

**ANÁLISE *in silico* DA EXPRESSÃO GÊNICA
DIFERENCIAL DE *Arachis stenosperma* INOCULADO
COM *Meloidogyne arenaria*.**

República Federativa do Brasil
Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Helio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa
Silvio Crestana

Diretores Executivos
José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 85

**Análise *in silico* da expressão gênica
diferencial de *Arachis stenosperma*
inoculado com *Meloidogyne arenaria*.**

**P. M. Guimarães
K. Proite
S. C. Leal-Bertioli
D. Bertioli**

BRASÍLIA, DF
2005

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: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

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: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005)

A 532 *Análise in silico da expressão gênica diferencial de Arachis stenosperma inoculado com Meloidogyne arenaria* / P. M. Guimarães ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

25 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676-1340; 85)

1. *Arachis stenosperma* – análise expressão gênica – stress biótico.
2. *Arachis stenosperma* – mecanismos de defesa - *Meloidogyne arenaria*.
3. Amendoim. I. Guimarães, P. M. I. Série.

633.368 - CDD 21

SUMÁRIO

Resumo	6
Abstract	7
1. Introdução	8
1.1 O amendoim cultivado e seus parentes silvestres	8
1.2 Análise da expressão gênica	11
Materiais e Métodos	13
3.1- Extração de RNA total	13
3.2-Extração de RNA poli A⁺	13
3.3-Construção das bibliotecas de cDNA	14
3.4-Sequenciamento dos <i>ESTs</i>	14
3.5-Análise computacional dos <i>ESTs</i>	15
Resultados e discussão	15
Referências bibliográficas	22

Análise *in silico* da expressão gênica diferencial de *Arachis stenosperma* inoculado com *Meloidogyne arenaria*.

P. M. Guimarães¹
K. Proite²
S. C. Leal-Bertioli³
D. Bertioli⁴

Resumo

O amendoim cultivado, *Arachis hypogaea*, é altamente suscetível às espécies do nematóide das galhas *Meloidogyne arenaria* raça 1, *M. javanica* raça 4 e a diversos fungos causadores de doenças foliares. Já o amendoim silvestre, *A. stenosperma*, apresenta resistência à maioria das espécies destes patógenos. O mecanismo de resistência de *A. stenosperma* a *Meloidogyne arenaria* foi recentemente estudado, demonstrando que o mesmo é decorrente da baixa penetração dos juvenis de segundo estágio e da ocorrência de reação de hipersensibilidade. Visando à identificação de genes potencialmente envolvidos nestes mecanismos de defesa, realizou-se a análise do perfil de expressão diferencial de plantas submetidas a este stress biótico. Para tal, foram construídas duas bibliotecas de cDNA, a partir de mRNAs de raízes de plantas de *A. stenosperma* inoculadas com 10000 J2 e de raízes não inoculadas. Até o momento, foram produzidos 8675 ESTs (expressed sequenced tags) das duas bibliotecas. Na análise preliminar das seqüências geradas, já foi possível a identificação de genes envolvidos com resistência e a geração de mais de 200 marcadores genéticos do tipo SSRs (microssatélites) que estão sendo utilizados na construção de um mapa de referência de *Arachis*. Os ESTs gerados a partir das duas bibliotecas foram comparados *in silico*, e foi possível identificar 92 genes diferencialmente expressos sendo que vários associados a processo de defesa da planta ao ataque dos nematóides. A geração de ESTs é a estratégia utilizada na construção do primeiro banco de seqüências de *Arachis* silvestre, que também conta com seqüências oriundas de bancos de cDNA de plantas desafiadas com fungos foliares e *Bradyrhizobium*.

¹ Bióloga, PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Bióloga, MsC, graduanda UnB

³ Bióloga, PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Biólogo, PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Abstract

The cultivated peanut, *Arachis hypogaea* is highly susceptible to many species of the root-knot nematode, *Meloidogyne arenaria* race 1, *M. javanica* race 4 and various leaf spot-causing fungi. On the contrary, wild species, including *A. stenosperma*, show high resistance to the main species of these pathogens. Recently, the mechanism of resistance of *A. stenosperma* against *Meloidogyne arenaria* was studied, and the low penetration of second stage juveniles (J2) associated to the hypersensitive reaction were identified as the main reasons for the high level of resistance of the species. The analysis of differentially expressed genes between the two libraries was conducted in order to identify genes potentially related to resistance. For this purpose, two cDNAs libraries were made, one from non-inoculated *A. stenosperma* roots and other from roots inoculated with up to 10000 J2. So far, 8675 ESTs (expressed sequenced tags) have been produced from both libraries. A preliminary analysis of these ESTs identified more than 200 SSRs (microsatellites), which will be used to enrich the *Arachis* genetic map, and a number of genes related to resistance. The ESTs were compared *in silico* and 92 sequences were found to be differentially expressed, some of which related to the process of plant defense against nematodes. Together with these ESTs, sequences from cDNA libraries challenged by foliar fungi and *Bradyrhizobium* are also being included for the construction of the first wild *Arachis* genebank.

1. Introdução

1.1 O amendoim cultivado e seus parentes silvestres

O amendoim é a quarta maior cultura oleaginosa mundial, ficando atrás apenas, na safra de 2003/04, da soja (56,8% do total da safra mundial); do algodão (11,3%) e da canola (11,1%) (CONAB, 2004). *Arachis hypogaea* é susceptível a várias doenças e patógenos tanto no Brasil quanto em todo mundo sendo que os nematóides do gênero *Meloidogyne* chegam a causar 12% de perdas em amendoim cultivado nos Estados Unidos e Índia (BAILEY, 2002). Os principais causadores de doença em amendoim são os nematóides-das-galhas, *M. arenaria* raça 1 (Neal) Chitwood, *M. hapla* Chitwood e *M. javanica* (Treub) Chitwood (NELSON et al., 1989; SHARMA e MCDONALD, 1990; LORDELLO et al., 1997; CARNEIRO et al., 1996; 2000). Estes organismos impedem o desenvolvimento das plantas de amendoim, provocando murcha, perda de cor, podridão dos ginóforos, das vagens e das raízes. E ainda em associação com fungos de solo que incluem *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Aspergillus*, ocasionam perdas da ordem US\$ 5 bilhões por ano nos Estados Unidos (WILLIAMSON e HUSSEY, 1996) (Fig. 1).



Figura 1. Galhas do fitonematóide *M. arenaria* formadas nas raízes do amendoim.

Os modernos nematicidas não apresentam em geral um controle efetivo em relação ao custo do tratamento/ha, considerando as vastas extensões a

serem tratadas. A utilização de variedades resistentes é uma maneira eficiente, de baixo custo e dano ambiental, de se controlar pragas, se comparada ao uso de pesticidas químicos.

Análises bioquímicas e de marcadores moleculares de DNA no gênero *Arachis* têm mostrado um baixo nível de diversidade genética na espécie domesticada *Arachis hypogaea* e baixa resistência à maioria das pragas e doenças (STALKER e SIMPSON, 1995). Isto motivou os melhoristas a estender suas buscas a um pool genético secundário que envolve as espécies silvestres próximas, as quais possuem genes com caracteres agronomicamente úteis (SINGH, 1986; 1988). Já as espécies silvestres diplóides da seção *Arachis* não são importantes comercialmente, mas são valiosas por possuírem genes de resistências a vários patógenos do amendoim cultivado e por serem assim, uma fonte para a ampliação da base genética do amendoim (FOSTER et al., 1981; GARCIA et al., 1996; PANDE e RAO, 2001; STALKER, 1984). Várias espécies silvestres de *Arachis* já foram investigadas quanto à resistência a doenças foliares e altos níveis de resistência foram identificados (CHOI et al., 1999; FOSTER et al., 1981; PANDE e RAO, 2001; WYNNE e BEUTE, 1991).

O Brasil contém alguns dos centros de diversidade genética mais ricos do mundo, com os centros de origem de um número de plantas de grande importância sócio-econômica (ex. mandioca, amendoim, caju, abacaxi e cacau), assim como de parentes silvestres de muitas outras plantas (ex. diversos representantes de solanáceas). A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui um banco de germoplasma silvestre de *Arachis*, com mais de 1000 acessos de espécies silvestres e outras 1000 de variedades primitivas, algumas das quais já identificadas como fontes de resistência para fungos e nematóides (NELSON et al., 1989; BERTIOLI et al., 2000; LEAL-BERTIOLI et al., 1999; FÁVERO, 2004).

A identificação e transferência de genes de resistência de material silvestre para cultivares altamente produtivos têm sido um dos principais gargalos em algumas culturas na aplicação do manejo integrado de pragas e doenças. A transferência destas características por métodos convencionais de melhoramento é bastante lenta, uma vez que, durante o processo de introgressão dos genes de interesse, também são transferidas características

indesejáveis, tais como baixa produtividade e baixa qualidade de frutos. Conseqüentemente, vários retrocruzamentos são necessários para se obter plantas com as características desejáveis.

Resistência a *M. hapla* foi encontrada em *A. glabrata*, mas esta espécie não é compatível com o amendoim cultivado, isto é, não é possível o cruzamento entre elas (BANKS, 1969 citado por NELSON et al., 1989). Como a introdução de resistências em amendoim é feita por melhoramento tradicional, é preciso que se encontrem resistências em espécies compatíveis geneticamente com *A. hypogaea*. Nelson et al. (1989) avaliaram a resistência a *M. arenaria* e *M. hapla* em 116 espécies silvestres de *Arachis* e encontraram altos níveis de resistência em muitas delas. A resistência a *M. arenaria* identificada em *A. cardenasii* (NELSON et al., 1990) foi introgridida em *A. hypogaea* por Stalker e colaboradores em 1995 (STALKER e SIMPSON, 1995; CHOI et al., 1999). Garcia et al. (1996) observaram que esta resistência estava condicionada a dois genes dominantes, um gene denominado *Mag*, o qual inibia a formação de galhas na raiz, e o gene denominado *Mae*, que inibia a produção de ovos por *M. arenaria*. Esta mesma resistência foi também introgridida para *A. hypogaea* por Simpson (1991) em algumas variedades americanas. No entanto, existe ainda a necessidade de se identificar novas fontes de resistência a *M. arenaria*, visando a piramidização de genes de resistência, e de novos genes de resistência a outras espécies de *Meloidogyne*, de maior importância para o Brasil, e sua incorporação em variedades nacionais.

Uma alternativa ao melhoramento tradicional é a identificação de seqüências expressas (ESTs) associadas à resposta de resistência em germoplasma silvestre, e seu mapeamento em mapa genético de *Arachis* recentemente desenvolvido por este grupo (MORETHZSOHN et al., 2005), possibilitando a seleção assistida, o que acelerará o melhoramento tradicional. Desta forma, será possível, em cada fase da seleção, a escolha dos indivíduos que contêm o máximo do genótipo desejado, diminuindo o tempo do processo de seleção. Além disso, estas seqüências poderão ser utilizadas no isolamento de genes de resistência e sua transferência direta para espécies cultivadas através da transformação de plantas.

1.2 Análise da expressão gênica

O estudo da expressão gênica tem demonstrado ser uma importante ferramenta no entendimento dos processos biológicos em nível molecular. Por exemplo, estes estudos podem ser utilizados na identificação de rede de genes expressos de fundamental importância no desenvolvimento de determinada estrutura, ou na resposta de um organismo a um estímulo externo. O estudo da expressão gênica diferencial pode contribuir para a caracterização de resistências, pois possibilita a identificação de genes-chave de redes pela comparação da expressão gênica durante o desenvolvimento de uma estrutura sob condições normais e em organismos carregando uma mutação ou submetidos a algum tipo de stress. O conjunto de dados da expressão diferencial de vários genes sob diferentes condições, pode ser usado para reconstruir as vias reguladas por estes genes, predizer onde eles atuam e identificar novos genes associados ao processo.

Para o entendimento da função de um gene, é fundamental o estudo de onde e quando ele é expresso. Recentemente, várias estratégias foram desenvolvidas para permitir o estudo da função de vários genes simultaneamente, entre elas: a genética reversa (geração de mutações específicas em genes de interesse), *screens* mutagênicos (geração de mutações randômicas e screening de um pool de mutantes para se identificar fenótipos de interesse) e bioinformática (a análise dos dados gerados por todas as estratégias acima). As estratégias acima, associadas aos projetos genoma, que têm como objetivo o sequenciamento do genoma inteiro de vários organismos, têm possibilitado o estudo sistemático da expressão diferencial de genes em nível de genoma como um todo. A análise da expressão diferencial de genes em resposta ao ataque de um patógeno constitui, portanto, ferramenta importante no isolamento de genes de resistência ou de fatores envolvidos com a interação patógeno-hospedeiro.

Os ESTs são uma forma complementar, mas extremamente rápida de identificação de novos genes (HÖFTE et al., 1993). ESTs são seqüências curtas de DNA produzidas a partir de clones de cDNA escolhidos aleatoriamente e sequenciados uma única vez (GAUTHERET et al., 1998). Além de serem amplamente explorados na identificação de genes novos, vêm

também sendo utilizados para a criação de extensos catálogos de genes (AARONSON et al., 1996 citado por GAUTHERET et al., 1998; ZAFAR et al., 2002). Estes catálogos permitem a comparação de similaridades de seqüências a genes já conhecidos sugerindo assim sua função (MATTHEWS et al., 2001).

Até o momento, apenas 1300 ESTs, todos oriundos de amendoim cultivado *Arachis hypogaea*, estão disponíveis no genbank (LUO et al., 2005). Destes, menos de 10% têm função putativa associada à resistência. Desta forma, uma maior varredura do genoma de *Arachis*, incluindo principalmente espécies silvestres com resistência comprovada a fungos e nematóides, se faz necessária.

Neste estudo, objetivou-se caracterizar genes responsáveis pela resistência a *M. arenaria* em *Arachis stenosperma*. O método da análise de ESTs “in silico” visou identificar genes cuja expressão é modificada durante desafio com o patógeno, de genética muito complexa, mas cujo nível de expressão determina resistência ou suscetibilidade (ELLINGBOE, 2000).

Além disso, objetivou-se selecionar ESTs para serem utilizados como marcadores gênicos em mapas genéticos de *Arachis*, contribuindo para o melhoramento genético através de seleção assistida por marcadores moleculares da cultura. Estes marcadores estão sendo mapeados assim como clones genômicos, indicando a posição dos genes, alguns com função e padrão de expressão conhecidos, em regiões do genoma que podem ser correlacionadas com os diferentes fenótipos. Assim, a associação de marcadores gerados pelo clone de cDNA com fenótipos poderá aumentar o entendimento ou o relacionamento com as vias e mecanismos bioquímicos que afetam características agrônômicas como resistência (MATTHEWS et al., 2001). Os ESTs selecionados serão convertidos em marcadores baseados em PCR através de primers desenhados a partir de suas seqüências-STS (Sequenced Tagged Site) (MATTHEWS et al., 2001).

Considerando-se que genes de resistência encontram-se distribuídos no genoma em “clusters” (AARTS et al., 1998), há grande chance de se encontrar vários genes próximos que confirmam resistência a outras pragas (ex. *M.incognita*, *M.arenaria* e *M.hapla*) através de “chromosome walking” (STEIN et al., 2000). Pretende-se, numa etapa posterior, isolar os genes candidatos,

caracterizá-los e transferi-los para outras plantas de importância econômica por transformação direta de plantas.

Materiais e Métodos

3.1- Extração de RNA total

O RNA total foi extraído das raízes e folhas saudias (RN) 48 h após a infecção com *M. arenaria* (RM). Para a extração foi utilizado o protocolo de extração do *Trizol Reagent*[®] (Invitrogen), com modificações:

- a. As raízes ou folhas foram lavadas, pesadas e congeladas em N₂ líquido imediatamente.
- b. Utilizou-se a proporção de 200mg de raiz/folha para cada mL de *Trizol*.
- c. Raízes e folhas de *Arachis* possuem muito polissacarídeo, portanto, incluiu-se as seguintes modificações para evitar contaminação da amostra com polissacarídeo: o RNA foi centrifugado a 14.000 g após a homogeneização com *Trizol* e o sobrenadante continuou sendo processado. Na etapa da precipitação, adicionou-se 0,8 M de citrato de sódio e 1,2 M NaCl juntamente com o isopropanol.
- d. Realizou-se limpeza do RNA com o *Rneasy Plant Mini Kit* (Qiagen).
- e. Foi extraído cerca de um miligrama de RNA total de cada *bulk* (resistente e suscetível) contendo 20g de raízes para posterior extração do mRNA. Os RNAs foram quantificados em espectrofotômetro e a qualidade verificada por eletroforese.

3.2-Extração de RNA poli A⁺

- a) A quantidade inicial de RNA total para extração do RNA poli A⁺ foi de 1 mg para cada *bulk*.
- b) Para extração do RNA poli A⁺ foi utilizado *Oligotex Spin Column*- (Qiagen) de acordo com as orientações do fabricante, salvo algumas modificações:

- Incubou-se RNA total e resina de oligo dT por trinta minutos sob agitação.
- Nas três eluições, ressuspendeu-se a resina com o volume máximo recomendado (100µL) da solução OEB e pipetou-se a 70° C.

3.3-Construção das bibliotecas de cDNA

Foram geradas duas bibliotecas de cDNA correspondente aos seguintes tratamentos:

- a. Raízes de *Arachis* sadias
- b. Raízes de *Arachis* inoculadas com *M. arenaria*

As bibliotecas de cDNA foram confeccionadas com *SMART™ cDNA Library Construction Kit* (Clontech-BD Bioscience) de acordo com as instruções do fabricante. Foram obtidos cDNAs longos e completos (*full-length*) preservando a seqüência 5' do mRNA. Utilizou-se uma seqüência de oligo dT modificada denominada CDSIII/3'PCR Primer, que inicia a síntese da primeira fita do cDNA e de um outro oligo, SMART IV Oligo que serve com um pequeno e curto molde extendido na extremidade 5' do mRNA. Como o SMART IV Oligo possui uma seqüência de Gs na sua extremidade 3' forma com a seqüência de Cs um molde extendido. Desta forma foram gerados cDNAs fita simples com extremidade 5' completas do mRNA, bem como, uma seqüência complementar ao SMART IV Oligo, que serve então, como um sítio de iniciação universal (âncora SMART) para as amplificações subseqüentes. Os cDNAs foram clonados em bacteriófago *SMART™ cDNA Library Construction Kit* (Clontech-BD Bioscience).

3.4-Seqüenciamento dos ESTs

Foram seqüenciados pelo menos 4000 clones de cada biblioteca, totalizando 8675 ESTs. O seqüenciamento foi realizado na plataforma genômica – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e na Universidade

Católica de Brasília, utilizando-se seqüenciador automático ABI 3700 e o kit Big-DYE (Amershan-Manheim).

3.5-Análise computacional dos ESTs

Depois do seqüenciamento dos clones, realizou-se a análise dos mesmos através de bioinformática. Primeiramente, foi feito um controle de qualidade das seqüências, utilizando-se os programas Phred (EWING et al., 1998) e Phrap (GREEN, 2000). As seqüências de alta qualidade foram submetidas a comparação com seqüências já existentes em bancos de dados tais com GenBank (NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) através do programa *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990). As seqüências com similaridade com seqüências de nematóides (no caso de plantas inoculadas) foram desconsideradas, e as outras foram utilizadas para a criação de um banco de dados local .

1. As seqüências de cDNA mais abundantes foram aglomeradas em *contigs* únicos. Isto foi feito através de metodologias baseadas em *Blast*.
- 1.2. Após a construção dos contigs, foi realizada a subtração eletrônica que permitiu a identificação de genes expressos diferencialmente em *bulks* resistente e susceptível em resposta à infecção por *M. arenaria* .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. ESTs Diferencialmente Expressos

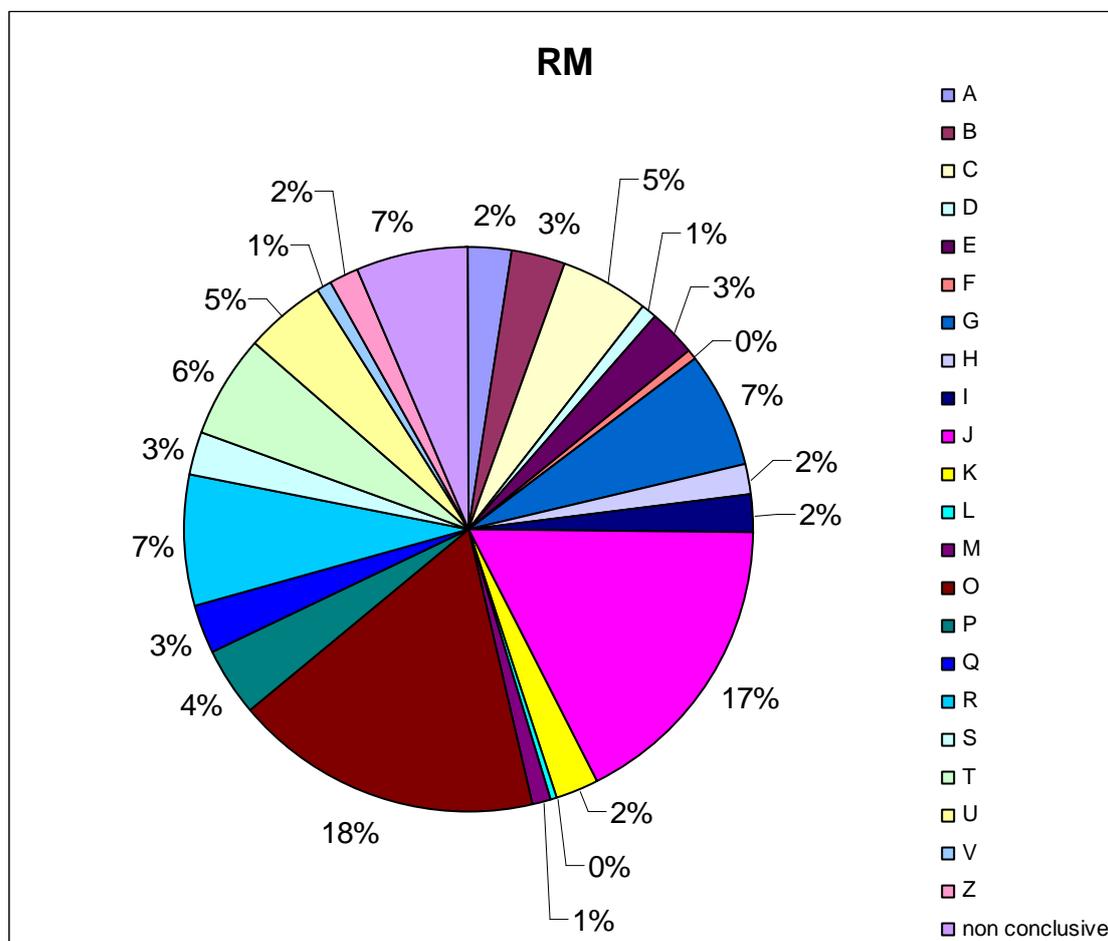
A fim de se identificar os fatores moleculares envolvidos neste fenômeno, foram construídas duas bibliotecas de cDNA de raízes não inoculadas e inoculadas com o nematóide. Foram seqüenciados 8785 clones das duas bibliotecas dos quais 5921 seqüências (67,7%) foram aproveitadas após análise de qualidade, formando um total de 3500 clusters, sendo 1833 da biblioteca de raízes não inoculadas (RN) e 1930 da biblioteca de raízes

inoculadas. Foram obtidos 2537 *singlets* (seqüências únicas) e o total de *contigs* (agrupamentos) foi de 963. Através de uma análise *in silico*, foi feita a comparação dos genes expressos nas duas bibliotecas. Na figura 1 é apresentada a classificação funcional nas diversas categorias de expressão gênica da biblioteca de raízes inoculadas (RM) de acordo com KOG (<http://www.ncbi.nih.gov/COG/new/showkog.cgi>). Foram obtidos 92 clones exclusivamente expressos na biblioteca inoculada sendo que seis deles apresentaram expressão diferencial significativa pelo teste de Fish e alguns estão relacionados à defesa (Tabela 1). O contig 821 contém seqüências que têm homologia com o fito-hormônio auxina. Este hormônio regula diversos processos de crescimento e desenvolvimento através do controle da expressão dos genes que respondem à auxina. Sabe-se que a regulação destes processos mediados pela auxina é muito conservada, como a composição química da parede celular, as respostas fisiológicas à auxina são similares e a proteína chave que media o processo de alongação rápida, a expansina apresenta-se extremamente conservada. No entanto, se conhece pouco sobre os genes que têm expressão reprimida pela auxina. Um gene que codifica para a proteína *auxin repressed protein like* (ARP) se apresentou bem mais expressa na RM. É sabido que a auxina modula a expressão da citocinina na formação de raízes laterais que por sua vez é necessária para o estabelecimento do sítio de alimentação do nematóide (LOHAR et al., 2004). O gene da citocinina aparece 20 vezes mais expresso na biblioteca RN (Tabela 1).

Outro gene importante que apresentou diferença na sua expressão é o da proteína metalotioneína do tipo 2, que aparece mais expressa nas raízes não inoculadas (RN) do que nas inoculadas. Potenza et al. (2001) demonstraram através de *northern-blots* que em raízes de alfafa inoculadas com *M. incognita*, ocorre uma diminuição da expressão de metalotioneína, quando comparada com a raiz não inoculada. Acredita-se que estas proteínas funcionem como “coletoras de metais” e que são induzidas por pequenas GTPases (Racs) que são importantes na regulação de sinais de transdução em eucariotos (WONG et al., 2004). Além disso, em experimentos com células de arroz, a expressão das metalotioneínas foi diminuída quando estas foram tratadas com calyculin A e/ou N-acetyl-chitooligosaccharide (ambos indutores

de respostas associadas à defesa como a fosforilação oxidativa-ROS), indicando a associação desta proteína com a respostas de hipersensibilidade (WONG et. al., 2004). Por outro lado, quando houve um aumento da expressão da metalotioneína, ocorreu a diminuição de ROS e conseqüentemente uma diminuição da resistência a doenças (WONG et. al., 2004). Foram observados ainda, outros genes relacionados à resistência que somente foram expressos na RM, como PR 10, germin-like proteins, heat-shock proteins e outras (Tabela1).

Figura 1- Representação gráfica dos genes expressos da biblioteca de raízes de *A. stenosperma* inoculadas com o nematóide *M. arenaria* raça 1.



PROCESSO CELULARES E SINALIZAÇÃO

- M Parede Celular/membrana/biogênese de envelope
- N Motilidade Celular
- O Modificação Pós-Transcricional, Turnover Protéico, Chaperonas
- T Mecanismos de Transdução de Sinal
- U Tráfego Intracelular, Secreção e Transporte Vesicular
- V Mecanismos de Defesa
- W Estruturas Extracelulares
- Y Estrutura Nuclear
- Z Citoesqueleto

PROCESSAMENTO E ESTOCAGEM DE INFORMAÇÃO

- A Processamento e Modificação de RNA
- B Estrutura e Dinâmica da Cromatina
- J Tradução, Estrutura Ribossomal e Biogênese
- K Transcrição
- L Replicação, Recombinação e Reparo

METABOLISMO

- C Produção e Conversão de Energia
- D Controle do Ciclo Celular, Divisão Celular, Divisão Cromossômica
- E Transporte e metabolismo de Aminoácidos
- F Transporte e metabolismo de Nucleotídeos
- G Transporte e metabolismo de Carboidratos
- H Transporte e metabolismo de Coenzimas
- I Transporte e metabolismo de Lipídeos
- P Transporte e metabolismo de Íons Inorgânicos
- Q Biossíntese, Transporte e Catabolismo de Metabólicos Secundários

POUCO CARACTERIZADO

- R Apenas Função Geral Preditada
- S Função Desconhecida

Tabela 1 - ESTs diferencialmente expressos nas bibliotecas RN (raiz não inoculada) e RM (raiz inoculada) associados à resposta de defesa.

Contig	Nº de Leituras	Bibliotecas	Homologia de BLAST	Função putativa	Fisher Test
821	115	1RM (24), 2RM (81), RN (9)	Gb (AAX84677.1) Auxin repressed protein like protein ARP1 (Manihot esculenta)	Regulação do Crescimento e Desenvolvimento	X
185	25	1RM (11), 2RM(13), RN(1)	(1e-38) dbj BAD83567.1 hypothetical protein [Nicotiana tabacum] BAD83437.1 -hypothetical protein [Nicotiana tabacum]		X
154	60	RN (50), 1RM (2), 2 RM (8)	P43390- MT2_ACTCH Metallothionein-like protein type 2	Reação Oxidativa Resistência	X
433	44	1RM (2), 1RN (40), 2RM (1)	CAB79732.1 cytokinin oxidase-like protein [Arabidopsis thaliana]		X
532	39	1RN (35) 2RM (2)	AAO72531.1- alcohol dehydrogenase 1; ADH1 [Lotus corniculatus]		X
874	38	1RM, 2RM	gb AAT02527. - metallothionein 3b [Populus balsamifera subsp. trichocarpa x Populus deltoides] (3e-15)	Cell rescue, defense and virulence	X
214	20	1RM, 2RM	NP_919162.1 - hypothetical protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]		X
190	10	1RM, 2RM	dbj BAD90696.1 plasma membrane intrinsic protein 1;1 [Mimosa pudica] (1e-151)	Signal trasduction, drought	
155	7	1RM, 2RM	CAA06245.1 -elongation factor 1-alpha (EF1-a) [Cicer arietinum] (2e-77)	Plant-pathogen interaction, resitance	
37	5	1RM, 2RM	CAA69931.1- PR10-1 protein [Medicago truncatula]	Resistance, plant pathogenesis	
909	5	1RM, 2RM	AAQ87663.1- translationally controlled tumor protein [Elaeis guineensis] (1e-43)	Plant -pathogen interaction	
151	5	1RM, 2RM	CAA82751.1 -protein kinase C inhibitor [Zea mays] sp	Cell rescue, defense and virulence	
61	4	1RM, 2RM	Pir T07629 small heat shock protein - soybean sp P04794 HS14_SOYBN 17.5 kDa class I heat shock protein (HSP 17.5-E)	Plant-pathogen interaction, resitance House-Keeping	
143	3	1RM, 2RM	AAC83463.1-cationic peroxidase 2 [Glycine max]	Plant-pathogen interaction, resitance	
150	3	1RM, 2RM	AAN08609.1- glutathione-S-transfere-like protein [Medicago truncatula] (2e-83)	Plant-pathogen interaction, resitance	
156	3	1RM, 2RM	CAB65369.1- germin-like protein [Pisum sativum]	Plant-pathogen interaction, resitance	
859	3	1RM, 2RM	NP_916980.1- cytokinesis regulating protein - like [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] gb AAU03363.1 wound/stress protein [Lycopersicon esculentum]	Plant-pathogen interaction, resitance	

Além dos clones diferencialmente expressos, foi possível identificar 91 microssatélites dentro das seqüências dos *ESTs* da biblioteca não inoculada e 114 da inoculada. Cinquenta e quatro primers já foram desenhados e 30% se mostraram polimórficos numa população diplóide de *Arachis* (MORTEZSOHN et al., 2005). Novos primers estão sendo desenhados e serão testados numa população tetraplóide.

Através da análise da expressão diferencial observou-se que a infecção do nematóide induz a repressão do gene do hormônio auxina e, este por sua vez, também reprime a expressão do gene de citocinina, impedindo assim o estabelecimento do sítio de alimentação do nematóide. No entanto, não há relatos identificando a auxina como fator iniciador de uma resposta de hipersensibilidade, como foi observado nas raízes infectadas. A análise *in silico*, permitiu a escolha de genes que serão amplificados e utilizados como sondas em experimentos de macroarranjo e *northern-blot*, utilizando-se o RNA total de plantas resistentes desafiadas e não desafiadas com o nematóide para confirmação da expressão diferencial dos mesmos e sua distribuição temporal.

A análise da expressão gênica diferencial utilizando-se macroarranjos e *northern-blots* é um método eficiente para se identificar genes cuja expressão é modificada durante desafio com o patógeno, mas cuja genética é muito complexa. A identificação e isolamento de diferentes genes de resistência oriundos de germoplasma silvestre e sua introgressão em material cultivado possibilitará o acúmulo (piramidização) de genes de resistência, dificultando a quebra da resistência pelo patógeno. Além disso, uma vez que serão mapeados genes de resistência tanto em espécies possuidoras de genoma AA, como em espécies de genoma BB, plantas AA com os genes de resistência poderão ser cruzadas com plantas BB também resistentes, obtendo-se plantas AB, o que torna viável o cruzamento com *A. hypogaea*, para introgressão destes genes.

Considerando que estes patógenos causam danos expressivos à cultura do amendoim, o isolamento de genes de resistência e sua introgressão em cultivares comerciais de amendoim contribuirão para o aumento da produtividade

beneficiando, os produtores, a agroindústria e o meio ambiente que será poupado da aplicação massiva de agroquímicos.

Referências bibliográficas

AARTS, M. G.; LINTEL, T. E.; HEKKERT, B.; HOLUB, E. B.; BEYNON, J. L.; STIEKEMA, W. J.; PEREIRA, A. Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, US, v. 11, p. 251-258, 1998.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.

BAILEY, J. Peanut disease management. In: NORTH Carolina peanut production guide. [S.l: s.n], 2002. Chapter 6.

BERTIOLI, D. J.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; CARNEIRO, R. G.; VALLS, J. F. M.; FAVERO, A. P.; BRUZZI, M.; VELLO, N. A.; MORAES, S.; GUIMARÃES, P. M. The Brazilian *Arachis* germplasm bank: its diversity, disease resistances and resistance gene analogues. **Molecular Genetics of Model Legumes**, Norwich, p. 24-28, June 2000.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, A. R. A.; CARNEIRO, R. G. Enzyme phenotypes of Brazilian isolates of *Meloidogyne* spp. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge, FR, v. 19, p. 555-560, 1996.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, A. R. A.; QUÉNÉHÉRVÉ, P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. isolates. **Nematology**, Leiden, NL, v. 2, p. 645-654, 2000.

CHOI, K.; BUROW, M. D.; CHURCH, G.; BUROW, G.; PATERSON, A. H.; SIMPSON, C. E.; STARR, J. L. Genetics and mechanism of resistance to *Meloidogyne arenaria* in peanut germoplasm. **Journal of Nematology**, College Park, US, v. 31, p. 283-290, 1999.

CONAB. **Conjuntura semanal**: especiais 16-20/09. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2004.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, US, v. 8, p. 175-185, 1998.

ELLINGBOE, A. Plant-pathogen interactions: genetic and comparative analyses. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, NL, v. 107, p. 79-84, 2000.

FÁVERO, A. P. **Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando à introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado.**

2004. 165 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FOSTER, D. J.; STALKER, H. T.; WYNNE, J. C.; BEUTE, M. K. Resistance of *Arachis hypogaea* L. and wild relatives to *Cercospora arachidicola* Hori. **Oléagineux**, Paris, v. 36, p. 139-143, 1981.

GARCIA, G. M.; STALKER, H. T.; SHROEDER, E.; KOCHERT, G. Identification of RAPD, SCAR e RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis cardenasii* into *Arachis hypogaea*. **Genome**, Ottawa, v. 39, p. 836-845, 1996.

GAUTHERET, D.; POIROT, O.; LOPEZ, F.; AUDIC, S.; CLARVERIE, J. M. Alternate polyadenylation in human mRNAs: a large-scale analysis by EST clustering. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, US, v. 8, p. 524-530, 1998.

GREEN, P. Documentation for *PHRAP* and *cross_match* (version 0.990319). Disponível em: <<http://www.phrap.org/phrap.docs/phrap.html>>. Acesso em: MAIO 2000.

HÖFTE, H.; DESPREZ, T.; AMSELEM, J.; CHIAPELLO, H.; CABOCHE, M. An inventory of 1152 expressed sequence tags obtained by partial sequencing of cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, GB, v. 4, p. 1051-1061, 1993.

LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; GUIMARÃES, P. M.; BRUZZI, M.; CARNEIRO, R. G.; VALLS, J. F. M.; BERTIOLI, D. J. **Busca de resistência ao nematóide das galhas *Meloidogyne* spp. e seqüências análogas a genes de resistência em acessos silvestres de *Arachis***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 17 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa, 20).

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

LORDELLO, R. R. A.; LORDELLO, A. I. L.; GODOY, I. J. Ocorrência de *Meloidogyne javanica* parasitando raízes e nódulos de amendoim no Paraguai. **Bragantia**, Campinas, v. 56, p. 87-89, 1997.

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.

MATTHEWS, B. F.; DEVINE, T. E.; WEISEMANN, J. M.; BEARD, H. S.; LEWERS, K. S.; MACDONALD, M. H.; PARK, Y. B.; MAITI, R.; LIN, J.; KUO, J.; PEDRONI, J. J.; CREGAN, P. B.; SAUNDERS, J. A. Incorporation of sequence cDNA and

genomic markers into soybean genetic map. **Crop Science**, Madison, US, v. 41, p. 516-521, 2001.

MORETZSOHN, M. C.; LEOI, L.; PROITE, K.; GUIMARÃES, P. M.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; GIMENES, M. A.; MARTINS, W. S.; GRATTAPAGLIA, D.; BERTIOLI, D. J. Development and mapping of microsatellite markers in *Arachis* (Fabaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, p. 1432-2242, 2005. Publicação on-line.

MORETZSOHN, M. C.; LEOI, L.; PROITE, K.; GUIMARÃES, P. M.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; VALLS, J. F. M.; GIMENES, M. A.; MARTINS, W.; BERTIOLI, D. J. Development and mapping of microsatellite markers in *Arachis*. In: PLANT AND ANIMAL GENOMES CONFERENCE, 13., San Diego, California. **Abstracts...** San Diego: Scherego International, 2005. p. 457. PAG-XIII Abstracts, pôster.

LORDELLO, R. R. A.; LORDELLO, A. I. L.; GODOY, I. J. Ocorrência de *Meloidogyne javanica* parasitando raízes e nódulos de amendoim no Paraguai. **Bragantia**, Campinas, v. 56, p. 87-89, 1997.

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, p. 654-660, 1989. Supplement.

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, p. 242-244, 1990.

PANDE, S.; RAO, J. N. Resistance of wild *Arachis* species to late leaf spot and rust in greenhouse trials. **Plant Disease**, Saint Paul, US, v. 85, p. 851-855, 2001.

POTENZA, C.; THOMAS, S. H.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Genes induced during early response to *Meloidogyne incognita* in roots of resistant and susceptible alfafa cultivars. **Plant Science**, Limerick, IE, v. 161, p. 289-299, 2001.

SHARMA, S. B.; MCDONALD, D. Global status of nematode problems of groundnut, pigeonpea, chickpea, sorghum and pearl millet. **Crop Protection**, Guildford, GB, v. 9, p. 453-458, 1990.

SIMPSON, C. E. Pathways for introgression of pest resistance into *Arachis hypogaea* L. **Peanut Science**, Raleigh, US, v. 18, p. 22-26, 1991.

SINGH, A. K. Utilization of wild relatives in the genetic improvement of *Arachis hypogaea* L. 8. Synthetic amphidiploids and their importance in interspecific breeding. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 72, p. 433-439, 1986.

SINGH, A. K. Putative genome donors of *Arachis hypogaea* (Fabaceae). Evidence from crosses with synthetic amphidiploids. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 160, p. 143-151, 1988.

STALKER, H. T. Utilizing *Arachis cardenasii* as a source of *Cercospora* Leafspot resistance for peanut improvement. **Euphytica**, Wageningen, v. 33, p. 529-538, 1984.

STALKER, H. T.; SIMPSON, C. E. Germplasm resources in *Arachis*. In: PATTEE, H. E.; STALKER, H. T. (Eds.) **Advances in peanut science**. Stillwater: APRES, 1995. p.14-53.

STEIN, N.; FEUILLET, C.; WICKER, T.; SCHLAGENHAUF, E.; KELLER, B. Subgenome chromosome walking in wheat: a 450-kb physical contig in *Triticum monococcum* L. spans the Lr10 resistance locus in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). **Proceedings of the National Academy of Science U S A**, Washington, v. 97, p. 13436-41, 2000.

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

WYNNE, J. C.; BEUTE, M. K.; NIGAM, S. N. Breeding for disease resistance in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, US, v. 29, p. 279-303, 1991.

WONG, H. L.; SAKAMOTO, T.; KAWASAKI, T.; UMEMURA, K.; SHIMAMOTO, K. Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1447-1456, 2004.

ZAFAR, N.; MAZUMDER, R. ; SETO, D. **BMC Bioinformatics**, V. 3, p. 12, 2002.