

ELENE YAMAZAKI LAU

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE  
GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA  
INTERAÇÃO TOMATEIRO - *Meloidogyne incognita***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para obtenção do título de "*Doctor Scientiae*".

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2005**

ELENE YAMAZAKI LAU

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE  
GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA  
INTERAÇÃO TOMATEIRO - *Meloidogyne incognita***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “*Doctor Scientiae*”.

APROVADA: 26 de abril de 2005.

---

Prof. Leandro Grassi de Freitas  
(Conselheiro)

---

Prof. Júlio César de Mattos Cascardo

---

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior

---

Prof<sup>ª</sup>. Marisa Vieira de Queiroz

---

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel  
(Orientador)

A Deus.  
Aos meus pais, Antonia e Kaoru.  
Ao meu esposo Douglas.  
Aos meus irmãos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Engenharia Florestal, ao Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela formação científica e profissional.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel, pela orientação, oportunidade de aprendizagem, confiança e amizade.

Ao meu esposo Douglas pelo seu amor e presença.

Aos amigos do Laboratório de Genômica, André, Bruno, Bruno Capoeira, Cynthia, Edgar Paulino, Evandro, Francis, Janaína, João Paulo, Júlio, Klaus, Léo, Luana, Lúcio Mauro, Luís, Reginaldo, Sônia, Stefânia e Tadeu, pela convivência, cumplicidade, amizade e apoio em todos os momentos, e em especial ao Gustavo por sua dedicação incansável na realização do trabalho. Aos amigos dos Laboratórios de Nematologia, Dagoberto, Fábio e Rodrigo, pela amizade e colaboração irrestrita.

Aos Professores Acelino Couto Alfenas, Leandro Grassi de Freitas, Wagner Campos Otoni, Rosângela D'Arc de Lima Oliveira e Francisco Murilo Zerbini pela amizade, conselhos e colaboração.

A todos que contribuíram de maneira direta ou indireta que foram omitidos, mas não menos importantes.

## ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	8
Material vegetal e inoculação com <i>Meloidogyne incognita</i> .....	8
Extração de RNA.....	9
Construção das bibliotecas subtrativas.....	9
Sequenciamento e análise dos clones recombinantes.....	11
Análise de expressão utilizando macroarranjos de cDNA.....	12
Análises de <i>Southern</i> e <i>Northern blot</i> .....	13
Análise da expressão diferencial por PCR em tempo real.....	14
RESULTADOS.....	16
Construção das bibliotecas subtrativas.....	16
Análise de similaridade e classificação dos ESTs da biblioteca Mol 24h..	17
Validação das bibliotecas subtrativas Mol 24h e Mol 72h .....	24
Análise da expressão diferencial por <i>Northern blot</i> .....	25
Análise da expressão diferencial por PCR em tempo real.....	26
Número de cópias no genoma de oito genes encontrados na biblioteca Mol 24h.....	27
DISCUSSÃO.....	31

LITERATURA CITADA.....	45
ANEXO.....	54

## RESUMO

YAMAZAKI LAU, Elene. D.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2005.  
**Identificação e caracterização parcial de genes diferencialmente expressos na interação tomateiro-*Meloidogyne incognita*.** Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Conselheiros: Leandro Grassi de Freitas e Wagner Campos Otoni.

*Meloidogyne incognita* é um nematóide endoparasita sedentário que induz a formação de galhas nas raízes das plantas suscetíveis. Em tomateiros com o gene *Mi-1*, as células próximas ao estilete dos juvenis de segundo estágio exibem reação de hipersensibilidade (HR) a partir de oito a doze horas após a inoculação. Esse trabalho objetivou identificar e caracterizar parcialmente genes envolvidos nas vias de transdução de sinais e nas respostas de defesa do tomateiro a *Meloidogyne incognita* mediadas pelo gene *Mi-1* utilizando a técnica de hibridização subtrativa seguida de amplificação por PCR (*suppressive subtractive hybridization*, SSH). A partir dos cultivares quase isogênicos de tomateiros 'MoneyMaker' (suscetível) e 'Motelle' (resistente) inoculados com *M. incognita* foram construídas duas bibliotecas subtrativas enriquecidas para genes diferencialmente expressos na interação incompatível (Mol 24h e Mol 72h) e uma biblioteca para a interação compatível (MMI 24h). Foram seqüenciados 81 clones da biblioteca Mol 72h, 26 da MMI 24h e 620 da

Mol 24h. As análises subseqüentes se concentraram nesta última porque as outras duas apresentaram elevada redundância ou muitos ESTs (*Expressed Sequence Tags*) com similaridade a genes não caracterizados. Na análise de expressão por macroarranjo, 126 (41%) entre os 307 clones não redundantes de cDNAs apresentaram expressão diferencial. A análise de *Northern blot* não apresentou sensibilidade suficiente para evidenciar diferenças nos níveis de expressão. Vinte e um genes foram submetidos à análise de expressão por PCR quantitativa e, entre estes, oito apresentaram indução duas horas após a inoculação. A classificação dos ESTs em categorias funcionais em potencial mostrou que 31% deles têm relação com resposta de resistência, resposta a patógenos, proteção à célula, sinalização celular ou a estresse abiótico. Os ESTs classificados como não caracterizados corresponderam a 26%. Entre os ESTs com similaridade a genes induzidos nessa interação relatados previamente, estão inibidores de proteases, quitinase, aquaporina, fenilalanina amônia liase, *Ki1* e peroxidase. Entre os ESTs relacionados com defesa relatados em outros patossistemas estão os similares a genes que codificam para *MAPK4*, defensinas, proteínas de transferência de lipídios, *PR10* e proteína 14-3-3. Os genes semelhantes a *MtN19*, *D13F MYB ST1* e cinase dependente de cálcio parecem apresentar mais de uma cópia no genoma e os genes semelhantes a *Myb1*, gene relacionado à resposta de resistência, gene envolvido com a resistência sistêmica adquirida, *Ki1* e a defensina parecem estar presentes em cópia única no genoma. Os transcritos dos genes correspondentes aos clones SSH08D08 (*MtN19*), SSH09A10 (peroxidase 10), SSH10H09 (semelhante a *Ki1*) e SSH09D04 (defensina) possuem cerca de 2,5 kb, 1,2 kb, 1,8 kb e 0,5 kb, respectivamente. A presença de muitos genes relacionados com defesa e a ausência de genes do patógeno na biblioteca demonstra que a subtração foi eficiente para enriquecer para genes diferencialmente expressos. A grande quantidade de genes identificados e parcialmente caracterizados fornece subsídios para o estudo funcional visando caracterizar as vias de respostas de defesa mediadas pelo gene *Mi-1*.

## ABSTRACT

YAMAZAKI LAU, Elene. D.S., Universidade Federal de Viçosa, April 2005.  
**Identification and partial characterization of genes differentially expressed in the tomato-*Meloidogyne incognita* interaction.** Advisor: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Committee members: Leandro Grassi de Freitas and Wagner Campos Otoni.

In the compatible interaction between tomato and root-knot nematode *Meloidogyne incognita*, galls are formed on the roots. The tomato gene *Mi-1* confers resistance to *M. incognita* accompanied by a hypersensitive response. To elucidate the mechanisms underlying these interactions, three cDNA libraries enriched for transcripts differentially expressed in susceptible (MMI 24h) and in resistant (Mol 24h and Mol 72h) plants, respectively, were generated by suppressive subtractive hybridization (SSH). Twenty-six ESTs were generated from MMI 24h, 81 from Mol 72h and 620 from Mol 24h library. The library Mol 24 was further characterized because the first two were highly redundant or had many ESTs similar to unknown genes. The cDNA macroarray analysis of 307 nonredundant clones revealed that 126 (41%) corresponded to differentially expressed transcripts. Northern blot analysis did not show enough sensitivity to detect differential expression. Quantitative PCR was performed to investigate the expression patterns of 21 selected genes. Transcript

accumulation occurred for eight out of the 21 genes two hours after *M. incognita* challenge in resistant plants. Classification of the ESTs into several putative functional categories showed that 31% of these ESTs represented genes involved in resistance response, pathogen and stress response, cell protection or signaling. Twenty-six percent of ESTs corresponded to genes with unknown functions. Among ESTs similar to genes known to be involved in plant-nematode interactions were trypsin-alpha amylase inhibitor, chitinase, aquaporin, phenylalanine ammonia-lyase, *Ki1* and peroxidase. Among ESTs similar to genes reported in other pathosystems were *MAPK4*, defensins, lipid transfer proteins, *PR10* and 14-3-3 proteins. The genes similar to *MtN19*, to *D13F MYB ST1* and to calcium-dependent protein kinase 3 apparently are present in more than one copy in the tomato genome and the genes similar to *Myb1*, to disease resistance response protein, to systemic acquired resistance-related protein, to *Ki1* and to plant defensin apparently have only one copy. The transcripts corresponding to SSH08D08 (*MtN19*), SSH09A10 (peroxidase 10), SSH10H09 (similar to *Ki1*) and SSH09D04 (plant defensin) clones have approximately 2,5 kb, 1,2 kb, 1,8 kb and 0,5 kb, respectively. The presence of various defense related genes and the absence of pathogen genes in the libraries give evidence of successfully subtraction for genes differentially expressed. The identification and partial characterization of these cDNAs will assist functional analysis aimed to elucidate the pathways activated by the *Mi-1* gene.

## INTRODUÇÃO

Os nematóides fitopatogênicos de hábito sedentário atacam um grande número de culturas economicamente importantes, causando perdas de mais de 100 bilhões de dólares por ano na produção agrícola mundial (Bird e Koltai, 2000; Opperman e Bird, 1998). Em uma interação compatível, esses parasitas induzem a rediferenciação das células das raízes da planta hospedeira para formar os sítios de alimentação, que são essenciais para o seu crescimento e reprodução. No caso do nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.), os juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) penetram na raiz do hospedeiro e migram de maneira intercelular em direção ao cilindro vascular, onde é formado o sítio de alimentação, que consiste de várias células gigantes originárias da rediferenciação de células adjacentes ao cilindro vascular (Williamson e Hussey, 1996; Wyss et al., 1992). Essa mudança no destino celular é o resultado da ativação de genes da planta e da reativação do ciclo celular, possivelmente induzida por secreções do nematóide. Essas células sofrem sucessivas divisões nucleares sem ocorrência de citocinese, tornando-se poliplóides, podendo cada uma conter até 100 núcleos. Os núcleos podem ainda ser endorreduplicados (Wiggers et al., 1990). O citoplasma dessas células torna-se denso, com grande número de mitocôndrias, e as paredes celulares tornam-se invaginadas, aumentando a superfície de absorção de produtos fotossintetizados, minerais e outros metabólitos pela plasmalema. Ao

redor dos sítios de alimentação ocorre a divisão de células corticais, dando origem às típicas galhas induzidas por *Meloidogyne* spp. (Jones, 1981; Sijmons et al., 1994).

As células gigantes servem como sítio de alimentação do nematóide em desenvolvimento, durante um período de três a seis semanas até a maturação dos ovos. Neste período, a demanda nutritiva do nematóide é proporcional ao estado metabólico das células gigantes (Huang e Maggenti, 1969; Williamson e Hussey, 1996).

Diversos genes diferencialmente expressos em plantas durante a patogênese de *Meloidogyne incognita* já foram identificados. Niebel et al. (1993 e 1995) isolaram cDNAs com similaridade a genes de defesa de plantas conhecidos, como os que codificam para extensina e catalase, por meio da comparação da expressão diferenciada de genes em raízes infectadas e não infectadas. Entre os vários genes induzidos, foram identificados genes que codificam proteínas similares à enzima E<sub>2</sub> (que participa da via de ubiquitinação de proteínas), à subunidade maior da RNA polimerase II, a um fator de transcrição do tipo Myb, à H<sup>+</sup>-ATPase da plasmalema (Bird e Wilson, 1994) e à Lea14-A (uma proteína abundante em estágios tardios da embriogênese, com possível função de proteção à dessecação) (Van der Eycken et al., 1996). Outros genes são também transcricionalmente ativados durante o início da formação dos sítios de alimentação, como os que codificam para a cinase dependente de ciclina CDC2a e a ciclina mitótica CYC1At (Niebel et al., 1996). Nesta fase ocorre proliferação dos núcleos e a concomitante endoreduplicação do DNA. A identificação destes genes evidencia a alteração do ciclo celular durante a formação dos sítios de alimentação. Além disso, o estabelecimento e o desenvolvimento da galha contendo as células gigantes são totalmente dependentes da síntese de DNA e da mitose (de Almeida Engler et al., 1999). Outro gene essencial para a formação dos sítios de alimentação em estágios iniciais é *RPE*, que codifica uma proteína similar a D-ribulose-5-fosfato 3-epimerase (envolvida na via das pentoses fosfato) (Favery et al., 1998). Este gene é normalmente expresso nos meristemas e nos sítios de iniciação de raízes laterais, sugerindo que o desenvolvimento de sítios de alimentação e os primeiros estágios da formação de meristemas compartilham rotas gênicas comuns (Favery et al., 1998).

Inversamente, diversos genes são silenciados poucos dias após a infecção, conforme demonstrado em plantas contendo genes repórteres controlados pelos promotores dos genes que codificam para a nopalina sintase, da fenilalanina amônia-liase 1, AtEREBP e do promotor 35S do CaMV, entre outros (Gheysen e Fenoll, 2002). Esta modificação no padrão de expressão dos genes, tanto para níveis maiores ou menores, confirma que as células das raízes sofrem uma reprogramação ao se tornarem sítios de alimentação.

Em interações incompatíveis, como no caso da infecção de *M. incognita* em tomateiro contendo o gene de resistência *Mi-1*, as células do cilindro central próximas ao local de penetração do estilete do nematóide exibem um processo de morte celular programada conhecido como reação de hipersensibilidade (*hypersensitive response*, HR) a partir de oito a 12 horas após a inoculação das raízes com juvenis *J*<sub>2</sub>, impedindo o estabelecimento de uma interação compatível (Dropkin, 1969a; Paulson e Webster, 1972). Nas células que estão comprometidas com a HR, ocorre aumento na elétrion-densidade do citoplasma, caracterizada pelo aumento no número de ribossomos, proliferação do retículo endoplasmático e uma coloração mais intensa das substâncias que compõem o citosol. Concomitantemente, as inclusões elétrion-densas do vacúolo desaparecem e, em seguida as membranas das organelas celulares se rompem, resultando no desaparecimento de mitocôndrias e do complexo de Golgi. Estruturas fibrilares do nucleoplasma são substituídas por inclusões elétrion-densas (Paulson e Webster, 1972). As células adjacentes à área necrótica apresentam muitas vesículas produzidas pelo retículo endoplasmático e um aumento da deposição de calose (Bleve-Zacheo et al., 1982). Possivelmente não são produzidas substâncias tóxicas durante a interação porque os *J*<sub>2</sub> removidos de raízes com HR, dois dias após a inoculação, são capazes de infectar plantas suscetíveis (Paulson e Webster, 1972).

Além de *M. incognita*, o gene *Mi-1* ainda confere resistência a *M. javanica*, a *M. arenaria*, ao afídeo *Macrosiphum euphorbiae* (Rossi et al., 1998) e à mosca branca *Bemisia tabaci* (Nombela et al., 2003). Este gene codifica uma proteína com um domínio de ligação a nucleotídeos trifosfatados (*nucleotide binding site*, NBS) e um domínio com repetições ricas no aminoácido leucina (*leucine rich repeats*, LRR), similar a outras proteínas

envolvidas na resistência a fitopatógenos (Milligan et al., 1998). Essas proteínas reconhecem elicitores produzidos pelos patógenos e, após o reconhecimento, ativam cadeias de transdução de sinais que resultam na morte celular programada no sítio de infecção (Hammond-Kosack e Jones, 1997). Em altas temperaturas esta resistência parece não ser efetiva. A determinação da resistência ocorre durante as primeiras 24 a 48 horas após a infecção, pois após este período a resistência não é desencadeada mesmo em temperatura permissiva (Dropkin, 1969b). Ainda não se sabe se a morte celular localizada é a responsável direta pela resistência ou se é uma resposta secundária.

De maneira semelhante às respostas de resistência para outros patógenos, ocorrem alterações moleculares imediatamente após a infecção, como o aumento dos níveis de atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase e peroxidases (Brueske, 1980; Zacheo et al., 1993). Em análises de bibliotecas de cDNA provenientes de mRNA isolado a partir de raízes 12 horas após a infecção, foram identificados vários cDNAs com similaridade a genes de defesa, incluindo peroxidase, quitinase, lipoxigenase, extensina e inibidores de protease. No entanto, a maioria destes genes também é induzida em plantas suscetíveis, com variações na extensão e no tempo de indução (Williamson e Hussey, 1996; Gheysen e Fenoll, 2002).

Recentemente, utilizando plantas transgênicas expressando *NahG*, foi demonstrado que a via de transdução de sinais ativada pelo gene *Mi-1* é dependente de ácido salicílico, tanto para a resistência a *M. incognita* como para a elicitação da HR (Branch et al., 2004). Na interação incompatível entre tomateiro contendo *Mi-1* e *M. euphorbiae*, a resistência também parece ser dependente de ácido salicílico (Ilarduya et al., 2003).

O gene *Rme1* é requerido para a resistência mediada por *Mi-1* a *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. incognita*, *Macrosiphum euphorbiae* e *Bemisia tabaci* (Ilarduya et al., 2001; Ilarduya et al., 2004), porém este ainda não foi clonado e sua possível função não foi determinada. De acordo com o modelo de “molécula-guardiã”, a proteína *Mi-1* monitoraria as modificações da proteína *Rme1*, sendo essa última o alvo das moléculas efetoras dos patógenos a que *Mi-1* confere resistência (Ilarduya et al., 2004).

Apesar dos esforços realizados até o momento, relativamente poucos genes envolvidos nas modificações que ocorrem durante as interações compatível e incompatível entre plantas e nematóides foram isolados e caracterizados. Isso se deve principalmente às limitações impostas pelas metodologias utilizadas até o presente momento para a identificação desses genes, assim como às dificuldades inerentes à interação, como o número limitado de células afetadas pelo nematóide, o difícil acesso ao local da interação e a infecção não sincronizada (Branch et al., 2004).

Vários métodos já foram utilizados para identificar genes diferencialmente expressos durante a interação planta-nematóide. A transformação de plantas com um interposon (construção contendo um gene repórter sem promotor) foi realizada para a clonagem de *RPE* (Favery et al., 1998). A aplicação desse método é possível somente em plantas cuja eficiência de transformação é alta e, além disso, a probabilidade do interposon ser inserido exatamente na região controlada por um promotor de um gene diferencialmente expresso é baixa. Os genes que codificam para a extensina (Nebel et al., 1993) e para a endo- $\beta$ -1,4-glucanase (Goellner et al., 2001) foram identificadas com base na similaridade com genes previamente clonados e caracterizados. Esse método depende da existência de estudos anteriores e de inferências sobre a função desses genes em cada situação específica. Além disso, é restrita à identificação de genes similares. A transformação de plantas com uma construção contendo o promotor de um gene expresso especificamente em raiz, fusionado a um gene repórter, foi realizada para demonstrar que o gene *TobRB7* é induzido nas células gigantes produzidas por *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. incognita* (Opperman et al., 1994). A utilização desse método depende da existência de estudos anteriores e do acaso, além de não permitir a identificação de novos genes. *Differential display* e cDNA-AFLP foram utilizados para identificar seis genes induzidos por *M. incognita* em interação suscetível (Vercauteren et al., 2001, Samuelian et al., 2004). Esses métodos favorecem a identificação de genes que apresentam altos níveis de expressão, além da necessidade de avaliar um grande número de transcritos. A análise de microarranjos possibilitou a identificação de vários genes diferencialmente expressos mediante a inoculação de *Arabidopsis* com *Heterodera schachtii* e *H. glycines* (Puthoff et al., 2003). Esse método depende

da disponibilidade de equipamentos relacionados à construção e leitura dos microarranjos. Outras dificuldades são que transcritos com baixos níveis de expressão não são detectados e ainda pode ocorrer interferência na detecção da expressão diferencial no caso de famílias multigênicas. Por fim, pode-se construir bibliotecas de genes diferencialmente expressos durante a interação por meio de hibridização subtrativa.

Muitas variações da técnica de subtração já foram utilizadas, permitindo a clonagem de diversos genes relacionados à infecção por nematóides, como o gene que codifica para uma catalase em batata infectada pelo nematóide dos cistos (Niebel et al., 1995); *LemMi-19*, que é similar a *Lea14-A* (Van der Eycken et al., 1996); genes similares ao que codifica a enzima  $E_2$ , a subunidade maior da RNA polimerase II, ao fator de transcrição do tipo Myb e à  $H^+$ -ATPase da plasmalema (Bird e Wilson, 1994; Wilson et al., 1994).

Uma variação da técnica de subtração denominada *suppression subtractive hybridization* (SSH) foi implementada por Diatchenko et al. (1996). A SSH combina a normalização de genes com altos e baixos níveis de expressão diferencial com a subtração em apenas uma etapa. É realizada ainda uma etapa de PCR que suprime a amplificação de cDNAs correspondentes a transcritos muito abundantes e favorece a amplificação dos cDNAs correspondentes a transcritos normalizados e com expressão diferencial. A eliminação de etapas permite maior eficiência, economia de tempo e de mão de obra dispensada para a obtenção da biblioteca subtrativa. Esta estratégia foi utilizada com sucesso na produção de uma biblioteca subtrativa de tomateiro transgênico superexpressando o gene de resistência *Pto* (Xiao et al., 2001). Combinada à análise de microarranjos de cDNA, essa técnica foi utilizada para identificar genes induzidos ou reprimidos em tomateiro por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* contendo *AvrPto* e também na interação incompatível com tomateiro expressando o gene de resistência *RxvT13* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* estirpe T3 (Mysore et al., 2003, Gibly et al., 2004). A utilização da SSH ainda não foi relatada no patossistema tomateiro-nematóide. Essa estratégia pode permitir a identificação de genes essenciais para a resistência mediada por *Mi-1*, como *Rme1*, caso os seus níveis de expressão sejam modificados durante a interação.

Assim, tendo em vista da carência de informações quanto aos genes envolvidos na interação entre plantas e nematóides das galhas e das vantagens oferecidas pelo método SSH, esse trabalho teve por objetivo construir bibliotecas subtrativas de genes diferencialmente expressos nas interações compatível e incompatível com a finalidade de identificar e caracterizar genes envolvidos nas vias de transdução de sinais e nas respostas de defesa do tomateiro a *M. incognita* mediadas pelo gene *Mi-1*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Material vegetal e inoculação com *Meloidogyne incognita***

Sementes de *Lycopersicon esculentum* Miller dos cultivares quase isogênicos 'MoneyMaker' (suscetível) e 'Motelle' (resistente, contendo o gene *Mi-1*) foram germinadas em substrato Plantmax ou solo esterilizado. As mudas foram transplantadas para areia após duas a três semanas, e irrigadas periodicamente com água destilada ou solução nutritiva contendo 0,3 g/l de adubo Ouro Verde. Uma semana antes da inoculação, as mudas foram transferidas para câmara de crescimento a 26°C e fotoperíodo de 16 horas. Cada planta foi inoculada com 5000 juvenis J<sub>2</sub> de *Meloidogyne incognita* raça 1 (cedidas pelo Laboratório de Nematologia da UFV), 30 dias após o transplantio. Para cada planta inoculada havia uma planta correspondente não inoculada. Todas as plantas tiveram o substrato (areia) perfurado na base da planta antes da inoculação.

As raízes de 'MoneyMaker' inoculadas e não inoculadas foram coletadas 2h, 24h, 48h, 72h, 7 dias e 30 dias após a inoculação, e de 'Motelle' 2h, 24h, 48h, 72h e 7 dias após a inoculação. Para a coleta, as raízes foram lavadas duas vezes com água de torneira e o excesso de água retirado em papel toalha. Foram coletadas oito a dez plantas por tempo por tratamento. As raízes foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o processamento para a extração de RNA.

Os nematóides foram multiplicados em casa de vegetação em *L. esculentum* 'Moneymaker' ou 'Santa Clara'. As raízes com galhas foram lavadas em água corrente, cortadas em pedaços com comprimento de 2 cm e trituradas em liquidificador na presença de quatro volumes de água e um de hipoclorito de sódio 2,5%. Os ovos foram coletados em uma peneira de 0,025 mm de abertura (500 mesh) colocada abaixo de outra de 0,074 mm de abertura (200 mesh) e transferidos para funil de Baermann modificado. Os juvenis eclodidos foram coletados diariamente durante uma semana e mantidos em água a 4°C até o momento da contagem e inoculação. Os juvenis foram quantificados em câmara de Peters com o auxílio de microscópio estereoscópico. Os juvenis foram mantidos em borbulhamento de ar em água à temperatura ambiente no experimento utilizado para cinética de expressão gênica.

### **Extração de RNA**

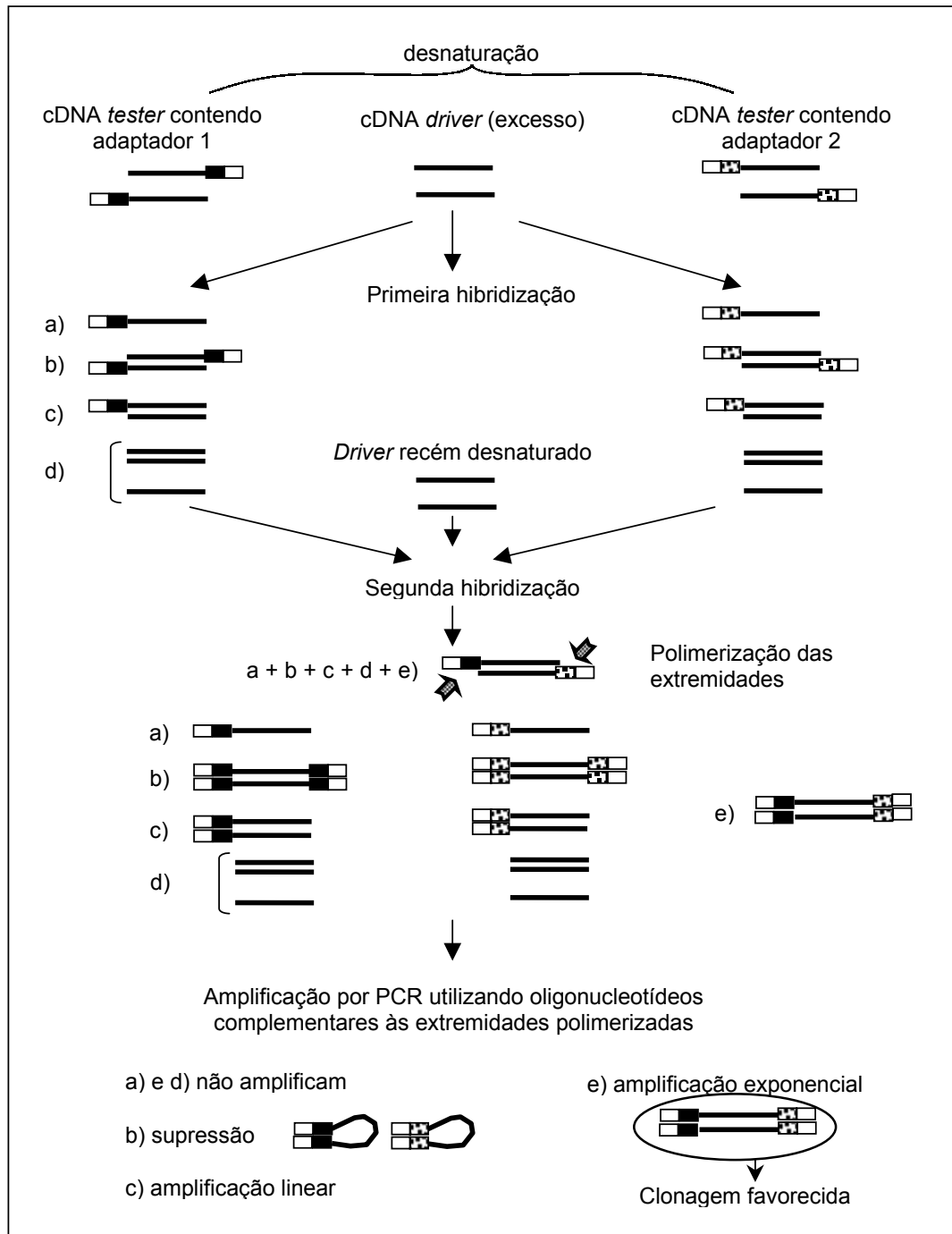
O RNA total das raízes foi extraído conforme o protocolo proposto por Logemann (1987), porém ajustado para volume maior.

Para fins de construção das bibliotecas e de sondas, o mRNA foi purificado conforme o protocolo do kit *NucleoTrap<sup>®</sup> Nucleic Acid Purification* (Clontech, Palo Alto, CA, EUA), liofilizado, ressuspendido em tris-HCl 5 mM, pH 7,5 e armazenado a -80°C até o momento do uso.

A concentração e a qualidade do RNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1,2% desnaturante e leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

### **Construção das bibliotecas subtrativas**

As bibliotecas foram construídas utilizando-se o kit *PCR-Select<sup>™</sup> cDNA Subtraction* (Clontech, Palo Alto, CA, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante, conforme a Figura 1. O material utilizado para a síntese de cDNAs utilizados como *tester* e como *driver* para a construção das bibliotecas estão apresentados na Tabela 1.



**Figura 1.** Esquema da técnica SSH (*suppression subtractive hybridization*) para a construção de bibliotecas subtrativas (adaptado de Diatchenko *et al.*, 1996).

Os fragmentos de cDNAs subtraídos foram clonados nos vetores pCR2.1 TOPO ou pGEM-T Easy (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) e transformados em células de *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen) ou EC100 (Epicentre, Madison, WI, EUA), por eletroporação. As colônias contendo

plasmídeos com insertos foram identificadas por meio de PCR realizada com os oligonucleotídeos M13F e M13R. Clones contendo fragmentos de diferentes tamanhos foram selecionados para sequenciamento.

Tabela 1 – Material utilizado para a síntese de cDNAs utilizados como *tester* e *driver* para a construção das bibliotecas subtrativas

Biblioteca	<i>tester</i>	<i>Driver</i>
MMI 24h	MMI24h <sup>a</sup>	MM24h <sup>b</sup> , Mol24h <sup>c</sup> , Mo24h <sup>d</sup>
Mol 24h	Mol24h	MM24h, MMI24h, Mo24h
Mol 72h	Mol72h	Mo72h, MMI24h

<sup>a</sup> mRNA proveniente de raiz de *Lycopersicon esculentum* 'Moneymaker' (suscetível) 24 horas pós-inoculação (h.p.i.) com *Meloidogyne incognita*; <sup>b</sup> mRNA proveniente de raiz de 'Moneymaker' 24 h.p.i. com água; <sup>c</sup> mRNA proveniente de raiz de *L. esculentum* 'Motelle' (resistente) 24 h.p.i. com *M. incognita*; <sup>d</sup> mRNA proveniente de raiz de 'Motelle' 24 horas h.p.i. com *M. incognita*

### Sequenciamento e análise dos clones recombinantes

Os plasmídeos ou produtos da PCR dos clones recombinantes foram seqüenciados nos equipamentos ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) ou MegaBACE 500 (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação foram M13F e M13R. Os produtos amplificados foram purificados em filtros *MultiScreen*<sup>®</sup> - *PCR Plates* (Millipore, Bedford, MA, USA) e os fragmentos analisados em gel de agarose 1%. Para a reação de sequenciamento foram utilizados os mesmos oligonucleotídeos M13F e, ou, M13R. As seqüências obtidas foram comparadas àquelas depositadas nos bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (algoritmo BLASTx), *The Institute of Genomic Research* (TIGR) (algoritmo BLASTn) (<http://www.tigr.org/>) e *Solanaceae Genomics Network* (SGN) (<http://www.sgn.cornell.edu/>) (BLASTn). Para definir as categorias funcionais em potencial dos genes encontrados foram utilizadas as ferramentas disponíveis nos bancos de dados *Expert Protein Analysis System* (ExpPASy) (<http://bo.expasy.org/>) e InterPRO (<http://www2.ebi.ac.uk/interpro/>). A similaridade foi considerada significativa quando o valor esperado (e-value) era menor do que 1e<sup>-3</sup>.

A similaridade mais significativa foi considerada para fins de comparação, exceto quando esta correspondesse a ESTs não caracterizados e ocorresse similaridade menos significativa, porém menor que o valor de corte considerado, com genes caracterizados. As seqüências foram agrupadas e analisadas quanto à redundância utilizando o programa CAP ([http://www.infobiongen.fr/services/analyseseq/cgi-bin/cap\\_in.pl](http://www.infobiongen.fr/services/analyseseq/cgi-bin/cap_in.pl)).

### **Análise de expressão utilizando macroarranjos de cDNA**

A análise dos macroarranjos dos cDNAs foi efetuada para confirmar a expressão diferencial dos clones, conforme os procedimentos do kit *PCR-Select Differential Screening* (Clontech, Palo Alto, CA, EUA). Os fragmentos foram amplificados com os oligonucleotídeos *Nested PCR primer 1* e 2R, que anelam nas extremidades dos clones correspondentes a genes diferencialmente expressos, conforme a metodologia utilizada para a construção das bibliotecas. Aos produtos da PCR foi adicionado igual volume de NaOH 0,6 N, e dois microlitros da solução resultante foram depositados em cada uma de quatro membranas de náilon Hybond-N<sup>+</sup> (GE Healthcare). Cada uma das membranas foi hibridizada com uma das sondas a seguir descritas. O DNA foi fixado na membrana com NaOH 0,4 N durante dez minutos e lavado em SSC 2x durante dez minutos. As sondas utilizadas foram o cDNA não subtraído [50 a 100 ng de cDNA sintetizado com o kit *SuperScript<sup>TM</sup>* (Invitrogen, GmbH, Karlsruhe, Germany) e oligonucleotídeo oligo-dT a partir de mRNA proveniente do material *driver* e *tester* da biblioteca Mol 24h] e os cDNAs subtraídos *forward* (do qual foi anteriormente construída a biblioteca 'Motelle' 24 h.p.i.) e *reverse* (*tester* e *driver* invertido em relação ao *forward*). As sondas foram marcadas com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP utilizando-se o mesmo kit, porém a reação foi interrompida e o cDNA desnaturado com o mesmo volume de NaOH 0,8 N. As membranas foram pré-hibridizadas a 68°C a 70°C durante 24h em tampão de Denhardt [SSC 5x, solução de Denhardt 5x, SDS 0,5% (p/v) e 200 mg/L de DNA de esperma de salmão] e hibridizadas nessas mesmas condições durante 24h. Após a hibridização as membranas foram enxaguadas em SSC 2x e SDS 0,1% e lavadas sequencialmente em SSC 2x e SDS 0,1%, SSC 1x e SDS 0,1% e SSC 0,5x e SDS 0,1%, a 68°C. Cada lavagem teve duração de 20 minutos, sob agitação. Finalizadas as lavagens, as membranas foram colocadas no

interior de cassetes contendo intensificador e filme Kodak X-Omat AR5 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) durante 36h ou três dias. Os clones que apresentaram hibridização com intensidade maior, visualmente, na membrana hibridizada com a sonda *forward* em relação à sonda *reverse*, foram considerados como diferencialmente expressos.

### **Análises de *Southern* e *Northern blot***

Para a análise de *Northern blot*, 15 µg de RNA total das amostras 'Moneymaker' 2h, 24h, 48h, 72h, 120h e 20 dias após a inoculação, 'Motelle' 2h, 24h, 48h, 72h, 120h após a inoculação, e os correspondentes não inoculados, foram separados em gel desnaturante. Após a corrida eletroforética, o gel foi enxaguado duas vezes com água autoclavada e lavado sequencialmente em água autoclavada e SSC 10x. Cada lavagem teve a duração de 15 minutos, sob agitação. O RNA foi transferido para membrana de náilon Hybond-N<sup>+</sup> (GE Healthcare) por capilaridade em SSC 10x durante 24 horas. Após a transferência, o RNA foi fixado na membrana com NaOH 0,4 N durante dez minutos e enxaguado com SSC 2x por dez minutos.

Para a análise de *Southern blot*, o DNA das folhas de 'Motelle' e 'Moneymaker' foi extraído conforme o protocolo de Fulton et al. (1995). O DNA total foi digerido com as enzimas *EcoR* I, *EcoR* V e *Xba* I. Cerca de 12 µg de DNA digerido foram separados em gel TAE 1x com 1% de agarose à 24V durante cerca de 20 horas. Após a corrida, o gel foi lavado com água destilada durante 20 minutos, com HCl 0,25 N durante 10 minutos e neutralizado em NaOH 0,4 N. Em seguida, o DNA foi transferido para membrana de náilon Hybond-N<sup>+</sup> (GE Healthcare) por capilaridade em NaOH 0,4 N durante 24 horas. Após a transferência a membrana foi enxaguada com SSC 2x por dez minutos e utilizada a seguir para a hibridização, ou envolta em filme plástico e mantida a 4°C até a utilização.

Os fragmentos utilizados como sondas foram provenientes de produto da PCR amplificados com os oligonucleotídeos *Nested PCR Primer* 1 e 2R ou de clivagem dos clones selecionados com *EcoR* I. Os fragmentos foram purificados do gel de agarose com a utilização do kit *Sephaglas*<sup>TM</sup> *BandPrep* (GE Healthcare, Freiburg, Germany).

As sondas (cerca de 150 ng) foram marcadas da mesma forma descrita para a análise de macroarranjo. As membranas foram pré-hibridizadas a 65°C durante 24h em tampão de Denhardt [SSC 5x, solução de Denhardt 5x, SDS 0,5% (p/v) e 200 mg/L de DNA de esperma de salmão] e hibridizadas nessas mesmas condições durante 24h. Foram enxaguadas em SSC 2x e SDS 0,1% e lavadas sequencialmente em SSC 2x e SDS 0,1%, SSC 1x e SDS 0,1% e SSC 0,5x e SDS 0,1%, a 65°C. Cada lavagem teve duração de 20 minutos, sob agitação. As membranas foram colocadas no interior de cassetes contendo intensificador e filme Kodak X-Omat AR5 (Eastman Kodak Company) durante sete dias para o *Northern blot* e quatro a oito dias para o *Southern blot*.

### **Análise da expressão diferencial por PCR em tempo real**

Cerca de 70 µg de RNA total foram tratados com DNase I livre de RNase (Qiagen, Valencia, CA, EUA) e purificadas em colunas do kit *Plant RNeasy Mini* (Qiagen). A ausência de contaminação por DNA genômico foi comprovada por PCR utilizando oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 1,5 kb de um gene semelhante a *MtN19*. A integridade do RNA após o tratamento com DNase I foi confirmada em gel desnaturante de agarose 1,2%. O cDNA foi sintetizado conforme o protocolo do kit *SuperScript™* (Invitrogen), utilizando o oligonucleotídeo oligo-dT a partir de cerca de 10 µg de RNA total. Após a síntese, a solução contendo o cDNA foi diluída para 100 ng/µl de RNA total inicial. A confirmação da síntese foi feita por meio da PCR utilizando um par de oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 62 bp no cDNA, sintetizados com base no unigene TC116117 (actina 2). Esse par de oligonucleotídeos amplifica um fragmento de cerca 900 bp no DNA genômico.

Como controles endógenos foram testados os genes codificando para actina 2, β-6-tubulina, fator de alongação 1α (EF1), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (G3PDH), ubiquitina 10 (UBQ10) e adenosil-fosforibosil transferase 1 (APT1). Os oligonucleotídeos foram desenhados com base nos unigenes correspondentes a actina 2 (TC116117), β-6-tubulina (TC123940), EF1α (SGN U143399), G3PDH (SGN U218153), UBQ10 (SGN U212679) e APT1 (TC115870).

Todos os pares de oligonucleotídeos foram desenhados utilizando o software Primers Express 2.0 (Applied Biosystems), com amplicons variando de 57 a 112 bp. As seqüências dos oligonucleotídeos estão apresentadas na Tabela 5 (ANEXO).

As reações da PCR foram efetuadas no equipamento ABI 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) utilizando SYBR<sup>®</sup> Green para detecção das fitas duplas de DNA sintetizados. O volume das reações foi de 20 µl, contendo 10 µl de 2x SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (Applied Biosystems), 200 nM de cada oligonucleotídeo e 0,75 µl da solução contendo cDNA (correspondente a 75 ng de RNA total submetido à síntese de cDNA). A mistura contendo o cDNA foi aliqüotada com o auxílio de pipeta multicanal eletrônica, assim como a solução contendo os oligonucleotídeos, a fim de minimizar os erros de pipetagem. As condições de termociclagem utilizadas consistiram de aquecimento a 50°C por dois minutos, 95°C por dez minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Os dados foram analisados conforme o método comparativo do ciclo limiar (Ct), de acordo com a equação  $(1+E_E)^{Ct_{E_{am}} - Ct_{E_{cal}}} \times (1+E_A)^{Ct_{A_{cal}} - Ct_{A_{am}}}$ , onde:  $E_E$ , eficiência de amplificação do gene endógeno;  $E_A$ , eficiência de amplificação do gene alvo;  $Ct_{E_{am}}$ , valor de Ct do gene endógeno na amostra;  $Ct_{E_{cal}}$ , valor de Ct do gene endógeno no calibrador;  $Ct_{A_{cal}}$ , valor de Ct do gene alvo no calibrador; e  $Ct_{A_{am}}$ , valor de Ct do gene alvo na amostra. Essa equação foi derivada da equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Relative Quantification getting started guide for the 7300/7500 System e User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystem), considerando as eficiências de amplificação do gene endógeno e do gene alvo diferentes. eficiência foi estimada utilizando diluições do cDNA molde e a equação  $(1+E) = 10^{(-1/slope)}$ . O controle endógeno utilizado foi a actina 2. A presença de produto de amplificação não específica foi verificada pela curva de dissociação e corrida em gel de agarose 4%. A curva de dissociação representa a relação entre temperatura e quantidade de emissão de fluorescência da reação da PCR, sendo os dados coletados no intervalo entre 60°C a 95°C. Caso ocorra a amplificação de mais de um produto, diferentes temperaturas de dissociação são detectadas.

## RESULTADOS

### Construção das bibliotecas subtrativas

Com o objetivo de identificar genes diferencialmente expressos durante a interação tomateiro-*Meloidogyne incognita* que possivelmente apresentassem função importante na patogênese ou na resistência, foram construídas três bibliotecas subtrativas utilizando a técnica SSH (Diatchenko et al., 1996). Duas bibliotecas foram enriquecidas para transcritos induzidos durante a interação incompatível, 24 e 72 horas após a inoculação (denominadas de Mol 24h e Mol 72h, respectivamente) e uma biblioteca foi enriquecida para transcritos induzidos durante a interação compatível 24 horas após a inoculação (denominada de MMI 24h). A biblioteca Mol 72h apresentou elevada redundância de clones, com apenas 19 (21%) diferentes ESTs entre os 81 clones sequenciados. Além disso, dois clones, similares aos genes que codificam para a proteína ribossomal L14 e para o fator de transcrição SHORT ROOT, representaram 50% da biblioteca (Tabela 2). Nessa biblioteca ainda foram encontrados clones com similaridade a genes que poderiam estar relacionados à resposta de defesa, como o fortalecimento de parede celular e a degradação de proteínas pela via da ubiquitina, além de genes relacionados com estresses (histona H1 e metalotioneína). Foram seqüenciados 26 clones da biblioteca MMI 24h, compreendendo 15 (54,7%) diferentes ESTs, sendo a

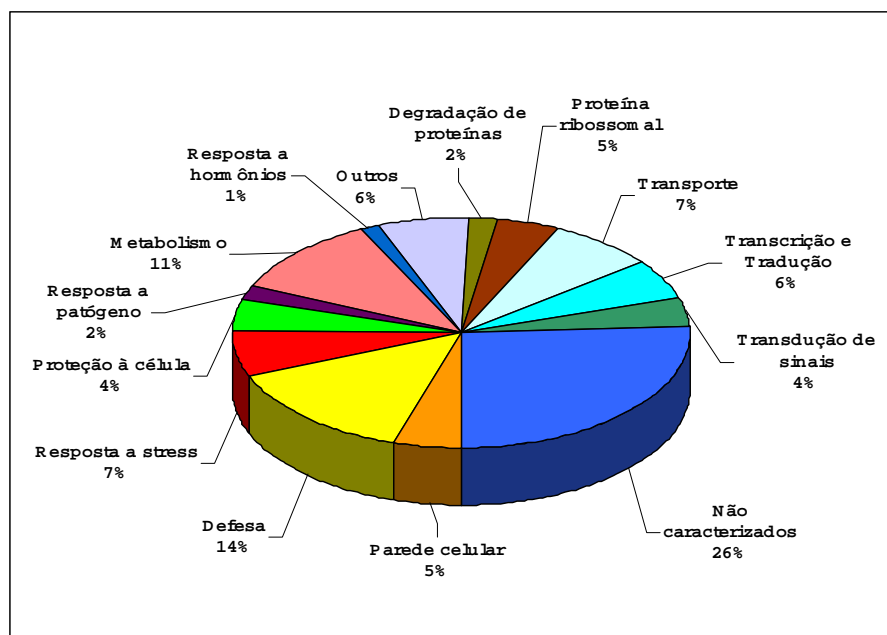
maioria (11 ESTs) similar a genes ainda não caracterizados (Tabela 3). Entre os 11 ESTs, apenas dois não estavam presentes nos bancos de dados de solanáceas. Em nenhuma das duas bibliotecas houve ESTs com similaridade a genes do patógeno. A biblioteca Mol 24h apresentou maior diversidade de clones similares a genes com possível significado biológico na interação (Tabela 4). Portanto, grande parte relatada nesse trabalho baseou-se na análise de genes dessa biblioteca e mais detalhes estão apresentados a seguir.

### **Análise de similaridade e classificação dos ESTs da biblioteca Mol 24h**

Foram obtidas 620 sequências, excluindo-se as de baixa qualidade e aquelas com similaridade a sequência do vetor (clones sem inserto), as quais foram comparadas com as sequências depositadas nos bancos de dados do NCBI, SGN e TIGR utilizando os algoritmos Blast *x* e, ou, Blast *n*. Esses ESTs representaram 306 genes potenciais únicos (49% do total). A maioria das sequências foi única (185 ESTs), 55 ESTs apresentaram duas cópias e apenas seis ESTs apresentaram mais de nove cópias. Esses últimos incluem ESTs com similaridade a genes que codificam para glutathione peroxidase PHGPx (*phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*) (*L. esculentum*) (18 cópias), a um membro da família de proteínas alergênicas PR Bet v I (*Arabidopsis thaliana*) semelhante a PR10 (18 cópias), ao transportador de malato ativado por alumínio (*Triticum aestivum*) (15 cópias), a uma proteína de função desconhecida (unigene SGN-U106564) (15 cópias), a um membro da família das defensinas de planta PDF1.4 (*A. thaliana*) (11 cópias) e à pectina metilesterase isoforma  $\alpha$  (*Vigna radiata*) (9 cópias) (Tabela 4). Entre os presentes em maior número, quatro genes estão envolvidos com proteção e resposta de defesa da célula, fornecendo evidências de que a biblioteca está enriquecida para genes induzidos durante a resposta de resistência. Foram encontrados também vários ESTs com similaridade a genes que codificam para proteínas de defesa, como uma proteína de transferência de lipídios (*lipid transfer protein*, LTP) e inibidores de protease, além de outros genes anteriormente citados como induzidos por nematóides como, por exemplo, os que codificam para fenilalanina amônia liase e quitinase (Gheysen e Fenoll,

2002). Além disso, na classificação conforme a função potencial dos ESTs, o maior grupo (26%) é representado por genes não caracterizados previamente (Figura 2), o que pode levar à descoberta de novos genes que podem estar envolvidos com a resposta de resistência. Os genes pertencentes às categorias potenciais de defesa, resposta a estresses e proteção correspondem em conjunto a 25% do total de ESTs (Figura 2).

Nenhum dos ESTs apresentou similaridade com genes de nematóides, indicando que a subtração foi eficiente, pois um dos componentes do *driver* foi cDNA de 'Moneymaker' 24 horas após a inoculação. Como essa amostra também contém cDNAs correspondentes aos transcritos do patógeno, a sua inclusão no *driver* teve por objetivo excluir tais genes durante a subtração.



**Figura 2.** Classificação dos ESTs encontrados na biblioteca subtrativa 'Motelle' 24 horas após a inoculação (Mol 24h) com *Meloidogyne incognita*, de acordo com a função biológica em potencial, com base na similaridade com seqüências de função conhecida nos bancos de dados NCBI, SGN e TIGR.

Tabela 2 – Lista dos ESTs derivados da biblioteca subtrativa da interação resistente tomateiro-*Meloidogyne incognita* 72 horas após a inoculação (Mol 72h)

Categoria	Descrição	Gene (melhor valor de similaridade)	Clone	e-value (SGN)	Unigene (SGN)	e-value (NCBI)	Macro arranjo	Frequência na biblioteca
Parede celular	Atividade hidrolase	Xiloglucana endotransglicosilase-hidrolase XTH9 [ <i>Lycopersicon esculentum</i> ]	SSH03G04	0,00E+01	SGN-U216405	3,00E-160	-	2
Metabolismo	Biossíntese de glicosinolato, atividade oxidoreductase	Oxidoreductase, família das 2OG-Fe(II) oxigenase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	SSH03B01	0,00E+01	SGN-U227804	1E-710	-	2
Degradação de proteínas	Via da ubiquitinação	Similar a ubiquitina (SMT3) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH03C08	0,00E+01	SGN-U215690	1,80E-42	-	2
Proteína ribossomal	Biogênese de ribossomos	Proteína ribossomal 60S L14 [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH03A08	0,00E+01	SGN-U213533	7,20E-61	NT	19
Transdução de sinais	Atividade cinase	Similar a receptor cinase com repetições ricas em leucina [ <i>Malus x domestica</i> ]	SSH03A01			5,00E-04	-	1
Resposta a estresse	Organização cromossômica	Histona H1, induzível por estresse [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH03C11	0,00E+01	SGN-U216158	2,60E-56	-	1
Transcrição	RNA polimerase	RNA polimerase dirigido por DNA IIa e IIb [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]	SSH03B03	0,00E+01	SGN-U215763	7,50E-67	-	1
Transcrição	Família GRAS de fatores de transcrição, especificação da endoderme	Potencial proteína SHORT-ROOT (SHR) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH03A06	0,00E+01	SGN-U257074	7,50E-78	-	22
Transporte	ATPse, exportação de hidrogênio	H <sup>+</sup> -ATPase de membrana plasmática [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH03H10	0,00E+01	SGN-U215042	0,00E+01	-	1
Transporte	Ligação a metais pesados	Proteína similar a metalotioneina tipo 2 [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH03D05	0,00E+01	SGN-U214788	5,60E-19	-	6
Desconhecido	Desconhecido	B1144G04.32 [ <i>Oryza sativa</i> (grupo japonica)]	SSH03D06	0,00E+01	SGN-U243417	5,20E-88	-	8
Desconhecido	Desconhecido	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH03E04	0,00E+01	SGN-U217624	2,80E-18	-	4
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH03A02	0,00E+01	SGN-U106411		-	2
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH03D04	3,00E-14	SGN-U262902		-	3
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH03D01	1,00E-125	SGN-U106603		-	2
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH03E12	0,00E+01	SGN-U214418		-	1
Desconhecido	Desconhecido	Potencial proteína de ligação a proteína [ <i>Solanum demissum</i> ]; família de proteínas F-box contendo repetições kelch	SSH03B12	1,00E-105	SGN-U222346	8,90E-39	-	2
Desconhecido	Desconhecido	Proteína desconhecida [ <i>Oryza sativa</i> (grupo japonica)]	SSH03B07	9,00E-04	SGN-U224760	6,20E-05	NT	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH03H02				-	1

- Não possui expressão diferencial segundo a análise de macroarranjo

NT Não analisado pelo macroarranjo

Tabela 3 – Lista dos ESTs derivados da biblioteca subtrativa da interação suscetível tomateiro-*Meloidogyne incognita* 24 horas após a inoculação (MMI 24h)

Categoria	Descrição	Gene (melhor valor de similaridade)	Clone	e-value (SGN)	Unigene (SGN)	e-value (NCBI)	Frequência na biblioteca
Metabolismo	Metabolismo de amino ácidos	Relacionado a esfingosina-1-fosfato liase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	MMI24B05	1,00E-130	SGN-U218389	3,20E-93	2
Outros	Retrotransposon	Potencial poliproteína [ <i>Oryza sativa</i> (grupo japónica)]	MMI24D01			9,00E-08	1
Outros	Retrotransposon	Potencial poliproteína, 3'-parcial [ <i>Solanum demissum</i> ]	MMI24E06	2,00E-89	SGN-U241877	6,50E-66	2
Transcrição	Controle de germinação de sementes	Proteína Dof zinc finger [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]	MMI24F05	5,00E-63	SGN-U217713	1,20E-62	2
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	MMI24F03	0,00E+01	SGN-U106439		4
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	MMI24H03	5,00E-09	SGN-U106443		1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	MMI24F01	4,00E-87	SGN-U107519		1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	MMI24D06	1,00E-123	SGN-U109078		2
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	MMI24E04	0,00E+01	SGN-U109799		2
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	MMI24F02	1,00E-106	SGN-U110049		1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	MMI24B04	1,00E-19	SGN-U111182		1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	MMI24G01	9,00E-75	SGN-U111247		4
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	MMI24G05	1,00E-141	SGN-U226595		1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	MMI24D11				1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	MMI24F12				1

Tabela 4 – Lista dos principais ESTs derivados da biblioteca subtrativa da interação resistente tomateiro-*Meloidogyne incognita* 24 horas após a inoculação (Mol 24h)

Categoria	Descrição	Gene (melhor valor de similaridade)	Clone	e-value (SGN)	Unigene (SGN)	e-value (NCBI)	Macro arranjo	Frequência na biblioteca
Resposta a hormônios	Ligação a calmodulina, resposta a etileno	Proteína ER66 [ <i>Lycopersicon esculentum</i> ]	SSH13C08	0,0E+01	SGN-U218949	5,0E-171	NT	1
Resposta a hormônios	Atividade endonuclease	Relacionada à proteína responsiva a ABA [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	SSH01F12	4,0E-78	SGN-U228779	5,5E-08	+	2
Parede celular	Biossíntese de parede celular	Família epimerase/desidratase NAD-dependente [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09C10	0,0E+01	SGN-U215234	0,0E+01	+	3
Parede celular	Atividade pectina esterase, inibidora de enzimas, molécula estrutural	Pectina metilesterase isoforma alfa [ <i>Vigna radiata</i> ]	SSH08F09	0,0E+01	SGN-U229767	2,0E-56	+	9
Parede celular	Constituinte estrutural da parede celular, ligação a ácidos nucleicos	Proteína com domínio KH [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH08A11	0,0E+01	SGN-U214833	2,9E-46	+	1
Proteção à célula	Protege células e enzimas dos danos oxidativos	Provável fosfolipídio hidroperóxido glutationa peroxidase (PHGPx) [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH08G09	1,0E-115	SGN-U214733	1,8E-93	+	18
Proteção à célula	Resposta a estresse oxidativo	Potencial peroxidase ATP2a [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH11H10	1,0E-149	SGN-U212850	1,0E-132	+	5
Defesa	Proteína antifúngica	Membro da família de defensinas de plantas (PDF1.4) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09D04	1,0E-169	SGN-U226552	5,8E-18	+	11
Defesa	Atividade de defesa / imunidade	Proteína relacionada com resposta de resistência a doenças [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH11H11	1,0E-173	SGN-U264335	2,4E-32	+	1
Defesa	Induzido por ferimentos, elicitores e anaerobiose	Álcool desidrogenase [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	SSH10C04	6,0E-12	SGN-U244128	0,0E+01	+	2
Defesa	Transferência de lipídios, atividade antipatogênica	Proteína de transferência de lipídios 2 [ <i>Lycopersicon pennellii</i> ]	SSH08G11	1,0E-162	SGN-U212736	2,2E-56	+	6
Defesa	Inibe uma endoglucanase fúngica xiloglucana-específica	Inibidor de endoglucanase fúngica xiloglucana-específica [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH13D10	1,0E-110	SGN-U245583	2,5E-89	NT	3
Defesa	Proteína de transferência de lipídios / reserva de sementes / inibidor de tripsina-alfa amilase	Proteína rica em prolina (EIG-I30) [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]	SSH01C10	1,0E-174	SGN-U213369	1,3E-34	+	2
Defesa	Biossíntese e degradação de lignina, suberização, resposta a ferimentos, patógenos e estresse oxidativo	Precursor da peroxidase 10 (Atperox P10) (ATP5a) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09A10			9,0E-38	+	1
Defesa	Proteína de resistência	Potencial proteína de resistência a <i>Phytophthora infestans</i> [ <i>S. demissum</i> ]	SSH01D07			4,0E-27	-	1
Defesa	Resposta a patógenos, ligação a proteínas; sinalização	Proteína 14-3-3 (TFT2) [ <i>S. tuberosum</i> ]	SSH08A07	1,0E-140	SGN-U243697	6,0E-134	+	1
Defesa	Resposta a patógenos; síndrome da alergia oral	Proteína relacionada a patogênese família alérgica Bet v I (PR10) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH08C05	6,0E-46	SGN-U224456	3,2E-76	+	18

Categoria	Descrição	Gene (melhor valor de similaridade)	Clone	e-value (SGN)	Unigene (SGN)	e-value (NCBI)	Macro arranjo	Frequência na biblioteca
Defesa	Resposta a estresse e a patógenos	Proteína induzida por ferimentos (Sn-1) [ <i>Capsicum annuum</i> ]	SSH11F12	2,0E-43	SGN-U216965	1,2E-53	+	3
Defesa	Resistência Sistêmica Adquirida (SAR)	Proteína relacionada à SAR (SRE1a) [ <i>S. tuberosum</i> ]	SSH10F12	8,0E-28	SGN-U212951	9,5E-14	+	1
Defesa, metabolismo	Metabolismo de fenilpropanóides, resposta a UV, fungos patogênicos e ferimentos	4-cumarato-CoA ligase 2 (4CL 2) [ <i>N. tabacum</i> ]	SSH01B12	0,0E+01	SGN-U217714	4,0E-145	+	4
Defesa, transdução de sinais	Induzido por patógenos	Proteína cinase ativada por mitógenos 4 (MAPK4) [ <i>Petroselinum crispum</i> ]	SSH13D04	0,0E+01	SGN-U213820	0,0E+01	NT	1
Defesa, resposta a estresse	Biossíntese de fenilpropanóides; resposta a ferimentos; defesa	Fenilalanina amônia-liase (PAL2) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09H04	1,0E-157	SGN-U230487	1,3E-30	+	1
Metabolismo	Metabolismo de fenilpropanóides	NADPH-citocromo P450 oxidoreductase [ <i>N. tabacum</i> ]	SSH08E05	0,0E+01	SGN-U214783	0,0E+01	+	1
Metabolismo	Metabolismo de sacarose	Sacarose sintase [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH02D04	2,0E-32	SGN-U232319	3,2E-65	+	1
Metabolismo	Metabolismo de sacarose	Invertase ácida vacuolar [ <i>Beta vulgaris</i> ]	SSH08D09	1,0E-134	SGN-U255547	3,1E-70	+	2
Formação de nódulos	Nodulina, induzido durante a nodulação	Potencial MtN19 [ <i>Oryza sativa</i> (grupo japonesa)]	SSH08D08	0,0E+01	SGN-U215088	2,0E-135	+	4
Outros	Ligação a ATP	Proteína envolvida no transporte de K <sup>+</sup> [ <i>Musa acuminata</i> ]	SSH08C12	0,0E+01	SGN-U266906	2,8E-77	+	1
Degradação de proteínas	Ubiquitinação	Subunidade beta B do proteossoma 20S (PBB1) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH08F07	1,0E-133	SGN-U216307	9,0E-134	+	1
Degradação de proteínas	Ubiquitinação	Proteína HAC13 [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09B01	9,0E-68	SGN-U248834	2,0E-11	+	3
Degradação de proteínas	Ubiquitinação	Potencial enzima ubiquitina-conjugante [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH10C02	1,0E-18	SGN-U260342	3,0E-16	+	1
Degradação de proteínas	Ubiquitinação	Relacionada à família de proteínas F-box [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01E05	1,0E-77	SGN-U253237	3,3E-134	+	2
Proteína ribossomal, induzido por estresse	Biossíntese de proteínas	Potencial proteína ribossomal [ <i>Capsicum annuum</i> ]	SSH01C03	1,0E-150	SGN-U213584	2,6E-72	+	3
Transdução de sinais	Sinalização mediada por auxinas; enzima ativadora semelhante a ubiquitina	Potencial produto do gene auxin-resistance [ <i>S. demissum</i> ]	SSH09A04	0,0E+01	SGN-U220723	4,0E-175	+	1
Transdução de sinais	Atividade cinase	Potencial proteína cinase transmembrana contendo repetições ricas em leucina [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH08G02			3,0E-80	+	3
Transdução de sinais	Atividade cinase	Proteína cinase específica serina/treonina (NPK15) [ <i>N. tabacum</i> ]	SSH09C12	0,0E+01	SGN-U249367	1,0E-169	+	1
Transdução de sinais, metabolismo	Transdução de sinais, biossíntese de fosfolípidios	Similar a fosfolipase C [ <i>A. thaliana</i> ]; Ki1 [ <i>Beta vulgaris</i> ] 4.2e-20	SSH10H09	0,0E+01	SGN-U228573	1,1E-24	+	2
Resposta a estresse	Desconhecido	Proteína hipotética [ <i>N. tabacum</i> ]; proteína de resistência a doenças (classe CC-NBS-LRR) 2.5e-05	SSH08G08	4,0E-44	SGN-U222626	1,2E-27	+	1

Categoria	Descrição	Gene (melhor valor de similaridade)	Clone	e-value (SGN)	Unigene (SGN)	e-value (NCBI)	Macro arranjo	Frequência na biblioteca
Resposta a estresse, metabolismo	Beta oxidação de ácidos graxos, biossíntese de ácido jasmônico, resposta a ferimentos	Acetil-CoA C-aciltransferase (3-cetoacil-CoA tiolase) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH08F04	0,0E+01	SGN-U213000	0,0E+01	+	3
Resposta a estresse, transdução de sinais	Metabolismo, fosforilação de amino ácidos	Proteína cinase dependente de cálcio 3 [ <i>C. annuum</i> ]	SSH11C07	0,0E+01	SGN-U215947	0,0E+01	+	2
Resposta a estresse, transdução de sinais, transporte	Transporte de íons, transdução de sinais, tráfego e fusão de vesículas; ligação a fosfolipídeos cálcio-dependente	Anexina p34 [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH11G03	2,0E-84	SGN-U214256	3,0E-175	+	1
Transcrição	Regulação negativa das vias de sinalização mediada pelo etileno	Fator de ligação ao elemento responsivo a etileno [ <i>N. tabacum</i> ]	SSH10D11	0,0E+01	SGN-U213917	1,9E-50	+	1
Transcrição	Atividade hidrolase fosfórico diéster e fator de transcrição	Família de proteínas tubby contendo F-box [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01B11	0,0E+01	SGN-U230089	1,4E-38	+	1
Transcrição	Regulação da transcrição	Regulador transcricional bHLH [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH13G07	0,0E+01	SGN-U224431	2,0E-150	NT	1
Transcrição	Fator de transcrição	MybSt1 [ <i>S. tuberosum</i> ]	SSH11D07	0,0E+01	SGN-U215724	0,0E+01	+	1
Transcrição	Fator de transcrição	Fator de transcrição Myb1 [ <i>Malus xiaojinensis</i> ]	SSH09G01	1,0E-168	SGN-U212596	1,8E-57	+	2
Tradução	Iniciação da tradução	Relacionado ao fator de iniciação de tradução eIF-1A [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09E10	0,0E+01	SGN-U214495	4,2E-54	+	1
Tradução	Elongação durante a tradução	Potencial fator de elongação 1-alfa (EF-1-alfa) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09H10	1,0E-150	SGN-U267913	2,7E-45	+	1
Tradução, transdução de sinais	Ligação a RNA, transdução de sinais, iniciador de tradução	Proteína expressa similar a LIGATINA [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01B04	0,0E+01	SGN-U217581	1,0E-117	-	4
Transporte	Transporte de elétrons	Potencial proteína de membrana que se liga a esteróides [ <i>O. sativa</i> (grupo japonica)]	SSH08A05	0,0E+01	SGN-U214215	6,5E-77	+	1
Transporte	Transportador de malato	Transportador de malato ativado por alumínio [ <i>Triticum aestivum</i> ]	SSH09C02	1,0E-76	SGN-U228497	1,1E-31	+	15
Transporte	Transporte de oligopeptídeos	Similar à proteína de transporte de peptídeos [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01E06	0,0E+01	SGN-U249292	2,0E-118	+	3
Transporte	Canais de água	Família Major intrinsic protein (MIP) [ <i>A. thaliana</i> ]; similar a nodulina-26	SSH01B10	0,0E+01	SGN-U217531	2,0E-125	+	1
Transporte	Canais de água	Potencial gamma TIP [ <i>Nicotiana glauca</i> ]; Rb7, aquaporina 5	SSH01G09	0,0E+01	SGN-U213272	3,0E-129	-	1
Desconhecido	Desconhecido	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH10G01	0,0E+01	SGN-U220446	2,0E-125	+	8
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH08B01	0,0E+01	SGN-U106564		+	15
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH08F06	0,0E+01	SGN-U225968		+	6

+ Possui expressão diferencial segundo a análise de macroarranjo

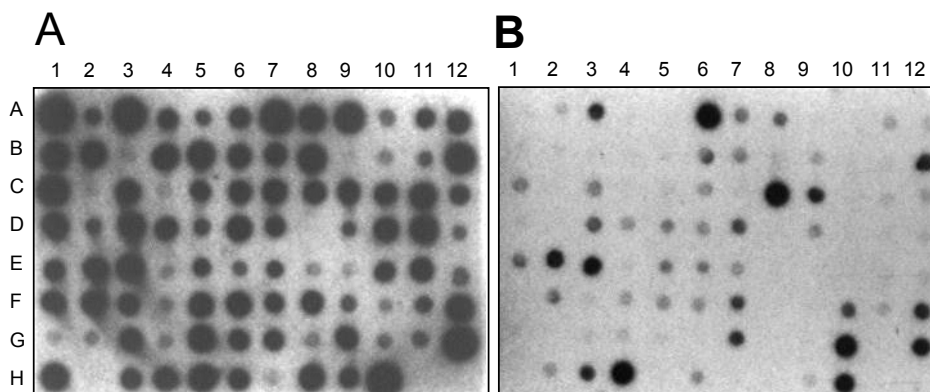
- Não possui expressão diferencial segundo a análise de macroarranjo

NT Não analisado pelo macroarranjo

### Validação das bibliotecas subtrativas Mol 24h e Mol 72h

Os clones com expressão aumentada foram identificados pela diferença na intensidade de sinal detectada nos *dots* das membranas (macroarranjo) hibridizadas com as sondas *forward* e *reverse* subtraídas (Figura 3). Foram confirmados 126 clones não redundantes diferencialmente expressos entre os 339 clones submetidos ao macroarranjo (representando 37,5% do total e 43% dos clones não redundantes). Os 339 clones representaram 290 e 17 clones não redundantes das bibliotecas Mol 24h e Mol 72h, respectivamente [Tabelas 2, 4 e 6 (ANEXO)].

Todos os clones com expressão diferencial foram da biblioteca Mol 24h. Não houve sinal nas membranas hibridizadas com as sondas não subtraídas, provavelmente devido ao reduzido tempo de exposição ou a quantidade insuficiente de sonda adicionada. Esses resultados indicam que a biblioteca Mol 24h é enriquecida de genes com expressão aumentada com representatividade de cerca de 43% e que os genes da biblioteca Mol 72h possivelmente não apresentam indução 24 horas após a inoculação.



**Figura 3.** Validação das bibliotecas Mol 24h e Mol 72h por meio de macroarranjo. O DNA depositado nas membranas de náilon consistiu de dois microlitros da solução contendo reação de PCR utilizando os plasmídeos recombinantes como molde e amplificados com os oligonucleotídeos *PCR Primer 1* e *2R* adicionado de igual volume de NaOH 0,6N. As membranas foram hibridizadas com as sondas originadas da população de cDNAs subtraídos *forward* (A) e *reverse* (B) da biblioteca Mol 24h. Nesse exemplo, a maioria dos cDNAs foi considerada como diferencialmente expresso, baseado no sinal de hibridização mais forte com a sonda *forward* e mais fraca com a sonda *reverse*. Os *dots* H11 e H12 correspondem a controles negativos (fragmentos de cDNA provenientes de mRNAs de genes de humanos, fornecidos pelo kit *PCR-Select Differential Screening* - Clontech).

### Análise da expressão diferencial por *Northern blot*

Essa análise foi realizada para fins de verificar a cinética de expressão de genes relacionados a clones selecionados que foram diferencialmente expressos segundo o resultado do macroarranjo.

Entre os clones submetidos ao *Northern blot*, SSH09A10 (similar ao gene que codifica para peroxidase 10), SSH08D08 (similar ao gene que codifica para nodulina MtN19), SSH10H09 (semelhante a *Ki1*) e SSH09D04 (similar ao gene que codifica para defensina) apresentaram níveis de expressão suficientes para serem detectados por essa análise, com os transcritos possuindo aproximadamente 1,2 kb, 2,5 kb, (Figura 4A e 4B, respectivamente) 1,8 kb e 0,5 kb (dados não mostrados), respectivamente. A expressão diferencial não foi evidente para nenhum dos quatro clones.

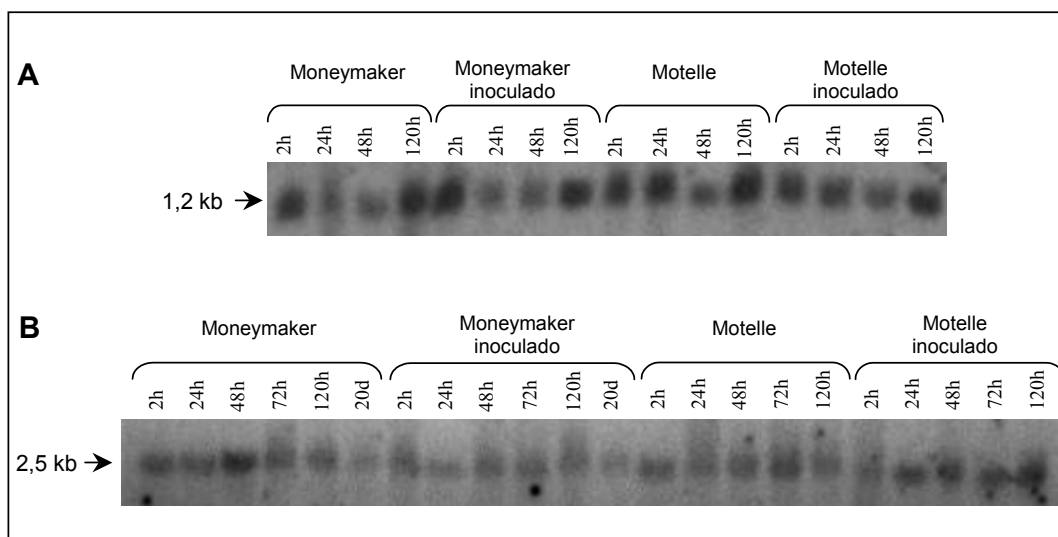


Figura 4. Análise de *Northern blot* para verificar a cinética da expressão de genes encontrados na biblioteca subtrativa Mol 24h em material suscetível (*Lycopersicon esculentum* 'Money maker') e resistente (*L. esculentum* 'Motelle') inoculados e não inoculados com *Meloidogyne incognita*. Foram utilizados 15 µg do RNA total para cada material. Os tempos indicados correspondem aos tempos decorridos da inoculação à coleta dos respectivos materiais. (A) Membrana hibridizada com o inserto do clone SSH09A10 (similar ao gene que codifica para peroxidase 10). (B) Membrana hibridizada com o inserto do clone SSH08D08 (similar ao gene que codifica para nodulina MtN19).

Os transcritos correspondentes aos clones SSH01D07 (semelhante a *Sw5/Prf*), SSH08C05 (semelhante a *PR10*), SSH08G08 (semelhante a *Bs2*), SSH11C07 (similar ao gene que codifica para uma cinase dependente de cálcio), SSH09H04 (similar ao gene que codifica para fenilalanina amônia liase

2) e SSH10F12 (similar ao gene envolvido com a resistência sistêmica adquirida) não puderam ser detectados por essa análise. Devido aos resultados pouco promissores, não foram realizadas hibridizações com um controle endógeno.

### **Análise da expressão diferencial por PCR em tempo real**

Com exceção dos clones SSH01D07 (similar a *Sw5* e *Prf*) e SSH01D12 (similar ao gene que codifica para ligatina), todos os outros analisados quanto à cinética de expressão, utilizando PCR quantitativa, haviam sido classificados como diferencialmente expressos segundo o resultado do macroarranjo.

Inicialmente realizou-se uma comparação entre seis diferentes genes comumente utilizados como controles, que codificam para: actina 2,  $\beta$ -6-tubulina, fator de alongação 1 $\alpha$  (EF1), G3PDH, ubiquitina 10 (UBQ10) e adenosil-fosforibosil transferase 1 (APT1). Os ESTs similares a *EF1- $\alpha$*  encontrados na biblioteca são relacionados a unigenes distintos daquele utilizado para o controle da PCR quantitativa.

Para a escolha do controle endógeno foram realizados os procedimentos de quantificação relativa. As comparações foram feitas considerando sempre um dos genes como controle endógeno, e o cDNA de 'Motelle' 2 horas após a inoculação como calibrador. Qualquer gene com expressão igual ao endógeno nessa comparação foi considerado do mesmo grupo. Os outros cDNAs testados foram provenientes de mRNAs de raízes de 'Moneymaker' não inoculado e 30 dias após a inoculação, 'Motelle' 2 horas, 48 horas e 7 dias após a inoculação. Foram detectados grupos de genes que apresentaram padrão de expressão distinto (EF1  $\approx$  APT1  $\approx$  UBQ10, actina 2  $\approx$  G3PDH, tubulina 6) nos cDNAs. Como é pouco provável que a expressão de grupos de genes constitutivos seja induzida ou reprimida da mesma forma, pares de oligonucleotídeos que apresentaram maior eficiência de amplificação (E), ausência de produtos de amplificação não específica e que pertenceram a grupos de expressão com dois e três genes foram selecionados, sendo esses os oligonucleotídeos que amplificam *APT1*, com E = 89% e R<sup>2</sup> = 0,99 e o gene que codifica para actina 2, com E = 95% e R<sup>2</sup> = 0,99. Posteriormente esse

último gene que foi adotado como controle único pelo fato da expressão de *APT1* ser muito semelhante.

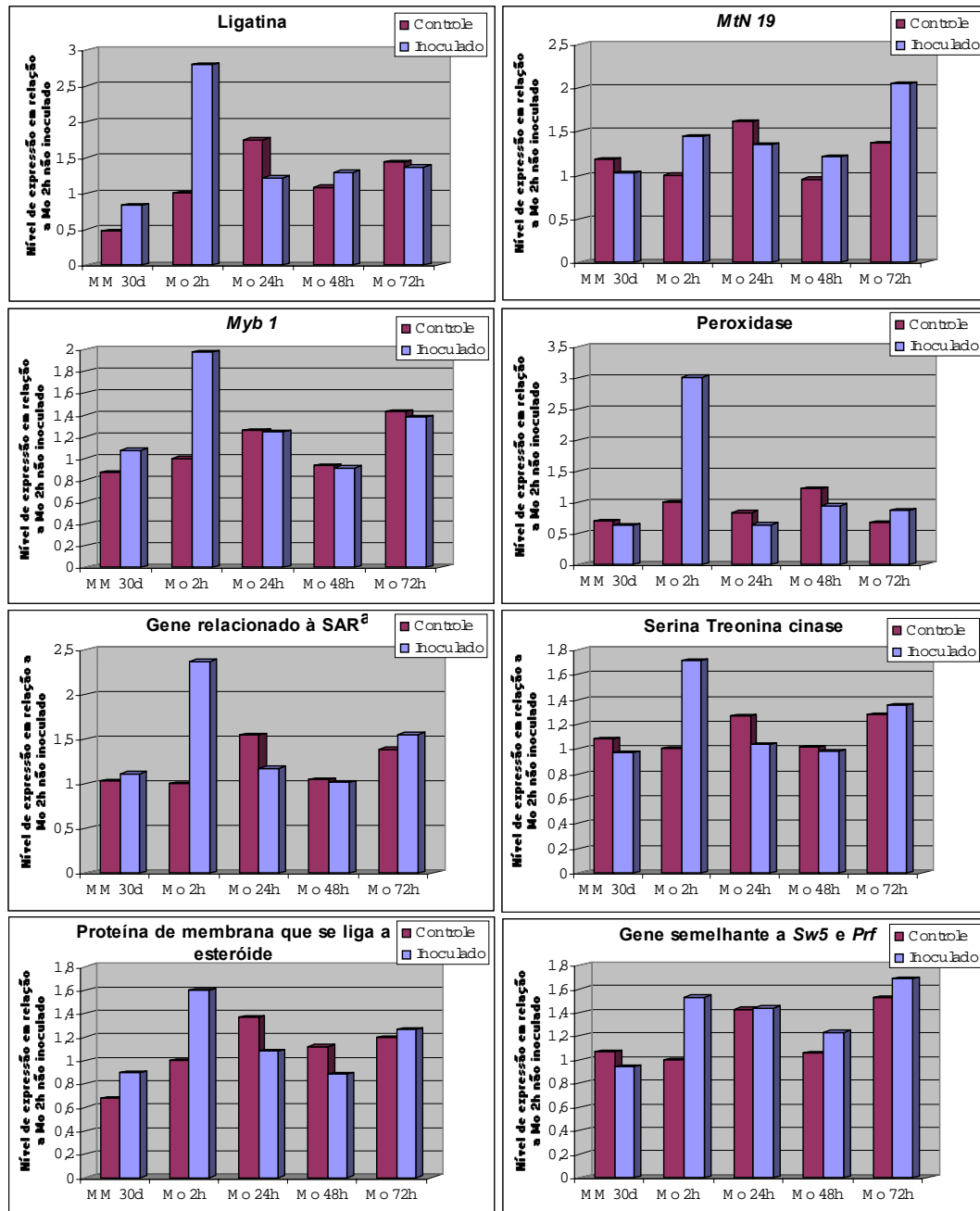
Todos os pares de oligonucleotídeos testados apresentaram fragmento único sob as condições de amplificação utilizadas, com exceção dos correspondentes a *EF1 $\alpha$* , conforme a curva de dissociação.

O calibrador para as comparações foi 'Motelle' 24 horas após a inoculação. Considerando a correção feita para diferentes eficiências de amplificação, houve uma tendência de alguns genes (genes semelhantes à *Sw-5/Prf*, *MtN19*, *Myb1*, gene relacionado à resistência sistêmica adquirida, genes que codificam uma proteína de membrana que se liga a esteróide, uma cinase serina treonina, peroxidase e ligatina) apresentarem indução 2 horas após a inoculação na planta resistente (Figura 5), correspondendo a 38% dos genes testados. O nível máximo de expressão foi cerca de três vezes mais do que o calibrador.

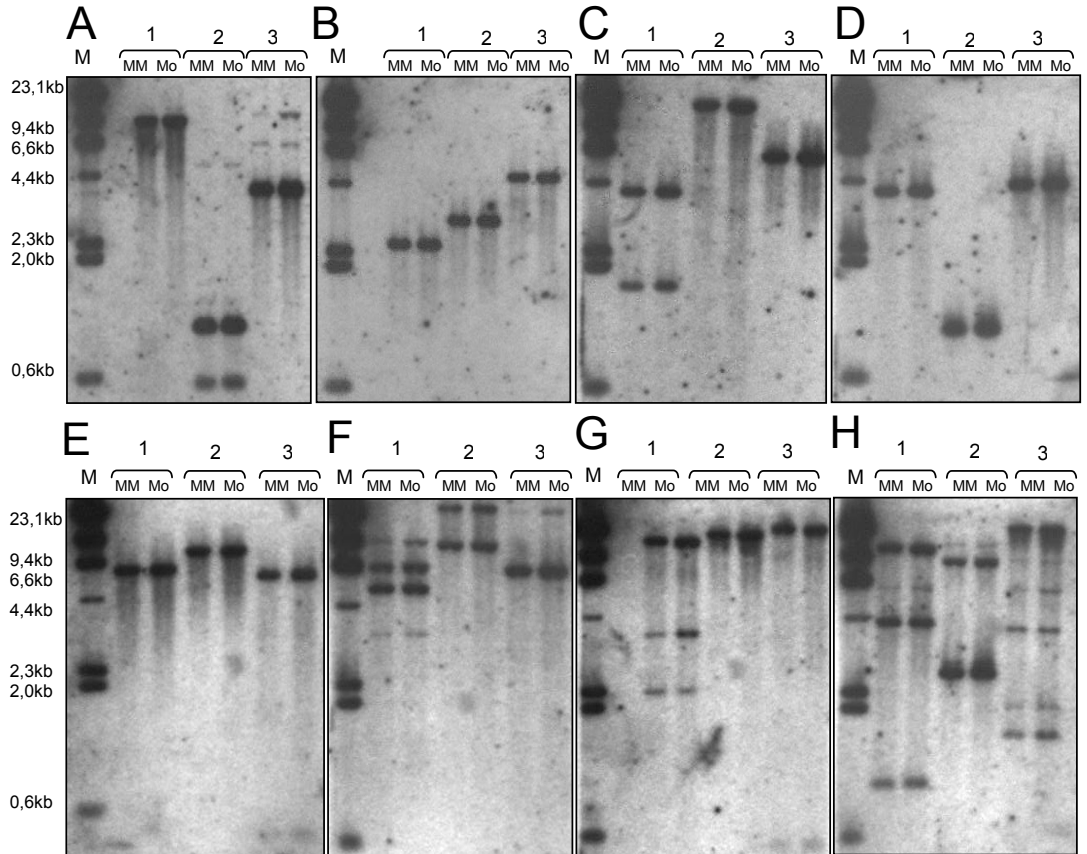
### **Número de cópias no genoma de oito genes encontrados na biblioteca Mol 24h**

A determinação do possível número de cópias no genoma foi efetuada para os genes correspondentes aos clones SSH08D08 (similar a *MtN19*), SSH11C07 (similar a um gene que codifica para uma cinase dependente de cálcio), SSH10F12 (gene envolvido com a resistência sistêmica adquirida), SSH10H09 (semelhante a *Ki1*), SSH09D04 (similar ao gene que codifica para defensina), SSH11D07 (codifica para um fator de transcrição semelhante a D13F MYB ST1), SSH09G01 (codifica para um fator de transcrição semelhante a *Myb1*) e SSH11H11 (gene relacionado à resposta de resistência).

Os genes semelhantes a *MtN19*, *D13F MYB ST1* e que codifica para uma cinase dependente de cálcio parecem apresentar mais de uma cópia no genoma porque as sondas destes hibridizaram com diferentes fragmentos do DNA genômico de tomateiro digerido com diferentes enzimas de restrição, evidenciado pela presença de várias bandas (Figura 6).



**Figura 5.** Análise da cinética de expressão de genes correspondentes a cDNAs presentes na biblioteca subtrativa 'Motelle' 24 horas pós-inoculação (h.p.i.) (Mol 24h) com *Meloidogyne incognita* utilizando PCR quantitativa. O eixo x representa o cDNA oriundo de mRNA de raízes de tomateiro suscetível 'Moneymaker' (MM) 30 dias pós-inoculação, tomateiro resistente 'Motelle' (Mo) 2, 24, 48 e 72 h.p.i., com os respectivos controles. A quantificação relativa foi calculada utilizando a equação  $(1+E_E)^{Ct_{E_{am}} - Ct_{E_{cal}}} \times (1+E_A)^{Ct_{A_{cal}} - Ct_{A_{am}}}$ , onde:  $E_E$ , eficiência de amplificação do gene endógeno;  $E_A$ , eficiência de amplificação do gene alvo;  $Ct_{E_{am}}$ , valor de Ct do gene endógeno na amostra;  $Ct_{E_{cal}}$ , valor de Ct do gene endógeno no calibrador;  $Ct_{A_{cal}}$ , valor de Ct do gene alvo no calibrador; e  $Ct_{A_{am}}$ , valor de Ct do gene alvo na amostra. A eficiência de amplificação foi estimada utilizando diluições do cDNA molde e a equação  $(1+E) = 10^{(-1/slope)}$ . O controle endógeno foi a Actina 2. O calibrador foi Mo 2h não inoculado. <sup>a</sup> Resistência Sistêmica Adquirida.



**Figura 6.** Análise de *Southern blot* para determinação de número de cópias no genoma de oito genes encontrados na biblioteca subtrativa 'Motelle' 24 horas após a inoculação com *Meloidogyne incognita*. Quinze microgramas de DNA genômico de tomateiros 'Motelle' (Mo) e 'Moneymaker' (MM) foi digerido com *EcoRI* (1), *EcoRV* (2) e *XbaI* (3) e utilizados para o *Southern blot*. As sondas consistiram de produtos de PCR dos clones SSH08D08 (similar a *MtN19*) (A), SSH10F12 (similar a gene relacionado à resistência sistêmica adquirida) (B), SSH11H11 (similar a gene relacionado à resposta de resistência) (C), SSH09G01 (similar a *Myb1*) (D), SSH09D04 (similar a gene que codifica para defensina) (E), SSH11D07 (*D13F MYB ST1*) (F), SSH10H09 (similar a *Ki1*) (G) e SSH11C07 (similar a um gene que codifica para uma cinase dependente de cálcio) (H), amplificados com os oligonucleotídeos *PCR Primer 1* e *2R* marcados com  $P^{32}$ . M – marcador  $\lambda$  digerido com *HindIII*.

Os clones semelhantes a *Myb1*, gene relacionado à resposta de resistência, gene envolvido com a resistência sistêmica adquirida, similar a *Ki1* e ao que codifica para defensina parecem estar presentes em cópia única no genoma porque as sondas destes hibridizaram com fragmento único do DNA genômico de tomateiro digerido com diferentes enzimas de restrição, evidenciado pela presença de uma ou de bandas adicionais (Figura 6). Nesse caso, as bandas adicionais foram detectadas porque há sítios de restrição para

as enzimas utilizadas na digestão em alguns fragmentos que originaram as sondas. Não houve polimorfismo entre plantas resistentes e suscetíveis nas regiões genômicas onde todos os oito genes estão localizados, pois todos os fragmentos em que as sondas hibridizaram foram iguais para ambos (Figura 6), indicando que nenhum desses genes está localizado na região genômica introgridida de *L. peruvianum* juntamente com o gene *Mi-1* (Messeguer et al., 1991).

## DISCUSSÃO

O presente trabalho objetivou clonar e caracterizar parcialmente genes induzidos na interação tomateiro-*Meloidogyne incognita*. Foram construídas três bibliotecas subtrativas por meio da técnica SSH, sendo MMI 24h a biblioteca enriquecida para genes induzidos 24 horas pós-inoculação (h.p.i.) no cultivar suscetível, Mol 24h e Mol 72h enriquecidas para genes induzidos 24 h.p.i. e 72 h.p.i. no cultivar resistente, respectivamente. MMI 24h e Mol 72h apresentaram grande número de ESTs similares a genes ainda não caracterizados e elevada redundância. As análises se concentraram na biblioteca Mol 24h porque apresentou grande variedade de cDNAs, das quais 31% têm relação com resposta de resistência, resposta a patógenos, proteção à célula, sinalização celular ou a estresse abiótico.

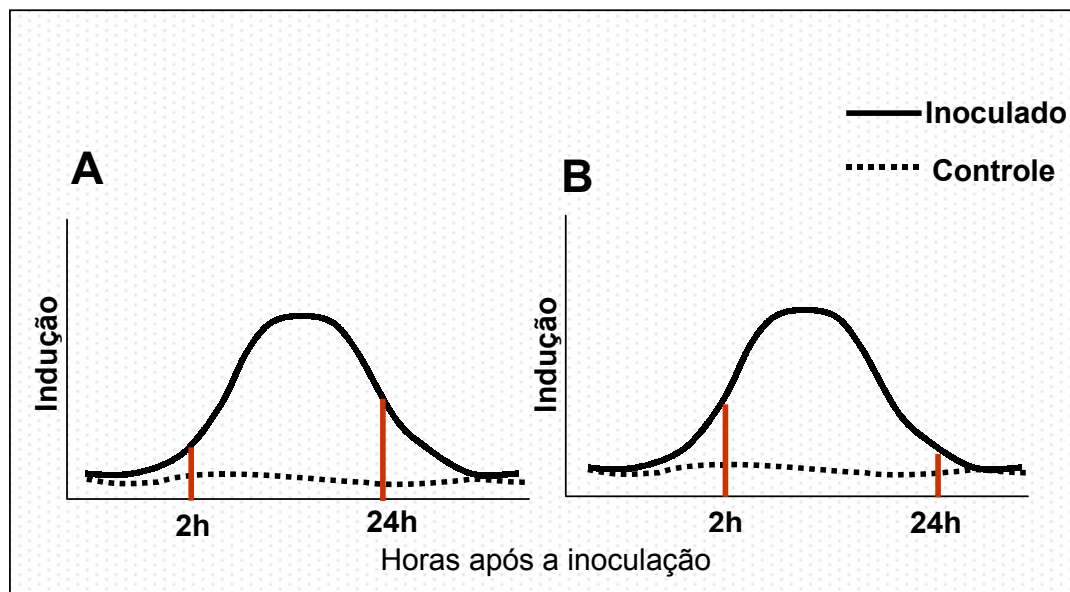
A confirmação da expressão diferencial foi realizada por meio de análises de macroarranjo de cDNAs, *Northern blot* e PCR quantitativa. Os resultados da análise de macroarranjo indicaram que cerca de 43% dos clones da biblioteca Mol 24h correspondem a genes com expressão induzida e que os genes da biblioteca Mol 72h possivelmente não apresentam indução 24 horas após a inoculação. A análise de macroarranjo identifica, entre os cDNAs clonados, os que apresentam expressão diferencial na própria população de cDNAs utilizada para a construção da biblioteca. Isso pode produzir resultado tendencioso porque as sondas consistiram do mesmo material. Para eliminar

esse problema e para fornecer informações sobre a cinética da expressão gênica, foi realizada a análise de *Northern blot*, utilizando material proveniente de experimento independente. No entanto, esse procedimento não permitiu detectar diferenças nos níveis de expressão entre as amostras, além disso, seis entre os dez genes analisados não apresentaram níveis de expressão suficientes para serem detectados nas condições utilizadas. Para quatro genes foi possível verificar o tamanho aproximado dos transcritos e que estes não apresentam formas alternativas de *splicing*. Em vista desses resultados, a análise da cinética de expressão foi prosseguida utilizando PCR quantitativa.

Entre os genes avaliados por PCR quantitativa, alguns apresentaram tendência a serem expressos em maior quantidade no material suscetível inoculado do que no não inoculado, 30 dias após a inoculação, incluindo os similares a *D13F MYB ST1*, *Myb1*, gene relacionado com a resposta de resistência, e os similares aos que codificam para cinase dependente de cálcio, defensina e ligatina. Possivelmente o aumento de expressão é parte de uma tentativa de resposta tardia, porém inefetiva, à presença do nematóide no tecido radicular. Para a maioria dos genes testados, os níveis de expressão nas plantas suscetíveis foram iguais ou menores do que nas plantas resistentes, tanto inoculadas quanto não inoculadas, sugerindo que esses genes realmente possuem relação com a resistência.

De acordo com os resultados da PCR quantitativa para o material resistente, a tendência de indução foi verificada nas amostras coletadas duas horas após a inoculação. No entanto, o material para a construção da biblioteca foi coletado 24 h.p.i.. Essa contradição aparente pode ser devida à maneira de armazenamento do inóculo até o momento da inoculação. Para a construção da biblioteca, o inóculo foi mantido a 4°C, o que pode diminuir a atividade dos nematóides, acarretando um período de tempo até a aclimação. Para os experimentos de cinética o inóculo foi mantido em borbulhamento à temperatura ambiente, o que mantém os juvenis ativos. Possivelmente a indução dos genes foi mais rápida pela infecção precoce no material utilizado para a cinética (Figura 7B) em relação ao utilizado para a construção da biblioteca (Figura 7A). Apesar da HR ser visualizada melhor oito a nove horas após a inoculação, em seis horas já pode ser detectada (Dropkin, 1969b), indicando que é possível que a ativação da expressão gênica devido ao

reconhecimento do patógeno pelo *Mi-1* ocorra antes desse intervalo de tempo. Os maiores níveis de indução poderiam estar ocorrendo antes de 24 h.p.i. e não foram detectados devido ao intervalo muito longo entre as coletas. É possível também que a indução verificada duas horas após a inoculação seja decorrente da injúria causada pela penetração do patógeno, não apenas mecânica, mas possivelmente facilitada com a ação de enzimas degradadoras de parede celular, secretadas pelo patógeno, como celulase e poligalacturonase (Williamson e Gleason, 2003). Deve ser considerado que muitos genes encontrados na biblioteca participam da rota do ácido jasmônico, e que respostas à injúria mecânica e a insetos são mediados por essa rota (Dong, 1998). Portanto, esses genes podem estar sendo ativados pelo processo de penetração do patógeno e posteriormente podem ter os níveis de expressão potenciados pelo reconhecimento do elicitor pela proteína *Mi-1*.



**Figura 7.** Modelo de cinética de expressão dos genes induzidos por *Meloidogyne incognita* em tomates contendo o gene *Mi-1*. (A) Cinética de expressão quando o inóculo foi mantido a 4°C antes da inoculação. (B) Cinética de indução quando o inóculo foi mantido em borbulhamento de ar em água à temperatura ambiente antes da inoculação.

As diferenças de expressão entre o controle e o material inoculado observadas pela PCR quantitativa não foram muito significativas. Como a infecção por nematóides afeta um pequeno número de células, o material

coletado deve ser direcionado ao sítio de infecção, pois a coleta de todo o tecido radicular promove a “diluição” dos transcritos com expressão aumentada. Alguns trabalhos envolvendo verificação de expressão diferencial utilizam metodologias que permitem a verificação do aumento da expressão gênica no sítio em que o patógeno está localizado, como a utilização de construções contendo genes repórteres fusionados a um promotor induzível pelo patógeno ou a hibridização *in situ* (de Almeida Engler et al., 1999, Brenner et al., 1998, Bertoli et al., 1999, Niebel et al., 1993). Em estudos futuros, o intervalo de coleta deve ser diminuído, pois a partir de 24 h.p.i. não foi mais possível verificar diferenças conclusivas na indução da expressão gênica, pelo menos para os genes cuja expressão foi analisada pela PCR quantitativa. A ausência de grande quantidade de genes induzidos na biblioteca Mol 72h também é uma evidência da ativação mais precoce dos genes envolvidos durante a interação entre *Mi-1* e *M. incognita*.

Por fim, a presença de muitas galhas visualizada 30 dias após a inoculação no material suscetível indica que a não confirmação da expressão diferencial não se deve a problemas de inoculação. Não foram detectadas galhas no material resistente após esse mesmo período, demonstrando a eficácia da resistência nas condições em que as plantas foram mantidas após a inoculação.

Embora os estudos de expressão não tenham confirmado a expressão diferencial dos genes clonados, pelos motivos anteriormente apontados, a presença de vários genes relatados anteriormente como envolvidos com respostas de plantas a nematóides, de vários genes relacionados com resposta de defesa a outros fitopatógenos e também a ausência de ESTs similares a genes do patógeno na biblioteca Mol 24h, sugerem fortemente que ela é enriquecida para genes diferencialmente expressos na interação.

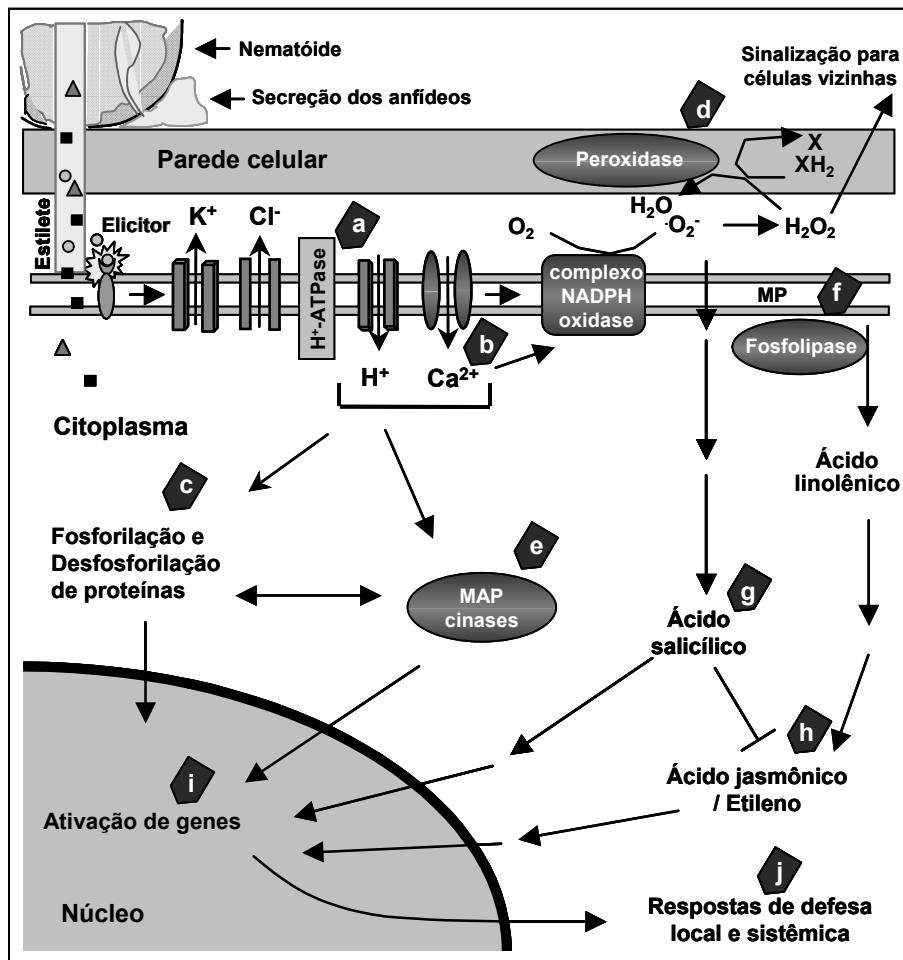
A estrutura da proteína *Mi-1*, que apresenta os domínios NBS e LRR, sugere o seu envolvimento em uma cadeia de transdução de sinais que resulta em HR e culmina na resistência (Milligan et al., 1998). Genes de resistência (gene *R*) do tipo NBS-LRR parecem depender de proteínas cinases na cadeia de transdução de sinais. *Xa21* é um gene *R* que codifica uma proteína que possui domínios LRR e cinase (Song et al., 1995), indicando a dependência de uma via de sinalização envolvendo ativação de proteínas por cinases. O gene

de resistência *Pto*, que codifica para uma proteína serina/treonina cinase, é dependente de *Prf*, semelhante a um gene *R* contendo NBS e LRR (Martin et al., 1993; Salmeron et al., 1996). *Pti1* é uma proteína serina/treonina cinase autofosforilada e fosforilada por *Pto* e, além disso, a superexpressão de *Pti1* em plantas transgênicas de tabaco acelera a elicitação de HR (Zhou et al., 1995). Condizente com esses dados, nesta biblioteca foram encontrados 25 ESTs semelhantes a genes que codificam para cinases, representando 17 genes diferentes, distribuídos em várias categorias, e a etapa da participação dessas cinase na resposta de defesa é ilustrada na Figura 8.

Interessantemente, o clone SSH11E08 é similar ao gene que codifica para o receptor cinase 2 (*Glycine max*), mas também é similar a *CLAVATA1* e *HAR1* (*hypernodulation aberrant root*). Este último é requerido para a regulação, pela parte aérea, do desenvolvimento das raízes, do número de nódulos e da sensibilidade ao nitrato para o desenvolvimento da simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio (Krussel et al., 2002). Existem relatos de genes que estão envolvidos tanto na formação de nódulos por rizóbio quanto de sítios de alimentação induzido por nematóides (Koltai et al., 2001; McCarter et al., 2003; Weerasinghe et al., 2005), indicando que as rotas de transdução de sinais que levam à formação dessas estruturas são sobrepostas. Além disso, embora ainda não tenha sido identificado em *M. incognita*, *Heterodera glycines* possui um peptídeo similar a *CLAVATA3* de plantas (Davis et al., 2004). Quando *CLAVATA3* de plantas interage com *CLAVATA1*, promove a diferenciação de células da haste no meristema apical (Davis et al., 2004). Assim, é possível que a proteína *CLAVATA1* esteja envolvida na formação das células gigantes.

As MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) de plantas são ativadas por vários estímulos bióticos ou abióticos (Nürnberger e Scheel, 2001). O clone SSH13D04 é similar à *MAPK4*. O mutante de *Arabidopsis mapk4* apresenta nanismo severo, níveis elevados de ácido salicílico, maior resistência a bactérias e oomicetos, e repressão dos genes *PDF1.2* e *THI1* (induzidos por ácido jasmônico), demonstrando que *AtMAPK4* possui uma função importante na regulação da resposta de defesa (Petersen et al., 2000). O gene *AtMAPK4* é induzido rapidamente por ferimentos, assim como a cadeia de transdução de sinais mediada por ácido jasmônico (Nürnberger e Scheel, 2001). A proteína

codificada pelo gene representado por SSH13C04 poderia estar atuando na rota do ácido jasmônico (Figura 8h).



**Figura 8.** Modelo da participação dos genes encontrados na biblioteca subtrativa Mol 24h no processo de sinalização de sinais desencadeado a partir do reconhecimento de um elicitor de *Meloidogyne incognita* pelo gene *Mi-1*, resultando na elicitação de resposta de hipersensibilidade e resistência. O modelo baseia-se em Scheel (1998) e Somssich e Hahlbrock (1998). a) fluxo de íons, possível envolvimento de H<sup>+</sup>ATPase; b) aumento na concentração de cálcio; c) e e) ativação de cinases e fosforilases mediada pelo cálcio; d) ação de peroxidases no fortalecimento da parede celular e sinalização para a proteção de células vizinhas; f) e h) participação de uma fosfolipase na ativação da rota do ácido jasmônico; g) ativação da rota do ácido salicílico; i) ativação de fatores de transcrição; j) genes envolvidos com as respostas de defesa local e sistêmica. MP – membrana plasmática

Já foi proposto que as respostas ativadas pela interação gene-a-gene entre planta e patógeno e as ativadas por injúria mecânica se interligam ao nível de MAP cinases (Romeis et al., 1999). Outros ESTs com similaridade a genes induzidos por injúria mecânica também foram encontrados, como os

similares aos genes que codificam para a proteína Sn1 (SSH11F12), para acetil-CoA C-aciltransferase (SSH08F04), envolvida na biossíntese de ácido jasmônico, para 4-cumarato-CoA ligase 2 (SSH01B12), para álcool desidrogenase (SSH10C04) e para peroxidase 10 (SSH09A10). O ácido abscísico (ABA), juntamente com o etileno, está envolvido com a sinalização induzida por ferimentos. Clones relacionados com respostas a esses hormônios vegetais foram encontrados na biblioteca, como os similares aos genes que codificam para uma proteína responsiva a ABA (SSH01F12), para ER66 (SSH13C08), que possui sítio de ligação a calmodulina e para um fator de transcrição que se liga a um elemento responsivo a etileno (SSH10D11). O gene similar a SSH10D11 codifica para um regulador negativo da cadeia de transdução de sinais mediada pelo etileno. Os ESTs semelhantes ao gene que codifica para um membro família de proteínas alergênica PR Bet v I de *A. thaliana* e também a PR10 estiveram representados 18 vezes nessa biblioteca e poderiam estar envolvidas na etapa da Figura 8j. Em células de *Petroselinum crispum* PR10 é induzido por ácido salicílico (Thulke e Conrath, 1998).

Muitos ESTs presentes na biblioteca Mol 24h sugerem que a resistência a *M. incognita* mediada pelo gene *Mi-1* utiliza também a rota do ácido jasmônico e etileno. Parece ser diferente da resposta de resistência a *M. euphorbiae*, no qual PR1, que depende da cadeia de transdução de sinais mediada por ácido salicílico, representado pela Figura 8g, foi induzido (Ilarduya et al., 2003). Nenhum EST similar a PR1 foi encontrado em Mol 24h. O ácido salicílico é importante, mas não suficiente para a resistência mediada por *Mi-1* (Branch et al., 2004), pois a sua degradação em plantas transgênicas contendo *NahG* permite o desenvolvimento de apenas 20 a 38% dos juvenis de *M. javanica*. Possivelmente esta resistência independente do ácido salicílico é mediada pela rota do ácido jasmônico.

Uma das respostas iniciais de células vegetais expostas a elicitores são alterações na permeabilidade da membrana plasmática que levam à entrada de cálcio e prótons e saída de potássio e cloro (Scheel, 1998) (Figura 8). A entrada de cálcio é essencial para a ativação da biossíntese de fitoalexinas, para a indução de genes relacionados à defesa e para HR (Scheel, 1998). Alvos potenciais para níveis elevados de cálcio são as cinases dependentes de cálcio e as calmodulinas, sendo essas últimas proteínas que se ligam e

modulam a ação do cálcio (Martin et al., 2003). A presença do clone SSH11C07 (similar ao gene que codifica para a proteína cinase 3 dependente de cálcio) e SSH11G03 (similar ao gene que codifica para anexina p34, envolvida em transporte de íons, tráfego e fusão de vesículas, além de ligação a fosfolipídeos dependente de cálcio) sugere que o cálcio é importante na interação tomateiro-*M. incognita*. As anexinas de tomateiro possuem atividade de ATPase e interagem com a actina do citoesqueleto (Calvert et al., 1996). Além disso, podem estar relacionadas com estresse oxidativo, visto que uma anexina de *Arabidopsis thaliana* complementou um mutante de *Escherichia coli* incapaz de crescer em altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gidrol et al, 1996).

Nesse processo de alteração na concentração de íons, os transportadores de íons possuem papel importante. Embora houvesse suposições de que a planta utilizasse proteínas já disponíveis para essas respostas iniciais de defesa (Hutcheson, 1998), já foi descrita a indução de uma H<sup>+</sup>-ATPase na interação resistente mediada pelo gene de resistência *RxvT3* e o gene de avirulência *avrXv3* (Gibly et al., 2004). O clone SSH08C12 é similar a um gene que codifica para uma proteína envolvida no transporte de potássio e também a uma ATPase. Possivelmente esse gene possui atividade tardia em relação ao influxo de cálcio e à retirada de potássio requeridos para a resposta local. Um gene que codifica para H<sup>+</sup>-ATPase foi induzido na interação compatível (Bird e Wilson, 1994), entretanto pode estar envolvida com a absorção de solutos como açúcares e aminoácidos para o interior da célula gigante, importante para manutenção do nematóide (Huang, 1985).

Uma H<sup>+</sup>-ATPase ligada a proteínas 14-3-3 forma um sítio de ligação para a toxina fúngica fusicoccina (Baunsgaard et al., 1998). Existem pelo menos 10 genes que codificam proteínas 14-3-3 (denominados *TFT* – *tomato fourteen-three-three*) em tomateiro. *TFT1*, 4 e 6 são induzidos na interação *Cf9-Avr9*, e *TFT4*, 8, 9 e 10 são induzidos por fusicoccina (Roberts e Bowles, 1999). A aplicação de fusicoccina juntamente com o elicitor *Avr9* apresenta maior indução de *PR3* ácida e básica do que somente a aplicação de *Avr9* em tomateiro contendo *Cf9* (Roberts e Bowles, 1999). Três clones com similaridade para genes que codificam proteínas 14-3-3 foram encontrados na biblioteca, sendo o clone SSH08A07 similar a *TFT2* e outros dois ESTs similares a *TFT10*. De maneira similar à interação *Cf9-Avr9*, essas proteínas

também poderiam estar envolvidas no reconhecimento de algum produto secretado pelo nematóide, participando das respostas de defesa.

Sabe-se que ocorre um aumento na atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase e peroxidase em interações incompatíveis entre plantas e nematóides (Brueske, 1980; Zacheo et al., 1993; Zacheo et al., 1995; Huang, 1985). Neste trabalho, apenas um EST similar a um gene que codifica para fenilalanina amônia-liase (SSH09H04) foi identificado na biblioteca. No entanto, foram encontrados quatro clones de cDNAs com similaridade ao gene que codifica para 4-cumarato-CoA ligase 2 e um para a NADPH-citocromo P450 oxidoreductase. Ambas as enzimas estão envolvidas no metabolismo de fenilpropanóides, de forma análoga a fenilalanina amônia-liase. Quanto às peroxidases, foram encontrados 28 clones representando cinco diferentes genes e poderiam estar representadas na Figura 8d. O mais abundante codifica a enzima glutationa peroxidase (*phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*, PHGPx). A via dos fenilpropanóides está envolvida com a lignificação e formação de outras barreiras estruturais, como as papilas, além da formação de produtos secundários envolvidos na resistência, como as fitoalexinas e ácido salicílico (Sticher et al., 1997). O aumento da deposição de calose nas células adjacentes às que foram submetidas à morte celular foi relatado por Bleve-Zacheo et al. (1982). Esses genes podem estar relacionados com esse processo, além de proteger a célula do estresse oxidativo devido à produção de espécies de oxigênio reativo durante a reação de hipersensibilidade.

Os ESTs similares a genes relacionados com síntese de parede celular compreenderam 5% do total, representando 8 diferentes genes, sendo que apenas 2 foram únicos. Entre esses genes estão os similares aos que codificam para um membro da família epimerase/dehidratase NAD-dependente, para uma pectina metilesterase isoforma  $\alpha$  e para uma proteína contendo domínio KH (também similar a uma cisteína protease). A presença de várias cópias indica que a maioria estava presente com grande representatividade na população de cDNA inicial, mas não houve expressão diferencial para todos, pois houve sinal semelhante nos *blots* hibridizados com a sonda *reverse*. Espera-se que transcritos com expressão alta, tanto no *driver* como no *tester*, podem não ser totalmente subtraídos pelo procedimento

utilizado para a construção da biblioteca. Possivelmente existem genes específicos envolvidos no fortalecimento da parede celular que são ativados durante a resposta de defesa. Alterações na parede celular podem ocorrer tanto durante a interação incompatível, com deposição de calose, como na compatível, possivelmente em resposta ao aumento de pressão causada pela expansão do cilindro central devido à presença do nematóide (Paulson e Webster, 1972; Niebel et al., 1993), caracterizando uma resposta de defesa tardia.

Entre os inibidores de proteases, foram encontrados um inibidor de metalocarboxipeptidase (relacionado com resistência a insetos), um inibidor de tripsina  $\alpha$  amilase, e várias proteínas de transferência de lipídios (*lipid transfer proteins*, LTPs). A expressão de um inibidor de tripsina originado de caupi em plantas transgênica de batata reduziu a fecundidade de fêmeas de *M. incognita* (Atkinson et al., 2003). As LTPs e as defensinas pertencem a um grupo de peptídeos de atividade antimicrobiana comprovada (Broekaert et al., 1997). As defensinas são induzidas por metil jasmonato, mas não por ácido salicílico, enquanto um LTP de tomate é induzido por ácido abscísico (ABA) e estresse hídrico (Penninckx et al., 1996; Torres-Schumann et al., 1992). O metil jasmonato está envolvido principalmente na resposta a ataque de herbívoros, como insetos, ativando genes que codificam inibidores de proteases, entre outros (Creelman e Mullet, 1997).

O clone SSH10H09 é similar a um gene que codifica para uma fosfolipase e também ao gene *Ki1*. Esse último é induzido na interação incompatível entre o nematóide *Heterodera schachtii* e beterraba (*Beta procumbens*) contendo o gene de resistência *Hs1<sup>pro-1</sup>*. A expressão de *Ki1* mediada pelo promotor 35S em raízes suscetíveis diminuiu significativamente o número de fêmeas desenvolvidas (Samuelian et al., 2004). Além disso, acredita-se que a ação de fosfolipases (Figura 8f) liberaria o ácido linolênico da membrana plasmática, que é substrato para a produção de ácido jasmônico, metil jasmonato e moléculas relacionadas (Somssich e Hahlbrock, 1998). A presença desses genes na biblioteca Mol 24h reforça a importância da rota do ácido jasmônico na resistência mediada pelo gene *Mi-1* a *M. incognita*.

Recentemente foi demonstrado que o processo de degradação de proteínas possui papel importante na cadeia de transdução de sinais mediada

por diferentes genes *R* (Martin et al., 2003). Por exemplo, em *Nicotiana benthamiana* contendo o gene *N*, a supressão dos genes *NbRar*, *NbSGT1*, *NbSKP1* e *NbCOP9* compromete a resistência a *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Liu et al., 2002a, Liu et al., 2002b). *NbRar1* interage com *NbSGT1* e este, por sua vez, interage com *NbSKP1*. A proteína *NbSGT1* faz parte do complexo E<sub>3</sub> ubiquitina ligase do tipo SCF (*Skp1/Cullin/F-box protein*), envolvido na degradação de proteínas (Liu et al., 2002a). COP9 também é um complexo multiprotéico envolvido na degradação de proteínas pela via da ubiquitinação por meio do proteasoma 26S (Wei e Deng, 1999). Na biblioteca foram identificados 11 ESTs relacionado com a degradação de proteínas pela via da ubiquitinação, representando oito diferentes genes. Entre eles estão os ESTs similares a genes que codificam a subunidade B do proteasoma β 20S (PBB1), a proteína HAC13, uma enzima potencial ubiquitina-conjugante (também semelhante à enzima E<sub>2</sub>) e uma proteína relacionada à família F-box. Em interações compatíveis envolvendo nematóides, a subunidade α do proteasoma 20S e a enzima ubiquitina E<sub>2</sub> são induzidas em galhas e células gigantes (Bird e Wilson, 1994; Vercauteren et al., 2001). Na interação compatível, esses genes podem estar envolvidos com uma resposta tardia de resistência ou com a adaptação das atividades celulares existentes às novas condições impostas pelo desenvolvimento do sítio de alimentação. Na interação resistente poderiam estar envolvidos com a degradação de reguladores negativos das respostas de resistência (Liu et al., 2002a).

Durante a resposta de defesa, a ativação transcricional de genes ocorre em conseqüência da transdução de sinais (Figura 8i). Portanto, é esperado que genes envolvidos com a transcrição e tradução sejam ativados. Na biblioteca foram encontrados dois clones cujas seqüências são similares a genes que codificam para fatores de transcrição do tipo Myb, um similar ao regulador transcricional bHLH, além de outros. Este último já foi relacionado com estresses de várias origens, inclusive por patógenos, e também com a interação incompatível entre *A. thaliana* e *Alternaria brassicicola* (Mahalingam et al., 2003, Schenk et al., 2003). Relacionadas com a tradução de proteínas foram encontrados os clones SSH09H10 (similar ao gene que codifica para uma EF-1α potencial) e SSH01B04 (similar ao gene que codifica para ligatina,

com atividade de ligação a RNA, de transdução de sinal e de fator de iniciação de tradução). Em mamíferos, a ligatina provavelmente é uma proteína periférica externa de membrana que pode ser liberada por cátions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e pH (4,5 e 8,0) (Jakoi et al., 1987). A presença desses genes na Mol 24h indica que também podem estar envolvidas com a cadeia de transdução de sinais mediada pelo gene *Mi-1*.

Vários genes *R* são induzidos pelo patógeno a que conferem resistência como, por exemplo, *I<sub>2</sub>*, *Xa1*, *Hs1<sup>pro-1</sup>* e *Hero A* (Mes et al., 2000; Sobczak et al., 2005; Thureau et al., 2003; Yoshimura et al., 1998). Foi encontrado um EST semelhante a um gene de resistência (SSH01D07, similar a *Sw5*, *Prf* e a um gene potencial que confere resistência a *Phytophthora infestans* em batata) na biblioteca Mol 24h. Análogos de genes *R* foram induzidos local e sistemicamente na interação incompatível entre *A. thaliana* e *A. brassicicola* (Schenk et al., 2003), sugerindo a possibilidade de que essa indução também possa ocorrer na interação tomateiro-*Mi-1* e *M. incognita*.

Foram identificados dois genes com expressão diferencial cujos ESTs são similares a genes relacionados com a formação de nódulos por bactérias fixadoras de nitrogênio, um similar a *MtN19* e outro similar a um membro da família *Major intrinsic protein* (MIP) e homólogo do gene que codifica para nodulina 26. Esse último está envolvido no transporte de água (*water channel*). ESTs representando três outros canais de água foram encontrados, inclusive um semelhante a aquaporina 1 e *Rb7* (SSH01G09), previamente citado como induzido nas células gigantes (Opperman et al., 1994). Em tabaco, *TobRB7* é expresso em raízes infectadas por *M. incognita*, mas não por *Globodera tabacum* (Opperman et al., 1994). Na interação suscetível acredita-se que os canais de água importam água do xilema e a redistribuem entre as células gigantes (Gheysen e Fenoll, 2002).

Em acordo com o aumento no número de ribossomos relacionado com a HR (Paulson e Webster, 1972), muitos genes codificando proteínas ribossômicas foram encontrados na biblioteca, representando 5% do total de clones e 19 ESTs distintos. O EST do clone SSH01C03 é similar a um gene que codifica para uma proteína ribossômica potencial que já foi anteriormente relacionado com resposta a estresse. Em análise de microarranjo de tomateiro superexpressando *Pto* inoculado com *P. syringae* pv. *tomato* avirulento

também foram encontrados ESTs correspondentes a genes diferencialmente expressos que codificam proteínas ribossomais, assim como na interação incompatível entre tomateiro contendo o gene de resistência *RxvT3* e *X. campestris* pv. *vesicatoria* T3 (Mysore et al., 2003; Gibly et al., 2004). Os genes identificados em outros estudos de expressão diferencial em interações incompatíveis reforçam o enriquecimento para esses genes na biblioteca Mol 24h, além de indicar que rotas comuns são compartilhadas pelas cadeias de transdução de sinais mediadas por diferentes genes *R*.

A situação de estresse induz a ativação de retrotransposons em plantas, assim como é um evento comum em todos os eucariotos (Grandbastien, 1998). Em plantas, alguns retrotransposons possuem seqüências regulatórias semelhantes às de alguns genes de defesa, e são induzidos por ferimentos ou pela aplicação de jasmonato (Grandbastien, 1998). O promotor do retrotransposon Tnt1 é ativado por *Cladosporium fulvum* nas interações compatível e incompatível (Mhiri et al., 1999). Esse promotor é induzido mais tardiamente na interação compatível do que na interação incompatível. Considerando esses fatos, é de se esperar a presença de retrotransposons tanto na interação compatível como na incompatível como verificado neste estudo.

Vários ESTs semelhantes a genes envolvidos com metabolismo geral foram diferencialmente expressos, incluindo várias hidrolases, genes envolvidos na degradação de fosfolípidos, na biossíntese de glicolípídios, esteróis e aminoácidos, no transporte de lipídios, no metabolismo de sacarose, entre outros. Em outros trabalhos de prospecção de genes responsivos a patógenos envolvendo *differential display*, SSH e microarranjos também foram encontrados vários genes dessas categorias (Vercauteren et al., 2001, Puthoff et al., 2003, Gibly et al., 2004), mas a maioria ainda não foi caracterizada quanto à sua função na interação planta-patógeno. Um dos poucos genes relacionados a metabolismo geral estudado na interação compatível entre *A. thaliana* e *Heterodera schachtii* é UDP-glicose-4-epimerase, em que o mutante para este gene apresentou aumento na suscetibilidade ao nematóide (Wubben et al., 2004).

Os genes que apresentam cópia única no genoma, como o semelhante a *Myb1*, gene relacionado à resposta de resistência, gene envolvido com a

resistência sistêmica adquirida, similar a *Ki1* e ao que codifica para defensina poderão ser submetidos à análise funcional utilizando o silenciamento gênico induzido por vetor viral (*virus-induced gene silencing*, VIGS) (Burch-Smith et al., 2004) ou por meio de superexpressão em plantas transgênicas. Estudo mais detalhado dos membros das famílias multigênicas aos quais pertencem os genes semelhantes a *MtN19*, *D13F MYB ST1* e ao que codifica para uma cinase dependente de cálcio, deverão ser efetuados visando melhor subsidiar estudos funcionais utilizando VIGS. Para suprimir transcritos de um gene pertencente a uma família multigênica, é necessária a cuidadosa seleção de regiões que não contenham regiões de 23 nucleotídeos com identidade completa aos outros membros da família (Thomas et al., 2001). Alternativamente, com base nestes estudos pode ser interessante selecionar regiões que são conservadas entre os membros da família multigênica visando suplantiar possível redundância funcional, facilitando a detecção do fenótipo do gene silenciado (Lu et al., 2003).

Concluindo, a utilização da técnica de SSH permitiu identificar grande número de genes potencialmente envolvidos na resistência do tomateiro a *M. incognita* mediada pelo gene *Mi-1*. Todavia, é necessário o desenvolvimento de um método de inoculação que permita a realização dessa análise em tecidos contendo maior número de células confrontadas com o patógeno e com coletas em intervalos de tempo menores, de modo a permitir uma análise de expressão detalhada dos genes identificados. Além disso, estudos funcionais utilizando VIGS ou transformação genética necessitam serem conduzidos para confirmar de forma inequívoca a importância dos genes identificados nas respostas do tomateiro a *Meloidogyne incognita*.

## LITERATURA CITADA

ATKINSON, H.J.; URWIN, P.E.; McPHERSON, M.J. Engineering plants for nematode resistance. **Annual Reviews of Phytopathology**, v.41, p.615-639, 2003.

BAUNSGAARD, L.; FUGLSANG, A.T.; JAHN, T.; KOURTHOUT, H.A.A.J.; DE BOER, A.H.; PALMGREN, M.G. The 14-3-3 proteins associate with the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase to generate a fusicoccin binding complex and a fusicoccin-responsive system. **Plant Journal**, v.13, p.815-820, 1998.

BERTIOLI, D.J.; SMOKER, M.; BURROWS, P.R. Nematode-responsive activity of the *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter and its subdomains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, p.189-196, 1999.

BIRD, D.M.; KOLTAL, J. Plant parasitic nematodes: habitats, hormones, and horizontally acquired gene. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.19, p.183-194, 2000.

BIRD, D.M.; WILSON, M.A. DNA sequence and expression analysis of root-knot nematode-elicited giant cell transcripts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.7, p.419-424, 1994.

BLEVE-ZACHEO, T.; ZACHEO, G.; MELILLO, M.T.; LAMBERTI, F. Ultrastructural aspects of the hypersensitive reaction in tomato root cells resistant to *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Mediterranea**, v.10, p.81-90, 1982.

BRANCH, C.; HWANG, C-F.; NAVARRE, D.A.; WILLIAMSON, V.M. Salicylic acid is part of the *Mi-1*-mediated defense response to root-knot nematode in tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, p.351-356, 2004.

BRENNER, E.D.; LAMBERT, K.N.; KALOSHIAN, I.; WILLIAMSON, V.M. Characterization of *LeMir*, a root-knot nematode-induced gene in tomato with an encoded product secreted from the root. **Plant Physiology**, v.118, p.237-247, 1998.

BROEKAERT, W.; CAMMUE, B.P.A.; DE BOLLE, M.F.C.; THEVISSSEN, K.; DE SAMBLANX, G.W.; OSBORN, R.W. Antimicrobial peptides from plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.16, p.297-323, 1997.

BRUESKE, C.H. Phenylalanine ammonia-lyase activity in tomato roots infected and resistant to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Physiological Plant Pathology**, v.16, p.409-414, 1980.

BURCH-SMITH, T.M.; ANDERSON, J.C.; MARTIN, G.B.; DINESH-KUMAR, S.P. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. **Plant Journal**, v.39, p.734-746, 2004.

CALVERT, C.; GANT, S.J.; BOWLES, D.J. Tomato annexins p34 and p35 bind to F-actin and display nucleotide phosphodiesterase activity inhibited by phospholipid binding. **Plant Cell**, v.8, p.333-342, 1996.

CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.355-381, 1997.

DAVIS, E.L.; HUSSEY, R.S.; BAUM, T.J. Getting to the roots of parasitism by nematodes. **Trends in Parasitology**, v.20, p.134-141, 2004.

DE ALMEIDA ENGLER, J.; DE VLEESSCHAUWER, V.; BURSSSENS, S.; CELENZA Jr.; J.L.; INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M.; ENGLER, G.; GHEYSEN, G. Molecular markers and cell cycle inhibitors show the importance of cell cycle progression in nematode-induced galls and syncytia. **Plant Cell**, v.11, p.793-807, 1999.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y-F.C.; CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E.D.; SIEBERT, P.D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of National Academy of Science**, v.93, p.6025-6030, 1996.

DONG, X. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.1, p.316-323, 1998.

DROPKIN, V.H. Cellular responses of plants to nematode infections. **Annual Reviews of Phytopathology**, v.7, p.101-122, 1969a.

DROPKIN, V.H. The necrotic reaction of tomatoes and other host resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. **Phytopathology**, v.59, p.1632-1637, 1969b.

FAVERY, B.; LACOMTE, P.; GIL, N.; BECHTOLD, N.; BOUCHEZ, G.; DALMASSO, B.; ABAD, P. RPE, a plant gene involved in early developmental steps of nematode feeding cells. **EMBO Journal**, v.17, n.23, p. 6799-6811, 1998.

FULTON, T.M.; CHUNWONGSE, J.; TANKSLEY, S.D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.13, p.207-209, 1995.

GHEYSEN, G.; FENOLL, C. Gene expression in nematode feeding sites. **Annual Reviews of Phytopathology**, v.40, p.191-219, 2002.

GIBLY, A.; BONSHTIEN, A.; BALAJI, B.; DEBBIE, P.; MARTIN, G.B.; SESSA, G. Identification and expression profiling of tomato genes differentially regulated during a resistance response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, p.1212-1222, 2004.

GIDROL, W.; SABELLI, P.A.; FERN, Y.S.; KUSH, A.K. Annexin-like protein from *Arabidopsis thaliana* rescues  $\Delta$ oxyR mutant of *Escherichia coli* from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. **Proceeding of National Academy of Science**, v.93, p.11268-11273, 1996.

GOELLNER, M.; WANG, X.; DAVIS, E.L. Endo- $\beta$ -1,4-glucanase expression in compatible plant-nematode interactions. **Plant Cell**, v.13, p.2241-2255, 2001.

GRANDBASTIEN, M.A. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. **Trends in Plant Science**, v.3, p.181-187, 1998.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.575-607, 1997.

HUANG, J-S. Mechanisms of resistance to root-knot nematodes. In: **An advanced treatise on Meloidogyne**. v.1, p.165-174, 1985. Ed. Sasser, J.N.; Carter, C.C. (Raleigh: North Carolina State University Graphics)

HUANG, C.S.; MAGGENTI, A.R. Mitotic aberrations and nuclear changes of developing giant cells in *Vicia faba* caused by the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. **Phytopathology**, v.59, p.447-455, 1969.

HUTCHESON, S.W. Current concepts of active defense in plants. **Annual Reviews of Phytopathology**, v.36, p.59-90, 1998.

ILARDUYA, O.M.; MOORE, A.E.; KALOSHIAN, I. The tomato *Rme1* locus is required for *Mi-1*-mediated resistance to root-knot nematodes and the potato aphid. **Plant Journal**, v.27, p.417-425, 2001.

ILARDUYA, O.M.; XIE, Q.; KALOSHIAN, I. Aphid-induced defense responses in *Mi-1*-mediated compatible and incompatible tomato interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.16, p.699-708, 2003.

ILARDUYA, O.M.; NOMBELA, G.; HWANG, C-F.; WILLIAMSON, V.M.; MUÑIZ, M.; KALOSHIAN, I. *Rme1* is necessary for *Mi-1*-mediated resistance and acts early in the resistance pathway. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, p.55-61, 2004.

JAKOI, E.R.; ROSS, P.E.; TING-BEALL, H.P.; KAUFMAN, B.; VANAMAN, T.C. Ligatin: a peripheral membrane protein with covalently bound palmitic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, p. 1300-1304, 1987.

JONES, M.G.K. Host cell responses to endoparasitic nematode attack: structure and function of giant cells and syncytia. **Annals of Applied Biology**, v.97, p.353-372, 1981.

KOLTAI, H.; DHANDAYDHAM, M.; OPPERMAN, C.; THOMAS, J.; BIRD, D. Overlapping plant signal transduction pathways induced by a parasitic nematode and rhizobial endosymbiont. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, p.1168-1777, 2001.

KRUSSEL, L.; MADSEN, L.H.; SATO, S.; AUBERT, G.; GENUA, A.; SZCZYGLOWSKI, K.; DUC, G.; KANEKO, T.; TABATA, S.; DE BRULJN, F.; PAJUELO, E.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J. Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. **Nature**, v.420, p.422-426, 2002.

LIU, Y.; SCHIFF, M.; SERINO, G.; DENG, X.W.; DINESH-KUMAR, S.P. Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the *N* gene-mediated resistance response to *Tobacco mosaic virus*. **Plant Cell**, v.14, p.1483-1396, 2002a.

LIU, Y.; SCHIFF, M.; MARATHE, R.; DINESH-KUMAR, S.P. Tobacco *Rar1*, *EDS1* AND *NPR1/NIM1* like genes are required for *N*-mediated resistance to *Tobacco mosaic virus*. **Plant Journal**, v.30, p.415-429, 2002b.

LOGEMANN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. **Analytical Biochemistry**, v.163, p.16-20, 1987.

LU, R.; MALCUIT, I.; MOFFETT, P.; RUIZ, M.T.; PEART, J.; WU, A.J.; RATHJEN, J.P.; BENDAHMANE, A.; DAY, L.; BAULCOMBE, D.C. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. **EMBO Journal**, v.22, p.5690-5699, 2003.

McCARTER, J.P.; MITREVA, M.K.; MARTIN, J.; DANTE, M.; WYLIE, T.; RAO, PAPE, K.; BOWERS, Y.; THEISING, B.; MURPHY, C.V.; KLOEK, A.P.; CHIAPELLI, B.J.; CLIFTON, S.W.; BIRD, D.M.; WATERSTON, R.H. Analysis and functional classification of transcripts from the nematode *Meloidogyne incognita*. **Genome Biology**, v.4, r.26, 2003.

MAHALINGAM, R.; GOMEZ-BUITRAGO, A.M.; ECKARDT, N.; SHAH, N.; GUEVARA-GARCIA, A.; DAY, P.; RAINA, R.; FEDOROFF, N.V. Characterizing the stress/defense transcriptome of Arabidopsis. **Genome Biology**, v.4, R20, 2003.

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

MARTIN, G.B.; BOGDANOVA, A.J.; SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annual Reviews of Plant Biology**, v.54, p.23-61, 2003.

MES, J.J.; VAN DOORN, A.A.; WIJBRANDI, J.; SIMONS, B.; CORNELISSEN, B.J.C.; HARING, M.A. Expression of the *Fusarium* resistance gene *I-2* co-localizes with the site of fungal containment. **Plant Journal**, v.23, p.183-193, 2000.

MESSEGUER, R.; GANAL, M.; VICENTE, M.C.; YOUNG, N.D.; BOLKAN, H.; TANKSLEY, S.D. High resolution RFLP map around the root knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, v.82, p.529-536, 1991.

MHIRI, C.; DE WIT, P.J.G.M.; GRANDBASTIEN, M.A. Activation of the promoter or the Tnt1 retrotransposon in tomato after inoculation with the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, p.592-603, 1999.

MILLIGAN, S.B.; BODEAU, J.; YAGHOUBI, J.; KALOSHIAN, I.; ZABEL, P.; WILLIAMSON, V.M. The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. **Plant Cell**, v.10, p.1307-1319, 1998.

MYSORE, K.S.; D'ASCENZO, M.D.; HE, X.; MARTIN, G.B. Overexpression of the disease resistance gene *Pto* in tomato induces gene expression changes similar to immune responses in human and fruitfly. **Plant Physiology**, v.132, p.1901-1912, 2003.

NIEBEL, A.; de ALMEIDA-ENGLER, J.; TIRE, C.; ENGLER, G.; VAN MONTAGU, M.; GHEYSEN, G. Induction patterns of an extensin gene in tobacco upon nematode infection. **Plant Cell**, v.5, p.1697-1710, 1993.

NIEBEL, A.; de ALMEIDA-ENGLER, J.; HEMERLY, A.; FERREIRA, P.; INZE, D.; VAN MONTAGU, M.; GHEYSEN, G. Induction of *cdc2a* and *cycAt* expression in *Arabidopsis thaliana* during early phases of nematode-induced feeding cell formation. **Plant Journal**, v.10, 1037-1043, 1996.

NIEBEL, A.; HEUNGENS, K.; BARTHEL, N.; INZE, D.; VAN MONTAGU, M.; GHEYSEN, G. Characterization of a pathogen-induced potato catalase and its systemic expression upon nematode and bacterial infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.8, p.371-378, 1995.

NOMBELA, G.; WILLIAMSON, V.M.; MUÑIZ, M. The root-knot nematode resistance gene *Mi-1.2* of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.16, p.645-649, 2003.

NÜRNBERGER, T.; SCHEEL, D. Signal transmission in the plant immune response. **Trends in Plant Science**, v.6, p.372-379, 2001.

OPPERMAN, C.H.; BIRD, D.M. The soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*: a genetic model system for the study of plant-parasitic nematodes. **Current Opinion in Plant Biology**, v.1, p.343-346, 1998.

OPPERMAN, C.H.; TAYLOR, C.H.; CONKLING, M.A. Root-knot nematode-directed expression of a plant root-specific gene. **Science**, v.263, p.221-223, 1994.

PAULSON, R.E.; WEBSTER, J.M. Ultrastructure of the hypersensitive reaction in roots of tomato, *Lycopersicon esculentum* L. to infection by the root-knot nematode, *Melodogyne incognita*. **Physiological Plant Pathology**, v.2, p.227-234, 1972.

PENNINCKX, I.A.M.A.; EGGERMONT, K.; TERRAS, F.R.G.; THOMMA, B.P.H.J.; DE SAMBLANX, G.W.; BUCHALA, A.; MÉTRAUX, J.P.; MANNERS, J.M.; BROEKAERT, E.F. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. **Plant Cell**, v.8, p.2309-2323, 1996.

PETERSEN, M.; BRODERSEN, P.; NAESTED, H.; ANDREASSON, E.; LINDHART, U.; JOHANSEN, B.; NIELSEN, H.B.; LACY, M.; AUSTIN, M.J.; PARKER, J.E.; SHARNIA, S.B.; KLESSIG, D.F.; MARTIENSSON, R.; MATTSON, O.; JENSEN, A.B.; MUNDY, J. *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. **Cell**, v.103, p.1111-1120, 2000.

PUTHOFF, D.P.; NETTLETON, D.; RODERMEL, S.R.; BAUM, T.J. *Arabidopsis* gene expression changes during cyst nematode parasitism revealed by statistical analyses of microarray expression profiles. **Plant Journal**, v.33, p.911-921, 2003.

ROBERTS, M.R.; BOWLES, D. Fusicoccin, 14-3-3 protein, and defense responses in tomato plants. **Plant Physiology**, v.119, p.1243-1250, 1999.

ROMEIS, T.; PIEDRAS, P.; ZHANG, S.; KLESSIG, D.F.; HIRT, H.; JONES, J.D. Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinase in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance genes, elicitor, wound, and salicylate responses. **Plant Cell**, v.11, p.273-287, 1999.

ROSSI, M.; GOGGIN, F.L.; MILLIGAN, S.B.; KALOSHIAN, E.; ULLMAN, E.E.; WILLIAMSON, V.M. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. **Proceedings of National Academy of Science**, v.95, p.9750-9754, 1998.

SALMERON, J.M.; OLDROYD, G.E.D.; ROMMENS, C.M.T.; SCOFIELD, S.R.; KIM, H.S.; LAVELLE, D.T.; DAHLBECK, D.; STASKAWICZ, B.J. Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. **Cell**, v.86, p.123-133, 1996.

SAMUELIAN, S.; KLEINE, M.; RUYTER-SPIRA, C.P.; KLEIN-LANKHORST, R.M.; JUNG, C. Cloning and functional analyses of a gene from sugar beet up-regulated upon cyst nematode infection. **Plant Molecular Biology**, v.54, p.147-156, 2004.

SCHEEL, D. Resistance response physiology and signal transduction. **Current Opinion in Plant Biology**, v.1, p.305-310, 1998.

SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; MANNERS, J.M.; ANDERSON, J.P.; SIMPSON, R.S.; WILSON, I.W.; SOMERVILLE, S.C.; MACLEAN, D.M. Systemic gene expression in *Arabidopsis* during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. **Plant Physiology**, v.132, p.999-1010, 2003.

SIJMONS, P.C.; ATKINSON, H.J.; WYSS, U.; Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses. **Annual Reviews of Phytopathology**, v.32, p.235-259, 1994.

SOBCZAK, M.; AVROVA, A.; JUPOWICZ, J.; PHILLIPS, M.S.; ERNST, K.; KUMAR, A. Characterization of susceptibility and resistance responses to potato cyst nematode (*Globodera* spp.) infection of tomato lines in the absence and presence of the broad-spectrum nematode resistance *Hero* gene. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.18, p.158-168, 2005.

SOMSSICH, I.E.; HAHLBROCK, K. Pathogen defense in plants – a paradigm of biological complexity. **Trends in Plant Science**, v.3, p.86-90, 1998.

SONG, W.Y.; WANG, G.L.; CHEN, L.L.; KIM, H.S.; PI, L.Y.; GARDNER, J.; WANG, B.; HOLSTEN, T.; ZHAI, W.X.; XHU, L.H.; FAUQUET, C.; RONALD, P.C. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa21*. **Science**, v.270, p.1804-1806, 1995.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Reviews of Phytopathology**, v.35, p.235-270, 1997.

THOMAS, C.L.; JONES, L.; BAULCOMBE, D.C.; MAULE, A.J. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for using RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a *Potato virus X* vector. **Plant Journal**, v.25, p.417-425, 2001.

THULKE, O.; CONRATH, U. Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley. **Plant Journal**, v.14, p.35-42, 1998.

THURAU, T.; KIFLE, S.; JUNG, C.; CAI, D. The promoter of the nematode resistance gene *Hs1<sup>pro-1</sup>* activates a nematode-responsive and feeding site-specific gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v.52, p.643-660, 2003.

TORRES-SCHUMMAN, S.; GODOY, J.A.; PINTOR-TORO, J.A. A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. **Plant Molecular biology**, v.18, p.749-757, 1992.

VAN DER EYCKEN, W.; de ALMEIDA-ENGLES, J.; INZE, D.; VAN MONTAGU, M.; GHEYSEN, G. A molecular study of root-knot nematode-induced feeding sites. **Plant Journal**, v.9, p.45-54, 1996.

VERCAUTEREN, E.; VAN DER SCHUEREN, E.; VAN MONTAGU, M.; GHEYSEN, G. *Arabidopsis thaliana* genes expressed in the early compatible interaction with root-knot nematode. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, p.288-299, 2001.

WEERASINGHE, R.R.; BIRD, D.M.; ALLEN, N.S. Root-knot nematodes and bacterial Nod factors elicit common signal transduction events in *Lotus japonicus*. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v.102, p.3147-3152, 2005.

WEI, N.; DENG, X.W. Making sense of the COP9 signalosome, a conserved regulatory protein complex from *Arabidopsis* to human. **Trends in Genetics**, v.15, p.98-103, 1999.

WIGGERS, R.J.; STARR, J.L. PRICE, H.J. DNA content and variation in chromosome number in plant cells affected by *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. **Phytopathology**, v.80, p.1391-1395, 1990.

WILLIAMSON, V.M.; GLEASON, C. Plant-nematode interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.1-7, 2003.

WILLIAMSON, V.M.; HUSSEY, R.S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **Plant Cell**, v.8, p.1735-1745, 1996.

WILSON, M.A.; BIRD, D.; McK.; VAN DER DNAAP, E. A comprehensive subtractive cDNA cloning approach to identify nematode induced transcripts in tomato. **Phytopathology**, v.84, p.299-303, 1994.

WYSS, U.; GRUNDLER, F.M.W.; MUNCH, A. The parasitic behavior of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Nematologica**, v.38, p.89-111, 1992.

WUBBEN, M.J.E.; II, RODERMEL, S.R.; BAUM, T.J. Mutation of a UDP-glucose-4-epimerase alters nematode susceptibility and ethylene responses in *Arabidopsis* roots. **Plant Journal**, v.5, p.712-724, 2004.

XIAO, F.; TANG, X.; ZHOU, J.M. Expression of 35S::*Pto* globally activates defense-related genes in tomato plants. **Plant Physiology**, v. 126, p.1637-1645, 2001.

YOSHIMURA, S.; YAMANOUCHI, U.; KATAYOSE, Y.; TOKI, S.; WANG, Z-X.; KONO, I.; KURATA, N.; YANO, M.; IWATA, N.; SASAKI, T. Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. **Proceedings of National Academy of Science**, v.95, p.1663-1668, 1998.

ZACHEO, G.; ORLANDO, C.; BLEVE-ZACHEO, T. Characterization of anionic peroxidases in tomato isolines infected by *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, v.25, p.249-256, 1993.

ZACHEO, G.; BLEVE-ZACHEO, T.; PACODA, D.; ORLANDO, C.; DURBINS, R.D. The association between heat-induced susceptibility of tomato to *Meloidogyne incognita* and peroxidase activity. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.46, p.491-507, 1995.

ZHOU, J.; LOH, R. T.; BRESSAN, R.A.; MARTIN, G.B. The tomato gene *Pti1* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by pto and is involved in the plant hypersensitive response. **Cell**, v.83, p.925-935, 1995.

**ANEXO**

## Silenciamento gênico induzido por vetor viral (VIGS)

### INTRODUÇÃO

A confirmação do envolvimento dos genes identificados nas bibliotecas subtrativas depende de uma análise funcional. Uma das técnicas utilizadas para esta finalidade é a indução do silenciamento dos genes de interesse mediada por vírus (*virus-induced gene silencing*, VIGS), que é uma forma de silenciamento gênico pós-transcricional (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS) (Tijsterman et al., 2002). Esse processo envolve a formação de RNA de fita dupla do gene alvo, que é digerido em pequenos fragmentos de 25 nucleotídeos também designado de siRNA (*short interfering RNA*) (Hamilton e Baulcombe, 1999; Martinez et al., 2002). Acredita-se que os siRNAs são transferidos para o complexo enzimático RISC (*RNAi-induced silencing complex*), auxiliando-o a reconhecer o mRNA alvo que será degradado (Tijsterman et al., 2002). Para a indução de VIGS em plantas, fragmentos do gene de interesse são inseridos em vetores construídos a partir de vírus fitopatogênicos. Esse fragmento é expresso em altos níveis na planta durante a infecção viral, levando à formação de RNA de fita dupla, formação de siRNAs, identificação e degradação do transcrito do gene endógeno (Tijsterman et al., 2002).

Existem vários vetores desenvolvidos para o VIGS. Entre eles existem os vetores desenvolvidos a partir de *Tobacco rattle virus* (TRV) utilizado para o silenciamento em tomateiro (Liu et al., 2002a; Valentine et al., 2004). Esses vetores virais consistem nos cDNAs dos RNAs 1 e 2 do TRV clonados separadamente em T-DNAs de plasmídeos binários, ambos sob o controle do promotor 35S de CaMV (Liu et al., 2002a) ou de capa protéica de tobavirus (Valentine et al., 2004). No RNA 2 existe um sítio múltiplo de clonagem que permite a inserção de fragmentos de interesse, de forma que sua expressão seja controlada pelo promotor viral. As duas construções são transferidas para *Agrobacterium tumefaciens* separadamente. A seguir, são multiplicadas, misturadas e inoculadas nas plantas a serem analisadas.

O VIGS tem sido utilizado principalmente nos estudos de defesa das plantas. Por exemplo, o silenciamento de um gene similar a *EDS1* demonstrou que esse é importante para a resistência a *Tobacco mosaic virus* (TMV) mediado pelo gene *N* e não para a resistência mediada pelos genes *Pto* e *Rx* (Peart et al., 2002). O silenciamento dos genes *Rar1* e *NPR1/NIM1*, além de *EDS1*, também afetou a resistência mediada pelo gene *N* (Liu et al., 2002b). O silenciamento de genes no sistema radicular utilizando VIGS também foi relatado utilizando vetores virais baseados em *Potato virus X* (PVX) e em TRV (Faivre-Rampant et al., 2004; Ryu et al., 2004; Valentine et al., 2004). O nível de expressão do gene *Mi-1* foi reduzido em 25% quando comparado com o controle, utilizando um vetor viral baseado em TRV no cultivar de tomateiro 'Rossol'. Nas plantas silenciadas foram observadas 15% a 25% de reprodução do patógeno em relação ao controle suscetível (100%) (Valentine et al., 2005).

Para os estudos funcionais, essa técnica possui as vantagens de não requerer tanto tempo como a transformação genética, além de permitir o silenciamento direcionado de membros de famílias multigênicas (silenciamento apenas de um componente ou de vários) e também de genes que podem ser importantes durante o desenvolvimento da planta, os quais não são recuperados pela transformação genética (Burch-Smith et al., 2004). Como limitações podem ser citadas a desuniformidade do silenciamento em todos os tecidos da planta, dificultando a interpretação; a dependência da planta ser hospedeira do vetor viral; a supressão incompleta dos transcritos, que pode ser insuficiente para eliminar toda a função da proteína correspondente e por fim,

quando não se tem informação de número de cópias do gene alvo, o silenciamento de genes que não são alvo, mas que possuem porções de sequências idênticas (Burch-Smith et al., 2004).

Considerando as vantagens e as desvantagens, a aplicação dessa técnica ainda é interessante estudo funcional em grande escala. No caso dos vários genes encontrados nas bibliotecas subtrativas, quando os resultados não forem suficientes para elucidar a função desses, permite realizar uma análise prévia para a seleção de genes promissores para efetuar a transformação genética.

Com o objetivo de verificar o efeito do silenciamento de 20 genes da biblioteca Mol 24h e um gene da MMI 24h na resistência mediada pelo gene *Mi-1* a *Meloidogyne incognita*, as seqüências parciais foram transferidas para o vetor viral baseado em TRV e agroinoculadas em 'Motelle' e 'Moneymaker' e testados em diversos experimentos descritos a seguir.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os clones SSH08D08 (similar a *MtN19*), SSH10H09 (semelhante a *Ki1*), SSH09D04 (similar ao gene que codifica para a defensina), SSH11C07 (similar ao gene que codifica para uma cinase dependente de cálcio), SSH11D07 (*D13F MYB ST1*), SSH11H11 (gene envolvido com resposta de resistência), SSH09G01 (*Myb1*), SSH01D07 (similar a *Sw5/Prf*), SSH08G08 (similar a *Bs2*), SSH09H04 (*PAL2*), SSH10F12 (gene relacionado à SAR), SSH08C05 (similar a *PR10*), SSH09A10 (similar ao gene que codifica para a peroxidase 10), SSH08F06 (desconhecida), SSH08G02 (similar ao gene que codifica para um receptor cinase), SSH09A04 (*AXR 1*), SSH09C12 (similar ao gene que codifica para uma serina/treonina cinase), SSH10G01 (similar ao gene que codifica para uma proteína hipotética), SSH08A05 (similar ao gene que codifica para uma proteína de membrana que se liga a esteróide) e SSH01E06 (similar ao gene que codifica para uma proteína transportadora de peptídeos) da biblioteca Mol 24h e o clone MMI24B05 (similar ao gene que codifica para a esfingosina 1-fosfato liase) da biblioteca MMI 24h foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoR* I, ou *BamH* I e *Xba* I, ou *BamH* I e *Xho* I, conforme a

necessidade, para a liberação dos clones de cDNAs. Os fragmentos foram separados em gel de agarose 1x a 1%, retirados do gel e purificados utilizando o kit *Sephaglas*<sup>TM</sup> *BandPrep* (GE Healthcare).

O vetor viral pTRV RNA2 (Liu et al., 2002a) foi digerido com as enzimas de restrição *EcoR* I, ou *BamH* I e *Xba* I, ou *BamH* I e *Xho* I. O plasmídeo linearizado foi separado em gel de agarose 1x a 1%, retirado do gel e purificado utilizando o kit *Sephaglas*<sup>TM</sup> *BandPrep* (GE Healthcare). O plasmídeo digerido com *EcoR* I foi desfosforilado.

Os fragmentos dos clones de cDNAs foram ligados ao vetor viral digerido com as enzimas de restrição correspondentes. O produto da ligação foi eletroporado em *E. coli* EC100. A orientação nos clones positivos foi determinada segundo a digestão com enzimas adequadas para cada clone. Os clones recombinantes contendo os fragmentos nas orientações senso e antisenso foram transferidos para *A. tumefaciens* LBA4404 por eletroporação. Colônias isoladas foram submetidas a PCR utilizando os oligonucleotídeos *PCR primer* 1 e 2R para a confirmação da presença dos clones recombinantes. As condições de amplificação consistiram de uma etapa inicial de rompimento de células bacterianas e desnaturação de cinco minutos a 95°C e 32 ciclos de desnaturação de 95°C durante dez segundos e anelamento e extensão a 68°C durante três minutos. O DNA foi separado em gel de agarose 1x a 1%, corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV. As colônias contendo os clones recombinantes foram multiplicadas em meio LB contendo 50 µg/ml de canamicina e 50 µg/ml de estreptomicina, a 250 rpm e 28°C durante 24h, misturadas com um volume de glicerol 50% e estocadas a -80°C.

Para a inoculação das plantas, as agrobactérias contendo pTRV RNA1 e pTRV RNA2 contendo os insertos dos genes, foram incubadas a 30°C em meio LB contendo 15 g/l de ágar durante três dias. As bactérias multiplicadas contendo as construções pTRV RNA2 foram retiradas do meio de cultura com o auxílio de lamínulas e palito de dente, colocadas em tubos de 1,5 ml e misturadas àquelas contendo pTRV RNA1 na proporção 2:1.

Um fragmento do gene *NbPDS* de *N. benthamiana* na orientação senso foi utilizado como controle, cujo silenciamento afeta a biossíntese de carotenóides, provocando o branqueamento das folhas afetadas (Liu et al.,

2002a). Isso permite a detecção visual do silenciamento, podendo inferir indiretamente a proporção e o tempo em que o silenciamento ocorre nos demais genes.

A inoculação das plantas consistiu na formação de orifícios no pecíolo de duas folhas de tomateiro com a utilização de palitos de dente e adição da mistura de agrobactérias.

### **Experimento 1**

Plantas de 'Motelle' com 21 dias de idade mantidas em casa de vegetação tiveram o sistema radicular partido ao meio e foram mantidas em água contendo 0,3 g/l de adubo Ouro Verde durante uma semana. Metade foi colocada em vasos de 200 cm<sup>3</sup> contendo solo e a outra metade em vasos contendo areia, visando posterior coleta para extração de RNA para confirmação do silenciamento. A agroinoculação foi efetuada quando as plantas estavam com seis semanas de idade. Uma folha de cada planta foi agroinoculada com a mistura de pTRV RNA2 contendo o inserto na orientação senso e outra com a mistura contendo o inserto na orientação antisenso.

Os clones testados foram SSH08D08 (similar a *MtN19*), SSH10H09 (semelhante a *Ki1*), SSH09D04 (similar ao gene que codifica para a defensina), SSH11C07 (similar ao gene que codifica para uma cinase dependente de cálcio), SSH11D07 (*D13F MYB ST1*), SSH11H11 (similar ao gene que codifica para uma proteína envolvida com resposta de resistência), SSH09G01 (*Myb1*) e SSH10F12 (gene relacionado à SAR) transferidos para pTRV RNA 2.

Foram agroinoculadas 12 plantas de 'Motelle' com pTRV RNA2 contendo insertos dos genes selecionados, dez com pTRV RNA2 contendo o fragmento do gene *NbPDS*, dez com o pTRV RNA2 vazio, dez plantas foram somente furadas nos pecíolos das folhas sem adição de agrobactérias assim como dez plantas de 'MoneyMaker'. Foram inoculadas 1000 J<sub>2</sub> de *M. incognita* por planta, 40 dias após a agroinoculação e foram avaliadas quanto à infecção por nematóides após mais 40 dias. O sistema radicular no substrato areia foi coletado no dia da inoculação.

## Experimento 2

Plantas de 'Motelle' com 30 dias de idade mantidas em casa de vegetação tiveram o sistema radicular retirado. O caule foi partido ao meio e uma das partes foi colocada em vasos contendo solo e a outra em vasos contendo areia. A agroinoculação foi efetuada quando as plantas estavam com seis semanas de idade. Uma folha de cada planta foi agroinoculada com a mistura de pTRV RNA2 contendo o inserto na orientação senso e outra com a mistura contendo o inserto na orientação antisense.

Os clones testados foram os mesmos do experimento anterior.

Foram agroinoculadas 12 plantas de 'Motelle' com pTRV RNA2 contendo insertos dos genes selecionados, dez com pTRV RNA2 contendo o inserto do gene *NbPDS*, dez com o pTRV RNA2 vazio, dez plantas foram somente furadas nos pecíolos das folhas sem adição de agrobactérias assim como dez plantas de 'Moneymaker'.

## Experimento 3

Plantas de 'Motelle' mantidas em casa de vegetação em vasos contendo solo e areia na proporção 1:1 com um mês de idade foram agroinoculadas com os mesmos clones dos experimentos anteriores. Duas folhas de cada planta foram agroinoculadas com a mistura de pTRV RNA2 contendo o inserto na orientação senso. As plantas foram regularmente adubadas com Ouro Verde.

Foram agroinoculadas 20 plantas de 'Motelle' com pTRV RNA2 contendo insertos dos genes selecionados, dez com pTRV-RNA2 contendo o inserto do gene *NbPDS*, doze com o pTRV-RNA2 vazio, doze plantas foram somente furadas nos pecíolos das folhas sem adição de agrobactérias assim como doze plantas de 'Moneymaker'. A inoculação com 1000 J<sub>2</sub> de *M. incognita* foi realizada 23 dias após a agroinoculação. As raízes de seis plantas contendo as construções com os fragmentos dos genes da biblioteca Mol 24 e três plantas do controle inoculado com o vetor viral vazio e do controle não inoculado foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C. Nesse caso a confirmação do silenciamento seria inferido pela determinação dos níveis dos transcritos nessas plantas. Após mais 40 dias as plantas foram avaliadas quanto à presença de galhas e massas de ovos nas raízes.

#### **Experimento 4**

Plantas de 'Motelle' mantidas em casa de vegetação em vasos contendo solo e areia na proporção 1:1 com um mês de idade foram agroinoculadas com todas as 20 construções da biblioteca Mol 24h, citados inicialmente, transferidas para pTRV RNA 2. Plantas de 'Moneymaker' foram agroinoculadas com os clones SSH08D08 (similar a *MtN19*), SSH11C07 (similar ao gene que codifica para uma cinase dependente de cálcio), SSH09A04 (*AXR 1*), SSH08A05 (similar ao gene que codifica para uma proteína de membrana que se liga a esteróide) e SSH01E06 (similar ao gene que codifica para uma proteína transportadora de peptídeos) e MMI24B05 (similar ao gene que codifica para uma esfingosina 1-fosfato liase) transferidos para pTRV RNA 2. Duas folhas de cada planta foram agroinoculadas com a mistura de pTRV RNA2 contendo o inserto na orientação senso. As plantas foram regularmente adubadas com Ouro Verde.

Foram agroinoculadas 20 plantas com pTRV RNA2 contendo insertos dos genes selecionados, dez com pTRV RNA2 contendo inserto do gene *NbPDS*, doze com o pTRV RNA2 vazio, doze plantas foram somente furadas nos pecíolos das folhas sem a adição de agrobactérias. Todos correspondentes para 'Motelle' e 'Moneymaker', conforme as construções utilizadas. Foram utilizados os tratamentos controle para os dois cultivares.

## **RESULTADOS**

#### **Experimento 1**

Os sintomas do silenciamento gênico no controle (*NbPDS*) foram observados a partir de 14 dias após a agroinoculação. Sete entre dez plantas apresentaram branqueamento no momento da inoculação com *M. incognita*, indicando que o silenciamento gênico provavelmente estava ocorrendo em 70% das plantas. Todas as plantas apresentaram sintomas de infecção sistêmica viral.

Este experimento não obteve sucesso porque o tempo requerido para o caule da planta estar apto a ser partido, a emissão de novas raízes e o estresse provavelmente afetou a multiplicação viral, atrasando o silenciamento

e a inoculação com *M. incognita*, não sendo constatadas galhas nem mesmo no controle suscetível. Além disso, o ferimento favoreceu a infecção por outros patógenos, provocando perdas de repetições.

### **Experimento 2**

Este experimento não obteve sucesso porque possivelmente houve problemas com o substrato e todas as plantas apresentaram amarelecimento da parte aérea. Além disso, o ferimento novamente favoreceu a infecção por outros patógenos, provocando perdas de repetições.

### **Experimento 3**

Nove entre dez plantas apresentaram branqueamento no momento da inoculação com *M. incognita*, indicando que o silenciamento gênico provavelmente estava ocorrendo em 90% das plantas. Todas as plantas apresentaram sintomas de infecção sistêmica viral.

Não foi possível detectar alterações no fenótipo da resistência mediada pelo gene *Mi-1* pelos resultados desse experimento. Não houve diferenças estatísticas no número de galhas ou fêmeas presentes das plantas agroinoculadas e das plantas resistentes não agroinoculadas (menos de uma galha por planta, em média). O controle suscetível apresentou mais de 100 galhas por planta. Não houve alteração no fenótipo quanto às características morfológicas nas plantas submetidas ao VIGS.

### **Experimento 4**

Houve problemas no estabelecimento do silenciamento gênico, caracterizado pela baixa percentagem (30%) de plantas apresentando sintomas de silenciamento nas plantas inoculadas com a construção controle (*NbPDS*). O ensaio foi abortado.

## **DISCUSSÃO**

Em vista dos resultados insatisfatórios obtidos, os procedimentos de indução de silenciamento necessitam serem aprimorados para ensaios futuros

visando estudo funcional em larga escala para o sistema ou restringir o número de genes selecionados e realizar estudo funcional utilizando plantas transgênicas. No patossistema tomateiro-*M. incognita*, a grande dificuldade está no longo tempo requerido até a análise dos resultados, assim como a disponibilidade de inóculo nas épocas frias do ano. Outra dificuldade está no tecido em que ocorre a interação. Para a confirmação do silenciamento gênico é necessária a coleta do tecido em que se deseja analisar, sem causar danos que possam influenciar nos resultados. O substrato utilizado nos experimentos foi areia ou areia e solo (1:1), sem adição de matéria orgânica, para favorecer a infecção pelo patógeno e, principalmente, para evitar injúrias durante a coleta. Além disso, para analisar grande quantidade de plantas, foram utilizados vasos de 200 cm<sup>3</sup>. Possivelmente o substrato pobre, a restrição no volume e o requerimento de longo período de tempo nessas condições foi um dos obstáculos para a obtenção de resultados satisfatórios.

Para a utilização do VIGS para os estudos funcionais nesse patossistema ainda é necessário determinar quais as melhores condições de manutenção das plantas, obter plantas silenciadas com idade mais precoce possível, verificar a cinética do silenciamento para determinar o melhor momento para o confronto com o patógeno e testar outros vetores disponíveis para escolha daquele que induzir silenciamento especificamente no local de estabelecimento do patógeno.

## LITERATURA CITADA

BURCH-SMITH, T.M.; ANDERSON, J.C.; MARTIN, G.B.; DINESH-KUMAR, S.P. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. **Plant Journal**, v.39, p.734-746, 2004.

HAMILTON, A.J.; BAULCOMBE, D.C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, v.286, p.950-952, 1999.

LIU, Y.; SCHIFF, M.; DINESH-KUMAR, S.P. Virus-induced gene silencing in tomato. **Plant Journal**, v.31, p.777-786, 2002a.

LIU, Y.; SCHIFF, M.; MARATHE, R.; DINESH-KUMAR, S.P. Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for *N*-mediated resistance to Tobacco mosaic virus. **Plant Journal**, v.30, p.415-429, 2002b.

MARTINEZ, J.; PATKANIOWSKA, A.; URLAUB, H.; LUHRMANN, R.; TUSCHL, T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. **Cell**, v.110, p.563-574, 2002.

PEART, J.R.; COOK, G.; FEYS, B.J.; PARKER, J.E.; BAULCOMBE, D.C. An *EDS1* orthologue is required for *N*-mediated resistance against *Tobacco mosaic virus*. **Plant Journal**, v. 29, p.589-579, 2002.

RYU, C-M.; ANAND, A.; KANG, L.; MYSORE, K.S. Agrodrench: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse Solanaceous species. **Plant Journal**, v.40, p.322-331, 2004.

TIJSTERMAN, M.; KETTING, R.F.; PLASTERK, R.H.A. The genetics of RNA silencing. **Annual Reviews of Genetics**, v.36, p.489-510, 2002.

FAIVRE-RAMPANT, O.; GILROY, E.M.; HRUBIKOVA, K.; HEIN, I.; MILLAM, S.; LOAKE, G.J.; BIRCH, P.; TAYLOR, M.; LACOMME, C. *Potato virus X*-induced gene silencing in leaves and tuber of potato. **Plant Physiology**, v.134, p.1308-1316, 2004.

VALENTINE, T.; SHAW, J.; BLOK, V.C.; PHILLIPS, M.S.; OPARKA, K.J.; LACOMME, C. Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified *Tobacco rattle virus* vector. **Plant Physiology**, v.136, p.3999-4009, 2004.

Tabela 5 – Oligonucleotídeos utilizados para o ensaio de PCR quantitativa

Oligonucleotídeos	Seqüência	Proteína codificada pelos genes (amplicon)
RT-Actin-F	5'-CGGTGACCACTTTCCGATCT-3'	Actina 2 (62bp)
RT-Actin-R	5'-TCCTCACCGTCAGCCATTTT-3'	
RT-TUB6-F	5'-TTGGTTTTGCACCACTGACTTC-3'	β-6-tubulina (65bp)
RT-TUB6-R	5'-AAGCTCTGGCACTGTCAAAGC-3'	
RT-EF1-F	5'-GATTGACAGACGTTCTGGTAAGGA-3'	Fator de elongação 1α (67bp)
RT-EF1-R	5'-ACCGGCATCACCATTCTTCA-3'	
RT-G3PDH-F	5'-GCCAGGGTGGCTCTACAAAG-3'	G3PDH (64bp)
RT-G3PDH-R	5'-CGGTGATGAAGGGATCGTTAA-3'	
RT-UBQ10-F	5'-GGTTTTTAAGTTGTGGTTGTCTGGTT-3'	Ubiquitina 10 (112bp)
RT-UBQ10-R	5'-AAAAGCGAAAACACATTGATGATC-3'	
RT-APT1-F	5'-GAACAGACAAGATTGAGATGCATGTA-3'	Adenosil-fosforibosil transferase 1 (60bp)
RT-APT1-R	5'-CCACGAGGGCACGTTCA-3'	
RTSSH08D08-F	5'-TGGTTACATAGTCGGGATGTCTAGTT-3'	MtN19 (68 bp)
RTSSH08D08-R	5'-TCTCCCCTGCCGAGATCTTA-3'	
RTSSH10H09-F	5'-AGGATTGAAGGCAAGATCTGATG-3'	Ki1 (68 bp)
RTSSH10H09-R	5'-TGAAGCAAACGTGTAACTGGAA-3'	
RTSSH09D04-F	5'-GGTAATTGTAGCCGTCATGCA-3'	Defensina (65 bp)
RTSSH09D04-R	5'-CCACTTCTGTGACAAGCTCCAA-3'	
RTSSH11C07-F	5'-TCTTTAAGCCAGGACAAATATTCACA-3'	Cinase dependente de cálcio (68 bp)
RTSSH11C07-R	5'-AAGCACCTCAGGAGCCACAT-3'	
RTSSH11D07-F	5'-ACTCCAATGGTATCGAGGGATT-3'	D13F MYB ST1 (63 bp)
RTSSH11D07-R	5'-GTTGCTTTGCATCTCAGCTTGT-3'	
RTSSH11H11-F	5'-AGGAGGGACTGGCAAGTATGAG-3'	Proteína relacionada à resposta de resistência (66 bp)
RTSSH11H11-R	5'-TCCACGTGAGGAAGAGTTTCG-3'	
RTSSH09G01-F	5'-GTTTTCAATGCCTAATCCATCAA-3'	Myb1 (67 bp)
RTSSH09G01-R	5'-TGGCTCGATTGTTGAATTGTG-3'	
RTSSH01D07-F	5'-CTGAGAATGGCAGAGCACTTTG-3'	Similar a Sw5/Prf (66 bp)
RTSSH01D07-R	5'-GGCGACTTCCCCATCAAC-3'	
RTSSH08G08-F	5'-ACTCGATCTTGCCCATTTGG-3'	Similar a Bs2 (62 bp)
RTSSH08G08-R	5'-TTGCTTTGCTTGTGTTTTCCA-3'	
RTSSH09H04-F	5'-GGTGCTCCTCTTCCACTTTGC-3'	PAL2 (66 bp)
RTSSH09H04-R	5'-GCACGCTTTGAAGTGTCCAA-3'	
RTSSH10F12-F	5'-ATCTGATATATTTGATTACTGGATCGTCTGT-3'	Proteína relacionada à SAR (83 bp)
RTSSH10F12-R	5'-CACAACCTGATTAACAAGCATAACAACCT-3'	
RTSSH08C05-F	5'-CTTTTTGCTGATACAGTTGTCAAATTG-3'	Similar a PR10 (62 bp)
RTSSH08C05-R	5'-CACCGTTACCACCAAGAGCTATG-3'	
RTSSH09A10-F	5'-GCCCCAACCAAGAAAGATTCA-3'	Peroxidase 10 (66 bp)
RTSSH09A10-R	5'-CGAACCTGTTAATTGAGACTGCAT-3'	
RTSSH08F06-F	5'-CCATGGCTCGCAATTATGCT-3'	Proteína desconhecida (71 bp)
RTSSH08F06-R	5'-TGAATGAGCCAAGTAAACAGATATCAC-3'	
RTSSH08G02-F	5'-TGTTGGTTTATGAATACATGCCTAATG-3'	Receptor cinase (68 bp)
RTSSH08G02-R	5'-CAACACAAACTTCCACCATGA-3'	
RTSSH09A04-F	5'-TGCCGGTATGGTGCTTCTG-3'	AXR 1 (57 bp)
RTSSH09A04-R	5'-TGCAACTCCTCCGACAAAGG-3'	
RTSSH09C12-F	5'-TCCTTTTTGAACTAATCACCGCTAT-3'	Serina/treonina cinase (69 bp)
RTSSH09C12-R	5'-TTGCCGCAAGATTTACATATTCC-3'	
RTSSH10G01-F	5'-TTTCCCTAGACAAGTTAGTACTCGTCGAA-3'	Proteína hipotética (74 bp)
RTSSH10G01-R	5'-GGATCATCAGTAAATGCACCAACA-3'	
RTSSH08A05-R	5'-TGGCCCATCTGGAAGCA-3'	Proteína de membrana que se liga a esteróide (60 bp)
RTSSH08A05-R	5'-TTGTCAACATCACCGTCAGACTT-3'	
RTSSH01E06-F	5'-CTCTTTGTCGAGCAAGGTGATG-3'	Proteína transportadora de peptídeos (67 bp)
RTSSH01E06-R	5'-TGCTTGCTGCTGGAATCCT-3'	
RTSSH01D12-F	5'-GTCCCCAAAAAATATATCGAAGTGCTT-3'	Ligatina (80 bp)
RTSSH01D12-R	5'-ACTTGAACAGCATATAGGGAATATAACCT-3'	

Tabela 6 – Lista adicional dos ESTs derivados da biblioteca subtrativa da interação resistente tomateiro-*Meloidogyne incognita* 24 horas após a inoculação (Moi 24h)

Categoria	Descrição	Gene (melhor valor de similaridade)	Clone	e-value (SGN)	Unigene (SGN)	e-value (NCBI)	Macro arranjo	Frequência na biblioteca
Apoptose, transporte	Apoptose, transporte intracelular de proteínas	Proteína expressa, baixa similaridade a proteína 31 associada ao receptor de células B [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	SSH09D09	4,0E-43	SGN-U197460	1,2E-57	+	1
Apoptose, transdução de sinais, transcrição	Transdução de sinais, regulação da transcrição, controle do ciclo celular e apoptose	Transducina / família de proteínas contendo repetições WD-40 [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01C12	1,0E-121	SGN-U215943	0,0E+01	-	1
Catabolismo	Catabolismo de treonina	Potencial sorbitol desidrogenase NAD-dependente [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH12H04	0,0E+01	SGN-U219599	0,0E+01	NT	1
Controle do ciclo celular	Desconhecido	Similar a proteína nuclear [ <i>Oryza sativa</i> (grupo japônica)]; relacionado com controle do ciclo celular	SSH10H07	0,0E+01	SGN-U218985	9,0E-118	+	1
Controle do ciclo celular, transdução de sinais	Fosforilação de amino ácidos de proteínas	Cadeia alfa da proteína cinase (CK2) [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]; potencial função no controle do ciclo celular	SSH13F06	1,0E-141	SGN-U213919	0,0E+01	NT	1
Proteção à célula	Atividade antioxidante	Tioredoxina peroxidase 1 [ <i>Lycopersicon esculentum</i> ]	SSH08B06	1,0E-170	SGN-U214598	1,9E-87	-	2
Proteção à célula	Resposta a estresse oxidativo	Precursor de peroxidase ( <i>L. esculentum</i> ); peroxidase rip1 induzido por <i>Rhizobium</i>	SSH13E10	0,0E+01	SGN-U214243	6,0E-101	NT	2
Parede celular	Elongação celular	Proteína similar a extensina [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH08D05	0,0E+01	SGN-U224806	8,0E-12	-	3
Parede celular	Atividade celulose sintase, transferase	Celulose sintase [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	SSH08E10	2,0E-77	SGN-U218183	0,0E+01	-	4
Parede celular	Atividade celulose sintase, transferase	Glicosiltransferase 10 [ <i>Ipomoea trifida</i> ]	SSH02H10	0,0E+01	SGN-U215015	0,0E+01	-	1
Parede celular	Organização e biogênese de parede celular	Família de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01G06	0,0E+01	SGN-U215186	4,0E-167	-	2
Parede celular	Atividade de pectina esterase, inibidora de enzimas, molécula estrutural	Pectina metilesterase isoforma alfa [ <i>Vigna radiata</i> ]	SSH14G08	1,0E-124	SGN-U256270	9,4E-72	NT	1
Parede celular	Biossíntese de lignina, via dos fenilpropanóides	Cafeoil-CoA O-metiltransferase (CCoAMT) [ <i>S. tuberosum</i> ]	SSH01F05	0,0E+01	SGN-U214088	2,0E-135	-	5
Defesa	Defesa contra ataque de insetos	Inibidor metalocarboxipeptidase [ <i>S. tuberosum</i> ]	SSH09B03	0,0E+01	SGN-U220039	2,8E-04	+	1
Defesa	Induzido por harpinas	Família 1 de proteínas induzidas por harpinas (HIN1) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH11E11	7,0E-78	SGN-U221237	3,2E-59	-	1
Defesa	Resposta de hipersensibilidade, atividade quitinase	Quitinase classe IV [ <i>Vitis vinifera</i> ]	SSH08C06	0,0E+01	SGN-U214902	2,0E-106	+	4
Defesa	Brotamento de vesículas de transporte, divisão de organelas, citocinese, resistência a patógenos	Homólogo de dinamina [ <i>Astragalus sinicus</i> ]	SSH08A09	0,0E+01	SGN-U247984	3,1E-26	+	1

Categoria	Descrição	Gene (melhor valor de similaridade)	Clone	e-value (SGN)	Unigene (SGN)	e-value (NCBI)	Macro arranjo	Frequência na biblioteca
Defesa	Potencial alfa-dioxigenase patógeno-responsivo ( <i>Nicotiana attenuata</i> ), atividade peroxidase e oxidoreductase	Proteína relacionada a Feebly [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH11A11	0,0E+01	SGN-U237212	9,8E-65	+	8
Defesa	Inibidor de protease / reserva de sementes / família de proteínas de transferência de lipídios (LTP)	Proteína hipotética 10.0K (TED4) [ <i>Zinnia elegans</i> ]	SSH13F09	2,0E-89	SGN-U214087	6,6E-25	NT	2
Defesa	Resposta a nitrato	Similar à proteína induzida por nitrato (NOI) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH11B02	0,0E+01	SGN-U257205	3,4E-16	+	1
Defesa	Resposta a nitrato	Proteína NOI, induzida por nitrato [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH12B03	0,0E+01	SGN-U226737	1,2E-24	NT	2
Defesa	Resposta a patógenos, transdução de sinais	Proteína 14-3-3 (TFT10) [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH13A10	0,0E+01	SGN-U214588	2,0E-137	NT	2
Defesa	Resposta a estresse, ABA e nematóides	Potencial proteína abundante em estágios tardios da embriogênese [ <i>O. sativa</i> (grupo japonica)]	SSH08B05	2,0E-70	SGN-U218298	5,0E-116	-	7
Defesa, transporte	Transporte de carboidratos, cromatos, ânions inorgânicos e orgânicos, fosfatos, resposta de defesa	Transportador de glicerol-3-fosfato (glicerol 3-fosfato permease) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01D05	1,0E-49	SGN-U221867	8,4E-57	-	1
Defesa, transporte	Transporte de amino ácidos, resposta de defesa, biossíntese de fosfolipídeos e cobalamina	Família de transportadores de amino ácidos [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH08G07	0,0E+01	SGN-U217703	8,0E-104	-	1
Resposta a hormônios	Relacionada a auxina	Relacionado à proteína induzida por auxinas [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09D02	5,0E-31	SGN-U247037	7,1E-96	+	3
Resposta a hormônios	Relacionada a auxina	Relacionado à proteína axi 1 de <i>N. tabacum</i> [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH12D07	1,0E-155	SGN-U215673	0,0E+01	NT	2
Resposta a hormônios	Proteína reprimida por citocinina	Proteína reprimida por citocininas (CR9) [ <i>Cucumis sativus</i> ]	SSH10G03	1,0E-21	SGN-U212706	3,6E-24	-	1
Metabolismo	Metabolismo de antibióticos	Glucosiltransferase [ <i>N. tabacum</i> ]	SSH10E10	1,0E-175	SGN-U225901	4,0E-106	+	2
Metabolismo	Metabolismo de ATP	Adenilato cinase-b (ATP-AMP transferase) [ <i>O. sativa</i> ]	SSH12B12	0,0E+01	SGN-U215591	4,0E-121	NT	4
Metabolismo	Metabolismo de carboidratos	Poligalacturonase [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH02A05	9,0E-97	SGN-U209677	7,2E-80	-	1
Metabolismo	Metabolismo de carboidratos	Beta-primeverosidase, família glicosil hidrolase 1 [ <i>Citrus sinensis</i> ]	SSH10C01	9,0E-22	SGN-U217343	4,0E-171	-	1
Metabolismo	Metabolismo de carboidratos	Beta-primeverosidase, família glicosil hidrolase 1 [ <i>C. sinensis</i> ]	SSH10G11	2,0E-86	SGN-U214166	3,0E-168	-	4
Metabolismo	Metabolismo de carboidratos	Família glicosida hidrolase 2 [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01A11	0,0E+01	SGN-U250607	3,0E-115	+	1
Metabolismo	Atividade catalítica	Família de isocorismatase hidrolase [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09G04	0,0E+01	SGN-U218436	3,6E-83	+	1
Metabolismo	Atividade catalítica, acil-CoA tioesterase e hidrolase	Relacionado a tioesterase [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH10H08	4,0E-83	SGN-U221413	5,1E-31	+	1

Categoria	Descrição	Gene (melhor valor de similaridade)	Clone	e-value (SGN)	Unigene (SGN)	e-value (NCBI)	Macro arranjo	Frequência na biblioteca
Metabolismo	Atividade catalítica, atividade fosfórico monoéster hidrolase	Potencial proteína relacionada ao amadurecimento [ <i>V. vinifera</i> ]	SSH09B12	0,0E+01	SGN-U213072	1,0E-131	+	3
Metabolismo	Biossíntese de glicosinolato	Oxidoreductase, família de proteínas oxigenase 2OG-Fe(II) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH02H02			4,0E-04	-	1
Metabolismo	Metabolismo de glicerolipídios e glicosfingolipídios, degradação de fosfolipídios	Fosfatase alfa do ácido fosfatídico [ <i>Vigna unguiculata</i> ]	SSH11A12	5,0E-17	SGN-U215815	5,0E-122	+	1
Metabolismo	Metabolismo de glicerolipídios e glicosfingolipídios, degradação de fosfolipídios	Fosfatase alfa do ácido fosfatídico [ <i>V. unguiculata</i> ]	SSH08B04	0,0E+01	SGN-U215815	5,0E-122	-	1
Metabolismo	Metabolismo de glicerol	Similar ao precursor de glicerofosforil diéster fosfodiesterase 1 [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH12A06	0,0E+01	SGN-U219870	3,4E-59	NT	2
Metabolismo	Biossíntese de glicolipídios	MGDG sintase tipo A [ <i>N. tabacum</i> ]	SSH09D01	3,0E-91	SGN-U219269	0,0E+01	+	7
Metabolismo	Biossíntese de glicolipídios	MGDG sintase tipo A [ <i>N. tabacum</i> ]	SSH10D12	1,0E-114	SGN-U212969	0,0E+01	+	1
Metabolismo	Glicólise	Frutose-bisfosfato aldolase [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH14E05	0,0E+01	SGN-U212968	0,0E+01	NT	5
Metabolismo	Glicólise	Hexocinase [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH01A05	5,0E-62	SGN-U228100	1,2E-89	-	2
Metabolismo	Glicólise, biossíntese de lisina, de metionina e treonina	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase [ <i>S. tuberosum</i> ]	SSH09C05	0,0E+01	SGN-U212862	1,0E-170	-	1
Metabolismo	Transporte de lipídios, metabolismo de lipoproteínas	Similar à cadeia pesada da miosina [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH11G10	1,0E-78	SGN-U215000	6,0E-115	+	3
Metabolismo	Catabolismo de L-fenilalanina, metabolismo de tirosina	Homogentisate 1,2-dioxigenase [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH14F02	1,0E-134	SGN-U225649	4,3E-84	NT	3
Metabolismo	Biossíntese de manose e ácido colânico	Relacionado a fosfomanomutase [ <i>O. sativa</i> (grupo japonica)]	SSH11D05	1,0E-160	SGN-U216352	9,0E-119	-	1
Metabolismo	Atividade oxidoreductase	Potencial flavonol sintase [ <i>O. sativa</i> (grupo japonica)]	SSH12E02	0,0E+01	SGN-U213371	8,5E-62	NT	1
Metabolismo	Metabolismo de riboflavina	Relacionado a fosfatase ácida [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH02G07	0,0E+01	SGN-U223810	4,6E-71	-	1
Metabolismo	Biossíntese de esteróis	C-8,7 esteroil isomerase [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09A03	1,0E-160	SGN-U215678	2,2E-79	-	1
Metabolismo	Biossíntese de esteróis	Esqualeno epoxidase [ <i>Panax ginseng</i> ]	SSH10H10	0,0E+01	SGN-U218568	1,1E-64	+	2
Metabolismo	Metabolismo de sacarose	Sacarose sintase [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH14F03	1,0E-57	SGN-U213119	0,0E+01	NT	3
Metabolismo	Ciclo dos ácidos tricarbóxicos	Malato desidrogenase [ <i>Citrullus lanatus</i> ]	SSH08C10	1,0E-83	SGN-U218104	5,0E-152	-	1
Metabolismo	Ciclo dos ácidos tricarbóxicos	Citrato sintase [ <i>N. tabacum</i> ]	SSH10A08	1,0E-147	SGN-U216974	0,0E+01	+	1
Metabolismo	Biossíntese de tetrahydrobiopterinas, relacionado com a elongação de ácidos graxos saturados e insaturados	Potencial álcool desidrogenase do tipo cadeia leve [ <i>S. tuberosum</i> ]	SSH10D08	0,0E+01	SGN-U214301	5,0E-91	+	1
Metabolismo, transcrição	Metabolismo de amino ácidos, regulação da transcrição	Potencial desidratase/deaminase [ <i>O. sativa</i> (grupo japonica)]	SSH02H06	1,0E-128	SGN-U215899	1,2E-57	-	5
Metabolismo, transporte	Biossíntese de amino ácidos aromáticos, transporte de elétrons	Potencial xantina desidrogenase [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09H01	0,0E+01	SGN-U214062	0,0E+01	+	1

Categoria	Descrição	Gene (melhor valor de similaridade)	Clone	e-value (SGN)	Unigene (SGN)	e-value (NCBI)	Macro arranjo	Frequência na biblioteca
Metabolismo, transporte	Metabolismo de compostos aromáticos, transporte de elétrons	Monooxigenase 1 [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH08C03	0,0E+01	SGN-U217723	4,50E-53	+	1
Outros	Movimento baseado em filamentos de actina	Miosina XI [ <i>N. tabacum</i> ]	SSH01A02	1,0E-118	SGN-U228211	1,30E-79	+	1
Outros	Atividade catalítica e hidrolase	Relacionado com esterase D [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01E08	0,0E+01	SGN-U214806	3,0E-131	-	1
Outros	Organização da cromatina	Fator de fixação ao MFP1 [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH08H06	0,0E+01	SGN-U216822	4,4E-66	+	1
Outros	Organização e biogênese do cromossomo	Histona H2B-2 [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH02B06	0,0E+01	SGN-U232636	5,6E-43	-	1
Outros	Ativador de GTPase	Proteína relacionada com a ativação de GTPase [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01A04	1,0E-174	SGN-U216424	3,00E-173	-	1
Outros	Lipase	Proteína lipase/hidrolase com domínio GDSL [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH13G02	0,0E+01	SGN-U233719	2,0E-46	NT	1
Outros	Tráfego de membrana, proteína de resistência, formação de rede de interações proteína-proteína	Proteína de membrana com 27k associada à vesículas (VAP27) [ <i>Nicotiana glaberrima</i> ]	SSH01H10	0,0E+01	SGN-U253996	1,1E-71	-	1
Outros	Pararetrovírus	Potencial proteína de capa protéica [Tobacco vein-clearing virus]	SSH11D06			3,0E-26	+	7
Outros	Dobramento de proteínas	Chaperonina [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH12H03	0,0E+01	SGN-U197417	8,0E-105	NT	1
Outros	Dobramento de proteínas	Chaperonina [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH11B07	0,0E+01	SGN-U222270	4,7E-60	+	5
Outros	Resposta a antibióticos	Similar a gda-1 [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH08C08	2,0E-54	SGN-U213660	9,3E-82	+	1
Outros	Retrotransposon	Potencial poliproteína [ <i>Solanum demissum</i> ]	SSH14C10	1,0E-129	SGN-U106390	7,0E-28	NT	2
Outros	Retrotransposon	Potencial poliproteína, 3'-parcial [ <i>S. demissum</i> ]	SSH02B02	1,0E-162	SGN-U106438	1,0E-128	+	1
Outros	Ligação ao RNA	Domínio de reconhecimento de RNA (RRM) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH13G06	0,0E+01	SGN-U218722	8,8E-41	NT	1
Outros	Metabolismo de RNA/DNA em mitocôndrias e cloroplastos	Proteína contendo repetições pentatricopeptídeo (PPR) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH08A02	0,0E+01	SGN-U230315	7,9E-64	+	1
Resposta a patógenos	Induzido por AvrBs3	Desconhecido [ <i>C. annuum</i> ]	SSH09G03	0,0E+01	SGN-U218546	7,3E-76	-	7
Resposta a patógenos	Desconhecido	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH08F10	1,0E-133	SGN-U223883	6,6E-54	-	1
Resposta a patógenos, metabolismo	Biossíntese de NAD	Proteína de ligação a GTP [ <i>C. annuum</i> ]	SSH11H06	1,0E-137	SGN-U214195	0,0E+01	+	1
Resposta a patógenos, metabolismo	Via das pentoses-fosfato, biossíntese de porfirina, resposta a pragas, patógenos ou parasitas	Proteína relacionada a 3-hidroxi-isobutirato desidrogenase [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH08A01	1,0E-128	SGN-U230819	3,5E-60	-	1
Resposta a patógenos, transcrição	Atividade de fator de transcrição	Similar ao fator de transcrição homeobox Hox7 [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH08D11	0,0E+01	SGN-U216436	4,1E-53	+	1
Biossíntese de fenilalanina	Atividade prefenato desidratase	Potencial prefenato desidratase [ <i>S. demissum</i> ]	SSH01G08	2,0E-09	SGN-U244855	0,0E+01	-	1
Degradação de proteínas	Ubiquitinação	Subunidade beta G1 do proteossoma 20S (PBG1) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH02F04	1,0E-152	SGN-U215895	1,0E-114	-	1

Categoria	Descrição	Gene (melhor valor de similaridade)	Clone	e-value (SGN)	Unigene (SGN)	e-value (NCBI)	Macro arranjo	Frequência na biblioteca
Degradação de proteínas	Ubiquitinação	Família de proteínas NPL4 [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH02F02	1,0E-69	SGN-U215568		-	1
Degradação de proteínas	Ubiquitinação	Potencial proteína RING zinc finger tipo C3HC4 [ <i>O. sativa</i> (grupo japônica)]	SSH13B11			2,0E-07	NT	1
Degradação de proteínas	Ubiquitinação	Família ubiquitina [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH02G05	1,0E-150	SGN-U217554	4,3E-36	-	1
Proteína ribossomal	Biossíntese de proteínas	Relacionada a proteína ribossomal 60S L21 [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH12B11	0,0E+01	SGN-U213265	1,6E-79	NT	1
Proteína ribossomal	Biossíntese de proteínas	Proteína ribossomal 60S L35a (RPL35aC) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09E05	1,0E-122	SGN-U213260	2,5E-56	-	1
Proteína ribossomal	Biossíntese de proteínas	Proteína ribossomal 60S L28 (RPL28A) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01H12	3,0E-21	SGN-U213137	1,2E-42	-	2
Proteína ribossomal	Biossíntese de proteínas	Proteína ribossomal 40S S14 (RPS14B) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09C01	0,0E+01	SGN-U213445	8,4E-60	NT	2
Proteína ribossomal	Biossíntese de proteínas	Proteína ribossomal 40S S11 (RPS11B) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH13A04	0,0E+01	SGN-U213250	9,8E-72	NT	2
Proteína ribossomal	Biossíntese de proteínas	Proteína ribossomal 60S L13A (RPL13aD) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH13G03	0,0E+01	SGN-U213298	8,0E-104	NT	2
Proteína ribossomal	Biossíntese de proteínas	Similar à proteína ribossomal L28 [ <i>O. sativa</i> (grupo japônica)]	SSH02H01	1,0E-179	SGN-U213136	2,6E-56	NT	4
Proteína ribossomal	Biossíntese de proteínas	Proteína ribossomal 60S L34 [ <i>S. demissum</i> ]	SSH12D11	0,0E+01	SGN-U215714	7,8E-48	NT	6
Proteína ribossomal	Biossíntese de proteínas	Proteína ribossomal L7a [ <i>O. sativa</i> (grupo japônica)]	SSH02G02	2,0E-59	SGN-U243901	4,9E-49	NT	1
Proteína ribossomal	Biossíntese de proteínas	Potencial proteína ribossomal S29 [ <i>O. sativa</i> (grupo japônica)]	SSH11D08	7,0E-86	SGN-U213322	7,5E-27	-	1
Proteína ribossomal	Biossíntese de proteínas, biogênese de ribossomos	Proteína regulada pelo amadurecimento DDTFR19 [ <i>L. esculentum</i> ]; similar à proteína ribossomal 60S	SSH01H03	1,0E-162	SGN-U216484	1,6E-23	NT	1
Proteína ribossomal	Biossíntese de proteínas, biogênese de ribossomos	Proteína ribossomal L23a [ <i>N. tabacum</i> ]	SSH02A12	1,0E-117	SGN-U214520	3,7E-58	NT	2
Proteína ribossomal	Biossíntese de proteínas, proteólise e peptidólise	Proteína ribossomal L7 [ <i>S. tuberosum</i> ]	SSH10D09	0,0E+01	SGN-U213499	6,0E-122	NT	3
Transdução de sinais	Proteína cinase anquirina	Potencial proteína cinase [ <i>O. sativa</i> (grupo japônica)]	SSH11F03	0,0E+01	SGN-U242722	8,9E-26	+	3
Transdução de sinais	Ligação a ATP, atividade cinase	Família de proteínas cinase contendo repetições ricas em leucina [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09A02	1,0E-115	SGN-U217560	6,0E-151	-	1
Transdução de sinais	Ligação a ATP, atividade cinase serina/treonina	Família de proteínas cinase [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01F06	0,0E+01	SGN-U225486	3,0E-136	-	1
Transdução de sinais	Ligação a ATP, atividade cinase serina/treonina	Potencial proteína cinase [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH02F06	1,0E-125	SGN-U216083	7,7E-44	-	1

Categoria	Descrição	Gene (melhor valor de similaridade)	Clone	e-value (SGN)	Unigene (SGN)	e-value (NCBI)	Macro arranjo	Frequência na biblioteca
Transdução de sinais	Biossíntese, fosforilação de proteínas, proteólise e peptidólise, via de sinalização do receptor transmembrana cinase tirosina	Proteína receptor cinase 2 [ <i>Glycine max</i> ]	SSH11E08	0,0E+01	SGN-U218475	0,0E+01	-	1
Transdução de sinais	Ligação ao DNA, ligação ao receptor interleucina-13	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH11D10	1,0E-141	SGN-U214634	6,0E-123	+	4
Transdução de sinais	Ligação a GTP, atividade adenil succinato sintase, ligação a cálcio	Relacionada à proteína de ligação a GTP [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01H06	3,0E-12	SGN-U216829	0,0E+01	-	1
Transdução de sinais	Proteína serine/treonina cinase	Família de proteínas cinase serina/treonina [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09D12	1,0E-132	SGN-U266190	3,0E-03	+	1
Transdução de sinais	Proteína contendo domínio Sacl / WW. Transdução de sinais	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH14F08	0,0E+01	SGN-U220446	2,0E-125	NT	2
Transdução de sinais, transcrição	Biossíntese de proteínas, transdução de sinais mediado por <i>small</i> GTPase, regulação da transcrição	Proteína relacionada a Ras (RAB8-5) [ <i>N. tabacum</i> ]	SSH01F09	1,0E-143	SGN-U213618	6,9E-96	-	1
Transdução de sinais, transcrição	Transdução de sinais, molécula sensora de dois componentes	Proteína relacionada a receptor cinase [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01E10	1,0E-122	SGN-U215679	6,3E-42	+	1
Transdução de sinais, transporte	Transporte intracelular de proteínas, percepção sensorial, transdução de sinais	Proteína relacionada com classificação de vacúolos; similar à proteína de embriogênese H beta 58 [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH02H12	7,0E-83	SGN-U217100	5,0E-158	NT	1
Transdução de sinais, transporte	Transporte de proteínas, ligação a nucleotídeos	Proteína similar a F6N15.8 [ <i>Mangifera indica</i> ]; transducinas / família de proteínas contendo repetições WD-40	SSH13F04	1,0E-145	SGN-U223776	1,0E-45	NT	1
Transdução de sinais, transporte	Envolvido nas vias de transdução mediada pela proteína G, transporte de elétrons	Proteína expressa similar a disulfide isomerase [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH10G12	4,0E-95	SGN-U214929	3,3E-83	+	1
Resposta a estresse	Ligação a metais pesados	Similar à metalotioneína tipo 2 [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH13C11	1,0E-155	SGN-U214788	5,6E-19	NT	2
Resposta a estresse	Ligação a metais pesados	Similar a metalotioneína tipo 2 A (LeMT(A)) [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH10F03	1,0E-132	SGN-U214993	1,2E-23	-	1
Resposta a estresse	Atividade co-chaperona e chaperona	Proteína homóloga a DnaJ [ <i>S. tuberosum</i> ]	SSH11B08	0,0E+01	SGN-U212655	0,0E+01	-	1
Resposta a estresse	Resposta à salinidade hiperosmótica	Proteína SL T4 [ <i>N. tabacum</i> ]	SSH11E05	0,0E+01	SGN-U218172	0,0E+01	+	1
Resposta a estresse	Resposta ao frio	Proteína similar a desidrina [ <i>Solanum sogarandinum</i> ]	SSH02D06	1,0E-104	SGN-U232499	9,0E-03	-	1
Resposta a estresse	Resposta ao frio, à dessecação e à salinidade hiperosmótica	Peroxidase [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH11G12	0,0E+01	SGN-U213324	0,0E+01	-	2
Resposta a estresse	Resposta ao calor	Proteína Heat shock 83 [ <i>Ipomoea nil</i> ]	SSH01B03	0,0E+01	SGN-U217418	0,0E+01	-	1
Resposta a estresse	Resposta ao estresse oxidativo	Peroxidase secretória [ <i>N. tabacum</i> ]	SSH08D12	2,0E-32	SGN-U212734	3,0E-170	-	2
Resposta a estresse	Resposta a privação de fosfato	Proteína TPS1, induzida por privação de fosfato [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH08F05			5,0E-17	-	1
Resposta a estresse	Resposta a ferimentos	KED [ <i>N. tabacum</i> ]	SSH01C06	3,0E-82	SGN-U216027	1,1E-11	-	1

Categoria	Descrição	Gene (melhor valor de similaridade)	Clone	e-value (SGN)	Unigene (SGN)	e-value (NCBI)	Macro arranjo	Frequência na biblioteca
Resposta a estresse, biossíntese de etileno	Enzima formadora de etileno	1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase 2 [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH01C02	3,0E-36	SGN-U212789	9,0E-169	-	1
Resposta a estresse, resposta a hormônios	Constituinte estrutural do citoesqueleto	Actina [ <i>Malva pusilla</i> ]	SSH01A07	1,0E-165	SGN-U213130	0,0E+01	-	1
Resposta a estresse, resposta a hormônios	Resposta ao frio, à privação de água e ao estímulo de ácido abscísico	Similar a desidrina C17 [ <i>S. tuberosum</i> ]	SSH01H11	2,0E-72	SGN-U213745	1,8E-38	-	1
Resposta a estresse, metabolismo	Biossíntese de proteínas, resposta ao calor	<i>Small heat shock protein de 17.7 kD da classe I</i> [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH02A03	0,0E+01	SGN-U212699	4,7E-64	+	2
Resposta a estresse, metabolismo	Relaxamento e rearranjo da parede celular	Proteína sadtomato [ <i>C. annuum</i> ]	SSH13A03	1,0E-116	SGN-U217823	e-115	NT	1
Resposta a estresse, transdução de sinais	Metabolismo, fosforilação de amino ácidos	Proteína cinase dependente de cálcio 3 [ <i>C. annuum</i> ]	SSH08C04	1,0E-82	SGN-U215948	2,0E-122	+	1
Resposta a estresse, transdução de sinais, degradação de proteínas	Ligação a ATP, atividade cinase, ubiquitinação, resposta a estresse	Família de proteínas cinases [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH11A04	1,0E-20	SGN-U202879	8,6E-63	+	6
Resposta a estresse, transcrição	Regulação da transcrição, oxidação do metanol, biossíntese de acetato	Relacionada à proteína induzida por desidratação [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01E12	0,0E+01	SGN-U215730	0,0E+01	+	2
Resposta a estresse, transcrição	Atividade de fator de transcrição	Potencial regulador da resposta à privação de fosfato [ <i>Solanum bulbocastanum</i> ]; potencial proteína cinase dependente de cálcio	SSH08E12	2,0E-92	SGN-U225941	1,2E-27	+	2
Resposta a estresse, transporte	Resposta ao estresse salino	Transportador de potássio HAK3p [ <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> ]	SSH11A09			9,0E-48	-	1
Transcrição	Atividade helicase ATP-dependente	RNA helicase PRH75 [ <i>C. annuum</i> ]	SSH08H04	3,0E-98	SGN-U218063	2,3E-25	-	1
Transcrição	Ligação ao DNA e ao RNA	Nucleolina de tabaco [ <i>N. tabacum</i> ]	SSH01B08	1,0E-142	SGN-U213956	5,0E-107	-	1
Transcrição	Ligação ao DNA, fator de transcrição	Potencial fator de transcrição TINY contendo o domínio AP2 [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01A09	1,0E-130	SGN-U229460	9,9E-27	-	1
Transcrição	Regulação negativa da transcrição; modificação do RNA	Relacionado ao fator associado a CCR4 [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH11A07	1,0E-56	SGN-U213840	3,0E-121	-	1
Transcrição	Biossíntese de nucleotídeos purina, regulação da transcrição	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH08C02	0,0E+01	SGN-U221353	6,1E-31	+	1
Transcrição	Regulação da transcrição	Relacionado à proteína zinc finger tipo CCCH e a uma repetição de anquirina [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH13A01	1,0E-125	SGN-U214167	1,0E-144	NT	1
Transcrição	Regulação da transcrição	Provável fator de transcrição [ <i>Vicia faba</i> ]	SSH01C01	0,0E+01	SGN-U214458	1,1E-35	-	1
Transcrição	Regulação da transcrição	Família de proteínas zinc finger TAZ [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH12E04	0,0E+01	SGN-U214874	7,0E-123	NT	1
Transcrição	Regulação da transcrição	Proteína Finger pcp1 [ <i>S. tuberosum</i> ]	SSH13C12	0,0E+01	SGN-U237253	2,4E-08	NT	4
Transcrição	Processamento de RNA	Similar à proteína de controle de ciclo celular crn (crooked neck) [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01H04	0,0E+01	SGN-U220979	0,0E+01	-	2

Categoria	Descrição	Gene (melhor valor de similaridade)	Clone	e-value (SGN)	Unigene (SGN)	e-value (NCBI)	Macro arranjo	Frequência na biblioteca
Transcrição	Fator de transcrição	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]; ativador transcricional TA9 [ <i>O. sativa</i> (grupo japônica)] 8e-15	SSH12F08	0,0E+01	SGN-U223247	8,4E-66	NT	1
Transcrição	Fator de terminação da transcrição	Similar ao fator terminador de transcrição mitocondrial [ <i>O. sativa</i> (grupo japônica)]	SSH08H10	8,0E-46	SGN-U231850	3,0E-19	-	5
Transcrição	Elongação durante a tradução	Fator de elongação da tradução eEF-1 cadeia alfa [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH02C07	0,0E+01	SGN-U212838	6,0E-144	-	2
Transporte	Síntese de ATP, transporte de íons de hidrogênio, trânsito de peptídeos	ATP sintase cadeia delta, precursor mitocondrial, ATPase de dois setores transportadora de H <sup>+</sup> [ <i>Ipomoea batatas</i> ]	SSH08H01	1,0E-110	SGN-U212969	5,0E-99	+	1
Transporte	Transporte de carboidratos, ânions inorgânicos, íons, fosfatos, e tetraciclina	Proteína relacionada a transporte [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH14D06	0,0E+01	SGN-U216314	1,0E-163	NT	1
Transporte	Ligação e armazenamento do íon de cálcio, transporte de elétrons, atividade isomerase e oxidoreductase	Proteína disulfide isomerase [ <i>Elaeis guineensis</i> ]; família de proteínas tioredoxina	SSH10B08	1,0E-157	SGN-U216778	1,0E-132	+	1
Transporte	Ligação a calmodulina, canal de íons	Potencial canal de íons regulado por nucleotídeos cíclicos e calmodulinas [ <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> ]	SSH08A12	0,0E+01	SGN-U262929	1,4E-49	-	1
Transporte	Ligação a DNA, transporte de elétrons, ligação a íons de zinco	Proteína zinc finger [ <i>O. sativa</i> (grupo cultivar indica)]	SSH10H04	0,0E+01	SGN-U216283	5,4E-59	+	1
Transporte	Transporte de elétrons	Relacionado a acetil-coA desidrogenase [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH02E10	0,0E+01	SGN-U215859	0,0E+01	-	1
Transporte	Transporte de elétrons	Relacionado ao citocromo c oxidase subunidade Vc [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH08A10	1,0E-130	SGN-U216256	5,3E-25	+	1
Transporte	Transporte de elétrons	Potencial família TM4 de proteínas endomembrana 70 [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH02C12	1,0E-144	SGN-U223018	9,0E-174	-	2
Transporte	Síntese de ATP ligado ao transporte de elétrons	Família de proteínas de membrana TMS, expressão diferencial em tumores [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01H07	8,0E-50	SGN-U228539	3,2E-69	-	1
Transporte	Transporte do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi	Pertence a GTPases da subfamília Rab1 [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH01D11	0,0E+01	SGN-U214787	9,0E-111	-	1
Transporte	Ligação a íons de metais	Proteína contendo domínio associado a metais pesados [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH02G01	1,0E-149	SGN-U215387	2,0E-38	+	4
Transporte	Transporte de íons de metais	Família de proteínas de ligação ao cobre similar ao fator de homeostase de cobre [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH13G09	2,0E-71	SGN-U224291	3,7E-32	NT	1
Transporte	Transporte de organelas	Potencial gene da cadeia leve da cinesina [ <i>O. sativa</i> (grupo japônica)]; contém repetições TPR	SSH02H11	1,0E-120	SGN-U256413	2,0E-104	-	1

Categoria	Descrição	Gene (melhor valor de similaridade)	Clone	e-value (SGN)	Unigene (SGN)	e-value (NCBI)	Macro arranjo	Frequência na biblioteca
Transporte	Transporte de proteínas, via secretória	Proteína de membrana carreadora secretória [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH02G09	0,0E+01	SGN-U216317	5,0E-101	-	2
Transporte	Possivelmente envolvido com transporte ou regulação dos níveis intracelulares de cálcio	Proteína da família reticulon (RTNLB1) [ <i>A. thaliana</i> ].	SSH02E11	4,0E-15	SGN-U244512	1,2E-74	-	1
Transporte	Canais de água	<i>Major intrinsic protein 2</i> [ <i>S. tuberosum</i> ]; <i>aquaporina 1</i> [ <i>A. cepa</i> ] 2e-129	SSH01C05	1,0E-88	SGN-U213111	4,0E-145	-	4
Transporte	Canais de água	Proteína de membrana associada com o amadurecimento [ <i>L. esculentum</i> ]	SSH02D05	1,0E-118	SGN-U212568	8,8E-60	-	1
Transporte, formação de nódulos	Transporte de amino ácidos, íons de cobalto, nitratos, poliamina e proteínas; nodulação; biogênese de citocromos	Potencial transportador ABC [ <i>O. sativa</i> (grupo japonica)]	SSH02A01	1,0E-176	SGN-U213231	0,0E+01	-	1
Transporte, formação de nódulos	Transporte de cátions e de íons de níquel, regulação do pH, patogênese, inibidor de proteína cinase	Proteína similar a nodulina, família de nodulina MtN21 [ <i>O. sativa</i> (grupo japonica)]	SSH08A03	1,0E-174	SGN-U226104	1,2E-97	-	2
Transporte, formação de nódulos	Transporte de cátions e de íons de níquel, regulação do pH, patogênese, inibidor de proteína cinase	Família de proteínas nodulina MtN21 [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01C08	1,0E-40	SGN-U224246	7,0E-123	-	1
Desconhecido	Atividade catalítica	Proteína expressa similar a PrMC3 [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH10B03	1,0E-134	SGN-U214554	3,0E-70	+	1
Desconhecido	Ligação a DNA	Similar à proteína de ligação ao metil-CpG MBD2 testículo específico de <i>Homo sapiens</i> [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09E02	0,0E+01	SGN-U219428	2,8E-23	+	1
Desconhecido	Similar a potencial proteína cinase	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH14B10	0,0E+01	SGN-U223247	8,4E-66	NT	1
Desconhecido	Ligação a proteínas	Família de proteínas contendo repetições de anquirina [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH11H04	0,0E+01	SGN-U249796	7,70E-11	+	1
Desconhecido	Ligação a RNA	Fator de splicing rico em arginina/serina (atSRp34), potencial NULL [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01D10	0,0E+01	SGN-U214908	2,0E-76	-	1
Desconhecido	Desconhecido	Potencial dioxigenase 2-oxoglutarato-dependente, similar ao 2A6 e proteína reguladora da síntese de etileno E8 de tomateiro [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH02B10	9,0E-17	SGN-U212803	7,0E-92	+	1
Desconhecido	Desconhecido	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01D09	0,0E+01	SGN-U229647	1,8E-14	-	1
Desconhecido	Desconhecido	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01D06	0,0E+01	SGN-U222402	4,9E-16	-	1
Desconhecido	Desconhecido	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09C03	1,0E-155	SGN-U222533	9,1E-08	+	1
Desconhecido	Desconhecido	Similar a uma potencial proteína cinase [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09G02	0,0E+01	SGN-U223247	8,4E-66	+	1
Desconhecido	Desconhecido	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH08D03	0,0E+01	SGN-U220047	1,0E-179	+	2
Desconhecido	Desconhecido	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH08F12	1,0E-172	SGN-U224165	1,6E-38	-	2
Desconhecido	Desconhecido	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH02B11	9,0E-13	SGN-U239359	4,1E-19	+	2

Categoria	Descrição	Gene (melhor valor de similaridade)	Clone	e-value (SGN)	Unigene (SGN)	e-value (NCBI)	Macro arranjo	Frequência na biblioteca
Desconhecido	Desconhecido	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH13E11	0,0E+01	SGN-U242002	1,3E-10	NT	1
Desconhecido	Desconhecido	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01F04	0,0E+01	SGN-U215010	2,5E-23	-	1
Desconhecido	Desconhecido	Proteína hipotética [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01D04	0,0E+01	SGN-U221418	8,3E-11	-	1
Desconhecido	Desconhecido	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01A12	1,0E-129	SGN-U213540	2,7E-83	-	1
Desconhecido	Desconhecido	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01D01	0,0E+01	SGN-U216506	7,7E-22	-	1
Desconhecido	Desconhecido	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH02F02	1,00E-69	SGN-U215568	6,00E-84	-	1
Desconhecido	Desconhecido	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01B02	0,0E+01	SGN-U236698	1,0E-03	-	2
Desconhecido	Desconhecido	At4g17070/dl4565c [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09B07	0,0E+01	SGN-U253172	4,0E-118	+	2
Desconhecido	Desconhecido	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH02F08	1,00E-129	SGN-U224456	3,20E-76	+	1
Desconhecido	Desconhecido	Proteína hipotética de cloroplasto RF19 [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH14A04	0,0E+01	SGN-U223021	3,6E-55	NT	1
Desconhecido	Desconhecido	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH14H08	2,0E-46	SGN-U231850	3,0E-19	NT	1
Desconhecido	Desconhecido	Proteína contendo repetições PPR [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09B11	4,0E-75	SGN-U220557	1,5E-49	+	5
Desconhecido	Desconhecido	Precursor de proteína não caracterizada ancorada com GPI [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09E09	9,0E-77	SGN-U236333	4,3E-53	+	3
Desconhecido	Desconhecido	Precursor de proteína não caracterizada ancorada com GPI [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH08H05	5,0E-50	SGN-U246287	5,5E-57	+	1
Desconhecido	Desconhecido	Proteína rica em cisteína [ <i>N. tabacum</i> ]	SSH01G02	2,0E-64	SGN-U240521	3,9E-05	NT	6
Desconhecido	Desconhecido	Relacionada com proteína de ligação ao DNA [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09B02	5,0E-82	SGN-U254671	1,0E-04	-	2
Desconhecido	Desconhecido	Proteína hipotética, domínio de ligação a cálcio EF-hand [ <i>O. sativa</i> (grupo japonica)]	SSH14G04	2,0E-91	SGN-U249300	6,1E-16	NT	2
Desconhecido	Desconhecido	Proteína expressa [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH09B06	0,0E+01	SGN-U262345	7,0E-40	+	2
Desconhecido	Desconhecido	Proteína expressa, relacionada à cadeia pesada de miosina [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH01E09	2,0E-76	SGN-U256488	4,5E-32	-	1
Desconhecido	Desconhecido	Proteína desconhecida [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH02B05	1,0E-107	SGN-U256598	3,0E-48	+	1
Desconhecido	Desconhecido	Proteína hipotética [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH12C04			1,0E-03	NT	1
Desconhecido	Desconhecido	Proteína hipotética [ <i>O. sativa</i> ]	SSH10D05	1,0E-106	SGN-U253581	6,4E-34	+	1
Desconhecido	Desconhecido	Potencial proteína não caracterizada de hipotálamo HT010 [ <i>O. sativa</i> (grupo japonica)]	SSH01A01	0,0E+01	SGN-U225031	6,40E-37	-	1
Desconhecido	Desconhecido	Potencial proteína [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH10D03			2,0E-35	-	4
Desconhecido	Desconhecido	T25K16.10 [ <i>A. thaliana</i> ]	SSH02C05	0,0E+01	SGN-U251979	4,2E-42	-	2
Desconhecido	Desconhecido	Proteína desconhecida [ <i>Homo sapiens</i> ]	SSH02E08	1,0E-134	SGN-U213687	3,5E-05	-	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH14E03	5,0E-43	SGN-U113276		NT	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH10H12	3,0E-64	SGN-U213102		-	2
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH12F07	8,0E-89	SGN-U213566		NT	1

Categoria	Descrição	Gene (melhor valor de similaridade)	Clone	e-value (SGN)	Unigene (SGN)	e-value (NCBI)	Macro arranjo	Frequência na biblioteca
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH14G12	0,0E+01	SGN-U215718		NT	3
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH01G10	0,0E+01	SGN-U222010		-	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH10C06	0,0E+01	SGN-U222290		+	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH01B01	0,0E+01	SGN-U225679		-	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH10E03	1,0E-28	SGN-U226485		+	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH01B06	1,0E-163	SGN-U227587		+	3
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH01E07	0,0E+01	SGN-U231028		-	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH02D07	7,0E-72	SGN-U232499		-	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH11G11	1,0E-178	SGN-U236370		+	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH01F08	6,0E-49	SGN-U236826		-	2
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH12F01	1,0E-18	SGN-U239805		NT	2
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH12F11	1,0E-03	SGN-U240521		NT	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH01H05	1,0E-156	SGN-U241237		-	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH02C06	1,0E-15	SGN-U256077		-	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH08D01	6,0E-70	SGN-U266021		-	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH02C04	6,0E-30	SGN-U267452		-	3
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH09D08	1,0E-151	SGN-U112824		+	2
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH09A07	2,0E-63	SGN-U226485		+	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH01G05	1,0E-104	SGN-U219844		-	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH02H07	1,0E-132	SGN-U225287		-	2
Desconhecido	Desconhecido	Potencial proteína regulada por auxinas [ <i>O. sativa</i> (grupo japonica)]	SSH14B07	1,9E-01	SGN-U231266	5,1E-34	NT	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH10H06	8,0E-02	SGN-U111881		-	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH13D02	5,0E-03	SGN-U207684		NT	5
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH14A05	7,1E-02	SGN-U207723		NT	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH11E12	8,9E-02	SGN-U212480		+	2
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH13H08	1,0E-02	SGN-U218344		NT	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH11H03	4,0E-03	SGN-U221356		-	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH01G11	2,8E-01	SGN-U231303		-	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH10E08	4,0E-03	SGN-U234426		+	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH11D12	1,9E-01	SGN-U235915		+	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH14C08	3,5E-02	SGN-U237707		NT	2
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH14D12	1,2E-01	SGN-U239530		NT	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH01B09	2,1E-02	SGN-U241011		-	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH02F01	1,4E-01	SGN-U245971		-	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH11H09	5,7E-01	SGN-U252831		+	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH10G05	2,3E-02	SGN-U254078		+	1

<b>Categoria</b>	<b>Descrição</b>	<b>Gene (melhor valor de similaridade)</b>	<b>Clone</b>	<b>e-value (SGN)</b>	<b>Unigene (SGN)</b>	<b>e-value (NCBI)</b>	<b>Macro arranjo</b>	<b>Frequência na biblioteca</b>
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH09H06	1,1E-01	SGN-U257488		+	6
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH13C03	3,5E-02	SGN-U257865		NT	2
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH09A11	2,4E-02	SGN-U259036		+	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH11E07	3,4E-02	SGN-U262688		-	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH02F03	3,0E-03	SGN-U264307		-	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH14A01				NT	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH14D04				NT	1
Desconhecido	Desconhecido	Não anotado	SSH01B07				+	1

+ Possui expressão diferencial segundo a análise de macroarranjo

- Não possui expressão diferencial segundo a análise de macroarranjo

NT Não analisado pelo macroarranjo