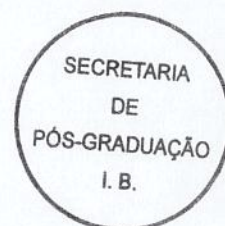


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**KARINA KLEINFELDER FONTANESI**

**Proteoma Comparativo de Folhas de Laranja Pêra (*Citrus sinensis*) e de Tangerina Poncan (*Citrus reticulata*) Infectadas com *Xylella fastidiosa* versus Não Infectadas.**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Karina Kleinfelder Fontanesi e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Molecular e Funcional, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. José Camillo Novello

Co-Orientadora: Profa. Dra. Ione Salgado

**Campinas, 2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**F735p**

Fontanesi, Karina Kleinfelder

Programa comparativo de folhas de laranja pêra (*Citrus sinensis*) e de tangerina poncan (*Citrus reticulata*) infectadas com *Xylella fastidiosa* versus não infectadas / Karina Kleinfelder Fontanesi. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: José Camillo Novello, Ione Salgado.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Xylella fastidiosa*. 2. Eletroforese bidimensional. 3. Clorose variegada dos citros. 4. Laranja. 5. Poncan. I. Novello, Jose Camillo. II. Salgado, Ione. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Comparative analysis of proteome of sweet orange and ponkan infected with *Xylella fastidiosa*.

**Palavras-chave em inglês:** *Xylella fastidiosa*; Two-dimensional electroforesis; Citrus variegated chlorosis; Oranges; Mandarin orange.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** José Camillo Novello, Marcos Antonio Machado, Carlos Alberto Labate.

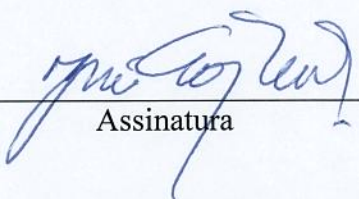
**Data da defesa:** 18/09/2009.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

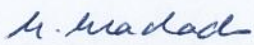
Campinas, 18 de setembro de 2009

**BANCA EXAMINADORA**

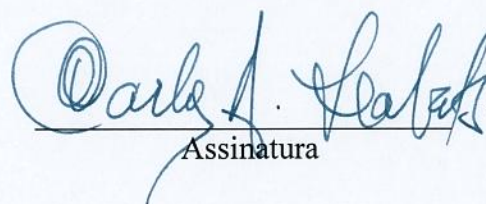
Prof. Dr José Camillo Novello (Orientador)

  
Assinatura

Prof. Dr. Marcos Antonio Machado

  
Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto Labate

  
Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Marco Aurélio Takita

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Aos meus pais João Carlos e Ivonilde pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

**DEDICO**

Ao meu marido Mario William pela atenção, ajuda, incentivo, paciência, amor e companheirismo.

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os colegas, professores e funcionários dos Laboratórios de Proteômica, Bioquímica de Planta, Laquip e Labex do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP. O pessoal do laboratório Max Feffer (ESALQ-USP – Piracicaba) e do laboratório Thomson do Instituto de Química da UNICAMP, que contribuíram para a realização deste trabalho, e em especial:

Ao professor Dr. José Camillo Novello, pela orientação, incentivo, confiança e amizade.

À professora Dra. Ione Salgado, pela co-orientação, ajuda, paciência, confiança, amizade e sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Professor Dr. Cláudio S. Werneck pelas sugestões, ajuda e ensinamentos.

À Professora Dra. Alessandra A. Souza pela confiança, colaboração, apoio e ajuda na inoculação da bactéria nas plantas e a realização do teste PCR.

Ao Professor Dr. Marcos A. Machado pela colaboração e pelas plantas cedidas para este trabalho.

Ao Professor Dr. Carlos A. Labate, ESALQ-USP, pela colaboração e pelas análises no espectrômetro de massas – ESI-Q-TOF.

À Professora Dra. Denise V. Macedo pela utilização do programa de análise de imagem ImageMaster Platinum®.

Ao Dr. Marco Aurélio Takita pelas análises de Blast das sequências de aminoácidos das proteínas de laranja Pêra e das de tangerina Poncan no banco de dados de citros.

À Doutoranda Flavia Vischi Winck pelos ensinamentos, treinamento, incentivo, pela importante e indispensável colaboração, direcionamento na condução do experimento, disponibilidade a discussões, carinho e amizade.

Ao Dr. Alexander de Andrade pelas sugestões, carinho com que me recebeu e pela análise das minhas amostras no espectrômetro de massas do tipo ESI-Q-TOF.

Ao Gustavo Sanvido e à Jerusa Garcia pelas análises feitas no espectrômetro de massa do tipo MALDI-Q-TOF.

À Dra. Elzira Saviani por todos os ensinamentos que me concedeu, pela ajuda na execução do trabalho, pela amizade e apoio em todos os momentos.

Às minhas queridas irmãs pelo apoio e pelos maravilhosos momentos que passamos juntas.

À minha amiga Mariane Flores pelos momentos alegres que passamos juntas, pelas críticas construtivas referente a minha tese, carinho e amizade.

Aos amigos, Hugo, Jusceley, Dayane, Halley, Pablo, Plínio, Rodrigo, Natália, Ricardo (Shin), Erich, Daniel e Bruno pela cooperação, alegria e ajuda no decorrer da minha dissertação.

À Deus, por sempre ter me acompanhado, por me ajudar nos momentos de angustia e por tornar realidade todos os meus sonhos.

À Capes e à Faepex pelo apoio financeiro.

À todos aqueles que de alguma forma participaram deste trabalho, muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XIV</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XVI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>2</b>
2.1 A citricultura.....	2
2.2 Sintomas e controle da Clorose Variegada dos Citros.....	3
2.3 Caracterização, mecanismo de colonização e patogenicidade.....	4
2.4 Interação planta-patógeno.....	7
2.4.1 <i>Mecanismos de defesa da planta</i> .....	9
2.5 Genoma.....	14
2.6 Proteoma.....	15
2.6.1 <i>Proteoma de planta</i> .....	16
2.7 Identificação de proteínas.....	17
2.8 Espectrometria de massas.....	19
2.8.1 <i>MALDI “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization”</i> .....	20
2.8.2 <i>ESI – “Eletrospray Ionization”</i> .....	22
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>24</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>5. MATERIAS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
5.1 Preparo de mudas e infecção com <i>X. fastidiosa</i> .....	26
5.2 Preparo do inóculo.....	26
5.3 Confirmação de infecção por <i>X. fastidiosa</i> .....	27
5.4 Extração de proteínas totais de folhas.....	28
5.5 Dosagem de proteínas.....	28
5.6 Eletroforese bidimensional.....	29
5.6.1 <i>Focalização isoeletrica ou isoeletrofocalização (primeira dimensão)</i> .....	29
5.6.2 <i>Equilíbrio das tiras IPG</i> .....	29
5.6.3 <i>SDS-PAGE (segunda dimensão)</i> .....	30
5.7 Detecção de proteínas e digitalização de imagem.....	30

5.8 Análise computacional dos géis.....	31
5.9 Espectrometria de massas.....	31
5.9.1 Preparo das amostras.....	31
5.9.2 Digestão das proteínas.....	31
5.9.3 Sequenciamento das proteínas.....	33
5.9.4 Análise das informações.....	34
5.9.5 Identificação das proteínas.....	35
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
6.1 Confirmação de infecção por <i>X. fastidiosa</i> nas variedades de citros.....	36
6.2 Otimização do protocolo de extração de proteínas totais das folhas.....	37
6.3 Análise comparativa de proteínas encontradas em laranja Pêra e de tangerina Poncan inoculadas com <i>X. fastidiosa</i> .....	41
6.4 Proteínas de laranja Pêra e de tangerina Poncan identificada por espectrometria de massas.....	47
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
7.1 Protocolo de extração das proteínas de folhas de citros.....	65
7.2 Análise de imagem e dos dados.....	69
7.3 Perfil do proteoma da laranja Pêra e da tangerina Poncan.....	72
7.3.1 Energia.....	73
7.3.2 Mecanismos de defesa.....	79
7.3.3 Metabolismo primário.....	87
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>93</b>
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>94</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Sintomas de CVC.....	4
<b>Figura 2</b> Modelo dos estágios de desenvolvimento do biofilme bacteriano.....	6
<b>Figura 3</b> Esquema ilustrativo de um espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF e seu funcionamento.....	21
<b>Figura 4</b> Esquema de ionização realizada por ESI.....	23
<b>Figura 5</b> Parâmetros de processamento usados pelo programa Proteinlynx V. 2.1 na interpretação dos espectros de massa.....	34
<b>Figura 6</b> Eletroforese em gel de agarose (1,0 %) empregada na visualização dos produtos da reação do PCR.....	36
<b>Figura 7</b> Perfil bidimensional de proteínas extraídas com CHAPS e DTT no tampão de lise.....	38
<b>Figura 8</b> Perfil bidimensional da extração de proteínas utilizando a combinação de CHAPS com ASB-14 e TBP no tampão de lise.....	39
<b>Figura 9</b> Distribuição das proteínas extraídas com o protocolo adaptado de Maserti et al. (2006) estabelecido.....	41
<b>Figura 10</b> Mini-gel SDS-PAGE das proteínas de laranja Pêra.....	42
<b>Figura 11</b> Mini-gel SDS-PAGE das proteínas de tangerina Poncan.....	43
<b>Figura 12</b> Géis de eletroforese bidimensional com os perfis das proteínas extraídas das folhas de laranja Pêra.....	45
<b>Figura 13</b> Géis de eletroforese bidimensional com os perfis das proteínas extraídas das folhas de tangerina Poncan.....	45
<b>Figura 14</b> Histogramas representativos dos <i>spots</i> estatisticamente relevantes.....	46
<b>Figura 15</b> Identificação de proteínas.....	48
<b>Figura 16</b> Separação das proteínas por eletroforese bidimensional de folhas de laranja Pêra sadia.....	49
<b>Figura 17</b> Separação das proteínas por eletroforese bidimensional de folhas de tangerina Poncan infectadas com <i>X. fastidiosa</i> .....	52
<b>Figura 18</b> Avaliação de diferentes gradientes de pH.....	54

- Figura 19** Separação das proteínas de folhas de tangerina Poncan infectadas com *X. fastidiosa* por eletroforese bidimensional.....55
- Figura 20** Distribuição por categoria funcional dos *spots* de tangerina Poncan analisados, separados por eletroforese bidimensional em um gradiente de pH linear de 4-7 e seqüenciados por LC/MS/MS.....64

**LISTA DE TABELA**

- Tabela 1** Proteínas de folhas de laranja Pêra separadas por eletroforese bidimensional com um gradiente de pH 3-10 não linear analisadas por MALDI-Q-TOF.....50 a 51
- Tabela 2** Proteínas de folhas de tangerina Poncan separadas por eletroforese bidimensional com um gradiente de pH 3-10 não linear analisadas por MALDI-Q-TOF.....53
- Tabela 3** Proteínas de folhas de tangerina Poncan separadas por eletroforese bidimensional com um gradiente de pH 4-7 analisadas por ESI-Q-TOF.....57 a 62
- Tabela 4** Proteínas que foram representadas por mais de um *spot* nos géis de eletroforese bidimensional.....63

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACN – Acetonitrila

AMBIC – Bicarbonato de amônio

ASB-14 – Tetradecanoilamido propil dimetil amônio propano sulfonado

BSA – Albumina de soro bovino

C7BzO – 3-(4-heptil) fenil 3-hidroxi propil dimetil amônio propano sulfonado

CHAPS – Ciclohexilamino dimetilamônio propano sulfonato

2DE – Eletroforese bidimensional

D.O. – Densidade óptica

DTT – Ditioneitol

EDTA – Etilenodiaminatetracetato

ESI – *Electrospray Ionization*

EST – Expressed Sequence Tags

IEF – Focalização isoeletrica

IAA - Iodoacetamida

IPG – Gradiente de pH imobilizado

kDa – Quilodalton

kV - Quilovolts

mA - Miliamper

MALDI – *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*

MS - Espectrometria de massas

$m/z$  – Razão entre a massa e a carga

pI – Ponto isoeletrico

PMSF – Fluoreto de fenil-metil-sulfonilo

PVPP – Poli (vinilpolipirrolidone)

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

TCA – Ácido tricloroacético

TBP - Tributílfosfina

TCEP – Tris (2-carboxietil)fosfina hidrocloreto

TEMED – Tetrametiletenodiamina

TOF – *Time-of-flight*

Vhr – Voltagem/hora

VhT – Voltagem/hora total

## RESUMO

O sistema citrícola no Brasil representa um setor de grande importância econômica. O Estado de São Paulo é o principal produtor de citros, fazendo do país o maior exportador de suco de laranja concentrado congelado. Apesar do Brasil ocupar uma posição de destaque no cenário mundial de citricultura, o país não consegue aumentar a sua produtividade devido à ocorrência simultânea de pragas e doenças, sendo que a clorose variegada dos citros (CVC) se mostra como uma das mais limitantes sobre esta produção. Ela é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, que é capaz de infectar todas as variedades de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), embora a tangerina Poncan (*Citrus reticulata* Blanco) seja considerada tolerante à sua infecção. Apesar de muitos estudos já tenham sido realizados a fim de se compreender melhor os mecanismos da sua patogenicidade, questões ainda permanecem em aberto acerca dos mecanismos que controlam o seu processo de infecção e o desenvolvimento da doença. Desse modo, foi realizado um estudo comparativo do proteoma das folhas de laranja Pêra e de tangerina Poncan após 30 dias da inoculação com a *X. fastidiosa* e o dos obtidos de folhas não infectadas, empregando a técnica de eletroforese bidimensional (2DE) e espectrometria de massas (MS). Foram confeccionados mapas 2DE com o intuito de se verificar proteínas diferencialmente expressas que por ventura poderiam estar relacionadas aos mecanismos de defesa e resistência da planta. Entre as proteínas (*spots*) de laranja Pêra, separadas por eletroforese bidimensional, 60 *spots* foram considerados como estatisticamente relevantes, apresentando alteração de intensidade. Entre as proteínas de tangerina Poncan analisadas na mesma condição, 38 foram consideradas como estatisticamente relevantes. Confeccionou-se para a planta tangerina Poncan géis de poliacrilamida utilizando IPG com gradiente de pH linear de 4-7, visto que houve um grande número de proteína diferencialmente expressas nesta faixa. Como resultado, foram obtidos 45 *spots* com diferença de expressão. A identificação dessas proteínas foi feita por meio do seqüenciamento por espectrometria de massas através do sistema LC ESI-MS/MS ou MALDI-Q-TOF. O seqüenciamento por MS possibilitou a aquisição da seqüência de aminoácidos de 49,7% dos *spots*. Dentre eles, 76% dos *spots* foram identificados, enquanto que 24% não apresentaram homologia com nenhuma base de dados. Entre as proteínas identificadas quatro foram representadas por mais de um *spot*, podendo indicar a ocorrência de eventos provenientes do splicing alternativo, modificações pós-traducionais, variações alélicas de uma mesma proteína ou degradação da

amostra. As proteínas identificadas foram relacionadas com a produção de energia, com o metabolismo primário, com mecanismo de defesa, proteínas de microrganismos e proteínas desconhecidas. Laranja Pêra apresentou uma diminuição da expressão de proteínas relacionadas à fotossíntese, o que coincide com os primeiros efeitos sentidos pelas plantas colonizadas pela bactéria. Em contrapartida, tangerina Poncan apresentou um aumento de expressão de proteínas relacionadas à resposta de defesa contra esse patógeno.

Palavras chaves: *Xylella fastidiosa*; Eletroforese Bidimensional; Espectrometria de Massas; Folha; Clorose Variegada dos Citros; Laranja Pêra; tangerina Poncan.

## ABSTRACT

The citrus system in Brazil represents one of the most important economic sectors. The State of São Paulo is the main producer of citrus, settling the country as the biggest exporter of concentrated freezing orange juice. Besides holding the outstanding position in the worldwide citrus culture scene, the country cannot raise its productivity due to simultaneous occurrence of plagues and diseases, being the citrus variegated chlorosis (CVC) one of the most limiting diseases affecting the citrus production. This disease is caused by bacterium *Xylella fastidiosa*, that which is able to infect all sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) varieties, however ponkan (*Citrus reticulata* Blanco) was considered resistant to it. Although, many studies have already been done in order to understand, in a better way, the mechanism of its pathogenicity, there are still queries about the mechanisms which control the process of its infection and the development of the disease. In this manner, we did a comparative proteomics study of leaves from sweet orange and ponkan after 30 days of the inoculation with *X. fastidiosa* versus leaves not infected with this bacterium (healthy plants), using two-dimensional gel electrophoresis (2DE) and mass spectrometry techniques. Comparative 2DE maps were done with the aim to verify differentially expressed proteins related with defense mechanism and the plant resistance. Among the proteins (spots) extracted from sweet orange, separated by two-dimensional gel electrophoresis, 60 spots were considered with statistical significance, showing intensity alteration. On the other hand, among the proteins (spots) extracted from ponkan and analyzed in the same condition, 38 spots were considered with statistical significance. Gels using linear pH gradient ranging from 4 to 7 were prepared for ponkan gels using, because there were a larger number of differentially expressed proteins in this area. As a result, we obtained 45 spots with difference in its expression. The identification of these proteins was done by sequencing using mass spectrometry like LC ESI-MS/MS or MALDI-Q-TOF. 143 spots were analyzed by mass spectrometry and were obtained amino acid sequence from 71 (49,7%) of the spots. Between them, 54 (76%) were identified, while 17 (24%) presented no homology in the database used. Overall, 4 proteins appeared as multiple spots and accounted for most of the protein found in the group. This observation may reflect post-translation modification, alternative splicing events, isozyme variation, allelic variation of the same protein, but also protein degradation. The identified proteins play a role in energy, primary metabolism,



defense mechanism, unknown proteins and microorganism proteins. The sweet orange presented a decrease in expression of photosynthesis related protein, indicating a possible lower photosynthetic activity resulting from early effects of the bacterial colonization in affected plants. On the other hand, ponkan showed an increase in defense-related proteins response against this pathogen.

**Key words:** *Xylella fastidiosa*; Two-dimensional electroforese; Mass spectrometria; leaf; Citrus Variegated Chlorosis; Sweet orange; Ponkan

## 1. INTRODUÇÃO

*Xylella fastidiosa* é o agente causal da clorose variegada dos citros (CVC ou amarelinho dos citros), uma doença responsável por grandes perdas econômicas para o Brasil bem como para outros países com atividade citrícola. Muitos estudos já foram realizados sobre esta bactéria bem como o sequenciamento completo do seu genoma a fim de se compreender melhor os mecanismos da sua patogenicidade. Mesmo assim, não foi possível elucidar todos os mecanismos que controlam o processo de infecção e o desenvolvimento da doença (SIMPSON et al., 2000).

Diversos estudos têm demonstrado que a análise proteômica pode gerar informações relevantes para elucidar os mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento da planta. Atualmente, a técnica proteômica também tem sido muito utilizada como ferramenta de estudo da interação planta-patógeno (ROSIGNOL et al., 2006).

O estudo do proteoma da *X. fastidiosa* já foi realizado no intuito de se desvendar os possíveis mecanismos envolvidos com a sua patogenicidade. No entanto, existem poucas evidências que comprovam a expressão de proteínas deste patógeno realmente envolvidas com a resposta dos citros à sua infecção (SMOLKA, 2002). Além disso, não existem relatos sobre as alterações no proteoma de folhas de citros em resposta a infecção por essa bactéria.

Sendo assim, o estudo comparativo dos proteomas de laranja Pêra (espécie suscetível à *X. fastidiosa*) e da tangerina Poncan (espécie tolerante à *X. fastidiosa*) saudáveis com as plantas infectadas com *X. fastidiosa* revela-se uma interessante forma de detectar as possíveis proteínas diferencialmente expressas. Este trabalho pode auxiliar na identificação de novos alvos moleculares envolvidos na regulação de mecanismos de defesa da planta a este patógeno.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A citricultura

O sistema citrícola no Brasil representa um setor de grande importância econômica, destacando-se em 2º lugar no Estado de São Paulo, sendo superado apenas pelo cultivo da cana-de-açúcar. O país apresenta uma área cultivada de 500 mil hectares, sendo que 77% da produção de laranja situa-se na região Sudeste. A laranja representa 49% de toda a fruta produzida no Brasil ([www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br)). Atualmente o país é responsável por 33,7% de suco de laranja concentrado congelado ocupando posição de maior exportador deste produto (BARRIOS et al., 2005).

Apesar do Brasil se destacar no cenário mundial da citricultura, o país não consegue aumentar a sua produtividade devido a perdas causadas pela ação de diversos patógenos, como bactérias, vírus e viróides. O fato de a citricultura paulista ser baseada em monocultura representa o fator isolado mais importante para o aparecimento e avanço de uma série de doenças, como sorose, exocorte, cancro cítrico, *huanglongbing* (ex-greening), a leprose, a gomose e a tristeza, todas com elevada taxa de disseminação através de material propagativo (BARBOSA et al., 2006). Dentre as doenças causadas por fitopatógenos, atualmente a mais importante é a CVC, que tem sido considerada um dos fatores responsáveis pela retração na produtividade de cítricos no país.

A CVC foi primeiramente descrita em 1987 em pomares do Triângulo Mineiro e no Norte e Nordeste do Estado de São Paulo. Hoje está presente em todas as áreas citrícolas do Brasil, resultando numa perda econômica anual por volta de US\$100 milhões para a agro-indústria de citros (SOUZA et al., 2007b). As regiões Norte do Estado de São Paulo e Sul de Minas Gerais apresentam maior incidência e severidade da doença, compreendendo justamente as atuais áreas de expansão da citricultura (DONADIO, 1998; BOLOGNA, 2003).

Todos os cultivares comerciais de laranja doce são afetadas pela CVC, independente do porta-enxerto utilizado (CARVALHO et al., 1995). A laranja doce é a principal fonte de suco de laranja e tornou-se a variedade mais cultivada no país por apresentar boa adaptação às condições climáticas das principais áreas produtoras do Estado de São Paulo. No entanto, apresenta maior susceptibilidade à doença (COLETTA-FILHO et al., 2007).

Algumas variedades de tangerinas como Nova, Fortuna, Clementina, Ellendale e Wilking também são sensíveis à CVC. Entretanto, a variedade tangor Murcott (*C. sinensis* x *C. reticulada*), cidra e pomelo (*C. grandis*) são aparentemente resistentes à doença. Como variedades supostamente tolerantes à CVC encontram-se o limão (*C. limon*), a lima (*C. aurantifolia*) e a tangerina Poncan (*C. reticulada*) (BOVÉ & AYRES, 2007). Mesmo a bactéria sendo esporadicamente detectada nesta espécie, não é observada nenhum sintoma da doença ou perdas econômicas relacionadas (SOUZA et al., 2007b).

Além de infectar laranjas doces, a *X. fastidiosa* também infecta videiras (doença de Pierce), provoca escaldadura das folhas da amendoeira e a doença “phony” do pessegueiro. A *X. fastidiosa* pode também habitar outras espécies de plantas como cafeeiros e ameixeiras (RIBEIRO et al., 2003).

O método de controle das principais doenças bacterianas dos citros se faz de uma maneira integrada, envolvendo o uso simultâneo de diversas medidas (biológicas, genéticas, físicas e culturais). Este manejo integrado tem como objetivo reduzir as doenças a um nível tolerável, ou seja, trata de controlar a disseminação dos patógenos e não de erradicá-los (DONADIO, 1998).

## 2.2 Sintomas e controle da CVC

Os sintomas iniciais da doença são vistos nas folhas maduras da copa da árvore que apresentam pontuações circulares de cor amarela (aspecto semelhante à deficiência de zinco) na face superior e lesões de cor palha na face inferior (Figura 1). Os ramos afetados podem apresentar entrenós curtos que conferem aspectos de “envassouramento”, visto que as gemas destes ramos tendem a brotar com maior frequência e vigor originando novos ramos doentes (LARANJEIRA, 1997 apud BOLOGNA, 2003). Com o avanço da CVC, pode ocorrer desfolha dos ramos mais altos e degeneração da planta. O agravamento da doença causa a diminuição, endurecimento e maturação precoce dos frutos (Figura 1). As plantas afetadas sofrem significativa redução de crescimento apesar de não chegarem a morrer. Neste estágio, os frutos são impróprios para o comércio *in natura* ou para utilização na indústria de suco concentrado.



**Figura 1. Sintomas de CVC.** (A) Folhas, apresentando manchas amareladas na sua parte superior e inferior. (B) Frutos, que amadurecem precocemente, ficando endurecidos e com o tamanho reduzido ([www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br)).

A CVC se espalha rapidamente nos pomares de laranja infectados, pois a bactéria pode ser transmitida pelos pontos mais altos dos enxertos das gemas dos galhos ou naturalmente pelas cigarrinhas (homópteros) que, ao se alimentarem da seiva bruta proveniente do xilema de plantas contaminadas, sugam também a bactéria, passando a transmiti-la para plantas saudáveis. Existem onze espécies de cigarrinhas responsáveis pela disseminação da CVC em todas as regiões citrícolas do país (SMOLKA, 2002).

O controle da CVC se baseia na plantação de mudas saudáveis, na poda de galhos com folhas que apresentam sintomas ou na erradicação das plantas infectadas para a remoção da fonte de inoculação, além do controle dos vetores com o uso de inseticidas, o que apresenta um efeito negativo para o meio ambiente (COLETTA-FILHO et al., 2007).

### 2.3 Caracterização, Mecanismos de Colonização e Patogenicidade

A *X. fastidiosa* é um bastonete Gram-negativo, não flagelado, com dimensões de 0,25 a 0,35  $\mu\text{m}$  de largura e entre 0,9 e 3,5  $\mu\text{m}$  de comprimento. A bactéria não apresenta mobilidade, é aeróbica estrita, não fermentativa, não halofílica e não pigmentada. É de natureza fastidiosa e exige meios de cultura complexos para o seu desenvolvimento e tempos longos de duplicação (acima de 9 horas). O pH e temperatura ótimos para o seu crescimento se encontram na faixa de 6,5 a 6,9 e 26 a 28  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Ela é capaz de hidrolisar gelatina, produzir catalase e apresentar reação negativa para os testes de indol, lipase, amilase, coagulase e fosfatase (WELLS et al., 1987).

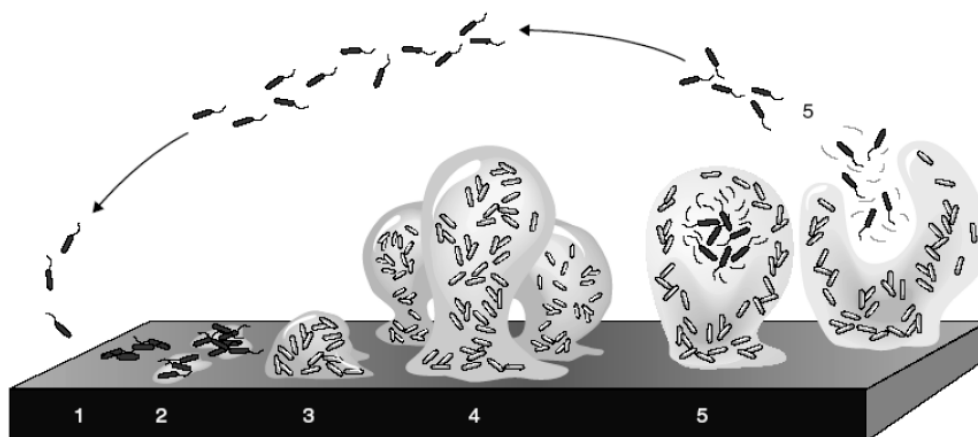
A bactéria *X. fastidiosa* se instala no xilema da planta infectada dando início a colonização. Durante a colonização ocorre a formação do biofilme bacteriano que causa a oclusão vascular, obstruindo a passagem de água. Isto afeta o transporte de água e nutrientes do sistema radicular para a parte aérea da planta (BELLATO et al., 2004; SOUZA, et al., 2005).

Já foi demonstrado que a bactéria é capaz de crescer como um biofilme, sendo este um possível fator importante para a sua patogenicidade (SOUZA et al., 2005). Os biofilmes podem ser definidos como uma comunidade estrutural de agregados microbianos sésseis, envolvidos em uma matriz polimérica auto-produzida, fixada a uma superfície inerte ou viva (MARQUES et al., 2002). Estudos genéticos de biofilmes de uma espécie dessa bactéria mostraram que estes são formados por múltiplos estágios que são regulados por vários genes da bactéria que sofrem alteração na sua expressão em cada fase do desenvolvimento do biofilme (SOUZA et al., 2005).

A formação do biofilme, segundo Sauer (2003, apud SOUZA, 2004), é composta por cinco diferentes estágios (Figura 2):

- Primeiro estágio: adesão reversível das células na superfície;
- Segundo estágio: adesão irreversível mediada principalmente pela produção de substâncias exopoliméricas (polissacarídeos);
- Terceiro estágio: início do desenvolvimento da arquitetura do biofilme;
- Quarto estágio: o biofilme já se encontra totalmente maduro, de forma complexa e com alta densidade celular;
- Quinto estágio: fase de dispersão das células do biofilme;

Quando o biofilme alcança um estágio maduro, com alta densidade celular, é ativado um sistema de sinalização celular que permite à bactéria regular a expressão de grupos específicos de genes tais como os fatores de virulência, resistência a compostos antimicrobianos, resposta de defesa do hospedeiro, produção de antibióticos e transferência de plasmídeo por conjugação. Estas características dão à célula do biofilme uma vantagem em se adaptar ao hospedeiro (SOUZA et al., 2005).



**Figura 2. Modelo dos estágios de desenvolvimento do biofilme bacteriano.** 1) Aderência da bactéria de forma reversível à superfície; 2) Adesão irreversível das células bacterianas à superfície; 3) Início da maturação; 4) Maturação completa; 5) Dispersão das células móveis que deixam as microcolônias (SOUZA, 2004).

Em geral, a oclusão do vaso do xilema é a causa aceita para explicar os sintomas induzidos pela *X. fastidiosa*. Outros fatores como absorção de nutrientes e produção de toxinas pela bactéria também parecem contribuir para a sua patogenicidade (MACHADO et al., 2001). Em publicação anterior (1994), Machado et al., definem que plantas afetadas pela CVC apresentam disfunção no funcionamento dos estômatos, aumento da resistência ao fluxo da água ou absorção da água pelas raízes, tornando-as mais sensíveis à deficiência hídrica. O estresse hídrico compromete a produção de frutos, tornando-os inadequados para o comércio e prejudicando economicamente a citricultura, principalmente no Brasil (SMOLKA, 2002).

Outro aspecto importante é o movimento sistêmico que a bactéria utiliza para se espalhar e colonizar o hospedeiro. Alguns pesquisadores como Purcell & Hopkins (1996) fazem uma avaliação a respeito da movimentação vaso a vaso das bactérias presentes no xilema, sugerindo a produção de enzimas que degradam a membrana da pontuação. É sabido que a *X. fastidiosa* passa pelas membranas que constituem os vasos, formadas por celulose, hemicelulose, pectina, lignina e proteína, que por sua vez apresentam poros pequenos, de tamanho insuficiente à passagem. Uma hipótese seria o rompimento

enzimático da membrana. Dessa maneira, proteínas com atividade de degradação dos compostos citados acima estariam desempenhando papel fundamental no processo de colonização da bactéria (SMOLKA, 2002). Esse mecanismo pode ser visto em variedades suscetíveis como laranja Pêra, onde a bactéria apresenta taxas elevadas de colonização, sobrevivendo e alastrando-se rapidamente para as partes superiores do vaso (SOUZA et al., 2005).

A presença da bactéria também leva a planta a produzir toxinas (fitotoxinas) e/ou possíveis alterações hormonais que ajudariam em sua ação nociva (PURCINO et al., 2007).

## **2.4 Interação planta-patógeno**

Todas as plantas vivem naturalmente com algum tipo de associação íntima com os microrganismos. Estes podem colonizar sua superfície (colonização epifítica) ou ocupar espaços dentro dos seus tecidos (colonização endofítica), retirando dela carbono e os nutrientes necessários para a sua sobrevivência (BRENCIC & WINANS, 2005).

Existe uma vasta gama de interações que podem ocorrer entre plantas e microrganismos (vírus, bactérias, fungos e nematóides). Nem sempre estas interações resultam no desenvolvimento de condições desvantajosas e detrimenais para a planta. Há relações benéficas entre estes seres, que muitas vezes, culminam em uma relação simbiótica que facilita a captação de nutrientes pela planta, o que acaba favorecendo o seu crescimento (BIRCH & KAMOUN, 2000; LIPKA & PANSTRUGA, 2005).

Em outras vezes, quando a interação é desvantajosa para a planta, ela pode desenvolver sintomas que são respostas auto-limitantes e reduzem a sobrevivência do patógeno, evitando assim sua disseminação de um hospedeiro para outro. Não obstante, uma doença fatal pode ocorrer quando o patógeno encontra um hospedeiro que foi enfraquecido pelas circunstâncias que alteraram este delicado balanço de interação planta-patógeno (GALÁN & COLLMER, 1999; LIPKA & PASTRUGA, 2005).

As interações entre planta e patógeno são classificadas como: compatíveis, quando o patógeno é virulento e o hospedeiro é suscetível (condicionando a doença); incompatíveis, quando o patógeno é avirulento e o hospedeiro é resistente - neste caso o sistema de defesa

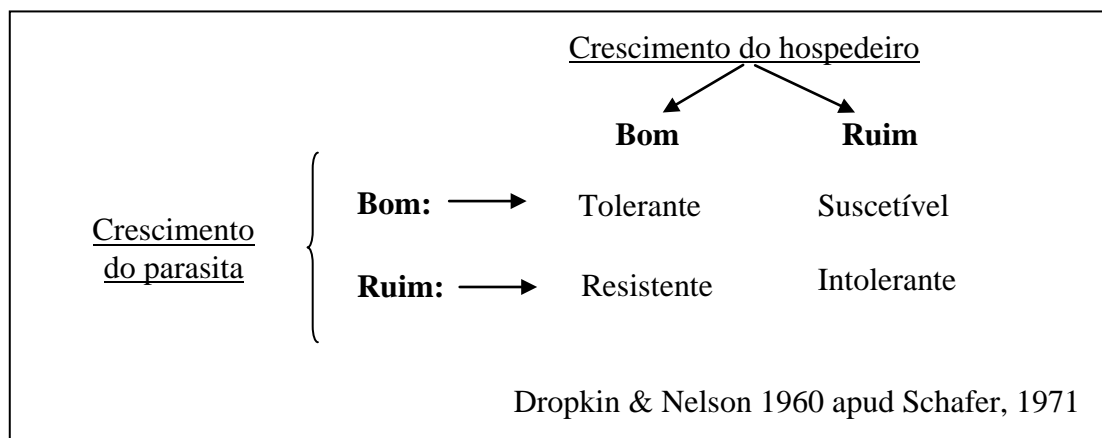


da planta é eficientemente ativado, conduzindo à resistência (RESENDE et al., 2003); e como não hospedeira (*nonhost*), na qual normalmente um patógeno virulento para um hospedeiro em particular não é capaz de infectar e crescer em um tipo diferente de hospedeiro (GÖHRE E ROBATZEK, 2008) .

A compatibilidade e a incompatibilidade da interação planta-patógeno envolve a diminuição ou o aumento da expressão de centenas de diferentes grupos de genes. Em muitos casos a susceptibilidade e a resistência a certo patógeno dependem do tempo que a planta leva para ativar o seu mecanismo de defesa e da magnitude dessas mudanças (VAN LOON, REP e PIETERSE, 2006).

A resistência da planta a certas doenças pode ser devida a vários mecanismos e estar presente em diferentes níveis. O termo tolerância é usado para definir o ato ou a capacidade da planta em resistir ao ataque de patógenos, ou seja, é a capacidade da planta em suportar fortes infecções sem apresentar severas perdas na sua produção ou na sua qualidade (SCHAFER, 1971).

Os termos tolerância, resistência, intolerância e susceptibilidade podem ser esquematizados da seguinte forma:



A respeito da interação planta-patógeno, a bactéria uma vez instalada, continua controlando as mudanças na fisiologia do seu hospedeiro e encontra nele um local adequado e com nutrientes necessários para o seu crescimento e reprodução (LAM et al., 2001). Para que haja esta associação é necessário que as proteínas da bactéria reconheçam de alguma

forma a planta associada. Neste caso, o metabolismo da planta passa por modificações, frequentemente devido às atividades específicas da colonização pelo patógeno. No mesmo sentido, o microrganismo patogênico apresenta como resposta um ajuste contínuo na sua própria fisiologia (BRENCIC & WINANS, 2005), pois só após a sua ligação à superfície do hospedeiro, a realização da degradação das barreiras químicas e físicas do hospedeiro e posteriormente a produção de suas toxinas e a inativação das defesas da planta é que o patógeno vai obter o sucesso da sua infecção (LAMB et al., 1989).

Na dinâmica dessa interação, a participação de proteínas no reconhecimento do hospedeiro e nos diversos mecanismos de sinalização intra e intercelulares são fundamentais para a manutenção de tal interação (BRENCIC & WINANS, 2005).

Segundo Birch & Kamoun (2000), um passo importante para se revelar os mecanismos dessa interação seria definir os componentes genéticos envolvidos nas mudanças transcricionais que ocorrem tanto no microrganismo quanto na planta hospedeira.

Portanto, o processo que determina a consequência da interação entre o microrganismo patogênico e a planta hospedeira se revela complexo. Ainda é considerado um desafio à compreensão das adaptações fisiológicas e de desenvolvimento que permitem ao patógeno infectar, colonizar tecidos e subverter o metabolismo da planta hospedeira (KAZAN et al., 2001).

#### ***2.4.1 Mecanismos de defesa das plantas***

A sobrevivência das plantas e o aumento de produtividade dependem fortemente da habilidade delas em se adaptar, responder, resistir e tolerar as diferentes condições ambientais. As plantas possuem diversos mecanismos de resposta aos estresses bióticos como os causados por pragas e patógenos e abióticos como aqueles causados pelo estresse salino, hídrico, por deficiência nutricional e por elevada intensidade luminosa (ROSIGNOL et al. 2006).

De acordo com Margis-Pinheiro et al. (1999) as plantas apresentam três sistemas de defesa e adaptação para impedir o alastramento do patógeno:

- Resistência constitutiva: recebida por herança dos ancestrais – possibilita que as plantas se tornem imunes;

- Resistência localizada: é ativada no local onde ocorre a agressão. Exemplo: resposta hipersensitiva (*hypersensitive reaction* ou HR);
- Resistência sistêmica adquirida (SAR): protege a planta contra ataques subseqüentes do mesmo patógeno;

Portanto, as plantas apresentam mecanismos de defesa pré-formados que estão presentes nas plantas antes do contato do patógeno e induzíveis que são produzidos ou ativados na planta em resposta à invasão de microorganismos (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

Uma vez que o patógeno entra em contato com a planta, ela normalmente desencadeia como forma de resposta primária à infecção, o reforço da parede celular, a produção de metabólitos secundários e a produção de proteínas antimicrobianas (GONZÁLEZ et al., 2001; VAN LOON, REP e PIETERSE, 2006).

Alguns hormônios vegetais, como o ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno, atuam como sinalizadores, sendo os maiores reguladores da imunidade inata da planta. Suas produções variam muito em quantidade, composição e tempo, e resultam na ativação de diferentes grupos de genes relacionados à defesa que eventualmente determinam a natureza da resposta de defesa da planta contra o patógeno encontrado (PÓZO, VAN LOON, PIETERSE, 2005). Dentre os genes que são expressos durante a infecção muitos estão envolvidos na regulação transcricional, transdução de sinal, atividades metabólicas direcionadas à ativação de defesa (VAN LOON, REP e PIETERSE, 2006).

Outras respostas de defesa da planta são a geração de espécies reativas de oxigênio (RESENDE et al., 2003) e óxido nítrico (DELLEDONNE et al., 1998; SALGADO et al., 2004; DELLEDONNE, 2005), mudanças na expressão e ativação de quinases e a morte celular programada localizada ou resposta hipersensitiva (HR) (ABRAMOVICHTH et al., 2006). A HR é caracterizada pela morte celular programada do hospedeiro no ponto de infecção, o que restringe o crescimento ou espalhamento do patógeno, sendo frequentemente associada ao aparecimento de lesões necróticas no sítio de entrada do patógeno. Ela é observada nas interações de incompatibilidade (MESSIAS, 2008).

Dentre as alterações celulares que podem ocorrer nas células de plantas hospedeiras em resposta a invasão por um microorganismo estão sinalizações celulares específicas para

formação de vesículas e secreção de compostos antimicrobianos, alterações na organização do citoesqueleto e redirecionamento de organelas e proteínas (LIPKA & PANSTRUGA, 2005).

Existem modificações profundas no metabolismo da célula vegetal que resultam em adaptação e resistência da planta. Uma dessas alterações é a síntese de proteínas relacionadas à defesa (conhecidas como proteínas PR, de *pathogenesis-related*). A síntese dessas proteínas pode ocorrer de duas formas: (a) forma direta (combate ao agente patogênico), (b) forma indireta (manutenção da estrutura e das funções celulares). Estas proteínas são classificadas em cinco grupos (PR-1, PR-2, PR-3, PR-4 e PR-5), todas apresentando baixo peso molecular, solubilidade em meio ácido e resistência à proteases (MARGIS-PINHEIROS et al., 1999).

Outra forma de resposta é a hipótese gene-a-gene que foi proposta para explicar a resposta de plantas resistentes a um patógeno em particular, devendo haver a combinação dos genes de resistência (dominante-R) da planta hospedeira com os de avirulência (dominante-Avr) do patógeno. O reconhecimento destes produtos gênicos pela planta hospedeira é que ativa a complexa cadeia de transmissão de sinal, resultando na ativação do sistema de defesa vegetal (RESENDE et al., 2003; COAKER et al., 2005). Esta resposta é caracterizada pelo rápido fluxo de íons e cálcio, pela explosão oxidativa extracelular, pela reprogramação transcricional dentro e em volta do local de infecção e, na maioria dos casos, pela morte celular programada localizada (GREENBERG e VINATZER, 2003; NIMCHUK et al., 2003).

Os genes *avr* podem ser essenciais para a multiplicação do patógeno no hospedeiro, como no caso de *avrBs2* de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, ou para a colonização e indução de sintomas da doença, como *pthA* de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (HAYWARD & MARIANO, 1997). Normalmente os produtos dos genes *avr* são injetados na célula hospedeira através do sistema de secreção do tipo III. Este sistema é essencial para a bactéria causar a doença em plantas suscetíveis e para causar a resposta hipersensitiva nas plantas resistentes (NOMURA et al., 2005). Entretanto, genes homólogos aos *avr* conhecidos não foram encontrados no genoma da *X. fastidiosa*, da mesma forma que não foram identificados genes que codificassem proteínas que compõem o sistema de secreção do tipo III (SIMPSON et al., 2000).

Na ausência de um reconhecimento específico para o patógeno, uma defesa basal (ou resistência basal) ocorre na planta hospedeira. Esta resposta é aparentemente induzida pelos padrões de moléculas associadas ao patógeno (PAMPs) como as flagelinas e lipopolissacarídeos (LPS). A defesa basal fornece um nível de resistência que geralmente previne a infecção da planta por uma grande faixa de micróbios, sendo caracterizada pela deposição localizada de calose na parede celular da planta e pela indução de certos genes de defesa; porém este tipo de resposta é temporariamente menor e com baixa amplitude, não proibindo a colonização do patógeno, apenas limitando o seu crescimento e espalhamento (BELKHADIR et al., 2004; NOMURA et al., 2005). Em plantas suscetíveis, a resistência basal é suprimida pelo organismo patogênico através das suas moléculas efectoras (GÖHRE e ROBATZEK, 2008).

Existe também a resistência apresentada pelas plantas não hospedeiras, denominada *nonhost resistance*. Esta resistência é uma das mais importantes, é a mais comum e provavelmente a menos compreendida entre os mecanismos de resistência das plantas. Este tipo de resistência possibilita que uma espécie particular de planta resista à infecção por uma vasta gama de patógenos potenciais que infectam outras espécies de plantas (HEATH, 2000; NOMURA, MELOTTO e HE, 2005). Como resposta, estas plantas apresentam barreiras químicas e físicas pré-formadas presentes constitutivamente em suas superfície, como camadas de cera, paredes celulares rígidas, metabólitos secundários antimicrobianos (fitoantimicinas) que inicialmente podem impedir o estabelecimento da infecção (NÜRNBERGER e LIPKA, 2005).

Os pesquisadores Mysore e Ryu (2004) propuseram classificar a resistência de plantas não hospedeiras em dois tipos: tipo I e tipo II. A resistência do tipo I é caracterizada pela falta de sintomas visíveis (como a necrose) na planta. Neste caso, o patógeno não consegue passar pelo primeiro obstáculo (parede celular, compostos antimicrobianos e outros metabólitos secundários) ou pelo segundo obstáculo (indução da resposta de defesa da planta através do reconhecimento não específico de moléculas eliciadoras do patógeno, ativando a resposta de defesa) e a resistência do tipo II que está sempre associada com a rápida necrose localizada (HR) se assemelhando a resposta da plantas resistentes em interação de incompatibilidade com o patógeno (hipótese gene-a-gene).

Na *X. fastidiosa*, os genes de patogenicidade/virulência fundamentais para o estabelecimento da infecção são ativados em função da densidade de suas células bacterianas. Foi observado por Hopkins (1985) que a *X. fastidiosa* pode perder parcial ou totalmente a sua virulência após sucessivas transferências em meio de cultura, perdendo também a sua habilidade de agregação (formação do biofilme).

Alguns aspectos da patogenicidade da *X. fastidiosa* estão relacionados com a sua adesão, deslocamento e colonização no interior dos vasos do xilema. Devido o quadro sintomatológico observado em algumas variedades de citros atacado, pode-se evidenciar que as disfunções do sistema condutor de água sejam a causa mais provável da doença (MACHADO et al., 1994; MACHADO et al., 2001; MEDINA, 2002), porém não podemos descartar outras hipóteses como a produção de fitotoxinas e alterações na concentração de reguladores de crescimento (ALVES, 2003).

Mesmo que outros mecanismos primários de patogênese possam estar envolvidos em parte da síndrome da doença, o principal mecanismo de patogênese é a falta de translocação de água e de nutrientes devido alguns fatores como: a oclusão de vaso do xilema pelos agregados da bactéria, reações de resistência como a deposição de goma, pectina, formação de tilose pelo hospedeiro (MOLLENHAUER & HOPKINS, 1976; FRY & MILHOLLAND, 1990), pela formação de cristais de cálcio em vaso que resultam em estresse hídrico e possivelmente pela destruição das membranas da pontuação causando cavitação nos vasos com embolia (SCHULTZ & MATTHEWS, 1988). Segundo Alves et al. (2004) a intensidade dos sintomas observados em citros com CVC está relacionada com o bloqueio dos vasos do xilema, os quais podem causar redução de até 50 % no fluxo de seiva bruta. Isto ocasiona a diminuição do potencial de água de folha, a diminuição na assimilação de CO<sub>2</sub>, a redução na taxa de transpiração e a redução na condutância estomática.

É de grande importância saber como os estímulos ambientais são percebidos pela planta e como se dá a ativação dos mecanismos de defesa, da rede de sinalização (que lida com a alteração da expressão de genes, mudanças na proteína e no metabolismo), do retardamento do crescimento e ainda como esses eventos resultam em tolerância e resistência (ROSIGNOL et al., 2006).

## 2.5 Genoma

A disponibilização das seqüências de genomas de organismos patogênicos e de seus hospedeiros proporciona uma grande oportunidade de avanço no conhecimento científico. A linhagem 9a5c da *X. fastidiosa* foi o primeiro fitopatógeno a ter o seu genoma completamente seqüenciado. Atualmente, várias espécies de *X. fastidiosa* já apresentam seus genomas parcialmente seqüenciados (CAO et al., 2001).

As análises aplicadas ao estudo funcional do genoma de citros representam um valioso avanço no que concerne à identificação e isolamento de genes de interesse, geração de marcadores moleculares, mapeamento genético e aumento de indivíduos nas coleções de germoplasma (KAZAN et al., 2001).

Atualmente com o projeto CitEST (Integração de Melhoramento Genético, Genoma Funcional e Comparativo de Citros) foram seqüenciados 55 mil genes de citros. O desenvolvimento de bibliotecas de ESTs associado com a tecnologia de expressão diferencial de gene (DGE) está em ascensão e fornece uma visão panorâmica de muitos processos biológicos (MARSHALL, 2004 apud AMELINE-TORREGROSA et al., 2005).

Mais recentemente, estudos funcionais do genoma de citros têm sido feitos também na Espanha (KATZ et al., 2007). Nesse contexto, ferramentas para estudos genômicos de citros em larga escala estão sendo aprimorados. Diversos processos celulares estão sendo analisados, incluindo: análises do desenvolvimento da planta (crescimento vegetativo, florescimento, desenvolvimento e qualidade dos frutos, senescência, etc) e respostas a estresses bióticos e abióticos (infecção por vírus, bactéria e fungos, deficiência de ferro, salinidade, tempos de seca, etc) (FORMENT et al., 2005).

Nos últimos anos ficou reconhecido que o genoma apenas representa o primeiro nível de complexidade dos sistemas biológicos. A função biológica não é analisada por estatística do genoma, mas, principalmente pela dinâmica da população de proteínas em um dado momento. Muitas informações a respeito das proteínas não podem ser previstas através da seqüência do genoma, como modificações pós-traducionais e efeitos de *splicing* alternativo. Existem numerosos casos de *splicing* diferenciais e muitas modificações pós-traducionais de proteínas (por exemplo: fosforilação, glicosilação, metilação e S-

nitrosilação) que podem controlar a atividade das proteínas mais do que as taxas diferenciadas de suas sínteses (HOOG, 2004; ROMERO-PUERTAS et al., 2008).

Dessa forma, a identificação e a caracterização funcional das proteínas são muito importantes para a compreensão das vias metabólicas de interesse e elucidação dos mecanismos moleculares relacionados à patogenicidade (ZHU et al., 2003).

## **2.6 Proteoma**

O entendimento do fenômeno biológico se faz necessário, de maneira que seja possível investigar sistematicamente as variações na expressão de proteínas nos diversos momentos e condições em que o fenômeno acontece. Este desafio pode ser enfrentado estudando-se o proteoma que, de maneira potencial, pode capturar a dinâmica das mudanças na expressão de proteínas sob diversas influências: genética e epigenética (MISCHAK et al., 2007).

O termo proteoma se refere ao conjunto de espécies de proteínas expressas em uma célula ou tecido em uma determinada condição em um determinado momento. Ele pode se alterar com o estado de desenvolvimento do tecido ou mesmo sob as condições nas quais o indivíduo se encontra (WILKINS et al., 1995). O termo engloba todos os conceitos e tecnologias aplicadas ao estudo de proteomas.

As metodologias usualmente aplicadas nesse tipo de estudo estão direcionadas à identificação e à caracterização das proteínas, através de abordagens quantitativas e estudos de modificações pós-traducionais em uma célula, tecido ou organismo (DI CIERO & BELLATO, 2002; LEE FERGUSON & SMITH, 2003).

Atualmente, a técnica de eletroforese bidimensional (2DE) combinada a métodos cada vez mais eficientes e sensíveis de identificação de proteínas por espectrometria de massas (MS) ainda permanece como uma das plataformas mais usadas no estudo de proteomas (CARPENTIER et al., 2005). O método da 2DE se apresenta em duas etapas ou dimensões. A 1ª dimensão é a focalização isoeétrica (IEF), na qual as proteínas são separadas em um gradiente de pH até alcançarem o seu ponto isoeletrico (pI). O pI é a posição estacionária que cada proteína apresenta, onde sua carga total é zero. Na 2ª dimensão, as proteínas separadas pela IEF são então separadas pela massa molecular (MW)



por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A visualização das proteínas é feita diretamente no gel, que resulta num perfil cartesiano de pontos ou *spots*, onde cada ponto contém múltiplas cópias de uma proteína (WILKINS et al., 1995).

Para aplicar a técnica de 2DE, as amostras biológicas são tratadas da seguinte maneira: primeiramente, as células são rompidas através de métodos químicos ou físicos e os interferentes (ácidos nucléicos, polissacarídeos, sais, lipídios e compostos fenólicos) são eliminados. As proteínas são solubilizadas com detergentes não iônicos (o que previne a interação hidrofóbica entre os domínios hidrofóbicos da proteína e evita a sua agregação e precipitação) e desnaturadas com agentes caotrópicos tais como a uréia (rompe pontes de hidrogênio) e tiuréia (quebra as interações hidrofóbicas), e pequenas quantidades de agentes redutores, como o ditioneitol (cliva as pontes dissulfetos intra e intermoleculares para alcançar o completo desdobramento da proteína) na presença de inibidores de proteases (GÖRG et al., 2004). Após serem submetidas à 2DE, as proteínas são visualizadas por métodos de coloração como: azul de coomassie (coomassie blue) e/ou por nitrato de prata. Existem também os métodos de marcação isotópica ou radioativa que se baseiam na incorporação de  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$  ou  $^{125}\text{I}$  às proteínas e detecção de proteínas por fluorescência (DI CIERO & BELLATO, 2002).

Embora a 2DE seja uma importante e poderosa técnica para a análise de proteomas, ela ainda apresenta limitações, tais como: dificuldade em detectar proteínas com pH menor que 3.5 ou maior que 9; proteínas de baixa abundância e proteínas muito hidrofóbicas. Ainda, a presença de contaminantes afeta o desempenho da 2DE, dificultando a análise apurada de proteínas (NATARAJAN et al., 2005). Mesmo assim, trata-se de um método de separação eficiente, já que um elevado número de proteínas presentes em uma amostra pode ser separado simultaneamente (mais de 1000 proteínas), fornecendo informações sobre pI, massa molecular e níveis de expressão (abundância relativa) (O'FARREL, 1975).

### **2.6.1 Proteoma de planta**

A análise de proteomas de plantas é uma vertente crescente que atualmente se encontra restrita a poucos modelos que, em sua maioria, estão apoiados nas informações de

genomas completos ou parcialmente publicados, dentre eles temos os estudos de proteomas realizados em *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* (arroz) e *Medicago sativa* (alfafa) (ROSSIGNOL et al., 2006).

Estudos de avaliação comparativa de proteomas de plantas caracterizaram diferentes padrões de expressão de proteínas sob condições de estresses bióticos e/ou abióticos, observando-se um aumento no número de proteínas relacionadas à resistência ou ao estresse (antioxidantes e chaperonas) (HEIL & BALDWIN, 2002).

No estudo do proteoma, a preparação das amostras é um passo crítico e absolutamente essencial para se obter um resultado de qualidade. Em vegetais, faz-se necessário o emprego de precauções especiais. A parede celular e o vacúolo compõem a maior parte da massa celular, com o citosol representando apenas 1-2 % do volume total da célula. Os tecidos da planta apresentam uma relação relativamente baixa entre proteína/volume quando comparados aos tecidos de origem bacteriana e/ou animal. As proteínas isoladas dos tecidos de plantas são, em sua maioria, difíceis de serem analisados pelo método de 2DE, devido à abundância de metabólitos secundários (principalmente fenóis e polifenóis), carboidratos, pigmentos e proteínas como a ribulose bisfosfato carboxilase (Rubisco) e seus produtos de proteólise. Isto resulta em um gel com traços horizontais e verticais e com manchas que reduzem o número de *spots* bem definidos e distintos (CARPENTIER et al., 2005; WANG et al., 2006). Por este motivo, alguns protocolos de extração de proteínas de tecidos vegetais têm sido testados para a otimização da separação de proteínas por 2DE, permitindo as análises comparativas de proteomas de plantas (MASERTI et al., 2006).

## 2.7 Identificação de proteínas

Os métodos mais conhecidos para identificar uma proteína envolvem o seqüenciamento químico e/ou a espectrometria de massas (MS). Uma vez conhecida a seqüência desta proteína ou as massas do conjunto dos peptídeos que a constituem (*peptide-mass fingerprinting* - PMF) é possível realizar sua identificação por correlação de

informações depositadas em bancos de dados de seqüências de proteínas acessíveis via internet, como o Swiss-Prot (<http://ca.expasy.org/>).

Essa possibilidade se dá pelo fato de que cada proteína se diferencia consideravelmente, não apenas na sua seqüência, mas também na sua composição de aminoácidos. O fato de cada proteína ter sua “impressão digital” é a base da técnica do PMF. Esta técnica se baseia na digestão proteolítica de uma enzima que cliva a proteína em um sítio específico, gerando peptídeos que terão suas massas medidas por MS. Esta lista de massas de peptídeos (que na teoria é única para cada proteína) é correlacionada, por um algoritmo, com os dados depositados em um banco de dados (de seqüência genômicas ou protéicas), onde todas as seqüências das proteínas conhecidas para o organismo em questão foram clivadas *in silico* (usando a mesma regra de clivagem da enzima utilizada no experimento) gerando uma “impressão digital virtual”. Após a comparação dos dados experimentais com os virtuais é gerado um valor (*score*) para cada correlação, de acordo com a qualidade das comparações (*matches*). A proteína que apresentou o maior *score* é classificada como sendo a identificada. Para se ter uma identificação inequívoca são utilizadas informações de pI e massa molecular da proteína, obtidas por meio das coordenadas do seu *spot* no gel 2DE. Contudo, esta ferramenta é limitada a organismos que tenham seu genoma completamente seqüenciado ou que as seqüências de aminoácidos das proteínas já sejam conhecidas (AEBERSOLD & GOODLETT, 2001; AEBERSOLD & MANN, 2003; JOHNSON et al., 2005).

Para organismos que têm uma complexidade maior no genoma - contendo proteínas diferentes formadas por peptídeos semelhantes, e/ou que apresentam apenas as etiquetas de seqüências expressas (ESTs), faz-se necessária obter mais dados a respeito da proteína para uma identificação correta. Desse modo, foram desenvolvidos equipamentos mais sofisticados como os espectrômetros de massas híbridos (conhecidos como MS/MS). Estes equipamentos contêm mais de um analisador em série, tornando-se mais poderosos na resolução de dados das moléculas analisadas. Uma vantagem desses sistemas está na capacidade de fragmentação dos peptídeos. Os fragmentos produzidos têm as suas massas medidas possibilitando a determinação da seqüência de aminoácidos do peptídeo, gerando dados mais robustos para a identificação da proteína. Sendo assim, obtém-se o PMF e as

massas dos fragmentos dos peptídeos selecionados, gerando assim, as suas seqüências de aminoácidos (GEVAERT et al., 2000).

## 2.8 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas tem se destacado dentre as técnicas analíticas em pesquisa biológica ao nível molecular, e atualmente é uma das técnicas mais versáteis e abrangentes disponíveis na química e bioquímica. Ela também é empregada em vários outros campos, como a biotecnologia, farmacologia, microbiologia e na genômica funcional (JONSSON, 2001).

Esta é uma técnica que mede a relação entre a massa e a carga ( $m/z$ ) de moléculas ionizadas em fase gasosa de maneira muito rápida e precisa devida a alta acurácia e sensibilidade do aparelho de espectrometria de massas (DASS, 2001). De uma maneira geral, um espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados. Na fonte de ionização as moléculas são ionizadas e transferidas para a fase gasosa. No analisador de massas os íons formados são separados de acordo com suas relações de  $m/z$  e posteriormente detectados (usualmente por um multiplicador de elétron).

Os primeiros espectrômetros de massas analisavam apenas moléculas pequenas, pois os métodos de ionização existentes até a década de 80 analisavam moléculas que eram capazes de resistir ao método de ionização. Para que ocorresse esta ionização, as moléculas analisadas deveriam estar em fase gasosa, sob alto vácuo e a altas temperaturas, condições estas incompatíveis com biomoléculas. Com a introdução dos métodos de ionização suaves – ionização por *electrospray* (ESI) e a ionização e dessorção à laser auxiliado por matriz (MALDI) no final dos anos 80, foi possível a análise de moléculas grandes e termolábeis, como as proteínas, além de fazer suas transferências para a fase gasosa sem sofrer fragmentação, viabilizando a análise de complexos não covalentes de biomoléculas (JONSSON, 2001).

Os tipos de fonte de ionização mais utilizados na identificação de proteínas e no estudo que envolve análise proteômica são: ESI e MALDI (CHEN & HARMON, 2006). O MALDI-MS é normalmente empregado em análises de misturas de peptídeos relativamente

simples, enquanto o sistema de ESI-MS integrado à cromatografia líquida (LC-MS) é preferido para o estudo de amostras complexas (AEBERSOLD & MANN, 2003).

Os analisadores de massas empregados na pesquisa proteômica apresentam boa sensibilidade, resolução, acurácia e habilidade em gerar informações acerca dos espectros de massas dos íons a partir dos fragmentos dos peptídeos. Há quatro tipos básicos de analisadores de massas utilizados nesta análise: o *Ion Trap*, *Time-of-Flight* (TOF), o quadrupolo e *Fourier Transform Ion Cyclotron* (FT-MS), cada um com seus pontos fortes e fracos; desempenho e *design* distintos (AEBERSOLD & MANN, 2003).

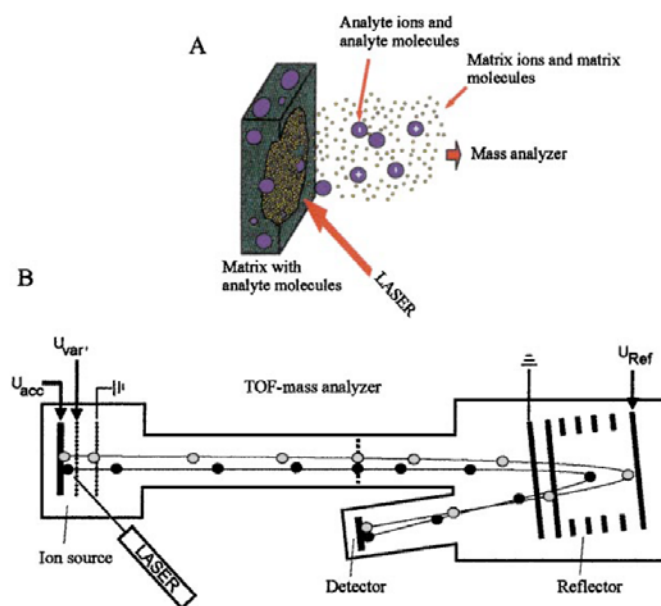
### **2.8.1 MALDI “Matrix – Assisted Laser Desorption Ionization”**

O método de MALDI foi introduzido no início da década de 80 por Toichi Tanaka e aprimorado pelo grupo dos pesquisadores Franz Hillenkamp e Michael Karas.

Na análise por MALDI, o analito é misturado com uma solução saturada de matriz (por exemplo, o ácido 2,5-dihidroxibenzóico ou ácido  $\alpha$ -cyano-4-hidroxicinâmico), que absorve luz no comprimento de onda do laser. A mistura matriz/analito é aplicada em uma placa de metal, na qual eles se cristalizam. O sólido resultante é então bombardeado por um feixe de laser (comumente um laser de nitrogênio a 337nm) que fornece luz a ser absorvida pelas moléculas aromáticas da matriz. A energia é subsequentemente transferida para o analito que se torna dessorvido na fase gasosa ocorrendo a ionização dos peptídeos. Após a análise se obtém informações sobre o seu peso molecular. O mecanismo de ionização não se encontra totalmente compreendido e várias sugestões ainda têm sido debatidas (JONSSON, 2001; MANN et al., 2001) (Figura 3).

A fonte de MALDI tem sido tradicionalmente acoplada ao analisador de massa do tipo TOF (*Time-of-Flight*) devido à sua natureza pulsada. Nesta análise, a razão  $m/z$  de um íon é determinada pelo tempo que ele leva para percorrer um tubo de vôo e atingir o detector (YATES, 1998; ASHCROFT, 2003). Com o método de MALDI produzem-se principalmente íons monocarregados, o que constitui uma excelente opção para se analisar misturas biológicas complexas, como digestos protéicos (AEBERSOLD & MANN, 2003).

Por um longo tempo, o MALDI-TOF foi considerado um espectrômetro de massas de baixa resolução. Com a introdução de novas melhorias ditas “*delayed extraction*” e “*reflector mode*”, mudou-se drasticamente esta visão. Dentre as vantagens desse equipamento tem-se: alta sensibilidade (limite de detecção de fentomoles), média a alta tolerância a sais, reduzido nível de ruído, pouca fragmentação, formação de íons monoprotônados ( $M-H^+$ ), além de ser de fácil operação e exigir mínima experiência de uso (HARVEY,1996; WU, 1998).



Mann *et al.*, 2001

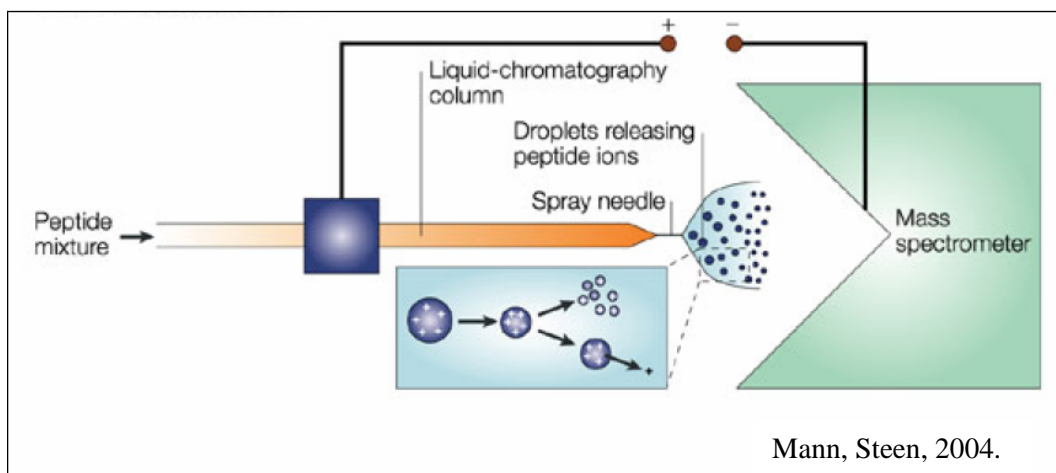
**Figura 3. Esquema ilustrativo de um espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF e seu funcionamento.** (A) A amostra cristalizada com a matriz é irradiada com um feixe de laser, levando a sublimação e ionização dos peptídeos. (B) Cerca de 100-500 ns depois do pulso do laser, um forte campo de aceleração é ligado (*delayed extraction*), na qual confere uma energia cinética fixa aos íons produzidos pelo processo de MALDI. Esses íons viajam em um tubo de vôo e são virados em um espelho de íons, ou *reflector*, para corrigir a diferença de energia inicial. A razão massa/carga está relacionada com o tempo que o íon leva para alcançar o detector. Os íons mais leves apresentam altas velocidades e são detectados primeiro.

### 2.8.2 ESI “*Electrospray Ionization*”

O método de ionização por *electrospray* foi desenvolvido por John Fenn e colaboradores em 1989. Esta técnica apresenta um processo de ionização muito suave (não fragmenta o íon molecular), que produz moléculas ionizadas na fase gasosa a partir de uma solução líquida. O seu processo é feito por meio de um fino *spray* (cone de Taylor) composto de gotas altamente carregadas na presença de um forte campo elétrico. Após a ionização, originam-se íons contendo um ( $M-H^+$ ) ou mais  $[(M-nH)^{n+}]$  prótons. Os íons são transferidos com alta eficiência, por meio da atração eletrostática, para dentro do equipamento, onde há um alto vácuo. São acelerados através de um campo elétrico para o analisador de massa do MS e separados de acordo com a sua razão massa/carga. (MANN et al., 2001). A fonte de ESI é comumente acoplada aos analisadores de massas do tipo *Ion traps* e quadrupolo (AEBERSOLD & MANN, 2003).

Uma ampla faixa de compostos pode ser analisada por ESI, desde que apresentem polaridade suficiente para permitir a deposição de cargas. Como exemplo tem-se: proteínas, oligonucleotídeos, açúcares e lipídeos polares (MANN et al., 2001). A ionização por *electrospray* tem como característica formar moléculas com múltiplas cargas e, por isso, moléculas com peso molecular muito alto são observadas com valores baixos de  $m/z$ . Essa característica permite aumentar a faixa de massa que pode ser analisada por este equipamento (VAN BRAMER, 1997).

O ESI apresenta baixa tolerância a tampões, sais e detergentes. Estas substâncias, quando presentes, devem estar em baixa concentração na amostra. Estes compostos interferem na análise causando supressão dos íons formados ou uma determinação dúbia das massas quando combinados com o analito. Entretanto, o ESI apresenta a vantagem de acoplamento com técnicas de separação e purificação como cromatografia líquida (LC) e a eletroforese capilar (YATES, 1998; ASCHCROFT, 2002).



**Figura 4. Esquema de ionização realizada por ESI.** Uma solução da amostra em pH ácido ou básico (ou “neutra” de um sal) é submetida a um *spray* eletrolítico sob pressão atmosférica. Um fino *spray* (aerosol) se forma (cone de Taylor) na presença de um alto campo elétrico de + 4000V (ou - 4000V). O contra íon é oxidado (ou reduzido) e formam-se gotas com excesso de carga positiva (ou negativa). O solvente evapora e o volume da gota é reduzido, resultando na subdivisão das gotas. Eventualmente, devido à alta repulsão entre os íons de mesma carga, podem-se formar gotas contendo apenas um íon ou ocorrer a evaporação das gotas para a fase gasosa (os íons são “ejetados”). Finalmente, os íons formados são atraídos eletrostaticamente para dentro do analisador de massas.



### 3. JUSTIFICATIVA

Os mecanismos celulares e moleculares da resposta da planta ao patógeno compõem uma área da pesquisa ainda com muitas questões em aberto. Neste sentido, foi realizada a análise da alteração do proteoma das plantas tangerina Poncan (*Citrus reticulata*) e laranja Pêra (*Citrus sinensis*) induzida pela *X. fastidiosa* comparada com os mapas 2DE obtidos das respectivas plantas saudáveis. Vale lembrar que a tangerina Poncan é tolerante a esta bactéria enquanto a laranja Pêra é classificada como suscetível. O estudo destas duas espécies, que apresentam comportamentos tão distintos em resposta a este patógeno, poderá gerar importantes informações para a compreensão da maneira como interagem com o patógeno, de como respondem à sua colonização e, possivelmente, dos mecanismos pelos quais as suas vias de sinalização são reguladas.

#### 4. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de mapas proteômicos de folhas de laranja Pêra e de tangerina Poncan infectadas com *X. fastidiosa* e compará-los àqueles obtidos de folhas não infectadas, buscando identificar a presença de proteínas que seriam diferencialmente expressas nestas duas variedades de citros. Para que estes objetivos fossem alcançados procurou-se:

- Estabelecer um protocolo eficiente de extração de proteínas totais do tecido foliar de laranja Pêra e de tangerina Ponca
- Otimizar a metodologia de 2DE para a separação das proteínas totais das folhas
- Comparar o perfil 2DE de proteínas totais de folhas destas duas espécies após infecção com *X. fastidiosa*
- Identificar os *spots* referentes às proteínas diferencialmente expressas na comparação entre os mapas proteômicos obtidos das plantas sadias dos obtidos das plantas infectadas, utilizando programa estatístico adequado
- Identificar estas proteínas diferencialmente expressas empregando técnicas de espectrometria de massas

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Preparo de mudas e infecção com *X. fastidiosa*

As plantas de *Citrus sinensis* (laranja Pêra) e de *Citrus reticulata* (tangerina Poncan) foram mantidas em casa de vegetação e fazem parte do lote básico de matrizes do Centro APTA Citros Sylvio Moreira do IAC, em Cordeirópolis. As plantas utilizadas neste experimento estavam com cinco meses de idade. Folhas de plantas saudáveis (controle negativo) e folhas de plantas após 30 dias de inoculação foram retiradas, sendo imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, transportadas em gelo seco e mantidas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Laranja Pêra e a tangerina Poncan apresentam respostas diferentes à infecção pela *X. fastidiosa*. Com 30 dias de inoculação, consegue-se obter a amplificação e isolamento positivo desta bactéria em ambas as plantas. Após este período a população bacteriana começa a se desenvolver rapidamente na laranja Pêra e na tangerina Poncan o crescimento bacteriano é iniciado, mas a bactéria falha em colonizá-la, resultando na diminuição da sua população possivelmente devido à morte da bactéria no interior do vaso. Transcorrido 60 dias da inoculação, mesmo conseguindo obter um PCR positivo da bactéria na tangerina Poncan não se consegue mais recuperá-la desta planta (SOUZA et al., 2009).

### 5.2 Preparo do inóculo

Os inóculos bacterianos foram obtidos de colônias isoladas 9a5c de *X. fastidiosa* (SIMPSON et al., 2000) extraídos de plantas de laranja doce mantidas em casa-de-vegetação com sintomas da CVC. A bactéria foi isolada e inoculada em meio PW (DAVIS et al., 2001). As colônias de bactérias da primeira subcultura foram colocadas em suspensão e lavadas duas vezes em tampão fosfato (PBS) estéril para remover resíduos do meio de cultura. Doze plantas de laranja Pêra e doze de tangerina Poncan foram inoculadas depositando uma gota de 10  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana ( $1 \times 10^9 \text{CFU mL}^{-1}$ ) em seis pontos diferentes, ao longo da planta, na região entre o caule e a folha das mesmas, sendo que o tecido foi infiltrado cinco vezes com um pino entomológico para inoculação da gota. Os

pontos de inoculação foram marcados e usados como pontos de referência para as amostras de folhas. Os controles negativos da tangerina Poncan (quatro plantas) e da laranja Pêra (quatro plantas) foram inoculados com apenas a solução de tampão fosfato (PBS). A inoculação foi realizada de manhã e as plantas foram mantidas na posição horizontal até o dia seguinte.

### 5.3 Confirmação de infecção por *X. fastidiosa*

Folhas com 30 dias de inoculação com a *X. fastidiosa* foram usadas como amostra para os testes de PCR. O DNA total foi extraído dos pecíolos e nervura central das folhas usando o método de CTAB adaptado de Murray e Thompson (1980). Sucintamente, 250 mg de tecidos foram macerados com nitrogênio líquido e transferidos para um tubo de 1,5 mL contendo 600 µL do tampão de extração [5% CTAB (v/v), 5M NaCl, 1M Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M EDTA e 140 mM β-mercapto-etanol]. As amostras foram incubadas a 60 °C por 30 minutos, seguida da extração com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado usando 800 µL de 100% etanol e centrifugado por 10 minutos a 12000 x g para a obtenção do sedimento. As amostras de DNA foram solubilizadas com 50 µL de TE 1/10 (1mM Tris-HCl pH8.0 e 0.1 mM EDTA) contendo 10 µg/µL de RNase e foram usadas nas análises de PCR. As amplificações de PCR foram realizadas com um volume de 25 µL, no qual continha 0.1 (v/v) de tampão 10X, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM de cada dNTPs (Invitrogen Copr., San Diego, USA), 20 ng dos *primers* CVC-1 e 272-2 int, 20 ng de DNA total e 1.5 unidades de Taq DNA plimerase (Invitrogen Corp., San Diego, USA). Um PTC 100 *thermocycler* (MJ Research INC, Massachusetts, USA) foi programado começando com o passo inicial de desnaturação a 94 °C por 3 minutos seguida de 36 ciclos de: desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 60 °C por 45 segundos, alongamento a 72 °C por 45 segundos e extensão final com incubação de 5 minutos a 72 °C. Alíquotas de 10 µL da reação de amplificação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,0%. Os géis foram corados com brometo de etídio e examinados em luz ultravioleta.

#### 5.4 Extração de proteínas totais de folha

Baseado no protocolo proposto por Maserti et al., (2006), três folhas jovens de laranja Pêra com área foliar entre 29,08 cm<sup>2</sup> e 41,35 cm<sup>2</sup> e/ou de tangerina Poncan com área foliar entre 25,09 cm<sup>2</sup> e 31,48 cm<sup>2</sup> (a medição da área foliar foi feita através do *software* UTHSCSA *ImageTools* v. 3.0 para Windows, University of Texas Health Science, Center in San Antonio), foram maceradas com nitrogênio líquido em um almofariz até obtenção de um pó. A amostra em pó (1g) foi homogeneizada com 2,5 mL da solução tampão de lise [7M Uréia, 2M Tiuréia, 20mM Tris-HCl pH 8.8, 2% CHAPS (p/v), 2% C7BzO (p/v), 5mM TCEP, 10mM EDTA, 2mM PMSF, 10% Glicerol (v/v) e 40mg/g PVPP] por 5 minutos e posterior agitação por 1 hora à temperatura ambiente, para a solubilização da amostra.

A amostra homogeneizada foi centrifugada a 16000 x g por 30 minutos a 20 °C em centrífuga refrigerada (Hitachi - himac CR22G. Hitachinaka, Japan). O sobrenadante foi coletado e misturado com seis vezes o seu volume com solução 10% de ácido tricloroacético (TCA) em acetona absoluta gelada e mantida a -20 °C *overnight* (para permitir a precipitação das proteínas obtidas). O precipitado de proteínas foi obtido através da centrifugação a 16000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento foi lavado uma vez com 12 mL da solução 0,1M acetato de amônio em 80% metanol gelado e centrifugado a 16000 x g por 10 minutos a 4 °C, seguida de outra lavagem com 12 mL da solução 80% acetona gelada e novamente centrifugado a 16000 x g por 10 minutos a 4 °C. Depois o sedimento foi deixado para secar à temperatura ambiente e foi homogeneizado em 500 µL da solução de reidratação [7M Uréia, 2M Tiuréia, 3% CHAPS (p/v), 1% C7BzO (p/v) e 5mM TBP] sob agitação constante por 1 hora. As proteínas foram alquiladas com 0,048M de Iodoacetamida (IAA) por 2 horas no escuro seguido de centrifugação a 16000 x g (centrífuga 5417 R. Eppendorf AG. Hamburg, Germany) por 5 minutos a 20 °C para remoção do material insolúvel. A amostra foi armazenada a -80 °C.

#### 5.5 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada segundo a técnica descrita por Bradford (1979), utilizando como padrão a albumina de soro bovino (BSA). O tampão de reidratação diluído na razão 1:20 foi utilizado como branco e nas diluições do BSA.

## 5.6 Eletroforese bidimensional

A técnica de eletroforese 2-DE foi utilizada para a separação de proteínas das folhas de plantas saudáveis e infectadas por *X. fastidiosa*.

### 5.6.1 Focalização isoeétrica ou isoeletrofocalização (primeira dimensão)

A focalização isoeétrica (IEF) das proteínas foi realizada em tiras desidratadas de poliacrilamida de 18 cm com gradiente imobilizado de pH (IPG, “immobilized pH gradient”) na faixa de 3-10 não linear (Amersham Biosciences (GE Healthcare) Chalfont St. Giles, United Kingdom), Chalfont St. Giles, United Kingdom) utilizando equipamento IPGphor (Amersham Biosciences (GE Healthcare)).

As amostras contendo 500 µg de proteínas foram solubilizadas no tampão SB1D tiuréia [7M uréia, 2M tiuréia, 4% CHAPS (p/v), 70mM DTT, 2% anfólitos (v/v), 0,001% (p/v) azul de bromo fenol] completando o volume final para 350 µL. As amostras foram homogêneas em vórtex por 1 minuto e centrifugadas em temperatura ambiente a 10000 x g por 2 minutos e o sobrenadante utilizado na IEF.

Os parâmetros elétricos usados para as corridas foram: 13 horas de reidratação a 50 V, 200 V durante 1 hora, 500 V durante 1 hora, 1000 V durante 1 hora e 8000 V até acumularem-se 85kVh totais de corrida, sob refrigeração constante de 20 °C e amperagem máxima de 50 µA por tiras. Após a IEF as tiras foram imediatamente equilibradas ou armazenadas a -80 °C para posterior utilização.

### 5.6.2 Equilíbrio das tiras IPG

Após a isoeletrofocalização as tiras foram incubadas em 2 mL de tampão SDS – DTT [6M uréia, 10% SDS (p/v), 28% glicerol (v/v), 50mM Tris-HCl pH 8.8, 0,25% DTT (p/v)] por 12 minutos e no tampão SDS-IAA [6M uréia, 10% SDS (p/v), 30% glicerol (v/v), 50mM Tris-HCl pH 8.8, 0,625% iodoacetamida (p/v)] por 12 minutos. Após este período, foram adicionados 200 µL de tampão 1M Tris-HCl pH 6.8 em cada *strip*, que permaneceram 2 minutos adicionais sob esta condição e imediatamente submetidas à

segunda dimensão: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).

### **5.6.3 SDS-PAGE (segunda dimensão)**

A eletroforese das proteínas em géis SDS-PAGE unidimensional foi realizada utilizando a cuba Hoefer SE-600 (Holliston, MA, Estados Unidos) conforme a metodologia descrita por Laemmli (1970).

Os géis de poliacrilamida foram preparados em placas de 14 cm x 16 cm x 1.5 mm na concentração de 12.5% [12.5% solução acrilamida (30% acrilamida: 0.8% bis-acrilamida (m/m), 0.04% PSA (p/v), 0.05% TEMED (v/v), 0.37M Tris-HCl pH 8.8]. As tiras de IPG providas da corrida de primeira dimensão e após serem incubadas, foram aplicadas sobre os géis previamente preparados e cobertos com agarose 0.1% aquecida a 70 °C. Após solidificação da agarose, a corrida eletroforética ocorreu no sistema SE-600 com tampão de corrida [14.42% glicina (p/v), 1% SDS (p/v), 3% Tris (p/v)]. A corrida se processou a 20 °C, com refrigeração interna. Ao final da corrida, os géis foram lavados por 5 minutos em água deionizada para a retirada do SDS e corados com a solução corante Coomassie Blue G-250 ou com nitrato de prata descrito em Smolka (2002) para a visualização dos *spots*.

### **5.7 Detecção de proteínas e digitalização de imagem**

Os géis SDS-PAGE, após serem lavados por 5 minutos em água deionizada, foram colocados diretamente em solução fixadora contendo 30% etanol e 2% ácido fosfórico por no mínimo 5 horas ou *overnight*. A etapa seguinte consistiu de três lavagens com água deionizada por 20 minutos cada. Posterior a isto, os géis receberam a solução corante (coloidal Coomassie Blue G-250) contendo 0,12% Coomassie Blue G-250 (p/v), 10% sulfato de amônio (p/v), 10% ácido fosfórico (v/v) e 20% metanol (v/v), sob agitação constante e à temperatura ambiente. Os géis ficaram nesta solução por no mínimo três dias (CANDIANO et al., 2004).

A descoloração dos géis foi realizada através de trocas sucessivas de água destilada, sob agitação constante, até que os *spots* se tornassem visivelmente nítidos. Após a coloração, as imagens dos géis foram digitalizadas com resolução 300 dpi (em tons de cinza) com equipamento específico para a aquisição de imagem por transmitância, o SharpScanner JX-330 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). As imagens dos géis foram armazenadas no computador em forma de arquivos TIFF (8 bits) para posterior análise.

## **5.8 Análise computacional dos géis**

As imagens dos géis bidimensionais foram analisadas com o Programa Imagemaster™ Platinum v. 6.0 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, United Kingdom). Neste programa, três géis 2DE de cada condição experimental foram analisados e os seus *spots* automaticamente detectados. Os valores obtidos das densidades ópticas foram normalizados e os *spots* comparados. Os dados obtidos nesta comparação foram usados para a análise estatística comparativa entre os dois grupos (infectado e sadio) de géis (Teste-T) e nas análises quantitativas, permitindo o reconhecimento dos *spots* diferencialmente expressos.

## **5.9 Espectrometria de massas**

### ***5.9.1 Preparo da amostra***

As proteínas (*spots*) detectadas nos géis bidimensionais e que apresentaram diferença significativa na análise estatística foram extraídos do gel manualmente, através de “recorte” usando bisturi, colocadas em tubos eppendorf e armazenadas a 4 °C em solução 1% (v/v) ácido acético.

### ***5.9.2 Digestão das proteínas***

A digestão das proteínas contidas no gel foi feita de acordo com o protocolo modificado de Parker et al. (1998), conforme descrito abaixo:



**Remoção do corante:** Os segmentos dos géis que continham as proteínas diferencialmente expressas foram lavados em água deionizada, descorados por três vezes em solução contendo 50% (v/v) de acetonitrila (ACN) e 25mM de bicarbonato de amônio (AMBIC) por 30 minutos e desidratados duas vezes em 100% ACN por 10 minutos. A acetonitrila foi removida e o resíduo remanescente foi eliminado à temperatura ambiente.

**Redução e alquilação:** Os fragmentos dos géis que continham as proteínas de interesse foram reidratados e reduzidos utilizando solução de DTT (20mM DTT / 50mM AMBIC) a 60 °C por 40 minutos e alquilados com iodoacetamida (55mM IAA / 50mM AMBIC) no escuro por 30 minutos. A solução de iodoacetamida foi removida e os fragmentos foram lavados em AMBIC 25mM e posteriormente desidratados em 100% acetonitrila. A acetonitrila foi descartada e os resíduos remanescentes nos géis foram deixados evaporar à temperatura ambiente.

**Digestão das proteínas:** Os fragmentos do gel contendo as proteínas de interesse foram então reidratados com 15 µL de solução contendo 150 ng de tripsina em 50mM de bicarbonato de amônio e mantidas a 37 °C por 12 horas. A ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 µL de solução bloqueadora [50 % (v/v) acetonitrila e 5% (v/v) ácido fórmico].

**Extração dos peptídeos:** Os peptídeos foram eluídos da acrilamida através de duas lavagens de 15 minutos cada com a solução de eluição [60% (v/v) metanol e 1% (v/v) ácido fórmico] a 45 °C sob sonicação, e com mais duas lavagens de 15 minutos cada com solução acetonitrila 100% a 45 °C sob sonicação. O aparelho de sonicação usado foi o ULTRASOM (Thornton – INPEC Eletrônica LTDA) modelo G/T, tipo T7, com 40 KHz de frequência fixa e potência de 30 W. A solução contendo os peptídeos extraídos foi submetida à secagem em um concentrador à temperatura ambiente, por um período que variou entre 2 e 3 horas, ou até que cada uma delas alcançasse o volume de 5 µL. Os peptídeos foram ressuspensos com 13 µL da solução de ácido fórmico 1% (v/v) e seqüenciados por espectrometria de massas.

Os peptídeos submetidos ao MALDI-QUAD-TOF foram previamente purificados em colunas Zip Tip C18 (Millipore). A quantidade de 2  $\mu\text{L}$  dos peptídeos eluídos foi depositada na placa de amostras junto com 2  $\mu\text{L}$  da solução matriz (2% ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, 60% acetonitrila e 0.1% TFA)

### 5.9.3 Seqüenciamento das proteínas

As proteínas foram seqüenciadas em espectrômetro de massas Q-TOF – Ultima API (ESI-MS/MS – *quadrupole/aceleração orthogonal time-of-flight*) da Water- Micromass (Milford, MA, United States) acoplado a um sistema *on-line* de HPLC capilar, CapIC (Waters®, Milford, MA, United States) em colaboração com o Prof. Dr. Carlos Alberto Labate do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas- ESALQ-USP. Foram também realizadas identificações das proteínas utilizando-se um espectrômetro de massas do mesmo tipo, mas MALDI como fonte de ionização em colaboração com o Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin do laboratório Thomson do Instituto de Química – UNICAMP.

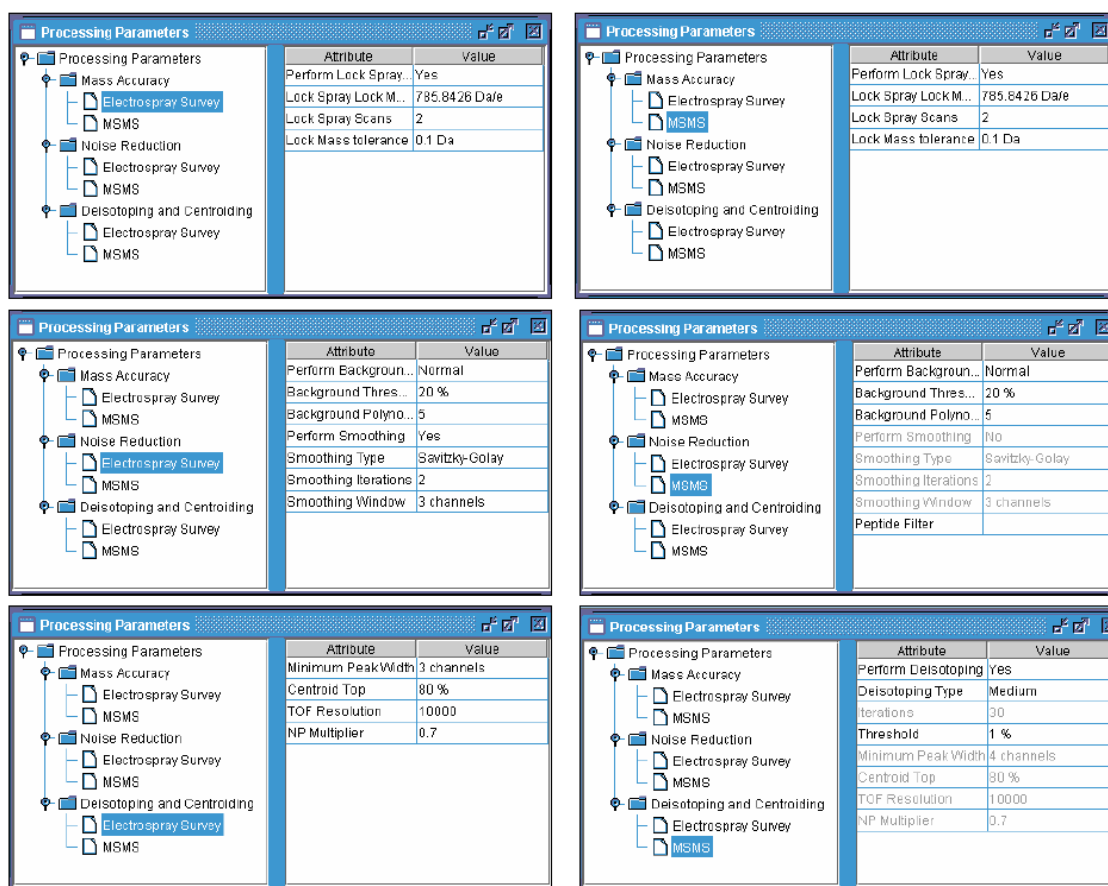
A separação dos peptídeos pelo ESI-Q-TOF foi realizada utilizando-se uma pré-coluna C18 (Sentry™ Guard Column C18 Waters®, Milford, MA, United States) seguida por uma coluna de fase reversa C18 (Symmetry® C18 5  $\mu\text{m}$  0,32 x 150 mm Waters®®, Milford, MA, United States). Os peptídeos foram eluídos através da variação do gradiente do tampão A [95% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}$ , 5% (v/v) acetonitrila e 0,1% (v/v) ácido fórmico] e do tampão B [95% (v/v) acetonitrila, 5% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}$  e 0,1% (v/v) ácido fórmico]. Durante a corrida, foi empregado o fluxo de 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  nos primeiros 15 minutos, 2  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  entre 15 minutos e 40 minutos e de 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  entre 40 minutos e 45 minutos. A variação de gradiente do tampão B foi de 10% (v/v) a 15% (v/v) em 5 minutos, de 15% (v/v) a 35% (v/v) em 20 minutos, de 35% (v/v) a 45% (v/v) em 5 minutos, 45% (v/v) a 80% (v/v) em 5 minutos, mantido por 5 minutos em 80% (v/v) e os últimos 5 minutos em 10% (v/v).

A ionização das moléculas por *electrospray* foi realizada com uma voltagem fixa de 3000 V, temperatura de 90 °C e 5 psi de nitrogênio. Os espectros foram adquiridos em modo MS/MS automaticamente com um limiar de 25 *counts*, dentro de uma amplitude de 50 a 2000 *m/z*. As aquisições foram realizadas simultaneamente com o peptídeo padrão

GFP através do sistema Nanolock Spray da Micromass, para corrigir as variações de calibração que ocorrem ao longo do tempo.

#### 5.9.4 Análise das informações

Os espectros de massas das amostras foram analisados e processados, conforme os parâmetros demonstrados na Figura 5, utilizando os programas MassLynx NT BioLynx V. 4.0 e ProteinLynx V. 2.1 (Waters-Micromass, Milford, MA, United States) e submetidos então à sua identificação.



**Figura 5. Parâmetros de processamento usados pelo programa ProteinLynx V 2.1 na interpretação dos espectros de massa.**

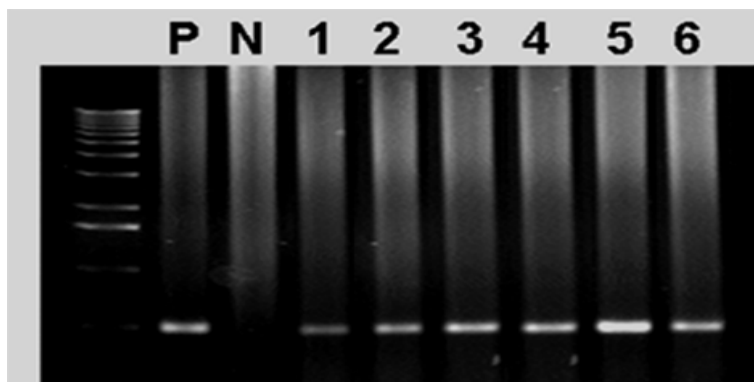
### ***5.9.5 Identificação das proteínas***

O programa MASCOT (<http://www.matrix-science.com/>) foi utilizado para a identificação das proteínas. Os parâmetros de busca utilizados no *MS/MS ion search* foram: enzima tripsina, um sítio de clivagem perdido, tolerância de 50 ppm para peptídeo, tolerância de 0.5 Da para MS/MS, carga do peptídeo de 1+ 2+ e 3+ para ESI e carga 1+ para MALDI, modificação fixa da carbamidometilação de cisteína e oxidação da metionina como modificação variável. O formato dos dados estava em Micromass (.PKL) e o equipamento utilizado foi o ESI-QUAD-TOF ou MALDI-QUAD-TOF.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Confirmação de infecção por *X. fastidiosa* nas variedades de citros

A confirmação da presença da *X. fastidiosa* nas folhas de laranja Pêra e de tangerina Poncan inoculadas com a bactéria foi feita através de análise por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos, originários de uma sequência intergênica da *X. fastidiosa* conforme descrito por Pooler & Hartung (1995). As amostras de DNA das plantas que indicaram resultados positivos para a análise por PCR apresentaram produto da amplificação e tiveram suas folhas usadas para a extração das proteínas totais. Dentre as vinte e quatro plantas que receberam o inóculo bacteriano (doze plantas de laranja Pêra e doze plantas de tangerina Poncan), apenas seis plantas (três da laranja Pêra e três da tangerina ponca) apresentaram PCR positivo para a *X. fastidiosa* (Figura 6).



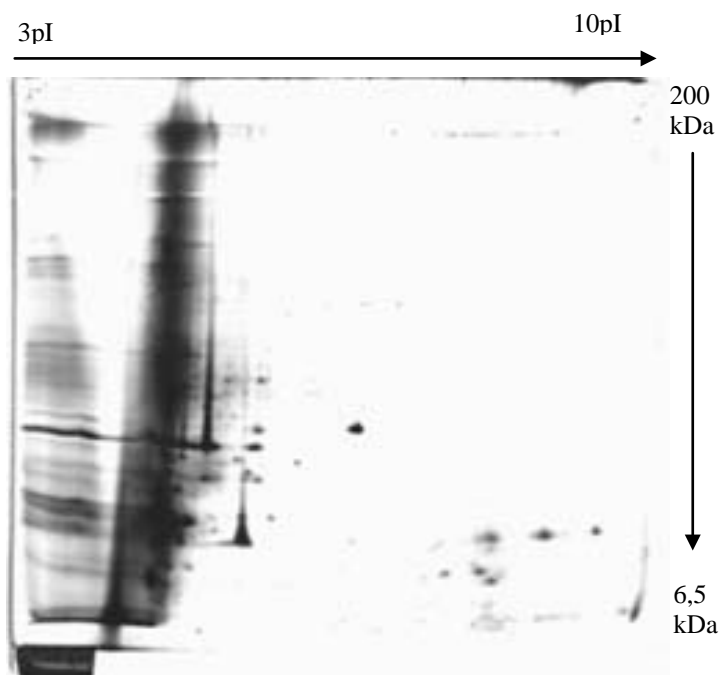
**Figura 6. Eletroforese em gel de agarose (1,0 %) empregada na visualização dos produtos da reação do PCR.** Produtos da amplificação do fragmento DNA da bactéria em nervura central de folhas de laranja Pêra e tangerina Poncan para confirmação da presença da *X. fastidiosa*. **P: controle positivo** (DNA da *X. fastidiosa* 9a5c). **N: controle negativo**. **1, 2 e 3** representam as plantas laranja Pêra com PCR positivo (LDx6, LDx5 e LDx4). **4, 5 e 6** representam as plantas tangerina Poncan com PCR positivo (POx7, POx8 e POx9).

## 6.2 Otimização do protocolo de extração de proteínas totais das folhas

Para se analisar a imagem dos géis e selecionar os *spots* diferencialmente expressos é imprescindível que os mesmos apresentem boa resolução e reprodutibilidade. Para isso, foi iniciada a padronização do protocolo de extração visando reduzir os possíveis interferentes ou contaminantes das amostras, bem como a otimização das condições da eletroforese bidimensional para as proteínas de folha de citros.

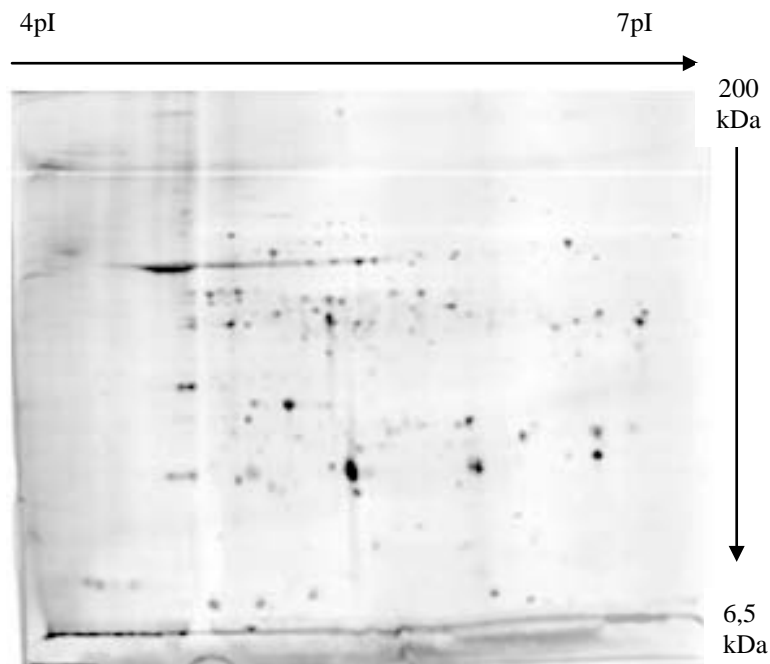
Tendo em vista os objetivos desse trabalho iniciou-se a padronização do protocolo de extração de proteínas. Antes da definição do protocolo de extração descrito no item 5.4 foi preciso fazer algumas tentativas e melhorias para alcançá-lo. Inicialmente, tentou-se utilizar o tampão de homogeneização formado por Tris-HCl (100mM), EDTA (1mM), DTT (5mM), PMSF (0,862mM) e PVPP (50mM/mL) para a extração das proteínas de citros. O resultado desta extração não foi satisfatório, pois o extrato obtido não foi sequer passível de ser focalizado (isoeletrofocalização), apresentando dificuldade em alcançar altas voltagens no aparelho IPGphor. Possivelmente isto foi devido à presença de sais e de outros interferentes na amostra.

Após esta tentativa optou-se por adotar o protocolo de Maserti et al. (2006) adaptado. No primeiro ensaio foi utilizado para a extração de proteínas 0,5 g do pó de folha de citros para 2,5 mL de tampão de lise que inicialmente era composto por outro agente redutor DTT (5mM) e por apenas um detergente - CHAPS (2%). Para as etapas de lavagens do sedimento foram utilizados 2 mL de acetona gelada e para a sua solubilização foi utilizado inicialmente no tampão de reidratação um detergente, CHAPS (1%), e como agente redutor o DTT (5mM). Na focalização isoelétrica os parâmetros elétricos foram: 50 V por 12 horas (etapa de reidratação), 300 V por 2 horas, 1000 V por 2 horas e 8000 V até ser alcançado o número de volts hora totais (VhT) desejado. O primeiro gel obtido está representado na Figura 7. O gel 2DE resultante apresentou poucos *spots*, baixa resolução e riscos horizontais e verticais.



**Figura 7. Perfil bidimensional de proteínas extraídas com CHAPS e DTT no tampão de lise.** Primeira tentativa de extração utilizando o protocolo adaptado de Maserti et al. (2006). As proteínas foram separadas em um gradiente de pH não linear de 3-10. Foram aplicados 93,60 $\mu$ g de proteínas e acumulou-se uma voltagem de 30000 Vh totais. O gel foi corado com nitrato de prata. A presença de contaminantes na amostra prejudicou a quantidade e a resolução dos *spots*, sendo também responsáveis pela presença de manchas e traços verticais e horizontais no gel.

Como o resultado não foi satisfatório, optou-se por encontrar formas de melhorar a extração das proteínas, acrescentando-se no tampão de extração mais um detergente, ASB-14 (2%), e substituindo o DTT pelo agente redutor TBP (5mM). Ainda, no novo gel utilizou-se *strip* com gradiente de pH imobilizado linear de 4-7 para uma possível melhora na separação e resolução das proteínas, mantendo-se os mesmos parâmetros na focalização isoeletrica. A Figura 8 mostra o mapa obtido desta extração.



**Figura 8. Perfil bidimensional da extração de proteínas utilizando a combinação de CHAPS com ASB-14 e TBP no tampão de lise.** Foram aplicados 180 $\mu$ g de proteínas e o gel foi corado com nitrato de prata.

Nesta imagem pode-se notar um aprimoramento no processo de extração, porém a quantidade de proteínas ainda permanecia baixa. Com o intuito de se elevar o número de proteínas extraídas, aumentou-se a quantidade de material utilizado, passando de 0,5 g para 1 g de pó de folhas a cada 2,5 mL de solução do tampão de lise. Para aumentar a solubilização das proteínas no tampão de lise fez-se o uso, em primeira instância, do CHAPS (2%) associado ao ASB-14 (2%) que mostrou ser bastante eficiente na solubilização de uma maior quantidade de proteínas e na resolução da parte básica do gel, visto que o uso combinado de dois detergentes ajuda na solubilização das proteínas hidrofílicas e hidrofóbicas (GALVANI et al., 2001; MARTINS et al., 2007) e posteriormente, do CHAPS (2%) com C7BzO (2%). Esta última combinação apresentou uma melhor atividade na solubilização das proteínas no tampão de lise e uma melhora na resolução do gel, além de ser mais eficiente na solubilização e resolução das proteínas de membrana (LUCHE et al., 2003).



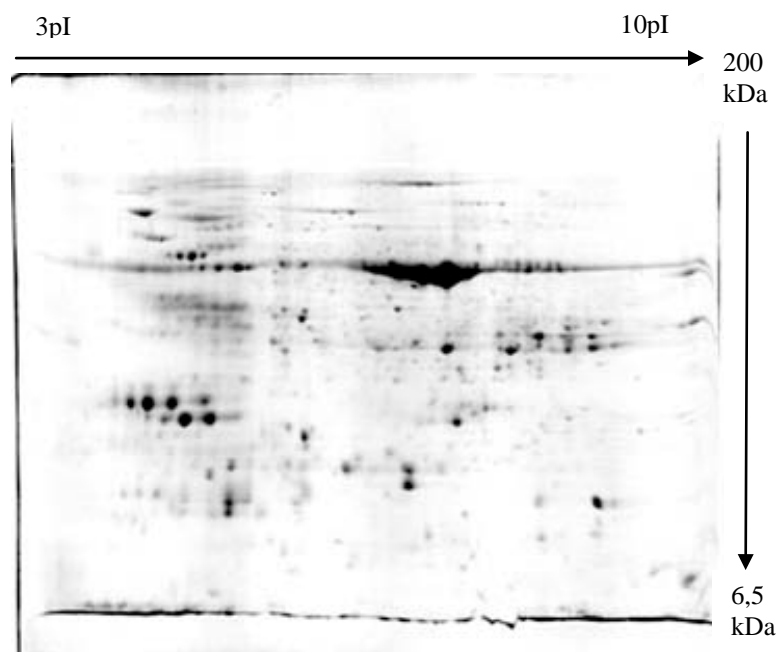
Além disso, alterou-se novamente o agente redutor no tampão de lise, passando a ser utilizado o TCEP (5mM). Com o aumento do material utilizado para a extração de proteínas foi necessário aumentar as concentrações de EDTA (10mM) e do PMSF (2mM) que anteriormente eram de 5mM e 1mM respectivamente, na tentativa de se evitar perdas de proteínas devido à ação de proteases. A solução de reidratação também foi alterada, substituindo o DTT pelo TBP (5mM). Tanto o TCEP quanto o TBP aumentam a solubilização das proteínas durante a IEF e permitem o sucesso de suas transferências para a segunda dimensão (MECHIN et al., 2003). Também foi aumentada a concentração do CHAPS (3%) e passamos a utilizar mais um detergente C7BzO (1%) (Figura 9).

Ademais, foi necessário modificar as etapas de lavagens do sedimento a fim de eliminar os possíveis contaminantes presentes na amostra. Antes era empregado duas lavagens com 2 mL de acetona absoluta gelada. Após isto, utilizou-se uma lavagem com 12 mL da solução acetato de amônio (0,1M) em metanol (80%) seguido por outra lavagem com 12 mL da solução (70%) etanol gelado, obtendo-se um *pellet* de cor amarelada o que poderia indicar a co-precipitação de compostos fenólicos. Devido a isto, empregou-se na segunda lavagem 12 mL da solução (80%) acetona gelada, vindo a obter um *pellet* bem claro. A vantagem de se usar o metanol associado ao acetato de amônio é a neutralização do TCA residual e o aumento da solubilização do *pellet* (WANG et al., 2006).

Os parâmetros elétricos empregados na focalização isoeletrica (IEF) também passaram por ajustes, visto que as condições de separação das proteínas devem ser adequadas de acordo com a natureza e composição de cada amostra. Na definição destes parâmetros teve-se também a preocupação de se estabelecer aqueles que possibilitassem adquirir a máxima resolução possível de todas as proteínas presentes no gel. O número de volts-hora acumulado na IEF afeta de maneira bastante evidente os resultados do experimento. Na IEF é preferível usar múltiplo “*time point*” para aperfeiçoar a separação das proteínas. Neste experimento iniciou-se com os parâmetros anteriormente comentados, passando a utilizar a seguinte condição: 50 V por 13 horas (reidratação) a 20 °C, 200 V por 1 hora, 500 V por 1 hora, 1000 V por 1 hora e 8000 V até atingir 85000 Vh totais, mostrando ser bastante eficiente.

Todas estas alterações foram realizadas com o intuito de se aprimorar a resolução final dos perfis bidimensionais da amostra estudada, estabelecendo-se assim o protocolo de

extração de proteínas de folhas de citros e a padronização da isoeletrofocalização. A imagem do gel na Figura 9 mostra o perfil bidimensional obtido. Como pode ser observado, o mapa 2DE resultante apresenta uma quantidade considerável de *spots*, poucos interferentes e uma boa resolução.

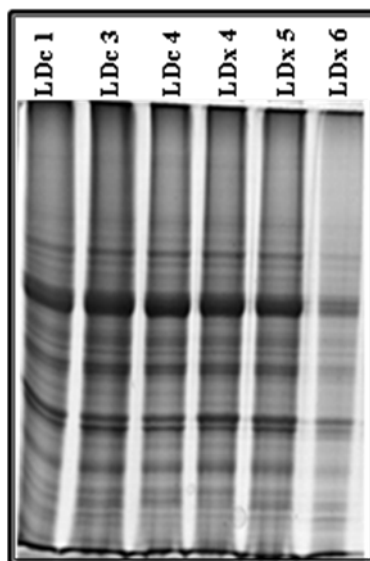


**Figura 9. Distribuição das proteínas extraídas com o protocolo adaptado de Maserti et al. (2006) estabelecido.** Foram aplicados 500  $\mu\text{g}$  de proteínas e o gel foi corado com Comassie Coloidal G-250.

### **6.3 Análise comparativa de proteínas encontradas em laranja Pêra e de tangerina Poncan inoculadas com *X. fastidiosa***

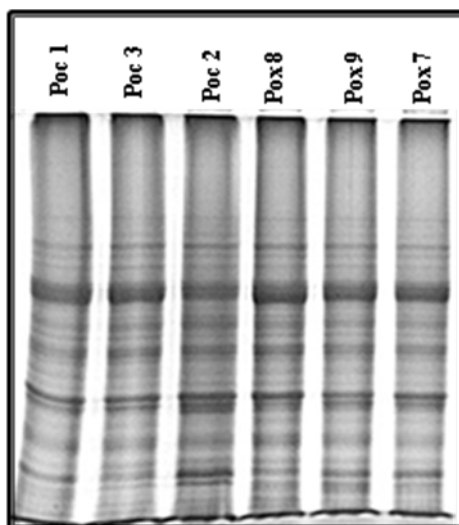
Anteriormente à realização dos géis bidimensionais, preparou-se um mini-gel para a laranja Pêra e um para a tangerina Poncan (SDS-PAGE) para que as suas imagens fossem analisadas pelo programa *Scion Image* a fim de se certificar que cada amostra continha a mesma quantidade de proteína empregada nos demais géis. A verificação da dosagem assegura que seja realmente aplicado no gel 2DE um volume correspondente a 500  $\mu\text{g}$  de proteínas. Pode-se ver claramente na Figura 10 (referente às amostras de laranja Pêra) que, mesmo tendo aplicado o volume referente à 40  $\mu\text{g}$  de proteínas em cada amostra, após a

dosagem por Bradford as “lanes” apresentaram intensidades de bandas distintas, indicando a presença de concentrações diferentes de proteínas.



**Figura 10. Mini-gel SDS-PAGE das proteínas da laranja Pêra.** Amostras: LDe1, LDe3, LDe4, LDx4, LDx5 e LDx6. **LDe** = Laranja Pêra controle (planta sadia); **LDx** = Laranja Pêra infectada com *X. fastidiosa*.

Após a verificação dos extratos protéicos da tangerina Poncan, pode-se observar na Figura 11 que também houve uma pequena variação nas intensidades de bandas de cada amostra. As respectivas concentrações de proteínas extraídas de laranja Pêra e de tangerina Poncan foram então corrigidas tendo por base os valores das densidades óticas fornecidos pelo programa *Scion Image* (resultado não demonstrado).



**Figura 11. Mini-gel SDS-PAGE das proteínas da tangerina Poncan.** Amostras: POc1, POc3, POc2, POx8, POx9 e POx7. **POc** = tangerina Poncan controle (planta sadia). **POx** = tangerina Poncan com *X. fastidiosa*.

Com esta mesma imagem pode-se observar que o método de extração adotado apresentou boa reprodutibilidade pelo fato das amostras (tanto na laranja Pêra quanto na tangerina Poncan) não apresentarem divergências no perfil de proteínas mostrado na corrida. Diferenças na intensidade ocorrem devido ao fato da dosagem da concentração de proteínas não estar correta, demonstrando que os reagentes utilizados no tampão de reidratação, mesmo estando em baixas concentrações devido à diluição, ainda interferem com o método de dosagem.

Os ensaios foram realizados em triplicata e três géis (utilizando a *strip* de um gradiente de pH imobilizado não linear de 3-10) de cada condição foram comparados, cada gel representando uma planta de laranja Pêra ou de tangerina Poncan. Foram analisados os perfis de proteínas expressas pela planta laranja Pêra e pela tangerina Poncan inoculadas com a bactéria *X. fastidiosa* e comparados com os perfis de proteínas apresentados pelas respectivas plantas sadias.

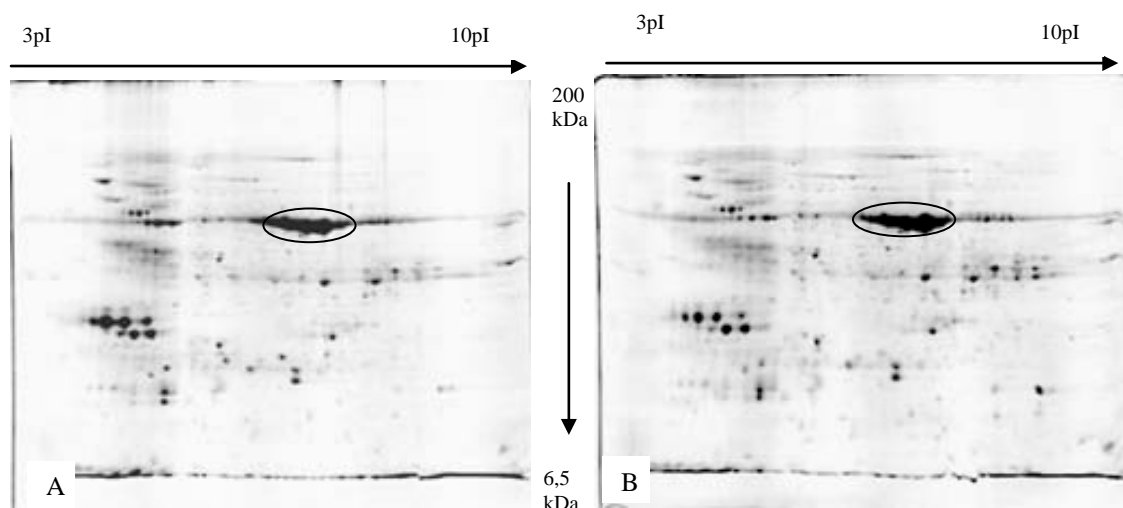
A análise de imagem dos géis 2DE realizada por meio do programa ImageMaster 2D Platinum v.6.0 demonstrou uma boa reprodutibilidade nos resultados. Após a detecção automática dos *spots*, foi realizada uma edição manual composta por correção, adição e deleção dos *spots*. Dentre os *spots* removidos estavam aqueles com baixa resolução e com

pouca nitidez. Depois de terminada a detecção dos *spots*, um gel de cada condição (sadio e inoculado) foi escolhido como sendo o gel de referência. No gel de referência foram adicionadas proteínas (*spots*) presentes em pelo menos 2 dos 3 géis analisados, caso fosse constatada a ausência desses *spots* no gel de referência.

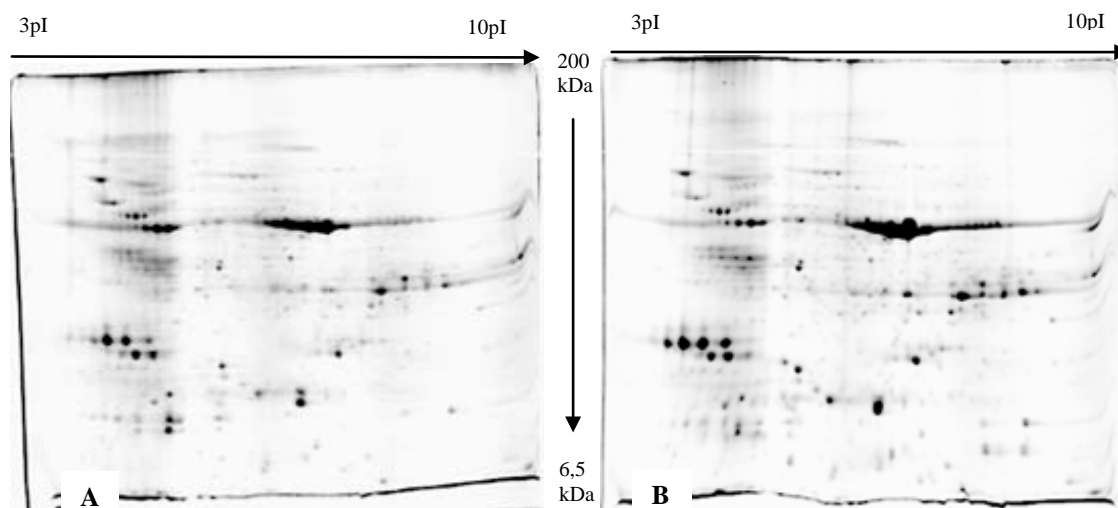
Nas análises computacionais, foram feitas a normalização (o volume de cada *spot* foi normalizado pelo volume total dos *spots* no gel) e a comparação dos *spots* entre os géis de cada condição, determinando as alterações nas suas intensidades. O teste estatístico empregado foi o Teste-T, onde os *spots* que apresentaram uma variação estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre a planta sadia e a inoculada foram detectados e analisados para a identificação da proteína por espectrometria de massas.

O número de *spots* detectados no gel não foi muito alto. Uma das possíveis causas desta limitação pode ter sido devido ao método empregado para a revelação das proteínas. Outro motivo pode ser atribuído à presença da Ribulose bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco). Esta proteína existe em elevada quantidade em plantas superiores, representando mais de 50% de todas as proteínas solúveis das folhas. A sua eliminação facilitaria a visualização e determinação das proteínas menores e menos abundantes (ROSIGNOL et al., 2006).

As imagens dos perfis bidimensionais de proteínas representadas na Figura 12 correspondem a cada grupo da laranja Pêra (inoculado e sadio) e na Figura 13 estão os mapas 2DE dos grupos (inoculado e sadio) da tangerina Poncan. Em ambos os géis, os *spots* que se apresentam em maior tamanho e intensidade são referentes à proteína Rubisco.



**Figura 12. Géis de eletroforese bidimensional mostrando os perfis das proteínas extraídas das folhas de laranja Pêra. (A) laranja Pêra inoculada com *X. fastidiosa*. (B) laranja Pêra sadia. A separação das proteínas foi realizada em gradiente não linear de pH 3-10 e os géis foram corados com comassie G250. A proteína que aparece circulada em ambos os géis é Rubisco.**

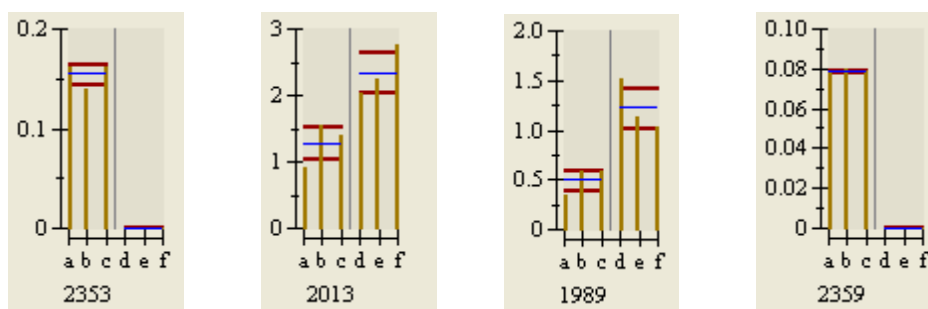


**Figura 13. Géis de eletroforese bidimensional mostrando os perfis das proteínas extraídas das folhas de tangerina Poncan. (A) tangerina Poncan sadia. (B) tangerina Poncan inoculada com *X. fastidiosa*. A separação das proteínas foi realizada em gradiente não linear de pH 3-10 e os géis foram corados com comassie G250.**

Pelas análises qualitativas e quantitativas, foram detectados *spots* que apresentaram níveis de intensidade ótica diferentes e com valor estatístico significativo em relação ao mesmo *spot* do outro grupo.

Do total dos 324 *spots* da laranja Pêra analisados e comparados, 60 foram considerados estatisticamente relevantes, apresentando alterações de intensidade. Dentre eles, 43 estavam mais abundantes no grupo de géis da laranja Pêra sadia e 17 estavam mais abundantes no grupo de géis da laranja Pêra infectada com *X. fastidiosa*. Para a tangerina Poncan, do total dos *spots* igualmente analisados, 38 apresentaram diferença estatística. Dentre eles, 6 estavam mais abundantes no grupo de géis de tecido sadio e 32 estavam mais abundantes no grupo de géis inoculado com a *X. fastidiosa*.

A análise estatística dos *spots* diferencialmente expressos detectados com seus respectivos histogramas de variação de volume está representada abaixo por alguns dos histogramas dos *spots* significativos (Figura 14). Nela, cada um representa a análise estatística feita para cada um dos *spots*. As barras verticais em laranja correspondem ao volume de cada *spot*, a barra vertical cinza separa os grupos (planta infectada à direita e planta sadia à esquerda), a barra horizontal azul indica o valor médio de cada grupo e a barra horizontal vermelha define o intervalo de dispersão. O número localizado abaixo do histograma representa a identificação do grupo do *spot*.



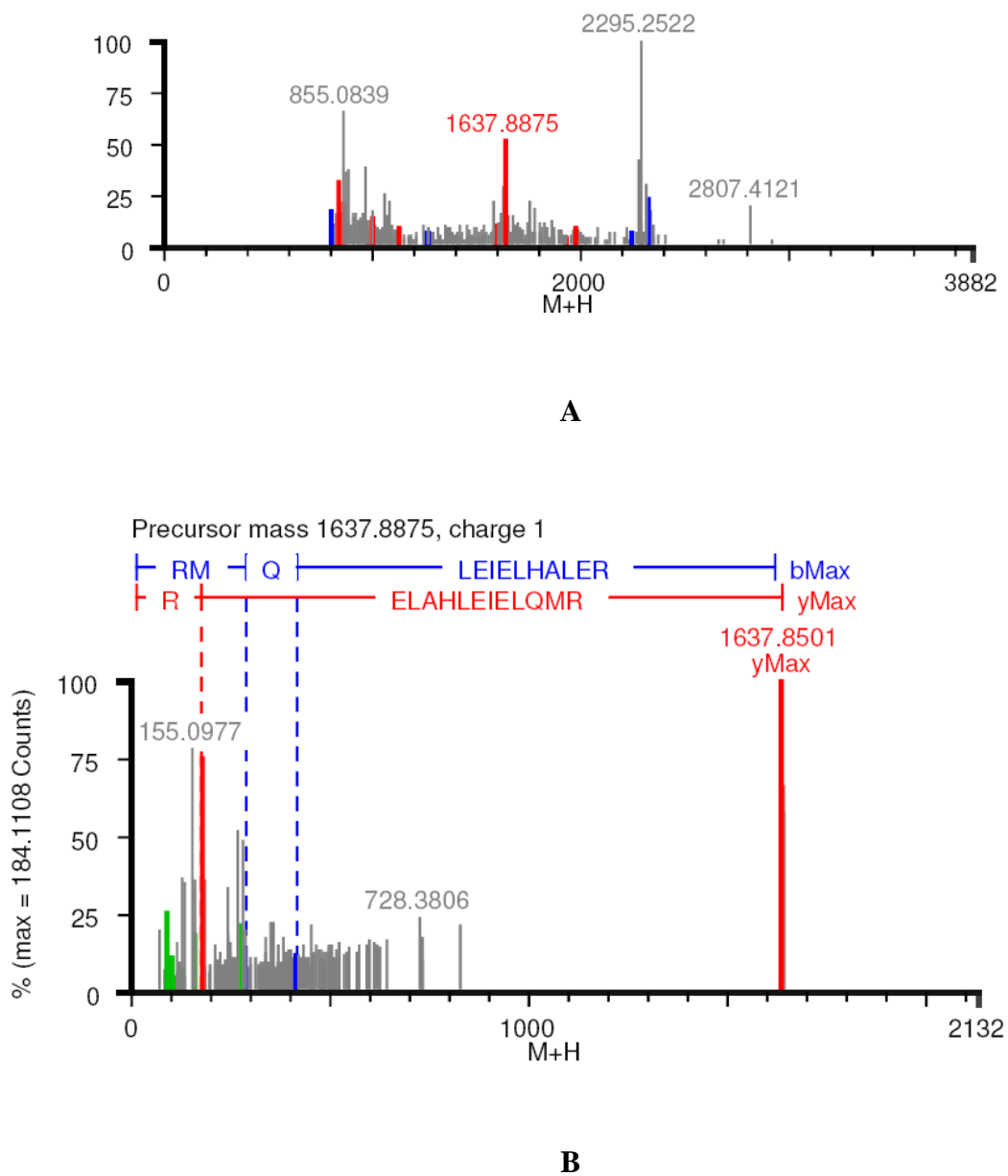
**Figura 14. Histogramas representativos dos *spots* estatisticamente relevantes.** Cada um dos histogramas mostra os volumes relativos de cada um dos *spots* de laranja Pêra (2353, 2013, 1989 e 2359) nos géis amostra controle (a, b, c) e nos géis de amostra infectadas com *X. fastidiosa* (d, e, f).

#### 6.4 Proteínas de laranja Pêra e tangerina Poncan identificadas por espectrometria de massas

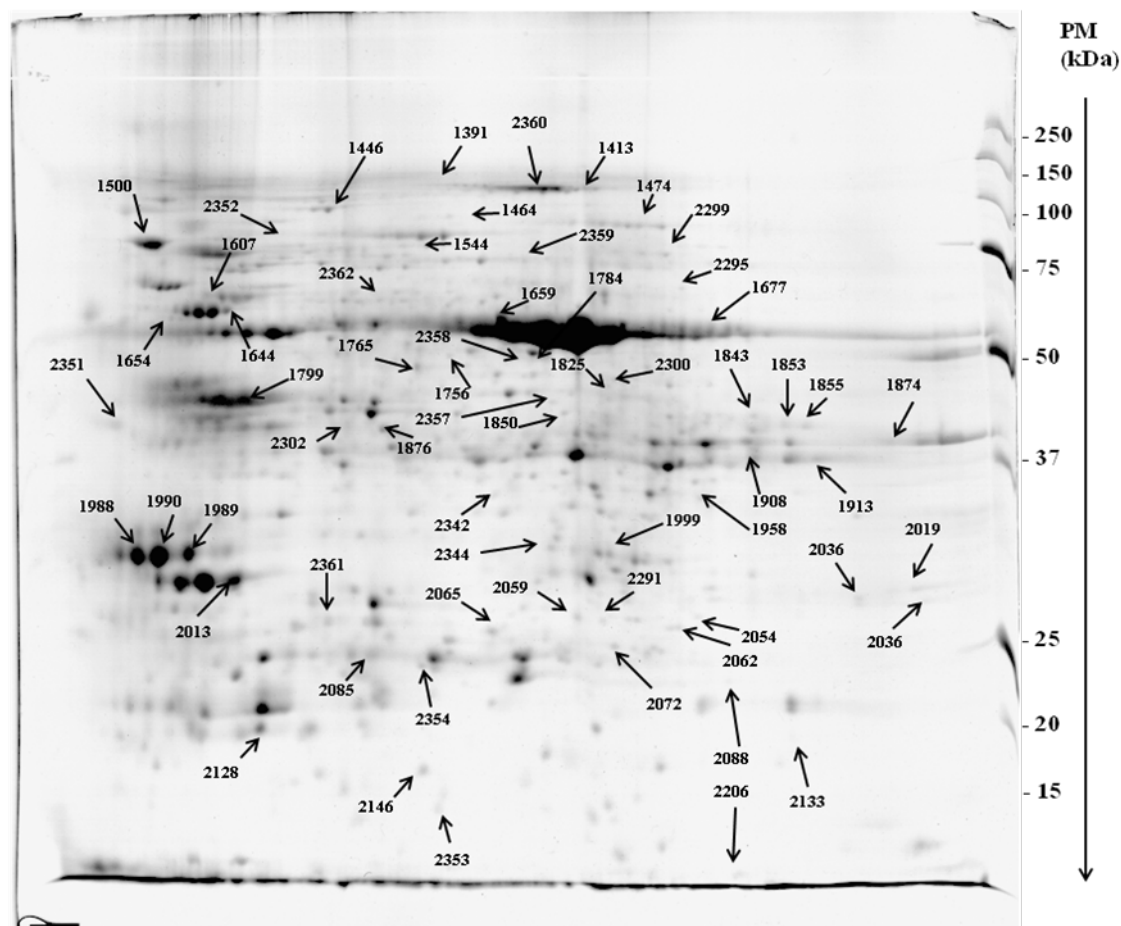
Todas as proteínas de laranja Pêra e tangerina Poncan diferencialmente expressas foram analisadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-QUAD-TOF e seqüenciadas. Picos monoisotópicos dos espectros de massas foram submetidos à busca nos bancos de dados NCBIInr, MSDB e SWISSPROT pelo *software* Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) (Figura 15), a busca foi feita no dia 23 de abril de 2009. Peptídeos não identificados foram submetidas à busca (tblastn) contra o banco de dados de citros ESTs (CiTEST) e de *Arabidopsis thaliana* (<http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>).

Entre os 60 *spots* da laranja Pêra que foram submetidos ao seqüenciamento por MALDI-QUAD-TOF e analisados em três bases de dados (SWISSPROT, NCBIInr e MSDB), apenas 11 *spots* foram identificados, apresentando homologia com uma das três bases de dados. Entre os não identificados, 10 *spots* não apresentaram homologia com nenhuma base de dados, e 39 *spots* não produziram espectros de massas onde fosse possível obter uma seqüência de peptídeos necessária à identificação. Os 60 *spots* analisados estão indicados na Figura 16 e os resultados obtidos se encontram na Tabela 1.





**Figura 15. Identificação de proteínas.** (A) Exemplo de imagem de um dos espectros de massas utilizados para as identificações das proteínas. (B) Exemplo de sequência de uma proteína identificada.



**Figura 16. Separação das proteínas por eletroforese bidimensional de folhas de laranja Pêra sadia.** A focalização isoeétrica foi realizada em gradiente de pH não linear de 3-10. Coloração com coomassie G250. Os números indicam os *spots* que apresentaram diferença de expressão e que foram removidos do gel para análise.

Tabela 1 – Proteínas de folhas de laranja Pêra separadas por eletroforese bidimensional com um gradiente de pH 3-10 não linear e analisadas por MALDI-Q-TOF

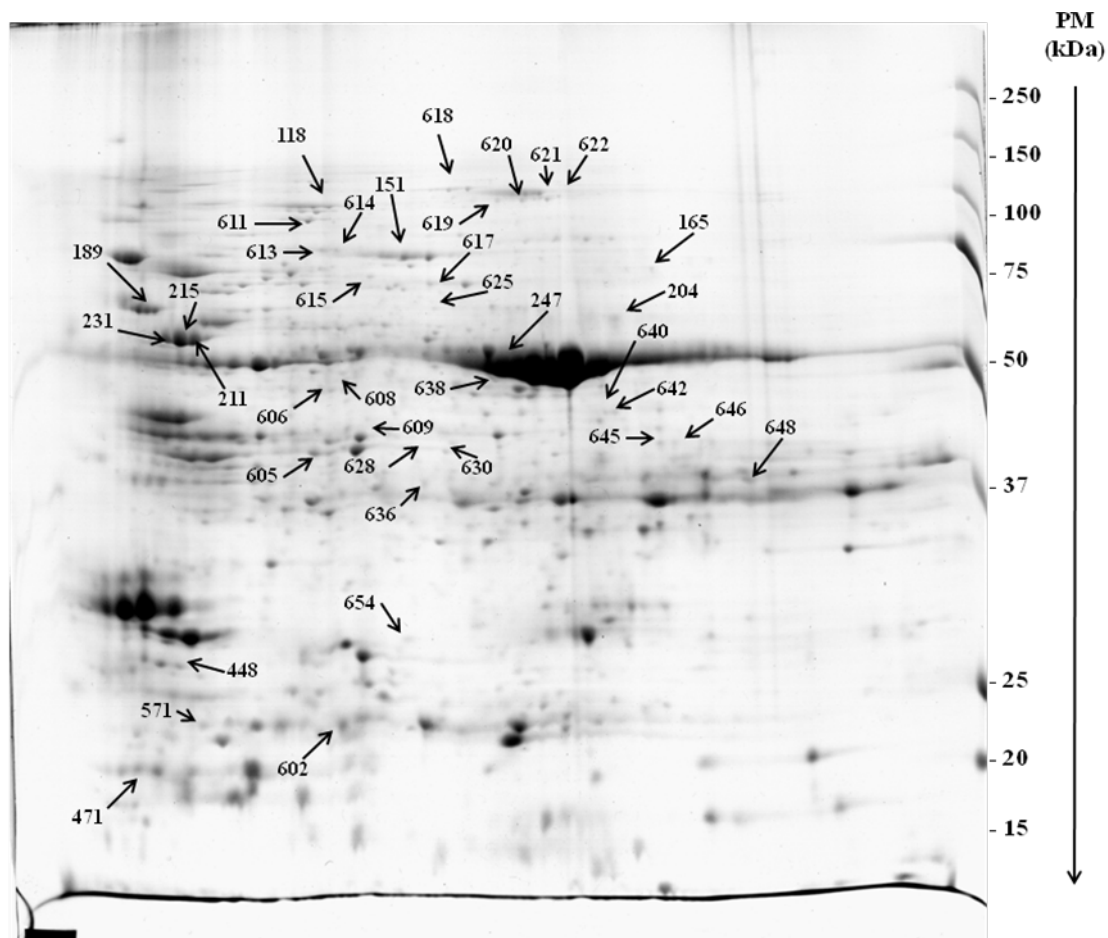
(Continua)										
*Spot	Proteína	No. acesso	Espécie	Escore / e value	*Base	Cobertura *(%)	Teor. *PM/*pI	Exper. *PM/*pI	Peptídeos encontrados	Modificações
1913	<i>ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit</i>	AAN63285	<u>Dorstenia mannii</u>	80	NC/SP	5	50.1/5.6	37.0 / 8.9	(R)DNGLLLHIHR(A)	
1659	<i>ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase</i>	CAC04406	<u>Sarcostigma kleinii</u>	132	NC/SP	9	52.1/5.3	54.0 / 6.7	(K)DTDILAAFR(V) (K)TFQGPPHGIQVER(D) (R)DITLGFVDLLR(D)	
2036	<i>hypothetical protein</i>	CAN74530	<u>Vitis vinifera</u>	38	NC/SP	6	16.4/5.0	28.0 / 9.2	(K)RLADLAASFR(V)	
1908	<i>ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase</i>	AAA92135	<u>Patosia clandestina</u>	71	NC/SP	5	50.2/8.6	37.0 / 8.7	(R)DNGLLLHIHR(A)	
1677	<i>catalase 2</i>	ACF06566	<u>Elaeis guineensis</u>	65	NC/SP/CiT	4	57.3/6.4	53.0 / 8.0	(K)SHIQEYWR(V) (K)TWPEDILPLQPVGR(L)	
2013	<i>Oxygen-evolving enhancer protein 1</i>	P26320	<u>Solanum tuberosum</u>	101	NC/SP/CiT	9	35.5 / 5.8	29.0 / 4.9	(R)VPFLFTIK(Q) (K)GTGTANQCPTIDG GVDSFAFKPGK(Y)	
1989	<i>DNA binding</i>	AT3G24870.1	<u>Arabidopsis thaliana</u>	0.36	Tair		208 / 7.7	35.0 / 4.3	ETEDSAIFRPYAR	
2344	<i>Rubisco large subunit</i>	ATCG00490.1	<u>Arabidopsis thaliana</u>	0.032	Tair		52.9 / 6.2	30.0 / 7.3	TFQGPPHGIQVER	
1464	<i>serine/threonine protein kinase</i>	AT1G06700.2	<u>Arabidopsis thaliana</u>	8,00E-05	Tair/ CiT		39.8 / 7.5	80.0 / 6.7	HENLIQLLGFCVDGNLR	
2206	<i>glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>)</i>	AT2G40690.1	<u>Arabidopsis thaliana</u>	6,00E-05	Tair/ CiT		45.0 / 8.6	10.0 / 8.7	KVVVLGGGSFGTAMAA HVAR	
1644	<i>ATPase alpha subunit</i>	ATCG00120.1	<u>Arabidopsis thaliana</u>	0.012	Tair/ CiT		55.3 / 4.8	54.0 / 5.0	EAYPGDVFYLHSR	

(Conclusão)

*Spot	Proteína	No. acesso	Espécie	Escore	Cobertura *(%)	Teor. *PM/*pI	Exper. *PM/*pI	Peptídeos encontrados	Modificações
<b>Proteínas que não apresentaram homologia</b>									
2065	não homologia						26.0 / 6.8	AELSNIVEIK RAEASSNYK FCSLHSLVLTFFISLLG	
2062	não homologia						25.0 / 8.2	VSR	
1607	não homologia						55.0 / 4.3	DLINVLEDAIR	
1799	não homologia						41.0 / 4.7	VDELNSVTQERDDTR	
2352	não homologia						90.0 / 5.0	KVVGCSSTVLK	
1990	não homologia						29.0 / 4.3	YESENTHLK	
2059	não homologia						26.0 / 7.3	IALDIPCLYK	
2342	não homologia						35.0 / 6.7	AGHPTFVLVR	
1843	não homologia						40.0 / 8.8	IFGTSPNAVAER	
2353	não homologia						14.0 / 6.4	IGDPVLHIELR	

\* **pI**: ponto isoelétrico, **PM**: peso molecular em kDa, **cobertura**: porcentagem da seqüência da proteína que foi identificada, **spot marcado em vermelho**: proteínas menos expressas em laranja infectada com *X. fastidiosa*, **spot marcado em verde**: proteínas mais expressas em laranja infectada com *X. fastidiosa*. **Base**: Base de dados onde a proteína foi identificada: SP = SwissProt, CiT = CitEST (Blast no banco de citros), NC = NCBIInr, Tair = banco de dados da *Arabidopsis thaliana* (Blast).

Entre os 38 *spots* da tangerina Poncan que foram submetidos ao seqüenciamento e analisados nas mesmas três bases de dados, apenas 8 *spots* foram identificados, apresentando homologia com uma das três bases de dados. Entre os não identificados, 2 *spots* não apresentaram homologia com nenhuma base de dados, e 28 não produziram espectros de massas onde fosse possível obter seqüência de peptídeos necessários na identificação. Os 38 *spots* analisados estão indicados na Figura 17 e os resultados obtidos se encontram na Tabela 2.



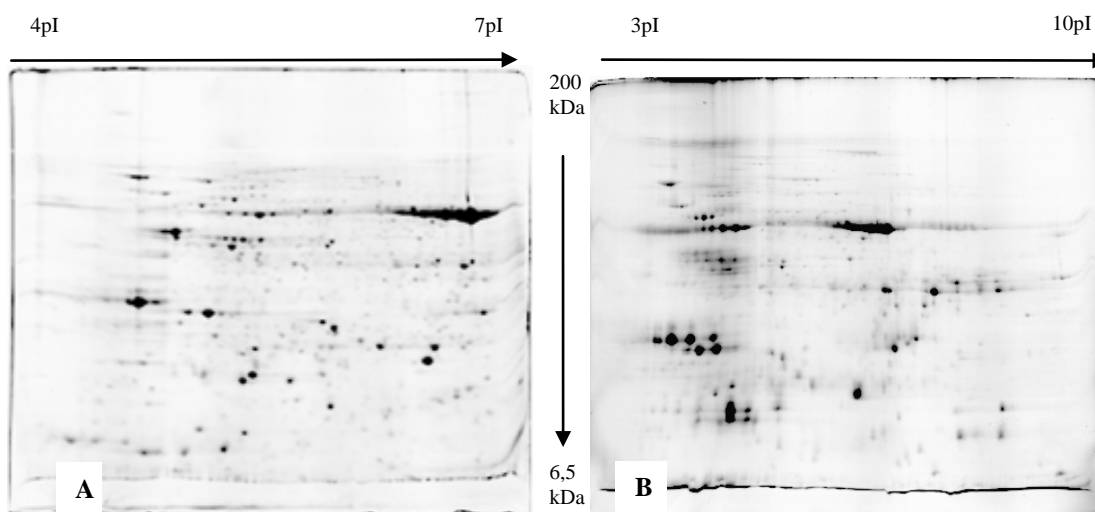
**Figura 17. Separação das proteínas por eletroforese bidimensional de folhas de tangerina Poncan infectadas com *X. fastidiosa*. A focalização isoelétrica foi realizada em gradiente de pH não linear de 3-10. Coloração com coomassie G250. Os números indicam os *spots* que apresentaram diferença de expressão e que foram removidos do gel para análise posterior.**

Tabela 2 – Proteínas de folhas de tangerina Poncan separadas por eletroforese bidimensional com um gradiente de pH 3-10 não linear e analisadas por MALDI-Q-TOF

*Spot	Proteína	No. acesso	Espécie	Escore/ e-value	*Base	Cobertura *(%)	Teor. *PM/*pI	Exper. *PM/*pI	Peptídeos encontrados	Modificações
247	<i>ribulosebiphosphate carboxylase</i>	AAA68039	<u><i>Pandanus tectorius</i></u>	105	SP/NC	4	52.1 / 6.3	53.0 / 6.8	(R)DNGLLLHIHR(A) (K)TFKGPPHGIQVER(D)	
231	<i>ATP synthase CF1 alpha subunit</i>	YP_740460	<u><i>Citrus sinensis</i></u>	167	SP/NC	9	55.5 / 5.0	55.0 / 4.3	(K)ADEISNIIR(E) (R)LIESPAPGHSR(R) (K)IAQIPVSEAYLGR(V) (K)ASSVAQVVNTFQER(G)	
215	<i>ATP synthase CF1 alpha subunit</i>	YP_740460	<u><i>Citrus sinensis</i></u>	167	SP/NC	9	55.4/5.0	54.0/4.3	(R)SVYEPLQTGLIAIDSMPIGR(G) (R)EAYPGDVFYLHSR(L) IAQIPVSEAYLGR	
448	<i>TIR-NBS-LRR clas)</i>	AT5G17680.1	<u><i>Arabidopsis thaliana</i></u>	0.90	Tair		147.3 / 6.8	27.0 / 4.6	RSQIEWESTLAR	
606	<i>serine/threonine protein kinase</i>	AT1G06700.1	<u><i>Arabidopsis thaliana</i></u>	8,00E-05	Tair/CiT		39.8 / 7.5	46.0 / 5.4	HENLIQLLGFCVDGNLR	
613	<i>transposable element gene</i>	AT1G78350	<u><i>Arabidopsis thaliana</i></u>	0.006	Tair			76.0 / 5.4	GHLLATVGRDGDNR VDDIWDEDK	
211	<i>ATPase alpha subunit</i>	ATCG00120.1	<u><i>Arabidopsis thaliana</i></u>	0.032	Tair/CiT		55.3 / 4.8	54.0 / 4.8	EAYPGDVFYLHSR IAQIPVSEAYLGR	
646	<i>bZIP family transcription factor</i> <b>Proteínas que não apresentaram homologia</b>	AT2G21230.3	<u><i>Arabidopsis thaliana</i></u>	0.001	Tair		57.0 / 9.0	40.0 / 8.2	VQTLQTEATTLAQLTHLQR	
622	não homologia							140.0 / 7.3	<u>MRMHYTLK</u>	Oxidation (M)
645	não homologia							42.0 / 8.0	VAAVYEDLATKLDQAAQILHR	

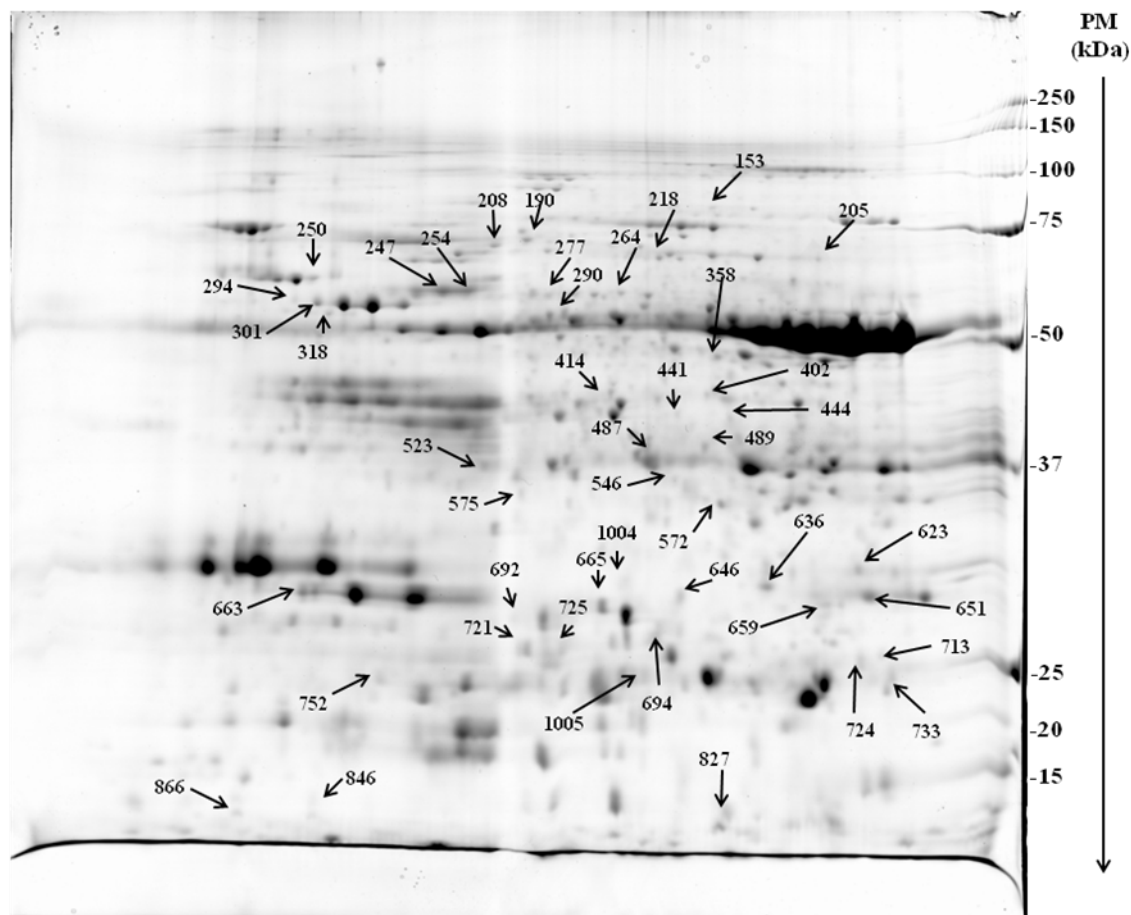
\* **pI**: ponto isoelétrico, **PM**: peso molecular em kDa, **cobertura**: porcentagem da seqüência da proteína que foi identificada, **spot marcado em vermelho**: proteínas menos expressas em tangerina Poncan infectada com *X. fastidiosa*, **spot marcado em verde**: proteínas mais expressas em tangerina Poncan infectada com *X. fastidiosa*. **Base**: Base de dados onde a proteína foi identificada: SP = SwissProt, CiT = CitEST (Blast no banco de citros), NC = NCBIInr, Tair = banco de dados da *Arabidopsis thaliana* (Blast).

A separação das proteínas de folha da tangerina Poncan por eletroforese bidimensional usando um gradiente não linear de pH 3-10 demonstrou que houve predomínio de proteínas que apresentaram diferença estatística entre o pI 4-7. Para se ter uma melhor visualização dessas proteínas, minimizando a sobreposição de *spots* bem como melhorando a sua resolução, elaboraram-se géis utilizando IPG com gradiente de pH 4-7, onde as condições das corridas (na primeira e segunda dimensão), coloração e a análise de imagem foram as mesmas utilizadas nos géis de pH 3-10 não linear (Figura 18).



**Figura 18. Avaliação de diferentes gradientes de pH entre (A) pH linear de 4-7 e (B) pH não linear de 3-10 por eletroforese bidimensional da distribuição das proteínas de folhas de tangerina Ponca.**

Após as análises e comparações entre os géis provenientes da tangerina Poncan (sadia *versus* infectada) na faixa de pH 4-7, a quantidade de *spots* considerados como estatisticamente relevantes foram 45, sendo observadas alterações de intensidades de suas densidades óticas. Dentre eles, 9 estavam mais abundantes no grupo de géis provenientes da tangerina Poncan sadia e 36 estavam mais abundantes no grupo de géis originados da tangerina Poncan infectada com *X. fastidiosa* (Figura 19).



**Figura 19.** Separação das proteínas de folhas de tangerina Poncan infectada com *X. fastidiosa* por eletroforese bidimensional. A focalização isoeétrica foi realizada em gradiente de pH 4-7. Coloração com coomassie G250. Os números indicam os *spots* que apresentaram diferença de expressão e que foram removidos do gel para análise.

Os *spots* diferencialmente expressos foram posteriormente submetidos ao sequenciamento utilizando o espectrômetro de massas ESI-QUAD-TOF. As massas dos peptídeos desses *spots* foram analisadas conforme descrito no item 6.4.

Entre os 45 *spots* de tangerina Poncan separados em um gradiente de pH linear de 4-7 que foram submetidos ao sequenciamento por ESI-QUAD-TOF e analisados em duas bases de dados: SWISSPROT e NCBIInr, 35 *spots* foram identificados por apresentarem homologia com uma das duas bases de dados. Entre os não identificados, 5 *spots* não apresentaram homologia com nenhuma base de dados, e 5 *spots* não produziram espectros



de massas onde fosse possível obter seqüência de peptídeos necessária à identificação. A lista das proteínas identificadas está descrita na Tabela 3.

Tabela 3 – Proteínas de folhas de tangerina Poncan separadas por eletroforese bidimensional com um gradiente de pH 4-7 e analisadas por ESI-Q-TOF

(Continua)

*Spot	Proteína	No. acesso	Espécie	Escore / (%) Prob.	*Base	Cobertura *(%)	Teor. *PM/*pI	Exper. *PM/*pI	Peptídeos encontrados	Modificações
1004	<i>Uroporphyrinogen decarboxylase</i>	Q6AHF5	<u>Leifsonia xyli</u> subsp. <u>xyli</u>	100%	SP/MB	2,38	40.1/ 5.9	30.0/ 6.5	(R)TLLDEASRR(L)	
153	5- <i>methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase</i>	Q42662	<u>Solenostemon scutellarioides</u>	99.99%	SP/MB/CiT	3.14	84.5/ 6.4	75.0/ 6.9	(K)YLFAGVVVDGR(N) (K)AGITVIQIDEAALR(E)	
205	<i>glycine dehydrogenase decarboxylating mitochondrial</i>	O80988	<u>Arabidopsis thaliana</u>	99.96 %	SP/MB	3.06	113.7/ 6.5	73.0 / 7.0	(K)GNINIEELR(N) (K)JAILNANYMAK(R) (K)NTAGIEPEDVAK(R)	
250	<i>unnamed protein product</i>	CAO16795	<u>Vitis vinifera</u>	202	NC	21	61.7/ 5.0	60.0/ 4.8	(K)DIIPLEK(T) (K)LGLLSVTSGANPVSI K(K) (K)ALVAPASLIAHNAG VEGEVVVEK(I)	
254	<i>GroEL-like chaperone, ATPase</i>	ABE86688	<u>Medicago truncatula</u>	308	NC	10	61.4 / 5.9	60.0 / 5.7	(K)VLELALK(R) (R)EIGELIAK(A) (K)IGGASEAEVGEK(K ) (K)IGVQIIQNALK(T) (K)SGIIDPLK(V) (R)GYISPYFITNQK(N)	

(Continuação)

*Spot	Proteína	No. acesso	Espécie	Escore ou % Prob.	Base	Cobertura %	Teor. Mr/pI	Exper. Mr/pI	Peptídeos encontrados	Modificações
264	<i>predicted protein</i>	XP_002299849	<u>Populus trichocarpa</u>	75	NC	4	55.0 / 6.8	53.3 / 6.4	(R)IAQTLLR(E) (R)AGVPELGAAQELAR(L)	
290	<i>UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase</i>	Q43772	<u>Hordeum vulgare</u>	1,00E+02	SP/MB/CiT	5.28	51.6 / 5.2	52.0 / 6.1	(K)VLQLETAAGAAIR(F) (K)LEIPDGAVLENK(D)	
301	<i>ATP synthase CF1 alpha subunit</i>	YP_740460	<u>Citrus sinensis</u>	637	NC/CiT	20	55.5 / 5.0	52.0 / 4.9	(K)FLVELR(T) (R)QMSLLLR(R) (R)KFLVELR(T) (R)LIESPAPGIISR(R) (K)IAQIPVSEAYLGR(V) (K)ASSVAQVVNTFQER(G) (K)TNKPQFQEIISSTK(I) (K)IVNIGTVLQVGDGIAR(I) (R)SVYEPLQTGLIAIDSMPIGR(G)	
546	<i>aldo-keto reductase, putative</i>	EEF33305	<u>Ricinus communis</u>	106	NC	6	42.6 / 7.6	36.9 / 6.4	(K)MAELCQLTGVK(L) (K)LITYGTVMGLLSEK(F)	
572	<i>Acidic ribosomal protein P0 homolog</i>	Q8TI80	<u>Methanosarcina acetivorans</u>	99,99%	SP/MB	5,764	37.1 / 4.8	35 / 6.7	(K)NLGVNAVILEPGVMDTLLAK(A)	
623	<i>conserved hypothetical protein (Thioredoxin_like)</i>	EEF52786	<u>Ricinus communis</u>	162	NC	9	34.0 / 7.1	35.0 / 7.1	(K)IYPFMVDLSR(T) (K)VPHFSFYK(S) (K)LIVLDVGLK(H)	

(Continuação)

*Spot	Proteína	No. acesso	Espécie	Escore ou % Prob.	Base	Cobertura %	Teor. Mr/pI	Exper. Mr/pI	Peptídeos encontrados	Modificações
636	<i>ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit</i>	Q49CC1	<u>Cuscuta sandwichiana</u>	99,99%	SP/MB	10.18	53.4 / 7.1	33.0 / 6.9	(R)IPPAYTK(T) (K)TFKGPPHGIQVER(D) (R)GGLDFTK(D) (K)DDENVNSQPFMR(W) (R)FLFCAEAIYK(S)	Carbamidomethyl C (4)
651	<i>ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit</i>	Q09MH0	<u>Citrus sinensis</u>	99,99%	SP/MB	13.47	52.4 / 6.6	27.5 / 7.4	(K)LTYYPDPYVTK(D) (R)AVYECLR(G) (K)DDENVNSQPFMR(W) (R)FLFCAEALYK(A) (R)DITLGFVDLLR(D) (K)WSPELAAACEVWK(S)	Carbamidomethyl C (5) Carbamidomethyl C (4) Carbamidomethyl C (9)
713	<i>miraculin-like protein 1</i>	BAE79510	<u>Citrus jambhiri</u>	250	NC/CiT	18	25.5 / 8.1	25.0 / 7.5	(K)QFITIGEGK(T) (K)VSASIFD <u>M</u> K(I) (K)DVGVSNDGVQR(L) (K)NLVLLPNDNSIIVR(E)	Oxidation (M)
721	<i>Respiratory burst oxidase homolog protein D</i>	Q9FIJ0	<u>Arabidopsis thaliana</u>	99,88%	SP/MB	1.08	103 / 9.4	27.3 / 5.8	(R)NNVSGDAITK(E)	
724	<i>Ribulose bisphosphate carboxylase large chain</i>	Q31750	<u>Calycophyllum candidissimum</u>	98.32%	SP/MB	7.24	51.9 / 6,1	26.3 / 7.5	(R)DITLGFVDLLR(D) (R)VSLEACVKAR(N) (K)WSPELAAACEVWK(E)	Carbamidomethyl C (6) Carbamidomethyl C (9)

(Continuação)

*Spot	Proteína	No. acesso	Espécie	Escore ou % Prob.	Base	Cobertura %	Teor. Mr/pI	Exper. Mr/pI	Peptídeos encontrados	Modificações
733	<i>Ribulose-phosphate 3-epimerase, chloroplastic</i>	Q9ZTP5	<u>Oryza sativa Japonica Group</u>	99.99 %	SP/MB/CiT	7.664	29.0 / 8,8	24.9 / 7.9	(R)VPDFIK(A) (K)GVNPWIEVDGGVGPK(N)	
752	<i>Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic</i>	P84989	<u>Populus euphratica</u>	59,42%	SP/MB	8	10.6 / 5.3	23.0 / 5.5	(R)VPFLFTIK(G)	
1005	<i>carbonic anhydrase, putative</i>	EEF37661	<u>Ricinus communis</u>	82	NC	4	36.0 / 6.4	25 / 6.3	(K)YAGVGAAVEYAVLHLK(V)	
208	<i>V-type proton ATPase catalytic subunit</i>	P09469	<u>Daucus carota</u>	298	NC/CiT	12	69.0 / 5.2	71.0 / 5.7	(R)LGDLFYR(L) (R)SGDVYIPR(G) (K)TVISQALSK(Y) (K)LAADTPLLTGQR(V) (K)DTVLELEFQGVK(K) (R)EDDLNEIVQLVGK(D)  (R)LAEMPADSGYPAYLAAR(L)	Oxidation (M)
247	<i>Chaperonin CPN60-2, mitochondrial</i>	Q05046	<u>Cucurbita maxima</u>	66	NC/CiT	2	61.3 / 5.6	60.0 / 5.7	(K)VLELALK(K) (K)IGVQIIQNALK(T)	
414	<i>unnamed protein product</i>	CAO64239	<u>Vitis vinifera</u>	40	NC	3	34.0 / 4.9	40.0 / 6.3	(K)VGETVDIVGLK(D)	
489	<i>Protein Nef</i>	Q8AIH4	<u>SIVcpz TAN1</u>	99.99 %	SP/MB	5.12	21.9 / 5.5	38.0 / 6.7	(K)LAIDLSWFLK(E)	
523	<i>phosphoribulokinase</i>	AAD55057	<u>Beta vulgaris</u>	108	NC/CiT	9	30.7 / 5.1	37.4 / 5.6	(K)ILVIEGLHPMYDAR(V) (R)LTSVFGGAAEPPK(G)	
575	<i>Ribosome biogenesis protein ERB1</i>	Q04660	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	99.99%	SP/MB	1.13	91.6 / 5.0	34.0 / 6.6	(R)SLDLYLAPRVR(K)	

(Continuação)

*Spot	Proteína	No. acesso	Espécie	Escore ou % Prob.	Base	Cobertura %	Teor. Mr/pI	Exper. Mr/pI	Peptídeos encontrados	Modificações
646	<i>miraculin-like protein 1</i>	BAE79510	<u>Citrus jambhiri</u>	288	NC/CiT	21	25.5 / 8.1	27.0 / 6.5	(K)QFITIGEGK(T) (K)VSASIFDMK(I) (K)IALDIPCLYK(I) (K)DVGVSNDVGVQR(L) (R)YYLVSALWGVK(T)	Oxidation (M)
659	<i>Ribulose bisphosphate carboxylase large chain</i>	P25826	<u>Alluaudia procera</u>	93	NC	4	53.5 / 6.2	28.0 / 7.4	(R)FLFCAEAIYK(A) (R)DITLGFVDLLR(D)	
692	<i>amino acid dehydrogenase small subunit</i>	A8AFS0	<u>Citrobacter koseri</u> <u>ATCC BAA-895</u>	95.68%	SP/MB	3.009	47.6 / 8.0	26.0 / 5.9	(K)ALRASTGIQYEGR(Q)	
694	<i>unknown</i>	ACJ84528	<u>Medicago truncatula</u>	74	NC	5	27.6 / 6.7	25.0 / 6.5	(K)IGGADDIFLGLDIR(N)	
827	<i>Ribulose bisphosphate carboxylase large chain</i>	Q31750	<u>Calycophyllum candidissimum</u>	99.84%	SP/MB	7.24	51.9 / 6.1	10.0 / 6.7	(R)DITLGFVDLLR(D) (R)VSLEACVKAR(N) (K)WSPELAAACEVWK(E)	Carbamidomethyl C (6) Carbamidomethyl C (9)
866	<i>bisphosphate carboxylase large chain Fragment</i>	P31191	<u>Ilex aquifolium</u>	99.99%	SP/MB	37.03	5.8 / 5.0	9.8 / 4.9	(K)LTYYTPDYVTK(D) (K)DTDILAAFR(V)	
277	<i>Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase</i>	Q01587	<u>Cucumis sativus</u>	52	NC/CiT	2	45.9 / 7.5	55.0 / 6.1	(K)VPLILGVWGGK(G)	
725	<i>Oxygen-evolving enhancer protein 1</i>	P84989	<u>Populus euphratica</u>	59.42%	SP/MB	8	10.6 / 5.3	25.0 / 6.2	(R)VPFLFTIK(G)	

(Conclusão)										
*Spot	Proteína	No. acesso	Espécie	Escore ou % Prob.	Base	Cobertura %	Teor. Mr/pI	Exper. Mr/pI	Peptídeos encontrados	Modificações
294	<i>ATP synthase CF1 alpha subunit</i>	YP_740460	<u>Citrus sinensis</u>	62	NC/CiT	2	55.5 / 5.0	55.0 / 5	(R)LIESPAPGIISR(R)	
318	<i>vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase B subunit</i>	BAA75517	<u>Citrus unshiu</u>	328	NC/CiT	12	54.4 / 4.9	53.0 / 5.3	(R)TVTGVAGPLVILDK(V) (K)AVVQVFEGTSGIDNK(F) (R)QIYPPINVLPSLSR(L) (K)IPLFSAAGLPHNEIAAQICR(Q) (K)YYEIVNIR(L) (K)TPVSLDMLGR(I)	
<b>Proteínas que não apresentaram homologia</b>										
441	não homologia							42.0 / 6.6	IGVIESLLEK	
487	não homologia							40.0 / 6.5	MRPRGETAK	
402	não homologia							47.0 / 6.7	SAVTPSKSR	
358	não homologia							48.0 / 6.7	FYPKFAVEGLLR	
218	não homologia							73.0 / 6.5	VVSLSIPR	

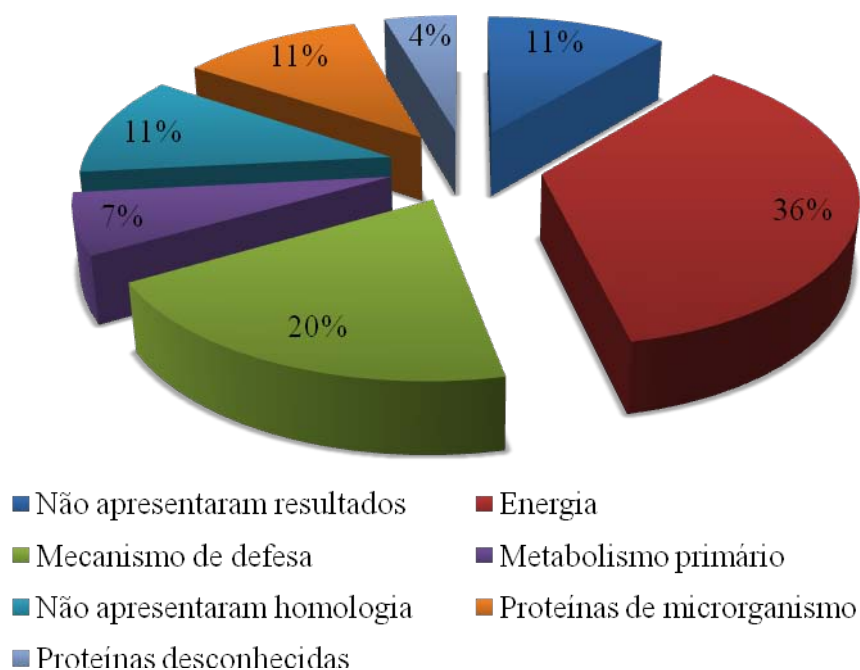
\* **pI**: ponto isoelétrico, **PM**: peso molecular em kDa, **cobertura**: porcentagem da sequência da proteína que foi identificada, **spots marcados em vermelho**: proteínas menos expressas em tangerina Poncan infectada com *X. fastidiosa*, **spots marcados em verde**: proteínas mais expressas em tangerina Poncan infectada com *X. fastidiosa*. **Base**: Base de dados onde a proteína foi identificada: SP = SwissProt, CiT = CitEST (Blast no banco de citros), NC = NCBI nr, MB = MSDB, Tair = banco de dados da *Arabidopsis thaliana* (Blast).

Os *spots* obtidos da análise de tangerina Poncan separados em um gradiente de pH de 4-7 foram classificadas em categorias funcionais. A sua distribuição está representada na Figura 20. A categoria que apresentou maior número de proteínas identificadas foi àquela relacionada à parte energética da célula, com 16 *spots* relacionados a transdução de energia, metabolismo de carboidratos e fotossíntese. Faz parte desta categoria a proteína mais abundante encontrada na folha de citros, a Rubisco, a qual foi representada por múltiplos *spots* (Tabela 4). Com relação ao metabolismo primário, foram identificados 3 *spots* relacionados à síntese e degradação de macromoléculas, como aminoácidos, nucleotídeos e proteínas; em se tratando das proteínas relacionadas aos mecanismos de defesa, 9 proteínas foram identificadas. Cinco delas foram identificadas como sendo de microrganismos como bactéria, vírus e levedura.

**TABELA 4.** Proteínas que foram representadas por mais de um *spot* nos géis de eletroforese bidimensional.

<b>Proteína</b>	<b><i>Spots</i></b>
<b>Proteínas de laranja separadas em um gradiente de pH de 3-10nl</b>	
<i>Ribulose 1,5biphosphate carboxylase/oxigenase</i>	1913, 1659, 1908
<b>Proteínas de tangerina separadas em um gradiente de pH de 3-10nl</b>	
<i>ATP syntase CF1 alpha subunit</i>	213, 215
<b>Proteínas de tangerina separadas em um gradiente de pH de 4-7</b>	
<i>Oxygen-evolving-enhancer protein 1</i>	725, 752
<i>Ribulose bisphosphate carboxylase</i>	724, 659, 827, 866, 277
<i>ATP syntase CF1 alpha subunit</i>	301, 294
<i>Miraculin</i>	713, 646
<i>Ribulose-1,5-biphosphate</i>	636, 651





**Figura 20. Distribuição por categoria funcional dos *spots* de tangerina Poncan analisados, separados por eletroforese bidimensional em um gradiente de pH linear de 4-7 e seqüenciados por LC/MS/MS.**

A metodologia adotada neste trabalho para a extração e separação das proteínas de folhas de citros possibilitou a identificação de proteínas citoplasmáticas (*UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase*) e de diferentes organelas, como o cloroplasto (*Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic*), mitocôndria (*Chaperonin CPN60-2, mitochondrial*) peroxissomas, glioxissomas (*catalase 2*) e vacúolo (*vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase B subunit*).

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1 Protocolo de extração das proteínas de folhas de citros

No estudo de proteoma de um organismo a plataforma mais amplamente utilizada é o gel de eletroforese bidimensional (2DE), que permite a separação simultânea de centenas de proteínas. O principal objetivo dessa técnica é a obtenção de uma boa separação e a visualização do maior número de proteínas de uma amostra complexa e que seja passível de análises qualitativa e quantitativa, além de ser reprodutível (BIRON et al., 2006).

Para se alcançar uma reprodutibilidade em géis 2DE é preciso uma otimização na preparação da amostra para cada organismo ou tecido estudado. Esta etapa constitui o passo mais crítico e problemático da técnica, pois é necessário que se tenha uma alta qualidade na solubilização das proteínas para se obter um mapa 2DE que tenha uma resolução satisfatória e com uma correta representação do proteoma (MARTINS et al., 2007).

Visto a importância de se ter um gel com boa resolução e reprodutibilidade, foram feitas algumas tentativas de extração visando encontrar o método mais eficiente para as proteínas de folhas de citros. Como o primeiro método adotado fracassou, fomos a busca de um método que correspondesse aos objetivos propostos. O método de Maserti et al. (2006) foi escolhido pelo fato de ser um método de extração otimizada para folhas de citros analisadas por eletroforese bidimensional e por mostrar eficiência em melhorar a resolução das proteínas básicas no gel 2DE. Na primeira tentativa não foi possível obter um bom gel devido à presença de contaminantes na amostra e possivelmente à baixa solubilização das proteínas.

Uma vez que a solubilização das proteínas é o passo mais importante, é grande o empenho para se aumentar a eficácia deste processo. Com isso, têm-se proliferado vários protocolos de extração, estando quase sempre adaptados conforme a espécie, o tecido analisado e a proteína de interesse (ROSSIGNOL et al., 2006). A maioria desses protocolos utiliza fenol e a combinação de TCA com acetona na extração das proteínas de plantas (KIM et al., 2001).

Já que para cada tipo de protocolo de extração empregado se obtém um perfil distinto do proteoma do organismo estudado, às vezes potencializando a solubilização de

proteínas básicas outras vezes de proteínas mais ácidas, optamos por encontrar um método novo que talvez fosse capaz de extrair e solubilizar todas as proteínas da amostra. Por causa disso, escolhemos um método diferente da extração por fenol para a extração de proteínas de planta.

A preparação da amostra para o estudo do proteoma vegetal apresenta uma complexidade maior em comparação ao de mamíferos ou microrganismos, já que os tecidos de plantas são tecidos são ricos em compostos que interferem na 2DE (WANG et al., 2003; MASERTI et al., 2006). As plantas apresentam abundância de metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, que são encontrados em grande quantidade nos tecidos verdes. Os fenóis, uma vez descompartimentalizados são rapidamente oxidados a quinonas por enzimas próprias da planta (polifenoloxidase e peroxidase). Os compostos fenólicos não oxidados e as quinonas podem reagir com as proteínas alterando a mobilidade de suas moléculas e podendo resultar em artefatos no gel (ALFENAS, 1998).

Para se obter um mapa proteômico com *spots* bem definidos é necessário que se remova qualquer contaminante presente na amostra. Eles podem ser retirados antes ou mesmo depois da extração das proteínas. A remoção convencional dos contaminantes não protéicos envolve o uso de solventes orgânicos, como acetona ou 10% TCA em acetona (WANG et al., 2003). A precipitação com TCA/acetona também minimiza a degradação de proteínas, porém a etapa de precipitação aumenta a possibilidade de perda de proteínas devido a precipitação incompleta e/ou solubilização incompleta do *pellet* na etapa subsequente (GÖRG et al., 2004). De acordo com Zukas & Breksa (2005) o uso de TCA já é suficiente para se concentrar e purificar o extrato protéico. O uso de TCA/acetona para precipitar as proteínas requer etapas de lavagens que auxiliam na remoção da pigmentação e dos contaminantes, obtendo-se um *pellet* mais limpo. A qualidade do tecido macerado também contribui para a eliminação dos contaminantes, sendo que, quanto mais fino for o pó obtido na maceração do tecido mais eficiente será a remoção destes interferentes (WANG et al., 2003).

Tendo isso em mente, utilizamos o pó bem fino de folhas de citros para extrair a proteína e empregamos a solução de 10% de TCA em acetona para precipitar as proteínas com intuito de se concentrar a amostra e eliminar os possíveis interferentes presentes. As

etapas de lavagens do sedimento auxiliaram nas suas remoções. Com isso, foi possível diminuir as manchas e traços nos géis.

Neste trabalho, além da solubilização das proteínas do citosol, também houve o interesse em se tentar solubilizar as proteínas de membrana, que segundo Zhang et al., (2007) apresentam uma natureza anfipática, alta hidrofobicidade, pIs básicos e se encontram em baixa abundância. As proteínas de membrana apresentam um importante papel em vários processos celulares, como a transdução de sinal, adesão celular, transporte de íons e metabólitos, endocitose, etc (SANTONI et al., 2000).

Tendo em vista o interesse de se analisar também as proteínas de membrana, foram usados nos tampões de lise e de reidratação reagentes que ajudariam em suas solubilizações. O detergente é um agente imprescindível no tampão de extração, pois atua na prevenção da interação hidrofóbica entre os domínios hidrofóbicos das proteínas evitando a perda de proteínas devido as suas agregações e precipitações (GÖRG et al., 2004). A introdução dos detergentes *zwitterionics* como ASB-14(tetradecanoilamido propil dimetil amônio propano sulfonado) e C7BzO [(3-(4-heptil)fenil-3-hidroxi propil dimetil amônio propano sulfonado)] contribuiu para se potencializar a solubilização destas proteínas no tampão de extração (FOUNTOULAKIS & TACÁKS, 2001; LUCHE et al., 2003). Os detergentes ASB-14 e C7BzO são significativamente eficientes não só na solubilização das proteínas de membrana como também na resolução dos seus géis de eletroforese bidimensional. Recentemente, por meio de estudos, ficou demonstrado que estes detergentes em conjunto com a uréia/tiuréia, melhoram a extração de proteínas hidrofílicas e hidrofóbicas (GIAVALISCO et al., 2003; LUCHE et al., 2003; TASTET, 2003), bem como o uso combinado de dois detergentes (como CHAPS com ASB-14 ou CHAPS com C7BzO) (GALVANI et al., 2001; MARTINS et al., 2007).

Em nosso trabalho, primeiramente foi testado o potencial do detergente CHAPS; o resultado foi bom, mas este detergente apresentou um rendimento menor na quantidade de proteínas extraídas quando comparado com o resultado obtido do uso do CHAPS combinado com o ASB-14. Entretanto, o detergente C7BzO combinado com o CHAPS apresentou uma propriedade superior na solubilização das proteínas além de melhorar as suas resoluções nos géis 2DE, permitindo se aplicar uma quantidade maior de proteínas em

cada *strip*. Sendo assim, foi aplicado para cada gel 500 µg de proteínas permitindo uma melhor visualização de proteínas menos abundantes no gel.

A necessidade de se descobrir novos detergentes surgiu do fato de que a maioria dos detergentes comerciais apresentava uma pobre eficiência em se solubilizar as proteínas de membranas em estado desnaturado (TASTET et al., 2003). Uma vez que, para conseguir uma alta resolução na plataforma 2DE, as proteínas analisadas devem ser desagregadas, reduzidas e solubilizadas visando se alcançar o total rompimento das suas interações intra e intermoleculares, mantendo-se as propriedades das cargas intrínsecas e garantindo desse modo que cada *spot* represente um polipeptídeo individual (GÖRG et al., 2004).

Outros agentes que normalmente têm sido usados no tampão de extração devido a sua compatibilidade com a focalização isoeétrica também foram inovados a fim de se potencializar a solubilização dessas proteínas. Os agentes redutores novos são o TBP e o TCEP que aumentam a solubilização das proteínas durante a IEF e permitem o sucesso de suas transferências para a segunda dimensão quando comparados ao DTT, impedindo a perda de proteínas devido as suas precipitações (MECHIN et al., 2003).

A uréia foi empregada isoladamente por um longo período na IEF, mas algum tempo atrás foi observado que o uso combinado da uréia com a tiuréia aperfeiçoou a solubilização das proteínas, especialmente daquelas localizadas na membrana. Assim, o emprego de agentes caotrópicos, ou seja, a combinação destes agentes, se tornou imprescindível para a otimização da eficiência do tampão (GALVANI et al., 2001; MÉCHIN et al., 2003).

A dificuldade em se visualizar todas as proteínas da célula ou do extrato de tecido estudado está no fato de que cada proteína apresenta características distintas, como o nível de expressão, o peso molecular, o ponto isoeétrico e a solubilidade (GÖRG et al., 2004). Um desafio maior está na análise do proteoma total, já que ele apresenta uma ampla e desconhecida complexidade. Os mapas 2DE resultantes apresentam uma distribuição das proteínas que freqüentemente aparecem de uma forma complexa, podendo dificultar a identificação de proteínas envolvidas na regulação da associação planta - patógeno (GUTTEMBERGER & HAMPP, 1992; GUERREIRO et al., 1996).

## 7.2 Análises de imagem e dos dados

A análise da imagem do gel 2DE não é uma tarefa muito simples, mas sim trabalhosa e demorada. Ela é feita através de *software* que faz a detecção dos *spots*, o “*matching*” e a subtração do “*background*” das imagens. Com isso, obtém-se o valor da intensidade de cada *spot* e conseqüentemente o valor da quantidade das proteínas entre os grupos do experimento (CHANG et al., 2004).

Para este fim, vários *softwares* estão disponíveis o mercado como o PDQuest™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), Progenesis™ (NonLinear Dynamics, New Castle, UK), ProteomWeaver™ (Definiens, Munich, Germany) e o ImageMaster™ (Amersham Bioscience), que realizam as análises quantitativa e qualitativa das imagens dos géis, detectando simultaneamente o nível de expressão de centenas de proteínas (KARP et al., 2004). Os programas de análise de imagem dos géis 2DE têm sido constantemente melhorados, tornando-se cada vez mais rápidos e diminuindo a intervenção manual (GÖRG et al., 2004). No entanto, mesmo com o bom desempenho desses programas ainda aparecem dificuldades na análise.

Uma das dificuldades encontrada na análise das imagens 2DE, que é ressaltada por alguns pesquisadores é a baixa reprodutibilidade das réplicas dos géis devido aos problemas metodológicos como, por exemplo, a variação analítica (separação, coloração das proteínas e aquisição da imagem dos géis) e a variação biológica composta pela diferença entre as amostras (HUNT et al., 2005; COTTINGHAM & ERICKSON, 2005; BIRON et al., 2006). Esta dificuldade foi encontrada nas análises dos géis de laranja Pêra e de tangerina Poncan por apresentarem *spots* entre as réplicas dos grupos (sadio e inoculado) e entre os grupos com as mesmas variações metodológicas, mesmo escolhendo os géis mais representativos de cada amostra não foi possível eliminar estas variações, apenas minimizá-las.

Outro problema é a ocorrência de valores ausentes (*missing values*) na tabela de dados dos *spots* dos géis gerada pelo *software* que realiza a análise (GROVE et al., 2006). Os valores ausentes ocorrem quando o *spot* de uma proteína encontrado no gel de referência não é detectado pelo programa de análise de imagem ou o *spot* não é encontrado no gel de referência. Isso pode ser tanto devido a real falta da proteína no gel da amostra como a sua não detecção pelo *software*. Caso a falta da proteína no gel não seja verdade e efetuando-se

a inclusão do valor zero na tabela de dados estar-se-á incluindo um falso negativo na análise. Neste caso, é preferível se colocar a média dos valores do mesmo *spot* encontrados nos outros géis nessa tabela (CHANG et al., 2004; URFER et al., 2006).

Após a realização da análise comparativa entre os géis de referência de cada grupo (sadio e inoculado) e a obtenção dos valores de densidade ótica de cada *spot*, foi observado, tanto para laranja Pêra quanto para tangerina Poncan, ausência de valores para vários *spots*. Neste caso, usou-se também a média dos valores dos outros dois *spots* como sendo o valor do *spot* que não apresentou dado e, no caso da presença de apenas um valor dentre os três possíveis *spots* do grupo, o mesmo foi eliminado da análise incluindo-se o valor zero na tabela de dados.

Os valores ausentes são um problema na análise, visto que com eles perdem-se informações sobre o padrão da proteína gerando dificuldades na análise estatística. Alguns testes estatísticos não são capazes de proceder à análise sem que todos os dados estejam presentes, sendo que outros testes têm sua análise prejudicada ao se depararem com a falta de alguns valores (CHANG et al., 2004; GROVE et al., 2006).

Uma maneira de se tentar diminuir a existência de valores ausentes é a inspeção visual dos “*matching*” com a correção manual dos mesmos na presença de erros. Embora a edição manual dos *spots* melhore o “*matching*” entre os géis, há o risco de se remover informações importantes e/ou de se adicionar falsas informações (ALMEIDA et al., 2005; GROVE et al., 2006).

Todas as imagens dos géis analisados de laranja Pêra e de tangerina Poncan passaram por uma inspeção visual a fim de se detectar um provável “*matching*” errado ou presença de *spots* que não foram detectados pelo programa, fazendo a sua detecção manual se necessários; mesmo assim, houve a presença de valores ausentes.

Há também o problema na análise estatística devido à quantidade de réplicas empregada neste tipo de experimento. A técnica 2DE, mesmo sendo um método robusto, é onerosa e muito demorada e, devido a isso, a quantidade de géis elaborados neste experimento é mantida em um número mínimo, sendo a triplicata utilizada em sua maioria. Ao se utilizar tão poucas repetições corre-se o risco de não se detectar as proteínas de interesse e de não se ter certeza de que a diferença estatística observada nesse estudo reflete

de fato a real diferença encontrada entre os grupos ou se é apenas uma variabilidade encontrada dentro de cada grupo ou entre os grupos (GROVE et al., 2006).

Para se ter uma análise de expressão diferencial de confiança, testes estatísticos têm sido empregados com o intuito de se encontrar o efeito significativo dos grupos analisados ao nível predefinido de  $\alpha = 5\%$ . O método estatístico mais comumente usado na análise dos dados do proteoma é o Teste-T (não pareado), sendo empregado em mais de 60% dos trabalhos recentemente publicados (GROVE et al., 2006). Quando é aplicado um teste como este para se analisar o volume dos *spots* de um amplo número de proteínas, com nível de significância de 5% ir-se-á causar uma taxa de erro superior a 5%, conduzindo a um número significativo de falsos positivos. Além disso, é questionável o uso do Teste-T na análise proteômica devido à violação de uma forte suposição paramétrica (esse teste só deve ser aplicado para dados do tipo contínuo e com distribuição Gaussiana), sendo preferível o emprego de um teste não paramétrico (como o Mann-Whitney *U*). No entanto, para se empregar este teste é necessário um alto número de réplica ( $n > 7$ ) (Amersham Bioscience, 2004). Neste aspecto, o problema na análise de dados do proteoma parece ser bem similar ao encontrado nas abordagens no estudo de transcriptomas - estudo simultâneo de várias centenas de genes com menos de 10 repetições (KARP et al., 2005).

Neste trabalho optou-se por adotar o Teste-T como forma de se analisar a diferença significativa entre as proteínas expressas na laranja Pêra e na tangerina Poncan sadias em resposta à inoculação com a bactéria, por se tratar de um teste que mesmo não sendo muito indicado para verificar diferença entre grupos com pequenas repetições (triplicata, no caso) ainda consegue-se fazer a análise estatística. Outro motivo por tê-lo escolhido foi pelo fato de ter sido necessário fazer uma análise estatística em paralelo para os grupos de *spots* que apresentaram valores ausentes, e apenas o referido teste estatístico permitiu a realização da análise, os demais exigiam maior número de indivíduos (ou réplicas) por grupo.

Já existe uma preocupação em se tentar melhorar a análise. Vários pesquisadores já apresentaram opções de programas estatísticos e de como se realizar uma análise de imagem ideal para estudos como este. Por conseguinte, serão obtidas com maior certeza proteínas que apresentaram diferença de expressão entre amostras ou grupo de amostras analisadas (KARP et al., 2004; HUNT et al., 2004; CHANG et al., 2004; MEUNIER et al., 2005; BOULEY et al., 2005; MAURER et al., 2005; ALMEIDA et al., 2005).



### 7.3 Perfis do proteoma da laranja Pêra e da tangerina Poncan

Os perfis do proteoma da laranja Pêra e da tangerina Poncan se apresentaram de formas similares neste trabalho. No entanto, ao analisarmos apenas as proteínas diferencialmente expressas, percebemos que na laranja Pêra infectada com a *X. fastidiosa* elas se dispuseram em uma grande abrangência de pI e de massa molecular. Por sua vez, a tangerina Poncan apresentou maior número de proteínas diferencialmente expressas entre os pI 4 e 7 do gel de eletroforese bidimensional. Ainda se tratando das proteínas mais expressas e estatisticamente relevantes, a laranja apresentou um número superior na planta sadia, enquanto que na tangerina isso ocorreu na planta infectada. Por mais que não tenha sido possível a identificação por espectrometria de massas de uma grande parte das proteínas separadas em um gradiente de pH não linear de 3-10, fica claro ao observarmos os mapas proteômicos que estas duas plantas apresentam respostas bastantes distintas à infecção pelo referido patógeno.

A dificuldade encontrada neste trabalho em identificar uma grande parte das proteínas de laranja Pêra e de tangerina Poncan separadas em um gradiente de pH não linear de 3-10, pode ser atribuída a eventual presença de mais de uma proteína no mesmo *spot* no gel, pela ocorrência de modificações pós-traducionais e pela digestão incompleta das proteínas pela enzima (LEÓN et al., 2007).

Entre as proteínas identificadas, um grande número apresentou homologia com seqüências de espécies bem divergentes, como a *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa Japonica*. A homologia indica que estas proteínas são altamente conservadas entre as espécies de plantas. Outro aspecto é que estas espécies apresentam um grande número de seqüências de proteínas e genes disponíveis em bancos de dados internacionais, como o NCBI e o SWISSPROT.

Poucas proteínas demonstraram homologia com *Citrus sinensis* e/ou *Citrus reticulata*. Uma possível justificativa para esta observação é o reduzido número de proteínas e genes destes gêneros depositados em bancos, como no NCBI.

No nosso estudo, percebemos que houve a presença de proteínas que foram representadas em mais de um *spot*. A ocorrência de degradação e modificações durante as

etapas de preparo e isolamento da amostra ou diferentes etapas de processamento de uma proteína podem promover a presença de múltiplos *spots* (ANDRADE, 2006).

As proteínas de tangerina Poncan separadas em um gradiente de pH linear de 4-7 cuja identificação foi possível por espectrometria de massas foram agrupadas em categorias funcionais: energia, mecanismos de defesa e metabolismo primário e são detalhadas a seguir. Junto delas estão discutidas as proteínas identificadas de laranja Pêra e de tangerina Poncan separadas em um gradiente de pH não linear de 3-10.

### 7.3.1 Energia

#### *Fotossíntese*

A necessidade energética da planta é suprida pela fotossíntese. O processo fotossintético se dá com a participação de quatro complexos protéicos diferentes encontrados nas membranas dos tilacóides, o *fotossistema I* (FSI), o *fotossistema II* (FSII), o complexo citocromo *b<sub>6</sub> f* (*Cit bf*) e o complexo ATP sintase, que atuam de modo integrado. O fluxo fotossintético de elétrons entre os fotossistemas gera um gradiente de prótons (H<sup>+</sup>) através das membranas dos tilacóides, que impulsiona a síntese de ATP (KERBAUY, 2004).

No nosso estudo, foram encontrados alguns *spots* na tangerina Poncan separados em um gradiente de pH 4-7 que corresponderiam a proteínas classificadas como sendo relacionadas à fotossíntese: sete *spots* correspondendo a Ribulose bisfosfato carboxilase/oxigenase (724, 659, 827, 277, 866, 636 e 651), um *spot* (1005) sendo a proteína anidrase carbônica putativa e um *spot* (523) identificado como fosforibuloquinase. Todos eles, exceto o *spot* 277, apresentaram expressão protéica aumentada na tangerina Poncan colonizada pela *X. fastidiosa*.

A rubisco é um heterômero formado por oito subunidades grandes de 50-55 kDa mais oito pequenas subunidades e catalisa a reação de fixação do CO<sub>2</sub> durante a fotossíntese para a formação de moléculas orgânicas. Esta enzima apresenta duas funções simultaneamente: catalisa tanto carboxilação quanto a oxigenação do seu substrato, a pentose ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP). Os produtos da carboxilação da RuBP participam

de um ciclo de reações bioquímicas que gera carboidratos que sustentam a planta. Essa via metabólica é conhecida como ciclo de *Calvin-Benson* ou ciclo *fotossintético redutivo*. Já o produto da oxigenação da RuBP é apenas processado na via metabólica conhecida como via  $C_2$  ou *via fotorrespiratória* com o consumo de  $O_2$  e com a perda de  $CO_2$  já fixado. Os dois ciclos competem com o mesmo sítio ativo da enzima, operam em sentidos opostos e são sustentados pelo ATP e pelo poder redutor (NADPH e ferredoxina reduzida) produzidos no fluxo fotossintético de elétrons (SPREITZER; SALVUCCI, 2002; KERBAUY, 2004).

Na laranja Pêra, ao contrário da tangerina Poncan, a Rubisco apresentou-se menos expressa no grupo infectado, o que poderia indicar que a taxa de fotossíntese nas plantas de laranja Pêra com CVC está comprometida. De acordo com Ribeiro e colaboradores (2003), plantas colonizadas pela *X. fastidiosa* apresentam baixa taxa fotossintética. Esta mudança ocorre nas plantas infectadas antes dos sintomas aparecerem e são provavelmente causadas pela baixa condutância dos estômatos e injúrias bioquímicas no maquinário fotossintético.

A proteína anidrase carbônica é uma enzima que catalisa a rápida conversão do dióxido de carbono em bicarbonatos e prótons. Em plantas, ela ajuda a aumentar a concentração de  $CO_2$  nos cloroplastos no intuito de se aumentar a taxa de carboxilação da enzima rubisco. A fosforibuloquinase é uma enzima que também participa do ciclo de Calvin, em um passo chave da via da pentose fosfato. Ela catalisa a fosforilação da ribulose-5-fosfato para formar a ribulose-1,5-fosfato, reação esta dependente de ATP (FÖSTER et al., 2006). Como na tangerina Poncan a expressão destas proteínas foi aumentada, possivelmente ela estaria aumentando a concentração de  $CO_2$  no cloroplasto para aumentar a eficiência da carboxilação da Rubisco, mantendo ou até mesmo aumentando a taxa de fotossíntese na presença da bactéria visando sustentar a produção de ATP e a formação de novas moléculas orgânicas como o carboidrato, ácidos nucleicos e glicose.

Nesta categoria também se encontram as proteínas *Oxygen-evolving enhancer protein 1* que foi representada pelo *spot 725* (que esteve mais expressa na tangerina Poncan com CVC no gel de pH 4-7) e pelo *spot 2013* (mais expressa na laranja Pêra com CVC). As proteínas estão localizadas no lúmen do tilacóide e são altamente conservadas nos cloroplastos de organismos fototróficos. Antes, as suas funções estavam vinculadas ao aperfeiçoamento de se agrupar o manganês no processo de oxidação da água. Mais adiante, atribuiu-se também a elas a proteção do complexo de fotossistema II contra a ação de

radicais de oxigênio formados na presença de luz e contra o estresse térmico (SEIDLER, 1996; BRICKER & FRANKLE, 1998; HEIDE, KALISZ, FOLLMANN, 2004).

O aumento da sua expressão na laranja Pêra e na tangerina Poncan inoculadas com a bactéria poderia indicar a presença de espécies reativas de oxigênio e possivelmente demonstrar uma tentativa destas plantas em preservar o maquinário fotossintético, mantendo-se assim o nível da taxa de fotossíntese.

Os cloroplastos e as mitocôndrias são adicionais fontes potenciais de espécie reativas de oxigênio (EROs) e apresentam mecanismos bem desenvolvidos para desintoxicar rapidamente a planta dos radicais livres (ROBSON & VANLERBERGHE, 2002; IVANOV & KHOROBRYKH, 2003).

O sistema antioxidante das plantas expostas por muito tempo a condição de estresse (seca) não consegue lidar com a geração excessiva de EROs, acarretando danos severos à fotossíntese por causar a inativação irreversível do aparato fotossintético (SHIKANAI et al., 1998). A laranja Pêra infectada com a bactéria parece estar lidando com a mesma situação, uma vez a *X. fastidiosa* acarreta um efeito indireto na fotossíntese por induzir um forte déficit hídrico (situação encontrada no estágio mais avançado da doença) ou um efeito direto (no início da colonização), possivelmente através da produção de toxinas que de alguma forma desacoplaria a cadeia de transporte de elétrons (MACHADO et al., 1994), favorecendo a formação de radicais livres.

### ***Transdução de Energia***

Neste grupo foram identificados *spots* correspondentes às proteínas: subunidade CF1 $\alpha$  da ATP sintase, subunidade B vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase e subunidade catalítica de prótons ATPase tipo V.

A ATP sintase é um complexo enzimático localizado na membrana interna da mitocôndria e também na membrana do tilacóide dos cloroplastos, que catalisa a formação de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico durante a fosforilação oxidativa e a fotossíntese, respectivamente. É formada por um componente integral da membrana (porção CF<sub>0</sub>) e uma porção periférica (CF<sub>1</sub>) acoplada a primeira. A subunidade CF<sub>0</sub> é

constituída por uma proteína altamente hidrofóbica, com aproximadamente 8 kDa, que atua como um canal iônico por onde passam os prótons. A subunidade CF<sub>1</sub> contém o centro catalítico da enzima. A síntese de ATP fornece energia para a manutenção da célula, para a divisão e diferenciação celular (RIBEIRO, 2004).

Na tangerina Poncan, entre as proteínas analisadas em um gel de pH não linear de 3-10, a subunidade CF1 $\alpha$  da ATP sintase foi identificada, sendo representada pelos *spots* 215 (expressão aumentada na planta com CVC) e 231 (expressão diminuída na planta com CVC). Tendo em vista a analogia entre o perfil destas proteínas no gel 2DE com o padrão geralmente visualizado na análise de isoformas, foi possível concluir que estas duas proteínas também seriam isoformas diferentes que poderiam ter funções distintas, dependendo das condições do ambiente que a planta é exposta.

O metabolismo da planta é totalmente alterado em contato com o agente patogênico, uma vez que a indução da defesa é de custo intensivo. Mesmo havendo uma redução na taxa fotossintética, a taxa de produção de energia aumenta significativamente em interação de plantas com os seus patógenos. A manutenção e divisão celular do microrganismo requerem a atividade da maquinaria bioquímica relacionada ao anabolismo de macromoléculas como proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Adicionalmente tais processos demandam energia e envolvem o gasto de ATP (BRIGATI, 2009).

Outro fato que poderia contribuir para o aumento da síntese de ATP estaria relacionado com a foto aclimatação do cloroplasto, pois se acredita que na presença de vários tipos de estresse como o luminoso, hídrico e por altas ou baixas temperaturas, ela seja regulada por um mecanismo comum por meio dos metabólitos redox. Este mecanismo sugere que o estado redox da cadeia de transporte de elétrons entre os fotossistemas FSII e FSI seja o primeiro sinal para modular a resposta da planta às flutuações ambientais (JIAO, HILAIRE, GUIKEMA, 2004). Em condições normais, a fotofosforilação cíclica e acíclica dos elétrons coexistem, atuando de modo cooperativo no sentido de manter o equilíbrio do sistema fotoquímico. O fluxo cíclico de elétrons (transporte de elétrons apenas pelo FSI) pode ser intensificado em situações de estresse luminoso e quando há falta de CO<sub>2</sub> (condição comum no estresse hídrico), pois começa a haver o acúmulo de NADPH e de ferredoxina reduzida no estroma e a falta do receptor final de elétrons, o NADP<sup>+</sup>, aumentando o fluxo de elétrons e conseqüentemente a formação de radicais livres

(KERBAUY, 2004). O aumento da ativação da ATP sintase na tangerina Poncan possivelmente teria também uma função protetora contra a formação de radicais livres, uma vez que ela diretamente diminui o gradiente de prótons.

Em tangerina Poncan inoculada com a *X. fastidiosa* separadas em um gradiente de pH de 4-7 a subunidade CF1 $\alpha$  da proteína ATP sintase também foi representada pelos *spots* 294 e 301, só que desta vez apareceram com a expressão protéica diminuída. Isso poderia ser resultado de uma alteração na demanda de ATP devido à sua interação com o patógeno. Provavelmente a planta estaria diminuindo a oferta de energia para o patógeno, dificultando a reprodução da bactéria.

As proteínas subunidade *B* da *vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase* (identificada no *spot* 318) e subunidade catalítica de prótons ATPase tipo V (representada pelo *spot* 208) são responsáveis pela acidificação de compartimentos intracelulares em células eucarióticas (GRUBER et al., 2001; NISHI, FORGAC, 2002). Em plantas, a acidificação dos compartimentos vasculares pela *V-ATPase* é essencial e está envolvida em diversas funções. Dependendo do tecido, do estágio de desenvolvimento e do sinal recebido pela planta, estão incluídos nessas funções a osmoregulação, o transporte e armazenamento de íons e metabólitos, a transdução de sinal, o armazenamento e renovação de proteínas, o armazenamento de metabólitos secundários e as proteínas de defesa (HARD, SZE, 1992; HERMAM et al., 1994; SUPEKOVA et al., 1996). Essas proteínas tiveram as suas expressões aumentadas na interação da tangerina Poncan com o patógeno. Isto pode sugerir o reconhecimento do patógeno pela tangerina Poncan e conseqüentemente a ativação do seu mecanismo de defesa contra o invasor, como por exemplo, a produção de óxido nítrico. Uma possível explicação para a indução do mecanismo de defesa da tangerina Poncan seria o reconhecimento de padrões de moléculas derivadas do patógeno (como por exemplo, as PAMPs) pela planta, ativando a via de sinalização e a expressão de proteínas relacionadas à defesa.

Uma molécula que pode ser formada em meios ácidos é o óxido nítrico (NO). Ele é um radical livre que pode tanto perder ou ganhar elétron. A formação de NO pode ser realizada de maneiras diferentes, e uma delas é a formação não enzimática a partir do nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) na presença de um agente redutor como ascorbato e compostos fenólicos. Como esta reação requer a não dissociação da forma ácida do NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a produção química de NO é

insignificante em pH fisiológico, mas é favorecida sob condições ácidas em tecidos e compartimentos (BELIGNI & LAMATTINA, 2001).

O metabolismo da planta é altamente influenciado pelo NO, estando ele envolvido no crescimento e desenvolvimento da planta, no mecanismo de sinalização e durante situações de estresses bióticos e abióticos (BELIGNI & LAMATTINA, 2001). O NO também tem sido envolvido com a resistência da planta ao ataque de patógenos avirulentos (ROMERO-PUERTAS et al., 2004).

Em experimentos realizados em tabaco feito por Durner e colaboradores (1998, apud ROMERO-PUERTAS et al., 2004) ficou demonstrado que o tratamento com NO induz o acúmulo do ácido salicílico. O ácido salicílico apresenta uma importante função durante a interação incompatível da planta com o patógeno em ambas as formas de resistência local e sistêmica, resultando na estimulação inicial, na explosão oxidativa e na expressão de genes relacionados à defesa. Na tangerina Poncan também foi observada um aumento da expressão da proteína relacionada com a explosão oxidativa, a *Respiratory burst oxidase homolog protein D*, sendo esse mecanismo um evento comum em estresses bióticos e abióticos. A explosão oxidativa participa de um sistema integrado e amplificado de sinalização, que envolve o ácido salicílico e cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) citosólico no disparo do mecanismo de defesa (LAMB & DIXON, 1997). Geralmente está associada à resposta de defesa da planta após o reconhecimento do patógeno, conduzindo a reação de hipersensibilidade (HR) e promovendo o estabelecimento gradual da resistência sistêmica adquirida (SAR) (RESENDE, SALGADO, CHAVES, 2003). A rápida geração de espécies reativas de oxigênio é considerada como um importante componente de resposta de plantas resistentes ao patógeno (SONG et al., 2006).

### ***Carboidratos***

Neste grupo foi encontrada a proteína *Ribulose-phosphate-3-epimerase, chloroplastic* (EC 5.1.3.1) (*spot* 733 que esteve aumentado na tangerina Poncan inoculada com a bactéria). Ela é uma enzima pertencente à família de isomerases e participa da biossíntese de carboidratos, convertendo, por epimerização, a xilulose 5-fosfato em ribulose 5-fosfato. Esta enzima também participa na parte oxidativa da via das pentoses fosfato, via

esta localizada nos cloroplastos (TEIGE et al., 1995), participa na fixação de carbono (ciclo de Calvin) e interconversão de pentose e glucuronato.

A via oxidativa das pentoses fosfato exerce uma função essencial no metabolismo intermediário de carboidratos nas células procarióticas e eucarióticas. Na etapa oxidativa da glicose de sua via a energia formada é armazenada na forma de poder redutor (NADPH) e não para a síntese de ATP. Essa energia pode ser usada na síntese de ácidos graxos e aminoácidos. A participação de enzimas que fazem a interconversão de glicídios fosforilados na parte não oxidativa desta via pode, a partir da eritrose 4-fosfato formar produtos que são usados para a síntese de aminoácidos aromáticos, flavonóides e lignina (KOPRIVA, KOPRIVOVA, SÜS, 2000).

A entrada do patógeno além de induzir as reações de defesa da planta também provoca alterações no metabolismo de carboidratos. Já que, possivelmente o patógeno tenta manipular o metabolismo de carboidratos da planta para o seu próprio proveito; enquanto que a planta tenta reorganizar os fluxos de carbonos para assegurar a batalha contra o mesmo (BERGE et al., 2004).

### **7.3.2 Mecanismos de defesa**

#### *Estresse*

As chaperonas são moléculas responsáveis pelo dobramento da proteína recém sintetizadas, sendo que muita delas se tornam funcionais depois deste evento. São divididas em famílias de acordo com o seu peso molecular, e a principal característica de cada família está relacionada com o estado de oligomerização, presença de atividade ATPase e interação com outras chaperonas. Foram classificadas como *heat shock proteins (HSP)* devido ao seu comportamento em resposta a condições de estresse. As mudanças de conformação realizadas pelas chaperonas regulam certas vias de tradução, e muitas delas estão ligadas à resposta ao estresse (HARTI, 1996; BORGES, RAMOS, 2005).

A conservação evolutiva das HSPs sugere que estas proteínas estão envolvidas em processos celulares fundamentais como: modificação pós-tradução, dobramento de



proteínas, translocação de proteínas através da membrana, reunião de proteínas oligoméricas, modulação da atividade de receptores, proteção de mRNA e mecanismos relacionados à proteção ao estresse (LEONE et al., 2000), sendo também observado a indução das suas sínteses em resposta ao ataque de patógenos (JELITTO-VAB DOORE et al., 1999).

Incluídas neste grupo funcional, foram encontradas as proteínas *Chaperonin CPN60-2-mitochondrial* (spot 247, mais expresso na tangerina Poncan infectada com a bactéria), proteína precursora da *HSP60* e a *GroEL-like chaperone, ATPase* (spots 254 e 250). O aumento da expressão dessa proteína pode indicar a estimulação de síntese de proteínas para reparar algum dano celular e para ativação do mecanismo de defesa da tangerina Poncan.

Na interação da tangerina Poncan com a *X. fastidiosa* a proteína, *GroEL-like chaperone, ATPase*, apresentou sua expressão diminuída, quando comparada com a planta sadia. Esta proteína é um complexo de aproximadamente 800 kDa que inibi a agregação de proteínas, apresentando uma atividade ATPase (TODD & LORIMER, 1995; KERNER et al., 2005). A GroEL hidrolisa o ATP mesmo na ausência de polipeptídeos desdobrados; sua atividade pode ser inibida pela GroES. A inibição da atividade ATPase dessa chaperona é dependente da concentração do íon potássio e da taxa de ATP e ADP (TODD & LORIMER, 1995). É sabido que a ligação do ATP causa uma mudança conformacional das moléculas GroEL, na qual permite a liberação do seu substrato.

### ***Miraculina***

Uma das proteínas caracterizadas como induzidas, apresentando aumento de expressão na tangerina Poncan, durante a infestação da *X. fastidiosa* foi a miraculina (spots 646 e 713). Esta é uma proteína básica e altamente glicosilada pertencente à família STI (THEERASILP et al., 1989), contendo uma atividade inibitória contra proteases serínicas. A miraculina é capaz de formar homodímeros e homotetrâmeros que têm atividade modificadora de sabor (IGETA et al., 1991).

Um dos principais mecanismos de regulação protéica se dá pela ação das proteases. Estas enzimas participam do processo de tradução, da clivagem de peptídeos-sinal durante o

direcionamento de proteínas e da degradação das proteínas nos proteossomos. No entanto, a principal função das proteases talvez seja a ativação e desativação de enzimas (MONDEGO, 2005).

Um dos fatores de virulência da *X. fastidiosa* é a produção de toxinas que lesam ou matam células vegetais, facilitando a colonização da bactéria na planta. No seu genoma foram encontrados genes que codificam toxinas e a produção de antibióticos (SIMPSON et al., 2000). Fica plausível supor que a miraculina pode estar sendo sintetizada pela tangerina Poncan no intuito de inativar estes fatores, dificultando assim, a colonização da bactéria em seu xilema.

### ***Aldo-ceto redutases***

As Aldo-ceto redutases (AKRs) são proteínas monoméricas com cerca de 320 aminoácidos de comprimento que metabolizam uma diversa faixa de substratos, incluindo os aldeídos alifáticos e aromáticos, monossacarídeos, esteróides, prostaglandinas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e isoflavonoides, e são capazes de catalisar a redução de aldeídos e de grupos carbonil (JEZ et al., 1997a). Estão representadas por uma super família de enzimas oxidoreduções dependentes de NADPH que compartilham características estruturais e funcionais. Mais de 140 AKRs já foram identificadas entre os eucariotos e procariotos, estando agrupadas em 15 super famílias diferentes (HUR et al., 2009).

Aldeídos e cetonas são intermediários importantes em muitas vias metabólicas como o metabolismo de açúcar, biossíntese de esteróides, metabolismo de aminoácidos e biossíntese de metabólitos secundários. Por causa da reatividade do grupo carbonil, muitos aldeídos e cetonas são mutagênicos e representam um perigo em potencial para a célula microbiana (MARNETT et al., 1985).

O *spot* 542 identificado como sendo a proteína *aldo-keto reductase* também foi induzido na tangerina Poncan durante a infestação pela *X. fastidiosa* apresentando a sua expressão aumentada. Como esta proteína está relacionada com a produção de metabólitos secundários, pode estar havendo o estímulo de suas produções para atacar o patógeno.

Os metabólitos secundários são moléculas que possuem características químicas muito variadas e, às vezes, bem complexas. Geralmente estão envolvidas em funções vitais e dificilmente fazem parte do metabolismo básico (HALL, 2006). Eles atuam como componentes estruturais, como atrativos para polinizadores e agente de defesa contra herbívoros e patógenos, evitando neste caso a colonização ou o crescimento, reprodução, desenvolvimento ou sobrevivência dos mesmos. Os principais grupos de metabólitos secundários são os alcalóides, terpenóides, fenólicos, glicosinolatos, compostos cianogênicos, os flavonóides e taninos (WALLING, 2000).

### *Catalases*

As catalases são enzimas responsáveis pela proteção contra o estresse oxidativo, convertendo  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (BREUSEGEM et al., 2001). Elas são essenciais no desenvolvimento das plantas, defesa, envelhecimento e senescência (YANG & POOVAIAH, 2002). As plantas possuem várias isoformas de catalase (CAT1, CAT2 e CAT3), as quais estão presentes nos peroxissomas e glioxissomas. Elas estão agrupadas em três classes: as catalases de classe 1 removem o  $H_2O_2$  produzido durante a fotorespiração em tecidos fotossintéticos; as catalases da classe 2 são produzidas em tecidos vasculares e podem exercer uma função de lignificação, mas sua exata função biológica permanece desconhecida; e as catalases da classe 3 estão presentes abundantemente em sementes e plantas jovens, e cuja atividade está relacionada à remoção de  $H_2O_2$  produzido durante a degradação dos ácidos graxos no glioxissoma (RESENDE et al., 2003).

A proteína *catalase 2* foi identificada no *spot* 1677 e apresentou expressão diminuída na laranja Pêra inoculada com a *X. fastidiosa*. Possivelmente deve estar ocorrendo a diminuição da lignificação. A lignina é um polímero fenólico complexo que confere à planta rigidez mecânica, além de contribuir para a formação de barreiras contra patógenos. O processo de lignificação é visto, pelo pesquisador Vance et al. (1980), como um mecanismo de resistência à doenças. O processo de lignificação é observado em muitas espécies de plantas em resposta à infecção por agentes patogênicos, tais como fungos, bactérias, nematóides e vírus (STICHER et al., 1997). Sendo assim, a diminuição da expressão da

proteína CAT2 poderia beneficiar a bactéria, pois ela encontraria maior facilidade em colonizar os vasos da planta hospedeira. Possivelmente a bactéria está produzindo algum tipo de substância que está afetando a síntese desta proteína. Nesta planta, em fase avançada da doença, os seus vasos do xilema se encontram parcialmente bloqueados ou limitados pelo biofilme bacteriano (SOUZA et al., 2007a).

### *Serina/treonina quinases*

As serina/treonina quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de resíduos de serina ou treonina das proteínas, por meio da transferência de um grupo fosforila de ATP ou de outros nucleotídeos, resultando numa mudança conformacional e conseqüentemente alterando a atividade dessas proteínas. Elas participam de vários processos celulares como apoptose, divisão, proliferação, diferenciação celular e apresentam função chave no controle intracelular, regulação e transdução de sinal (SILVA et al., 2009). Estas proteínas estão envolvidas com o reconhecimento do patógeno, desencadeando a ativação do mecanismo de defesa das plantas. Esta ativação ocorre durante a infecção, quando os PRRs (*pattern recognition receptor* - receptores da planta de reconhecimento das moléculas do patógeno) reconhecem as moléculas PAMPs (*pathogen associated molecular pattern*) (ROMEIS, 2001). Os PRRs são codificados pelo hospedeiro e fazem a intercessão do reconhecimento do patógeno pelo sistema imune inato; eles são altamente sensíveis e são receptores específicos para o reconhecimento de moléculas PAMPs. Após a percepção do ligante, ocorre a ativação da cascata de sinalização que resulta numa resposta de defesa típica (GÖHRE e ROBATZEK, 2008).

A proteína serina/treonina quinase foi identificada em ambas as plantas. Na tangerina Poncan (*spot* 606) ela apresentou expressão aumentada e na laranja Pêra (*spot* 1464) expressão diminuída. No caso da laranja Pêra, a bactéria *X. fastidiosa* pode estar secretando moléculas efetoras que estariam suprimindo a sua defesa basal, promovendo a proliferação da bactéria e condicionando a doença. As moléculas efetoras são importantes para a virulência do patógeno, pois são elas que promovem a penetração dele nos tecidos do hospedeiro, permitem o acesso aos nutrientes, conferem persistência ao patógeno dentro do hospedeiro, agem na supressão da resposta imune além de permitirem a proliferação e o

crescimento do patógeno. Na bactéria, a liberação dessas moléculas no apoplasto e no interior das células do hospedeiro pode acontecer via sistemas de secreção tipo II ou tipo III (GÖHRE e ROBATZEK, 2008). A *X. fastidiosa* só apresenta o sistema de secreção tipo II sendo este essencial para a sua patogenicidade, uma vez que, por meio dele a bactéria pode exportar enzimas de degradação para a parede celular do hospedeiro, incluindo endonucleases, poligalacturonases e talvez várias proteases. Estas enzimas ao degradarem as membranas da planta hospedeira facilitam o movimento da bactéria para vasos do xilema ainda não colonizados. Outras funções podem ser a mobilização da parede celular para o propósito nutricional ou para superar as defesas da planta (DOW e DANIELS, 2000).

Outra proteína que apresentou expressão aumentada na tangerina Poncan foi a proteína de resistência a doença (*disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)*) (*spot 448*). As proteínas NBS-LRR em plantas contêm séries repetidas ricas em leucina (LRRs) que funcionam como sítio de ligação para a interação proteína-proteína, proteína-carboidrato e para peptídeos. Estas proteínas apresentam também um sítio de ligação de nucleotídeo (NBS), que serve para a ligação de ATP ou GTP e um domínio de sinalização putativo amino terminal.

Existem duas maiores subfamílias das proteínas NBS-LRR em plantas, definidas pela presença do receptor Toll/interleucina-1 (TIR) ou por motivos super helicoidizados (CC) no domínio amino terminal. Elas estão envolvidas na detecção de diversos patógenos, incluindo bactérias, vírus, fungos, nematóides e insetos (MCHALE et al., 2006), monitorando direta ou indiretamente a presença ou a ação de moléculas efetoras derivadas do patógeno (DANGL & JONES, 2001; BELKHADIR, SUBRAMANIAM e DANGL, 2004). Estas proteínas agem por meio do entrelaçamento das vias de sinalização e induzem uma série de respostas de defesa da planta, como a ativação da explosão oxidativa, fluxos de cálcio e íons, cascata da proteína quinases associada ao mitógeno, indução de genes relacionados a patogêneses e a resposta hipersensitiva (MCHALE et al., 2006).

A sobrevivência da planta ao ataque de patógenos depende do rápido reconhecimento do organismo invasor e da ativação do seu mecanismo de defesa. Este reconhecimento é realizado pela detecção de moléculas eliciadoras originárias do patógeno (por exemplo, peptídeos, oligossacarídeos ou moléculas sinalizadoras baseadas em lipídeos)

ou pela detecção dos produtos de degradação da parede celular da planta. Após o reconhecimento do patógeno, inicia-se o evento de sinalização que ativa as primeiras respostas celulares, como síntese de espécies reativas de oxigênio e mudanças da transcrição de genes (HEATH, 2000; ROMEIS, 2001). Possivelmente isto está acontecendo na tangerina Poncan.

### ***Tiorredoxinas***

As tiorredoxinas (Trxs) são pequenas oxiredutases dissulfeto, geralmente termoestáveis possuindo cerca de 110 aminoácidos em sua forma madura. São especializadas na redução de pontes dissulfetos de outras proteínas, possuindo vários papéis na célula, como a regulação redox de enzimas alvos e de fatores de transcrição, desintoxicação de metais pesados e dissipação do estresse oxidativo, além de também servirem como doadores de hidrogênios para peroxirredoxinas, peroxidases sem ferro recentemente descobertas (ISHIWATARI et al., 1995; JACQUOT et al., 2002). As Trxs do cloroplasto *f* e *m* regulam a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de carbono (participam na regulação da fotossíntese) e a Trx citosólica *h* participa na mobilização das reservas de sementes durante a germinação (SANTOS e REY, 2006). Em várias espécies de plantas, a expressão do gene Trx é frequentemente associado ao contexto fisiológico caracterizado pelo aumento dos níveis de EROs (espécies reativas de oxigênio). O controle fino da homeostasia redox é fundamental no metabolismo da célula por causa das espécies reativas de oxigênio que em níveis sutis agem como moléculas de sinalização nos processos biológicos como desenvolvimento e percepção de estresse, enquanto que em níveis elevados ocasionam danos oxidativos de macromoléculas (MITTLER et al., 2004).

O *spot* 623 foi identificado como sendo *conserved hypothetical protein* semelhante à *TRX\_CDSP32* e apresentou expressão aumentada na tangerina Poncan inoculada com a bactéria. A CDSP 32 é uma tiorredoxina peculiar, estando localizada no estroma do cloroplasto e o seu nome vem de proteína cloroplástica induzida pelo estresse hídrico (SANTOS e REY, 2006). A proteína madura contém 243 resíduos e dois domínios homólogos aos das proteínas tiorredoxinas (BROIN et al., 2000).

Já é conhecido que a seca, através do fechamento dos estômatos, induz a redução da disponibilidade de CO<sub>2</sub> para a rubisco. Conseqüentemente ocorre à absorção de energia luminosa em excesso, o que acaba provocando um desvio do poder de redução para o oxigênio e um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (BROIN et al., 2000). Foi observado nas plantas *Solanum tuberosum* que esse tipo de tiorredoxina é altamente sintetizado em situações severas de déficit hídrico. A sua função já foi apontada como estando relacionada com a tolerância do aparato fotossintético a desidratação (REY et al., 1998). Foi mencionado também que a CDSP 32 pode regenerar as proteínas inativadas pela mudança redox ou pode fornecer elétrons para as proteínas dependentes de tiorredoxinas envolvidas no sequestro de peróxidos (BROIN et al., 2000).

De forma análoga, esse mecanismo pode estar acontecendo na tangerina Poncan, como uma tentativa de se manter a taxa de fotossíntese mesmo em situação de estresse hídrico.

### ***GTPase***

Pequenos monômeros (20-40 kDa) GTPases pertencem a super família Ras de GTPases e estão envolvidos com a regulação de uma ampla variedade de processos celulares, como a proliferação e adesão celular, movimento da célula, divisão, secreção e diferenciação celular. Ras é ativada pela troca de ligação de GDP por GTP, num processo catalisado pelos fatores de troca do nucleotídeo guanina (GEFs). Uma vez que Ras é ativada ela se associa com um número de alvos, ou efetores para exercer seu efeito biológico (WOLTHUIS e BOS, 1999). A super família Ras é dividida em cinco principais famílias funcionais de GTPases, sendo elas: Ras, Ran, Rab, Arf/Sar e Rho (SORMO et al., 2006).

O *spot* 414 apresentou expressão aumentada na tangerina Poncan inoculada com a bactéria e foi identificado com sendo *unnamed protein product* pertencente à *Ras-like GTPase superfamily*. Quatro das principais famílias funcionais da super família Ras têm sido identificadas em *Arabidopsis thaliana* (Ran, Rab, Arf/Sar e Rho), com um total de 93 genes codificando monômeros de GTPases (VERNOUD et al., 2003). No entanto, a família

Ras é ausente em plantas, bem como os membros da subfamília de Rho, como RHO e CDC42 GTPases (SORMO et al., 2006).

A família Rho em *A. thaliana* consiste de 11 *RAC-like GTPases* (AtRAC) e tem uma homologia global com a subfamília RAC de leveduras e animais. Esta família de Rho de plantas tem sido chamada também de proteínas Rho relacionadas de plantas (ROP) (YANG, 2002). Estudos funcionais têm demonstrado que RAC/ROP GTPases de vegetais coordenam numerosos processos nas plantas como resposta a hormônio, crescimento e diferenciação da célula, resposta a estresse e defesa contra patógeno (SORMO et al., 2006).

### 7.3.3 Metabolismo primário

#### *Metabolismo dos nucleotídeos*

A enzima UTP glucose 1 fosfato uridililtransferase é responsável por catalisar a formação de UDP-glucose através da fosforilação da alfa-D-glucose 1-fosfato. Para que ocorra a ativação da enzima é requerido um íon metálico como o  $Mg^{+2}$  e a sua regulação por inibição é feita com moléculas livres de UTP. A enzima ocupa um papel central no metabolismo dos açúcares de nucleotídeos. A UDP-glucose está também envolvida com a síntese da glicose e com a formação de celulose e calose (MENG et al., 2009). Esta proteína foi identificada no *spot 290*, que foi menos expresso na tangerina Poncan infectada com a *X. fastidiosa*. A deposição da calose é uma resposta de defesa da planta contra o agente agressor, tendo como função dificultar a entrada do patógeno no citoplasma da planta (GÖHRE & ROBATZEK, 2008).

#### *Metabolismo de aminoácidos*

Foram identificadas duas proteínas envolvidas com o metabolismo de aminoácidos, sendo elas a proteína *5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine-methyltransferase* (*spot 153*) e a proteína *glycine dehydrogenase decarboxylating*



*mitochondrial (spot 205)*, ambas se apresentaram mais expressas na tangerina Poncan inoculada com a bactéria.

A metionina sintase catalisa a formação de metionina através da transferência de um grupo metil da 5-metil-tetra-hidrofolato para a homocisteína. Esta reação é o último passo da biossíntese da metionina e é o ponto onde a via do metabolismo de um carbono converge para a via do metabolismo de metionina. Em plantas existe apenas a metionina sintase independente de cobalamina (vitamina B12) representando a segunda classe desta enzima; ela também é encontrada em fungos e em alguns procariotos (SULIMAN, APPLING e ROBERTUS, 2007). A síntese de metionina ocorre em uma via com um complexo circuito regulatório cujo ponto intermediário desta via, em plantas, é o *O*-fosfo-homoserina (OPHS), um substrato comum para treonina sintase (TS) e para a cistationina  $\gamma$ -sintase (CgS) (HESSE et al., 2004; ROEDER et al., 2009).

A formação da metionina acontece em três passos. Primeiramente ocorre a condensação da cisteína, depois o OPHS é catalisado pela CgS resultando em cistationina que é subsequentemente convertida em homocisteína pela cistationa  $\beta$ -liase e finalmente em metionina pela metionina sintase (DANCS, KONDRÁK e BÁNFALVI, 2008). A metionina sintase além de sintetizar a metionina também tem a função de regenerar o grupo metil da S'adenosil-L-metionina (HESSE et al., 2001).

Eventualmente cerca de 20% da metionina formada é incorporada nas proteínas enquanto que 80% é convertida em S'adenosil-L-metionina (SAM). A formação de SAM se dá pela adenilação da metionina com a participação da enzima S'adenosil-L-metionina sintetase. SAM é um importante doador biológico de metil envolvido na metilação de vários compostos celulares (como DNA, RNA, proteínas e lipídeos) e voláteis e um precursor da síntese de metabólitos, como etileno, poliaminas, nicotiaminas e biotina (HESSE et al., 2004; ROEDER et al., 2009).

O etileno é um hormônio vegetal que possui múltiplas funções fisiológicas, participando da regulação de praticamente todos os processos de crescimento, desenvolvimento e senescência das plantas. Além disso, este hormônio é sintetizado tanto como resposta a ferimentos como à infecção por patógenos, participando também na modulação de resposta da planta a estresse abiótico como em condição de falta de água

(AHARONI, 1976; CHANDLER, 1988; HYODO, 1991; GROSSKOPF et al., 1991). O primeiro passo para a ativação da biossíntese de etileno é o reconhecimento das moléculas eliciadoras derivadas do patógeno ou moléculas de avirulência pelos receptores da planta. O aumento da produção do etileno induz genes relacionados à defesa que codificam proteínas que participam na intensificação das barreiras físicas e no confinamento físico do patógeno, enzimas do metabolismo secundário e as proteínas relacionadas à defesa (PR) (BROEKAERT et al., 2006). Conforme relato de Boller (1990), exposição de plantas a etileno induz os mecanismos de defesa associadas ao sistema de resistência adquirida (SAR), como síntese de proteínas relacionadas com patogênese (PRPs) e lignificação.

Na tangerina Poncan, a indução da expressão da proteína *5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine-methyltransferase* pode estar favorecendo a produção de etileno que irá desencadear um dos mecanismos de defesa da planta contra este patógeno.

A *glycine dehydrogenase decarboxylating mitochondrial* é uma enzima que ajuda na quebra da glicina. Na fotossíntese nos cloroplastos, alguma porção da ribrose-1,5-difosfato do ciclo de Calvin é oxidada a glicolato-2-fosfato e glicerato-3-fosfato pela atividade oxigenase da rubisco. O glicolato formado sai do cloroplasto e entra no peroxissoma onde é transformado em glicina pela via do glioxilato (via alternativa de metabolismo de acetil-CoA encontrada nos vegetais e em algumas bactérias que permite a síntese de glicose e a produção de intermediários do ciclo de Krebs a partir do acetil-CoA). Depois a glicina se move até a mitocôndria e é decomposta a  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ , NADH e serina pelo sistema de quebra da glicina. A serina é convertida principalmente em glicerato-3-fosfato e participa novamente do ciclo de Calvin. A reação de quebra da glicina é um tipo de reação de salvamento da fotossíntese nas plantas. Nos tecidos das plantas, o NADH formado pela reação de quebra da glicina pode ser utilizado principalmente na redução do oxaloacetato a malato como na fosforilação oxidativa da mitocôndria (KIKUCHI et al., 2008).

Com isso a planta pode estar intensificando o processo fotossintético com intuito de se produzir mais energia a ser utilizada no combate ao patógeno.

### ***Ribossomo***

Os ribossomos são partículas compostas de RNA e proteínas, que se associam ao RNA mensageiro e catalisam a síntese de proteínas em todos os organismos. As proteínas ribossomais são nomeadas de acordo com a subunidade do ribossomo ao qual pertencem. Na subunidade 60S de eucariotos ocorre a presença de uma família de proteínas conhecidas como P0, P1 e P2 as quais desempenham um importante papel no passo de alongamento da síntese de proteínas, interagindo também com fatores de tradução (HIHARA et al., 1994; REMACHA et al., 1995). Foram identificadas duas proteínas relacionadas ao ribossomo, sendo elas a proteína *Acidic ribosomal protein P0 homolog (spot 572)* como sendo de microrganismo e a proteína *Ribosome biogenesis protein ERB1 (spot 575)* na tangerina Poncan com *X. fastidiosa*. O aumento de sua expressão poderia evidenciar o estímulo da síntese de novas proteínas na tangerina Poncan como resultado da sua interação com a bactéria, podendo ser tanto relacionada à defesa quanto para balancear o seu metabolismo de alguma desordem ocasionada pelo patógeno.

A análise proteômica de tecidos vegetais já foi demonstrada, apesar de ainda permanecerem consideráveis desafios técnicos a respeito da 2DE e da identificação de proteínas por MS. A maioria das proteínas identificadas, independente da espécie de planta utilizada ou da condição de estresse testada, parece estar presente na forma constitutiva (defesas pré-formadas) ou é induzida especificamente nas plantas resistentes/tolerantes. Poucas delas são específicas para o tipo de estresse aplicado (ROSIGNOL et al, 2006).

Em ambas as interações, compatível (suscetível) e incompatível (resistente), entre planta e patógeno, as plantas respondem secretando seu próprio grupo de proteínas. Essas proteínas podem tanto causar um dano direto aos invasores quanto agir de uma forma protetora por meio da inibição da enzima de degradação da parede celular secretada pelo patógeno, por exemplo (HOUTERMAN et al., 2007).

A ativação da resposta da planta à invasão de microrganismos requer a detecção de sinais fornecidos pelo patógeno, os quais podem desencadear esta resposta. Diversas classes de moléculas derivadas do patógeno se mostram efetivas como uma forma de sinalização; alguns destes sinais agem diretamente, enquanto outros agem indiretamente convertendo os componentes da planta em moléculas sinalizadoras, como ocorre com

algumas enzimas (AYERS et al., 1985 apud SHUDA & RAVISHANKAR, 2002). No caso da *X. fastidiosa*, algumas de suas moléculas, como os exopolissacarídeos, lipopolissacarídeos, adesinas e exoenzimas podem atuar como PAMPs (OSIRO et al., 2004; FEDATTO et al., 2006; WULFF et al., 2006; SOUZA et al., 2009).

No caso do mecanismo de defesa da laranja Pêra ser ativado, isso pode estar ocorrendo tardiamente, ou seja, depois que a bactéria já se estabeleceu dentro da planta, impossibilitando-a de combater a doença. Outra hipótese seria a bactéria conseguir ultrapassar a sua resistência basal, evidenciando uma característica comum de resposta das plantas suscetíveis ao patógeno. Por outro lado a tangerina Poncan consegue reconhecer o patógeno, após a bactéria ter alcançado certa densidade populacional, ativando rapidamente os mecanismos relacionados com a sua resposta de defesa para impedir o sucesso da colonização e espalhamento do patógeno para outros vasos, evidenciando uma interação de plantas tolerantes ou não hospedeiras (*nonhost*) a este patógeno.

Embora não se tenha conseguido a identificação de todas as proteínas diferencialmente expressas nessa interação planta-patógeno, provenientes de laranja Pêra e tangerina Poncan que foram separadas em um gradiente de pH de não linear 3-10, o ajuste fisiológico sugerido por algumas proteínas são condizentes com a reação esperada pelos organismos, suscetível e tolerante ao estresse causado pela *X. fastidiosa*. A expressão de algumas das proteínas afetadas e identificadas corresponde aos genes que tiveram suas expressões aumentadas ou diminuídas, identificados em estudos anteriores de transcriptoma realizado por Souza et al. (2007b).

A presença da *X. fastidiosa* em plantas suscetíveis (como a laranja Pêra) desencadeia a CVC. Esta doença induz o estresse hídrico e nutricional, os quais fazem parte das mudanças fisiológicas observadas nas plantas. Essas mudanças levam a modificações do padrão de expressão protéica, aumentando ou diminuindo o nível de expressão de diversas proteínas. Apesar dos estragos causados pela CVC, esta doença não mata a laranja Pêra afetada, indicando uma possível adaptação dos mecanismos que auxiliam esta planta a continuar viva. Em contrapartida, as proteínas identificadas na tangerina Poncan inoculada com a *X. fastidiosa* podem indicar uma resposta de planta tolerante ao patógeno, já que esta planta apresentou resposta diferente ao da laranja Pêra neste tipo de interação, apresentando a expressão de diferentes tipos de proteínas para impedir a colonização do patógeno.

## 8. CONCLUSÃO

- O método de extração de proteínas adotado neste trabalho apresentou boa resolução e reprodutibilidade.
- Foram observadas alterações diferenciais do proteoma total de folhas de laranja Pêra e de tangerina Poncan infectadas com *X. fastidiosa* quando comparados àqueles obtidos das respectivas plantas saudáveis.
- A separação das proteínas da folha de tangerina Poncan inoculada com *X. fastidiosa* por eletroforese bidimensional em um gradiente de pH de 3-10 não linear demonstrou que ocorreu um predomínio de proteínas diferencialmente expressas com pI entre 4-7.
- A separação das proteínas da folha de laranja Pêra inoculada com *X. fastidiosa* por eletroforese bidimensional em um gradiente de pH de 3-10 não linear demonstrou que as proteínas diferencialmente expressas se dispuseram em uma grande abrangência de pI e de massa molecular.
- Laranja Pêra e a tangerina Poncan apresentaram formas de resposta bem distintas à colonização por *X. fastidiosa* após 30 dias da sua inoculação.
- Tangerina Poncan apresentou aumento de expressão de proteínas relacionadas à defesa impedindo a colonização da *X. fastidiosa* em seu vaso.
- A combinação da eletroforese bidimensional e espectrometria de massas possibilitam uma separação reprodutível e identificação de algumas das proteínas de folhas de citros diferencialmente expressas nas plantas laranja Pêra e tangerina Poncan.
- A utilização de técnicas de análise proteômica, bem como de seus avanços, ainda permitem amplas possibilidades para a investigação de novos alvos moleculares envolvidos na interação planta-patógeno.

## 9. PERSPECTIVAS

Este estudo inédito acerca do proteoma total de folhas de laranja Pêra e tangerina Poncan revelou interessantes alvos moleculares, possivelmente envolvidos nos processos relacionados à resposta destas plantas a infecção por *X. fastidiosa*. Entretanto, embora estas informações sejam de fundamental importância, acabam se mostrando parciais no que se refere às suas funções nestes organismos e não nos contextualizam em uma visão fisiológica dinâmica dos processos celulares. Assim, o desenvolvimento de novos trabalhos, que envolvam análises mais abrangentes das alterações de expressão de proteínas observadas em laranja Pêra e tangerina Poncan infectadas com a *X. fastidiosa* e até o desenvolvimento de estudos dos seus sub-proteoma (proteínas de organelas como mitocôndria e cloroplastos) devem ser realizados. Para complementar as informações acerca da função das proteínas detectadas no presente trabalho e com intuito de se identificar possíveis novos alvos moleculares envolvidos na regulação da interação planta-patógeno, estudos posteriores com o emprego de novas metodologias se fazem necessários. Como um exemplo, podemos citar a validação das proteínas identificadas por espectrometria de massas através do emprego de anticorpos específicos. Outro estudo interessante seria a avaliação do metaboloma destas plantas em resposta à CVC, visto que muitos produtos secundários da planta estão envolvidos na sua interação com o ambiente, sendo induzíveis por elicitores bióticos ou abióticos (SUDHA & RAVISHANKAR, 2002). Um ponto importante a ser ressaltado seria a utilização de algumas das proteínas que se apresentaram mais expressas na tangerina Poncan inoculada com a bactéria, como por exemplo a miraculina, a aldo-ceto redutase e a ATPase vacuolar, como alvo de melhoramento genético na laranja Pêra. Caso estes estudos se realizem, talvez possamos no futuro compreender melhor estas questões fisiológicas e moleculares relacionadas à resposta destas plantas frente a este patógeno, o que poderia possibilitar a fundamentação de novas teorias no que se refere à expressão diferencial destas proteínas. Com isso, talvez consigamos interpretar melhor os mecanismos envolvidos no processo de defesa destas plantas e o que as tornam resistentes e/ou tolerantes, podendo também contribuir para um aumento de produtividade e de qualidade de seus frutos.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry – based proteomics. *Nature*, 13; 422 (6928): 198-207, 2003.

AHARONI, N. Relationship between leaf water status and endogenous ethylene in detached leaves. *Plant Physiology* 61: 658-662, 1978.

ALFENA, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**, Viçosa: UFV, 574p. 1998.

ALMEIDA, B. S. V. **Análise do Proteoma do fluido intercelular de folhas de laranjeiras infectadas com *Xylella fastidiosa***. Piracicaba, 2001,17-22p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Agronomia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

ALMEIDA, J. S.; STANISLAUS, R.; KRUG, E., ARTHUR, J. M. Normalization and analysis of residual variation in two-dimensional gel electrophoresis for quantitative differential proteomics. *Proteomics* 5: 1242-1249, 2005.

ALVES, E. ***Xylella fastidiosa* – Adesão e colonização em vasos do xilema de laranjeira doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno**. Piracicaba, 2003, 26-36p. Tese (Doutorado). Departamento de Agronomia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

ALVES, E.; MARUCCI, C. R.; LOPES, R. E.; LEITE, B. Leaf symptoms on plum, coffee and citrus and the relationship with the extent of xylem vessels colonized by *Xylella fastidiosa*. *Journal of Phytopathology* 152: 291-297, 2004.

Amersham Biosciences, ImageMaster 2D Platinum Software Version 5.0 User Manual, p. 77, 78, 174-178, 2004.

ANDRADE, A. **Seqüenciamento, identificação e análise de proteínas do caule de mudas de *Eucalyptus grandis***. Piracicaba, 2006, 48-51p. Tese (doutorado). Departamento de Agronomia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

ARAUJO, W. L.; MARCON, J., MACCHERONI, W.; ELSAS, J. D. V.; VUURDE, J. W. L. V.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial population and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (10): 4906 - 4914. 2002.

ASHCROFT, A. Protein and peptide identification: the role of mass spectrometry in proteomics. *Natural product reports*, London, vol.20, p. 202-215, 2003.

BARBOSA, C. J.; SANTOS, H. P.; SANTOS, E. E. S. Principais doenças do citros transmitidas por borbulhas no Brasil. **Comunicado Técnico 120**. p. 1-6. 2006.

BARRIOS, S. C. L.; TEIXEIRA, J. E.; AZEVEDO, S. M.; CAMPOS, M. A.; PAIVA, L. V. Obtenção de anticorpos policlonais contra proteínas presentes em plantas afetadas pela anomalia declínio dos citros. **Ciência Agrotecnológica, Lavras 30 (5)**: 1013-1016. 2006.

BASTIANEL, M.; OLIVEIRA, A. C.; CRISTOFANI, MACHADO M. M. A. Diversidade genética entre híbridos de laranja-doce e tangor “Murcott” avaliada por AFLP e RAPD. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília 41 (5): 779-784, 2006.

BELIGNI, M., V. & LAMATTINA, L. Nitric Oxide in plant: the history is just beginning. Mini review. **Plant, Cell and Environment 24**: 267-278, 2001.

BELKHADIR, Y.; SUBRAMANIAM, R, DANGL, J. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners, **Current Opinion in Plant Biology 7**: 391-399, 2004.

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

BIRON. D. G.; BRUN, C.; LEFEVRE, T.; LEBARBENCHON, C.; LOXDALE, H. D.; CHEVENET, F.; BRIZARD, J., P.; THOMAS, F. The pitfalls of proteomics experiments without the correct use of bioinformatics tools. **Proteomics 6**: 5577-5596, 2006.

BOLLER, T. Ethylene and plant-pathogen interactions. **Curr. Top. Plant Physiol. 5**: 138-145, 1990.

BOLOGNA, I. R. **Adução boratada em pomar de laranja pêra rio afetado pela clorose variegada dos citros**. Piracicaba, 2003, 35-39p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Agronomia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. Protein folding assisted by chaperones. **Protein and Peptide Letters 12**: 257-261, 2005.

BOULEY, J.; MEUNIER, B.; CHAMBON, C.; De SMET, S.; HOCQUETTE, J. F.; PICARD, B. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. **Proteomics 5**: 490-500, 2005.

BOVÉ, J. M.; AYRES, A. J. Etiology of Three Recent Diseases of Citrus in São Paulo State: Sudden Death, Variegated Chlorosis and Huanglongbing. Critical Review. **IUBMB Life 59 (4-5)**: 346-354, 2007.



BRENCIC, A.; WINANS, S. C. Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 1 (69):155-194, 2005.

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

BRICKER, T. M.; FRANKEL, L. M. The structure and function of the 33 kDa extrinsic protein of Photosystem II: A critical assessment. **Photosynthesis research**, Boston, vol. 56, p.157-173, 1998.

BRIGATI, J. B. **Análise anatômica e molecular do albedo de frutos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck ‘Pêra’ na interação com *Guignardia citricarpa***. Piracicaba, 2009, 71-77p. Dissertação (Mestrado) na área de Fisiologia e Bioquímica de Plantas. Departamento de Agronomia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

BROEKAERT, W. F.; DELAURÉ, S. J.; DE BOLLE, M. F.C.; CAMMUE, B. P.A. The Role of Ethylene in Host-Pathogen Interactions. **Annual Review of Phytopathology** 44: 393-416, 2006.

BROIN, M.; CUINÉ, S.; PELTIER, G.; REY, P. Involvement of CDSP 32, a drought-induced thioredoxin, in the response to oxidative stress in potato plants. **FEBS Letters** 467: 245-238, 2000.

BURKEY, K. O.; MATHIAS, J. N. Identification of a novel isoform of the chloroplast-coupling factor alpha-subunit. **Plant Physiology** 116: 703-708, 1998.

CAMPOSTRINI, N.; ARECES, L. B.; RAPPILBER, J.; PIETROGRANDE, M. C.; DONDI, F.; PASTORINO, F.; PONZONI, M.; RIGHETTI, P. G. Spot overlapping in two-dimensional maps: A serious problem ignored for much too long. **Proteomics** 5: 2385-2395, 2005.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G., M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis** 25: 1327-1333, 2004.

CAO, H.; BALDINI, R. L.; RAHME, L. G. Common Mechanisms for Pathogens of Plants and Animals. **Annu. Rev. Phytopathol.** 39: 259-284, 2001.

CARPENTIER, S. C. E.; WITTERS, K.; LAUKENS, P.; DECKERS, R.; SWENNEN, B.; PANIS. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics** 5: 2497-2507, 2005.

CARVALHO, M. L. V.; ROSSETTI, V.; POMPEU, JR, J. Evolução da sintomatologia do clorose variegada dos citros em laranja Pêra (*C. sinensis*). **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.351, 1995. Suplemento.

CASAGRANDE, E. C.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; OYA, T.; PEDROSO, J.; MARTINS, P. K.; BRETON, M. C.; NEPOMUCENO, A. L. Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 13 (2): 168 -184. 2001.

CHANDLER, P. M. Hormonal regulation of gene expression in the “slender” mutant of barley (*Herdeum vulgare* L.). **Planta** 175: 115-120, 1988.

CHANG, J.; REMMEN, H. V.; WARD, W. F.; REGNIER, F. E.; RICHARDSON, A.; CORNELL, J. Processing of Data Generated by 2-Dimensional Gel Electrophoresis for Statistical Analysis: Missing Data, Normalization, and Statistics. **Journal of Proteome Research** 3: 1210-1218, 2004.

CHEN, S. & HARMON, A. C. Advances in plant proteomics. Review. **Proteomics** 6: 5504 -5516. 2006.

COLETTA-FILHO, H. D.; PEREIRA, E. O.; SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; CRISTOFANI-YALE, M.; MACHADO, M. A. Analysis of resistance to *Xylella fastidiosa* within a hybrid population of Pera sweet orange x *Murcott tangor*. **Plant pathology**, 1-8, 2007.

COSTERTON, J. W.; IRWIN, R. T. The bacterial glycocalyx in nature and disease. **Annual Review of Microbiology** 35: 299-324, 1981.

COTTINGHAM, K.; ERICKSON, B. E. Designing a powerful 2-DE experiment. **Journal of Proteome Research** 4 (3): 663-664, 2005.

DANCS, G.; KOMDRÁK, M.; BÁNFALVI, Z. The effects of enhanced methionine synthesis on amino acid and anthocyanin content of potato tubers. **BMC Plant Biology** 65(8):1-10, 2008.

DANGL, J. L., & JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature** 411: 826 - 833. 2001.

DAVIS, M. J.; FRENCH, J.; SCHAAD, N.W. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. **Current Microbiology** 6: 309-314, 1981.

DELLEDONNE, M. NO news is good news for plant. **Current Opinion in Plant Biology** 8: 390-396, 2005.

DELLEDONNE, M.; XIA, Y.; DIXON, R. A.; LAMB, C. Nitric oxide functions as a signal in plant diseases resistance. **Nature** 394: 585-588, 1998.

DI CIERO, L.; BELLATO, C. M. Proteoma – Avanços Recentes em técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** 5 (29): 158-164. 2002.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. Tools for Biochemistry. Review. **Science** 312: 212 – 217. 2006.

DONADIO, L. C.; RODRIGUEZ, ODY. **Quinto seminário internacional de citros**. Fundação Cargil. 1º ed, p.236-237. 1998.

DOW, J. M.; DANIELS, M. J. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. **Yeast**. 17: 263-271, 2000.

FEDATO, L. M. **Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella Fastidiosa* de citros e videira**. Piracicaba, 2004,16-21p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Agronomia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

FORMENT, J.; GADIA, J.; HUERTA, J.; *et al.* Development of a citrus genome- wide EST collection and cDNA microarrays as resources for genomics studies. **Plant Molecular Biology** 57: 375-391, 2005.

FÖRSTER, B.; MATHESIUS, U.; POGSON, B. Comparative proteomics of high light stress in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Proteomics** 6: 4309-4320, 2006.

FOUNTOULAKIS, M.; TACÁKS, B. Effect of strong detergents and chaotropes on the detection of proteins in two-dimensional gels. **Electrophoresis** 22: 1593-1602, 2001.

FRY, S. M.; MILHOLLAND, R. D. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevines resistant, tolerant, an susceptible to Pierce’s disease. **Phytopatology** 1(84): 61-65, 1990.

GALÁN, J.E. AND COLLMER, A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. **Science**. 284: 1322–1328. 1999.

GALVANI, M.; ROVATTI, L.; HAMDAN, M.; HERBERT, B.; RIGHETTI, P. G. Protein alkylation in the presence/absence of thiourea in proteome analysis: A matrix assisted laser desorption/ionization-time off flight-mass spectrometry investigation. **Electrophoresis** 22: 2066-2074, 2001.

GEVAERT, K.; VANDEKERCKHOVE, J. Protein identification methods in proteomics. **Electrophoresis** 21(6):1145-54, 2000.

GIAVALISCO, P.; NORDHOFF, E.; LEHRACH, H.; GOBOM, J.; KLOSE, J. Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis. **Electrophoresis** 24: 207-216. 2003.

GONZÁLEZ, E. G.; ROSENSTEIN, Y.; QUINTO, C.; SÁNCHEZ, F. Actin Monoubiquitylation is induced in plants in response to Pathogens and Symbionts. **American Phytopathological Society** 11(14): 1267-1273, 2001.

GÖRG, A., OBERMAIER, C., BOGUTH, G., HARDER, A., SCHEIBE, B., WILDGRUBER, R., WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis** 21: 1037-1053, 2000.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics** 4: 3665-3685, 2004.

GÖRHE V.; ROBATZEK, S. Breaking the Barriers: Microbial Effector Molecules Subvert Plant Immunity **Annu. Rev. Phytopathol** 46: 189-215, 2008.

GROSSKOPF, D. G.; FELIX, G.; BOLLER, T. A yeast-derived glycopeptide elicitor and chitosan or digitonin differentially induce ethylene biosynthesis, phenylalanine ammonia-lyase and callose formation in suspension-cultured tomato cells. **Journal Plant Physiology** 138: 741-746, 1991.

GUERREIRO, N.; REDMOND, J. W.; ROLFE, B. G.; DJORDJEVIC. New Rhizobium leguminosarum flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins. **Molecular Plant-Microbe Interaction** 4 (10): 506-516, 1997.

GUTTEMBERG, M.; HAMPP, R. Ectomycorrhizins: symbiosis-specific or artifactual polypeptides from ectomycorrhizas. **Planta** 188: 129-136, 1992.

GREENBERG, J.T.; VINATZER, B.A. Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cell. **Current Opinion Microbiology** 6: 20-28, 2003.

GROVE, H.; HOLLUNG, K.; UHLEN, A. K.; MARTENS, H.; FAERGESTAD, E. M. Challenges related to analysis of protein spot volumes from two – dimensional gel electrophoresis as revealed by replicate gels. **Journal of Proteome Research** 5: 3399 – 3410, 2006.

GRUBER, G.; WIECZOREK, H.; HARVEY, W. R.; MULLER, V. Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPase. **The Journal of Experimental Biology** 204: 2597-2605, 2001.

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

HARRIS, L. R.; CHURCHWARD, A.; BUTT, H.; COORSSSEN, J. R. Assessing Detection Methods for Gel-Based Proteomic Analyses. **Journal of Proteome Research** 2007.

HARTI, F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature** 381: 571-580, 1996.

HAYWARD, A. C.; MARIANO, R. L. R. Mecanismo de virulência e patogenicidade em procarioto em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas** 5: 199-234, 1997.

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

HEIDE, H.; KALISZ, H. M.; FOLLMANN, H. The oxygen evolving enhancer protein 1 (OEE) of photosystem II in green algae exhibits thioredoxin activity. **Journal of Plant Physiology** 161: 139-149, 2004.

HEIL, M. & BALDWIN, I.T. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. **Trends Plant Science** 7 (2): 61-7, 2002.

HESSE, H.; KREFT, O.; MAIMANN, S.; ZEH, M.; WILLMITZER, L.; HÖFGEN, R. Approaches towards understanding methionine biosynthesis in higher plants. **Amino Acids** 20: 281-289, 2001.

HESSE, H.; KREFT, O.; MAIMANN, S.; ZEH, M.; HOEFGEN, R. Current understanding of the regulation of methionine biosynthesis in plants. **Journal of Experimental Botany** 55(404): 1799-1808, 2004.

HIHARA, Y.; UMEDA, M.; HARA, C.; TORIYAMA, K.; UCHIMIYA, H. Nucleotide Sequence of a Rice Acidic Ribosomal Phosphoprotein PO cDNA'. **Plant Physiology** 105: 753-754, 1994.

HOOG, C. L.; MANN, M. Proteomics. **Annual Reviews Genomics Hum. Genet.** 5: 267-293. 2004.

HOPKINS, D. L. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopatology** 27: 271-290, 1989.

HOUTERMAN, P. M., SPEIJER, D., DEKKER, H. L., DE KOSTER, C. G., CORNELISSEN, B. J. C., REP, M. The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. **Molecular Plant Pathology** 8: 215–221. 2007.

HUNT, S. M. N.; THOMAS, M. R.; SEBASTIAN, L. T.; PEDERSEN, S. K.; HARCOURT, R. L.; SLOANE, A. J.; WILKINS, M. R. Optimal Replication and the Importance of Experimental Design for Gel-Based Quantitative Proteomics. **Journal of Proteome Research** 4: 809-819, 2005.

HUR, Y. S.; SHIN, K. H.; KIM, S.; NAM, K. M.; LEE, M. S.; CHUN, J. Y.; CHEON, C. I. Overexpression of *GmAKR1*, a Stress-Induced Aldo/Keto Reductase from Soybean, Retards Nodule Development. **Molecules and Cells** 27: 217-223, 2009.

HYODO, H. Stress/wound/ethylene. In: Matoo AK, Suttle JC (eds), The plant hormone ethylene, pp. 43-63. CC Press, London, 1991.

IGETA, H.; TAMURA, Y.; NAKAYA, K.; NAKAMURA, Y.; KURIHARA, Y. Determination of disulfide array and subunit structure of taste modifying protein miraculin. **Biochim Biophys Acta** 1079: 303-307, 1991.

ISHIWATARI, Y.; HONDA, C.; KAWASHIMA, I.; NAKAMURA, S.; HIRANO, H.; MORI, S.; FUJIWARA, T.; HAYASHI, H.; CHIMO M. Thiorredoxin h is one of the major protein in rice phloem sap. **Planta** 195: 456-463, 1995.

IVANOV, B.; KHOROBRYKH, S. Participation of photosynthetic electron transport in production and scavenging of reactive oxygen species. **Antioxid Redox Signal** 5: 43-53, 2003.

JACQUOT, J-P.; GELHAYE, E.; ROUHIER, N.; CORBIER, C.; DIDIERJEAN, C.; AUBRY, A. Thiorredoxins and related proteins in photosynthetic organisms: molecular basis for thiol dependent regulation. **Biochemical Pharmacology** 64:1065-1069, 2002.

JAHN, O.; HESSE, D.; REINELT, M.; KRATZIN, H. D. Technical innovations for the automated identification of gel-separated proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem.** 386: 92-103, 2006.

JELITTO-VAN DOOREN, E. P.; VIDAL, S.; DENECKE, J. Anticipating endoplasmic reticulum stress. A novel early response before pathogenesis-related gene induction. **Plant Cell** 11: 1935-1944, 1999.

JEZ, J. M.; BENNETT, M. J.; SCHLEGEL, B. P.; LEWIS, M.; PENNING, T. M. Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. **Biochem. J.** 326: 625-636, 1997a.

JEZ, J. M.; FLYNN T.; G.; PENNING, T. M. A New Nomenclature for the Aldo-Keto Reductase Superfamily. **Biochemical Pharmacology** 54: 639-647, 1997b.

JIAO, S.; HILAIRE, E.; GUIKEMA, J. A. Identification and differential accumulation of isoformas of the CFI<sub>1</sub>- $\beta$  subuniti under high light stress in *Brassica rapa*. **Plant Physiology and Biochemistry** 42: 883-890, 2004.

KANZAN, K.; SCHENK, P. M.; MANNERS, J. M. DNA microarrays: new tools in the analysis of plant defense response. **Molecular Plant Pathology** 2: 177-185, 2001.

KARP, N. A.; KREIL, D. P.; LILLEY, K. S. Determining a significant change in protein expression with DeCyder<sup>TM</sup> during a pair-wise comparison using two-dimensional difference gel electrophoresis. **Proteomics** 4: 1421-1432, 2004.

KARP, N. A.; SPENCER, M.; LINDSAY, H.; O'DELL, K.; LILLEY, K. S. Impacta od Replicate Types on Proteomics Expression Analysis. **Journal of Proteome Research** 4: 1867-1871, 2005.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Guanabara Koogan, 130-178 p., 2004.

KERMER, M. J.; NAYLOR, D. J.; ISHIHAMA, Y.; MAIER, T.; CHANG, H. C.; STINES, A. P.; GEORGOPOULOS, C.; FRISHAN, D.; HAYER-HARTL, M.; MANN M.; ULRICH HARTL, F. Proteome-wide Analysis of Chaperonin-Dependent Protein Folding in *Escherichia coli*. **Cell**. 122: 209-220, 2005.

KIKUCHI, G.; MOTOKAWA, Y.; YOSHIDA, T.; HIRAGA, K. Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. **The Japan Academy** 84: 246-268, 2008.

KIM, S. T.; CHO, K. S.; JANG, Y. S.; KANG, K. Y. Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. **Electrophoresis** 22: 2103-2109, 2001.

KOIDE, T.; ZAINI, P. A.; *et al.* DNA microarray-based genome comparison of pathogenic and a nonpathogenic strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. **Journal of Bacteriology** 186 (16): 5442-5449. 2004.

KOMATSU, S. Plant Proteomics Databases: Their Status in 2005. **Current Bioinformatics** 1: 33-36, 2006.

KOPRIVA, S.; KOPRIVOVA, A.; SÜS, K. H. Identification, Cloning, and Properties of Cytosolic D-Ribulose-5-phosphate 3-Epimerase from Higher Plants. **The Journal of Biological Chemistry** 2 (275): 1294-1299, 2000.

LAEMMLI, U. K. SDS-PAGE. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685, 1970.

LAMB, C. & DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 48:251-75, 1997.

LAM E.; KATO N.; LAWTON M. Programmed cell death, mitochondria and plant hypersensitive response. **Nature** 411: 848-852, 2001.

LAMB, C. J.; LAWTON, M. A.; DRON, M. *et al.* Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. **Cell** 2 (56): 215-224, 1989.

LARANJEIRA, F. F.; POMPEU JÚNIOR, J.; HARAKAVA, R.; FIGUEIREDO, J.O.; CARVALHO, S.A.; COLETTA FILHO, H.D. Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condição de campo. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, n.2, p.147-154. 1998.

LAWLOR, D. W.; TEZARA, W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of process. **Annals of Botany** 103: 561-579, 2009.

LEE FERGUSON, P.; SMITH, R. D. Proteome analysis by mass spectrometry. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** 32: 399 – 424, 2003.

LEÓN, I. R.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; VALENTE, R. H.; MOTA, E. M.; LENZI, H. L.; PERALES, J. Improved protein identification efficiency by mass spectrometry using N-terminal chemical derivatization of peptides from *Angiostrongylus costaricensis*, a nematode with Unknown genome. **Journal of Mass Spectrometry** 42: 781-792, 2007.

LEONE, A.; PIRO, G.; LEUCCI, M. R.; DALESSANDRO, G.; ZACHEO, G. Membrane cell wall associated heat shock protein in two genotypes of barley seedling. **Plant Biosystems** 134: 171-178, 2000.

LIEBLER, D. C. **Introduction to proteomics: Tools for the new biology**. Humana press Towota, New Jersey. p.18-20, 2002.

LIPKA V.; PANSTRUGA R. Dynamic cellular responses in plant-microbe interactions. **Current opinion in plant biology** 8: 625-631, 2005.

LINTHORST, H. J. M. Pathogenesis-related proteins of plants. **Critical Review in Plant Science** 10: 123-150, 1991.

LÓPEZ, J. L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. Review. **Journal of Chromatography B** 849: 190-202, 2007.

LUCHE, S.; SANTONI, V.; RABILLOUD, T. Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional in electrophoresis. **Proteomics** 3: 249- 253, 2003.

MCDOUGALL, G. J. Changes in cell wall-associated peroxidases during the lignification of flax fibres. **Phytochemistry** 31: 3385-3389, 1992.

MACHADO, M. A.; SOUZA, A. A.; COLETTA FILHO, H. D.; IZIOKA, E. E. K.; TAKITA, M. A. Genome and Pathogenicity of *Xylella fastidiosa*. **Molecular Biology Today** 2(3): 33-43, 2001.

MACHADO E. C.; QUAGGIO, J. A.; LAGÔA, A. M. M. A.; TICELLI, M.; FURLANI, P. R. Trocas Gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 6: 53-57, 1994.

McHALE, L.; TAN, X.; KOEHL, P.; MICHELMORE, R. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. **Genome Biology** 4(7): 212-212.11, 2006.

MANN, M.; HENDRICKSON, R. C.; PANDEY, A. Analysis of protein and proteomes by mass spectrometry. **Annu. Rev. Biochem.** 70: 437-473, 2001.

MARTINS, D.; OLIVEIRA, B. M.; FARIAS, A. S.; HORIUCHI, R. S. O.; DOMINGUES, C. C.; DE PAULA, E.; MARANGONI, S.; GATTAZ, W. F.; DIAS-NETO, E.; NOVELLO, J. C. The use of ASB-14 in combination with CHAPS is the best for solubilization of human brain proteins for two-dimensional gel electrophoresis. **Briefings In Functional Genomics and Proteomics** 6: 70-75, 2007.



MARGIS-PINHEIROS, M.; SANDRONI, M.; LUMMERZHEIM, M.; OLIVEIRA, D., E. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciência hoje** 147, 1999.

MARQUES, L. L. R.; CERI, H.; MANFIO, G. P.; REID, D. M.; OSLON, M. E. Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* in vitro. **Plant Disease** 86: 633-638, 2002.

MARNETT, L. J.; HURD, H. K.; HOLLSTEIN, M. C.; LEVIN, D. E.; ESTERBAUER, H.; AMES, B. N. Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in Salmonella tester strain TA104. **Mutation Research** 148: 25-34, 1985.

MASERTI, B. E.; DELLA CROCE, C.M.; LURO, F.; MORILLON, R.; CINI, M.; CALTAVUTURO, L. A general method for extraction of citrus leaf proteins and separation by 2D electrophoresis: A follow up. **Journal of Chromatography B** 14801:1-6, 2006.

MAURER, M. H.; FELDMANN, R. E.; BRÖMME, J. O.; KALENKA, A. Comparison of Statistical Approaches for the Analysis of Proteome Expression Data of Differentiating Neural Stem Cells. **Journal of Proteome Research** 4: 96-100, 2005.

MÉCHIN, V.; CONSOLI, L.; LE GUILLOUX, M.; DAMERVAL, C. An efficient solubilization for plant proteins focused in immobilized pH gradients. **Proteomics** 3: 1299-1302, 2003.

MEDINA, C. L. **Fotossíntese, relações hídricas e alterações bioquímicas em laranja 'Pêra' com CVC e submetida à deficiência hídrica.** Campinas, 2002, 147p. Tese (Doutorado). Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas.

MENG, M.; GEISLER, M.; JOHANSSON, H.; HARHOLT, J.; SCHELLER, H. V.; MELLEROWICZ, E. J.; KLECZKOWSKI, L. A. UDP-Glucose Pyrophosphorylase is not Rate Limiting, but is Essential in Arabidopsis. **Plant Cell Physiology** 50(5): 998-1011, 2009.

MESSIAS, U. **Atividade da superóxido dismutase, catalase, peroxidases e acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associados à infecção de um Carlavirus em soja e um Potyvirus no feijoeiro.** Campinas, 2008, 1-6p. Dissertação (Doutorado) na área de Biologia Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas.

MEUNIER, B.; BOULEY, J.; PIEC, I.; BERNARD, C.; PICARD, B.; HOCQUETTE, J. F. Data analysis methods for detection of differential protein expression in two-dimensional gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry** 340: 226-230, 2005.

MISCHAK, H.; APWEILER, R.; BANKS, R. E.; CONAWAY, M. et al. Clinical proteomics: A need to define the field and to begin to set adequate standards. **Proteomics Clinical** 1: 148-156, 2007.

MITTLER, R.; *et al.* Reactive oxygen gene network of plant. **Trends Plant Science** 9: 490-498, 2004.

MOLLENHAUER, H. H.; HOPKINS, D. L. Xylem morphology of pierce's disease-infected grapevines with different level of tolerance. **Physiology Plant Pathology** 9: 95-100, 1976.

MONDEGO, J. M. C. **Caracterização de genes de café (*Coffea sp.*) induzidos durante a infestação do bicho mineiro (*Leucoptera coffeella*)**. Campinas, 2005, 24-38p. Tese (Doutorado) na área de Genética Vegetal e Melhoramento. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

MYSORE, K. S.; RYU, C. M. Nonhost resistance: how much do we know? **TRENDS in Plant Science** 2 (9): 97-104, 2004.

NATARAJAN, S.; XU; CHENPING; CAPERNA; T. J.; GARRET, W. M. Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. **Analytical Biochemistry** 342: 214-220, 2005.

NEVES, E. M.; DAYOUB, M.; DRAGONE, D. S.; NEVES, M. F. Citricultura brasileira: Efeitos econômicos e financeiros, 1996-2000.

NEWTON, R. P.; BRENTON, A. G.; SMITH, C. J.; DUDLEY, E. Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. **Phytochemistry** 65: 1449-1485, 2004.

NIMCHUK, Z.; EULGEM, T.; HOLT, B. F III.; DANGL J L. Recognition and response in the plant immune system. **Ann. Rev. Genet.** 37: 579-609, 2003.

NISHI, T.; FORGAC, M. The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase-nature's most versatile proton pumps. **Nature review. Molecular Cell Biology** 3:94-103, 2002.

NOMURA, K.; MELOTTO, M.; HE, S.H. Suppression of host defense i compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. **Current Opinion in Plant Biology** 8: 361-368, 2005.

NUNES, W. M. C.; ZANUTTO, C. A.; NUNES, M. J. C.; MOLINA, R. O. Análise espaço temporal da clorose variegada dos citros no Noroeste do Paraná, com uso de PCR para a detecção de *Xylella fastidiosa*. **Maringá** 28 (3): 421-425, 2006.

NÜRNBERGER, T.; LIPKA, V. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. **Molecular Plant Pathology** 6(3): 335-345, 2005.

O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry** 250: 4007-4021, 1975.

OLSON, P. D. & VARNER, J. E. Hydrogen peroxide and lignification. **Plant Journal** 4(5): 887-892, 1993.

PADLIYA, N. D. & COOPER, B. Mass spectrometry-based proteomics for the detection of plant pathogens. Review. **Proteomics** 6: 4069-4075, 2006.

PASCHOLATI, S. F. & LEITE, B. Hospedeiro: mecanismo de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATHI, H.; AMORIM, L. (Ed). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v.1, cap. 22, p. 417-453, 1995.

PIMENTA, A. M. C. Os desafios do proteoma. **Ciência hoje**, 192 (32): 17-22. 2003.

POLLE, A.; OTTER, T. & SEIFERT, F. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of norway spruce (*Picea abies* L.). **Plant Physiology** 106: 53-60, 1994.

POMPEU JÚNIOR, J.; LARANJEIRA, F. F.; HARAKAVA, R.; BERETTA, M. J. G. Primeira constatação de sintomas foliares de Clorose Variegada dos Citros em tangerinas e híbridos de tangerina. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.123, 1994. Suplemento.

POOLER, M. R.; HARTUNG, J. S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology** 31 (6): 377-381, 1995.

POZO, M. J.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. Jasmonates – Signals in Plant-Microbe Interactions. **Journal of Plant Growth Regulation** 23: 211-222, 2005.

PUERCELL, A. H.; HOPKINS, D. L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopatology** 23: 131-151, 1996.

PURCINO, R. P.; MEDINA, C. L.; SOUZA, D. M.; WINCK, F. V.; MACHADO, E. C.; NOVELLO, J. C.; MACHADO, M. A.; MAZZAFERA, P. *Xylella fastidiosa* disturbs nitrogen metabolism and causes a stress response in sweet Orange *Citrus sinensis* cv. Pêra. **Journal of Experimental Botany** 58 (11): 2733-2744, 2007.

RAMAGLI, L. S.; RODRIGUEZ, L. V. Quantification of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis sample buffer. **Electrophoresis** 6: 559-563, 1985.

REMACHA, M.; JIMENEZ-DIAS, A.; SANTOS, C.; BRIONES, E.; ZAMBRANO, R.; RODRIGUEZ, G. M. A.; GUARINOS, E.; BALLESTA, J. P. Proteins, P1, P2 and P0, components of the eukaryotic ribosome stalk. New structural and functional aspects. **Biochemistry and cell Biology** 73: 959-968, 1995.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M.L.; CHAVES, Z. M. Espécies Ativas de Oxigênio a Resposta de Defesa de Plantas a Patógeno. Revisão. **Fitopatologia Brasileira** 28 (2): 123-130, 2003.

REY, P.; PRUVOT, G.; BECUWE, N.; EYMERY, F.; RUMEAU, D.; PELTIER, G. A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants. **Plant Journal** 13: 97-107, 1998.

RIBEIRO, F. L. **Identificação e Caracterização de cDNAs Expressos Diferencialmente Durante a Maturação dos Frutos de *Coffea arabica*** I. Campinas, 2004, 55 e 74p.

Dissertação (Mestrado) na área de Biologia Celular. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

RIBEIRO, R. V.; MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F. Early photosynthetic response of sweet Orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 62: 167-173, 2003.

ROBSON, C.A; VANLERBERGHE, G.C. Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and independent pathways of programmed cell death. **Plant Physiology** 129: 1908-1920, 2002.

RODRIGUES, J. L. M.; SILVA-STENICO, M. E.; SOUZA, A. N.; LOPES, J. R. S.; TSAI, S. M. *In situ* probing of *Xylella fastidiosa* in honeydew of a xylem sap-feeding insect using 16S rRNA-target fluorescent oligonucleotides. **Environmental Microbiology** 8 (4):747-754, 2006.

ROEDER, S.; DRESCHLER, K.; WIRTZ, M.; CRISTESCU, S. M.; van HARREN, F. J. M.; HELL, R.; PIECHULLA, B. SAM levels, gene expression of SAM synthetase, methionine synthase and ACC oxidase, and ethylene emission from *N. suaveolens* flowers. **Plant Molecular Biology** 70: 535-546, 2009.

ROMEIS, T. Protein kinases in the plant defense response. **Current Opinion in Plant Biology** 4: 407-414, 2001.

ROMERO-PUERTAS, M. C.; CAMPOSTRINI, N.; MATTÈ A.; RIGHETTI P. G.; PERAZZOLLI, M.; ZOLLA, L.; ROEPSTORFF, P.; DELLEDONNE, M. Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. **Proteomics** 8:1459-1469, 2008.

ROMERO-PUERTAS, M. C.; PERAZZOLLI, M.; ZAGO, E. D.; DELLEDONNE, M. Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. Microreview. **Cellular Microbiology** 6 (9):795-803, 2004.

ROSE, J. K. C.; BASHIR, S.; GIOVANNONI, J. J.; JAHN, M. M.; SARAVANAN, R. S. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. **The Plant Journal** 39: 715-733, 2004.

ROSSIGNOL, M.; PELTIER, J. B.; MOCH, H. P.; MATROS, A.; MALDONADO, A. M.; JORRIN, J. V. Plant proteome analysis: A 2004-2006 update. **Proteomics** 6: 5529-5548, 2006.

SALA, A.; TENHUNEN, J.D. Simulations of canopy net photosynthesis and transpiration in *Quercus ilex* L. under the influence of seasonal drought. **Agricultural and Forest Meteorology** 3-4 (18):203-222, 1996.

SALGADO *et al.* In: (Hemantaranjan, Ed.) **Advances in Plant Physiology**, vol. 7, Scientific Publishers, Jodhpur, India, p. 117-137, 2004.

SANTONI, V.; MOLLOY, M.; RABILLOUD, T. Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible? Review. **Electrophoresis**. 21: 1054-1070, 2000.

SANTOS, C. V.; REY, P. Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. **TRENDS in Plant Science** 7 (11): 320-334, 2006.

SAVARANAN, R. S.; ROSE, J. K. C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomics analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics** 4: 2522-2532, 2004.

SCHAFFER, J. F. Tolerance to plant disease. **Annual Reviews** 3529: 235-251, 1971.

SCHULTZ, H. R.; MATTHEWS, M. A. Resistance to water transport in shoots of *Vitis vinifera* L. **Plant Physiology** 88: 718-7224, 1988.

SEIDLER, A. The extrinsic polypeptides of Photosystem II. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam. 1277: 35-60, 1996.

SHIKANAI, T.; TAKEDA, T.; YAMAUCHI, H.; SANO, S.; TOMIZAWA, K. I.; YOKOTA, A.; SHIGEOKA, S. Inhibition of ascorbate peroxidase under oxidative stress in tobacco having bacterial catalase in chloroplasts. **FEBS Letters** 428: 47-51, 1998.

SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A., *et al.*, Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature** 417: 459-463, 2002.

SILVA, B. V.; HORTA, B. A. C.; ALENCASTRO, R. B.; PINTO, A. C. Proteínas quinases: Características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova** 2 (32): 453-462, 2009.

SIMPSON, A. J. G.; REINACH, F. C.; ARRUDA, P. *et al.* The genome sequence of plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature** 406:151-159, 2000.

SMOLKA, B. M. **Análise Proteômica da *Xylella fastidiosa* e Desenvolvimento de Novo Método para Análise Quantitativa de Proteomas por Espectrometria de Massa**. Campinas, 2002. 1-16p. Tese (doutorado). Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas.

SONG, C. J.; STEINEBRUNNER, I.; WANG, X.; STOUT, S. C.; ROUX, S. J. Extracellular ATP Induces the Accumulation of Superoxide via NADPH Oxidases in Arabidopsis. **Plant Physiology** 140: 1222-1232, 2006.

SORMO, C. G.; LEIORS, I.; BREMBU, T.; WINGE, P.; OS, V.; BONES, A. M. The crystal structure of *Arabidopsis thaliana* RAC7/ROP9: The first RAS superfamily GTPase from the plant kingdom. **Phytochemistry** 67: 2332-2340, 2006.

SOUZA, A. A. **Análise comparativa da expressão de genes de *Xylella fastidiosa* associados à patogenicidade e formação do biofilme**. Campinas, 2004, 1-6p. Tese

(Doutorado) em Genética e Biologia molecular na área de Genética de Microrganismos. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas

SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; AMARAL, A. M.; COLLETA-FILHO, H. D.; MACHADO, M. A. Citrus Responses to *Xylella fastidiosa* Infection, the Causal Agent of Citrus Variegated Chlorosis. **Tree and Forestry Science and Biotechnology** 3 (2):73-80, 2009.

SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; PEREIRA, E. O.; COLETTA-FILHO, H. D. & MACHADO, M. A.. Expression of pathogenicity-related genes of *Xylella fastidiosa* in vitro and in plant. **Current Microbiology** 50 (4): 223-228, 2005.

SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; COLETTA-FILHO, H. D.; CALDANA, C.; GOLDMAN, G. H.; YANAI, G. M.; MUTO, N. H.; OLIVEIRA, R. C.; NUNES, L. R.; MACHADO, M. A. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenity **Molecular Plan-Microbe Interactions** 16: 867-875, 2003.

SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; COLETTA-FILHO, H. D.; TARGON, M. L.; CARLOS, E. F.; LOCALI-FABRIS, E. C.; AMARAL, A. M.; FREITAS-ASTÚA, J.; SILVA-PINHATI, A. C. O.; BOSCARIOL-CAMARGO, R. L.; BERGER, I. J.; RODRIGUES, C. M.; REIS, M. S.; MACHADO, M. A. Analysis of expressed sequence tags from *Citrus sinensis* L. Osbeck infected with *Xylella fastidiosa*. **Genetics and Molecular Biology** 30 (3): 957-964, 2007a.

SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; COLETTA-FILHO, H. D.; CAMPOS, M. A.; TEIXEIRA, J. E. C.; TARGON, M. L. P. N.; CARLOS, E. F.; RAVASI, J. F.; FISCHER, C. N.; MACHADO, M. A. Comparative analysis of differentially expressed sequence tags of sweet orange and mandarin infected with *Xylella fastidiosa*. **Genetics and Molecular Biology** 30 (3): 965-971, 2007b.

FEDATTO, L. M.; SILVA-STENICO, M. E.; ETCHEGARAY, A., PACHECO, F. T.; RODRIGUES, J. L.; TSAI, S. M. Detection and characterization of protease secreted by the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Microbiological Research** 161: 263-272, 2006.

SPREITZER, R. J.; SALVUCCI, M. E. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. **Nature** 337: 229-234, 2002.

STICHER, L., MAUCHI-MANI, B. & MÉTRAUX. J. P. Sistemic acquired resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.** 35: 235-270, 1997.

SUDHA, G.; RAVISHANKAR, G. A. Involvement and interaction of varios signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 71: 181-212, 2002.

SULIMAN, H. S.; APPLING, D. R.; ROBERTUS, J. D. The Gene for Cobalamin-independent Methionine Synthase is Essential in *Candida albicans*: A Potential Antifungal Target. **Arch Biochem Biophys.** 467 (2):218-226, 2007.

SUPEKOVA, L.; SBIA, M.; SUPEK, F.; MA, Y.; NELSON, N. A novel subunit of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase related to the *b* subunit of F-ATPase. **The Journal of Experimental Biology** 199: 1147-156, 1996.

TASTET, C.; CHARMONT, S.; CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; RABILLOUD, T. Structure-efficiency relationships of zwitterionic detergents as protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. **Proteomics** 3: 111-121, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. de E.R. Santarém *et al.* 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719p. 2004.

TEZARA, W.; MITCHELL, V. J.; DRISCOLL, S. D.; LAWLOR, D. W. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. **Nature** 401: 914-917, 1999.

THEERASILP S, HITOTSUYA H, NAKAJO S, NAKAYA K, NAKAMURA Y, KURIHARA Y. Complete amino acid sequence and structure characterization of the taste-modifying protein, miraculin. **Journal of Biological Chemistry** 264: 6655-6659, 1989.

TOOD, M. J. & LORIMER, G. Stability of the asymmetric *Escherichia coli* Chaperonin Complex. **The Journal of Biological Chemistry** 10 (270): 5388-5394, 1995.

URFER, W.; GRZEGORCZYK, M.; JUNG, K. Statistics for Proteomics: A Review of Tools for Analyzing Experimental Data. **Practical Proteomics** 1 (2): 48-55, 2006.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu. Rev. Phytopathol.** 44: 135-162, 2006.

VANCE, C. P.; KIRK, T. K. & SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Ann. Rev. Phytopathol.** 18: 259-288, 1980.

VERNOUD, V.; HORTON, A. C.; YANG, Z.; NIELSEN, E. Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. **Plant Physiology** 131: 1191-1208, 2003.

YATES III, J. R. Mass spectrometry and the age of the proteome. **Journal of mass spectrometry** 33:1-19, 1998.

YANAGIDA, M. Functional proteomics; current achievements. **Journal of Chromatography B** 771: 89-106, 2002.

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

YANG, Z. Small GTPases: versatile signaling switches in plants. **Plant Cell (Suppl.)** 14: S375-S388, 2002.

WALLING, L. L. The myriad plant responses to herbivores. **Journal Plant Growth Regulation** 19: 195-216, 2000.

WANG, W.; VIGNANI, R.; SCALI, M.; CRESTI, M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis** 27: 1-5, 2006.

WANG, W.; SCALI, M.; VIGNANI, R.; SPADAFORA, A.; SENSI, E.; MAZZUCA, S.; CRESTI, M. Protein extractin for two-dimensioan electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis** 24: 2369-2375, 2003.

WARD, J. M.; SZE, H. Subunit Composition and Organization of the Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase from Oat Roots. **Plant Physiology** 99: 170-179, 1992.

WELLS, J. M.; RAJU, B. C.; HUNG, H. Y.; WEISBURG, W. G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D. J. *Xylella fastidiosa* gen. nov. sp. nov.: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* ssp. **International Journal of Systematic Bacteriol** 2 (37): 136-143, 1987.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J-C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev.** 13:19-50, 1995.

WOLTHUIS, R. M. F.; BOS, J. L. Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral. **Current Opinion in Genetics & Development** 9: 112-117, 1999.

WONG, S.C.; COWAN, I.R.; FARQUHAR, G.D. Stomatal conductance correlates with photosynthetic capacity. **Nature** 5737 (282): 424-426, 1979.

WULFF, N. A. **Caracterização Enzimática das Celulases XF-810, XF-818 e XF-2708 de Xylella fastidiosa e Purificação da Proteína XF-818, Expressas em Escherichia coli.** Piracicaba, 2002. 2-3p. Dissertação (doutorado). Departamento de Agronomia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

WULFF, N. A.; CARRER, H.; PASCHOLATI, S. F. Expression and purification of celulase XF818 from *Xylella fastidiosa* in *Escherichia coli*. **Current Microbiology** 53: 198-203, 2006.



ZHANG, H.; LIN, Q.; PONNUSAMY, S.; KOTHANDARAMAN, N.; LIM, T. K.; ZHAO, C.; KIT, H. S.; ARIJIT, B.; RAUFF, M.; HEW, C. L.; CHUNG, M. C. M.; JOSHI, S. B.; CHOOLANI, M. Differential recovery of membrane proteins after extractin by aqueous methanol and trifluoroethanol. **Proteomics** 7: 1654-1663, 2007.

ZUKAS, A. A.; BREKSA III, A. P. Extraction methods for analysis of *Citrus* leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis. **Journal of Chromatography A** 1078: 201-205, 2005.

**Endereços eletrônico consultados:**

[www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br)

<http://ca.expasy.org/>

<http://www.matrix-science.com/>

<http://cgf.ucdavis.edu/home/>

<http://www.arabidopsis.org/Blast/index.js>