



# **Caracterização de fatores moleculares implicados na patogenicidade de *Phytophthora cinnamomi***

**Nélia Armanda Faiões da Nova Pereira**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção  
do Grau de Mestre em Engenharia Biotecnológica*

Orientado por:

**Professor Doutor Altino Branco Choupina**

**Bragança**

**2017**

## **Dedicatória**

Aos meus Pais pela presença e apoio incondicional e uma força tão importante como inspiradora que me têm dado ao longo da minha vida.

## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Altino Branco Choupina, meu orientador, por todo o apoio, empenho e dedicação. Por transmitir um estímulo constante na aquisição de novos conhecimentos, pela disponibilidade, pelos ensinamentos, e, acima de tudo, pela exigência.

Aos docentes do Mestrado, pelos saberes que me transmitiram.

Aos colegas de Curso pelos bons momentos proporcionados.

A todos aqueles que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## Índice Geral

Dedicatória.....	i
Agradecimentos .....	ii
Índice de Figuras .....	v
Índice de Tabelas .....	vii
Abreviaturas.....	viii
Resumo .....	x
Abstract.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1. O Castanheiro .....	1
1.2. Doença da Tinta do Castanheiro.....	3
1.3. Oomicetas .....	6
1.3.1. O Género <i>Phytophthora</i> .....	7
1.4. Mecanismo de infeção da <i>Phytophthora</i> e propagação da doença.....	8
1.5. Fatores de patogenicidade e moléculas efetoras da <i>Phytophthora</i> .....	9
1.5.1. Lipases em <i>Phytophthora</i> .....	10
1.6. A espécie <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	12
1.6.1. Ciclo de vida e Epidemiologia de <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	13
1.7. Estratégias de transformação genética e mecanismos de silenciamento genético... 14	
2. Objetivos.....	17
2.1. Objetivo geral .....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. Metodologias .....	18
3.1. Edição e comparação de sequências .....	18
3.2. Databases de informação biológica .....	18
3.3. Pesquisa de fases de leitura aberta.....	18
3.4. Homologia das proteínas codificadas pelas fases de leitura aberta .....	18
3.5. Predição da localização subcelular das proteínas .....	19
3.6. Caracterização Bioinformática dos fatores moleculares .....	19
3.7. Pesquisas bibliográficas.....	20
4. Apresentação e discussão dos resultados .....	21
4.1. Genes ligados à patogenicidade em <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	21

4.2. Sequências genómicas codificantes de <i>Phytophthora cinnamomi</i> com importância na patogenicidade .....	22
4.3. Sequências genómicas de <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	23
4.3.1. Caracterização do fator Avr3a, associado à patogenicidade de <i>P. cinnamomi</i> .....	25
4.3.1.1. Localização subcelular do fator Avr3a de <i>P. cinnamomi</i> .....	26
4.3.1.2. Desenho de uma construção genética para silenciamento, por ARN de interferência, do gene Avr3a de <i>P. cinnamomi</i> .....	27
4.3.2. Lipases em <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	29
4.3.2.1. Estrutura 3-D das lipases de <i>P. cinnamomi</i> .....	33
4.3.2.2. Localização subcelular das lipases de <i>P. cinnamomi</i> .....	34
4.3.2.3. Desenho de construções genéticas para silenciamento, por ARN de interferência, das lipases de <i>P. cinnamomi</i> .....	36
5. Considerações finais .....	38
5.1. Transformação e silenciamento de genes de <i>P. cinnamomi</i> .....	38
5.2. Quantificação de transcritos de <i>P. cinnamomi</i> durante a infecção mediante PCR em tempo real .....	38
6. Conclusões.....	40
7. Referências Bibliográficas.....	42

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Espécies de Castanha no Mundo.....	2
<b>Figura 2.</b> Sintomas causados por <i>Phytophthora cinnamomi</i> em castanheiro ao nível da copa (a) e (b), tronco (c) e raiz (d).....	5
<b>Figura 3.</b> Fases de leitura aberta deduzidas a partir da sequência LGSJ01000006.1 de <i>P. cinnamomi</i> depositada na database NCBI. O sentido das setas indica o sentido de leitura das fases de leitura aberta com tamanho significativo na sequência. ....	24
<b>Figura 4.</b> Fases de leitura aberta deduzidas a partir da sequência LGSK01000001.1 de <i>P. cinnamomi</i> depositada na database NCBI. O sentido das setas indica o sentido de leitura das fases de leitura aberta com tamanho significativo na sequência.....	24
<b>Figura 5.</b> ORF49 que codifica a proteína Avr3a com 290 aminoácidos, cuja sequência está representada na parte esquerda da figura segundo ORF Finder – NCBI. ....	25
<b>Figura 6.</b> Árvore filogenética de proteínas Avr3a de <i>P. cinnamomi</i> (unknown na figura) com diferentes espécies do género <i>Phytophthora</i> . ....	26
<b>Figura 7.</b> Cassete para silenciamento do gene Avr3a, de <i>Phytophthora cinnamomi</i> , por ARN de interferência. Sense e antisense (a vermelho) entre um intrão que servirá de loop (a verde).....	28
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática (FungiDB) das características das lipases de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (PHYCI_89229T0). ....	30
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática (FungiDB) das características das lipases de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (PHYCI_76143T0). ....	31
<b>Figura 10.</b> Alinhamento, de acordo com o algoritmo de Clustal das estruturas primárias das lipases de <i>P. cinnamomi</i> (PHYCI_76143T0 e PHYCI_89229T0), <i>P. infestans</i> (PITG_01274) e <i>P. ramorum</i> (PSURA_76385) (FungiDB). O retângulo delimita uma sequência consenso conservada (G-X-S-X-G).....	32
<b>Figura 11.</b> Estrutura 3-D das lipases de <i>P. cinnamomi</i> , com base no modelo da lipase gástrica do cão ( <i>Canis lupus familiaris</i> ) (d1k8qa no PDB-Protein Data Bank), com 371 resíduos para PHYCI_76143 (figura esquerda) e 367 resíduos para PHYCI_89229T0 (figura direita) e 86% de semelhança. ....	33
<b>Figura 12.</b> Localização do peptídeo sinal na sequência PHYCI_89229T0 de <i>P. cinnamomi</i> , de 425 aa, depositada na FungiDB, utilizando o programa SignalP 3.0. ...	34

**Figura 13.** Representação esquemática de cassetes para silenciamento por ARN de interferência das lipases individuais de *P. cinnamomi* (a) e representação de uma multicassete para silenciamento simultâneo dos dois genes (b) ..... 37

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Genes ligados à patogenicidade em <i>Phytophthora cinnamomi</i> . .....	21
<b>Tabela 2.</b> Localização segundo o programa Cello da proteína com a referência PHYCI_76143T0 de 309 aa em FungiDB.....	35

## Abreviaturas

<b>aa</b>	Aminoácido
<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNi</b>	Ácido ribonucleico de interferência
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>ARN-seq</b>	ARN sequencing
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Cálcio
<b>DDJB</b>	DNA Data Bank of Japan
<b>EC 3.1.1.3</b>	Triacylglycerol lipase
<b>EMBL</b>	European Molecular Biology Laboratory
<b>ER</b>	Retículo endoplasmático
<b>EST</b>	Expressed Sequence Tags
<b>FungiDB</b>	The Fungal and Oomycete Genomics Resource
<b><i>gip</i></b>	Gene da proteína inibidora da glucanase
<b>GIP</b>	Proteína inibidora da glucanase
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GSS</b>	Genome Survey Sequences
<b>JGI</b>	Joint Genome Institute
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NIP</b>	Necrosis-inducing proteins
<b><i>npp1</i></b>	Gene da proteína 1 indutora da necrose em <i>P.cinnamomi</i>
<b>NPP1</b>	Proteína 1 indutora da necrose em <i>P.cinnamomi</i>
<b>nt</b>	Nucleótido
<b>ORF</b>	Open reading frame; Fase de leitura aberta
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>PGs</b>	Poligalacturonases
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction; Amplificação de DNA por reação em cadeia com uma polimerase de DNA
<b>RISC</b>	RNA – Induced Silencing Complex
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid

<b>shRNA</b>	short/small hairpin RNA
<b>siRNA</b>	small interfering RNA
<b>TGS</b>	Transcriptional Gene Silencing

As restantes abreviaturas correspondem às abreviaturas internacionais e aos sistemas de medidas admitidos (IUPAC, União Internacional de Química Pura e Aplicada), incluindo os códigos de uma e três letras para designar os aminoácidos.

## Resumo

Os Oomicetas estão entre os organismos que causam doenças graves nas plantas e importantes perdas económicas na agricultura. São um grupo diverso de organismos eucariotas que podem encontrar-se em muitos nichos ecológicos, incluindo saprófitas e parasitas de plantas e animais.

*Phytophthora cinnamomi* é um Oomiceta, considerado um dos patogéneos mais difundidos e destrutivos do planeta. A sua presença geográfica é cosmopolita e a gama de hospedeiros é encarada como uma das maiores. Este patogéneo causa danos económicos enormes a importantes culturas a nível mundial, isto contribuiu para despertar a atenção da comunidade científica. É o agente causal da doença da “tinta” do castanheiro (*Castanea sativa* Miller).

Em Portugal, o castanheiro ocupa sobretudo a parte mais montanhosa do interior Centro e Norte, sendo uma importante fonte de rendimento das populações. O castanheiro tem diferentes aplicações, para além da castanha e da madeira, possui um papel importante na ecologia dos solos e na biodiversidade. Por isso, é importante conhecer os mecanismos moleculares (genes e proteínas) que estão na base do processo infeccioso de *Castanea sativa* por *Phytophthora cinnamomi* e a natureza da interação patogéneo-hospedeiro a fim de se poderem estabelecer estratégias de combate e controlo deste parasita.

Com ferramentas de bioinformática, conseguimos identificar e caracterizar o gene Avr3a em sequências genómicas de *P. cinnamomi*, depositadas nas Databases. Este gene codifica uma proteína com 209 aa reconhecida no citoplasma do hospedeiro onde desencadeia morte celular. Neste trabalho também caracterizamos duas sequências no genoma de *P. cinnamomi* que codificam proteínas de 309 e 425 aa, com atividade lipásica e com localização extracelular, homólogas com proteínas de papel significativo na patogenicidade de fungos de diferentes espécies do género *Phytophthora*. A fim de compreender melhor o seu papel no mecanismo de patogenicidade, foram desenhadas cassetes de silenciamento por ARN de interferência para os genes que codificam estas proteínas.

**Palavras-chave:** Castanheiro, *Phytophthora cinnamomi*, doença da tinta, lipases, gene Avr3a, ARN de interferência.

## Abstract

Oomycetes are among the organisms that cause serious diseases in plants and significant economic losses in agriculture. They are a diverse group of eukaryotic organisms that can be found in many ecological niches, including saprophytes and plant and animal parasites.

*Phytophthora cinnamomi* is an Oomycete considered one of the most widespread and destructive pathogens on the planet. Its geographic presence is cosmopolitan and the range of hosts is regarded as one of the largest. This pathogen causes enormous economic damages to important cultures worldwide, this has helped to attract the attention of the scientific community. It is the causal agent of chestnut "ink" disease (*Castanea sativa* Miller).

In Portugal, the chestnut tree occupies mainly the hilly part of the interior of the Center and North, being an important source of income of the populations. The chestnut tree has different applications, besides chestnut and wood, it plays an important role in soil ecology and biodiversity. Therefore it is important to know the molecular mechanisms (genes and proteins) that are the basis of the *Castanea sativa* infestation process by *Phytophthora cinnamomi* and the nature of the pathogen-host interaction in order to establish strategies to combat and control this parasite.

With bioinformatics tools, we were able to identify and characterize the Avr3a gene in genomic sequences of *P. cinnamomi* deposited in the Databases. This gene encodes a recognized 209 aa protein in the host cytoplasm where it triggers cell death. In this work we also characterize two sequences in the genome of *P. cinnamomi* that encode proteins of 309 and 425 aa with lipase activity and with extracellular localization, homologues with proteins with significant role in the pathogenicity of fungi of different species of the genus *Phytophthora*. In order to better understand their role in the pathogenicity mechanism, interference RNA silencing cassettes were designed for the genes encoding these proteins.

**Keywords:** Chestnut, *Phytophthora cinnamomi*, ink disease, lipases, Avr3a gene, interference RNA.

## 1. Introdução

### 1.1. O Castanheiro

O castanheiro é uma árvore de fruto pertencente ao género *Castanea* que juntamente com os géneros *Fagus* e *Quercus* pertence à família *Fagaceae*. É uma árvore de folha caduca que pode atingir 25-45 metros de altura, as folhas são simples, de 10-25 cm de comprimento por 5-8 cm de largura, com a margem serrada. Trata-se de uma espécie monóica com floração de maio a junho e os frutos amadurecem de outubro a novembro, vulgarmente conhecidos por castanhas, são glandes rodeadas por uma cúpula acrescente e espinhosa, designada por ouriço. O seu crescimento é bastante rápido até aos 50-60 anos e vivem em média 150 anos. A um povoamento de castanheiros mansos, vocacionados para produzir castanhas, dá-se o nome de “souto” e a um povoamento vocacionado para produzir madeira dá-se o nome de “castinçal” (Corredoira *et al.*, 2004; Serrazina, 2004; Silva, 2007).

Por ser uma espécie de origem muito antiga e por ser cultivada pelo homem há muito tempo, é difícil estimar a área de distribuição primitiva do castanheiro. Contudo muitos autores concordam com a hipótese de o castanheiro ser originário da Ásia Menor. Apesar da diversidade de solos e clima, o castanheiro encontra-se distribuído pelos continentes Europeu, Asiático, Americano e Oceânia. A especiação ocorreu, onde a adaptação à diversidade dos ecossistemas possibilitou que as diferentes espécies resultantes apresentassem especificidades próprias (Gomes-Laranjo *et al.*, 2009, Silva, 2007).

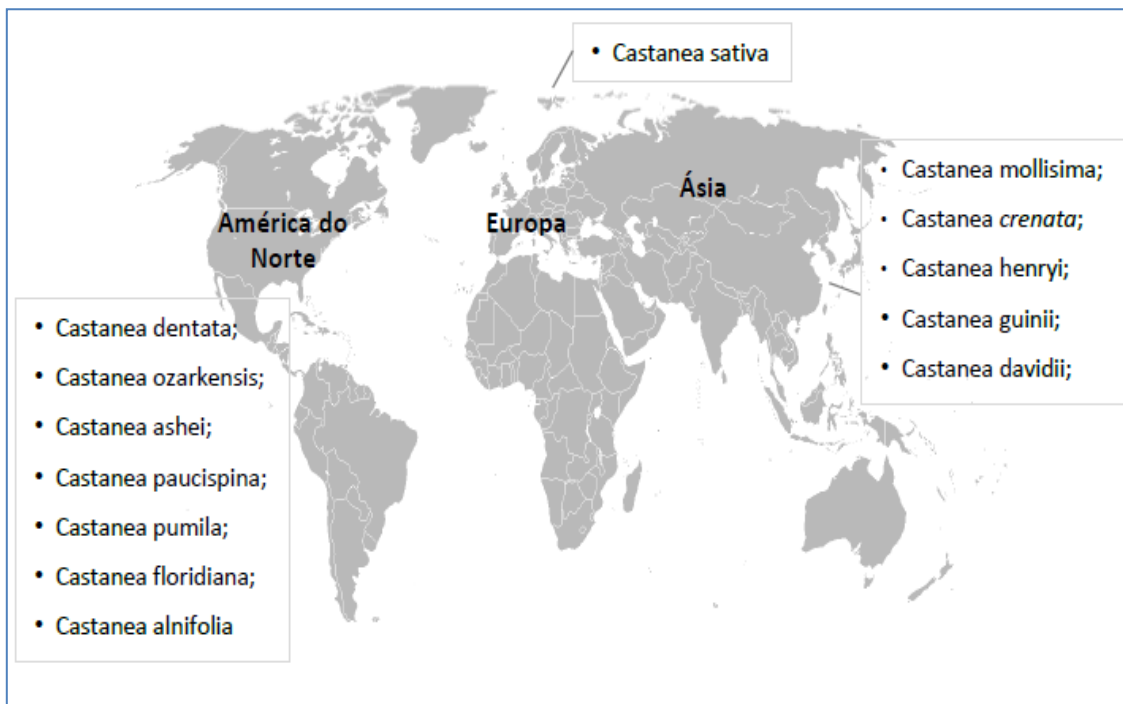
O castanheiro tem diferentes aplicações consoante a variedade, para além da castanha e da madeira, tem um papel importante na ecologia dos solos, na biodiversidade, no equilíbrio dos ecossistemas promovendo abrigo e alimentação a pequenos vertebrados. A castanha é apreciada nas tradições culinárias do Mediterrâneo, tem grandes qualidades organoléticas e valor nutricional, com alto teor de amido, teor de água e baixos níveis de gordura. A presença do castanheiro potencia o crescimento de cogumelos e ervas aromáticas contribuindo para a manutenção de uma maior biodiversidade com interesse ecológico e económico (Borges *et al.*, 2008).

Na Europa o castanheiro está presente desde o final da era Mesozoica, ou mais seguramente desde a era Cenozoica, época em que se deu a sua expansão. A existência

de *C. sativa* na Europa vem de tempos tão longínquos que é difícil perceber, em determinadas regiões, quais as populações autóctones e quais as que foram cultivadas e se tornaram posteriormente selvagens (Silva, 2007).

*Castanea sativa*, vulgarmente designada por castanheiro europeu, pertence ao género *Castanea* da família das *Fagaceae*, encontra-se distribuída por 25 países europeus ocupando cerca de dois milhões de hectares. Esta espécie tem especial incidência em Espanha, França, Grécia, Itália, Portugal e Turquia. Em Itália, a área florestada com castanheiro é das maiores da Europa (Gomes-Laranjo *et al.*, 2009).

Além do castanheiro europeu, que tem interesse económico pelo fruto e pela madeira, o género *Castanea* engloba ainda outras espécies de elevado interesse económico como *C. dentata* (castanheiro americano), hoje em dia, restrita ao sudeste do continente norte-americano; *C. mollissima* (castanheiro chinês) originária da China podendo ser também encontrada na Coreia do Norte e *C. crenata* (castanheiro japonês), encontra-se estabelecida no Japão e Coreia do Sul; assim como outras, com valor económico reduzido ou desconhecido como: *C. alnifolia*, *C. ashei*, *C. davidii*, *C. floridana*, *C. henry*, *C. ozarkensis*, *C. paucispina*, *C. pumila* e *C. seguinii* (Vieitez *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Espécies de Castanha no Mundo (Fórum Florestal, 2010).

Em Portugal, o castanheiro ocupa sobretudo a parte mais montanhosa do interior Centro e Norte, que corresponde às regiões da Beira Interior e Trás-os-Montes (Terra Fria Transmontana), localizadas entre os 600 e os 1000 m de altura. Em Trás-os-Montes existem aproximadamente 25.800 hectares de souto, o que representa cerca de metade da área total da Terra Fria. Aqui é produzida cerca de 85% da castanha nacional. Na Beira Interior, são cultivados cerca de 5 mil ha de castanheiros; por todo o país existem núcleos de castanheiro como na região Norte do Alentejo, Algarve, Minho Interior, Açores e Madeira (Choupina *et al.*, 2014<sup>b</sup>; Serrazina, 2004; Gomes-Laranjo *et al.*, 2009).

Até à data pensava-se que o castanheiro tinha sido introduzido em Portugal pelos romanos, sondagens realizadas em turfeiras da Serra da Estrela, a 1600 m, foram descobertas concentrações polínicas fósseis com 8000 anos. Embora ainda seja preciso saber com maior exatidão a datação do pólen encontrado é possível considerar que a ocorrência do castanheiro em Portugal é bastante anterior aos romanos, colocando-se a hipótese de ser uma espécie já existente no nosso país desde a época da pré-história (Van Den Brink e Janssen, 1985).

Na Europa, durante o século XX a produção da castanha diminuiu consideravelmente, com perdas de cerca de 300 milhões de euros; na América do Norte, na mesma época, os povoamentos de *C. dentata* quase desapareceram. Este decréscimo de produção deve-se essencialmente a infeções causadas por agentes patogéneos que são letais para a planta. A doença da tinta, provocada pelos Oomicetas *Phytophthora cinnamomi* (espécie mais virulenta) e *Phytophthora cambivora*, e o cancro do castanheiro, provocado pelo fungo *Cryphonectria parasitica*, são as principais e mais graves doenças do castanheiro (Silva, 2007; Costa *et al.*, 2011).

## 1.2. Doença da Tinta do Castanheiro

A doença da Tinta do castanheiro europeu (*Castanea sativa* Miller) surgiu em Espanha em 1726. Em 1859 verificou-se o aparecimento de sintomas da doença em castanheiros no Norte de Itália, nas províncias da Toscana, Piemonte e Ligúria; em França, nas regiões de *Gard*, *Lozère* e Baixos Pirenéus (Crandall, 1950; Elorrieta, 1949).

Em Portugal, os primeiros sintomas da doença da Tinta foram registados por volta de 1838 nas margens do rio Lima, verificando-se amarelecimento e queda prematura das folhas e o aparecimento de uma podridão húmida nas raízes que mais tarde conduzirá à morte da árvore (Fernandes, 1953). Habitualmente conhecida por doença da tinta, visto que nas zonas infetadas da planta ocorrem exsudados de cor violeta ou azul escuro. Quando surgem sintomas na copa da árvore pode significar que a infeção está muito avançada, tornando-se difícil de erradicar (Serrazina, 2004; Gomes-Laranjo *et al.*, 2009).

Segundo Gouveia, citando outros autores, o efeito da doença da tinta é considerada por muitos a principal causa do declínio e degradação dos soutos, a doença da tinta atinge, atualmente, proporções epidémicas em Portugal (Gouveia, 1993; Abreu *et al.*, 1999).

Na região do Nordeste Transmontano (nordeste de Portugal), o patogéneo *Phytophthora cinnamomi* é o responsável pela doença da tinta afetando *Castanea sativa* (Choupina *et al.*, 2013).

A Doença da Tinta conduz invariavelmente ao declínio e à morte do castanheiro e os parasitas, uma vez introduzidos no solo, rapidamente se multiplicam e disseminam para áreas cada vez mais alargadas. A produção de material de propagação de castanheiro isento de propágulos destes parasitas e a plantação em solos onde os parasitas não estejam presentes são assim requisitos básicos para o sucesso das novas plantações de castanheiro. Para se garantir a qualidade do material de propagação e conhecer o estado sanitário dos solos são necessários métodos de deteção sensíveis e rápidos (Gouveia *et al.*, 2009). No entanto, a grande capacidade de sobrevivência de *P. cinnamomi* dificulta em muito as estratégias de combate a este Oomiceta (Hwang e Ko, 1978).



**Figura 2.** Sintomas causados por *Phytophthora cinnamomi* em castanheiro ao nível da copa (a) e (b), tronco (c) e raiz (d) (Carvalho, 2014).

Para efetuar um controlo eficiente de um agente patogénico ao menor custo é necessário uma investigação de todas as opções disponíveis, sendo necessário conhecer o agente e quando é que este se encontra na fase mais suscetível do seu ciclo de vida, efetuando-se um controlo ao nível do agente patogénico; desta forma, será necessário conhecer o hospedeiro e o que o torna mais suscetível ao agente agressor, agindo-se ao nível do hospedeiro (*C. sativa*); e, por fim, como é que o ambiente exerce influência tanto no agente patogénico como no hospedeiro, controlando-se as condições ambientais que propiciam a doença. O agente patogénico, o hospedeiro e o ambiente constituem os três elementos mais importantes em que os métodos de controlo se devem basear. Quando se aplicam medidas que afetam a sua interação efetua-se um controlo eficaz da doença (Erwin e Ribeiro, 1996).

### 1.3. Oomicetas

Os Oomicetas causam enormes perdas na agricultura e degradação generalizada em áreas de crescimento natural, sendo responsáveis pela morte de milhares de árvores por ano (Santos *et al.*, 2016).

São um grupo diverso de organismos eucariotas que podem ser encontrados em muitos nichos ecológicos, incluindo saprófitas e parasitas de plantas, animais, insetos e vários microrganismos. Mais de 60 % das espécies conhecidas de Oomicetas são parasitas de plantas (Thines e Kamoun, 2010).

Os principais gêneros de Oomicetas patogêneos são: *Phytophthora*, *Plasmopara viticola*, *Albugo*, *Bremia*, *Peronospora* e *Pythium*. Entre estes gêneros, espécies do gênero *Phytophthora* são sem dúvida os agentes patogêneos mais destruidores de plantas dicotiledóneas, tais como batata, pimenta, tomate, soja, ervilha e alfafa (Kamoun, 2003).

Os Oomicetas foram por muito tempo classificados no reino dos fungos, devido ao seu crescimento filamentosos. No entanto, análises moleculares modernas mostram que estão mais relacionados com algas heterocontes no Reino *Stramenopila* (Kamoun, 2003; Thines e Kamoun, 2010), também denominado *Chromista* por Cavalier-Smith em 1986. Em contraste com fungos, *Stramenopila* são mais estreitamente relacionados às plantas do que animais, desta forma atribui-se assim significado às singularidades biológicas, fisiológicas, bioquímicas do gênero *Phytophthora* (Dick, 1995).

Os Oomicetas são um grupo de organismos que, apesar de apresentarem um crescimento com hifas e modos de vida semelhantes a fungos, representam uma linha evolutiva única, distante dos fungos verdadeiros. As principais diferenças incluem estruturados flagelos presentes nos zoósporos e a presença de celulose em vez de quitina na parede celular, entre outras divergências bioquímicas e estruturais (Horta, 2006).

Tanto os fungos como os Oomicetas formam micélio e esporos durante a reprodução assexuada e sexual e têm um crescimento filamentosos na fase vegetativa e sintetizam o aminoácido lisina por diferentes vias metabólicas, no entanto, existem entre estes dois grupos, várias diferenças morfológicas e fisiológicas importantes. A parede celular da maioria dos Oomicetas é principalmente constituída por celulose e beta-glucanos em vez de quitina, como os fungos, e a outra diferença é que o

estádio vegetativo dos fungos é haplóide, enquanto Oomicetas são diplóides (Kamoun, 2003).

Os Oomicetas incluindo *Phytophthora*, são a nível evolutivo muito distantes dos "verdadeiros" fungos, apesar de fazerem parte de um vasto grupo de microrganismos eucariontes e serem originalmente classificados como pertencentes ao reino Fungi devido à sua similaridade no crescimento, morfologia, propagação mediante esporos e na forma como infeta o hospedeiro (Latijnhouwers, 2003; Judelson e Blanco, 2005; Govers e Gijzen, 2006). No entanto, contrariamente à maior parte dos fungos, os Oomicetas são organismos difíceis de controlar já que não são afetados pela maior parte dos antifúngicos. A dificuldade em controlar estes organismos aumenta as doenças provocadas por *Phytophthora*, visto que as plantas são infetadas na maioria dos casos a nível das raízes onde não existe um tratamento economicamente viável (Tyler *et al.*, 2009).

### 1.3.1. O Género *Phytophthora*

O género *Phytophthora* pertence ao reino Chromista, filo Oomycota, classe Oomycetes, ordem Pythiales, família Pythiaceae (Hawksworth *et al.* 1995).

Foi tradicionalmente classificado no reino Fungi, por se tratar de organismos: heterotróficos, crescimento por polarização das hifas, esporos vegetativos adaptados à dispersão pelo vento ou pela água e utilizarem estratégias de infeção das plantas semelhantes às dos fungos. No entanto, em *Phytophthora*, sempre foram reconhecidas características biológicas e fisiológicas que lhe conferiam singularidade no contexto do reino onde estava inserida, e que foram sucessivamente ampliadas com estudos posteriores (Gouveia, 2004).

Como referido anteriormente, ao contrário de outros fungos "verdadeiros", a maior parte do seu ciclo de vida é diplóide, as paredes celulares são compostas por celulose e  $\beta$ -glucanos em vez de quitina, produzem zoósporos biflagelados e não sintetizam esteróis, por isso são resistentes aos antibióticos poliênicos, como a pimaricina, necessitando no entanto, esteróis para esporularem (Erwin e Ribeiro 1996).

Estes eucariontes semelhantes a fungos, classificados taxonomicamente como Oomicetas, geram esporos assexuados e sexuados, com características que contribuem grandemente para o seu sucesso patogénico (Judelson e Blanco, 2005).

#### **1.4. Mecanismo de infeção da *Phytophthora* e propagação da doença**

O género *Phytophthora* foi mencionado pela primeira vez por Anton de Bary em 1876 ao descrever o agente responsável pela devastação dos batatais na Irlanda, principal fonte alimentícia da população, promovendo o êxodo de aproximadamente um milhão de irlandeses para a América do Norte, entre os anos de 1845 e 1846 (Luz *et al.*, 2001).

*Phytophthora* pertence a um grupo de transição entre os fungos inteiramente aquáticos e completamente terrestres, refletindo-se na complexidade do seu ciclo de vida. Este organismo é dependente das condições de humidade para a sua sobrevivência, mas têm a capacidade de esporulação, dispersão, infeção e é capaz de adotar várias estratégias de adaptação às alterações edafoclimáticas (Shearer e Tippett, 1989).

Várias espécies de *Phytophthora* constituem uma ameaça para ecossistemas naturais, culturas hortícolas, frutícolas tropicais e subtropicais, ornamentais e florestais, podendo causar graves perdas económicas. A maior parte das espécies de *Phytophthora* são fungos de solo que causam a destruição do sistema radicular e podem sobreviver longos períodos de tempo no solo sem a presença do hospedeiro (Erwin e Ribeiro 1996).

A classificação taxonómica do género *Phytophthora* é baseada essencialmente em características morfológicas. Estas apresentam elevada plasticidade e são em número reduzido face ao elevado número de espécies descritas, tornando a classificação e identificação um processo difícil, laborioso e muito moroso (Gouveia, 2004).

As várias espécies do género *Phytophthora* podem infetar todos ou somente alguns órgãos específicos das plantas hospedeiras. Entre as várias manifestações de doenças podem-se citar: podridões radiculares, do colo, de frutos, lesões foliares, gomoses, murchidão da parte aérea da planta entre outras (Kimati *et al.*, 1997).

Existem muitas espécies de plantas classificadas como hospedeiras de uma ou mais espécies de *Phytophthora*, incluindo espécies florestais como carvalho (*Quercus sp.*), pinheiro (*Pinus sp.*), eucalipto (*Eucalyptus sp.*), cultivos agrícolas perenes, tendo como exemplo as plantas cítricas (*Citrus spp.*), o cacaueteiro (*Theobroma cacao L.*), a seringueira (*Hevea brasiliensis*) e cultivos anuais da papaia (*Carica papaya L.*), da batata (*Solanum tuberosum L.*) e do tomateiro (*Solanum lycopersicum L.*) (Beales *et al.*, 2004).

No Brasil diferentes espécies de *Phytophthora* são patogêneos de diversos cultivos economicamente viáveis, havendo relatos de sua ocorrência em todas as regiões do país (Luz *et al.*, 2001).

A gomose causada por *P. nicotianae* e *P. boehmeriae* é considerada o principal problema fitossanitário da acácia-negra, espécie florestal de importância econômica, e causa grandes perdas na produção das principais regiões produtoras do Brasil (Santos e Luz, 2006).

A maior dificuldade para a identificação morfológica das espécies do gênero *Phytophthora* é a definição de critérios objetivos de identificação, por isso, existe a necessidade de aplicações de técnicas, meios de cultura e procedimentos muito definidos para obtenção de estruturas morfológicas diferenciadas. Determinaram-se novas metodologias no domínio da bioquímica, da serologia e, mais recentemente, métodos moleculares foram aplicados na sistemática, classificação e filogenia do gênero (Gouveia, 2004).

### **1.5. Fatores de patogenicidade e moléculas efetoras da *Phytophthora***

Os patogêneos das plantas utilizam uma variedade de estratégias para colonizar e infectar os seus hospedeiros. Depois de atacar e se introduzirem na superfície do hospedeiro, os agentes patogêneos necrotróficos crescem através de tecidos vegetais como hifas, enquanto segregam uma variedade de enzimas e toxinas que matam e degradam os tecidos do hospedeiro; agentes patogêneos biotróficos, por outro lado, dependem dos tecidos vivos do hospedeiro para aquisição de nutrientes. Tipicamente, os agentes patogêneos biotróficos penetram na parede celular do hospedeiro, mas não na membrana plasmática, desenvolvendo estruturas especializadas de alimentação. Muitos Oomicetas

patogêneos podem ser caracterizados como hemibiotróficos, visto que, numa fase inicial biotrófica, eventualmente, é seguida por uma fase necrotrófica (Hosseini, 2010).

A fim de estabelecer uma infecção bem sucedida, os patogêneos precisam modular processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos nos seus hospedeiros. Os Oomicetas, normalmente conseguem, através da secreção de proteínas e outras moléculas coletivamente conhecidas como efetoras (Hogenhout *et al.*, 2009).

Efetoras são definidas como todas as proteínas patogênicas e pequenas moléculas que manipulam a estrutura e função da célula hospedeira, quer por facilitarem a infecção ou por ativarem uma resposta de defesa (Kamoun, 2006). Muitos genes efetores têm distintos padrões de expressão durante a colonização das plantas hospedeiras (Schornack *et al.*, 2009).

#### 1.5.1. Lipases em *Phytophthora*

As enzimas lipases (EC 3.1.1.3) pertencem à família das serinas hidrolases, que por sua vez incluem várias enzimas esterases. São enzimas que catalisam a hidrólise de gorduras e óleos, libertando ácidos gordos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Também têm a capacidade de catalisar reações de esterificação, transesterificação e interesterificação em solventes orgânicos (Villeneuve *et al.*, 2000).

As lipases estão amplamente distribuídas na natureza podendo encontrar-se em animais, como a lipase pancreática, as lipases da língua, do leite, do tecido adiposo, etc.; em plantas, principalmente nas sementes oleaginosas (atuam sobre os corpos lipídicos dos esferossomas); em bactérias, fundamentalmente em espécies dos géneros *Chromobacterium*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*; em leveduras principalmente em espécies do género *Candida* e na espécie *Yarrowia lipolytica*; e, em fungos, especialmente em espécies dos géneros *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Penicillium*.

As lipases microbianas são bastante diversificadas nas suas propriedades enzimáticas e especificidade para o substrato, o que aliado à sua fácil disponibilidade as torna muito atrativas para múltiplas funções biológicas e aplicações biotecnológicas.

Neste trabalho, referenciamos lipases em Oomicetas de espécies de *Phytophthora* spp., destacando as da espécie *Phytophthora cinnamomi*, com papel importante na fitopatogenicidade destes pseudofungos.

Nas databases GenBank/Joint Genome Institute (JGI), encontramos algumas sequências em *Phytophthora* spp. com um domínio putativo esterase/lipase descrito na literatura, com papel associado a mecanismos de patogenicidade (Richards *et al.*, 2011). Uma dessas sequências com ID82760 é de *Phytophthora ramorum*. Analisando essa sequência, Mancheno *et al.* (2003), consideraram que o papel funcional das esterases e das lipases é difícil de decifrar com base na homologia, porque a especificidade para o substrato muitas vezes depende de pequenas mudanças nas sequências de aminoácidos e essas famílias de enzimas têm relativamente poucos estudos funcionais em comparação com outras famílias de proteínas. No entanto, esta sequência de aminoácidos tem uma grande semelhança com as sequências de lipase do fungo *Pleurotus sapidus* que realizam a hidrólise eficiente de ésteres de xantofilas (Zorn *et al.*, 2005), logo, são potencialmente importantes para o processamento de carotenóides de xantofilina encontrados em tecidos vegetais.

Também foi demonstrado pela análise da database KASS que este gene tem grande similaridade com enzimas que participam na degradação de esteróis e lípidos. Alguns Oomicetas usam fontes extracelulares de esteróis e ácidos gordos, sendo que, a presença desses metabolitos, desempenham um papel importante para determinar da transição desses Oomicetas em diferentes estágios do ciclo de vida (Langcake *et al.*, 1975; Nes *et al.*, 1983). No entanto, estas enzimas extracelulares podem desempenhar um papel importante na libertação de ácidos gordos e terpenóides de cadeia longa a partir de uma variedade de substratos derivados de plantas.

Outras sequências de *Phytophthora sojae*, com domínio esterase/lipase, encontram-se nesta database com ID 133521, 142730 e 141189. Prever a função dessas proteínas, é muito difícil devido à família de genes altamente complexos como a família esterase/lipase. De acordo com Devescovi *et al.* (2007), as lipases extracelulares demonstraram ser importantes fenótipos patogêneos envolvidos na detecção e degradação da cutícula cerosa da planta, que pode representar um importante recurso metabólico para esteróis e ácidos gordos

de cadeia longa para os patógenos de plantas como são os Oomicetas (Voigt *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2009).

### 1.6. A espécie *Phytophthora cinnamomi*

*Phytophthora cinnamomi* foi descrita pela primeira vez por Rands em 1922, após ter sido detetada na árvore da canela (*Cinnamomi burmamii* Blume) em Sumatra. É um oomiceta do solo que infeta essencialmente as raízes das plantas hospedeiras. Este fitopatogénico originário da região da Papua Nova Guiné tem agora uma distribuição global (Hardham, 2005).

Atualmente, é a espécie do género *Phytophthora* mais amplamente distribuída e o patógeno mais destrutivo, com uma ampla gama de hospedeiros, provocando doença em aproximadamente 1000 espécies de plantas (Erwin e Ribeiro, 1996).

Esta espécie, assim como outros Oomicetas, possuem características que a permite distinguir de muitos outros fungos patógenos. Caracteriza-se em termos biológicos por possuir micélio cenocítico, as hifas são hialinas podendo ter uma aparência lisa, nodosa ou botriosa e ramificações laterais apresentam geralmente uma ligeira constrição na base (Gouveia, 2004).

Na Península Ibérica a *P. cinnamomi* é um pseudo fungo associado à mortalidade de castanheiros. Descobertas recentes revelam a existência de uma extensa classe de Oomicetas que, por um lado contribuem para a infeção da planta e, por outro lado, despoletam os sistemas de defesa da mesma (Hardham, 2005). Estas descobertas proporcionam uma excelente ajuda a novos estudos para compreender como estes organismos despoletam o reconhecimento de cascatas de defesa, quais os mecanismos que melhor resistem ao patógeno e como este ultrapassa ou suprime as ditas defesas (Duclos *et al.*, 1998; Kamoun, 2003).

Estas espécies de Oomicetas podem manipular processos bioquímicos e fisiológicos nas plantas hospedeiras através de um conjunto diverso de moléculas designadas por efetoras. Em plantas suscetíveis, estes efetores promovem a infeção suprimindo os mecanismos de defesa, reforçando a suscetibilidade ou originando sintomas da doença (Dixon *et al.*, 1994; Montesano *et al.*, 2003).

Em Oomicetas como é o caso da *Phytophthora cinnamomi* o processo de germinação, esporulação, crescimento celular e patogenicidade tem sido relacionado com a alteração da estrutura da parede celular (Hardham, 2005).

*P. cinnamomi* foi isolada do castanheiro pela primeira vez no nosso país, em 1941 por Moniz da Maia e confirmado em 1942 por Pimentel; que também isolou e identificou *P. cinnamomi* e *P. cambivora* de castanheiro com sintomas da Doença da Tinta (Pimentel, 1947).

### 1.6.1. Ciclo de vida e Epidemiologia de *Phytophthora cinnamomi*

*Phytophthora cinnamomi* é uma espécie maioritariamente heterotática, produzindo as estruturas sexuadas a partir de formas ou *mating types* de tipo de emparelhamento oposto. Geralmente as formas complementares designam-se por A1 e A2. A forma A2 de *P. cinnamomi* é a mais comum e encontra-se distribuída mundialmente. A forma A1 tem uma distribuição mais restrita. Os oósporos são estruturas de resistência, permitindo ao fungo sobreviver fora do hospedeiro longos períodos de tempo. A unidade principal da fase assexuada de *Phytophthora cinnamomi* é a hifa cenocítica que por clivagem do seu citoplasma origina clamidósporos e esporângios (Hardham, 2005).

Os esporângios são as principais estruturas reprodutivas assexuadas. Têm a capacidade de poder germinar diretamente como micélio ou emitir zoósporos móveis (Stamps *et al.*, 1990). Os zoósporos são biflagelados, com dois flagelos diferentes entre si, que saem da parte côncava; são produzidos no interior do esporângio e saem já formados. Outras estruturas reprodutivas assexuadas que se observam mais frequentemente em meio líquido são os clamidósporos. São as estruturas de resistência mais frequentes e persistentes no solo (Erwin e Ribeiro, 1996).

*P. cinnamomi* é um patogéneo do solo que depende de condições de humidade favoráveis para a sua sobrevivência, esporulação e dispersão (Shearer *et al.*, 1986). Se as condições ambientais são as adequadas, principalmente temperatura apropriada e existência de água livre no solo, estas estruturas germinam, produzindo esporângios que libertam zoósporos. Os zoósporos são considerados os propágulos de infeção mais importantes, pois podem produzir várias gerações durante o

período em que as condições ambientais se mantiverem apropriadas (Zentmyer, 1980; Erwin e Ribeiro, 1996).

Além dos zoósporos conterem informação sobre o ambiente químico, podem também integrar informação sobre o ambiente elétrico, o que parece permitir aos zoósporos distinguir as raízes vivas das mortas e contribuir para a seleção do local da infecção na superfície da raiz (Moris e Gow, 1993).

Quando as condições não são favoráveis o fungo sobrevive no solo ou nos tecidos infetados sob a forma de clamidósporos que se mantêm no estado de latência por períodos mais ou menos longos. Quando estimulados pela presença de um hospedeiro e condições ambientais favoráveis, os clamidósporos germinam dando origem a novas hifas infecciosas (Caetano, 2007).

*P. cinnamomi* pode sobreviver em material vegetal morto, a fase saprofítica pode levar a um aumento na população do patógeno, embora espécies de *Phytophthora* tenham uma capacidade saprófita limitada o que significa que apresentam crescimento pobre e de baixa capacidade competitiva à presença de outros microrganismos do solo (Cahill *et al.*, 1993).

*Phytophthora cinnamomi* é, como já mencionado, um dos patógenos conhecidos mais destrutivos, causando a morte massiva de raízes absorventes, o que reduz a capacidade da planta de absorver água e nutrientes (Zentmyer, 1980).

Ao ultrapassar todas as barreiras o patógeno instala-se no hospedeiro e os sintomas externos mais evidentes surgem na parte superior da copa progredindo de cima para baixo, a partir da extremidade dos ramos (Martins, 2010).

### **1.7. Estratégias de transformação genética e mecanismos de silenciamento genético**

Técnicas fiáveis e reprodutíveis para realizar manipulação molecular genética são essenciais para a determinação das funções de genes e proteínas identificados nos mais diversos organismos. A transformação genética é uma ferramenta chave para alcançar este objetivo. No caso dos microrganismos oomicetas fitopatogénicos, a transformação fornece ainda um método de seguir o crescimento dos mesmos nos hospedeiros, através da aplicação de genes marcadores, como a proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*), permitindo ampliar os conhecimentos sobre a biologia destes patógenos (Horta, 2006).

No silenciamento genético a nível da tradução utiliza-se a técnica recente do ARN de interferência. Esta técnica descoberta por Fire *et al.* em 1998 em *Caenorhabditis elegans*, veio mais tarde, a ser aplicada noutros organismos. Consiste numa estratégia de análise da função de genes através da utilização de moléculas de ARN de fita dupla, em que uma das fitas apresenta sequência complementar ao ARN mensageiro do gene alvo, causando a degradação de sequências específicas do ARNm (Fire *et al.*, 1998).

No interior da célula, o mecanismo de síntese da sequência complementar ao ARN mensageiro do gene alvo iniciada a comando da enzima ARN polimerase III, gerando uma estrutura de dupla cadeia em forma de grampo, denominada *hairpin*, com tamanho de cerca de 100 nucleótidos. Esta estrutura é reconhecida pela enzima nuclear Drosha, que processa o *pré-shARN* (*Small hairpin RNA*). O *pré shARN* é exportado para o citoplasma e processado pela enzima DICER gerando o *siARN*, de cerca de 21 pares de bases, com duas moléculas de ARN, *passenger* e fita guia. A *passenger* é degradada e a fita ARN guia é incorporada ao complexo conhecido como RISC (*RNA-induced silencing complex*), que com a influência da enzima argonauta, encontra fitas complementares de ARN mensageiros específicos e degrada o ARNm alvo no centro de sua sequência (França *et al.*, 2010). Desta forma, as moléculas de ARN de interferência podem ser geradas no meio intracelular, codificadas num vetor, possibilitando controlar a sua taxa de transcrição utilizando promotores induzíveis e a sua persistência na célula alvo através de marcadores de seleção.

Para se proceder ao silenciamento de *P. cinnamomi* com ARN de interferência de forma a silenciar genes, são usadas construções baseadas em sistema de expressão plasmídico *hairpin-ARN*.

Recentemente tem-se demonstrado que este sistema induz o silenciamento pontual de genes de maneira mais eficiente e estável (Kadoni *et al.*, 2003; Goldoni *et al.*, 2004).

O primeiro exemplo de silenciamento fúngico por ARNi baseado em construção *hairpin-ARN* na levedura *Cryptococcus neoformans*, foi realizado por Liu *et al.* (2002).

Ah-Fong *et al.* obtiveram resultados aceitáveis no silenciamento do gene *infl* em *P. infestans* por meio da introdução de um intrão entre fragmentos sense e antisense do gene alvo na construção *hairpin-ARN* (Ah-Fong *et al.*, 2008).

Atualmente construções plasmídicas expressando *hairpin-ARN*, contendo um intrão, são o sistema mais confiável para induzir ARN de interferência em Fungos e Oomicetas (Namekawa *et al.*, 2005; West *et al.*, 2008).

Para a transformação genética desenvolvem-se linhas celulares de raízes de castanheiro que são depois utilizadas como modelo simplificado no estudo da ação do patógeno, fazendo-se assim um estudo comparativo dos genes envolvidos nas respostas de defesa da planta, procurando-se esclarecer a função dos diferentes efetores durante o processo.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho é contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares que estão na base do processo infeccioso de *Castanea sativa* por *Phytophthora cinnamomi* e assim compreender a natureza da interação patogéneo-hospedeiro. Isto pode representar um importante contributo para o estabelecimento de estratégias de controlo a doenças causadas por espécies de *Phytophthora* a culturas importantes como a cultura do castanheiro.

Para atingir este objetivo geral estabelecemos os seguintes objetivos específicos:

### 2.2. Objetivos específicos

- 1) Pesquisa de genes nas sequências genómicas do Oomiceta *Phytophthora cinnamomi*, depositadas nas Databases.
- 2) Identificação, por homologia, de fatores moleculares (genes/proteínas) implicados na patogenicidade de *Phytophthora cinnamomi*.
- 3) Caracterização bioinformática e localização subcelular dos fatores moleculares identificados.
- 4) Desenho de construções genéticas para silenciamento, por ARN de interferência, dos genes identificados e implicados na patogenicidade de *Phytophthora cinnamomi*.

### 3. Metodologias

#### 3.1. Edição e comparação de sequências

Para a edição detalhada das sequências foi utilizado o programa BioEdit, cuja versão está disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>. Para comparação e anilhamento das sequências utilizou-se o programa *Sequencher*, da empresa Gene Codes Corporation cuja cópia de demonstração da versão 5.2.4 está disponível em [www.genecodes.com](http://www.genecodes.com).

#### 3.2. Databases de informação biológica

Para a pesquisa de genes utilizamos as sequências do genoma e do transcriptoma de *Phytophthora cinnamomi*, depositadas nas databases:

- NCBI (National Center for Biotechnology Information) em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>;
- EMBL (European Molecular Biology Laboratory) em [www.ebi.ac.uk/ena](http://www.ebi.ac.uk/ena);
- DDJB (DNA Data Bank of Japan) em [www.ddbj.nig.ac.jp/](http://www.ddbj.nig.ac.jp/);
- FungiDB (The Fungal and Oomycete Genomics Resource) em [fungidb.org](http://fungidb.org).

#### 3.3. Pesquisa de fases de leitura aberta

Para a pesquisa de fases de leitura aberta nas sequências do genoma e do transcriptoma de *P. cinnamomi* foram utilizados os programas:

- ORF finder da NCBI em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>;
- GGENEinfinity em [http://www.geneinfinity.org/sms/sms\\_orffinder.html](http://www.geneinfinity.org/sms/sms_orffinder.html);
- GGenScript em [https://www.genscript.com/sms2/orf\\_find.html](https://www.genscript.com/sms2/orf_find.html).

#### 3.4. Homologia das proteínas codificadas pelas fases de leitura aberta

A detecção da homologia das proteínas e o alinhamento das sequências estão na base da predição da estrutura proteica, da função e da evolução. As homologias das proteínas foram determinadas nos programas Blast (smartBlast), Clustal Omega e Fasta, de forma independente ou através do NCBI (National Center for

Biotechnology Information). A sua utilização é simples necessitando-se apenas de colar a sequência em estudo na janela do programa e pedir ao programa que estabeleça a homologia com as sequências das Databases de proteínas: UniProt Universal Resource (EBI, Swiss Institute of Bioinformatics), Protein Information Resource (PIR, Georgetown University Medical Center (GUMC)), Swiss-Prot Protein Knowledgebase (Swiss Institute of Bioinformatics) e PROSITE (Database of Protein Families and Domains).

### 3.5. Predição da localização subcelular das proteínas

A predição da localização subcelular das proteínas prediz o destino de uma proteína na célula por meio de métodos computacionais que a partir da sequência de proteínas, produzem uma predição da localização da proteína.

Existem vários softwares publicamente disponíveis, utilizando diferentes métodos para prever a localização de proteínas (composição de aminoácidos, composição de peptídeo sinal, composição físico-química, entre outros), que é uma parte muito importante da predição baseada em bioinformática de função de proteína e anotação de genoma.

Os softwares utilizados para as previsões de localização de proteínas podem ser acessados através dos endereços de URL do seguinte modo:

- SignalP 3.0: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>;
- Cello: <http://cello.life.nctu.edu.tw/>;
- LOctree: <https://roslab.org/services/loctree2/>;
- EuK-mPLoc 2.0: <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>;
- Esl pred: <http://www.imtech.res.in/raghava/eslpred/index.html>.

### 3.6. Caracterização Bioinformática dos fatores moleculares

Após descodificação da fase de leitura aberta de um gene, uma série de ferramentas bioinformáticas podem ser utilizadas para a caracterização da sequência deduzida da proteína. Uma pesquisa no website do ExPasy Proteomics Server (<http://expasy.org/tools>) e uma sequência nucleotídica permitem-nos identificar e caracterizar proteínas, identificar motivos, padrões e perfis, inferir a sua

estabilidade, localização celular ou função, fazer as predições das estruturas secundária e terciária, procurar sequências similares depositadas em databases e compará-las, estabelecer relações filogenéticas.

A detecção das características físico-químicas das proteínas foi realizada em PROSITE (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>), no sistema de rede neurais do Pôle BioInformatique Lonnais/Network Protein Sequence Analysis ou na aplicação DiANNA 1.1 (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>). Consultaram-se sítios diferentes para a predição de modificações pós-traducionais na página *web* do Center of Biological Sequence Analysis (<http://www.cbs.dtu.dk/services>). As predições estruturais foram realizadas por meio do servidor Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/>) e a representação estrutural feita através do programa Pymol, cuja versão pode ser instalada em <https://www.pymol.org/>.

### 3.7. Pesquisas bibliográficas

As pesquisas bibliográficas foram-se recopilando periodicamente a partir das databases centrais (MEDLINE TM, Current Contents TM, Life Sciences TM).

Apesar das direções URL da Internet se poderem conservar durante algum tempo, é provável que, por diversas razões, mudem de localização. Por isso, recomendamos que se atualizem acedendo diretamente à direção antiga ou através de algum motor de pesquisas como "Google" (<https://www.google.com>), escrevendo a(s) palavra(s) chave mais adequada(s).

## 4. Apresentação e discussão dos resultados

### 4.1. Genes ligados à patogenicidade em *Phytophthora cinnamomi*

Com o objetivo de conhecermos os fatores moleculares (genes e proteínas) associados aos mecanismos de patogenicidade de *Phytophthora cinnamomi* identificados e caracterizados até este momento, começamos por pesquisar nas referências bibliográficas e nas databases já mencionadas nas metodologias (NCBI, EMBL, DDJB e FungiDB) sequências nucleotídicas e proteicas bem como publicações sobre o tema. Para nossa surpresa, já que se trata de um agente fitopatogénico muito importante à escala global como se realçou na introdução deste trabalho, e o número de fatores moleculares ligados à patogenicidade de *P. cinnamomi* estudados até este momento, é muito reduzido, como se pode observar na tabela que construímos (Tabela 1), não chegando a cobrir uma simples via metabólica apesar da grande quantidade de dados de sequenciação do genoma deste fungo resultantes das modernas e massivas plataformas de sequenciação.

**Tabela 1.** Genes ligados à patogenicidade em *Phytophthora cinnamomi*.

Nome do Gene	Fonte	Nome da Proteína	Função
endo1	NCBI Accession: AM259651	glucan 1,3-beta-D-glucosidase	Processos morfológicos da célula, sobretudo no processo de infeção.
gip	NCBI Accession: AM259384	glucanase inibitor protein	Responsável pela supressão da resposta de defesa do hospedeiro.
npp1	NCBI Accession: AM403130	protein 1	Causa necrose nas folhas e raízes da planta.
Transglu	NCBI Accession: AM403129	transglutaminase elicitor precursor	Induz respostas de defesa e sintomas semelhantes ao da doença.
endoglucanase	Appl Microbiol Biotechnol 98: 3905-3909. Springer.	endo-1,3-beta-glucanase	Responsável por mecanismos de infeção.
exoglucanase	Appl Microbiol Biotechnol 98: 3905-3909. Springer.	exo-glucanase	Responsável pela adesão, penetração e colonização nos tecidos do hospedeiro.
ADP-ribosylation factor	Mol Genet Genomics. 2010 Dec; 284 (6): 425-435	ADP-ribosylation factor	Responsável por mecanismos de infeção.
Ric1 protein mRNA	Mol Genet Genomics. 2010 Dec; 284 (6): 425-435	Ric1 protein mRNA	Responsável por mecanismos de infeção.
polygalacturonase 4 1,2,3 e 4,5,6	Mol Plant Microbe Interact. 2002 Sep; 15 (9): 907-21	polygalacturonase 4	Rutura na composição da parede celular das células dos vegetais.
highly acidic elicitin	DNA Seq. 1998; 9 (4): 231-237	highly acidic elicitin	Responsável por mecanismos de infeção.

Os fatores moleculares associados à patogenicidade em *P. cinnamomi* mais estudados são: **NPP1** (proteína 1 indutora de necrose de *P. cinnamomi*), responsável por induzir necrose em folhas e raízes de plantas, levando à morte destas; **GIP** (glucanase inibitor protein) responsável pela supressão da resposta de defesa do hospedeiro; **GLUCANASES** responsáveis pela adesão, penetração e colonização nos tecidos do hospedeiro e **POLIGALACTURONASES**, que hidrolisam as ligações glicosídicas alfa-1,4 entre os resíduos de ácido galacturónico. O poligalacturonano, cujo principal componente é o ácido galacturónico, um composto muito importante de carboidratos da rede de pectina que entra na composição da parede celular das células dos vegetais (Götesson *et al.*, 2002; Choupina *et al.*, 2014<sup>a</sup>).

#### **4.2. Sequências genómicas codificantes de *Phytophthora cinnamomi* com importância na patogenicidade**

Das sequências genómicas codificantes de *P. cinnamomi* depositadas nas Databases destacam-se as poligalacturonases. Götesson *et al.* (2002), realizaram um importante estudo sobre as poligalacturonases (PGs) de *P. cinnamomi*. Um fragmento do gene de uma poligalacturonase de *P. cinnamomi* foi amplificado utilizando iniciadores degenerados com base em regiões conservadas em PGs fúngicas e de plantas, este fragmento foi depois utilizado como sonda para isolar 17 genes e pseudogenes de *P. cinnamomi* completos a partir de uma biblioteca genómica, assim como, a sequência parcial para outros dois genes. A transferência por southern blotting de ADN genómico indicou que pode haver ainda mais genes de PG no genoma de *P. cinnamomi*. As sequências dos genes de PG de *P. cinnamomi* foram expressas em levedura com deficiência de PG onde conferirem atividade de PG, confirmando assim a sua identidade funcional. Ainda segundo estes autores, as PGs de *P. cinnamomi* previstas caem em subgrupos que exibem grandes diferenças na extensão de N-glicosilação, pontos isoelétricos e estrutura N e C-terminal. Foram obtidas evidências de nascimento e morte, e evolução reticulada na família de genes pg de *P. cinnamomi*. Contrariamente às filogenias aceites para outras proteínas, a análise filogenética das PGs de *P. cinnamomi* revelou uma relação mais próxima com PGs de fungos verdadeiros do que com os de plantas (Götesson *et al.*, 2002).

### 4.3. Sequências genômicas de *Phytophthora cinnamomi*

Nas databases de sequências nucleotídicas <http://www.ebi.ac.uk/ena> e <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, estão depositados pela Universidade de Exeter dois conjuntos de sequências do genoma de *Phytophthora cinnamomi* com as referências GCA\_001314365.1 e GCA\_001314505.1 sequenciadas com a plataforma Illumina HiSeq, com tamanhos de 536914 Mb e 539693 Mb, respetivamente, revelando ambas 54% de GC (Studholme *et al.*, 2016).

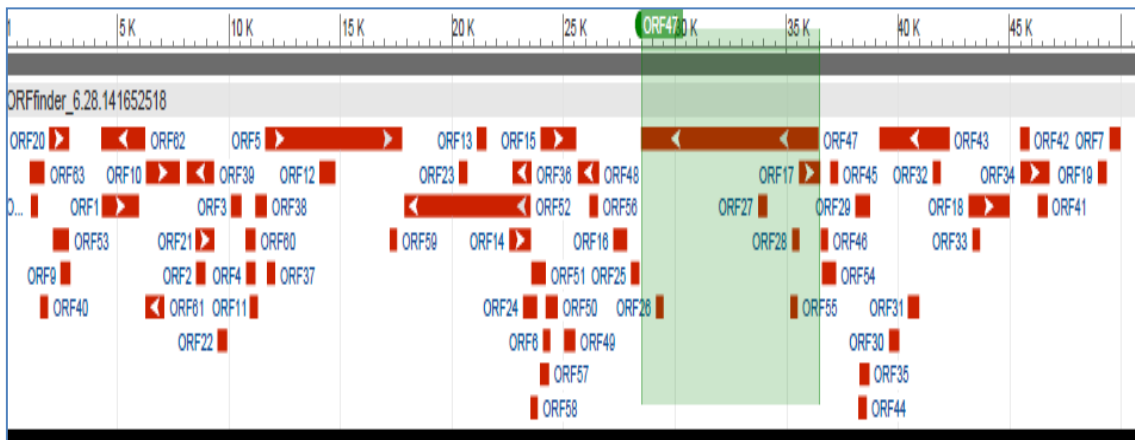
Nas databases biológicas europeia <http://www.ebi.ac.uk/ena>, existe ainda depositado um transcriptoma constituído por 37575 conjuntos de sequências de *Phytophthora cinnamomi* (Reitmann *et al.*, 2017). Além destas sequências, existem ainda na NCBI, 39509 conjuntos de sequências com função deduzida, 5 EST (Expressed Sequence Tags) e 1 GSS (Genome Survey Sequences). Estas sequências codificam maioritariamente para diferentes subunidades de ARN ribossomal, mitocondrial e genes do metabolismo fundamental de *P. cinnamomi*. Das 1289 proteínas depositadas a maioria são parciais e possuem funções estruturais (tubulinas e actinas) e funcionais de diferentes vias metabólicas (sintetases, oxidases e cinases), além de várias proteínas mitocondriais.

O estudo das sequências genômicas, os seus produtos, as suas funções e interações, permitirão elucidar os mecanismos genéticos e moleculares, estratégias de defesa e ataque do fungo *P. cinnamomi*, a fim de estabelecer estratégias de controlo mais eficiente e resiliente.

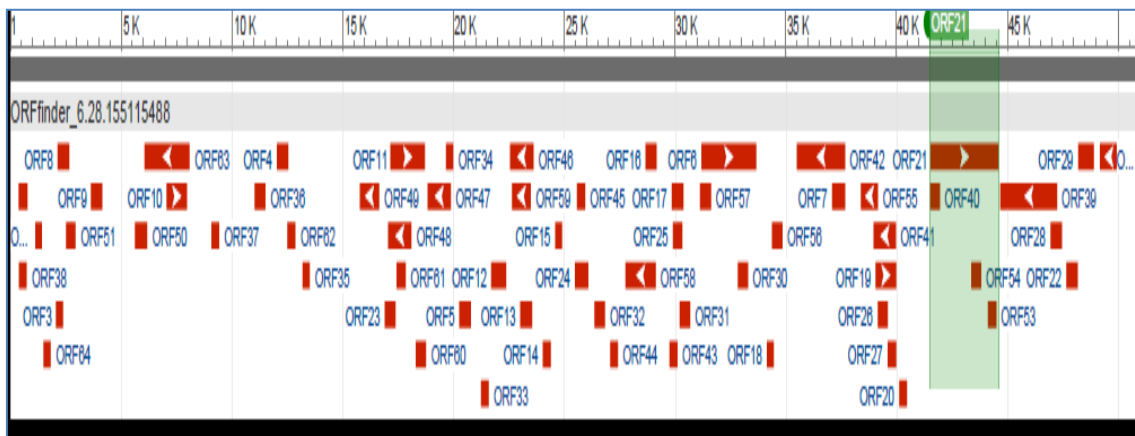
A análise bioinformática das sequências depositadas do genoma de *Phytophthora cinnamomi* realizada no programa "Open Reading Frame Finder-ORFfinder - NCBI", e noutros programas de pesquisa de fases de leitura aberta mencionados nas metodologias deste trabalho, permitiu-nos encontrar fases de leitura aberta que codificam proteínas com diferentes "domínios" e elevada homologia com proteínas com papel relevante na virulência em diferentes espécies do género *Phytophthora*.

Nas figuras 3 e 4 representam-se as fases de leitura aberta putativas das sequências com as referências LGSJ01000006.1, com 63 fases de leitura e LGSK01000001.1 com 64 fases de leitura, respetivamente, obtidas no programa ORFfinder da NCBI e deduzidas a partir de agrupamentos iguais ou superiores a 300 nucleótidos, considerando o ATG como o codão de início e TGA, TAG e TAA como

codões de STOP ou de terminação, o código genético universal e incluindo fases de leitura aberta internas.



**Figura 3.** Fases de leitura aberta deduzidas a partir da sequência LGSJ01000006.1 de *P. cinnamomi* depositada na database NCBI. O sentido das setas indica a sentido de leitura das fases de leitura aberta com tamanho significativo na sequência.

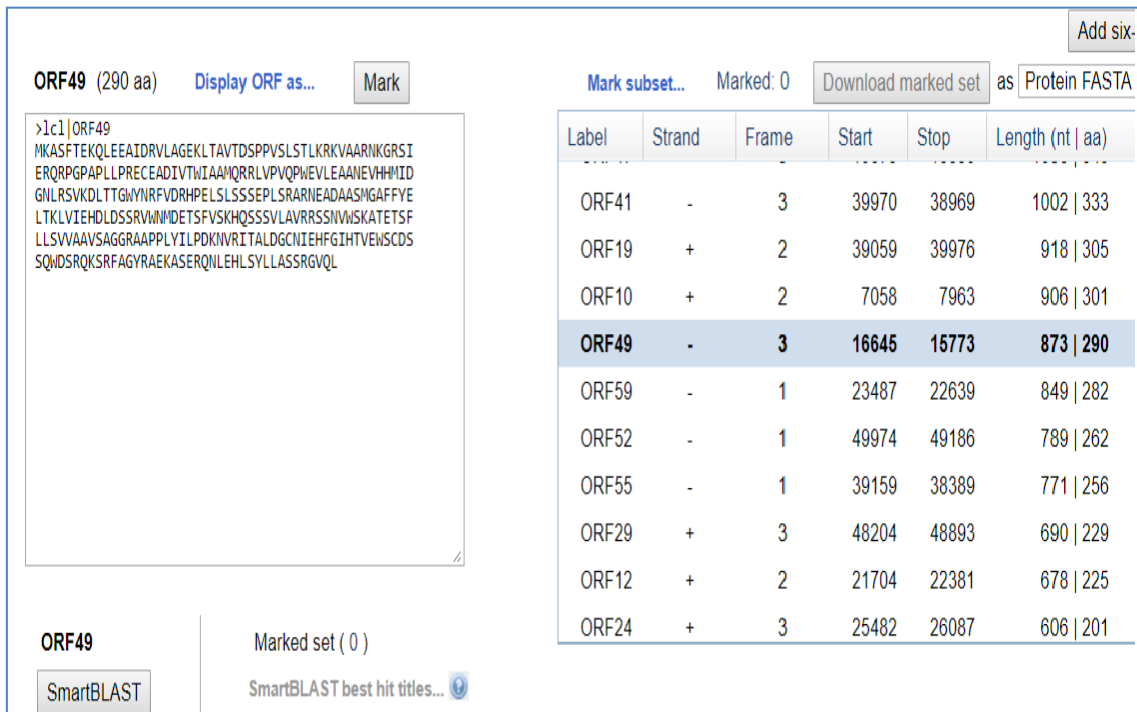


**Figura 4.** Fases de leitura aberta deduzidas a partir da sequência LGSK01000001.1 de *P. cinnamomi* depositada na database NCBI. O sentido das setas indica a sentido de leitura das fases de leitura aberta com tamanho significativo na sequência.

Utilizando os programas de homologia, especialmente, o SmartBLAST, fizemos uma comparação das proteínas deduzidas das fases de leitura aberta obtidas, a fim de encontrarmos proteínas homólogas caracterizadas noutros seres vivos e depositadas nas databases de proteínas UniprotKB e Swiss-Prot. Em ambas as sequências a maior parte das fases de leitura aberta codificam proteínas homólogas a proteínas do metabolismo de diferentes espécies do género *Phytophthora*, como se esperava, especialmente *P. infestans*, *P. sojae*, *P. nicotiana* e *P. parasitica*. Existindo ainda um grande número de fases de leitura que codificam para proteínas hipotéticas e/ou sem função conhecida.

#### 4.3.1. Caracterização do fator Avr3a, associado à patogenicidade de *P. cinnamomi*

Das fases de leitura aberta deduzidas no programa ORF Finder da NCBI a partir da sequência LGSK01000001.1, a fase de leitura número 49 (Figura 5) localizada na fita reversa complementar desta sequência na "Frame" 3, com tamanho de 873 nt (posição 16645-15773 da sequência), codifica para uma proteína putativa com 290 aminoácidos e com significativa homologia com as proteínas Avr3a de espécies do género *Phytophthora* nomeadamente *Phytophthora megakarya* (66%), *Phytophthora sojae* (88, 84 e 82%) e *Phytophthora infestans* (67%) de acordo com os programas smartBlast e Clustal Omega.



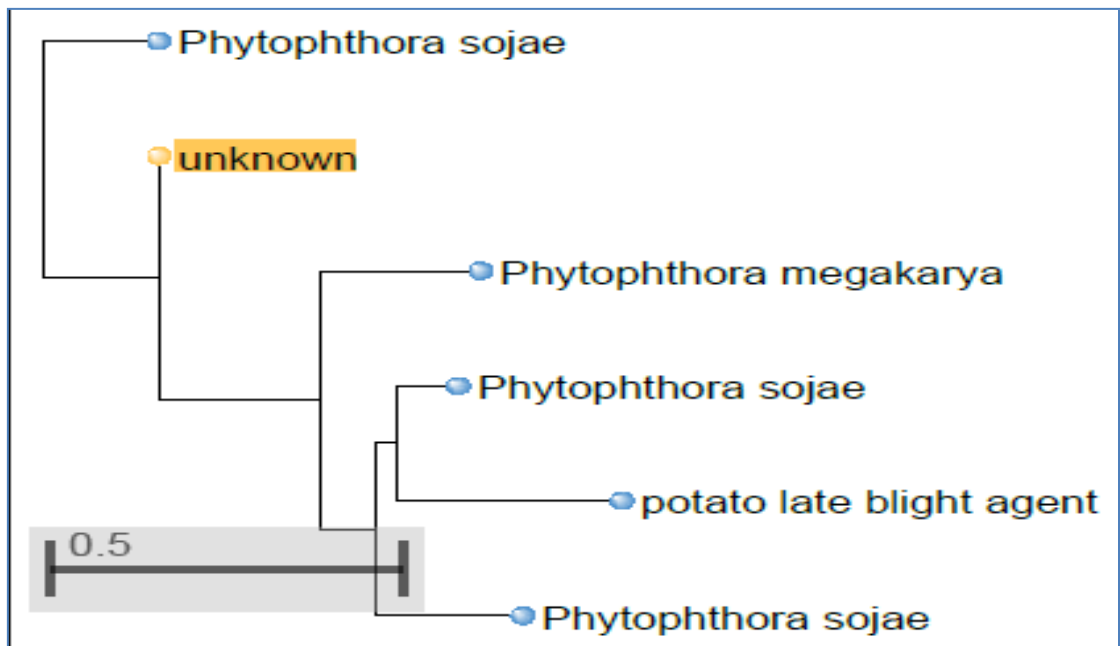
**Figura 5.** ORF49 que codifica a proteína Avr3a com 290 aminoácidos, cuja sequência está representada na parte esquerda da figura segundo ORF Finder – NCBI.

Armstrong *et al.* (2005), usaram genética de associação para identificar Avr3a em *P. infestans* e mostraram que codifica uma proteína que é reconhecida no citoplasma do hospedeiro (*Solanum demissum*), onde desencadeia morte celular.

Bos, *et al.* (2010) silenciaram o gene Avr3a em *P. infestans*, por ARN de interferência e posteriormente infetaram *Nicotiana benthamiana* com as estirpes obtidas do silenciamento e com *P. infestans* selvagem tendo com esses ensaios concluído que

Avr3a é um fator essencial na virulência de *P. infestans*, capaz de manipular a imunidade das plantas infetadas.

O estudo da função desta fase de leitura (ORF49) por silenciamento com ARN de interferência e posterior infecção de *C. sativa* com *P. cinnamomi* selvagem e com as estirpes silenciadas será muito importante por se tratar de um possível fator de virulência de *P. cinnamomi*, dada a significativa semelhança com as proteínas Avr3a, descritas, como se pode ver na árvore filogenética da Figura 6.



**Figura 6.** Árvore filogenética de proteínas Avr3a de *Phytophthora cinnamomi* (unknown na figura) com diferentes espécies do género *Phytophthora*.

#### 4.3.1.1. Localização subcelular do fator Avr3a de *P. cinnamomi*

Determinar a localização de proteínas envolvidas nos processos de infecção dos fungos permite saber como o parasita invade a planta sendo importante para compreender as funções das proteínas e consequentemente pode facilitar o tratamento das doenças.

Vários softwares descritos em 3.5. estão disponíveis publicamente e foram utilizados para a predição da localização das proteínas que caracterizamos.

Para a predição da proteína AVR3a, foram utilizados muitos softwares com diferentes métodos de predição (Composição de Aminoácidos, Composição N-

peptídica, Composição físico-química, entre outros), indicando a maioria deles o destino nuclear para esta proteína.

De acordo com o programa SignalP 3.0, esta proteína não apresenta o peptídeo sinal. O peptídeo sinal é uma pequena sequência de aminoácidos presentes no extremo N-terminal de proteínas que asseguram o seu transporte para o ER (retículo endoplasmático) para o transporte subsequente através da via de secreção: Retículo endoplasmático - complexo de Golgi - vesículas de secreção e exterior da célula (Rapoport, 1992). Contudo, este destino não é consistente com a função desta proteína, porque, para ser reconhecida no citoplasma do hospedeiro onde desencadeia morte celular, ela deveria ser excretada.

A predição que realizamos para proteínas homólogas incluindo a de *P. infestans*, diz-nos que a localização destas proteínas é diversificada desde mitocondrial, extracelular e citoplasmática. Possivelmente estas proteínas são secretadas, mas não através da via clássica de ER-Golgi (via peptídeo sinal), mas através de processos não convencionais de secreção de proteínas. Por isso, seria importante o estudo experimental da via de secreção desta proteína através da sua fusão com a proteína verde fluorescente (GFP) e posterior expressão homóloga e/ou heteróloga com observações em microscopia de fluorescência de células dos transformantes ao longo do crescimento.

#### **4.3.1.2. Desenho de uma construção genética para silenciamento, por ARN de interferência, do gene Avr3a de *P. cinnamomi***

Para sintetizar uma cassete de silenciamento convencional eficiente que visa o mRNA correspondente do gene Avr3a, devem ser levadas em consideração as seguintes medidas:

- A sequência de construção potencial não deve ter uma combinação perfeita de mais de 16 nucleótidos com outros genes de *P. cinnamomi* (verificado pela pesquisa BLAST em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>);
- A construção não deve ter uma repetição interna ou palíndromas e deve incluir conteúdo de G/C baixo a médio (Cheng e Chang, 2007);
- Recomenda-se usar um fragmento da cassete de silenciamento entre 300 e 1000 pb de comprimento como um tamanho adequado para maximizar a eficiência de silenciamento obtido (Wesley *et al.*, 2004).

As sequências de sense e antisense podem ser produzidas realizando duas reações de PCR separadas, em seguida, os produtos de PCR ligados pela ligase de ADN T4 (Figura 7).

Neste momento ainda não existem programas fiáveis para desenho de cassetes para o silenciamento de genes por ARNi, por isso, optamos por construir as cassetes para o silenciamento dos genes caracterizados por nós de forma manual.

Para o gene Avr3a, como se representa na Figura 7, colocamos 180 pb da "ORF" no sentido sense e antisense (a vermelho) entre um intrão (a verde) que servirá de "loop" para a formação de ARN de dupla fita após a transcrição. Nos extremos desta sequência colocamos a sequência de reconhecimento da endonuclease de restrição *ApaI* (a negro na figura) a fim de se poder ligar a um plasmídeo de *P. cinnamomi*, no sítio de corte desta enzima.

```
gatagggcccATGAAGGCATCCTTCACGGAGAAGCAGCTAGAGGAAGC
TATCGATCGCGTCCTCGCAGGAGAGAAGCTCACAGCTGTGACCGAC
TCGCCGCCGTGTCATTGTCAACACTGAAGCGCAAAGTCGCCGCGC
GCAATAAGGGCCGCTCCATTGAGCGCCAACGACCCGGAGGCCTGCC
CCTCTAGAGAAGGGTAAGCCAAGACATTTGACTTCCACAAAAGTAAG
AGTACTCACGCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTA
ATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGG
TGGCAACGCCAATCAGTAGAGGGGCGAGGCCTCCGGGTCGTTGGCGCT
CAATGGAGCGGCCCTTATTGCGCGCGGCGACTTTGCGCTTCAGTGTTG
ACAATGACACGGGCGGCGAGTCGGTCACAGCTGTGAGCTTCTCTCCTG
CGAGGACGCGATCGATAGCTTCTCTAGCTGCTTCTCCGTGAAGGATGC
CTTCATgggccctatc.
```

**Figura 7.** Cassete para silenciamento do gene Avr3a, de *Phytophthora cinnamomi*, por ARN de interferência. Sense e antisense (a vermelho) entre um intrão que servirá de loop (a verde).

#### 4.3.2. Lipases em *Phytophthora cinnamomi*

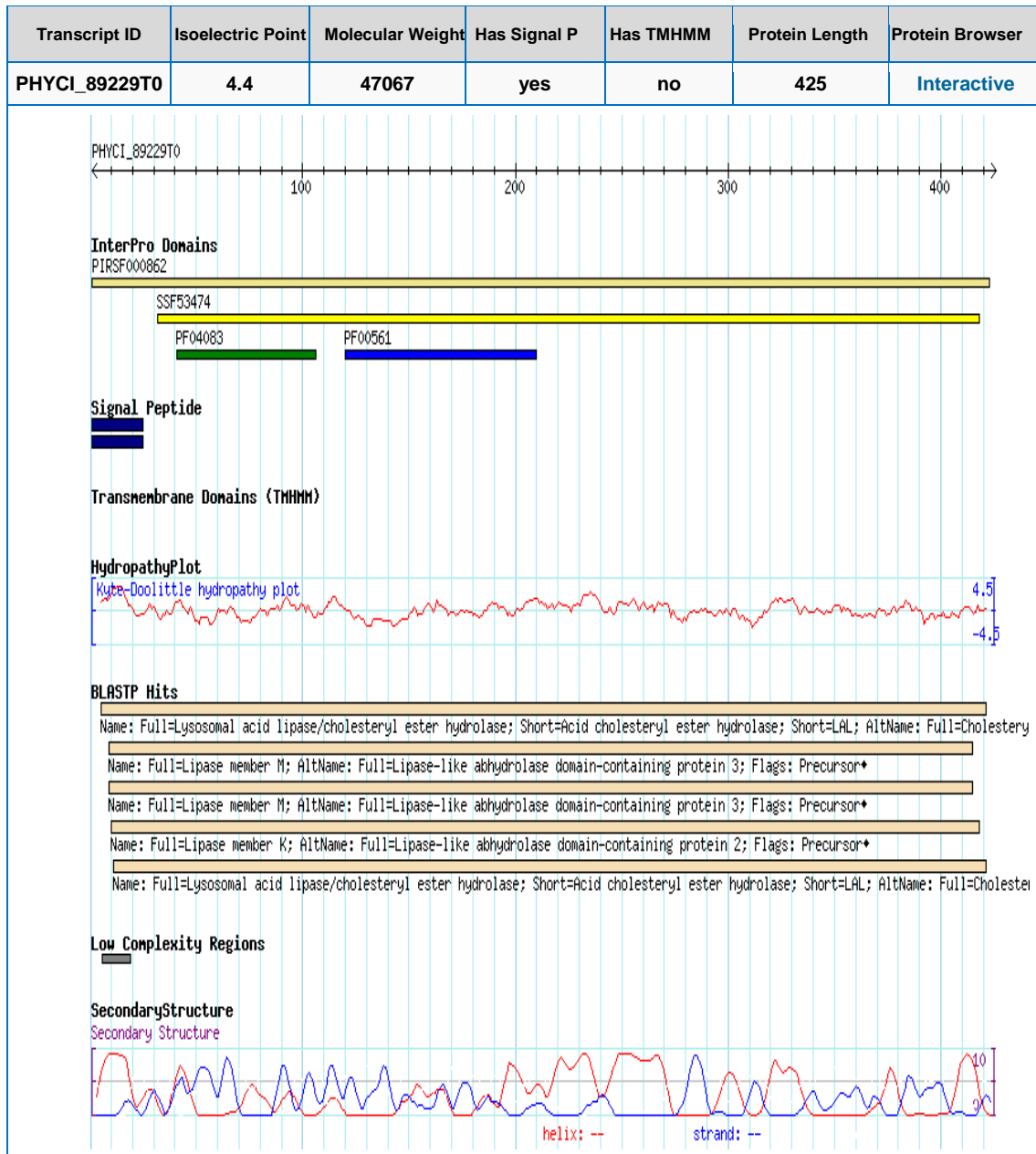
A análise bioinformática das sequências de *P. cinnamomi* em Databases, permitiu encontrar várias fases de leitura aberta que codificam proteínas com papel relevante na virulência de *P. cinnamomi*, com o programa "Open Reading Frame Finder - ORFfinder - NCBI" encontramos fases de leitura aberta que codificam proteínas com domínios de esterases/lipases e com grande homologia com lipases já descritas no capítulo anterior em diferentes espécies do género *Phytophthora* envolvidas em mecanismos de patogenicidade.

Essas sequências estão na database "FungiDB", com as referências PHYCI\_76143T0 e PHYCI\_89229T0 e codificam proteínas com 309 e 425 aminoácidos, respetivamente.

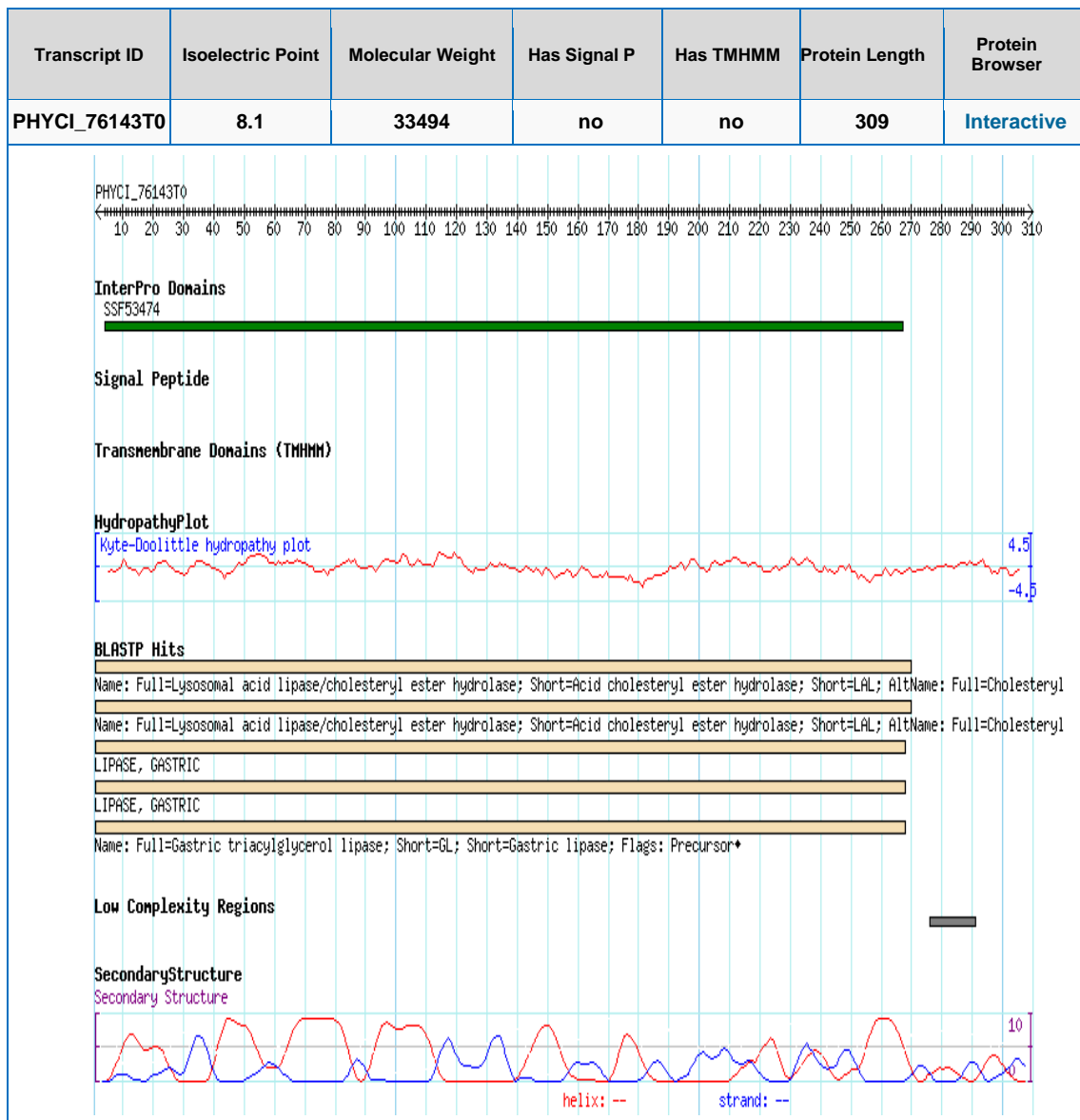
As principais características destas lipases assim como os domínios que as constituem encontram-se representadas de forma esquemática nas Figuras 8 e 9.

Para além da diferença de tamanhos e consequentemente de pontos isoelétricos e massa molecular, observamos que a proteína com a referência PHYCI\_89229T0 possui 4 domínios (com a barra de cor castanha representa-se o domínio da família das lipases na posição 1-422 aa e o domínio da superfamília das alfa/beta-hidrolases na posição 32-417 aa - barra amarela no esquema superior da Figura 8), relacionados com lipases e uma clara sequência de peptídeo sinal que abordaremos com mais detalhe na secção seguinte deste capítulo. A lipase com a referência PHYCI\_76143T0 possui o domínio, da superfamília alfa/beta-hidrolases, que engloba entre outras a família das carboxilesterases e lipases situado entre os aa 4 e 26 e representada pela barra verde no esquema da Figura 9.

Caracterização de fatores moleculares implicados na patogenicidade de *Phytophthora cinnamomi*



**Figura 8.** Representação esquemática (FungiDB) das características das lipases de *Phytophthora cinnamomi* (PHYCI\_89229T0).



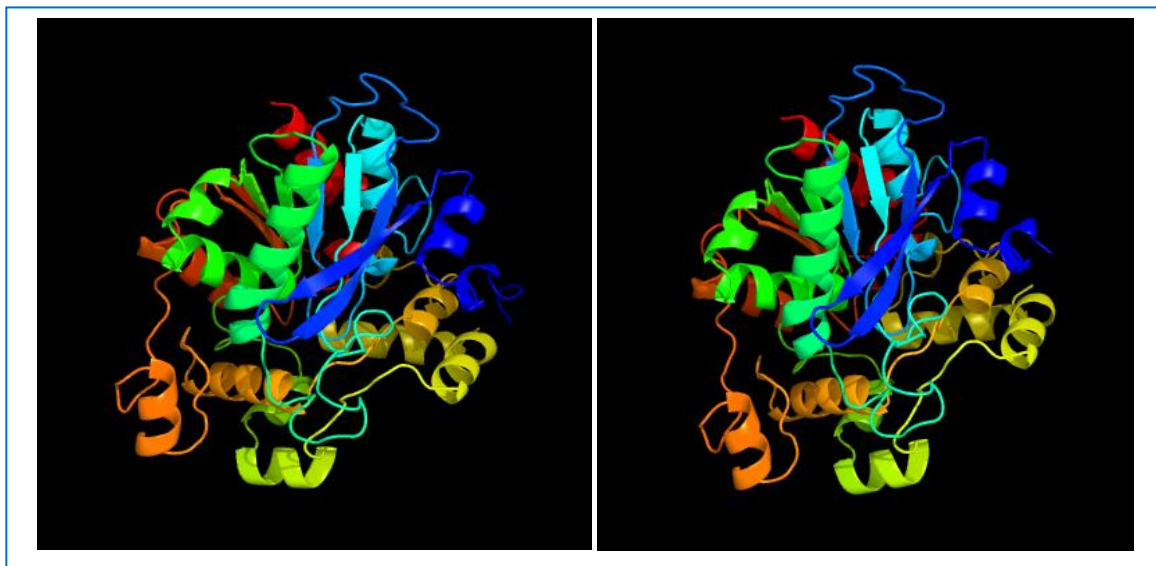
**Figura 9.** Representação esquemática (FungiDB) das características das lipases de *Phytophthora cinnamomi* (PHYCI\_76143T0).



tríade catalítica consistindo em Ser-His-Asp/Glu, mas ao contrário da maioria das serinas proteases, o centro ativo está protegido dentro da estrutura. Uma "tampa" ou "lid" protege o centro ativo, tornando-o inacessível ao solvente e aos substratos. A tampa abre-se durante o processo de ativação interfacial, permitindo o acesso do substrato lipídico ao centro ativo.

#### 4.3.2.1. Estrutura 3-D das lipases de *P. cinnamomi*

A predição estrutural das lipases de *P. cinnamomi* foi realizada no servidor Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015), com base na homologia dessas lipases com a lipase gástrica do Cão (*Canis lupus familiaris*), com o código de acesso d1k8qa em Protein Data Bank (Roussel *et al.*, 2002) (Figura 11).



**Figura 11.** Estrutura 3-D das lipases de *P. cinnamomi*, com base no modelo da lipase gástrica do cão (*Canis lupus familiaris*) (d1k8qa no PDB-Protein Data Bank), com 371 resíduos para PHYCI\_76143 (figura esquerda) e 367 resíduos para PHYCI\_89229T0 (figura direita) e 86% de semelhança.

As fitas onduladas com ponta de flecha representam regiões com conformação de folha beta e as em espiral representam as conformações alfa-helicoidais. Essa conformação é típica da superfamília das alfa/beta-hidrolases já descritas (Figura 11). A superfamília hidrolase alfa/beta pertence às enzimas hidrolíticas que diferem

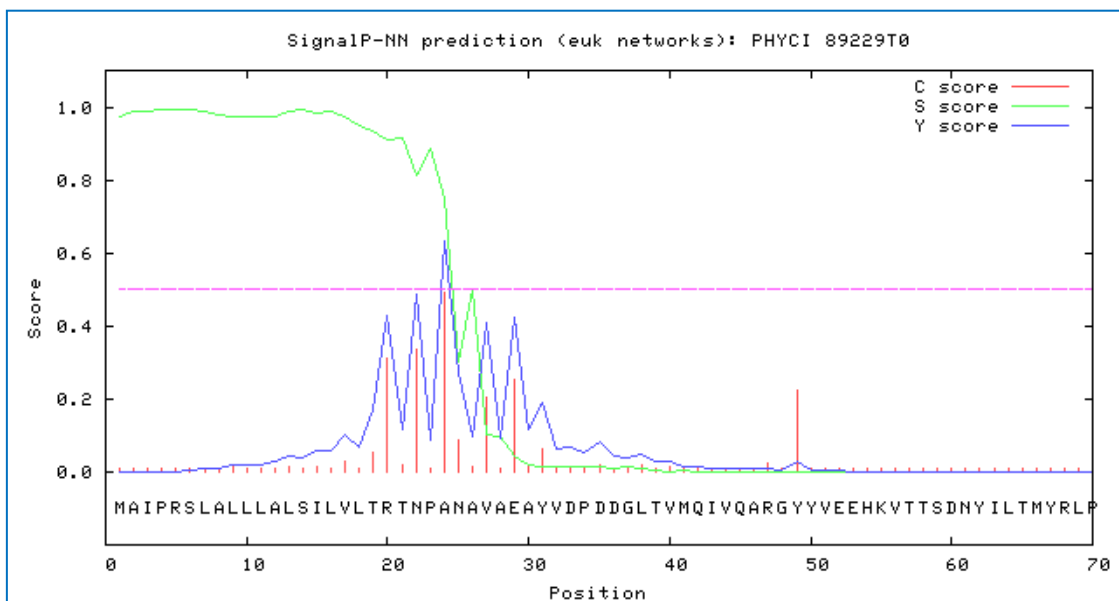
amplamente da sua origem filogenética e função catalítica que compartilham uma dobra comum (Ollis *et al.*, 1992).

De acordo com Carr e Ollis (2009), o núcleo de cada enzima é uma folha alfa/beta, contendo 8 folhas beta conectados por 6 hélices alfa. Acredita-se que essas enzimas tenham sido divergentes de um antepassado comum, conservando pouca similaridade de sequência e sendo que a disposição dos resíduos catalíticos tenha sido preservada. Todos eles têm uma tríade catalítica, cujos elementos são suportados em laços e sendo as características estruturais mais conservadas da dobra. A dobra de alfa/beta hidrolase inclui proteases, lipases, peroxidases, esterases, epóxido hidrolases e desoxalogenases.

#### 4.3.2.2. Localização subcelular das lipases de *P. cinnamomi*

##### - Sequência PHYCI\_89229T0 de 425 aa

Segundo o programa SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>) a proteína com a referência na Data Base FungiDB PHYCI\_89229T0 de 425 aa apresenta um peptídeo sinal para a secreção desta proteína, cujo local de clivagem mais provável se situa entre a posição 23 e 24 - entre os aminoácidos (TNP-AN) como se pode observar na figura seguinte.



**Figura 12.** Localização do peptídeo sinal na sequência PHYCI\_89229T0 de *P. cinnamomi*, de 425 aa, depositada na FungiDB, utilizando o programa SignalP 3.0.

No programa Cello em <http://cello.life.nctu.edu.tw/>, prediz-se a localização da proteína na membrana externa. Os restantes programas sugerem uma localização extracelular para esta proteína com probabilidades de 84% no programa LOctree em <https://roslab.org/services/loctree2/> e 94% no programa Esl pred em <http://www.imtech.res.in/raghava/eslpred/index.html>.

O espaço externo é a estrutura mais externa de uma célula. Para células sem estruturas de encapsulamento externo, isto refere-se ao espaço externo da membrana plasmática. Este termo abrange o ambiente da célula hospedeira ao espaço externo da parede celular (Goldberg *et al.*, 2012 e 2014).

#### - Sequência PHYCI\_76143T0 de 309 aa

O programa SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>) não apresenta um peptídeo sinal para a secreção da proteína com referência PHYCI\_76143T0 na FungiDB. A predição do programa Cello em <http://cello.life.nctu.edu.tw/>, que se apresenta na tabela seguinte, aponta para uma localização extracelular desta proteína.

**Tabela 2.** Localização segundo o programa Cello da proteína com a referência PHYCI\_76143T0 de 309 aa em FungiDB.

CELLO Prediction:	
Extracellular	1.611 *
OuterMembrane	1.115
Cytoplasmic	0.097
InnerMembrane	0.044

Os restantes programas que utilizamos para a localização desta proteína apontam para a sua localização extracelular com probabilidades que vão desde 53% no programa Esl pred (<http://www.imtech.res.in/raghava/eslpred/index.html>) até 83% no programa LOctree (<https://roslab.org/services/loctree2/>).

A localização extracelular destas lipases é consistente com o papel que elas podem desempenhar no processo de patogenicidade, pois, para participarem na degradação de esteróis, lípidos e fosfolípidos das células hospedeiras, terão que ser libertadas para o exterior.

#### 4.3.2.3. Desenho de construções genéticas para silenciamento, por ARN de interferência, das lipases de *P. cinnamomi*

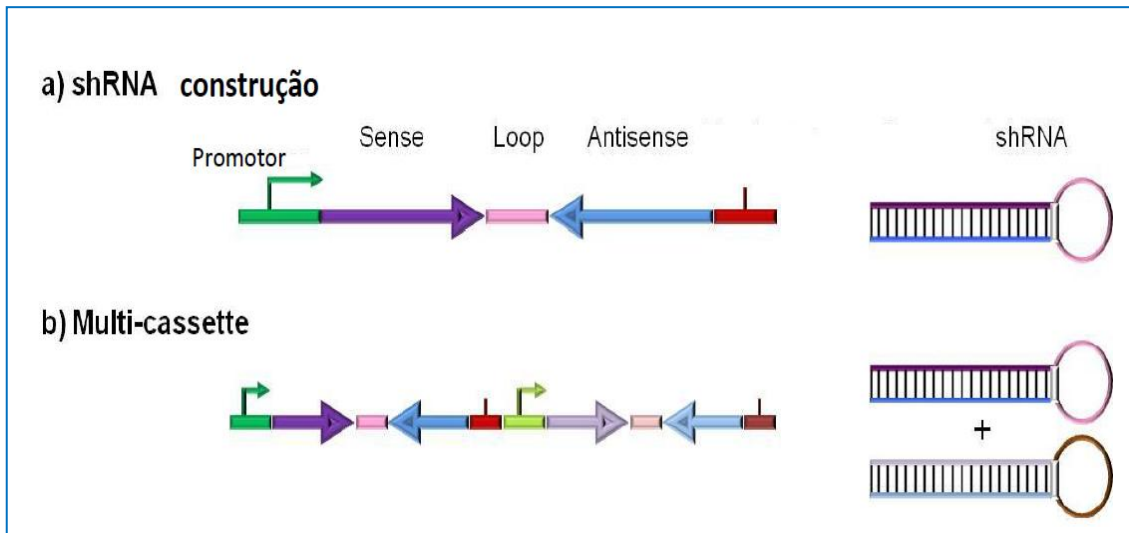
As recentes técnicas de sequenciação de ADN com plataformas que permitem a sequenciação maciça combinada com capacidades avançadas de bioinformática, permitem-nos deduzir o papel de muitos fatores moleculares nas vias metabólicas.

É possível que muitas moléculas tenham papéis em vias metabólicas desconhecidos até ao presente.

As recentes associações de lipases aos mecanismos de patogenicidade confirmam a elevada versatilidade dessas enzimas. No entanto, ainda se desconhece muito sobre a ação concreta dessas enzimas nas vias metabólicas envolvidas em mecanismos de patogenicidade. Por isso, é muito importante silenciar por ARNi, as duas lipases de *P. cinnamomi* descritas nesta revisão e, em seguida, infetando linhas celulares de *Castanea sativa* com estirpes selvagens e transformadas de *P. cinnamomi* e depois de uma avaliação fenotípica, com recurso à análise de expressão desses genes com ARN-seq poderemos perceber o papel dessas enzimas no processo infeccioso de *P. cinnamomi*.

Com o objetivo de silenciarmos os genes que expressam as lipases de *P. cinnamomi* desenhamos cassetes de silenciamento seguindo o mesmo procedimento que utilizamos para o desenho da cassette de silenciamento do gene Avr3a. Colocamos 180 pb do início da "ORF" do gene a silenciar no sentido sense e antisense intervalados por uma sequência de um intrão de *P. infestans* que levará à formação de um loop no respetivo transcrito para que este fique com dupla fita para impedir a tradução do ARN mensageiro da respetiva lipase e assim bloquear a formação desta proteína.

Desenhamos uma cassette individual para cada gene (parte a) da figura 13 e fundimos as cassetes das duas lipases, intervaladas por um terminador e por um promotor transcricional, a fim de criarmos uma multi-cassete que servirá para o silenciamento simultâneo dos dois genes mencionados (parte b) da figura 13.



**Figura 13.** Representação esquemática de cassetes para silenciamento por ARN de interferência das lipases individuais de *P. cinnamomi* (a) e representação de uma multi-cassete para silenciamento simultâneo dos dois genes (b).

## 5. Considerações finais

Como já mencionado ao longo deste trabalho a descoberta de fatores moleculares e suas interações nas vias metabólicas da infecção é um passo importante no desenvolvimento de estratégias de prevenção, processos de cura e controlo de infeções fúngicas nas plantas. Por isso, utilizando a informação deste trabalho especialmente as cassetes desenhadas, podemos silenciar os genes estudados e quantificar os transcritos em situações de infecção do hospedeiro, de acordo com o descrito nas secções que se seguem:

### 5.1. Transformação e silenciamento de genes de *P. cinnamomi*

No seguimento deste trabalho podemos transformar *P. cinnamomi* de forma a silenciar os genes em estudo utilizando ARN de interferência. Para isso as cassetes desenhadas deverão ser ligadas aos vetores pHAMT35H e pTH210. Estes vetores possuem sequências promotoras e terminadoras do gene *ham34* (*Bremia lactucae*) e o gene resistente à higromicina que servirá de marcador de seleção para identificar os transformantes positivos de *P. cinnamomi* (Horta *et al.*, 2008).

Para proceder à transformação estável de *P. cinnamomi* com ARN de interferência, será usado o método de protoplastos com recurso a meios químicos, mediada por lipossomas e/ou tratamento com CaCl<sub>2</sub>/polietilenoglicol (PEG), seguida pela germinação destes em presença do antibiótico de seleção (Higromicina) (Horta *et al.*, 2008).

Para comprovar o silenciamento dos genes, os clones obtidos serão analisados por meio de sequenciação de ADN e/ou ARN dos transformantes, e por Western, Southern e Northern blotting.

### 5.2. Quantificação de transcritos de *P. cinnamomi* durante a infecção mediante PCR em tempo real

RT-PCR é um procedimento extremamente sensível, que permite a determinação da expressão de genes responsáveis pela patogenicidade durante as primeiras fases de infecção, quando a biomassa do patógeno no hospedeiro é muito baixa e difícil de detetar por métodos tradicionais. Esta técnica será ainda aplicada na investigação da

expressão de genes durante a interação planta patógeno no processo de infecção (Tomlinson *et al.*, 2010).

Genes candidatos para RT-PCR serão selecionados com base numa similaridade significativa de sequências, identificadas em pesquisas BLAST. Pares de *primers* e sondas de *Taqman* serão definidas para cada sequência de ADN complementar. A eficiência de amplificação será otimizada com ADN genómico de *P. cinnamomi* utilizado como molde. Os *primers* serão igualmente definidos e otimizados para os genes *actin A* (*actA*) e *actin B* (*actB*), enquanto controlos endógenos constitutivamente expressos para o gene calmodulina (*calA*), conhecido por ser "up-regulator" durante a infecção da planta.

Todos os ensaios serão realizados em triplicado com controlos apropriados. Os ensaios serão repetidos em ocasiões independentes e com ARN isolado independentemente e subsequentemente sintetizadas amostras de ADN complementar.

Todos os cálculos e análises estatísticas devem ser efetuados como descrito no software de iCycler iQ Detection System (BIORAD) com base nas quantificações de amostras de concentrações conhecidas.

## 6. Conclusões

A palavra *Phytophthora* deriva do grego e significa destruidor de plantas. É urgente, senão eliminar, pelo menos travar a ação nefasta destes microrganismos, cuja ação já se faz sentir a nível mundial pela disseminação rápida destes patógenos potenciada pelas alterações climáticas. Se não o fizermos, arriscamo-nos a consequências terríveis, não só para o meio ambiente, pela destruição da flora natural, mas também a nível do modo de vida humano, tal como aconteceu no século XIX, no triste episódio da Grande Fome verificada na Irlanda, provocada pela destruição da cultura de batata por *P. infestans* (Fry e Goodwin, 1997).

A identificação dos fatores moleculares associados ao mecanismo de infeção de *Castanea sativa* por *Phytophthora cinnamomi* e a natureza da interação patógeno-hospedeiro mediado por ARN de interferência é muito importante pois cria um ponto de partida para o desenvolvimento de estratégias de controlo de doenças causadas por espécies de *Phytophthora* spp. a importantes culturas.

Com a identificação dos mecanismos moleculares de infeção de *Phytophthora*-hospedeiro, poderemos por exemplo, efetuar o silenciamento de genes de *Phytophthora* envolvidos na infeção por geração de ARN de interferência no hospedeiro (Tinoco *et al.*, 2010). Isto constituiu do ponto de vista biotecnológico, uma nova ferramenta para estratégias de resistência de plantas hospedeiras de *Phytophthora* spp., como também a outros parasitas de plantas.

Neste contexto e a partir do nosso trabalho, podemos apresentar as seguintes conclusões:

**Primeira** - Apesar de nas Databases se encontrar duas sequências do genoma de *P. cinnamomi* e uma sequência do transcriptoma, elas estão pouco organizadas e possuem pouca informação deduzida.

**Segunda** - O número de fatores moleculares ligados à patogenicidade de *P. cinnamomi*, estudados até este momento, é muito reduzido, destacando-se as glucanases e as poligalacturonases como os fatores mais estudados.

**Terceira** - No genoma de *P. cinnamomi*, identificamos uma sequência com tamanho de 873 nt que codifica para uma proteína com 290 aminoácidos e com significativa

homologia com as proteínas Avr3a associadas à patogenicidade em diferentes espécies do género *Phytophthora*.

**Quarta** - As proteínas Avr3a apesar de serem identificadas no citoplasma das células hospedeiras onde desencadeiam morte celular, não possuem peptídeo sinal nem uma via clara de secreção.

**Quinta**- Neste trabalho, caracterizamos também duas proteínas de *P. cinnamomi*, com domínios de lipases de 309 e 425 aminoácidos e com grande probabilidade de serem excretadas para o exterior da célula.

**Sexta** - A elevada homologia destas lipases permitiu elucidar a sua estrutura 3D a partir da lipase gástrica do Cão (*Canis lupus familiaris*) como modelo.

**Sétima** - A grande semelhança das lipases de *P. cinnamomi* com lipases de outras espécies do género *Phytophthora*, associadas a mecanismos de patogenicidade, justifica um estudo mais aprofundado sobre a sua expressão e o seu papel.

**Oitava** - Para analisar a expressão dos genes estudados e deduzir com mais rigor o seu papel no mecanismo de patogenicidade, foram desenhadas cassetes de silenciamento por ARN de interferência que podem ser utilizadas para transformar *P. cinnamomi*.

## 7. Referências Bibliográficas

- Abreu, C.; Carvalho, L.; Gaspar, M.; Gomes, A.; Colaço, J.; Cardoso, A. (1999). Assessment of resistance to chestnut ink disease. *Acta Horticulturae*, 494: 363-367.
- Ah-Fong, A.; Bormann-Chung, C.; Judelson H. (2008). Optimization of transgenemediated silencing in *Phytophthora infestans* and its association with small interfering RNAs. *Fungal Genet Biol*; 45: 1197-1205.
- Armstrong, M.; Whisson, S.; Pritchard, L.; Bos, J.; Venter, E.; Avrova, A.; Rehmany, A.; Bohme, U.; Brooks, K.; Cherevach, I.; Hamlin, N.; White, B.; Fraser, A.; Lord, A.; Quail, M.; Churcher, C.; Hall, N.; Berriman, M.; Huang, S.; Kamoun, S.; Beynon, J.; Birch, P. (2005). An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognised in the host cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 102, 7766-7771.
- Beales, P.; Schlenzig, A.; Inman, A. (2004). First report of ramorum but and leaf blight (*Phytophthora ramorum*) on *Syringa vulgaris* in the UK. *Plant Pathology*; v. 53, n.4, p.525. Cit. por Costa, R. (2011). Clonagem e análise da expressão heteróloga da endo-1, 3-beta-D-glucanasa de *Phytophthora cinnamomi*. Instituto Politécnico de Bragança – Escola Superior Agrária. Tese de Mestrado.
- Borges, O.; Gonc, B.; Correia, P., & Paula, A. (2008). Food Chemistry Nutritional quality of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars from Portugal. *Pharmacia*, 106, 976-984.
- Bos, J.; Armstrong, M.; Gilroy, E.; *et al.* (2010) *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.0914408107/-/DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.0914408107/-/DCSupplemental). [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0914408107](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0914408107); PNAS, vol. 107, n.º 21, 9909 – 9914.

- Caetano, P. (2007). Envolvimento de *Phytophthora cinnamomi* no declínio de *Quercus suber* e *Q. Rotundifolia*: Estudo da influência de factores bióticos e abióticos na progressão da doença. Possibilidades de controlo químico do declínio. Universidade do Algarve – Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais. Tese de Doutoramento.
- Cahill, D.; Bennett, I.; McComb, J. (1993). Mechanisms of resistance to *Phytophthora cinnamomi* in clonal, micropropagated *Eucalyptus marginata*. *Plant Pathol.*, 42 (6): 865– 872.
- Carr, P. & Ollis, D. (2009). Alpha/beta hydrolase fold: an update. *Protein and Peptide Letters*, 16, 1137-1148.
- Carvalho, C.; Meirinho, S. and Choupina, A. (2006). Characterization of Glucanase Inhibitor Protein (GIP) from *Phytophthora cinnamomi*. Journal Submitted Microbiologia e Biologia, Instituto Politécnico de Braganca, Braganca, Portugal. NCBI, Accession: AM259384.
- Carvalho, C.; Meirinho, S. and Choupina, A. (2006). Characterization of necrosis inducing protein (NPP1) gene from *Phytophthora cinnamomi*. Journal Submitted Microbiologia e Biologia, Instituto Politécnico de Braganca, Braganca, Portugal. NCBI, Accession: AM403130.
- Carvalho, J. (2014). Métodos de luta alternativos contra a doença da tinta do castanheiro. Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa. Tese de Mestrado.
- Cavalier-Smith, T. (1986). The Kingdom Chromista: origin and systematics. *Prog. Phycol. Res.*, 4 (1986), pp. 309-347.
- Cheng, T. and Chang, W. (2007). Construction of simple and efficient DNA vector-based short hairpin RNA expression systems for specific gene silencing in mammalian cells. *Methods In Molecular Biology* 408: 223-241.
- Choupina, A., Dominguez, A., López, M., Martins, I. (2013). Isolation and Sequencing of Actin1, Actin2 and Tubulin1 Genes Involved in Cytoskeleton Formation in *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology & Microbiology*.

- Choupina, A.; Cravador, A.; Carvalho, M.; Vaz, M.; Belo, H.; Martins, F.; Martins, I. (2014<sup>a</sup>). Cloning, characterization and in vitro and *in planta* expression of a glucanase inhibitor protein (GIP) of *Phytophthora cinnamomi*. *Mol Biol Rep* 41: 2453-2462.
- Choupina, A.; Estevinho, L. & Martins, I. (2014<sup>b</sup>). Scientifically advanced solutions for chestnut ink disease. *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 98, Issue 9, pp 3905-3909. Springer.
- Corredoira, E.; Montenegro, D.; San-José, M.; Vieitez, A.; Ballester, A. (2004) *Agrobacterium*-mediated transformation of European chestnut embryogenic cultures. *Plant Cell Reports*, 23, 311–318.
- Costa, R.; Bragança, H. & Machado, H. (2011). Os últimos 75 anos de investigação para o melhoramento do castanheiro em Portugal. *Agrorrural - Contributos Científicos*, 915-926.
- Crandall, S. (1950). The distribution and significance of the chestnut root rot *Phytophthoras*, *P. cinnamomi* and *P. cambivora*. *Plant Dis. Rep.*, 34 (6): 194-196.
- Devescovi, G.; Bigirimana, J.; Degrassi, G.; Cabrio, L.; LiPuma, J.; Kim, J.; Hwang, I. & Venturi, V. (2007). Involvement of a quorum-sensing-regulated lipase secreted by a clinical isolate of *Burkholderia glumae* in severe disease symptoms in rice. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4950-4958.
- Dick, M. (1995). The Straminipilous Fungi. A New Classification for the Biflagellate Fungi and Their Uniflagellate Relatives with Particular Reference to Lagenidiaceous Fungi. *C. A. B. Internat. Mycol. Pap.*, N° 168.
- Dixon, R.; Harrison, M. & Lamb, C. (1994). Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology*, 32: 479-501.
- Duclos, J.; Fauconnier, A.; Coelho, A.; Bollen, A.; Cravator, A. & Godfroid, E. (1998). Identification of an Elicitin Gene Cluster in *Phytophthora cinnamomi*. *Dna Sequence: The journal of DNA sequencing and mapping*; Vol. 9, Iss. 4: 231-237.

- Elorrieta, J. (1949). El castaño en España. IFIE. Madrid, p333. Cit. por Gomes-Laranjo, J.; Peixoto, F.; Ferreira-Cardoso, J. (2009). Castanheiros, Técnicas e Práticas. 1ª ed. Pulido Consulting – Industria Criativa & Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Erwin, D. e Ribeiro, O. (1996) *Phytophthora* diseases worldwide. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press.
- Feng, J.; Wang, F.; Liu, G.; Greenshields, D.; Shen, W.; Kaminskyj, S.; Kaminskyj, S.; Hughes, G.; Peng, Y.; Selvaraj, G.; Zou, J. & Wei, Y. (2009). Analysis of a *Blumeria graminis*-secreted lipase reveals the importance of host epicuticular wax components for fungal adhesion and development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*: 22, 1601-1610.
- Fernandes, C. (1953). A luta contra a “doença da tinta” dos castanheiros no Norte de Portugal. Separata das publicações da Direção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Vol. XX, Tomo: 153-158. Cit. por Martins, M. (2010). Caracterização do gene *gip* de *Phytophthora cinnamomi* Rands associado à doença da Tinta do castanheiro e pesquisa de novos fitofármacos no controlo da doença. Instituto Politécnico de Bragança – Escola Superior Agrária. Tese de Mestrado.
- Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.; Steven A.; Kostas, S.; Driver, S.; Mello, C. (1998), Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhanditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Fórum Florestal (2010). Estrutura Federativa da Floresta Portuguesa. Estudo Económico de Desenvolvimento da Fileira da Castanha.
- França, N.; Júnior, D.; Lima, A.; Pucci, F.; *et al.* (2010). Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. *Revista Brasileira de Reumatologia*. São Paulo. V. 50, n. 10, p. 695-709.
- Fry, W. and Goodwin, S. (1997). Resurgence of the Irish potato famine fungus. *Bioscience*. 47: 363-371.

- Goldberg, T.; Hamp, T. and Rost, B. (2012). LocTree2 predicts localization for all domains of life. *Bioinformatics*. 28: i458-i465. PMID: 22962467.
- Goldberg, T.; Hecht, M.; Hamp, T., Karl, T.; Yachdav, G.; Nielsen, H.; Rost, B.; *et al.* (2014). LocTree3 prediction of localization. *Nucleic Acids Research* 2014. PMID: 24848019.
- Goldoni, M.; Azzlin, G.; Macino, G.; Cogoni, C. (2004). Efficient gene silencing by expression of double stranded RNA in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol.* 41:1016-1024.
- Gomes-Laranjo, J.; Peixoto, F.; Ferreira-Cardoso, J. (2009). *Castanheiros, Técnicas e Práticas*. 1ª ed. Pulido Consulting – Industria Criativa & Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Götesson, A.; Marshall, J.; Jones, D. and Hardham, A. (2002). Characterization and evolutionary analysis of a large polygalacturonase gene family in the Oomycete plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Sep; 15(9): 907-21.
- Gouveia, M. (1993). *Doença da Tinta do Castanheiro. Avaliação da resistência à Phytophthora cinnamomi* Rands. Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. Dissertação do Curso de Mestrado em Protecção Integrada.
- Gouveia, M. (2004). Métodos moleculares na identificação, caracterização e detecção de *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman e *Phytophthora cinnamomi* Rands associadas com a doença da tinta do castanheiro. UTAD. Vila Real. Doutoramento em Ciências Agronómicas/Protecção de Plantas.
- Gouveia, M. (2009). Um método eficiente para a detecção de *Phytophthora cinnamomi* associada com a Doença da Tinta do Castanheiro na rizosfera de Castanheiro (*Castanea sativa* Mill.). Instituto Politécnico de Bragança.
- Govers, F.; Gijzen, M. (2006). *Phytophthora* genomics: The plant destroyers` genome decoded. *Molecular plant-microbe interactions*; 19(12): 1295-1301.

- Hardham, A. (2005). Pathogen profile: *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology*; 6(6): 589-604.
- Hawksworth, D.; Kirk, P.; Sutton, B.; Pegler, D.; Ainsworth & Bisby's (1995) *Dictionary of the Fungi*. Wallingford: Oxon CAB International, 8th Ed., ISBN: 0 851 98 885 7. Cit. por Caetano, P. (2007). Envolvimento de *Phytophthora cinnamomi* no declínio de *Quercus suber* e *Q. Rotundifolia*: Estudo da influência de factores bióticos e abióticos na progressão da doença. Possibilidades de controlo químico do declínio. Universidade do Algarve – Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais. Tese de Doutoramento.
- Hogenhout, S.; Van der Hoorn, R.; Terauchi, R. and Kamoun, S. (2009). Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 115-122.
- Horta, M. (2006). Estudo do papel biológico das elicinas de *Phytophthora cinnamomi* e do seu envolvimento no processo infeccioso. Universidade do Algarve. Faro. Doutoramento no ramo de Biologia, especialidade de Biologia Molecular.
- Horta, M.; Sousa, N.; Coelho, A.; Neves, D.; Cravador, A. (2008): In vitro and in vivo quantification of elicitin expression in *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*; 73: 48-57.
- Hosseini, S., (2010). Expression patterns of pathogenicity genes during *Phytophthora pisi* infection of pea roots. Independent Project in biology-Master's thesis, 30 hp, EX0564.
- Hwang, S.; Ko, W. (1978). Biology of Chlamydospores, Sporangia, and Zoospores of *Phytophthora cinnamomi* in Soil. *Phytopathology* 68, 726-731.
- Judelson, H.; Blanco, F. (2005). The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology*, 3 (1): 47-58.
- Kadoni, N.; Nakayashiki, H.; Tosa, Y.; Mayama, S. (2003). RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact*; 16: 769-776.

- Kamoun, S. (2003). Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes. *Eukaryotic cell* 10: 2 (2): 191-199.
- Kamoun, S. (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology*; 44: 41-60.
- Kelley, L.; Mezulis, S.; Yates, C.; Wass, M. & Sternberg, M. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10, 845-858.
- Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamim Filho, A.; Camargo, L.; Rezende, J. (1997). *Manual de Fitopatologia, Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas*. Editora Agronômica Ceres Ltda, São Paulo.
- King, M.; Reeve, W.; Van der Hoek, M.; Williams, N.; McComb, J.; O'Brien, P.; Hardy, G. (2010). Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Genetics and Genomics*. Dec: 284 (6): 425-435.
- Langcake, P. (1975). Uptake of Sterols by *Phytophthora infestans*, Their Intracellular Distribution and Metabolism. *Transactions of the British Mycological Society*, 64, 55-65.
- Latijnhouwers, M.; Wit, P.; Govers, F. (2003). Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in microbiology*; 11 (10): 462-469.
- Liu, H.; Cottrell, T.; Pierini, L.; Goldman, W.; Doering, T. (2002). RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genetics*; 160: 463-470.
- Luz, E.; Santos, A.; Matsuoka, K.; Bezerra, J. (2001). *Doenças causadas por Phytophthora no Brasil*. Livraria Editora Rural Ltda, 1-22.
- Mancheno, J.; Pernas, M.; Martinez, M.; Ochoa, B.; Rua, M. & Hermoso, J. (2003). Structural insights into the lipase/esterase behavior in the *Candida rugosa* lipases family: Crystal structure of the lipase 2 isoenzyme at 1.97 angstrom resolution. *Journal of Molecular Biology*, 332, 1059-1069.

- Martins, M. (2010). Caracterização do gene gip de *Phytophthora cinnamomi* Rands associado à doença da Tinta do castanheiro e pesquisa de novos fitofármacos no controlo da doença. Instituto Politécnico de Bragança – Escola Superior Agrária. Tese de Mestrado.
- Meirinho, S.; Carvalho, C.; Jorge, L. and Choupina, A. (2006). Characterization of endo-1,3-beta-glucanase gene from *Phytophthora Cinnamomi*. Journal Submitted Microbiologia e Biologia, Instituto Politécnico de Braganca, Braganca, Portugal. NCBI, Accession: AM259651.
- Meirinho, S.; Carvalho, C.; Jorge, L. and Choupina, A. (2006). Characterization of transglutaminase elicitor precursor from *Phytophthora cinnamomi*. Journal Submitted Microbiologia e Biologia, Instituto Politécnico de Braganca, Braganca, Portugal. NCBI, Accession: AM403129.
- Montesano, M.; Brader, G. & Palva, T. (2003). Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology*; n. 4, v.1, p.73-79.
- Moris, B.; Gow, N. (1993). Mechanism of electrotaxis of zoospores of phytopathogenic fungi. *Phytopathology*, 83, 877-882.
- Namekawa, S.; Iwabata, K.; Sugawara, H.; Hamada, F.; Koshiyama, A.; Chiku, H.; Kamada, T.; Sakaguchi, K. (2005). Knockdown of LIM15/DMC1 in the mushroom *Coprinus cinereus* by doublestranded RNA-mediated gene silencing. *Microbiology*; 151: 3669-3678.
- Nes, W. & Stafford, A. (1983). Evidence for metabolic and functional discrimination of sterols by *Phytophthora cactorum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*; 80, 3227-3231.
- Ollis, D.; Cheah, E.; Cygler, M.; Dijkstra, B.; Frolow, F.; Franken, S.; Harel, M.; Remington, S.; Silman, I.; Schrag, J.; Sussman, J.; Verschueren, K. & Goldman, A. (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein engineering*, 5, 197-211.
- Pimentel, A. (1947). *Phytophthora cinnamomi* Rands, um outro agente extremamente virulento, da “Doença da Tinta” do Castanheiro. *Separata da Agronomia Lusitana*, Vol. IX Tomo III. 181-191.

- Rapoport, T. (1992). Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science*, 258: 931-936.
- Reitmann, A.; Berger, D. and van den Berg, N. (2017). Putative pathogenicity genes of *Phytophthora cinnamomi* identified via RNA-Seq analysis of pre-infection structures. *European Journal of Plant Pathology*, 147 (1), 211-228.
- Richards, T.; Soanes, D.; Jones, M.; Vasieva, O.; Leonard, G.; Paszkiewicz, K.; Foster, P.; Hall, N. & Talbot, N. (2011). Horizontal gene transfer facilitated the evolution of plant parasitic mechanisms in the oomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 108, 15258-15263.
- Roussel, A.; Miled, N.; Berti-Dupuis, L.; Riviere, M.; Spinelli, S.; Berna, P.; Gruber, V.; Verger, R. & Cambillau, C. (2002). Crystal structure of the open form of dog gastric lipase in complex with a phosphonate inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 2266-2274.
- Santos, A.; Luz, E. (2006). A gomose da acácia-negra no Brasil. *Summa Phytopathologica*, v. 33, n. 2, p. 113-118.
- Santos, L.; Martins, I.; Maia, V.; Domínguez, A.; Choupina, A. (2016). Genes found in partial sequencing of *Phytophthora cinnamomi* genome. *Revista de Ciências Agrárias*. 39 (3): 431-436.
- Serrazina, S. (2004). Isolamento e caracterização de genes de resistência à doença a tinta em *Castanea sativa* Mill. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências. Grau de Doutor em Biologia.
- Shearer, B.; Shea, S.; Deegan, P. (1986). Temperature-Growth Relationships of *Phytophthora cinnamomi* in the Secondary Phloem of Roots of *Banksia grandis* and *Eucalyptus marginata*. Research Station, Department of Conservation and Land Management. *Phytopathology* 77: 661-665.
- Shearer, B.; Tippett, J. (1989). Jarrah Dieback: The Dynamics and Management of *Phytophthora cinnamomi* in the Jarrah (*Eucalyptus marginata*) Forest

of South-western Australia. Research Bulletin N.º 3, Department of Conservation and Land Management Como Western Australia.

Schornack, S.; Huitema, E.; Cano, L.; Bozkurt, T.; Oliva, R.; Van Damme, M.; Schwizer, S.; Raffaele, S.; Chaparro-Garcia, A.; Farrer, R.; Segretin, M.; Bos, J.; Haas, B.; Zody, M.; Nusbaum, C.; Win, J.; Thines, M. and Kamoun S. (2009). Ten things to know about oomycete effectors. *Molecular Plant Pathology* 10: 795-803.

Silva, J. (2007). Árvores e Florestas de Portugal. Do castanheiro ao teixo. As outras espécies florestais, Vol. 5. Lisboa: Publico, Comunicação Social, S.A..

Stamps, D.; Waterhouse, G.; Newhook, F.; Hall, G. (1990). Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. Mycological Paper 162. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK.

Studholme, D.; McDougal, R.; Sambles, C.; Hansen, E.; Hardy, G.; Grant, M.; Ganley, R. and Williams, N. (2016). Genome sequences of six *Phytophthora* species associated with forests in New Zealand. Elsevier. *Genomics Data*, 7, 54-56.

Tinoco, M.; Dias, B.; Dall'Asta, R.; Pamphile, J.; Aragão, F. (2010). *In vivo* transspecific gene silencing in fungal cells by in plant expression of a double-stranded RNA. *BMC Biology*, 8: 27.

Thines, M. and Kamoun, S. (2010). Oomycete-plant coevolution: recent advances and future prospects. *Current Opinion in Plant Biology*, 13: 1-7.

Tomlinson, J., Dickinson, M.; Hobden, E.; Robinson, S.; Giltrap, P.; Boonham, N. (2010). A five-minute DNA extraction method for expedited detection of *Phytophthora ramorum* following prescreening using *Phytophthora* spp. lateral flow devices. Elsevier. *Journal of Microbiological Methods*, 81 (2): 116-120.

Tyler, B.; Tripathi, S.; Aerts, A.; Bensasson, D.; Dehal, P.; Dubchak, I.; *et al.* (2009). Genome sequences of two *Phytophthora* species responsible for Sudden Oak

Death and Soybean Root Rot provide novel insights into their evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. Lawrence Berkeley National Laboratory.

Van Den Brink, L.; Janssen, C. (1985). The effect of human activities during cultural phases on the development of montane vegetation in the Serra da Estrela. Portugal. Review of Palaeobotany and Palynology, 44 (3-4): 193-202, 205-215.

West, P.; Shepherd, S.; Walker, C.; Li, S.; Appiah, A.; Grenville-Briggs, L.; Govers, F. and Gow, N. (2008). Internuclear gene silencing in *Phytophthora infestans* is established through chromatin remodeling. Microbiology, 154: 1482-1490.

Vieitez, E.; Madriñán, M.; Madriñán, F. (1996). El Castaño, 1.<sup>a</sup> Ed.. Léon. Edición Edilesa. Cit. por Carvalho, J. (2014). Métodos de luta alternativos contra a doença da tinta do castanheiro. Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa. Tese de Mestrado.

Villeneuve, P.; Muderhwa, J.; Graille, J.; Haas, M. (2000). Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. Elsevier. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 9 (4-6), 113-148.

Voigt, C.; Schafer, W. & Salomon, S. (2005). A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. Plant Journal, 42, 364-375.

Wesley, S; Helliwell, C.; Wang, M.; Waterhouse, P. (2004). Posttranscriptional gene silencing in plant. Methods in Molecular Biology, 265: 117-129.

Zentmyer, G. (1980). *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph, American Phytopathological Society. N.º 10, pp. 96, pp. ref. 600. ISBN: 0890540306.

Zorn, H.; Bouws, H.; Takenberg, M.; Nimtz, M.; Getzlaff, R.; Breithaupt, D. & Berger, R. (2005). An extracellular carboxylesterase from the

**Caracterização de fatores moleculares implicados na patogenicidade de *Phytophthora cinnamomi***

basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyses xanthophyll esters. Biological chemistry, 386, 435-440.