

**Análise da expressão diferencial de genes de
raízes de *Arachis stenosperma* Krapov. &
W.C. Gregory infectadas com o fitonematóide
Meloidogyne arenaria (Neal) Chitwood raça 1**

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 172

**Análise da expressão diferencial de genes de raízes
de *Arachis stenosperma* Krapov. & W.C. Gregory
infectadas com o fitonematóide *Meloidogyne arenaria*
(Neal) Chitwood raça 1**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Marante*
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*
Editoração eletrônica: *Daniele Alves Loiola*

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A 532 Análise da expressão diferencial de genes de raízes de *Arachis stenoperma* Krapov. & W.C. Gregory infectadas com o fitonematóide *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood raça 1 / K. Proite ... [et al.]. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
16 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 172).

1. *Arachis stenoperma* - mecanismos de resistência - *Meloidogyne arenari*. 2. *Meloidogyne arenaria* - nematóide. I. Proite, K. II. Série.

632.6257 - CDD 21.

Análise da expressão diferencial de genes de raízes de *Arachis stenosperma* Krapov. & W.C. Gregory infectadas com o fitonematóide *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood raça 1

Proite, K¹

Leal-Bertioli S.C²

Pic-Taylor A³

Bertioli D⁴

Guimarães P.M⁵

Resumo

Visando à elucidação dos mecanismos de resistência em *Arachis* silvestre a nematóides do gênero *Meloidogyne* spp., foram realizados experimentos de análise da expressão diferencial de seqüências potencialmente associadas a estes mecanismos através de Northern-blot. Estudos anteriores demonstraram que *Arachis stenosperma* possui um mecanismo de resistência similar à reação de hipersensibilidade na região onde se encontra o nematóide e no estágio de estabelecimento do sítio de alimentação. Duas seqüências diferencialmente expressas em raízes inoculadas com *Meloidogyne arenaria* (ARP- Auxin repressed Protein e CKX- catalase oxidase) foram analisadas quanto a sua distribuição temporal visando à sua associação com o processo de resistência nesta planta. Ambas estão associadas ao balanço hormonal da planta (auxina e citocinina). ARP foi induzida nas raízes inoculadas em comparação com as controle (não inoculadas), demonstrando a inibição ou degradação de auxina naquele ponto. No caso da CKX, nas raízes inoculadas de *A. stenosperma* o gene CKX foi induzido, indicando indiretamente a presença de citocinina e consequentemente sua degradação. A indução da degradação destes hormônios ocorreu justamente em pontos que, segundo estudo histopatológico realizado previamente, os juvenis de 2º estágio (J2) estariam penetrando nas raízes desta espécie e tentando estabelecer o seu sítio de alimentação.

¹ Proit, K doutora em biologia molecular-Unb.

² Leal-Bertioli, S.C - PhD em biologia molecular – Nottingham university

³ Pci-Taylor, A. - PhD e, biologia molecular- Newcastle university

⁴ Bertioli, D. – PhD em biologia molecular, Oxford university

⁵ Guimarães, P.M. – PhD London university

Introdução

A infecção por nematóides resulta em ferimentos nos tecidos vegetais, particularmente durante a fase de migração, mas também durante a fase de estabelecimento e expansão do sítio de alimentação (GHEYSEN e FENOLL, 2002). Todo o processo de infecção causa mudanças dramáticas na estrutura radical da planta que são consequência de mudanças da expressão de genes na raiz hospedeira (WANG, et al., 2003). A transformação das células normais da raiz em estruturas de alimentação inclui mudanças morfológicas e fisiológicas complexas (WILLIAMSON e HUSSEY, 1996). A complexidade e o dinamismo deste sistema sugerem que deva haver o envolvimento de vários genes. Alterações na expressão de genes correlacionados com respostas de defesa foram observadas em inúmeras interações planta-nematóide, incluindo extensinas, catalases, ciclinas, fitohormônios e vários outros que estão resumidos em Gheysen e Fenoll (2002).

As análises de ESTs, tanto *in silico*, quanto coleções de perfis de expressão de tecido têm conduzido à identificação de genes envolvidos nos vários aspectos das interações planta-nematóide. O significado destas análises de expressões digitais, o qual é designado pelo cálculo das frequências dos ESTs em diferentes bibliotecas, já foi previamente validado estatisticamente (STEKEL et al., 2000). Uma vantagem em usar a frequência de dados de ESTs para estimar a expressão gênica é se poder distinguir relações estreitas entre seqüências, o qual não é possível através de outras técnicas de estudo de expressão, incluindo análises de microarrays (PARK et al., 2006).

A análise da expressão diferencial de plantas de *A. stenosperma* inoculadas com *M. arenaria* "in silico" possibilitou a identificação de várias seqüências diferencialmente expressas (PROITE et al., 2007a). Duas destas seqüências estão associadas ao balanço hormonal em plantas e foram selecionadas para uma análise mais aprofundada: (ARP- Auxin-Repressed Protein- contig 821) e citocinina-oxidase (CKX- Cytokinin-oxidase- contig 433).

O hormônio vegetal auxina, tipificado pelo ácido indol-3-acético (IAA) regula uma variedade de processos fisiológicos e do desenvolvimento, incluindo, dominância apical, respostas de tropismo, formação de raiz lateral, diferenciação vascular, divisão embrionária e alongamento de brotos. Em nível celular, a aplicação de auxina modula o alongamento de células, divisão e diferenciação através da regulação transcricional de genes específicos (LEE, 2003). Os fitohormônios auxina e citocinina são considerados fatores chave no controle do progresso do ciclo celular em plantas. Este controle é alcançado através da regulação da expressão e/ou da atividade das ciclinas quinase-dependentes (CDK) e das ciclinas mitóticas (GOVERSE et al., 2000). Diversas observações apontaram para um papel da auxina na indução do sítio de alimentação por nematóides de galhas e cisto (GOVERSE et al., 2000). Acredita-se que o acúmulo local de auxina poderia ser parte de uma série de

eventos que resultariam na indução da formação do sítio de alimentação (BALASUBRAMANIAN e RANGARWAMI, 1983). Os genes da proteína auxina-reprimida (*Auxin-repressed protein – ARP*) e os seus papéis no crescimento e desenvolvimento das plantas são relativamente pouco estudados. Depois que este gene foi isolado de morango (REDDY e POOVAIAH, 1990), outros genes homólogos a ARP também foram isolados de ervilha (STAFSTROM et al., 1998), de falsa-acácia, uma leguminosa arbórea (PARK e HAN, 2003), fumo (STEINER et al., 2003) e pimenta (HWANG et al., 2005). Os genes ARP têm relações estreitas com genes relacionados com dormência (DRM), e já foi mostrado que com exceção de três trabalhos (LEE et al., 2003), estes genes foram induzidos pela ação direta do fitohormônio auxina (ROCHA et al., 2007).

Citocinina (CK) é uma classe de hormônio vegetal que tem papel em vários aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo dominância apical, formação e atividade nos meristemas de brotos, senescência de folhas, mobilização de nutrientes, germinação de sementes, crescimento de raízes e respostas ao estresse (GONZALEZ-RIZZO et al., 2006). Recentemente, as principais etapas do metabolismo e da sinalização de citocininas foram elucidadas em *Arabidopsis*. Sete genes que sintetizam citocinina, os isopentenil transferases (IPT) e sete genes codificadores para a degradação de citocinina, citocinina oxidase/desidrogenase (CKX) foram identificados no genoma de *Arabidopsis*. A degradação de citocinina é importante na regulação homeostática da acumulação e na distribuição dos metabólitos de citocinina nos tecidos vegetais (DAVIES, 2004). No presente trabalho, analisamos o perfil de expressão destas duas seqüências através de Northern-blot, visando correlacioná-las com o processo de resistência de *A. stenosperma* a *M. arenaria*.

Materiais e Métodos

Plantas de *Arachis* e bioensaio com *M. arenaria* raça 1

Foram utilizadas doze plantas de cada espécie, *A. stenosperma* (V10309), e *A. hypogaea* var. Tatu com dois meses de idade. Seis plantas serviram como controle, sendo denominadas não inoculadas, e seis plantas tiveram suas raízes inoculadas com 10.000 juvenis de segundo estágio (J2) de *M. arenaria* por planta. Estes dois conjuntos foram coletados com 4, 9 e 16 dias após a inoculação, seguindo o resultado do estudo histopatológico. O material foi congelado em N₂ líquido até a extração de RNA total.

Validação da análise *in silico* por Northern-Blot

O RNA total foi isolado a partir das raízes não inoculadas e inoculadas das espécies suscetível e resistente utilizando Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com instruções do fabricante. O RNA foi fracionado por 5 h a 50 V em gel desnaturante 1,2% agarose, 0,77 M formaldeído 37% em tampão 1X MOPS pelo método-padrão, transferido para membrana de nylon Hybond-N (Amersham, Arlington, IL), e a membrana foi fixada através de luz UV. As membranas foram hibridizadas com os seguintes ESTs: (1) proteína reprimida por auxina (Auxin-Repressed Protein- contig 821) e (2) citocinina-oxidase (Cytokinin-oxidase- contig 433). Os ESTs foram re-amplificados por PCR utilizando-se os primers direto, PT2F2 – 5'-GCGCCATTGTGTTGGTACCC - 3' e reverso, PT2R2- 5'- CCGCATGCATAAGCTTGCTC - 3'. O produto das reações de PCR foram limpas para retirada de excesso de primer, enzima e de outros reagentes com a coluna S-400 HR *MicroSpin Column* (Amersham, Arlington, IL). Estes clones foram re-sequenciados para que sua identidade fosse certificada. Foram marcados com o kit Ready-to-go pelo método random priming (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Todos os filtros foram pré-hibridizados a 65 °C por no mínimo 3 h e hibridizados a 65 °C por 16-20 h em 5 X SSC, 5 X Solução de Denhardt, 0,5% SDS e 0,02 mg/mL de Esperma de Salmão desnaturado. Após hibridização as membranas foram lavadas 2 vezes a 65 °C por 15 min. em 1 X SSC e 0,1% SDS e depois em 0,1 X SSC e 0,1% SDS. As membranas foram expostas em filme de raio-X, (BIOMAX – Kodak). Para corrigir diferenças na aplicação das amostras, as bandas foram quantificadas e normalizadas através de métodos de densitometria, utilizando-se o programa BiImage Intelligent Quantifier (Intelligent Quantifier, Bio Image Systems, Inc., Jackson, MI, USA). Foi gerado um gráfico com valores arbitrários para esta correção. Para a avaliação da expressão dos dois ESTs diferenciais foram escolhidos pontos importantes durante a evolução da infecção do nematóide. Esta escolha foi guiada por estudo histopatológico previamente realizado (PROITE et al., 2007b). Ponto 1: 4 DAI (Dias após inoculação), período onde ocorre grande parte da penetração dos J2s nas raízes; ponto 2: 9 DAI, o início da instalação do sítio de alimentação, e 16 DAI, quando houve resposta de hipersensibilidade na espécie resistente. O gráfico é o resultado da normalização das bandas da hibridização com as bandas coradas com brometo de etídeo. Seus valores correspondem a densitometria realizada pelo programa BiImage Intelligent Quantifier.

Resultados e Discussão

Análise temporal da expressão da proteína reprimida por auxina (Auxin-Repressed Protein ARP - contig 821)

Em *A. stenosperma*, observamos que aos 4 DAI a expressão do gene ARP foi induzida nas raízes inoculadas em comparação com as controles (não inoculadas), (Figura 1), depois podemos ver que sua expressão diminui aos 9 DAI, igualando-se ao das raízes não inoculadas e finalmente é aumentada novamente nos dois sistemas aos 16 DAI (Figura 1).

A expressão de ARP também foi monitorada em raízes de *A. hypogaea*, espécie que é suscetível ao nematóide, e observamos que a expressão deste gene é reprimida durante a infecção (4 DAI, inoculado), no entanto, este gene é induzido nos pontos subsequentes, (9 DAI e 16 DAI, inoculado) (Figura 1).

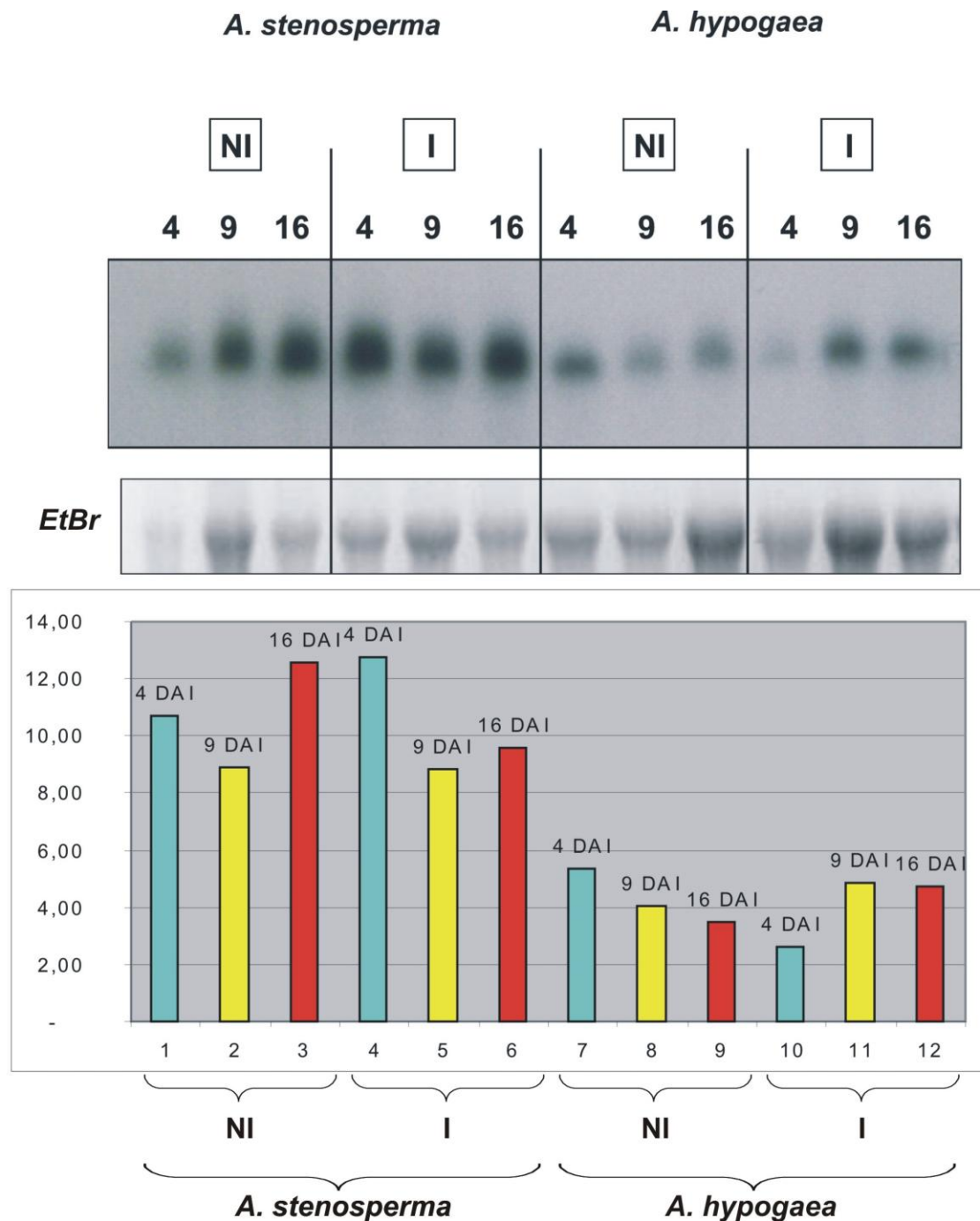


Figura 1- Análise temporal da expressão do gene ARP em raízes de *A. stenosperma* e *A. hypogaea* não inoculadas e inoculadas com *M. arenaria* raça 1. Os pontos avaliados foram 4, 9 e 16 dias após inoculação (DAI). NI = Não inoculada; I = Inoculada.

Como demonstrado anteriormente, a grande maioria dos trabalhos, relaciona o controle da expressão do ARP com a presença e abundância do hormônio auxina. Se seguirmos este modelo, temos que no sistema de interação incompatível houve um acúmulo de auxina durante o ponto 4 DAI nas raízes inoculadas. Em relação à expressão diferencial entre raízes inoculadas e não inoculadas, este é o único ponto relevante, já que os outros tiveram padrão semelhante na expressão. Este dado está de acordo com a análise *in silico* dos ESTs, que sugeriu uma expressão induzida ao ataque do nematóide. No entanto, foi observado um comportamento contrário nas raízes de *A. hypogaea*. Aos 4 DAI, o gene ARP foi reprimido e nos pontos seguintes houve sempre uma indução do gene. Neste sistema de interação incompatível, a expressão do gene ARP ratifica o que já foi encontrado nas interações nematóide-planta. Diversos trabalhos relatam que para o estabelecimento do sítio de alimentação, ocorre um acúmulo de auxina (MAZAREI et al., 2004), o que neste sistema é evidenciado pela indução do gene ARP, principalmente no ponto 9 DAI, que justamente, corresponde à indução das células gigantes e formação do sítio de alimentação em *A. hypogaea*. Entretanto, chama a atenção a expressão deste gene, que mesmo induzida é quase 2,5 x menor que em raízes de *A. stenosperma* (Figura 1). Nesta espécie, este ponto (9 DAI), não necessariamente corresponde ao da indução do sítio, pois como observado anteriormente em estudo histopatológico (PROITE et al., 2007b), parece somente ter havido a tentativa de instalação do sítio entre 16 e 19 DAI.

A expressão, de alguns genes relacionados com defesa, sempre ocorre mais rapidamente e de forma mais pronunciada em interações incompatíveis que em compatíveis (CHITTOOR et al. 1997). Em muitos outros sistemas de avaliação, o gene ARP foi induzido mediante infecção de folhas de pimenta com bactéria *Xanthomonas campestris* (JUNG e HWANG, 2000), de folhas e raízes com fungos e durante nodulação (KIM et al., 2007), após indução artificial de SAR em folhas de café (DE NARDI et al., 2006), e infecção de raízes e vagens de *A. hypogaea* (LUO et al., 2005).

Pode-se concluir que em relação ao gene ARP, *A. stenosperma* reage diferentemente de outros sistemas que avaliaram a interação planta-nematóide. Nas interações de plantas com nematóides foi sempre observado o acúmulo de auxina nas raízes, resultado do bloqueio no transporte e/ou no fluxo deste hormônio nas células precursoras de células gigantes pelo nematóide (KENNEDY et al., 1999). Nesta espécie não ocorre instalação de sítio de alimentação, e toda vez que foi observado um nematóide tentando fazê-lo, uma resposta de hipersensibilidade associada também foi observada. Este fato, sempre ocorreu em dias mais avançados no ciclo do mesmo em comparação com a espécie suscetível. Na espécie suscetível, *A. hypogaea*, a relação acúmulo de auxina e conseqüente, indução do gene ARP e instalação do sítio de alimentação apresentam resultados similares aos demais.

Análise temporal da expressão do hormônio citocinina-oxidase (Cytokinin-oxidase/desidrogenase- CKX contig 433)

Citocinina oxidase (CKX) foi um dos genes diferencialmente expressos na análise dos ESTs de bibliotecas de raízes não inoculadas e inoculadas de *A. stenosperma* com nematóide *M. arenaria*. Observamos que em raízes de *A. stenosperma* inoculadas (4 DAI e 16 DAI), houve indução na expressão do gene CKX, comparado às raízes não inoculadas, no entanto aos 9 DAI, a expressão foi reprimida (Figura 2). Este resultado é discordante com o apresentado pela análise *in silico* dos ESTs e esta diferença entre os resultados pode ser devida a natureza quantitativa da análise dos ESTs. As bibliotecas foram desenvolvidas com o conjunto de transcritos entre os dias 2, 6 e 10 DAI, já a análise da expressão pelo *Northern-Blot* além de ser uma análise qualitativa, foi também feita, individualmente, ponto a ponto. Se fosse possível quantificar esta análise talvez ficasse claro que no conjunto entre 4 e 9 DAI a expressão global deste gene seria reprimida, estando assim, de acordo com a análise *in silico*. Um padrão diferente foi observado nas raízes da espécie suscetível, *A. hypogaea*, onde a expressão de CKX foi reprimida em todos os pontos observados durante a infecção com nematóide (Figura 2).

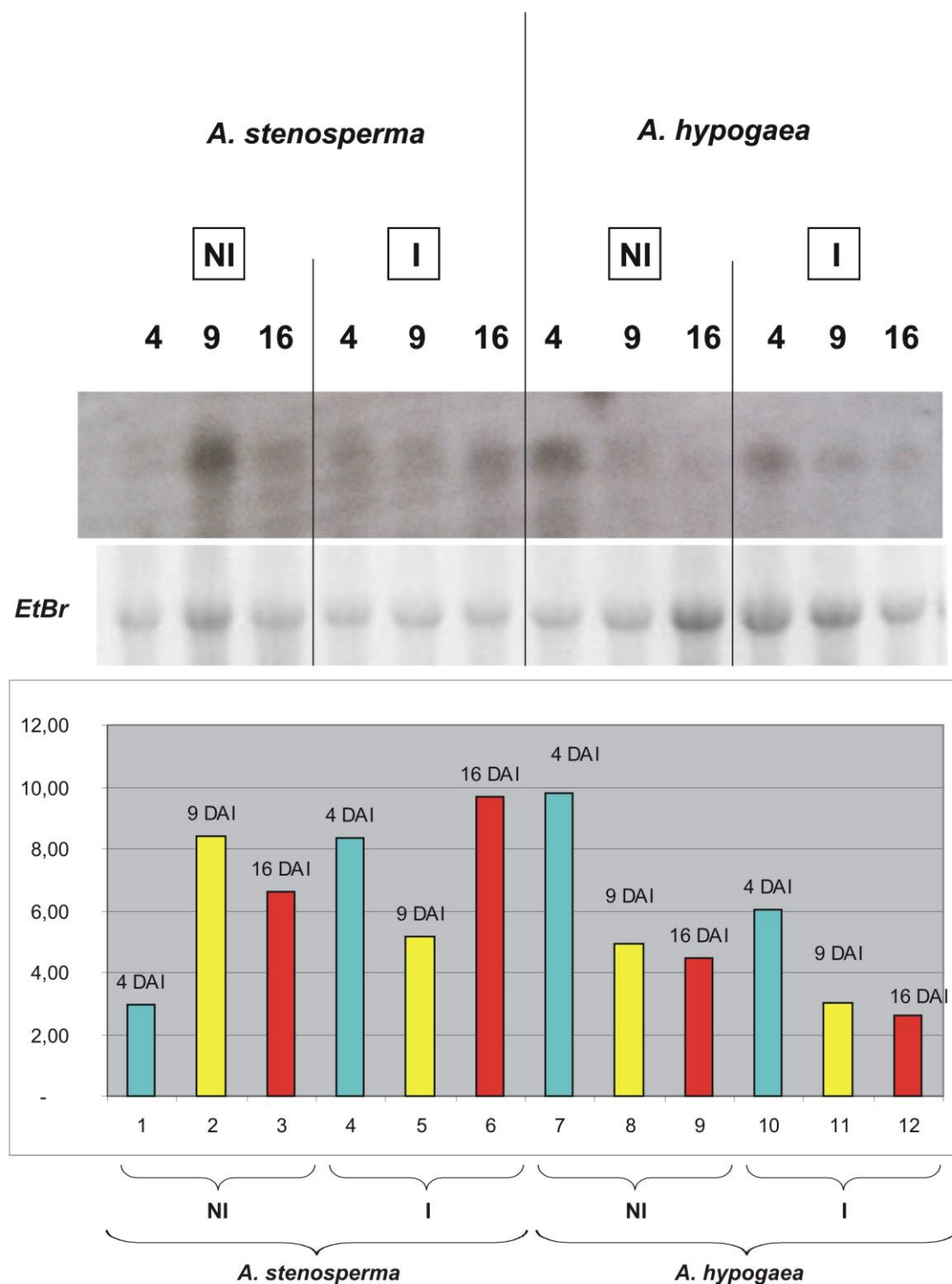


Figura 2- *Análise temporal* da expressão do gene CKX em raízes de *A. stenosperma* e *A. hypogaea* não inoculadas e inoculadas com *M. arenaria* raça 1. Os pontos avaliados foram 4, 9 e 16 dias após inoculação (DAI). NI = Não inoculada; I = Inoculada. O gráfico é o resultado da normalização das bandas da hibridização com as bandas coradas com brometo de etídeo. Seus valores correspondem a densitometria realizada pelo programa Biolumage Intelligent Quantifier.

O padrão de atividade e os níveis de transcritos de CKX sugerem que o controle transcricional da expressão do gene *ckx 1* é feito pelo hormônio citocinina (HIROSE et al., 2007). Diversos trabalhos mostraram que tanto citocinina endógena quanto a aplicação exógena, estimulam a atividade de citoxinina oxidase/desidrogenase, como foi observado em cultura de células de fumo, em cultura de calos de várias plantas (MOTYKA et al., 1996), em raízes de milho, trigo e arroz (HIROSE et al., 2007). Estes resultados demonstram uma resposta de feedback negativo, indicando que a própria citocinina induz sua degradação, pelo menos em parte, pela indução da expressão do gene *ckx*, impedindo assim uma ação persistente de citocinina no tecido (LEE et al., 2007). Podemos então correlacionar à indução da expressão de CKX em raízes de *A. stenosperma* inoculadas com nematóide à presença de citocinina no tecido. Foi demonstrado que durante a infecção, na formação do sítio de alimentação e durante os estágios mais desenvolvidos de galhas, a planta produz citocinina, isto foi observado através da indução do promotor do gene *ARR5 (Arabidopsis response regulator)*, que é um gene que responde a citocinina (LOHAR et al., 2004). Outros trabalhos mostraram que a citocinina também é produzida pelo próprio nematóide na infecção (MEUTTER et al., 2003), mas o seu papel durante o parasitismo ainda não está esclarecido (BIRD, 2004). Lohar et al. (2004) super-expressou o gene CKX de milho e de *Arabidopsis* em raízes transgênicas de *Lotus japonicus* e observou que houve uma redução de 50% no número de galhas, indicando que raízes com resistência a citocinina eram menos suscetíveis aos nematóides das galhas. Nas raízes inoculadas de *A. stenosperma* aos 4 e 16 DAI, o gene CKX foi induzido, indicando indiretamente a presença de citocinina e consequentemente sua degradação. A indução da degradação deste hormônio ocorreu justamente em pontos, que segundo o estudo histopatológico, os J2 estavam penetrando nesta espécie (4 DAI) e tentando estabelecer o sítio de alimentação (16 DAI). Lohar et al. (2004) demonstraram que a expressão de citocinina não ocorre durante a penetração e migração dos J2, mas somente na formação do sítio e nas células adjacentes às células gigantes nos estágios mais avançados do ciclo de infecção. Como este processo é dinâmico, pode-se considerar que em todos os pontos estudados (4-16 DAI) houve tentativas de estabelecimento de sítio de alimentação na espécie resistente, apesar de não terem sido observados antes dos 16 DAI, quando uma resposta de hipersensibilidade foi manifestada. É importante notar que a alta expressão de CKX em raízes foi observada (BRUGIÈRE et al., 2003). Na espécie suscetível, parece não ter havido a expressão e nem a acumulação de citocinina durante a infecção, pois, em todos os pontos analisados a expressão do gene CKX foi reprimida nas raízes infectadas. Este resultado é discordante dos anteriores encontrados na literatura e ao observado na espécie resistente. A regulação da expressão de CKX também está envolvida com outras respostas de defesa, tal como na repressão de citocinina durante o desenvolvimento da doença hérnia das crucíferas em *Arabidopsis* causada pelo patógeno *Plasmodiophora brassicae* (SIEMENS et al., 2006). Também observa-se a indução da expressão da cascata de sinalização citocinina ao ataque massivo de insetos herbívoros (HUI et al., 2003). Uma vez que CKX é a única enzima de planta conhecida que

cataboliza a degradação de citocininas, este parece ser um ponto importante de controle nos níveis de citocinina em tecidos específicos de plantas (JONES e SCHREIBER, 1997).

Referências

SUBRAHMANYAM, P.; MCDONALD, D.; GIBBONS, R. W.; SUBBA, R. P. V. Components of resistance to *Puccinia arachidis* in peanuts. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 73, p. 253-256, 1983.

BIRD, D. M. Signaling between nematodes and plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 4, p. 372-376, 2004.

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 and Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, US, v. 17, n. 4, p. 351-356, 2004.

BRUGIÈRE, M.; JIAO, S.; HANTKE, S.; ZINSELMEIER, C.; ROESSLER, J. A.; NIU, X. M.; JONES, R. J.; JEFFREY, E.; HABBEN, J. E. Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 132, p. 1228-1240, 2003.

BYRD, D. W.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissue for detection of nematodes. **Journal of Nematology**, College Park, US, v. 15, n. 1, p. 142-143, 1983.

CHITTOOR, J. M.; LEACH, J. E.; WHITE, F. F. Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Molecular and Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, US, v. 10, n. 7, p. 861-71, 1997.

DAVIES, P. J. Regulatory factors in hormone action: level, location and signal transduction. In: PLANT hormones: biosynthesis, signal transduction, action! 3th Ed. Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. p. 16-35.

DE NARDI, B.; DREOS, R.; DEL TERRA, L.; MARTELLOSI, C.; ASQUINI, E.; TORNINCASA, P.; GASPERINI, D.; PACCHIONI, B.; RATHINAVELU, R.; PALLAVICINI, A.; GRAZIOSI, G. Differential responses of *Coffea arabica* L. leaves and roots to chemically induced systemic acquired resistance. **Genome**, Ottawa, v. 49, n. 12, p. 1594-1605, 2006.

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

GONZALEZ-RIZZO, S.; CRESPI, M.; FRUGIER, F. The medicago truncatula CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. **The Plant Cell**, Rockville, US, v. 18, p. 2680-2693, 2006.

GOVERSE, A.; ALMEIDA ENGLER, J. de; VERHEES, J.; VAN DER KROL, S.; HELDER, J. H.; GHEYSEN, G. Cell cycle activation by plant parasitic nematodes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 5, p. 747-761, 2000.

HIROSE, N.; MAKITA, N.; KOJIMA, M.; KAMADA-NOBUSADA, T.; SAKAKIBARA, H. Overexpression of a type-a response regulator alters rice morphology and cytokinin metabolism. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 48, n. 3, p. 523-539, 2007.

HOLBROOK, C. C.; NOE, J. P. Resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis* sp. and implications on development of resistant peanut cultivars. **Peanut Science**, Raleigh, US, v. 17, p. 35-38, 1990.

HOLBROOK, C. C.; KNAUFT, D. A.; DICKSON, D. W. A technique for screening peanut for resistance to *Meloidogyne arenaria*. **Plant Disease**, Saint Paul, US, v. 67, p. 957-958, 1983.

HUI, D.; IQBAL, J.; LEHMANN, K.; GASE, K.; SALUZ, H. P.; BALDWIN, I. T. Molecular interactions between the Specialist Herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*: V. microarray analysis and further characterization of large-scale changes in herbivore-induced mRNAs. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 131, n. 4, p. 1877-1893, 2003.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, Washington, US, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

HWANG, E. W.; KIM, K. A.; PARK, S. C.; JEONG, M. J.; BYUN, M. O.; KWON, H.-B. Expression profiles of hot pepper (*Capsicum annuum*) genes under cold stress conditions. **Journal of Bioscience**, v. 30, p. 101-111, 2005.

JONES, R. J.; SCHREIBER, B. M. N. Role and function of cytokinin oxidase in plants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 23, p. 123-134, 1997.

JUNG, H. W.; HUANG, B. K. Isolation, partial sequencing, and expression of pathogenesis-related cDNA genes from pepper leaves infected by *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. **Molecular and Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, US, v. 13, p. 136-142, 2000.

KENNEDY, M. J.; NIBLACK, T. L.; KRISHAN, H. B. Infection by *Heterodera glycines* eleates isoflavonoide production and influences soybean nodulation. **Journal of Nematology**, College Park, US, v. 31, p. 341-347, 1999.

KIM, H. B.; LEE, H.; OH, C. J.; LEE, N. H.; AN, C. S. Expression of EuNOD-ARP1 encoding auxin-repressed protein homolog is upregulated by auxin and localized to the fixation zone in root nodules of *Elaeagnus umbellata*. **Molecules and Cells**, v. 23, n. 1, p. 115-121, 2007.

KOENNING, S. R.; BARKER, K. R. Relative damage functions and reproductive potencies of *Meloidogyne arenaria* and *M. hapla* on peanut. **Journal of Nematology**, College Park, US, v. 24, n. 1, p. 187-192, 1992.

LEE, D.-S.; SONG, H.; KIM, Y. Identification and characterization of genes responding to temperature stresses in Chinese cabbage using cDNA microarray. In: PLANT AND ANIMAL GENOME CONFERENCE, 11., 2003, San Diego, CA. [Proceedings...]. [S.l.: s.n.], 2003. p. 268.

LEE, D. J.; PARK, J. Y.; KU, S. J.; HA, Y.-M.; KIM, S.; KIM, M. D.; OH, M.-H.; KIM, J. Genome-wide expression profiling of ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 7 (ARR7) overexpression in cytokinin response. **Molecular Genetics and Genomics**, Heidelberg, v. 277, p. 115-137, 2007.

LOHAR, D. P.; SCHAFF, J. E.; LASHEY, J. G.; KIEBER, J. J.; BILYEU, K. D.; BIRD, D. M. Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. **Plant Journal**, Oxford, GB, v. 38, p. 203-214, 2004.

LUO, M.; DANG, P.; GUO, B. Z.; HE, G.; HOLBROOK, C.; BAUSHER, M. G.; LEE, R. D. Generation of Expressed Sequenced tags (ESTs) for gene discovery and marker development in cultivated peanut. **Crop Science**, Madison, US, v. 45, p. 346-353, 2005.

MAZAREI, M.; LENNON, K. A.; PUTHOFF, D. P.; RODERMEL, S. R.; BAUM, T. J. Homologous soybean and *Arabidopsis* genes share responsiveness to cyst nematode infection. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, n. 5, p. 409-423, 2004.

- MCSORLEY, R.; DICKSON, D. W.; CANDANEDO-LAY, E. M.; HEWLETT, T. E.; FREDERICK, J. J. Damage functions for *Meloidogyne arenaria* on peanut. **Journal of Nematology**, College Park, US, v. 24, n. 1, p. 193-198, 1992.
- MEUTTER, J. S.; TYTGAT, T.; WITTERS, E.; GHEYSEN, G.; ONCKELEN, H. V.; GHEYSEN, G. Identification of cytokinins produced by the plant parasitic nematodes *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne incognita*. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 4, p. 271-276, 2003.
- MOTYKA, V.; FAISS, M.; STRAND, M.; KAMÍNEK, M.; SCHMÜLING, T. Changes in cytokinin content and cytokinin oxidase activity in response to derepression of ipt gene transcription in transgenic tobacco calli and plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 112, n. 3, p. 1035-1043, 1996.
- NELSON, S. C.; SIMPSON, C. E.; STARR, J. L. Resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis* spp. germoplasm. **Journal of Nematology**, College Park, US, v. 21, n. 4S, suppl., p. 654-660, 1989.
- NELSON, S. C.; STARR, J. L.; SIMPSON, C. E. Expression of resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis batizocoi* and *A. cardenasii*. **Journal of Nematology**, College Park, US, v. 22, n. 2, p. 242-244, 1990.
- OKUSHIMA, Y.; MITINA, I.; QUACH, H. L.; THEOLOGIS, A. Auxin Response Factor 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. **The Plant Journal**, Oxford, GB, v. 43, p. 29-46, 2005.
- PARK, S.; HAN, K. H. An auxin-repressed gene (RpARP) from black locust (*Robinia pseudoacacia*) is posttranscriptionally regulated and negatively associated with shoot elongation. **Tree Physiology**, Victoria, CA, v. 23, p. 815-823, 2003.
- PARK, S. J.; HUANG, Y.; AYOUBI, P. Identification of expression profiles of sorghum genes in response to greenbug phloem-feeding using cDNA subtraction and microarray analysis. **Planta**, Berlin, v. 223, n. 5, p. 932-947, 2006.
- PROITE, K.; BERTIOLI, D.; LEAL-BERTIOLI, S. C.; CARNEIRO, R. G.; DA SILVA, F. R.; GUIMARÃES, P. M. Histopathological and differential gene expression analysis of *Arachis stenosperma* infected with *Meloidogyne arenaria*. In: GENERATION CHALLENGE PROGRAM 2005, ANNUAL RESEARCH MEETING, 2005, Rome. [Proceedings...]. [S.l.: s.n., 2005].
- PROITE, K.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; MORETZSOHN, M. C.; SILVA, F. R.; MARTINS, N. F.; GUIMARÃES, P. M. ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. **BMC Plant Biology**, v. 7, p. 1-10, 2007a.
- PROITE, K.; BERTIOLI, D. J.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; SILVA, F.; GUIMARÃES, P. M. Differential expression of defense-related genes in the wild peanut relative, *Arachis stenosperma* in response to *Meloidogyne arenaria*. **Plant Pathology**, 2007b. no prelo.
- REDDY, A. S. N.; POOVAIAH, B. W. Molecular cloning and sequencing of a cDNA for an auxin-repressed mRNA: correlation between fruit growth and repression of the auxinregulated gene. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 14, p. 127-136, 1990.
- ROCHA, F. R.; PAPINI-TERZI, F. S.; NISHIYAMA JUNIOR, M. Y.; VENCIO, R. Z.; VICENTINI, R.; DUARTE, R. D.; DE ROSA JUNIOR, V. E.; VINAGRE, F.; BARSALOBRES, C.; MEDEIROS, A. H.; RODRIGUES, F. A.; ULIAN, E. C.; ZINGARETTI, S. M.; GALBIATTI, J. A.; ALMEIDA, R. S.; FIGUEIRA, A. V.; HEMERLY, A. S.; SILVA-FILHO, M. C.; MENOSSI, M.; SOUZA, G. M. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics**, v. 8, n. 1, p. 71, 2007.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. (Ed.). **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3th ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001

SIEMENS, J.; KELLER, I.; SARX, J.; KUNZ, S.; SCHULLER, A.; NAGEL, W.; SCHMÜLLING, T.; PARNISKE, M.; LUDWIG-MÜLLER, J. Transcriptome analysis of arabidopsis clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. **Molecular and Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, US, v. 19, p. 480-494, 2006.

SIMPSON, C. E.; STARR, J. L.; CHURCH, G. T.; BUROW, M. D.; PATERSON, A. H. Registration of "NemaTAM" peanut. **Crop Science**, Madison, US, v. 43, p. 1561, 2003.

SIMPSON, C. E.; STARR, J. L. Registration of "COAN" peanut. **Crop Science**, Madison, US, v. 41, p. 918, 2001.

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 and Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, US, v. 18, n. 2, p. 158-68, 2005.

STAFSTROM, J. P.; RIPLEY, B. D.; DEVITT, M. L.; DRAKE, B. Dormancy-associated gene expression in pea axillary buds. **Planta**, Berlin, v. 205, p. 547-552, 1998.

STEINER, C.; BAUER, J.; AMRHEIN, N.; BUCHER, M. Two novel genes are differentially expressed during early germination of the male gametophyte of *Nicotiana tabacum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, NL, n. 1625, p. 123-133, 2003.

STEKEL, D. J.; GIT, Y.; FALCIANI, F. The comparison of gene expression from multiple cDNA libraries. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 10, p. 2055-2061, 2000.

TOMASZEWSKI, E. K.; KHALIL, M. A. M.; EL-DEEB, A. A.; POWERS, T. O.; STARR, J. L. *Meloidogyne javanica* parasitic on peanut. **Journal of Nematology**, College Park, US, v. 26, n. 4, p. 436-441, 1994.

VRAIN, T. C. A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. And a comparison of eggs and larvae as inocula. **Journal of Nematology**, College Park, US, v. 9, n. 3, p. 249-251, 1977.

WANG, J.; POTTER, R. H.; JONES, M. G. K. Differential display analysis of gene expression in the cytoplasm of giant cells induced in tomato roots by *Meloidogyne javanica*. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 5, p. 361-371, 2003.

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