2,936	8,636E+02	0,934	8,070E+02
	33,31						
	33,28						
13C - MSE - 15 dias	39,46	39,41	0,04	1,143	1,390E+01	1,063	1,478E+01
	39,38						
	39,39						

**Tabela A12:** Quantificação da expressão do gene *Haeβcin* em amostras de micélio (ensaio 3).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  
10<sup>7</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup> e 10<sup>3</sup> cópias da sequência alvo.

Ct = - 3,424 x Log (Nº cópias) + 43,324  
Coeficiente de correlação = 0,997

Eficiência da reacção PCR: 95,9%

Amostras 1	Ct Hae Alfa	Ct Médio Hae Alfa	Desvio Padrão Ct Hae Alfa	Média Log Cópias Hae Alfa	Média Cópias Hae Alfa	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Hae Alfa Normalizadas
PA45 - V8 - 3 dias	37,87	37,86	0,12	0,643	4,397E+00	1,000	4,397E+00
	37,98						
	37,74						
PA45 - V8 - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,089	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA45 - MSE - 3 dias	34,10	34,22	0,16	1,713	5,163E+01	0,938	4,842E+01
	34,40						
	34,15						
PA45 - MSE - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,035	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - V8 - 3 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	0,962	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - V8 - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,076	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - MSE - 3 dias	39,65	39,62	0,03	0,129	1,345E+00	0,917	1,233E+00
	39,61						
	39,59						
FATSS - MSE - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,035	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA37 - V8 - 3 dias	37,68	37,65	0,03	0,706	5,079E+00	0,986	5,010E+00
	37,63						
	37,64						
PA37 - V8 - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,054	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA37 - MSE - 3 dias	34,10	34,06	0,05	1,758	5,727E+01	0,904	5,177E+01
	34,01						
	34,08						
PA37 - MSE - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,045	#DIV/0!
	ND						
	ND						
13C - V8 - 3 dias	37,56	37,47	0,08	0,760	5,749E+00	0,957	5,503E+00
	37,43						
	37,41						
13C - V8 - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,076	#DIV/0!
	ND						
	ND						
13C - MSE - 3 dias	34,03	34,10	0,06	1,747	5,587E+01	0,955	5,336E+01
	34,15						
	34,12						
13C - MSE - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,037	#DIV/0!
	ND						
	ND						

**Tabela A13:** Quantificação da expressão do gene *Haeacin* em amostras de micélio (ensaio 1).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,409 \times \text{Log} (N^\circ \text{ cópias}) + 40,056$$

Coefficiente de correlação = 0,993

Eficiência da reacção PCR: 96,5%

ND = Valor de Ct Não Detectado  
 #DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras 2	Ct Hae Alfa	Ct Médio Hae Alfa	Desvio Padrão Ct Hae Alfa	Média Log Cópias Hae Alfa	Média Cópias Hae Alfa	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Hae Alfa Normalizadas
PA45 - V8 - 3 dias	35,44	35,42	0,03	0,726	5,316E+00	1,000	5,316E+00
	35,43						
	35,38						
PA45 - V8 - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,098	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA45 - MSE - 3 dias	32,63	32,69	0,09	1,523	3,333E+01	0,909	3,030E+01
	32,64						
	32,79						
PA45 - MSE - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,047	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - V8 - 3 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	0,982	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - V8 - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,083	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - MSE - 3 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	0,905	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - MSE - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,044	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA37 - V8 - 3 dias	36,73	36,71	0,06	0,349	2,233E+00	0,991	2,212E+00
	36,64						
	36,75						
PA37 - V8 - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,071	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA37 - MSE - 3 dias	32,20	32,17	0,03	1,673	4,708E+01	0,901	4,240E+01
	32,14						
	32,18						
PA37 - MSE - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,039	#DIV/0!
	ND						
	ND						
13C - V8 - 3 dias	36,15	36,14	0,04	0,515	3,276E+00	0,980	3,209E+00
	36,17						
	36,09						
13C - V8 - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,083	#DIV/0!
	ND						
	ND						
13C - MSE - 3 dias	32,03	32,05	0,03	1,708	5,103E+01	0,915	4,670E+01
	32,05						
	32,08						
13C - MSE - 15 dias	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,030	#DIV/0!
	ND						
	ND						

**Tabela A14:** Quantificação da expressão do gene *Haeacin* em amostras de micélio (ensaio 2).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,424 \times \text{Log} (N^\circ \text{ cópias}) + 37,901$$

Coefficiente de correlação = 0,998

Eficiência da reacção PCR: 95,9%

ND = Valor de Ct Não Detectado  
 #DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras 3	Ct Hae Alfa	Ct Médio Hae Alfa	Desvio Padrão Ct Hae Alfa	Média Log Cópias Hae Alfa	Média Cópias Hae Alfa	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Hae Alfa Normalizadas
PA45 - V8 - 3 dias	36,59 36,58 36,64	36,60	0,03	0,988	9,726E+00	1,000	9,726E+00
PA45 - V8 - 15 dias	ND ND ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,105	#DIV/0!
PA45 - MSE - 3 dias	33,95 33,92 33,93	33,93	0,02	1,767	5,852E+01	0,943	5,517E+01
PA45 - MSE - 15 dias	ND ND ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,044	#DIV/0!
FATSS - V8 - 3 dias	ND ND ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,021	#DIV/0!
FATSS - V8 - 15 dias	ND ND ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,090	#DIV/0!
FATSS - MSE - 3 dias	ND ND ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	0,945	#DIV/0!
FATSS - MSE - 15 dias	ND ND ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,042	#DIV/0!
PA37 - V8 - 3 dias	36,35 36,44 37,39	36,73	0,58	0,952	8,952E+00	0,975	8,732E+00
PA37 - V8 - 15 dias	ND ND ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,082	#DIV/0!
PA37 - MSE - 3 dias	33,86 33,99 34,02	33,96	0,09	1,760	5,760E+01	0,934	5,383E+01
PA37 - MSE - 15 dias	ND ND ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,042	#DIV/0!
13C - V8 - 3 dias	37,20 37,17 37,26	37,21	0,05	0,811	6,469E+00	1,014	6,558E+00
13C - V8 - 15 dias	ND ND ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,115	#DIV/0!
13C - MSE - 3 dias	33,86 33,78 33,81	33,82	0,04	1,801	6,329E+01	0,934	5,914E+01
13C - MSE - 15 dias	ND ND ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1,063	#DIV/0!

**Tabela A15:** Quantificação da expressão do gene *Haeacin* em amostras de micélio (ensaio 3).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  
 $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  cópias da sequência alvo.

$Ct = -3,426 \times \text{Log} (N^\circ \text{ cópias}) + 39,988$   
Coeficiente de correlação = 0,998

Eficiência da reacção PCR: 95,8%

ND = Valor de Ct Não Detectado  
#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

- Nas tabelas seguintes, denominadas de tipo B, são resumidos os valores médios do número de cópias obtido em cada ensaio independente para cada um dos genes; apresentam também um valor médio global dos três ensaios, bem como o respectivo desvio padrão; no caso da actina é mostrado um factor de normalização global dos três ensaios e nos genes das elicinas são calculados factores de indução, que revelam se o gene sofreu um aumento ou diminuição de expressão em relação à sua expressão na amostra padrão.

$$\text{Factor de indução} = \frac{\text{Número de cópias do gene da elicina em PA45, V8C, 3 dias}}{\text{Número cópias normalizadas do gene da elicina na amostra em estudo}}$$

Amostras Micélio	Média Cópias Actina 1	Média Cópias Actina 2	Média Cópias Actina 3	Média Cópias Actina	Desvio Padrão	Factor de Normalização
PA45 - V8 - 3 dias	1,608E+06	1,461E+06	1,726E+06	1,598E+06	1,330E+05	1,000
PA45 - V8 - 15 dias	1,477E+06	1,331E+06	1,563E+06	1,457E+06	1,173E+05	0,911
PA45 - MSE - 3 dias	1,715E+06	1,607E+06	1,831E+06	1,718E+06	1,118E+05	1,075
PA45 - MSE - 15 dias	1,554E+06	1,396E+06	1,654E+06	1,534E+06	1,300E+05	0,960
FATSS - V8 - 3 dias	1,672E+06	1,488E+06	1,691E+06	1,617E+06	1,125E+05	1,012
FATSS - V8 - 15 dias	1,494E+06	1,349E+06	1,584E+06	1,476E+06	1,186E+05	0,923
FATSS - MSE - 3 dias	1,755E+06	1,615E+06	1,827E+06	1,732E+06	1,078E+05	1,084
FATSS - MSE - 15 dias	1,554E+06	1,399E+06	1,657E+06	1,537E+06	1,300E+05	0,961
PA37 - V8 - 3 dias	1,631E+06	1,474E+06	1,770E+06	1,625E+06	1,478E+05	1,016
PA37 - V8 - 15 dias	1,526E+06	1,364E+06	1,595E+06	1,495E+06	1,182E+05	0,935
PA37 - MSE - 3 dias	1,779E+06	1,622E+06	1,847E+06	1,749E+06	1,156E+05	1,094
PA37 - MSE - 15 dias	1,540E+06	1,405E+06	1,657E+06	1,534E+06	1,261E+05	0,960
13C - V8 - 3 dias	1,680E+06	1,491E+06	1,703E+06	1,625E+06	1,163E+05	1,016
13C - V8 - 15 dias	1,494E+06	1,349E+06	1,549E+06	1,464E+06	1,032E+05	0,916
13C - MSE - 3 dias	1,684E+06	1,596E+06	1,847E+06	1,709E+06	1,274E+05	1,069
13C - MSE - 15 dias	1,550E+06	1,418E+06	1,624E+06	1,531E+06	1,042E+05	0,958

**Tabela B1:** Resumo da quantificação da expressão do gene da actina em amostras de micélio.

Amostras Micélio	Média Cópias Beta Normalizadas 1	Média Cópias Beta Normalizadas 2	Média Cópias Beta Normalizadas 3	Média Cópias Beta Normalizadas	Desvio Padrão	Factor de indução
PA45 - V8 - 3 dias	5,517E+01	5,206E+01	6,183E+01	5,635E+01	4,993E+00	1,000
PA45 - V8 - 15 dias	3,284E+01	2,917E+01	3,550E+01	3,250E+01	3,178E+00	0,577
PA45 - MSE - 3 dias	7,342E+03	6,670E+03	8,435E+03	7,482E+03	8,910E+02	132,774
PA45 - MSE - 15 dias	4,084E+02	3,749E+02	4,522E+02	4,118E+02	3,877E+01	7,307
FATSS - V8 - 3 dias	#DIV/0!	#DIV/0!	3,682E-01	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - V8 - 15 dias	#DIV/0!	#DIV/0!	2,656E-01	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - MSE - 3 dias	#DIV/0!	1,943E-01	3,173E-01	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - MSE - 15 dias	#DIV/0!	#DIV/0!	3,365E-01	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA37 - V8 - 3 dias	5,391E+01	4,667E+01	5,948E+01	5,335E+01	6,420E+00	0,947
PA37 - V8 - 15 dias	3,106E+01	3,037E+01	3,627E+01	3,257E+01	3,228E+00	0,578
PA37 - MSE - 3 dias	7,562E+03	6,781E+03	8,536E+03	7,626E+03	8,792E+02	135,328
PA37 - MSE - 15 dias	4,706E+02	4,251E+02	5,319E+02	4,759E+02	5,361E+01	8,444
13C - V8 - 3 dias	4,497E+01	4,615E+01	5,182E+01	4,764E+01	3,663E+00	0,845
13C - V8 - 15 dias	3,141E+01	3,151E+01	3,727E+01	3,339E+01	3,354E+00	0,593
13C - MSE - 3 dias	7,585E+03	6,607E+03	8,615E+03	7,602E+03	1,004E+03	134,904
13C - MSE - 15 dias	4,651E+02	3,883E+02	3,251E+02	3,929E+02	7,014E+01	6,971

**Tabela B2:** Resumo da quantificação da expressão do gene  $\beta cin$  em amostras de micélio.

#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Micélio	Média Cópias Alfa Normalizadas 1	Média Cópias Alfa Normalizadas 2	Média Cópias Alfa Normalizadas 3	Média Cópias Alfa Normalizadas	Desvio Padrão	Factor de indução
PA45 - V8 - 3 dias	7,748E+02	6,976E+02	8,683E+02	7,802E+02	8,545E+01	1,000
PA45 - V8 - 15 dias	6,852E+01	5,002E+01	9,198E+01	7,017E+01	2,103E+01	0,090
PA45 - MSE - 3 dias	1,068E+04	9,253E+03	1,249E+04	1,081E+04	1,625E+03	13,852
PA45 - MSE - 15 dias	6,008E+02	4,761E+02	7,484E+02	6,084E+02	1,363E+02	0,780
FATSS - V8 - 3 dias	4,183E+02	3,728E+02	5,176E+02	4,362E+02	7,405E+01	0,559
FATSS - V8 - 15 dias	3,762E+01	2,300E+01	5,020E+01	3,694E+01	1,361E+01	0,047
FATSS - MSE - 3 dias	2,119E+03	1,782E+03	2,590E+03	2,164E+03	4,054E+02	2,773
FATSS - MSE - 15 dias	5,144E+01	4,574E+01	6,961E+01	5,560E+01	1,247E+01	0,071
PA37 - V8 - 3 dias	8,054E+02	7,380E+02	8,943E+02	8,126E+02	7,837E+01	1,041
PA37 - V8 - 15 dias	7,070E+01	5,062E+01	7,841E+01	6,658E+01	1,434E+01	0,085
PA37 - MSE - 3 dias	1,121E+04	9,453E+03	1,316E+04	1,127E+04	1,854E+03	14,449
PA37 - MSE - 15 dias	6,266E+02	5,251E+02	8,362E+02	6,626E+02	1,586E+02	0,849
13C - V8 - 3 dias	7,783E+02	6,865E+02	8,537E+02	7,728E+02	8,375E+01	0,991
13C - V8 - 15 dias	7,458E+01	4,934E+01	8,361E+01	6,918E+01	1,776E+01	0,089
13C - MSE - 3 dias	1,179E+04	9,501E+03	1,408E+04	1,179E+04	2,289E+03	15,111
13C - MSE - 15 dias	6,075E+02	4,821E+02	7,472E+02	6,123E+02	1,327E+02	0,785

**Tabela B3:** Resumo da quantificação da expressão do gene *acin* em amostras de micélio.

Amostras Micélio	Média Cópias Hae Beta Normalizadas 1	Média Cópias Hae Beta Normalizadas 2	Média Cópias Hae Beta Normalizadas 3	Média Cópias Hae Beta Normalizadas	Desvio Padrão	Factor de indução
PA45 - V8 - 3 dias	3,317E+01	3,059E+01	3,873E+01	3,416E+01	4,156E+00	1,000
PA45 - V8 - 15 dias	1,438E+01	1,288E+01	2,069E+01	1,598E+01	4,147E+00	0,468
PA45 - MSE - 3 dias	5,356E+02	4,075E+02	7,874E+02	5,768E+02	1,933E+02	16,885
PA45 - MSE - 15 dias	2,615E+01	2,256E+01	2,799E+01	2,556E+01	2,763E+00	0,748
FATSS - V8 - 3 dias	2,020E+01	1,957E+01	2,408E+01	2,128E+01	2,445E+00	0,623
FATSS - V8 - 15 dias	1,211E+01	5,700E+00	6,537E+00	8,117E+00	3,487E+00	0,238
FATSS - MSE - 3 dias	8,337E+01	8,004E+01	9,175E+01	8,505E+01	6,034E+00	2,489
FATSS - MSE - 15 dias	1,759E+01	1,047E+01	1,891E+01	1,566E+01	4,541E+00	0,458
PA37 - V8 - 3 dias	3,446E+01	3,185E+01	3,951E+01	3,527E+01	3,893E+00	1,032
PA37 - V8 - 15 dias	1,460E+01	1,517E+01	2,032E+01	1,669E+01	3,153E+00	0,489
PA37 - MSE - 3 dias	5,511E+02	4,768E+02	8,271E+02	6,184E+02	1,846E+02	18,100
PA37 - MSE - 15 dias	2,723E+01	1,994E+01	3,216E+01	2,644E+01	6,152E+00	0,774
13C - V8 - 3 dias	3,285E+01	3,128E+01	4,275E+01	3,562E+01	6,217E+00	1,043
13C - V8 - 15 dias	1,467E+01	2,054E+01	2,636E+01	2,052E+01	5,846E+00	0,601
13C - MSE - 3 dias	5,771E+02	4,122E+02	8,070E+02	5,988E+02	1,983E+02	17,526
13C - MSE - 15 dias	2,656E+01	1,632E+01	1,478E+01	1,922E+01	6,404E+00	0,563

**Tabela B4:** Resumo da quantificação da expressão do gene *Haeβcin* em amostras de micélio.

Amostras Micélio	Média Cópias Hae Alfa Normalizadas 1	Média Cópias Hae Alfa Normalizadas 2	Média Cópias Hae Alfa Normalizadas 3	Média Cópias Hae Alfa Normalizadas	Desvio Padrão	Factor de indução
PA45 - V8 - 3 dias	4,397E+00	5,316E+00	9,726E+00	6,480E+00	2,849E+00	1,000
PA45 - V8 - 15 dias	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA45 - MSE - 3 dias	4,842E+01	3,030E+01	5,517E+01	4,463E+01	1,286E+01	6,888
PA45 - MSE - 15 dias	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - V8 - 3 dias	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - V8 - 15 dias	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - MSE - 3 dias	1,233E+00	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - MSE - 15 dias	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA37 - V8 - 3 dias	5,010E+00	2,212E+00	8,732E+00	5,318E+00	3,271E+00	0,821
PA37 - V8 - 15 dias	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA37 - MSE - 3 dias	5,177E+01	4,240E+01	5,383E+01	4,933E+01	6,091E+00	7,613
PA37 - MSE - 15 dias	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
13C - V8 - 3 dias	5,503E+00	3,209E+00	6,558E+00	5,090E+00	1,712E+00	0,786
13C - V8 - 15 dias	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
13C - MSE - 3 dias	5,336E+01	4,670E+01	5,914E+01	5,307E+01	6,224E+00	8,190
13C - MSE - 15 dias	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

**Tabela B5:** Resumo da quantificação da expressão do gene *Haeacin* em amostras de micélio.

#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

- Nas tabelas de tipo C estão apresentados os resultados dos cálculos de quantificação que foram efectuados segundo as recomendações do “ABI Prism 7700 Sequence Detection System - User Bulletin #2” fornecido pela Applied Biosystems. Estes cálculos foram efectuados para confirmar se a quantificação mostrada nas tabelas anteriores estava correcta. Efectivamente, a quantificação anterior é válida, como pode ser verificado pelos factores de indução semelhantes obtidos num e noutra caso. Simplesmente a normalização foi efectuada de modos distintos nos dois métodos.
- Para estes cálculos foram utilizados os valores médios dos números de cópias dos genes obtidos nos três ensaios.

- A quantidade normalizada de um gene é um número sem unidades que é usado para comparar as quantidades relativas de sequências alvo em amostras distintas. Neste caso, a quantidade normalizada foi obtida por:

$$\text{Quantidade normalizada do gene da elicina} = \frac{\text{Número médio de cópias do gene da elicina}}{\text{Número cópias da actina}}$$

- O desvio padrão deste quociente é dado por

$$\text{cv elicina normalizada} = \sqrt{(\text{cv elicina})^2 + (\text{cv actina})^2}$$

Onde cv gene = desvio padrão do gene(S)/média de cópias do gene

Como S = cv gene x média cópias do gene

também,

S elicina normalizada = cv elicina normalizada x média normalizada

- O factor de indução (ou elicina relativamente à amostra padrão) é dado por

$$\frac{\text{Quantidade normalizada do gene da elicina na amostra em estudo}}{\text{Quantidade normalizada do gene da elicina em PA45, V8, 3 dias}}$$

- O desvio padrão deste quociente é igual ao cv da elicina normalizada

Amostras Micélio	Média Cópias Actina	Desvio Padrão Actina	Média Cópias Beta	Desvio Padrão Beta	Beta normalizada	cv BetaN	S BetaN	Beta Relativ PA45, V8, 5d
PA45 - V8 - 3 dias	1,598E+06	1,330E+05	5,635E+01	4,993E+00	3,526E-05	1,215E-01	4,285E-06	1,00
PA45 - V8 - 15 dias	1,457E+06	1,173E+05	2,963E+01	2,822E+00	2,034E-05	1,247E-01	2,536E-06	0,58
PA45 - MSE - 3 dias	1,718E+06	1,118E+05	8,038E+03	8,239E+02	4,680E-03	1,214E-01	5,681E-04	132,73
PA45 - MSE - 15 dias	1,534E+06	1,300E+05	3,953E+02	3,749E+01	2,576E-04	1,272E-01	3,276E-05	7,31
FATSS - V8 - 3 dias	1,617E+06	1,125E+05	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - V8 - 15 dias	1,476E+06	1,186E+05	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - MSE - 3 dias	1,732E+06	1,078E+05	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - MSE - 15 dias	1,537E+06	1,300E+05	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA37 - V8 - 3 dias	1,625E+06	1,478E+05	5,424E+01	6,947E+00	3,339E-05	1,571E-01	5,245E-06	0,95
PA37 - V8 - 15 dias	1,495E+06	1,182E+05	3,045E+01	2,711E+00	2,037E-05	1,191E-01	2,425E-06	0,58
PA37 - MSE - 3 dias	1,749E+06	1,156E+05	8,343E+03	8,032E+02	4,769E-03	1,168E-01	5,568E-04	135,27
PA37 - MSE - 15 dias	1,534E+06	1,261E+05	4,567E+02	5,115E+01	2,977E-04	1,389E-01	4,136E-05	8,44
13C - V8 - 3 dias	1,625E+06	1,163E+05	4,840E+01	2,359E+00	2,979E-05	8,659E-02	2,579E-06	0,84
13C - V8 - 15 dias	1,464E+06	1,032E+05	3,057E+01	2,478E+00	2,088E-05	1,074E-01	2,244E-06	0,59
13C - MSE - 3 dias	1,709E+06	1,274E+05	8,127E+03	1,013E+03	4,755E-03	1,452E-01	6,906E-04	134,87
13C - MSE - 15 dias	1,531E+06	1,042E+05	3,771E+02	7,128E+01	2,463E-04	2,009E-01	4,949E-05	6,99

**Tabela C1:**

Cálculos alternativos para a quantificação da expressão do gene *βcin* em amostras de micélio.

#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Micélio	Média Cópias Actina	Desvio Padrão Actina	Média Cópias Alfa	Desvio Padrão Alfa	Alfa normalizada	cv AlfaN	S AlfaN	Alfa Relativ PA45, V8, 5d
PA45 - V8 - 3 dias	1,598E+06	1,330E+05	7,802E+02	8,545E+01	4,881E-04	1,375E-01	6,713E-05	1,00
PA45 - V8 - 15 dias	1,457E+06	1,173E+05	6,393E+01	1,887E+01	4,388E-05	3,060E-01	1,343E-05	0,09
PA45 - MSE - 3 dias	1,718E+06	1,118E+05	1,161E+04	1,547E+03	6,757E-03	1,483E-01	1,002E-03	13,84
PA45 - MSE - 15 dias	1,534E+06	1,300E+05	5,841E+02	1,310E+02	3,807E-04	2,398E-01	9,127E-05	0,78
FATSS - V8 - 3 dias	1,617E+06	1,125E+05	4,406E+02	6,396E+01	2,725E-04	1,610E-01	4,386E-05	0,56
FATSS - V8 - 15 dias	1,476E+06	1,186E+05	3,408E+01	1,244E+01	2,310E-05	3,736E-01	8,629E-06	0,05
FATSS - MSE - 3 dias	1,732E+06	1,078E+05	2,341E+03	3,859E+02	1,352E-03	1,762E-01	2,382E-04	2,77
FATSS - MSE - 15 dias	1,537E+06	1,300E+05	5,345E+01	1,196E+01	3,478E-05	2,393E-01	8,322E-06	0,07
PA37 - V8 - 3 dias	1,625E+06	1,478E+05	8,260E+02	8,641E+01	5,084E-04	1,386E-01	7,048E-05	1,04
PA37 - V8 - 15 dias	1,495E+06	1,182E+05	6,226E+01	1,325E+01	4,165E-05	2,270E-01	9,454E-06	0,09
PA37 - MSE - 3 dias	1,749E+06	1,156E+05	1,233E+04	1,795E+03	7,046E-03	1,599E-01	1,127E-03	14,43
PA37 - MSE - 15 dias	1,534E+06	1,261E+05	6,359E+02	1,521E+02	4,145E-04	2,529E-01	1,048E-04	0,85
13C - V8 - 3 dias	1,625E+06	1,163E+05	7,853E+02	7,472E+01	4,834E-04	1,191E-01	5,755E-05	0,99
13C - V8 - 15 dias	1,464E+06	1,032E+05	6,329E+01	1,562E+01	4,323E-05	2,566E-01	1,109E-05	0,09
13C - MSE - 3 dias	1,709E+06	1,274E+05	1,260E+04	2,352E+03	7,371E-03	2,011E-01	1,482E-03	15,10
13C - MSE - 15 dias	1,531E+06	1,042E+05	5,855E+02	1,175E+02	3,825E-04	2,119E-01	8,104E-05	0,78

**Tabela C2:**  
Cálculos alternativos para a quantificação da expressão do gene *αcin* em amostras de micélio.

Amostras Micélio	Média Cópias Actina	Desvio Padrão Actina	Média Cópias Hae Beta	Desvio Padrão Hae Beta	Hae Beta normalizada	cv Hae BetaN	S Hae BetaN	Hae Beta Relativ PA45, V8, 5d
PA45 - V8 - 3 dias	1,598E+06	1,330E+05	3,416E+01	4,156E+00	2,137E-05	1,474E-01	3,150E-06	1,00
PA45 - V8 - 15 dias	1,457E+06	1,173E+05	1,456E+01	3,690E+00	9,992E-06	2,660E-01	2,658E-06	0,47
PA45 - MSE - 3 dias	1,718E+06	1,118E+05	6,182E+02	1,976E+02	3,599E-04	3,262E-01	1,174E-04	16,84
PA45 - MSE - 15 dias	1,534E+06	1,300E+05	2,454E+01	2,702E+00	1,599E-05	1,389E-01	2,222E-06	0,75
FATSS - V8 - 3 dias	1,617E+06	1,125E+05	2,151E+01	1,887E+00	1,330E-05	1,120E-01	1,489E-06	0,62
FATSS - V8 - 15 dias	1,476E+06	1,186E+05	7,506E+00	3,269E+00	5,086E-06	4,429E-01	2,252E-06	0,24
FATSS - MSE - 3 dias	1,732E+06	1,078E+05	9,217E+01	4,436E+00	5,322E-05	7,868E-02	4,187E-06	2,49
FATSS - MSE - 15 dias	1,537E+06	1,300E+05	1,506E+01	4,397E+00	9,799E-06	3,040E-01	2,979E-06	0,46
PA37 - V8 - 3 dias	1,625E+06	1,478E+05	3,586E+01	4,256E+00	2,207E-05	1,496E-01	3,301E-06	1,03
PA37 - V8 - 15 dias	1,495E+06	1,182E+05	1,560E+01	2,757E+00	1,043E-05	1,937E-01	2,020E-06	0,49
PA37 - MSE - 3 dias	1,749E+06	1,156E+05	6,748E+02	1,866E+02	3,857E-04	2,843E-01	1,097E-04	18,05
PA37 - MSE - 15 dias	1,534E+06	1,261E+05	2,538E+01	5,881E+00	1,654E-05	2,459E-01	4,067E-06	0,77
13C - V8 - 3 dias	1,625E+06	1,163E+05	3,614E+01	5,360E+00	2,224E-05	1,647E-01	3,663E-06	1,04
13C - V8 - 15 dias	1,464E+06	1,032E+05	1,875E+01	5,013E+00	1,281E-05	2,765E-01	3,541E-06	0,60
13C - MSE - 3 dias	1,709E+06	1,274E+05	6,394E+02	2,089E+02	3,741E-04	3,350E-01	1,253E-04	17,50
13C - MSE - 15 dias	1,531E+06	1,042E+05	1,845E+01	6,271E+00	1,205E-05	3,466E-01	4,178E-06	0,56

**Tabela C3:**  
Cálculos alternativos para a quantificação da expressão do gene *Haeβcin* em amostras de micélio.

Amostras Micélio	Média Cópias Actina	Desvio Padrão Actina	Média Cópias Hae Alfa	Desvio Padrão Hae Alfa	Hae Alfa normalizada	cv Hae AlfaN	S Hae AlfaN	Hae Alfa Relativ PA45, V8, 5d
PA45 - V8 - 3 dias	1,598E+06	1,330E+05	6,480E+00	2,849E+00	4,054E-06	4,474E-01	1,814E-06	1,00
PA45 - V8 - 15 dias	1,457E+06	1,173E+05	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA45 - MSE - 3 dias	1,718E+06	1,118E+05	4,783E+01	1,302E+01	2,784E-05	2,798E-01	7,791E-06	6,87
PA45 - MSE - 15 dias	1,534E+06	1,300E+05	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - V8 - 3 dias	1,617E+06	1,125E+05	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - V8 - 15 dias	1,476E+06	1,186E+05	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - MSE - 3 dias	1,732E+06	1,078E+05	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - MSE - 15 dias	1,537E+06	1,300E+05	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA37 - V8 - 3 dias	1,625E+06	1,478E+05	5,421E+00	3,373E+00	3,337E-06	6,288E-01	2,098E-06	0,82
PA37 - V8 - 15 dias	1,495E+06	1,182E+05	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA37 - MSE - 3 dias	1,749E+06	1,156E+05	5,398E+01	5,983E+00	3,086E-05	1,290E-01	3,982E-06	7,61
PA37 - MSE - 15 dias	1,534E+06	1,261E+05	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
13C - V8 - 3 dias	1,625E+06	1,163E+05	5,164E+00	1,675E+00	3,179E-06	3,321E-01	1,056E-06	0,78
13C - V8 - 15 dias	1,464E+06	1,032E+05	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
13C - MSE - 3 dias	1,709E+06	1,274E+05	5,673E+01	6,173E+00	3,319E-05	1,319E-01	4,378E-06	8,19
13C - MSE - 15 dias	1,531E+06	1,042E+05	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

**Tabela C4:**  
Cálculos alternativos para a quantificação da expressão do gene *Haeacin* em amostras de micélio.

#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

- Nas amostras provenientes de raízes usaram-se como padrão os valores de expressão genética média obtidos para o micélio do isolamento PA45 cultivado durante 3 dias em meio V<sub>8</sub>C.
- As amostras dos ensaios 1 e 2 foram analisadas num mesmo ensaio de quantificação.

Amostras Raiz 1	Ct Actina	Ct Médio Actina	Desvio Padrão Ct Actina	Média Log Cópias Actina	Média Cópias Actina	Factor de Normalização das Amostras
PA45 - 12 h	28,62	28,66	0,03	2,885	7,674E+02	2,083E+03
	28,67					
	28,68					
PA45 - 24 h	26,54	26,32	0,21	3,522	3,327E+03	4,804E+02
	26,30					
	26,12					
PA45 - 36 h	23,67	23,61	0,14	4,261	1,823E+04	8,766E+01
	23,45					
	23,71					
FATSS - 12 h	32,19	32,22	0,03	1,914	8,213E+01	1,946E+04
	32,21					
	32,25					
FATSS - 24 h	28,69	28,86	0,14	2,831	6,769E+02	2,361E+03
	28,95					
	28,93					
FATSS - 36 h	26,10	26,07	0,04	3,589	3,884E+03	4,115E+02
	26,03					
	26,09					
PA37 - 12 h	28,32	28,33	0,02	2,973	9,401E+02	1,700E+03
	28,33					
	28,35					
PA37 - 24 h	26,19	26,23	0,04	3,547	3,521E+03	4,540E+02
	26,26					
	26,24					
PA37 - 36 h	23,67	23,66	0,01	4,248	1,771E+04	9,026E+01
	23,65					
	23,65					
13C - 12 h	28,41	28,38	0,03	2,960	9,111E+02	1,754E+03
	28,35					
	28,39					
13C - 24 h	26,16	26,12	0,08	3,577	3,772E+03	4,237E+02
	26,17					
	26,03					
13C - 36 h	23,80	23,82	0,02	4,204	1,598E+04	1,000E+02
	23,84					
	23,82					

**Tabela A16:** Quantificação da expressão do gene da actina em amostras de raízes (ensaio 1).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  
10<sup>7</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup> e 10<sup>3</sup> cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,668 \times \text{Log} (N^\circ \text{ cópias}) + 39,239$$

Coefficiente de correlação = 0,996

Eficiência da reacção PCR: 87,3%

Valor para normalização das amostras:  
(média cópias actina em PA45, V8, 5d)  
1,598E+06

Amostras Raiz 2	Ct Actina	Ct Médio Actina	Desvio Padrão Ct Actina	Média Log Cópias Actina	Média Cópias Actina	Factor de Normalização das Amostras
PA45 - 12 h	29,05	29,13	0,09	2,756	5,702E+02	2,803E+03
	29,11					
	29,23					
PA45 - 24 h	26,97	26,94	0,03	3,353	2,255E+03	7,090E+02
	26,93					
	26,92					
PA45 - 36 h	24,04	24,08	0,05	4,134	1,360E+04	1,175E+02
	24,13					
	24,06					
FATSS - 12 h	32,40	32,53	0,11	1,829	6,746E+01	2,369E+04
	32,58					
	32,61					
FATSS - 24 h	28,34	28,35	0,02	2,968	9,284E+02	1,722E+03
	28,35					
	28,37					
FATSS - 36 h	26,57	26,56	0,01	3,458	2,868E+03	5,573E+02
	26,55					
	26,55					
PA37 - 12 h	28,93	29,02	0,16	2,787	6,122E+02	2,611E+03
	28,92					
	29,20					
PA37 - 24 h	26,54	26,60	0,07	3,447	2,797E+03	5,715E+02
	26,67					
	26,58					
PA37 - 36 h	23,62	23,62	0,03	4,258	1,812E+04	8,821E+01
	23,59					
	23,65					
13C - 12 h	29,47	29,51	0,04	2,652	4,492E+02	3,559E+03
	29,51					
	29,55					
13C - 24 h	26,43	26,40	0,03	3,499	3,158E+03	5,062E+02
	26,38					
	26,40					
13C - 36 h	23,75	23,77	0,06	4,216	1,646E+04	9,712E+01
	23,73					
	23,84					

**Tabela A17:** Quantificação da expressão do gene da actina em amostras de raízes (ensaio 2).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  
10<sup>7</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup> e 10<sup>3</sup> cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,668 \times \text{Log} (N^\circ \text{ cópias}) + 39,239$$

Coefficiente de correlação = 0,996

Eficiência da reacção PCR: 87,3%

Valor para normalização das amostras:  
(média cópias actina em PA45, V8, 5d)  
1,598E+06

Amostras Raiz 3	Ct Actina	Ct Médio Actina	Desvio Padrão Ct Actina	Média Log Cópias Actina	Média Cópias Actina	Factor de Normalização das Amostras
PA45 - 12 h	30,70	30,73	0,03	2,986	9,692E+02	1,649E+03
	30,75					
	30,74					
PA45 - 24 h	28,15	28,15	0,05	3,688	4,874E+03	3,280E+02
	28,10					
	28,19					
PA45 - 36 h	25,88	25,86	0,03	4,309	2,036E+04	7,852E+01
	25,82					
	25,88					
FATSS - 12 h	34,34	34,39	0,06	1,994	9,853E+01	1,622E+04
	34,37					
	34,45					
FATSS - 24 h	31,03	30,69	0,62	2,996	9,917E+02	1,612E+03
	31,07					
	29,98					
FATSS - 36 h	28,51	28,38	0,17	3,625	4,221E+03	3,787E+02
	28,43					
	28,19					
PA37 - 12 h	30,67	30,72	0,05	2,988	9,733E+02	1,642E+03
	30,74					
	30,76					
PA37 - 24 h	27,98	27,95	0,05	3,742	5,523E+03	2,894E+02
	27,97					
	27,89					
PA37 - 36 h	25,66	25,68	0,02	4,357	2,273E+04	7,031E+01
	25,69					
	25,70					
13C - 12 h	31,01	31,04	0,03	2,903	8,001E+02	1,998E+03
	31,06					
	31,04					
13C - 24 h	28,11	28,08	0,03	3,705	5,070E+03	3,152E+02
	28,05					
	28,09					
13C - 36 h	25,87	25,91	0,04	4,296	1,977E+04	8,084E+01
	25,95					
	25,90					

**Tabela A18:** Quantificação da expressão do gene da actina em amostras de raízes (ensaio 3).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  
10<sup>7</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup> e 10<sup>3</sup> cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,683 \times \text{Log} (N^\circ \text{ cópias}) + 41,729$$

Coeficiente de correlação = 0,991

Eficiência da reacção PCR: 86,8%

Valor para normalização das amostras:  
(média cópias actina em PA45, V8, 5d)  
1,598E+06

Amostras Raiz 1	Ct Beta	Ct Médio Beta	Desvio Padrão Ct Beta	Média Log Cópias Beta	Média Cópias Beta	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Beta Normalizadas
PA45 - 12 h	39,16	39,17	0,03	0,676	4,738E+00	2082,795	9,868E+03
	39,20						
	39,15						
PA45 - 24 h	37,42	37,43	0,02	1,175	1,495E+01	480,403	7,182E+03
	37,43						
	37,45						
PA45 - 36 h	34,96	35,00	0,04	1,875	7,496E+01	87,656	6,570E+03
	35,03						
	35,00						
FATSS - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	19462,682	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 24 h	47,30	47,35	0,07	-1,675	2,113E-02	2361,414	4,991E+01
	47,40						
	ND						
FATSS - 36 h	48,25	48,61	0,51	-2,037	9,182E-03	411,488	3,778E+00
	ND						
	48,97						
PA37 - 12 h	39,15	39,15	0,02	0,682	4,811E+00	1700,187	8,180E+03
	39,13						
	39,16						
PA37 - 24 h	37,31	37,30	0,01	1,214	1,636E+01	454,014	7,429E+03
	37,29						
	37,29						
PA37 - 36 h	34,85	34,85	0,02	1,917	8,260E+01	90,262	7,455E+03
	34,87						
	34,83						
13C - 12 h	39,16	39,16	0,01	0,678	4,769E+00	1754,398	8,367E+03
	39,15						
	39,17						
13C - 24 h	37,26	37,25	0,02	1,228	1,691E+01	423,721	7,167E+03
	37,23						
	37,25						
13C - 36 h	35,05	35,04	0,03	1,861	7,268E+01	100,008	7,268E+03
	35,01						
	35,07						

**Tabela A19:** Quantificação da expressão do gene *βcin* em amostras de raízes (ensaio 1).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  
10<sup>6</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup> e 10<sup>2</sup> cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,480 \times \text{Log} (N^\circ \text{ cópias}) + 41,521$$

Coeficiente de correlação = 0,984

Eficiência da reacção PCR: 93,8%

ND = Valor de Ct Não Detectado  
#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Raiz 2	Ct Beta	Ct Médio Beta	Desvio Padrão Ct Beta	Média Log Cópias Beta	Média Cópias Beta	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Beta Normalizadas
PA45 - 12 h	39,94	39,92	0,03	0,460	2,884E+00	2803,435	8,086E+03
	39,94						
	39,88						
PA45 - 24 h	38,05	38,05	0,04	0,997	9,941E+00	708,981	7,048E+03
	38,09						
	38,01						
PA45 - 36 h	35,32	35,40	0,07	1,759	5,740E+01	117,492	6,744E+03
	35,43						
	35,45						
FATSS - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	23693,333	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 24 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1721,668	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 36 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	557,349	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA37 - 12 h	39,56	39,49	0,06	0,583	3,825E+00	2610,914	9,987E+03
	39,47						
	39,45						
PA37 - 24 h	37,37	37,34	0,03	1,201	1,590E+01	571,521	9,088E+03
	37,31						
	37,34						
PA37 - 36 h	34,86	34,87	0,04	1,911	8,151E+01	88,208	7,190E+03
	34,84						
	34,91						
13C - 12 h	40,31	40,31	0,03	0,349	2,233E+00	3558,682	7,948E+03
	40,33						
	40,28						
13C - 24 h	37,46	37,41	0,06	1,182	1,522E+01	506,203	7,702E+03
	37,34						
	37,42						
13C - 36 h	35,11	35,14	0,04	1,834	6,817E+01	97,121	6,621E+03
	35,13						
	35,18						

**Tabela A20:** Quantificação da expressão do gene *βcin* em amostras de raízes (ensaio 2).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  e  $10^2$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,480 \times \text{Log} (N^\circ \text{ cópias}) + 41,521$$

Coefficiente de correlação = 0,984

Eficiência da reacção PCR: 93,8%

ND = Valor de Ct Não Detectado  
#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Raiz 3	Ct Beta	Ct Médio Beta	Desvio Padrão Ct Beta	Média Log Cópias Beta	Média Cópias Beta	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Beta Normalizadas
PA45 - 12 h	39,04	39,13	0,08	0,709	5,117E+00	1649,165	8,438E+03
	39,15						
	39,19						
PA45 - 24 h	36,58	36,56	0,02	1,410	2,570E+01	327,977	8,428E+03
	36,56						
	36,54						
PA45 - 36 h	34,52	34,52	0,05	1,966	9,248E+01	78,519	7,261E+03
	34,48						
	34,57						
FATSS - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	16222,368	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 24 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1611,790	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 36 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	378,697	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA37 - 12 h	39,13	39,10	0,05	0,715	5,192E+00	1642,306	8,527E+03
	39,13						
	39,05						
PA37 - 24 h	36,69	36,65	0,05	1,386	2,433E+01	289,427	7,043E+03
	36,60						
	36,65						
PA37 - 36 h	34,58	34,57	0,02	1,954	8,999E+01	70,308	6,327E+03
	34,57						
	34,55						
13C - 12 h	39,39	39,36	0,03	0,645	4,419E+00	1997,697	8,827E+03
	39,33						
	39,36						
13C - 24 h	36,55	36,56	0,04	1,411	2,575E+01	315,244	8,118E+03
	36,52						
	36,60						
13C - 36 h	34,48	34,49	0,01	1,975	9,444E+01	80,843	7,635E+03
	34,49						
	34,50						

**Tabela A21:** Quantificação da expressão do gene *βcin* em amostras de raízes (ensaio 3).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  e  $10^2$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,662 \times \text{Log} (N^\circ \text{ cópias}) + 41,723$$

Coefficiente de correlação = 0,998

Eficiência da reacção PCR: 87,5%

ND = Valor de Ct Não Detectado  
#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Raiz 1	Ct Alfa	Ct Médio Alfa	Desvio Padrão Ct Alfa	Média Log Cópias Alfa	Média Cópias Alfa	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Alfa Normalizadas
PA45 - 12 h	40,65	40,76	0,11	0,362	2,299E+00	2082,795	4,789E+03
	40,76						
	40,87						
PA45 - 24 h	37,12	37,17	0,05	1,315	2,068E+01	480,403	9,933E+03
	37,17						
	37,21						
PA45 - 36 h	33,72	33,66	0,06	2,247	1,767E+02	87,656	1,549E+04
	33,64						
	33,61						
FATSS - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	19462,682	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 24 h	41,12	41,11	0,03	0,268	1,853E+00	2361,414	4,375E+03
	41,08						
	41,14						
FATSS - 36 h	38,79	38,82	0,02	0,877	7,541E+00	411,488	3,103E+03
	38,83						
	38,83						
PA37 - 12 h	40,37	40,45	0,07	0,444	2,779E+00	1700,187	4,724E+03
	40,48						
	40,50						
PA37 - 24 h	36,95	36,90	0,05	1,386	2,434E+01	454,014	1,105E+04
	36,89						
	36,86						
PA37 - 36 h	33,53	33,54	0,01	2,278	1,898E+02	90,262	1,713E+04
	33,54						
	33,55						
13C - 12 h	40,51	40,42	0,08	0,453	2,836E+00	1754,398	4,975E+03
	40,37						
	40,37						
13C - 24 h	36,89	36,97	0,07	1,369	2,336E+01	423,721	9,900E+03
	37,02						
	36,99						
13C - 36 h	33,87	33,89	0,02	2,184	1,529E+02	100,008	1,529E+04
	33,90						
	33,91						

**Tabela A22:** Quantificação da expressão do gene *acin* em amostras de raízes (ensaio 1).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  e  $10^2$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = -3,767 \times \text{Log} (\text{N}^\circ \text{ cópias}) + 42,122$$

Coefficiente de correlação = 0,998

Eficiência da reacção PCR: 84,3%

ND = Valor de Ct Não Detectado  
#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Raiz 2	Ct Alfa	Ct Médio Alfa	Desvio Padrão Ct Alfa	Média Log Cópias Alfa	Média Cópias Alfa	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Alfa Normalizadas
PA45 - 12 h	41,14	41,14	0,02	0,261	1,823E+00	2803,435	5,109E+03
	41,12						
	41,16						
PA45 - 24 h	37,62	37,63	0,03	1,192	1,554E+01	708,981	1,102E+04
	37,67						
	37,61						
PA45 - 36 h	34,34	34,33	0,02	2,069	1,173E+02	117,492	1,378E+04
	34,31						
	34,33						
FATSS - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	23693,333	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 24 h	40,21	40,23	0,02	0,502	3,179E+00	1721,668	5,473E+03
	40,25						
	40,23						
FATSS - 36 h	36,25	36,28	0,04	1,550	3,548E+01	557,349	1,977E+04
	36,32						
	36,28						
PA37 - 12 h	41,03	41,03	0,04	0,289	1,945E+00	2610,914	5,079E+03
	41,07						
	41,00						
PA37 - 24 h	37,42	37,40	0,06	1,254	1,796E+01	571,521	1,027E+04
	37,44						
	37,33						
PA37 - 36 h	33,56	33,57	0,02	2,271	1,867E+02	88,208	1,647E+04
	33,59						
	33,55						
13C - 12 h	41,49	41,46	0,04	0,175	1,496E+00	3558,682	5,323E+03
	41,48						
	41,42						
13C - 24 h	37,14	37,14	0,02	1,322	2,097E+01	506,203	1,062E+04
	37,16						
	37,13						
13C - 36 h	33,73	33,75	0,04	2,223	1,672E+02	97,121	1,624E+04
	33,79						
	33,72						

**Tabela A23:** Quantificação da expressão do gene *acin* em amostras de raízes (ensaio 2).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  e  $10^2$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = -3,767 \times \text{Log} (\text{N}^\circ \text{ cópias}) + 42,122$$

Coefficiente de correlação = 0,998

Eficiência da reacção PCR: 84,3%

ND = Valor de Ct Não Detectado  
#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Raiz 3	Ct Alfa	Ct Médio Alfa	Desvio Padrão Ct Alfa	Média Log Cópias Alfa	Média Cópias Alfa	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Alfa Normalizadas
PA45 - 12 h	41,35	41,36	0,01	0,381	2,403E+00	1649,165	3,964E+03
	41,36						
	41,37						
PA45 - 24 h	37,11	37,09	0,03	1,488	3,075E+01	327,977	1,009E+04
	37,05						
	37,10						
PA45 - 36 h	33,98	33,98	0,06	2,293	1,962E+02	78,519	1,541E+04
	34,04						
	33,92						
FATSS - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	16222,368	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 24 h	40,13	40,11	0,02	0,704	5,056E+00	1611,790	8,149E+03
	40,10						
	40,11						
FATSS - 36 h	36,23	36,23	0,02	1,709	5,117E+01	378,697	1,938E+04
	36,25						
	36,22						
PA37 - 12 h	41,02	41,10	0,07	0,448	2,807E+00	1642,306	4,609E+03
	41,16						
	41,12						
PA37 - 24 h	36,85	36,84	0,05	1,552	3,563E+01	289,427	1,031E+04
	36,88						
	36,79						
PA37 - 36 h	33,49	33,52	0,03	2,413	2,587E+02	70,308	1,819E+04
	33,54						
	33,52						
13C - 12 h	41,31	41,35	0,04	0,383	2,418E+00	1997,697	4,830E+03
	41,35						
	41,39						
13C - 24 h	36,99	37,03	0,04	1,503	3,188E+01	315,244	1,005E+04
	37,06						
	37,03						
13C - 36 h	34,01	34,05	0,05	2,274	1,878E+02	80,843	1,518E+04
	34,05						
	34,10						

**Tabela A24:** Quantificação da expressão do gene *acin* em amostras de raízes (ensaio 3).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:

$10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  e  $10^2$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,860 \times \text{Log} (N^\circ \text{ cópias}) + 42,830$$

Coefficiente de correlação = 0,998

Eficiência da reacção PCR: 81,6%

ND = Valor de Ct Não Detectado  
#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Raiz 1	Ct Hae Beta	Ct Médio Hae Beta	Desvio Padrão Ct Hae Beta	Média Log Cópias Hae Beta	Média Cópias Hae Beta	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Hae Beta Normalizadas
PA45 - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	2082,795	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA45 - 24 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	480,403	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA45 - 36 h	41,74	41,75	0,03	0,927	8,448E+00	87,656	7,406E+02
	41,78						
	41,72						
FATSS - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	19462,682	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 24 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	2361,414	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 36 h	42,30	42,36	0,08	0,761	5,762E+00	411,488	2,371E+03
	42,45						
	42,34						
PA37 - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1700,187	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA37 - 24 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	454,014	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA37 - 36 h	41,26	41,29	0,03	1,051	1,124E+01	90,262	1,015E+03
	41,29						
	41,31						
13C - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1754,398	#DIV/0!
	ND						
	ND						
13C - 24 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	423,721	#DIV/0!
	ND						
	ND						
13C - 36 h	42,05	42,05	0,03	0,846	7,013E+00	100,008	7,014E+02
	42,02						
	42,07						

**Tabela A25:** Quantificação da expressão do gene *Haeβcin* em amostras de raízes (ensaio 1).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:

$10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  e  $10^2$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,710 \times \text{Log} (N^\circ \text{ cópias}) + 45,185$$

Coefficiente de correlação = 0,997

Eficiência da reacção PCR: 86,0%

ND = Valor de Ct Não Detectado  
#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Raiz 2	Ct Hae Beta	Ct Médio Hae Beta	Desvio Padrão Ct Hae Beta	Média Log Cópias Hae Beta	Média Cópias Hae Beta	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Hae Beta Normalizadas
PA45 - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	2803,435	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA45 - 24 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	708,981	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA45 - 36 h	42,23	42,24	0,02	0,793	6,207E+00	117,492	7,293E+02
	42,26						
	42,24						
FATSS - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	23693,333	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 24 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1721,668	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 36 h	43,05	43,08	0,04	0,567	3,693E+00	557,349	2,058E+03
	43,06						
	43,13						
PA37 - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	2610,914	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA37 - 24 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	571,521	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA37 - 36 h	40,89	40,79	0,09	1,186	1,533E+01	88,208	1,352E+03
	40,71						
	40,76						
13C - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	3558,682	#DIV/0!
	ND						
	ND						
13C - 24 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	506,203	#DIV/0!
	ND						
	ND						
13C - 36 h	41,27	41,25	0,03	1,061	1,150E+01	97,121	1,117E+03
	41,22						
	41,26						

**Tabela A26:** Quantificação da expressão do gene *Haeβcin* em amostras de raízes (ensaio 2).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  e  $10^2$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,710 \times \text{Log} (\text{N}^\circ \text{ cópias}) + 45,185$$

Coefficiente de correlação = 0,997

Eficiência da reacção PCR: 86,0%

ND = Valor de Ct Não Detectado  
#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Raiz 3	Ct Hae Beta	Ct Médio Hae Beta	Desvio Padrão Ct Hae Beta	Média Log Cópias Hae Beta	Média Cópias Hae Beta	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Hae Beta Normalizadas
PA45 - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1649,165	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA45 - 24 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	327,977	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA45 - 36 h	40,23	40,25	0,03	1,297	1,982E+01	78,519	1,556E+03
	40,25						
	40,28						
FATSS - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	16222,368	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 24 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1611,790	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 36 h	46,35	46,34	0,06	-0,346	4,511E-01	378,697	1,708E+02
	46,39						
	46,28						
PA37 - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1642,306	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA37 - 24 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	289,427	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA37 - 36 h	41,02	41,01	0,01	1,092	1,236E+01	70,308	8,689E+02
	41,01						
	41,01						
13C - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1997,697	#DIV/0!
	ND						
	ND						
13C - 24 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	315,244	#DIV/0!
	ND						
	ND						
13C - 36 h	40,93	40,93	0,03	1,115	1,304E+01	80,843	1,054E+03
	40,90						
	40,95						

**Tabela A27:** Quantificação da expressão do gene *Haeβcin* em amostras de raízes (ensaio 3).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  e  $10^2$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,705 \times \text{Log} (\text{N}^\circ \text{ cópias}) + 45,059$$

Coefficiente de correlação = 0,987

Eficiência da reacção PCR: 86,2%

ND = Valor de Ct Não Detectado  
#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Raiz 1	Ct Hae Alfa	Ct Médio Hae Alfa	Desvio Padrão Ct Hae Alfa	Média Log Cópias Hae Alfa	Média Cópias Hae Alfa	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Hae Alfa Normalizadas
PA45 - 12 h	40,20	40,21	0,01	0,265	1,841E+00	2082,795	3,835E+03
	40,21						
	40,22						
PA45 - 24 h	39,67	39,64	0,05	0,420	2,629E+00	480,403	1,263E+03
	39,66						
	39,58						
PA45 - 36 h	39,23	39,32	0,10	0,505	3,200E+00	87,656	2,805E+02
	39,43						
	39,30						
FATSS - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	19462,682	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 24 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	2361,414	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 36 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	411,488	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA37 - 12 h	40,86	40,84	0,06	0,094	1,243E+00	1700,187	2,113E+03
	40,89						
	40,78						
PA37 - 24 h	40,21	40,25	0,05	0,253	1,792E+00	454,014	8,137E+02
	40,24						
	40,31						
PA37 - 36 h	38,87	38,84	0,03	0,634	4,302E+00	90,262	3,883E+02
	38,84						
	38,82						
13C - 12 h	40,62	40,73	0,10	0,125	1,333E+00	1754,398	2,339E+03
	40,80						
	40,77						
13C - 24 h	40,11	40,16	0,04	0,279	1,899E+00	423,721	8,048E+02
	40,19						
	40,18						
13C - 36 h	39,22	39,24	0,02	0,526	3,356E+00	100,008	3,356E+02
	39,25						
	39,26						

**Tabela A28:** Quantificação da expressão do gene *Haeacin* em amostras de raízes (ensaio 1).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  e  $10^2$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,708 \times \text{Log} (N^\circ \text{ cópias}) + 41,193$$

Coefficiente de correlação = 0,998

Eficiência da reacção PCR: 86,1%

ND = Valor de Ct Não Detectado  
#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Raiz 2	Ct Hae Alfa	Ct Médio Hae Alfa	Desvio Padrão Ct Hae Alfa	Média Log Cópias Hae Alfa	Média Cópias Hae Alfa	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Hae Alfa Normalizadas
PA45 - 12 h	40,73	40,72	0,01	0,128	1,341E+00	2803,435	3,761E+03
	40,71						
	40,72						
PA45 - 24 h	39,71	39,73	0,02	0,395	2,481E+00	708,981	1,759E+03
	39,75						
	39,73						
PA45 - 36 h	39,12	39,10	0,03	0,565	3,676E+00	117,492	4,319E+02
	39,10						
	39,07						
FATSS - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	23693,333	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 24 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1721,668	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 36 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	557,349	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA37 - 12 h	40,94	40,92	0,06	0,075	1,187E+00	2610,914	3,100E+03
	40,96						
	40,85						
PA37 - 24 h	40,81	40,83	0,02	0,099	1,255E+00	571,521	7,175E+02
	40,85						
	40,82						
PA37 - 36 h	38,77	38,74	0,04	0,662	4,587E+00	88,208	4,046E+02
	38,76						
	38,69						
13C - 12 h	40,71	40,76	0,05	0,118	1,311E+00	3558,682	4,666E+03
	40,75						
	40,81						
13C - 24 h	40,02	40,07	0,05	0,303	2,008E+00	506,203	1,017E+03
	40,08						
	40,11						
13C - 36 h	38,69	38,64	0,07	0,688	4,871E+00	97,121	4,731E+02
	38,56						
	38,68						

**Tabela A29:** Quantificação da expressão do gene *Haeacin* em amostras de raízes (ensaio 2).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  e  $10^2$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = - 3,708 \times \text{Log} (N^\circ \text{ cópias}) + 41,193$$

Coefficiente de correlação = 0,998

Eficiência da reacção PCR: 86,1%

ND = Valor de Ct Não Detectado  
#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Raiz 3	Ct Hae Alfa	Ct Médio Hae Alfa	Desvio Padrão Ct Hae Alfa	Média Log Cópias Hae Alfa	Média Cópias Hae Alfa	Factor de Normalização das Amostras	Média Cópias Hae Alfa Normalizadas
PA45 - 12 h	40,24	40,27	0,04	0,318	2,081E+00	1649,165	3,432E+03
	40,25						
	40,31						
PA45 - 24 h	39,63	39,61	0,02	0,497	3,140E+00	327,977	1,030E+03
	39,61						
	39,60						
PA45 - 36 h	37,97	37,99	0,02	0,941	8,723E+00	78,519	6,849E+02
	37,99						
	38,01						
FATSS - 12 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	16222,368	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 24 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1611,790	#DIV/0!
	ND						
	ND						
FATSS - 36 h	ND	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	378,697	#DIV/0!
	ND						
	ND						
PA37 - 12 h	39,73	40,43	0,61	0,274	1,878E+00	1642,306	3,084E+03
	40,74						
	40,82						
PA37 - 24 h	40,12	40,15	0,03	0,351	2,244E+00	289,427	6,496E+02
	40,15						
	40,17						
PA37 - 36 h	38,67	38,64	0,04	0,764	5,806E+00	70,308	4,082E+02
	38,65						
	38,59						
13C - 12 h	40,52	40,51	0,02	0,251	1,782E+00	1997,697	3,560E+03
	40,53						
	40,49						
13C - 24 h	40,02	40,00	0,02	0,391	2,461E+00	315,244	7,760E+02
	39,98						
	40,00						
13C - 36 h	38,76	38,78	0,04	0,726	5,316E+00	80,843	4,298E+02
	38,75						
	38,82						

**Tabela A30:** Quantificação da expressão do gene *Haeacin* em amostras de raízes (ensaio 3).

Curva padrão gerada por 4 amostras de concentração conhecida:  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  e  $10^2$  cópias da sequência alvo.

$$Ct = -3,658 \times \text{Log} (\text{N}^\circ \text{ cópias}) + 41,431$$

Coefficiente de correlação = 0,998

Eficiência da reacção PCR: 87,7%

ND = Valor de Ct Não Detectado  
#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Raízes	Média Cópias Actina 1	Média Cópias Actina 2	Média Cópias Actina 3	Média Cópias Actina	Desvio Padrão	Factor de Normalização
PA45 - Raiz - 12 h	7,674E+02	5,702E+02	9,692E+02	7,689E+02	1,995E+02	2078,719
PA45 - Raiz - 24 h	3,327E+03	2,255E+03	4,874E+03	3,485E+03	1,317E+03	458,642
PA45 - Raiz - 36 h	1,823E+04	1,360E+04	2,036E+04	1,740E+04	3,453E+03	91,869
FATSS - Raiz - 12 h	8,213E+01	6,746E+01	9,853E+01	8,271E+01	1,554E+01	19326,207
FATSS - Raiz - 24 h	6,769E+02	9,284E+02	9,917E+02	8,657E+02	1,665E+02	1846,455
FATSS - Raiz - 36 h	3,884E+03	2,868E+03	4,221E+03	3,658E+03	7,044E+02	436,997
PA37 - Raiz - 12 h	9,401E+02	6,122E+02	9,733E+02	8,419E+02	1,996E+02	1898,640
PA37 - Raiz - 24 h	3,521E+03	2,797E+03	5,523E+03	3,947E+03	1,412E+03	405,001
PA37 - Raiz - 36 h	1,771E+04	1,812E+04	2,273E+04	1,952E+04	2,790E+03	81,880
13C - Raiz - 12 h	9,111E+02	4,492E+02	8,001E+02	7,201E+02	2,411E+02	2219,632
13C - Raiz - 24 h	3,772E+03	3,158E+03	5,070E+03	4,000E+03	9,765E+02	399,591
13C - Raiz - 36 h	1,598E+04	1,646E+04	1,977E+04	1,740E+04	2,064E+03	91,841

**Tabela B6:** Resumo da quantificação da expressão do gene da actina em amostras de raízes.

Valor para normalização das amostras: (média cópias actina em PA45, V8, 5d) 1,598E+06

Amostras Raízes	Média Cópias Beta Normalizadas 1	Média Cópias Beta Normalizadas 2	Média Cópias Beta Normalizadas 3	Média Cópias Beta Normalizadas	Desvio Padrão	Factor de indução
PA45 - Raiz - 12 h	9,868E+03	8,086E+03	8,438E+03	8,797E+03	9,435E+02	156,111
PA45 - Raiz - 24 h	7,182E+03	7,048E+03	8,428E+03	7,552E+03	7,612E+02	134,019
PA45 - Raiz - 36 h	6,570E+03	6,744E+03	7,261E+03	6,859E+03	3,595E+02	121,706
FATSS - Raiz - 12 h	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - Raiz - 24 h	4,991E+01	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - Raiz - 36 h	3,778E+00	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA37 - Raiz - 12 h	8,180E+03	9,987E+03	8,527E+03	8,898E+03	9,589E+02	157,903
PA37 - Raiz - 24 h	7,429E+03	9,088E+03	7,043E+03	7,854E+03	1,086E+03	139,360
PA37 - Raiz - 36 h	7,455E+03	7,190E+03	6,327E+03	6,991E+03	5,897E+02	124,051
13C - Raiz - 12 h	8,367E+03	7,948E+03	8,827E+03	8,381E+03	4,398E+02	148,712
13C - Raiz - 24 h	7,167E+03	7,702E+03	8,118E+03	7,662E+03	4,767E+02	135,967
13C - Raiz - 36 h	7,268E+03	6,621E+03	7,635E+03	7,175E+03	5,132E+02	127,316

**Tabela B7:** Resumo da quantificação da expressão do gene *βcin* em amostras de raízes.

Valor para normalização das amostras: (média cópias *βcin* em PA45, V8, 5d) 5,635E+01

#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Raízes	Média Cópias Alfa Normalizadas 1	Média Cópias Alfa Normalizadas 2	Média Cópias Alfa Normalizadas 3	Média Cópias Alfa Normalizadas	Desvio Padrão	Factor de indução
PA45 - Raiz - 12 h	4,789E+03	5,109E+03	3,964E+03	4,621E+03	5,911E+02	5,922
PA45 - Raiz - 24 h	9,933E+03	1,102E+04	1,009E+04	1,035E+04	5,888E+02	13,261
PA45 - Raiz - 36 h	1,549E+04	1,378E+04	1,541E+04	1,489E+04	9,614E+02	19,089
FATSS - Raiz - 12 h	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - Raiz - 24 h	4,375E+03	5,473E+03	8,149E+03	5,999E+03	1,941E+03	7,689
FATSS - Raiz - 36 h	3,103E+03	1,977E+04	1,938E+04	1,408E+04	9,512E+03	18,052
PA37 - Raiz - 12 h	4,724E+03	5,079E+03	4,609E+03	4,804E+03	2,449E+02	6,158
PA37 - Raiz - 24 h	1,105E+04	1,027E+04	1,031E+04	1,054E+04	4,390E+02	13,513
PA37 - Raiz - 36 h	1,713E+04	1,647E+04	1,819E+04	1,726E+04	8,678E+02	22,124
13C - Raiz - 12 h	4,975E+03	5,323E+03	4,830E+03	5,043E+03	2,532E+02	6,463
13C - Raiz - 24 h	9,900E+03	1,062E+04	1,005E+04	1,019E+04	3,781E+02	13,058
13C - Raiz - 36 h	1,529E+04	1,624E+04	1,518E+04	1,557E+04	5,826E+02	19,960

**Tabela B8:** Resumo da quantificação da expressão do gene *αcin* em amostras de raízes.

Valor para normalização das amostras: (média cópias *αcin* em PA45, V8, 5d) 7,802E+02

#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Raízes	Média Cópias Hae Beta Normalizadas 1	Média Cópias Hae Beta Normalizadas 2	Média Cópias Hae Beta Normalizadas 3	Média Cópias Hae Beta Normalizadas	Desvio Padrão	Factor de indução
PA45 - Raiz - 12 h	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA45 - Raiz - 24 h	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA45 - Raiz - 36 h	7,406E+02	7,293E+02	1,556E+03	1,009E+03	4,742E+02	29,524
FATSS - Raiz - 12 h	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - Raiz - 24 h	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - Raiz - 36 h	2,371E+03	2,058E+03	1,708E+02	1,533E+03	1,190E+03	44,882
PA37 - Raiz - 12 h	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA37 - Raiz - 24 h	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA37 - Raiz - 36 h	1,015E+03	1,352E+03	8,689E+02	1,079E+03	2,479E+02	31,570
13C - Raiz - 12 h	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
13C - Raiz - 24 h	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
13C - Raiz - 36 h	7,014E+02	1,117E+03	1,054E+03	9,575E+02	2,240E+02	28,026

**Tabela B9:** Resumo da quantificação da expressão do gene *Haeβcin* em amostras de raízes.

Valor para normalização das amostras: (média cópias *Haeβcin* em PA45, V8, 5d) 3,416E+01

#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Raízes	Média Cópias Hae Alfa Normalizadas 1	Média Cópias Hae Alfa Normalizadas 2	Média Cópias Hae Alfa Normalizadas 3	Média Cópias Hae Alfa Normalizadas	Desvio Padrão	Factor de indução
PA45 - Raiz - 12 h	3,835E+03	3,761E+03	3,432E+03	3,676E+03	2,143E+02	567,283
PA45 - Raiz - 24 h	1,263E+03	1,759E+03	1,030E+03	1,350E+03	3,723E+02	208,406
PA45 - Raiz - 36 h	2,805E+02	4,319E+02	6,849E+02	4,658E+02	2,043E+02	71,881
FATSS - Raiz - 12 h	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - Raiz - 24 h	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - Raiz - 36 h	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA37 - Raiz - 12 h	2,113E+03	3,100E+03	3,084E+03	2,765E+03	5,654E+02	426,771
PA37 - Raiz - 24 h	8,137E+02	7,175E+02	6,496E+02	7,269E+02	8,248E+01	112,188
PA37 - Raiz - 36 h	3,883E+02	4,046E+02	4,082E+02	4,004E+02	1,061E+01	61,791
13C - Raiz - 12 h	2,339E+03	4,666E+03	3,560E+03	3,522E+03	1,164E+03	543,466
13C - Raiz - 24 h	8,048E+02	1,017E+03	7,760E+02	8,658E+02	1,315E+02	133,617
13C - Raiz - 36 h	3,356E+02	4,731E+02	4,298E+02	4,128E+02	7,028E+01	63,710

**Tabela B10:** Resumo da quantificação da expressão do gene *Haeαcin* em amostras de raízes.

Valor para normalização das amostras: (média cópias *Haeαcin* em PA45, V8, 5d) 6,480E+00

#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Raízes	Média Cópias Actina	Desvio Padrão Actina	Média Cópias Beta	Desvio Padrão Beta	Beta normalizada	cv BetaN	S BetaN	Beta Relativ PA45, V8, 5d
PA45 - Raiz - 12 h	7,689E+02	1,995E+02	4,246E+00	1,195E+00	5,522E-03	3,827E-01	2,114E-03	156,63
PA45 - Raiz - 24 h	3,485E+03	1,317E+03	1,686E+01	8,051E+00	4,838E-03	6,088E-01	2,946E-03	137,24
PA45 - Raiz - 36 h	1,740E+04	3,453E+03	7,495E+01	1,754E+01	4,307E-03	3,069E-01	1,322E-03	122,18
FATSS - Raiz - 12 h	8,271E+01	1,554E+01	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - Raiz - 24 h	8,657E+02	1,665E+02	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - Raiz - 36 h	3,658E+03	7,044E+02	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA37 - Raiz - 12 h	8,419E+02	1,996E+02	4,610E+00	7,055E-01	5,476E-03	2,822E-01	1,545E-03	155,31
PA37 - Raiz - 24 h	3,947E+03	1,412E+03	1,887E+01	4,741E+00	4,780E-03	4,372E-01	2,090E-03	135,59
PA37 - Raiz - 36 h	1,952E+04	2,790E+03	8,470E+01	4,617E+00	4,339E-03	1,530E-01	6,638E-04	123,07
13C - Raiz - 12 h	7,201E+02	2,411E+02	3,807E+00	1,374E+00	5,287E-03	4,923E-01	2,603E-03	149,95
13C - Raiz - 24 h	4,000E+03	9,765E+02	1,929E+01	5,657E+00	4,823E-03	3,815E-01	1,840E-03	136,81
13C - Raiz - 36 h	1,740E+04	2,064E+03	7,843E+01	1,405E+01	4,506E-03	2,148E-01	9,679E-04	127,82

**Tabela C5:** Cálculos alternativos para a quantificação da expressão do gene *βcin* em amostras de raízes.

Quantidade normalizada de gene *βcin* na amostra padrão (PA45, V8, 5d) usada para cálculo do factor de indução: 3,526E-05

#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Raízes	Média Cópias Actina	Desvio Padrão Actina	Média Cópias Alfa	Desvio Padrão Alfa	Alfa normalizada	cv AlfaN	S AlfaN	Alfa Relativ PA45, V8, 5d
PA45 - Raiz - 12 h	7,689E+02	1,995E+02	2,175E+00	3,097E-01	2,829E-03	2,960E-01	8,372E-04	5,79
PA45 - Raiz - 24 h	3,485E+03	1,317E+03	2,232E+01	7,738E+00	6,406E-03	5,127E-01	3,284E-03	13,12
PA45 - Raiz - 36 h	1,740E+04	3,453E+03	1,634E+02	4,109E+01	9,392E-03	3,204E-01	3,009E-03	19,24
FATSS - Raiz - 12 h	8,271E+01	1,554E+01	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - Raiz - 24 h	8,657E+02	1,665E+02	3,362E+00	1,610E+00	3,884E-03	5,159E-01	2,004E-03	7,96
FATSS - Raiz - 36 h	3,658E+03	7,044E+02	3,139E+01	2,210E+01	8,583E-03	7,297E-01	6,263E-03	17,58
PA37 - Raiz - 12 h	8,419E+02	1,996E+02	2,510E+00	4,894E-01	2,982E-03	3,069E-01	9,152E-04	6,11
PA37 - Raiz - 24 h	3,947E+03	1,412E+03	2,598E+01	8,946E+00	6,582E-03	4,966E-01	3,269E-03	13,48
PA37 - Raiz - 36 h	1,952E+04	2,790E+03	2,117E+02	4,071E+01	1,085E-02	2,396E-01	2,599E-03	22,22
13C - Raiz - 12 h	7,201E+02	2,411E+02	2,250E+00	6,857E-01	3,124E-03	4,528E-01	1,415E-03	6,40
13C - Raiz - 24 h	4,000E+03	9,765E+02	2,540E+01	5,730E+00	6,351E-03	3,324E-01	2,111E-03	13,01
13C - Raiz - 36 h	1,740E+04	2,064E+03	1,693E+02	1,755E+01	9,729E-03	1,575E-01	1,532E-03	19,93

**Tabela C6:** Cálculos alternativos para a quantificação da expressão do gene *αcin* em amostras de raízes.

Quantidade normalizada de gene *αcin* na amostra padrão (PA45, V8, 5d) usada para cálculo do factor de indução: 4,881E-04

#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Raízes	Média Cópias Actina	Desvio Padrão Actina	Média Cópias Hae Beta	Desvio Padrão Hae Beta	Hae Beta normalizada	cv Hae BetaN	S Hae BetaN	Hae Beta Relativ PA45, V8, 5d
PA45 - Raiz - 12 h	7,689E+02	1,995E+02	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA45 - Raiz - 24 h	3,485E+03	1,317E+03	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA45 - Raiz - 36 h	1,740E+04	3,453E+03	1,149E+01	7,298E+00	6,605E-04	6,654E-01	4,395E-04	30,90
FATSS - Raiz - 12 h	8,271E+01	1,554E+01	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - Raiz - 24 h	8,657E+02	1,665E+02	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - Raiz - 36 h	3,658E+03	7,044E+02	3,302E+00	2,677E+00	9,027E-04	8,332E-01	7,522E-04	42,24
PA37 - Raiz - 12 h	8,419E+02	1,996E+02	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA37 - Raiz - 24 h	3,947E+03	1,412E+03	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA37 - Raiz - 36 h	1,952E+04	2,790E+03	1,298E+01	2,114E+00	6,647E-04	2,167E-01	1,441E-04	31,10
13C - Raiz - 12 h	7,201E+02	2,411E+02	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
13C - Raiz - 24 h	4,000E+03	9,765E+02	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
13C - Raiz - 36 h	1,740E+04	2,064E+03	1,052E+01	3,132E+00	6,043E-04	3,205E-01	1,937E-04	28,27

**Tabela C7:** Cálculos alternativos para a quantificação da expressão do gene *Haeβcin* em amostras de raízes.

Quantidade normalizada de gene *Haeβcin* na amostra padrão (PA45, V8, 5d) usada para cálculo do factor de indução: 2,137E-05

#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico

Amostras Raízes	Média Cópias Actina	Desvio Padrão Actina	Média Cópias Hae Alfa	Desvio Padrão Hae Alfa	Hae Alfa normalizada	cv Hae AlfaN	S Hae AlfaN	Hae Alfa Relativ PA45, V8, 5d
PA45 - Raiz - 12 h	7,689E+02	1,995E+02	1,755E+00	3,774E-01	2,282E-03	3,370E-01	7,691E-04	562,87
PA45 - Raiz - 24 h	3,485E+03	1,317E+03	2,750E+00	3,459E-01	7,890E-04	3,982E-01	3,142E-04	194,62
PA45 - Raiz - 36 h	1,740E+04	3,453E+03	5,200E+00	3,061E+00	2,988E-04	6,212E-01	1,857E-04	73,72
FATSS - Raiz - 12 h	8,271E+01	1,554E+01	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - Raiz - 24 h	8,657E+02	1,665E+02	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FATSS - Raiz - 36 h	3,658E+03	7,044E+02	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
PA37 - Raiz - 12 h	8,419E+02	1,996E+02	1,436E+00	3,837E-01	1,706E-03	3,573E-01	6,093E-04	420,72
PA37 - Raiz - 24 h	3,947E+03	1,412E+03	1,764E+00	4,951E-01	4,470E-04	4,547E-01	2,032E-04	110,26
PA37 - Raiz - 36 h	1,952E+04	2,790E+03	4,898E+00	7,990E-01	2,509E-04	2,169E-01	5,442E-05	61,90
13C - Raiz - 12 h	7,201E+02	2,411E+02	1,475E+00	2,656E-01	2,049E-03	3,802E-01	7,789E-04	505,39
13C - Raiz - 24 h	4,000E+03	9,765E+02	2,123E+00	2,981E-01	5,308E-04	2,816E-01	1,495E-04	130,92
13C - Raiz - 36 h	1,740E+04	2,064E+03	4,514E+00	1,028E+00	2,594E-04	2,567E-01	6,659E-05	63,99

**Tabela C8:** Cálculos alternativos para a quantificação da expressão do gene *Haeαcin* em amostras de raízes.

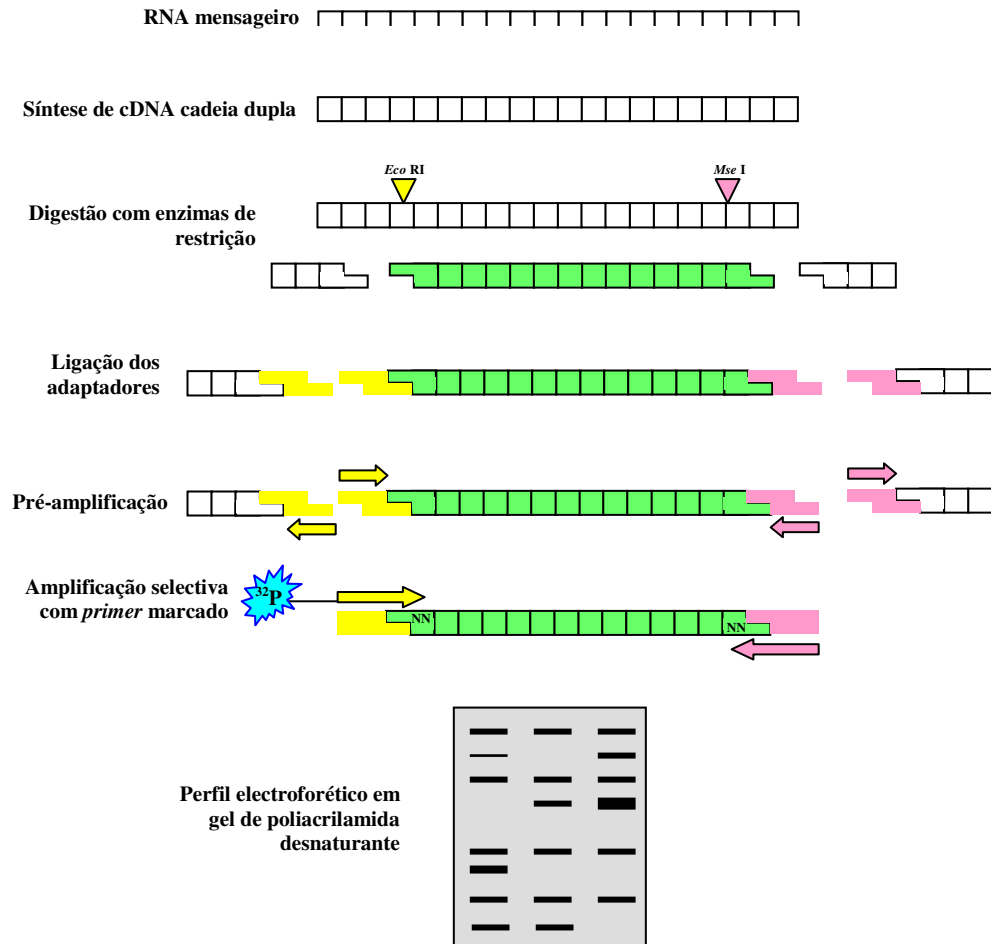
Quantidade normalizada de gene *Haeαcin* na amostra padrão (PA45, V8, 5d) usada para cálculo do factor de indução: 4,054E-06

#DIV/0! = Erro na folha de cálculo derivado da inserção de ND, valor não numérico



## Anexo 9

### Bases da metodologia cDNA-AFLP



**Figura 17:** Esquema da estratégia de obtenção de perfis de expressão genética por cDNA-AFLP.

A partir do RNAm é sintetizado cDNA de cadeia dupla (com *primers* oligo dT). Aos fragmentos obtidos após a digestão com enzimas de restrição, são ligados adaptadores que vão servir de molde a uma primeira reacção de amplificação não selectiva. Nucleótidos selectivos são adicionados à extremidade 3' dos *primers* de modo a que apenas um subgrupo dos fragmentos de restrição seja re-amplificado numa segunda amplificação em que um dos *primers* está marcado radioactivamente. Os fragmentos amplificados são então analisados por electroforese em gel desnaturante de poliacrilamida, gerando perfis diferenciais de expressão genética. Os fragmentos de interesse podem ser excisados do gel, reamplificados e, posteriormente, sequenciados.

(Fonte de informação: Bachem *et al.*, 1996, 1998; AFLP analysis system I, Life Technologies).



## Anexo 10 - Sequências nucleotídicas dos fragmentos cDNA-AFLP

A designação dos fragmentos corresponde à utilizada na Tabela III.15.

### >2A

ACCTGGAATATGATAGTGCAAGTTGCCAAACAATGCTCTGAATACAAAAGAAAAGCACAACATGA  
ATCGCATTACGAAATTTTAGAGATATTTTATCTTATTTTTTCGAGGTTTACGCCAATTGCACTCAGGG  
TGAGCCCCCGTTACCGTGTATCCCTCCTCCATACCGGCGGCTACGGTTGTTTTCGGACTGCTACCTA  
TACTACTAAGTAATAGTTTCTGACGGTGTGCCTGCCACGCTTGCAAGTGATCAGCTTAGTGCTCAT

### >5A

ATGGAAACTGTTTTTCGACCTAGTTGTGCACTCTTCCGGCATGGTGGTCGTCTCTGTTCCCGAGTGGT  
TCGCATGCCACTTCCAGTGCGAGTTCGTATGGGCTCTCATCGTGGGGAAGTCAAAGGCTGGAGGT  
GGACTCTACCTCAACAATATTTTAGTTGGTAACGACGGGATTAGGACGAATTTGGGATGACCACTG  
GGT

### >22A

ATGGGGCCGAACGGCGTCAACACCGATCAATATCGCTCCTTCGAGCTGTATAGGCGTAACACTGCA  
TGGCCGGAGATCATTACGTTGGACGAACCTACGAGCGGGCAAGTTACATCGTCAATCACAATGGC  
AGCTCAAAGCCAGTGGTCGCGGGATCAAATAGGCCGTGAACGGAAGACCGCATAGGACGCGAATC  
GTGACGAAATTGTGGCGCCGTCCCTAGGCACGTCTTTTCTACTTCTATAGTGCAATGATGGATAGAT  
GGCATAATCGGCATGAAAAACGAATTTAGGGGGAATAGGATGGATCAAGAGGGT

### >29A

ACCATAGGGATCTTCTGTTGCAGGTGTGCGATCTGCTATAATAATCTAGATTTGTTACTTATTGAAA  
GAATCGAGTCATCAATTTCTTGTTTATTTGCTTATACCAGACATCAACTCGGAAATCTCTTCAATA  
TTGAATTCATCAAGAACAGCAGGAACATAACGAACCCGGCAAGATTTCCCTGTCTTTTTCGGCTATG  
AGCGCGGCCTCTTTTGTATATTTGACATCAAGAATACCTCCTCCCTTGTGAAATCCACCATGTCAT  
ACTTATTGCTAACTGTAAACTCTACCAATTCAATGCTGGTTTCATTCTCTACCACCAGATCAGGTGT  
TCTCTGACTTTCAATATACTTAGAAAGGCTTACATCAGTTTCAAGATTCCTCTTCCCGAGGTCTTTG  
GTGACAGAGGAACCCGAATGTGTTGTGCCTACACTTGAATACAACCTTGAGCACATAAGGGTGTGAC  
ACAGAACCCGAAT

### >45C

ACCCGCCAGATGTGAACATGCCTCCCGAACAGGCCACGCTGGAAGATCCACTGCGCCGCCAGTAA  
GGTAACTGGACGGGTACGGAAAATCCCCATCGCTAGAGTGTGCAACGCGAACAGCACCGACATC  
GCCAAGTCTTCTCCAGCTCTTCGCTTGTC AACGGTTCGCATAAT

### >110A

ACCTCCCCTCTACTTTTGTCTTAGAAGCCATCACCTAAGGGGGCCTCGATTGTTCCATTTCTATTC  
AACCTCCAGATTCTCTTGCTCTGTAATTCGTGTCTCCTGCAAGCATGCCAGTCTGGAACATGACAA  
CTATTTTGAATGTAACAAAGGTATCACTGAACCAGTTCATTATTTACAAATTATCTTTCCTCGCAT  
AGAATATTCAGATGCTGGAGTCATAGGCAACAGAGATGGCCAAGTAGCAACTATTCTTCTGTGGCA  
ACGAGAGACCCTGTAAAAAGGACAATTTTGCTTTGGAGACTAAGCACCTCCACACCAGTCAGGAAT  
GACTCTGCTTTTACTTTAGGCTGAGAGGTGAGAAGGGTCAGAATACTGAGGGTTCAGAGGCCCTCAG  
TATTCTCCTTTCCAAGACGGAGTATGGCCACTCTCCATCTCAGTCCCTGGAAGGTGTCCGGAGCTCC  
CTGAGAATCCCTGCTCTGGGGCAGAATCACCAAGGCTCATCTCAGCTCCAGCTCCCCACAGGCTCCAG  
CAGGGCTTTCCTGCCAGGTGCAGGGCACAGGAATGGCTCTATCTGTCTTGGTTAGAGGGAGGCT  
ATGCAATGATGTTTGTATAAGAGGGACTGGGATTCTGGGTCTCCA

### >119C

ACCGAAGACAAGCCAAAAGCACGCTCCGCACGTCAAGTCGTAGCGCAAAAGACTGCCGATCAAGA  
TCAATTGGAGTCATCAGCCCCGAAACGACGACGAATCTCTGGTCCAACAATGGGTCCCTCCGCAACA  
GTCGAAGCTTAGCGAGCAAAAAGGTGACGACGCGAGTGTGTTGGAGGGAGGTGATCAGGTGTGGG  
ACCCCCGACAAACCAACAGGAGATGGCCGCACGAAGCTGAACGACAAGTATGGATACTGATCT  
CGCTAAAGACTCCGTTCAAGCAAAGGTTTACTCCA

**>112A**

ACCCATGAAGGCCTGTACGTGAACCAGCACCGCAACTGGCAGCAGTTCCTGCTCAAGGGCCTGGAC  
AGGCAAGCGCTGAAACTGCGGGAGGTGAAGTGATGAATGCGCAATTGCAGTACCGGATCGAGCAA  
TTCTTCTACCGCAAGTCCGAGCTGTGCGATGCACAGGACTGGGACGCCTATGTGCAGCTGTTGAT  
ACGCAAAGCGAGTTCACCTGCCCAATGGGACTCGGAACACGTCTACACCCGTGATCCCAAGCGC  
GAGATGTCGTTGATCTATTACGCCAACC GCCCGGCTGGAAGACCGCGTGTCCGCCTGCGCAGC  
GGCAAAGCCGCTCGGGCAGACCGATGCCGCGCACCTTGCACCTGATCAATAACGTGCGCATTGCC  
GAGCAACCGGATGGAACGCTGGAGGTGAAATTGAACTGGCACACGATGTTCTATCGATTGGCTAC  
ATCGGAGCAGTTCACGGACAGGCTACCTACAGCCTCAAGCCCACTGGCGACAGTTGGTTGATCAC  
CCGCAAACACGCGCTGCTGCTCAACGACACCA

**>150E**

TGCCAGCGTTACGTACCATATATGGATGGTATAACTGCGGCCGAGCATGGGCATTTGCAAGTGGT  
AACGTGGGTGCATGAACACTTCCCAACTCGTTTACGTAACCACGAAATGGACGCCGCTGCAAGAA  
ATGGTCACATGCATGTTATCGCGTGGCTTCATGAGAACC GAAGTGAGGGGTGCTCCGCAATGGCTT  
CGTGTGATGCAGCACGAAATGGTCACTTGGAACTGTTCAATGGCTCCACACACATTATCCCAGTA  
CATTTGTACCACAGACAATGAATGGAGCAGCTGCGAATGGCTGTCTCGAGGTTGTCCAGTGGTTGC  
ACGAGAATCGCCCCGAAGGCTGTACAGGAAGTGCTATGTACTTCGCCGCTACTAAAGACCACCTCG  
ACGTATTCCTGTATCTACTTGAACACCGAACTGAAGGGTTTCCAAGCAGTACGAAGCAGGATGCGC  
AAGATATCCATGTGTTGTGCCAGTTTGGCCCCGATATCCGTGGAAATCGACGACCCAATCGAGTTA  
CTGGCGCGCAATTGAAGATACTGCAGACCGTATTCAAGCAGCGCCCCGGCTTATCTTCAAGATTGTT  
TGCGCTGCTTAGCATGGATTGCATGCAGTAGCGGCAACATCATTACGCTGGACTGGGTGAACCAGT  
TTGGGATTCAGCTGCGGTCGACGACTCCCATCCGTAGCGCTATCGGCAGCGGCGACGTGAAGTTGT  
TGCGGTGGTTTTTCGGAGAACGGTTTTGTGGTGTATGGGTCCGGATCTGCTCGAGTTCGCAGTCGAAC  
CGGCCAACTCGACGCAGCCAGTCGGCTTTCTGAGCACGGACATACG

**>169B**

TGAGGGTAGTGCGCGTATTGGCGAGTATTCAGGCGAGCTAGGCGCCTGGACTTCAGTCTCGAGTG  
AGCCTAGTGTGTGAGTGACCCACCGTCCGAGGGTCCAAAAGAATAAGTGACGGCTAGTTGCAGTGT  
TGTATACTCTGTATTTGTTGGTTATCGGGCTAGGAGAGCACTTGGGGAAGGT

**>175D**

ACCTCTCAGCATGTTTGAATCAGTAGGAAAATGGAGCATCTCACAACAACACTGACCCTGCACAGA  
ATTTCCAAAACAATACTGCAGCATAAATAAATGAAAAAATATTTGTTGAAGTACAGTGAAGACAA

**>185A**

ACCAAAAAGGAAAACATTTGCTTCATGAGGAAATCCTCTCTTTGTGCTTTCCCACTGCGTAAGGA  
TAAAAATGGTTGGATTCAA

**>204A**

ATTGATAGACTGAGTAAAGAAGACCATTGTCATCAATGTGGGTGGGCATCGTCCAATCCACAACGG  
CCCAATAGAACACAAAGGTTAAGAAAAGACAAAGTTGCTCTCTCTTATTGAGCTGGAACATCCATT  
TTCTCCTGCCCTTAGACACTGGAGCTTCTGCTTCTCTGGCCTTTGGACTCTGGGACTTAAATATATAT  
CCTATTGGTTCTGTTTCTCTGGG

**>223A**

AGTAAGCTTTTTACGCCCCCTAGCTCAATGAGATGCTCTACCCCAAAAAAAGATTTTACTCAGGAC  
TCATCGTCACCATGCCCGCCGAGAAAGCAAGCTCAAGACCACGCCGCTGGACCCGTCGCTTCCCC  
AACCAGAACCAGGCGCAGCACTGCTGGACGCGCTACAACGAGTACGTGCTGTGCCTCAAGAACAA  
CGACGGCGACTAGGACGCGTGCAAGAAGTACTACCAGTACGCCGCCTCGCTCTGCCCCAACTTCTG  
GACGGACCGCTGGAACGAGCAGCGGAGGAGGGCACGTTCCAGGGCGTGCAGTACTTCAAGGAGG  
AGTAAGAAGTTCGTCTCGTGTCCCTCTCTCTTCTCTCTCTCTGCTGCATCATGTCACCAAGGCTG  
TGAGAGACTGCAGCGTCGCTGGGCCAGCGTGGAGGCAAAAAAAGCTGTAGCTCTTACAGGTTGCGC  
GCAGAGGACGTTGCAATTGACACCAAAATCCCCCAAATGAACGTTTGCCGCTCTTGCCACTTTCGGC  
CTCAGCATCCTGCACACCGTCCATCATTAGCCTGCAAAAT

**>255A**

CAGCCGAGAAAAACCATTGCTGCACCCGCTCAGAAAGCTTGGCACCACCACAAATCATGAACTCG  
ATTCCACCGAGCTTGCGGCGCAAAGTAGAGAACAACACTAGTGCATCAGCGATCTTGAGTTTGGCGGCT  
ACGGTGACCGGCAGCCGATCACCGGCACGACGGTACTGCTGGACGTCCCGGCCAGTAGCAAACGC  
CCACCGCGAGACTCGACTCGCCAAGCGTCCCTGCGGATAGGCTGTCATGACTCCAGCGCGGATTTT  
CTCAAAAATACGGGGCACACCACACATGACTCGGGGT

**>266A**

CACGATGAAACCCTGCCGAGGAAGGCGCCAAGCAGGCCCACTTCTGTTCCATGTGTGGTCCGCAC  
TTCTGCTCGATGAAGATCACGCAGGATGTGCGCGATTACGCCGACAAGCTGGGCGTGGATGAAAA  
AGAAGCCCTGAGCAAGGGCATGCAGGAAAAAGCGATTGAGTTCGTGAAGAAGGGCTCCGAGGTAT  
ATCAGAAGGT

**>267A**

ACACATGCAGCAAAGGATCCCGGCATGCTGACCTCTCTAGGAGCCAGTATGCTAGCTCATCAGGAA  
ACCTGGGTTCATTCTCAACCAGCCATGCAATTTTGATAAAGTGTCTTCAACCTCTGTGGCCCTCGC  
TTCCTTCTTCTGTAATAAGGGAGTAGAATTTTCATTTTTTTTGTAGGTTAGTGGGTAGGACTTACTGG  
T

**>275B**

CACAGGGAGGAAAGTGTAATGTGACATGCCTGACCACCTATTCCCATCATGGCCTGAACTAGTGTT  
TCAGGTTTAGTGTTTTAGAAAGGCCCTTGGCTGAGAGAAGGGGGTCCATTCAGTTGGTTGAGGGACT  
TAGAATTTTGTTTTTGGT

**>310A**

CCGACGAAATTCTATCGCAAAAATTTTCAGGAGATGGTTTTGAGTATGGGCTTAGTGAAGCGATGCA  
ATATGCTAGGCAAGATCTTCAAAAAGCTGGATTGTCTGAAGAAGCCA



## Anexo 11 - Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> O declínio de <i>Quercus suber</i> .....	1
<b>Figura I.1:</b> Representação esquemática das ELIs e ELLs. (A) ELIs excretadas para o meio de cultura .....	10
<b>Figura I.2:</b> Representação da estrutura secundária de um monómero de $\beta$ -cinamomina .....	11
<b>Figura I.3:</b> SAR contra a infecção do TMV em plantas de tabaco tratadas com $\gamma$ -megaspermina .....	18
<b>Figura I.4:</b> Modelo de entrada das elicinas em células de tabaco por endocitose mediada por um receptor e interação com receptor intracelular .....	21
<b>Figura I.5:</b> Ilustração esquemática da transferência do silenciamento genético internuclear em <i>Phytophthora</i> ... ..	33
<b>Figura I.6:</b> Representação da organização do cluster genómico das elicinas de <i>P. cinnamomi</i> .....	34
<b>Figura I.7:</b> Plasmídeo pHAMT35H .....	41
<b>Figura I.8:</b> Plasmídeo pTH210 .....	41
<b>Figura I.9:</b> Representação do mapa genético do plasmídeo pHAMT35-Fatss .....	42
<b>Figura I.10:</b> Representação do mapa genético do plasmídeo pFatssInc .....	42
<b>Figura I.11:</b> Representação do mapa genético do plasmídeo pHAMT35-shatss .....	43
<b>Figura I.12:</b> Representação do mapa genético do plasmídeo pShAtssInc .....	43
<b>Figura I.13:</b> Separação electroforética em gel de agarose (1%) do produto de amplificação de um fragmento do gene da higromicina fosfotransferase a partir de DNA genómico da estirpe FATSS .....	71
<b>Figura I.14:</b> Separação electroforética em gel de agarose (1%), do produto de amplificação de um fragmento do gene da higromicina fosfotransferase a partir de DNA genómico da estirpe 13C .....	71
<b>Figura I.15:</b> Separação electroforética, em gel de agarose (1%), dos produtos de amplificação do fragmento <i>ham34+fatss</i> .....	72
<b>Figura I.16:</b> Análise da presença de elicinas em filtrados de meios de cultura dos isolamentos PA45 e FATSS por electroforese de proteínas em gel SDS-PAGE (17,5%) corado com azul de Coomassie (1) .....	73
<b>Figura I.17:</b> Análise da presença de elicinas em filtrados de meios de cultura dos isolamentos PA45 e FATSS por electroforese de proteínas em gel SDS-PAGE (17,5%) corado com azul de Coomassie (2) .....	73
<b>Figura I.18:</b> Análise da presença de elicinas em filtrados de meios de cultura dos isolamentos PA37 e 13C por electroforese de proteínas em gel SDS-PAGE (17,5%) corado com azul de Coomassie .....	74
<b>Figura I.19:</b> Análise por <i>western blotting</i> da produção de $\beta$ -cinamomina em filtrados de meios de cultura dos isolamentos PA45 e FATSS .....	75
<b>Figura I.20:</b> Análise por <i>western blotting</i> da produção de $\beta$ -cinamomina em filtrados de meios de cultura dos isolamentos PA37 e 13C .....	76
<b>Figura I.21:</b> Gráfico da taxa de crescimento dos isolamentos .....	78
<b>Figura II.1:</b> Ciclo de vida de <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	86
<b>Figura II.2:</b> Quistos germinados de <i>P. cinnamomi</i> .....	87
<b>Figura II.3:</b> Germinação de bolotas de <i>Q. suber</i> em copos (A) ou em vasos (B) .....	92
<b>Figura II.4:</b> Infecção de raízes pelo método directo .....	93
<b>Figura II.5:</b> Infecção de raízes pelo método indirecto 1 .....	94
<b>Figura II.6:</b> Infecção de raízes pelo método indirecto 2 .....	94
<b>Figura II.7:</b> Folhas infectadas .....	95
<b>Figura II.8:</b> Plantas de <i>Q. suber</i> durante os testes de patogenicidade .....	96
<b>Figura II.9:</b> Raízes infectadas pelo método directo, 24 h após a inoculação .....	102
<b>Figura II.10:</b> Raízes infectadas pelo método indirecto, 36 h após o início do processo .....	106
<b>Figura II.11:</b> Raízes infectadas pelo método indirecto, 36 h após o início do processo .....	106

<b>Figura II.12:</b> Raízes antes (A) e depois (D) de imersas em suspensão de zoósporos .....	109
<b>Figura II.13:</b> Aspecto das necroses presentes nas folhas usadas como isco .....	110
<b>Figura II.14:</b> Aspecto global de plantas de <i>Q. suber</i> no final dos testes de patogenicidade .....	111
<b>Figura II.15:</b> Grau médio de severidade dos sintomas da parte aérea e do sistema radicular de plantas de <i>Q. suber</i> infectadas com diferentes isolamentos de <i>P. cinnamomi</i> selvagens .....	112
<b>Figura III.1:</b> Classificação funcional dos genes em <i>P. infestans</i> .....	123
<b>Figura III.2:</b> Géis de electroforese a duas dimensões, contendo proteínas de micélio, zoósporos e quistos germinados com apressórios .....	124
<b>Figura III.3:</b> Visualização, por electroforese em gel de agarose (1%), dos produtos de amplificação de um fragmento do gene da actina .....	145
<b>Figura III.4:</b> Visualização, por electroforese em gel de agarose (1%), dos produtos de amplificação dos genes das elicinas .....	146
<b>Figura III.5:</b> Visualização, por electroforese em gel de agarose (1%), dos produtos de digestão com <i>Eco</i> RI, das moléculas de DNA plasmídico recombinante .....	146
<b>Figura III.6:</b> Curvas de amplificação em tempo real do gene da actina em amostras de micélio com 3 dias e em amostras padrão constituídas por plasmídeos .....	150
<b>Figura III.7:</b> Curva de calibração para a quantificação da expressão do gene da $\beta$ -cinamomina .....	150
<b>Figura III.8:</b> Um exemplo dos perfis de expressão obtidos por cDNA-AFLP gerados pela combinação de <i>primers</i> I19 ( <i>Eco</i> RI-0; <i>Mse</i> I-TGG) .....	166
<b>Figura III.9:</b> Visualização, por electroforese em gel de agarose (1%), dos produtos de reamplificação de 25 fragmentos cDNA-AFLP gerados diferencialmente pela combinação de <i>primers</i> I03 ( <i>Eco</i> RI-ATG; <i>Mse</i> I-ACC) e excisados do gel .....	168
<b>Figura 2:</b> Alinhamento de sequências genéticas de genes <i>hpt</i> presentes no GenBank .....	203
<b>Figura 3:</b> Esquema da distribuição das plantas de <i>Quercus suber</i> usadas nos testes de patogenicidade no espaço da estufa .....	207
<b>Figura 4:</b> Actividade das sondas <i>Taqman</i> .....	213
<b>Figura 5:</b> Modelo de um gráfico de amplificação simples, mostrando os termos normalmente usados em PCR quantitativa em tempo real .....	214
<b>Figura 6:</b> Alinhamento das sequências genéticas codificantes dos genes actina de <i>Phytophthora megasperma</i> e actina A de <i>P. infestans</i> .....	215
<b>Figura 7:</b> Alinhamento da CDS do gene actina A de <i>Phytophthora infestans</i> e o fragmento do gene actina obtido para o isolamento PA45 de <i>P. cinnamomi</i> .....	217
<b>Figura 8:</b> Alinhamento da sequência genética da $\beta$ -cinamomina presente no <i>GenBank</i> .....	218
<b>Figura 9:</b> Alinhamento da sequência genética da HAE- $\alpha$ cinamomina presente no <i>GenBank</i> .....	219
<b>Figura 10:</b> Alinhamento da sequência genética da $\alpha$ -cinamomina presente no <i>GenBank</i> .....	220
<b>Figura 11:</b> Alinhamento da sequência genética da HAE- $\beta$ cinamomina presente no <i>GenBank</i> .....	221
<b>Figura 12:</b> Alinhamentos da tradução em proteínas das CDS das cinamominas .....	222
<b>Figura 13:</b> Alinhamento de sequências genéticas das elicinas do <i>cluster</i> presentes no <i>GenBank</i> . Alinhamento de sequências codificantes .....	223
<b>Figura 14:</b> Alinhamento de sequências genéticas das elicinas obtidas para o isolamento PA45. Alinhamento de sequências codificantes .....	224
<b>Figura 15:</b> Alinhamento de sequências genéticas das elicinas do <i>cluster</i> presentes no <i>GenBank</i> . Alinhamento de sequências que incluem as zonas 5' e 3' UTR .....	225
<b>Figura 16:</b> Alinhamento de sequências genéticas das elicinas obtidas para o isolamento PA45. Alinhamento de sequências que incluem as zonas 5' e 3' UTR .....	226
<b>Figura 17:</b> Esquema da estratégia de obtenção de perfis de expressão genética por cDNA-AFLP .....	255

## Anexo 12 - Lista de Tabelas

<b>Tabela I.1:</b> Identificação dos isolamentos de <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	35
<b>Tabela I.2:</b> Concentrações de higromicina B aplicadas no teste de sensibilidade .....	37
<b>Tabela I.3:</b> Composição dos vários tipos de Soluções de Equilíbrio .....	39
<b>Tabela I.4:</b> Composição das soluções de enzimas .....	39
<b>Tabela I.5:</b> Composição das soluções MTC .....	45
<b>Tabela I.6 :</b> Plasmídeos utilizados nos ensaios de transformação .....	46
<b>Tabela I.7:</b> Agentes de transfecção testados na transformação .....	46
<b>Tabela I.8:</b> Composição das soluções PEG 6000 .....	46
<b>Tabela I.9:</b> Resumo das condições aplicadas nos ensaios de electroporação (decaimento exponencial) .....	48
<b>Tabela I.10:</b> Resumo das condições de bombardeamento utilizadas nos ensaios de transformação biolística .....	50
<b>Tabela I.11:</b> Esquema de ciclos e temperaturas de PCR .....	52
<b>Tabela I.12:</b> Resultados do ensaio de sensibilidade dos isolamentos de <i>P. cinnamomi</i> ao antibiótico higromicina B efectuados em meio V <sub>8</sub> Ca .....	60
<b>Tabela II.1:</b> Escala para classificação da severidade dos sintomas .....	97
<b>Tabela II.2:</b> Re-isolamento a partir de tecido necrosado de maçãs .....	100
<b>Tabela II.3:</b> Existência de diferenças significativas entre a patogenicidade dos isolamentos .....	115
<b>Tabela III.1:</b> Informação sobre os fragmentos de elicinas a amplificar e respectivos <i>primers</i> .....	132
<b>Tabela III.2:</b> Esquema de ciclos e temperaturas da reacção de amplificação para sequenciação .....	135
<b>Tabela III.3:</b> Esquema de ciclos e temperaturas usados na PCR quantitativa em tempo real .....	136
<b>Tabela III.4:</b> Informação sobre <i>primers</i> , sonda e fragmento gerado para o gene da actina na reacção de PCR quantitativa em tempo real .....	137
<b>Tabela III.5:</b> Informação sobre <i>primers</i> , sondas e fragmentos gerados para os genes das elicinas na reacção de PCR quantitativa em tempo real .....	137
<b>Tabela III.6:</b> Esquema de ciclos e temperaturas na pré-amplificação .....	140
<b>Tabela III.7:</b> Esquema de ciclos e temperaturas na amplificação selectiva .....	141
<b>Tabela III.8:</b> Resumo dos resultados obtidos em alinhamentos de sequências de genes da actina de <i>Phytophthora</i> ..	147
<b>Tabela III.9:</b> Resumo dos resultados obtidos na comparação de alinhamentos de sequências de genes do <i>cluster</i> de elicinas de <i>Phytophthora cinnamomi</i> ... ..	148
<b>Tabela III.10:</b> Valores de massa molecular estimados para os plasmídeos utilizados para a obtenção das curvas padrão das reacções de PCR quantitativa em tempo real .....	149
<b>Tabela III.11:</b> Quantificação da expressão dos genes das elicinas em culturas <i>in vitro</i> .....	151
<b>Tabela III.12:</b> Regulação da expressão dos genes das elicinas em culturas <i>in vitro</i> .....	152
<b>Tabela III.13:</b> Quantificação da expressão dos genes das elicinas <i>in planta</i> .....	160
<b>Tabela III.14:</b> Regulação da expressão dos genes das elicinas <i>in planta</i> .....	161
<b>Tabela III.15:</b> Homologias existentes entre fragmentos cDNA-AFLP que se expressam diferenciadamente e sequências presentes nas bases de dados .....	170
<b>Tabela 1:</b> Taxas de crescimento diárias para os isolamentos cultivados em meio V <sub>8</sub> Ca .....	206
<b>Tabela 2:</b> Graus de severidade dos sintomas obtidos para os testes de virulência em plantas de <i>Q. suber</i> .....	209
<b>Tabela A1:</b> Quantificação da expressão do gene da actina em amostras de micélio (ensaio 1) .....	228
<b>Tabela A2:</b> Quantificação da expressão do gene da actina em amostras de micélio (ensaio 2) .....	228

<b>Tabela A3:</b> Quantificação da expressão do gene da actina em amostras de micélio (ensaio 3) .....	229
<b>Tabela A4:</b> Quantificação da expressão do gene <i>βcin</i> em amostras de micélio (ensaio 1) .....	229
<b>Tabela A5:</b> Quantificação da expressão do gene <i>βcin</i> em amostras de micélio (ensaio 2) .....	230
<b>Tabela A6:</b> Quantificação da expressão do gene <i>βcin</i> em amostras de micélio (ensaio 3) .....	230
<b>Tabela A7:</b> Quantificação da expressão do gene <i>acin</i> em amostras de micélio (ensaio 1) .....	231
<b>Tabela A8:</b> Quantificação da expressão do gene <i>acin</i> em amostras de micélio (ensaio 2) .....	231
<b>Tabela A9:</b> Quantificação da expressão do gene <i>acin</i> em amostras de micélio (ensaio 3) .....	232
<b>Tabela A10:</b> Quantificação da expressão do gene <i>Haeβcin</i> em amostras de micélio (ensaio 1) .....	232
<b>Tabela A11:</b> Quantificação da expressão do gene <i>Haeβcin</i> em amostras de micélio (ensaio 2) .....	233
<b>Tabela A12:</b> Quantificação da expressão do gene <i>Haeβcin</i> em amostras de micélio (ensaio 3) .....	233
<b>Tabela A13:</b> Quantificação da expressão do gene <i>Haeacin</i> em amostras de micélio (ensaio 1) .....	234
<b>Tabela A14:</b> Quantificação da expressão do gene <i>Haeacin</i> em amostras de micélio (ensaio 2) .....	234
<b>Tabela A15:</b> Quantificação da expressão do gene <i>Haeacin</i> em amostras de micélio (ensaio 3) .....	235
<b>Tabela B1:</b> Resumo da quantificação da expressão do gene da actina em amostras de micélio .....	236
<b>Tabela B2:</b> Resumo da quantificação da expressão do gene <i>βcin</i> em amostras de micélio .....	236
<b>Tabela B3:</b> Resumo da quantificação da expressão do gene <i>acin</i> em amostras de micélio .....	237
<b>Tabela B4:</b> Resumo da quantificação da expressão do gene <i>Haeβcin</i> em amostras de micélio .....	237
<b>Tabela B5:</b> Resumo da quantificação da expressão do gene <i>Haeacin</i> em amostras de micélio .....	238
<b>Tabela C1:</b> Cálculos alternativos para a quantificação da expressão do gene <i>βcin</i> em amostras de micélio .....	239
<b>Tabela C2:</b> Cálculos alternativos para a quantificação da expressão do gene <i>acin</i> em amostras de micélio .....	240
<b>Tabela C3:</b> Cálculos alternativos para a quantificação da expressão do gene <i>Haeβcin</i> em amostras de micélio .....	240
<b>Tabela C4:</b> Cálculos alternativos para a quantificação da expressão do gene <i>Haeacin</i> em amostras de micélio .....	241
<b>Tabela A16:</b> Quantificação da expressão do gene da actina em amostras de raízes (ensaio 1) .....	242
<b>Tabela A17:</b> Quantificação da expressão do gene da actina em amostras de raízes (ensaio 2) .....	242
<b>Tabela A18:</b> Quantificação da expressão do gene da actina em amostras de raízes (ensaio 3) .....	243
<b>Tabela A19:</b> Quantificação da expressão do gene <i>βcin</i> em amostras de raízes (ensaio 1) .....	243
<b>Tabela A20:</b> Quantificação da expressão do gene <i>βcin</i> em amostras de raízes (ensaio 2) .....	244
<b>Tabela A21:</b> Quantificação da expressão do gene <i>βcin</i> em amostras de raízes (ensaio 3) .....	244
<b>Tabela A22:</b> Quantificação da expressão do gene <i>acin</i> em amostras de raízes (ensaio 1) .....	245
<b>Tabela A23:</b> Quantificação da expressão do gene <i>acin</i> em amostras de raízes (ensaio 2) .....	245
<b>Tabela A24:</b> Quantificação da expressão do gene <i>acin</i> em amostras de raízes (ensaio 3) .....	246
<b>Tabela A25:</b> Quantificação da expressão do gene <i>Haeβcin</i> em amostras de raízes (ensaio 1) .....	246
<b>Tabela A26:</b> Quantificação da expressão do gene <i>Haeβcin</i> em amostras de raízes (ensaio 2) .....	247
<b>Tabela A27:</b> Quantificação da expressão do gene <i>Haeβcin</i> em amostras de raízes (ensaio 3) .....	247
<b>Tabela A28:</b> Quantificação da expressão do gene <i>Haeacin</i> em amostras de raízes (ensaio 1) .....	248
<b>Tabela A29:</b> Quantificação da expressão do gene <i>Haeacin</i> em amostras de raízes (ensaio 2) .....	248
<b>Tabela A30:</b> Quantificação da expressão do gene <i>Haeacin</i> em amostras de raízes (ensaio 3) .....	249
<b>Tabela B6:</b> Resumo da quantificação da expressão do gene da actina em amostras de raízes .....	249
<b>Tabela B7:</b> Resumo da quantificação da expressão do gene <i>βcin</i> em amostras de raízes .....	250
<b>Tabela B8:</b> Resumo da quantificação da expressão do gene <i>acin</i> em amostras de raízes .....	250
<b>Tabela B9:</b> Resumo da quantificação da expressão do gene <i>Haeβcin</i> em amostras de raízes .....	251
<b>Tabela B10:</b> Resumo da quantificação da expressão do gene <i>Haeacin</i> em amostras de raízes .....	251

---

<b>Tabela C5:</b> Cálculos alternativos para a quantificação da expressão do gene <i>βcin</i> em amostras de raízes .....	252
<b>Tabela C6:</b> Cálculos alternativos para a quantificação da expressão do gene <i>αcin</i> em amostras de raízes .....	252
<b>Tabela C7:</b> Cálculos alternativos para a quantificação da expressão do gene <i>Haeβcin</i> em amostras de raízes .....	253
<b>Tabela C8:</b> Cálculos alternativos para a quantificação da expressão do gene <i>Haeαcin</i> em amostras de raízes .....	253

