EXPRESSÃO GÊNICA DA INTERAÇÃO
SOJA - *Meloidogyne javanica*
VIA MICROARRANJOS DE DNA

ADRIANE WENDLAND

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura
“Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em Agronomia,
Área de Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro - 2005

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Wendland, Adriane

Expressão gênica da interação soja – *Meloidogyne javanica* via microarranjos de
DNA / Adriane Wendland. - - Piracicaba, 2005.
127 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.
Bibliografia.

1. DNA 2. Galha 3. 4. Genótipo 5. Expressão gênica 6. Nematóide parasito de
planta 7. Relação hospedeiro-patogêno 8. Soja I. Título

CDD 633.34

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade porque se tornará assim uma máquina utilizável, mas não uma personalidade.

É necessário que adquira um senso prático daquilo que vale a pena ser empreedindo, daquilo que é belo, do que é moralmente correto.

A não ser assim, ele se assemelhará com seus conhecimentos profissionais mais a um cão ensinado do que a uma criatura harmonicamente desenvolvida.

Deve aprender a compreender as motivações dos homens, suas quimeras e suas angústias, para determinar com exatidão o seu lugar preciso em relação a seu próximo e a comunidade”

Albert Einstein

Com amor,

DEDICO

Aos meus pais, Walter e Magda

Minha irmã, Andréia e sobrinha, Amanda

OFEREÇO

Ao Dr. Celso Charuri, que mostrou o caminho
para aqueles que desejam Um Mundo Bem Melhor

AGRADECIMENTOS

A DEUS.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia e Entomologia da Embrapa Soja, do Laboratório de Genética Molecular da Unesp de Jaboticabal e do Departamento de Fitopatologia e Laboratório de Genética Molecular da Esalq/USP.

Ao Prof. Dr. José Otavio Menten, pela amizade e paciência ao me orientar à distância.

Ao Dr. Alexandre Lima Nepomuceno pelos ensinamentos, amizade e recursos disponibilizados na execução deste trabalho na Embrapa Soja.

Ao Dr. João Flávio Veloso Silva pela amizade, por todo apoio e orientação durante o período que permaneci na Embrapa Soja.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, por sua orientação e ensinamentos no primeiro ano de doutorado.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia pela dedicação e respeito com que exercem o dom de ensinar.

A Prof. Dra. Eliana G. Macedo Lemos e Prof. Dra. Lúcia Alves, da Unesp de Jaboticabal, pela amizade e pela determinação em formar o centro de referência em Microarranjos.

A Dr. Regiane F. Traversolo Sacomano, pela valiosa amizade, pela ajuda constante e treinamento em Microarranjos e também por me receber em sua casa.

A Silvana e Cesar do laboratório da Embrapa Soja, por todo apoio e auxílio.

Ao Dr. Eliseu Binneck, pela ajuda na análise de dados e de bioinformática.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação, em especial aos Drs. Kátia, Fellipe e Cândido, pelo agradável convívio e pela troca de conhecimentos.

A Dr. Heloísa do laboratório de Patologia de Sementes e aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, Jeferson, Marina e Silvia.

A Silvia Zinsly da Biblioteca da Esalq pelas correções ortográficas.

A Dr. Giorla Carla Piubelli pela amizade que permanece inabalável a tanto tempo e a toda sua família que considero um pouco minha.

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos amigos da Pró-Vida de Piracicaba, Londrina, Marília, Curitiba e São Paulo, pelo junção em um grande Propósito.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 O Patossistema Soja- <i>Meloidogyne javanica</i>	3
2.2 Genética da Interação soja - Nematóide.....	6
2.3 Expressão gênica via Microarranjos de DNA.....	12
2.3.1 Genoma Funcional.....	16
2.3.2 Aplicações de Microarranjos de DNA.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Produção de seqüências gênicas para impressão em lâminas de vidro...	26
3.1.1 Construção das seqüências gênicas para os microarranjos.....	26
3.1.2 Controles positivos e negativos.....	32
3.1.3 Impressão robótica dos produtos de PCR purificados.....	33
3.1.4 Fixação dos DNAs nas lâminas.....	34
3.2 Produção de cDNAs marcados para hibridização nos Microarranjos.....	34
3.2.1 Construção do cDNA marcado com fluorescentes Cy3 e Cy5.....	34

3.3 Análise da imagem e obtenção dos dados.....	36
3.3.1 Hibridização dos microarranjos com os cDNAs marcados.....	36
3.3.2 Obtenção e análise das imagens.....	37
3.3.3 Desenho Experimental.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Padronização da técnica de microarranjos.....	39
4.1.1 Produção dos microarranjos para os genótipos de soja.....	39
4.1.2 Produção dos cDNAs marcados.....	41
4.2 Análise genética utilizando a ferramenta SAM	46
4.3 Comparação dos genes diferencialmente expressos nas plantas resistentes inoculadas e não inoculadas com <i>M. javanica</i>	48
4.3.1 Genes com expressão induzida em plantas resistentes a <i>M. javanica</i>	50
4.3.2 Genes com expressão reprimida em plantas resistentes a <i>M. javanica</i>	63
4.4 Comparação dos genes diferencialmente expressos nas plantas suscetíveis inoculadas e não inoculadas com <i>M. javanica</i>	66
4.4.1 Genes com expressão induzida em plantas suscetíveis a <i>M. javanica</i>	68
4.4.2 Genes com expressão reprimida em plantas suscetíveis a <i>M. javanica</i>	78
5 CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
ANEXOS.....	107

LISTA DE FIGURAS

		Página
1	Métodos de construção de bibliotecas de cDNA para seqüenciamento e geração de dados de EST.....	15
2	Esquema representando as etapas da técnica de microarranjos: preparo das raízes de soja para extração de RNA, marcação com Cy3 e Cy5, hibridização e análise da imagem. Fonte-Soybean Funcional Genomic- Shealy et al, University of Illinois.....	18
3	Perfil eletroforético dos produtos amplificados das placas BRSGMMJ1PCR001 (A01 a H12 -canaletas de 1 a 48) e BRSGMMJ1PCR002 (A01 a H12). M (padrão de peso molecular 1 kb) e (produtos amplificados).....	40
4	Perfil eletroforético de amostras de RNA dos genótipos de soja: resistente JF 7056 inoculados e não inoculados com <i>M. javanica</i> – (canaletas 1 e 2); suscetível 266-S (canaletas 3 e 4). PM (padrão de tamanho molecular-Invitrogen, Carlsbad CA, USA).....	43

- 5 Perfil eletroforético de amostras de cDNA dos genótipos de Soja, marcados com fluoróforos Cy3 e Cy5. PM (padrão de tamanho molecular - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), canaletas 1-4 (amostras de RNA dos genótipos 7056 Inoculado, 7056 Não Inoculado, 266-S Inoculado e 266-S Não inoculado)..... 45

- 6 Número de genes, por categoria funcional, expressos diferencialmente em plantas resistentes e suscetíveis. RI: planta resistente com expressão gênica induzida, RR: planta resistente com expressão gênica reprimida, SI: planta suscetível com expressão gênica induzida e SR: planta suscetível com expressão gênica reprimida..... 47

- 7 Identificação dos genes diferencialmente expressos para os genótipos: resistente inoculado (pontos vermelhos) e resistente não inoculado (pontos verdes). Gráfico da diferença relativa observada $d(i)$ versus a diferença relativa esperada $dE(i)$. A linha contínua (em azul) indica quando o $d(i) = dE(i)$, ou seja, quando a diferença relativa observada é idêntica a diferença relativa esperada. As linhas pontilhadas são referentes a distância $\Delta = 0,49$ da linha contínua..... 49

8	Disposição gráfica dos genes diferencialmente expressos para os genótipos: suscetível inoculado (pontos vermelhos) e suscetível não inoculado (pontos verdes). Gráfico da diferença relativa observada $d(i)$ versus a diferença relativa esperada $dE(i)$. A linha contínua (em azul) indica quando o $d(i) = dE(i)$, ou seja, quando a diferença relativa observada é idêntica a diferença relativa esperada. As linhas pontilhadas são referentes a distância $\Delta = 0,08$ da linha contínua.....	66
---	---	----

LISTA DE TABELAS

	Página
1	Características dos genótipos de soja resistente (JF 7056) e suscetível (266-S) não inoculados (NI) e inoculados (I) com 6.700 juvenis J2 de <i>M. javanica</i> 42
2	RNAs obtidos dos genótipos de soja inoculados e não inoculados com <i>M. javanica</i> 42
3	Quantificação da eficiência do cDNA marcado utilizando-se o conjunto de "random primer" e o kit "CyScribe cDNA Post Labelling"..... 44
4	Genes com expressão induzida no genótipo de soja resistente (JF 7056)..... 56
5	Genes com expressão reprimida no genótipo de soja resistente (JF 7056)..... 63
6	Genes com expressão induzida no genótipo de soja suscetível (266-S)..... 74
7	Genes com expressão reprimida no genótipo de soja suscetível (266-S)..... 78

EXPRESSÃO GÊNICA DA INTERAÇÃO SOJA - *Meloidogyne javanica* VIA MICROARRANJOS DE DNA

Autora: ADRIANE WENDLAND

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ OTAVIO MACHADO MENTEN

RESUMO

O nematóide de galhas da espécie *Meloidogyne javanica* é um patógeno de importância econômica na cultura da soja. O controle eficiente deste nematóide é na maioria das vezes, dependente da utilização de genótipos de soja resistente. A interação genética deste patossistema é complexa e a análise da expressão simultânea de genes envolvidos no processo infeccioso se faz necessária. O objetivo deste trabalho incluiu a identificação e caracterização de genes envolvidos na interação soja-nematóide por comparação das diferenças na expressão gênica ocorridas em genótipos de soja resistente (JF 7056) e suscetível (266-S) a *M. javanica*, por meio de microarranjos de DNA. Estes genótipos foram utilizados para a obtenção de quatro tratamentos: plantas resistentes inoculadas, não inoculadas, plantas suscetível inoculadas e não inoculadas com uma concentração de 6700 juvenis J2 de *M. javanica*. O RNA total foi extraído das raízes de cada tratamento e utilizado para construir bibliotecas de cDNA. Após o seqüenciamento, aproximadamente 1000 seqüências únicas foram amplificadas e fixadas em lâminas de vidro. As sondas de cDNA foram marcadas com Cy3

(plantas inoculada) e Cy5 (plantas não inoculadas) sendo estes fluoróforos incorporados diretamente por transcrição reversa. Os arranjos foram hibridizados e intensidade da imagem foi quantificada, normalizada e analisada através da ferramenta estatística SAM. A comparação dos padrões de expressão nas plantas resistentes e suscetíveis mostrou que no genótipo resistente JF 7056, 208 genes apresentam expressão diferencial. Entre eles, 158 genes foram induzidos e 50 genes foram reprimidos nas plantas resistentes a *M. javanica*. No genótipo suscetível 266-S, 103 genes apresentaram expressão diferencial, onde 76 genes foram induzidos e 27 foram reprimidos nas plantas suscetíveis a *M. javanica*. Estes genes foram distribuídos em diferentes categorias funcionais atribuídas por comparação de seqüências de outros organismos depositados em banco de dados. Entretanto, grande proporção dos genes expressos não apresentou homologia com outros genes conhecidos sendo provavelmente, específicos em soja. A expressão induzida nas plantas resistentes inoculadas está relacionada em sua maioria com genes que atuam na interação patógeno-hospedeiro. Entre os genes com expressão induzida no genótipo resistente está Hs1pro-1, (primeiro gene de Resistência a nematóides identificado em plantas) e PR proteína SH2 (relacionada a patogenicidade). A expressão induzida nas plantas suscetíveis inoculadas, no entanto, apresentou vários genes envolvidos com a produção de hormônios como etileno, auxina, giberelina e proteínas relacionadas à maturação e senescência em plantas.

GENETIC EXPRESSION OF SOYBEAN – *Meloidogyne javanica* INTERACTION BY DNA MICROARRAYS

Author: ADRIANE WENDLAND
Adviser: Prof. Dr. JOSÉ OTAVIO MACHADO MENTEN

SUMMARY

The root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is an economically important pathogen of soybeans. Effective control of the nematode is often dependent on the use of resistant genotypes. The genetic interactions are complex and the simultaneous analysis in expression genes involved in the infectious process is done necessary. The use of DNA Microarray technology promises to accelerate rapidly our understanding of infectious disease processes, by allowing the examination of thousands of genes and gene products. To explore the plant genes putatively in the events of nematode-plant parasitism, was used DNA Microarray to conduct expression profiling of the early stages of infection of soybean genotypes. The objective of this work included the identification and characterization of genes involved in the interaction

soybean-nematodes for comparison of the differences in the genetic expression. The infection experiments were conducted with four treatments: genotype of resistant soybean (JF 7056) inoculated and non-inoculated, genotype of susceptible soybean (266-S) inoculated and non-inoculated with a concentration of 6700 juvenile J2 of *M. javanica*. RNA was extracted from the roots of each treatment and used to build cDNA libraries. After the sequencing, approximately 1000 unique sequences of DNA were amplified and spotted in glass slides. The cDNA probe was labeled with Cy3 (inoculated plant) and Cy5 (non inoculated plant), both incorporate directly during reverse transcription. The arrays were hybridized and intensity of the image was quantified, normalized and analyzed through the statistical tool SAM. The comparison of the expression patterns in the resistant and susceptible plants showed that in the genotype JF7056, 208 genes present differential expression. Among them, 158 genes were induced and 50 genes were repressed in the resistant plants to *M. javanica*. In the genotype 266-S, 103 genes presented differential expression, where 76 genes were induced and 27 were repressed in the susceptible plants to *M. javanica*. These genes were distributed in different functional categories attributed by comparison of sequences of other organisms deposited in database. However, great proportion of the genes expressed didn't present homology being probably, specific to soybean. The expression induced in

the inoculated resistant plants is related in majority with genes that act in the host-pathogen interaction. Among the genes with expression induced in the resistant genotype are *Hs1pro-1*, (first Resistance gene identified in plant nematode) and PR protein SH2 (Pathogenesis related). The expression induced in the inoculated susceptible plants, however, it presented several genes involved with the production of hormones as ethilen, auxin, gibberellin, senescence and maturation related protein.

1 INTRODUÇÃO

Os nematóides formadores de galhas constituem uns dos principais problemas para a cultura da soja. Em algumas regiões do Brasil a ocorrência destes organismos é generalizada, crescente a cada safra. Os nematóides se desenvolvem no interior das raízes de soja, impedindo, desta forma, o fluxo regular de água e nutrientes por toda a extensão da planta. A monocultura, principalmente em solos exauridos, com deficiência nutricional, e a suscetibilidade de cultivares contribuem para o agravamento da doença.

Dentre as espécies freqüentemente associadas a danos na soja estão *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. hapla*. As duas primeiras destacam-se como as mais prejudiciais, sendo que *M. javanica* assume relevante importância em regiões de clima tropical, como o Brasil (Schmitt & Noel, 1984).

Os fitonematóides não podem ser erradicados, pois possuem mecanismos como a criptobiose, que permitem que os ovos permaneçam viáveis por longos períodos no solo. Assim, várias medidas de controle devem ser utilizadas de modo integrado, visando manter as populações em nível mínimo. Além da rotação de culturas, a utilização de cultivares resistentes ou tolerantes é uma ferramenta muito importante no controle. A identificação de genes expressos durante a relação parasitária de nematóides associados à cultura da soja e seleção de genes de resistência a *M. javanica*, que estão freqüentemente associados a danos na produção de soja em todo o Brasil são desejáveis para

aprimoramento e obtenção de variedades resistentes em curto período de tempo.

O recente desenvolvimento da tecnologia de microarranjos de DNA gera uma excelente oportunidade para caracterizar a expressão diferencial e simultânea de genes nos mais diferentes organismos. Nesse sentido, o estudo do genoma baseado em seqüências parciais de genótipos de soja (*Glycine max*), focalizou a análise de genes associados à relação patógeno/hospedeiro.

O objetivo deste trabalho incluiu a identificação e caracterização de genes envolvidos na interação soja-nematóide por comparação das diferenças na expressão gênica ocorridas em genótipos de soja resistente (JF 7056) e suscetível (266-S) a *M. javanica*, por meio de microarranjos de DNA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O patossistema soja-*Meloidogyne javanica*

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma das principais fontes de proteína utilizadas na atualidade e está envolvida em todas as ramificações da cadeia agroindustrial. Alcançou lugar de destaque no comércio internacional nos últimos anos, elevando o Brasil ao primeiro exportador mundial da oleaginosa. Cultivada inicialmente na Região Sul do Brasil, vem experimentando significativo aumento de área plantada, especialmente nos cerrados do Brasil Central, devido a grande demanda de proteína vegetal e óleo nos mercados externo e interno. A produção agrícola brasileira representa aproximadamente 8,9% do Produto Interno Bruto (PIB). Desse montante, a soja participa com 16,0% do PIB agrícola. Na safra 2003/2004, foram colhidas 49.770.100 toneladas no Brasil, numa área cultivada de 21.275.00 hectares, com rendimento médio de 2.339 kg/ha (CONAB, 2004). Este rendimento médio é crescente no País e, em algumas regiões, observam-se valores bastante elevados, como no Paraná e no Mato Grosso.

Entre os fatores que interferem na produtividade, estão diversas doenças, destacando-se aquelas causadas por nematóides fitoparasitos. O nematóide de cisto, *Heterodera glycines*, os nematóides de galhas, do gênero *Meloidogyne*, e o nematóide reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) são os que apresentam maior potencial de dano a sojicultura (Schmitt &

Noel, 1984). As perdas anuais da produção mundial são estimadas em 11% devido à redução da quantidade de grãos colhidos e aumento dos gastos com medidas de controle e defensivos.

No Brasil, as espécies mais associadas a danos são *Meloidogyne javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria*, *Heterodera glycines*, *Pratylenchus brachyurus* e *Rotylenchulus reniformis* (Silva, 1998). A severidade do dano depende da espécie envolvida e de seu nível populacional, das condições climáticas, do tipo de solo e das práticas culturais sob as quais a soja é cultivada. Além disso, a situação pode agravar-se pela interação com outros organismos patogênicos, em especial fungos do solo, como *Phytophthora*, *Fusarium* e *Rhizoctonia* (Good, 1973; Sasser, 1989). Os danos causados por *Fusarium solani* aumentaram significativamente no Brasil, especialmente em Goiás e Minas Gerais, sendo coincidentes com áreas infestadas por nematóides.

Os nematóides são, inicialmente, considerados parasitas e, se este parasitismo resulta em doença para a planta hospedeira, o parasita passa a ser denominado patógeno (Triantaphyllou, 1987).

Meloidogyne spp. (nematóides de galhas) é o maior grupo de nematóides fitoparasitas (Sasser & Carter, 1985). Até o momento, já foram descritas aproximadamente 80 espécies deste gênero. Entre elas, *M. javanica* é encontrada limitando a produção de soja no Brasil e também causando maior parte dos danos em diversas plantas de importância agrícola no mundo (Eisenback et al., 1981).

A classificação taxonômica de *M. javanica* é: Filo NEMATA, Classe ADENOPHOREA, ordem TYLENCHINA, superfamília TYLENCHOIDEA, família HETERODERIDAE, subfamília MELOIDOGYNINAE, gênero MELOIDOGYNE, espécie JAVANICA.

Seu ciclo de vida completa-se em torno de 22 a 30 dias, sendo diretamente influenciado pela temperatura do solo. As fêmeas produzem

em média, 400 a 500 ovos, e este número é variável em função do estado nutricional da planta e densidade populacional do fitoparasita (Ferraz, 2001). A reprodução de *M. javanica* ocorre por partenogênese mitótica, em que os ovos não fertilizados sofrem uma única maturação mitótica sem a redução do seu número de cromossomos (Triantaphyllou, 1985). As populações são constituídas basicamente de fêmeas, aparecendo os machos em maior número apenas em condições ambientais anormais (Monteiro et al., 1995).

Os juvenis sofrem a primeira ecdise dentro dos ovos e se transformam em juvenis de segundo estágio (J2). Após a eclosão, saem à procura de plantas hospedeiras, penetram pelas raízes e migram através do parênquima cortical por via intercelular. Terminando por localizar o corpo em posição paralela ao cilindro central, através do estilete injetam uma secreção no citoplasma de 3 a 10 células vegetais adjacentes à sua extremidade anterior. Depois de passar por mais dois estádios (J3 e J4), atingem a fase adulta.

A secreção oriunda da glândula dorsal possui compostos químicos que induzem a transformação das células vegetais em células multinucleadas, denominadas de nutridoras ou gigantes. Tratando-se de hospedeiro favorável, tais células passam por mudanças morfológicas e fisiológicas e, em plantas não hospedeiras, a inoculação da secreção não incitará a formação de células nutridoras e os juvenis tentarão migrar de volta para o solo, buscando outra fonte de alimento. Há ainda plantas consideradas resistentes em cujas raízes o juvenil provoca formação inicial de células nutridoras, mas estas degeneram prematuramente e levam o nematóide à morte, antes de completar seu desenvolvimento (Sasser & Carter, 1985; Monteiro et al., 2001).

A composição e função destas substâncias químicas ainda não foram completamente elucidadas. Aparentemente, trata-se de proteínas

básicas, peroxidases e/ou de certas esterases. As células da planta hospedeira inoculada com a “saliva” esofagiana começam a aumentar de tamanho e, após algum tempo, tornam-se claramente hipertrofiadas devido ao crescimento anormal, seguido de sucessivas divisões do núcleo (cariocinese) não acompanhadas de divisões da própria célula (citocinese). O citoplasma contendo vários núcleos torna-se denso e granuloso (Huang, 1985).

Segundo Bird (1996), os nematóides de galhas e do cisto são evolutivamente mais avançados que os demais fitonematóides por causa da sua capacidade de alterar a expressão gênica de células específicas da raiz do seu hospedeiro, transformando-as em células complexas e especializadas a favor do seu próprio desenvolvimento.

Numerosos genes de plantas foram caracterizados como genes com função putativa conhecida e diferencialmente expressos (ativados ou reprimidos) destas células nutridoras, sugerindo que os nematóides de galha e cisto induzem modificações na transcrição da célula parasitada (Bird, 1996; Favery et al., 1998; Fenoll et al., 1997; Gheysen et al., 1997; Hermsmeier et al., 2000; Opperman et al., 1994).

2.2 Genética da Interação soja – nematóide

A expansão dos estudos relacionados à interação patógeno - hospedeiro foi marcante nos últimos anos, devido principalmente a adoção cada vez maior da Biologia molecular. A clonagem e transferência do gene R para *H. schachtii* em beterraba foi o marco inicial da engenharia genética para resistência de plantas a nematóide (Cai et al., 1997). Os genes R não estão presentes na espécie cultivada de beterraba, *Beta vulgaris*, mas somente nas espécies selvagens *B. procumbens*, *B. webbiana* e *B. patellaris*. Em *B. procumbens*, o gene de resistência *Hs1pro-1*, confere resistência a *H. schachtii* por causar

degeneração do sincício (célula da planta modificada para nutrição de *Heterodera*), impedindo que o nematóide consiga completar seu ciclo de vida. Este gene foi clonado e apresentou muitas características típicas de genes de resistência clonados em outras espécies de plantas. Estas características incluem o número de repetições ricas em leucina (LRR), envolvidas no processo de reconhecimento do patógeno e o domínio trans-membrana. A expressão do cDNA do gene *Hs1pro-1* em plantas de beterraba suscetíveis conferiu resistência a infecção com *H. schachtii*, confirmando a identidade funcional do gene clonado (Perry & Jones, 1998).

A descrição de ocorrência natural de resistência a nematóides é variada, com relatos de um único gene dominante conferindo esta resistência (monogênica) ou da atuação de vários genes recessivos (resistência poligênica). A relação gene-a-gene entre planta e nematóide foi evidenciada e na maioria dos casos, é restrita a uma única espécie ou raça dentro de um gênero particular de nematóide (Janssen et al. 1998; Opperman et al., 1994; Roberts, 1992).

A resposta da planta para impedir o ataque do nematóide na maioria dos casos é caracterizada como uma reação de hipersensibilidade, variável em tempo e especificidade. Assim, a reação de hipersensibilidade já bastante estudada em doenças de plantas causadas por vírus, bactérias e fungos, também está intimamente relacionada com a resistência a nematóides. É desencadeada por uma rápida necrose, localizada nas células adjacentes ao sítio de infecção do nematóide. Envolve eventos comuns a outros patógenos, como a agregação do citoplasma, desaparecimento de mitocôndrias, perda da permeabilidade de membranas, aumento de ribossomos e de retículo endoplasmático (Roberts et al., 1998).

Após a penetração, os nematóides ainda podem ser afetados por compostos tóxicos já presentes nos tecidos das plantas (resistência bioquímica pré-formada). Correlação positiva entre os teores de compostos fenólicos e a resistência de tomate a *M. incognita* já foi relatada. O ácido clorogênico também foi observado em maior concentração em variedades resistentes de tomate (Huang, 1985).

Algumas espécies de plantas, especialmente leguminosas, podem rapidamente sintetizar compostos antimicrobianos de baixo peso molecular, chamados fitoalexinas, em resposta à penetração de nematóides (Huang, 1985). Em soja, observaram-se maior produção e acúmulo da fitoalexina gliceolina na variedade Centennial, resistente a *M. incognita*, quando inoculada com esse parasito. Já na variedade Pickett 71, suscetível, houve menor acúmulo. Entretanto, quando 'Centennial' foi inoculada com *M. javanica*, ao qual é suscetível, não houve acúmulo expressivo de gliceolina (Kaplan *et al.*, 1980 e 1979). *Meloidogyne incognita* parece ser bem mais sensível à ação dessa fitoalexina do que *M. javanica*, que suportou elevadas concentrações em experimento *in vitro* (Huang, 1985).

Reações bioquímicas também seguem o mesmo padrão observado na manifestação da resistência a outros tipos de doenças, como o aumento da atividade de determinadas enzimas, catalase, peroxidase e polifenoloxidase (Roberts *et al.*, 1998).

Uma série de estratégias está em desenvolvimento visando tornar as plantas mais resistentes. Entre elas a expressão de genes que codificam produtos antinematóides como os inibidores de proteinases, collagenases, ou toxinas. Outra possibilidade é a transformação da planta com anticorpos monoclonais que reconhecem especificamente secreções injetadas através do estilete e dessa forma, impedem o estabelecimento do sítio de alimentação.

A expressão constitutiva de genes que codificam para proteínas com atividade antifúngica *in vitro* também está em estudo. Entre estas proteínas, três grupos têm recebido destaque: β -1,3 glucanases, quitinases e proteínas inibidoras de ribossomos (RIP's). Os dois primeiros grupos atuam na degradação de componentes da parede celular de muitos fungos, enquanto as RIP's inibem a síntese protéica de fungos mediante modificação da subunidade 28 S dos ribossomos.

Kaplan & Davis (1987) dividiram a resposta da resistência em duas fases: determinativa e expressiva. A primeira envolve a detecção do nematóide por células da planta, numa reação do tipo elicitor-receptor. O elicitor provavelmente é produzido na glândula esofagiana do nematóide e é injetado no tecido do hospedeiro através do estilete. Esse reconhecimento gera, direta ou indiretamente, um sinal responsável pela reação de hipersensibilidade, envolvendo ativação de genes e síntese de mRNA. As secreções da glândula esofagiana de nematóides endoparasitos (*Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp. e *Globodera* spp.) estão intimamente relacionadas com a suscetibilidade das plantas, pois, a partir delas, modificações celulares são induzidas e mantidas, como os sítios específicos de alimentação (células gigantes e síncitos) do nematóide (Hussey, 1985). A fase expressiva inclui uma sucessão de eventos de regulação gênica e modificações bioquímicas que foram iniciados com o processo de sinalização, prevenindo o desenvolvimento do nematóide. Nessa fase, não há desenvolvimento normal dos sítios de alimentação, que se degeneram. Dessa forma, em raízes de plantas resistentes, poucos nematóides desenvolvem-se até adultos, há formação de número maior de machos e quando eventuais fêmeas reproduzem, o fazem com taxas mais baixas de fecundidade. Veech & Endo (1970) foram os primeiros a demonstrar que as células gigantes produzidas em cultivares de soja resistentes, em resposta à alimentação do nematóide, sofriam colapso e morriam.

Trabalho semelhante foi realizado para o isolamento do gene de resistência *Mi* e sua clonagem mostrou elevado potencial no controle de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*. Dessa forma, sua expressão heteróloga pode auxiliar na obtenção de resistência ao nematóide de galhas em culturas como a soja e muitas outras. A invasão de juvenis de segundo estágio (J2) em plantas de tomate que carregam o gene *Mi* é prevenida, porque a planta produz uma forte reação necrótica que resulta na morte ou saída do nematóide da raiz, impedindo a indução de células nutridoras. Este gene foi utilizado comercialmente para o controle de *M. incognita* em tomate e seu potencial de uso na transformação de plantas em outras culturas foi pesquisado (Roberts, 1992). Todavia, quando essa estratégia foi utilizada para a interação fumo X *Meloidogyne* spp, as plantas transformadas não expressaram qualquer nível de resistência, indicando que a resposta de resistência nesse caso, é dependente de fatores adicionais que estão presentes no tomateiro e ausentes nas plantas de fumo. É possível também que o sucesso seja alcançado mediante modificação *in vitro* do gene, ou da expressão do gene selvagem sobre o controle de um promotor mais forte. O surgimento de novas raças do nematóide que possam quebrar esta resistência faz com que a transferência de certos genes não seja uma garantia de resistência durável. Este fato ocorreu em campos de produção de tomate na Califórnia, onde a incidência da quebra de resistência foi freqüente mesmo com a utilização comercial do gene *Mi* (Perry & Jones, 1998).

De modo geral, existe grande disponibilidade de fontes de resistência a nematóides no germoplasma das espécies de plantas cultivadas. Poucas delas, entretanto, foram satisfatoriamente estudadas. Na soja não é diferente. A base genética da resistência a nematóides do gênero *Meloidogyne* existente atualmente nos cultivares é muito restrita.

Antes de se lançar mão da transferência interespecífica de genes de resistência, é fundamental explorar a diversidade genética já presente na espécie, de forma a torná-la mais acessível a programas de melhoramento vegetal. Entretanto, o uso de cultivares resistentes é desaconselhável quando a população do nematóide na área for muito elevada, porque nessas condições, a densidade populacional do nematóide é suficiente para causar prejuízos mesmo nesses cultivares (Silva, 2001).

O desenvolvimento de programas específicos de melhoramento de soja resultou na obtenção de muitos cultivares resistentes às diferentes espécies de *Meloidogyne* (Schmitt & Noel, 1984). O primeiro relato de resistência de soja aos nematóides de galhas no Brasil foi feito por Silva et al. (1952). Desde então, alguns trabalhos têm sido realizados com o intuito de se identificar fontes de resistência e introduzi-las nas principais cultivares de soja recomendada para as diferentes regiões do país (Covolo, 1975; Ferraz, 1978; Alcântara et al., 1980; Antônio & Dall'Agnol, 1982; Tihohod & Ferraz, 1985; Gouveia & Silva, 1996; Martini & Silva, 1996). Algumas vezes, entretanto, os resultados obtidos revelaram-se divergentes. Essa discrepância pode ser atribuída à utilização de diferentes raças do parasito, especialmente no caso de *M. incognita*, que muitas vezes não são identificadas nos trabalhos, e à falta de padronização nos métodos empregados na avaliação da resistência.

Sintomas evidentes decorrentes da interação planta-nematóide podem ser utilizados para avaliar a resistência de genótipos de soja, como é o caso da contagem de galhas radiculares incitadas por *Meloidogyne* sp. Nesse caso, é fundamental que haja correlação entre a ausência dos sintomas e a resistência da planta. Para a soja, há correlação positiva entre o número de galhas e a suscetibilidade das plantas (Kinloch, 1990; Young, 1998). Para outras espécies de plantas, como o milho, esta

correlação não é verdadeira, havendo a necessidade de se recorrer a outros parâmetros.

O procedimento de seleção deve permitir a avaliação de milhares de plantas de maneira rotineira e fácil (Young, 1998). Metodologias para a avaliação da resistência de plantas frente a importantes espécies de nematóides estão disponíveis (Starr, 1990) e podem ser praticadas tanto em casa de vegetação como no campo, com distintas limitações. Seleções realizadas no campo permitem a avaliação de um grande número de genótipos, mas também requerem um grande número de controles (variedades de reação conhecida) em diversos pontos da área, pois a distribuição dos nematóides não é aleatória, formando agregados. Misturas de espécies e/ou raças podem ocorrer no campo, dificultando ainda mais a interpretação dos resultados. Em casa de vegetação, pode-se controlar a população inicial de nematóides, empregando-se níveis de inoculo pré-estabelecidos. O ambiente (umidade, temperatura, luz), no geral, também pode ser ajustado artificialmente, entretanto a disponibilidade de espaço é limitada, reduzindo-se o número de genótipos a ser avaliado.

2.3 Expressão gênica via Microarranjos de DNA

Técnicas como Microarranjos de DNA de alta densidade utilizadas na Genômica Funcional têm permitido o estudo da estrutura, organização e função de milhares de genes e a sua expressão simultânea em um único experimento. Um dos campos no qual esta tecnologia causou maior impacto e aumentou sua importância, é o da análise da interação patógeno-hospedeiro (Diehn & Relman, 2001). Conjuntamente, a ampliação de seqüências de DNA depositadas em bancos de genes, resultante de diversos projetos genoma realizados nos últimos anos, (incluindo o do nematóide *Caenorhabditis elegans* e da soja - *Glycine*

max) permitiu o aperfeiçoamento de novas estratégias para a elucidação do padrão de expressão gênica em diversos organismos. Estima-se que plantas superiores como a soja tenha entre 80.000 a 100.000 genes e a compreensão de como e quando esses genes são expressos permite elucidar sua função nos processos fisiológicos.

A alteração no padrão de expressão da planta hospedeira quando infectada e a classificação do agente causal com base neste padrão induzido é de suma importância na diagnose e no tratamento de doenças de plantas. Nos últimos anos, diversos trabalhos foram publicados utilizando Microarranjos de DNA para analisar a resposta do hospedeiro aos processos infecciosos causados por diversos fitopatógenos (Puthoff et al., 2003; Boer et al. 2002; Reymond, 2001; Shenk et al. 2000).

O dogma central da biologia molecular conceitua os genes como seqüências de DNA que são transcritas a RNA mensageiro (mRNA), o qual é traduzido numa proteína funcional. Em 1953, Watson e Crick descreveram o arranjo linear dos genes e como acontece o processo de replicação do DNA. Em 1966, os grupos de Khorana e Nirenberg, independentemente, determinaram o código genético, permitindo a predição de seqüências de proteínas a partir de seqüências de DNA. Maxam e Gilbert (1977) e Sanger et al. (1977), introduziram, respectivamente, técnicas de seqüenciamento de DNA e desde então estas técnicas têm permitido o seqüenciamento em larga escala (Sterky et al. 2000).

O interesse pelo mapeamento e seqüenciamento do genoma de vários organismos, em especial o humano, motivou o desenvolvimento e a implementação de bases de dados de nucleotídeos e proteínas, bem como de métodos de bioinformática para administrar e interpretar o grande volume de informação. Como existe uma ordem subjacente a toda a diversidade da vida e como todos os organismos se relacionam

através de semelhanças na suas seqüências de DNA, o conhecimento adquirido a partir de genomas não humanos freqüentemente leva a novas descobertas na biologia humana.

Em 1995, o genoma completo de dois microrganismos foi, pela primeira vez, conhecido. Fleischmann et al.(1995) e Fraser et al. (1995) publicaram, respectivamente, toda a seqüência de bases de *Haemophilus influenzae* (1,83 Mb) e *Mycoplasma genitalium* (0,58 MB). No ano seguinte, Goffeau et al (1996) publicou a seqüência completa de *S. cerevisiae* (12 Mb), o primeiro eucarioto a ter seu genoma completamente seqüenciado. Desde então, mais de 73 genomas foram seqüenciados e publicados, incluindo o genoma do primeiro patógeno de plantas, *Xylella fastidiosa* (Simpson et al. 2000), realizado no Brasil.

Diante do imenso tamanho do genoma de certos organismos, foi adotada uma estratégia que prioriza o seqüenciamento apenas da fração expressa do genoma. Esta estratégia é baseada no seqüenciamento parcial (200-500 bases) a partir das extremidades 3' ou 5' de clones tomados aleatoriamente de uma biblioteca de cDNA, constituída basicamente de coleções de genes expressos inseridos em vetores de DNA (Figura 1). As bibliotecas de cDNA são construídas a partir de mRNA, empregando-se como iniciadores oligonucleotídeos sintéticos poli(dT) (Sambrook et al. 1989). Outra metodologia, denominada ORESTES ("Open Reading Frame Expressed Sequences Tags") (Dias et al. 2000), utiliza oligonucleotídeos sintéticos aleatórios. A seqüência de nucleotídeo obtida é denominada de "etiqueta de seqüência expressa" ou EST (Expressed Sequence Tags) (Adams et al. 1991).

As empresas *North Central Soybean Research* e *United Soybean Board* subsidiaram o projeto de ESTs para a soja. O objetivo do programa foi gerar mais de 200.000 ESTs, representando genes expressos em diversos tecidos, órgãos e condições ambientais. Para esta

espécie, aproximadamente 65 bibliotecas de cDNA foram criadas (Maguire et al. 2002).

Figura 1- Métodos de construção de bibliotecas de cDNA para seqüenciamento e geração de dados de EST

A Genômica, ciência que estuda como os genes ou a informação genética estão organizados no genoma e de que forma esta organização determina sua função, permite a análise sistemática e simultânea de um grande número de genes e o estudo dos processos biológicos como um todo. A Genômica é constituída pela Genômica Funcional, que emprega a informação da genômica estrutural para avaliar os processos biológicos de uma forma sistemática (Staudt et al, 2000).

2.3.1 Genoma Funcional

O termo "Genoma" descreve uma área de estudo responsável pelo mapeamento, seqüenciamento e análise do genoma de um organismo. Essa área é subdividida em "genoma estrutural", o qual representa a fase inicial de construção de mapas físicos e genéticos, com saturação de marcadores moleculares de alta resolução e "genoma funcional" que se refere ao estudo de todos os genes expressos por uma célula ou grupo de células em específico e as modificações no padrão de expressão ocorridas devido a doenças ou condições ambientais adversas.

Tanto a área computacional quanto a experimental têm sido usadas para estudar função gênica. A busca da homologia somente indica a função de um gene, no entanto, homologia não é função, e a comparação de seqüências de genes conhecidos tem um significado limitado (Strauss & Falkow 1997, Rastlan & Beeley 1997, Guigo 1997). Embora o ritmo da descoberta de genes e de informações geradas nos projetos genoma de organismos se acelera cada vez mais, o seu potencial para explicar os processos biológicos e moleculares, bem como o entendimento da função dos genes ainda não foi alcançado. Por exemplo, em um dos organismos mais estudados, *Echerichia coli*, mais de um terço das ORFs ainda não tem função designada (Blattner et al. 1997).

Designação de função aos genes por comparação de seqüências é às vezes incorreta devido às complicadas relações evolucionárias e relações de estrutura e função entre diferentes genes (Strauss & Falkow 1997). Uma forma de obter dados sobre a função do gene é através de seu padrão de transcrição uma vez que o gene é transcrito apenas quando e onde sua função é requerida. (Cummings & Relman, 2000). O

conhecimento do padrão transcricional freqüentemente oferece uma indicação de sua função biológica, e por sua vez, os padrões de expressão gênica na célula podem oferecer uma informação detalhada sobre seu estado funcional. Embora a regulação de proteínas na célula não é feita somente por regulação de mRNA, virtualmente todas as diferenças no tipo de célula são correlacionadas com as mudanças no nível de mRNA de muitos genes (DeRisi et al. 1997). Portanto, uma análise experimental deve ser conduzida para entender a função biológica de determinados produtos das seqüências geradas a partir de soja inoculada com *M. javanica*.

2.3.2 Aplicações de Microarranjos de DNA

O recente desenvolvimento da tecnologia de microarranjos de DNA proporciona uma excelente oportunidade para caracterizar os genes que são responsáveis pela meloidoginose em soja. Trata-se de um sistema avançado para o estudo simultâneo de expressão de genes múltiplos (Diehn & Relman, 2001; Freeman et al. 2000).

Os microarranjos de DNA são baseados em hibridização. No formato I, milhares de fragmentos de DNA, a princípio de qualquer tamanho e composição, são fixados em uma pequena superfície sólida, tal como lâminas de microscópio (Schena et al. 1995, DeRisi et al. 1997, Marshall e Hodgson 1998), Figura 2. No formato II, oligonucleotídeos são sintetizados *in situ* numa pequena superfície sólida ou convencionalmente, seguidos de imobilização em chips (Wallraff et al 1997).

Figura 2 - Esquema representando as etapas da técnica de microarranjos: preparo das raízes de soja para extração de RNA, marcação com Cy3 e Cy5, hibridização e análise da imagem. Fonte-Soybean Functional Genomic- Shealy et al, University of Illinois

Hibridização, detecção e vantagens dos microarranjos. A hibridização dos microarranjos é semelhante a qualquer outro método convencional de hibridização. Geralmente, amostras de DNA preparadas a partir de RNA total, são marcadas com fluoresceína (Schena et al. 1996, DeRisi et al. 1997) ou biotina (Wodicka et al. 1997), e hibridizadas ao arranjo previamente bloqueado em temperatura desejada. O sinal de hibridização é escaneado com um microscópio confocal a laser e a imagem fluorescente é digitalizada e mostrada no computador (DeRisi et al. 1997, Wodicka et al. 1997).

As diferenças dos padrões de expressão gênica em duas amostras biológicas podem ser determinadas usando o mesmo "array" com sondas fluorescentes de duas cores (Shalon et al. 1996). A vantagem da detecção de duas cores é que permite uma comparação direta e quantitativa da abundância de seqüências específicas entre misturas iguais de duas sondas que hibridizam competitivamente a um mesmo microarranjo (Ramsay 1998). Uma vez que a intensidade absoluta do sinal de hibridização de um elemento no "array" pode variar devido aos fatores experimentais (variações de hibridização, condições de lavagem entre experimentos ou variações nas características de hibridização das diferentes seqüências), às vezes se torna difícil obter uma estimativa quantitativa confiável dos níveis de expressão gênica baseado em intensidade absoluta. A razão de dois sinais de um determinado elemento no "array" é relativamente insensível a esses fatores experimentais, portanto, essa razão confiavelmente refletirá a relativa abundância da seqüência em amostras de duas sondas (Shalon et al. 1996).

Para a análise dos dados obtidos é importante que seja feita uma normalização. A quantidade de variação randômica e sistemática que ocorre nos experimentos principalmente com relação às diferenças

observadas na eficiência de marcação dos dois corantes utilizados, é importante para se verificar as diferenças na expressão dos genes. O termo normalização se refere ao processo matemático de remoção dessas variações sistemáticas observadas para posterior avaliação da expressão dos genes. O uso de um conjunto de controles adequados é fundamental para a normalização (Basset et al., 1999; Yang et al., 2002).

Na análise dos dados gerados pelo microarranjo, no mínimo duas fontes de erros podem ser observadas: biológica (variação de cultura a cultura) e operacional (variação da metodologia). Os passos incluem isolamento e marcação do RNA, hibridização e imagem dos híbridos. A eficiência de cada etapa não é conhecida e pode variar em qualquer uma delas. A utilização de propriedades de normalização e controles é importante. No entanto, não há um método único de normalização que possa ser aplicado para todas as condições. O método mais simples é normalizar contra a intensidade da imagem total de todos os genes detectados. A normalização minimiza as diferenças de intensidade resultantes de variáveis não biológicas, como a quantidade de cDNA aplicado à sonda e a eficiência de incorporação e detecção do corante fluorescente (Basset et al., 1999).

Métodos baseados no teste-*t* convencional permitem a análise da probabilidade de que uma modificação em um gene seja ao acaso. Entretanto, no caso da análise de expressão gênica em larga escala, mesmo um $p = 0,01$, que no contexto da análise de poucos genes seja significativa, não se mostra suficiente no caso de análises de microarranjos para um grande número de genes. Em um arranjo com 10.000 genes, por exemplo, uma análise convencional considerando-se $p = 0,01$ indicaria que existe a probabilidade de que 100 genes estejam sendo erroneamente colocados como diferencialmente expressos.

Problemas desse tipo levaram o grupo de bioestatística do Prof. Robert Tibshirani ("Stanford University") a desenvolver um método estatístico "Significance Analysis of Microarrays (SAM)" (Tusher et al., 2001). A análise dos dados pelo SAM baseia-se em uma série de testes-t específicos para cada gene, adaptados para a detecção em larga escala de genes diferencialmente expressos. A partir da observação de que as flutuações casuais são específicas para cada gene, o teste SAM é baseado na razão entre a diferença das médias das situações controle e tratado e o desvio padrão de cada gene, calculados a partir de repetição experimental.

Sensibilidade e quantificação são as maiores preocupações em qualquer tecnologia que envolve detecção. O limite de detecção do microarranjo medido no genoma humano permite monitorar mRNA que representa 1:500.000 do mRNA total, e o dobro das mudanças de expressão podem ser detectadas usando fluorescência de duas cores (Schena et al. 1996). Um limite de detecção semelhante é obtido usando-se microarranjo de oligonucleotídeos (Lockhart et al. 2000). Esse limite de detecção é maior que os métodos convencionais de hibridização de Northern blot. Comparando os resultados da hibridização do microarranjos com os resultados previamente sugeridos para detecção, aqueles parecem ser sensíveis e confiáveis o suficiente para detectar as diferenças de padrões de expressão gênica sob várias condições (DeRisi et al. 1997).

Muito embora o sistema de hibridização do microarranjos tem um conceito e funcionalidade semelhante às técnicas convencionais, oferecem uma série de vantagens em relação às demais técnicas de hibridização (Shalon et al. 1996). Em passado recente, a análise de expressão gênica era realizada com apenas um gene de cada vez através de medição da intensidade do nível de mRNA. As técnicas utilizadas eram

a análise de Northern blot, onde a amostra de RNA é resolvida por eletroforese em gel de agarose e transferida para uma membrana. Uma sonda específica é marcada e hibridizada com o RNA imobilizado e grandes quantidades de RNA eram freqüentemente requeridas. Cada gene era analisado separadamente por experimento, e a técnica exigia a produção de uma sonda específica e individual para cada gene de interesse. Dot blots é uma técnica alternativa e aperfeiçoada do Northern blot por não necessitar de resolução por eletroforese. Entretanto, sofre dos mesmos problemas de análise de um único gene de cada vez (Freeman et al., 2000).

Os microarranjos podem ser montados com alta densidade, pequenos volumes de hibridização e marcação, e detecção por fluorescência (Schena et al. 1996). Portanto, alta sensibilidade em um experimento de grande escala, ao nível do genoma, pode ser alcançado. Isso é difícil de ser obtido em filtros e membranas.

Aplicação dos microarranjos. Microarranjos de DNA ou oligonucleotídeos têm sido usados com sucesso para monitorar expressão gênica ou detectar expressão diferenciada de genes em levedura, (DeRisi et al. 1997, Shalon et al. 1996, Wodicka et al. 1997), plantas (Schena et al. 1995, Schena 1996), assim como diferentes células, tecidos e doenças humanos (Schena et al. 1996, DeRisi et al. 1996, Lockhart et al. 1996). Esses estudos convincentemente demonstraram que esta técnica permite aos pesquisadores saírem de um sistema focalizando somente um gene com seu promotor, para uma visão mais ampla e complexa do metabolismo de regulação gênica.

Um estudo mais abrangente para demonstrar a utilidade do microarranjo de DNA foi feito com a seqüência do genoma de levedura (DeRisi et al. 1997). Nesse estudo, microarranjos contendo virtualmente todos os genes de *Saccharomyces cerevisiae* (~6.000) foram fabricados

em lâminas de vidro ($\sim 4 \text{ cm}^2$), e usados para estudar o efeito da mudança de um metabolismo anaeróbio para aeróbio com limitação de glicose e a concomitante mudança do etanol como fonte de carbono.

Fleischmann et al., 1995 montaram um microarranjo de oligonucleotídeos contendo sondas que representam em torno de 100 genes de *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. Eles mostraram que cinco mRNA por célula podem ser detectados por hibridização dos microarranjos e que esse número representa uma sensibilidade maior que hibridização por Northern.

Trabalho desenvolvido por Richmond et al. (1999) utilizou a técnica de microarranjos para analisar a expressão dos genes da bactéria *Escherichia coli*. Para isso, 4.290 oligonucleotídeos foram desenhados de ORFs ("Open Reads Frame"-etiquetas abertas de leitura) do genoma completo da bactéria com o objetivo de analisar a diferença da expressão de genes quando a bactéria foi exposta ao choque térmico e ao tratamento com isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Da mesma maneira, Wei et al. (2001) compararam os níveis de mRNA de células de *E. coli* cultivadas em meio rico e meio mínimo. Através da técnica de microarranjos, a expressão dos genes das bactérias cultivadas em cada condição foi detectada e os resultados comparados com o que já se conhece a respeito da fisiologia de *E. coli*.

Um arranjo composto por 4.169 ORF's, possibilitou a Zheng et al. (2001) examinarem uma biblioteca de cDNA de células de *E. coli* tratadas previamente com peróxido de hidrogênio. Pela medida da expressão gênica entre estirpes isogênicas e mutantes, os autores confirmaram que o regulador OxyR ativa a maioria dos genes induzidos pelo peróxido de hidrogênio. Os arranjos de DNA permitiram a identificação de vários genes ativados pelo regulador OxyR, como por

exemplo *hemH* (biossíntese de grupos heme) e operon *suf* (montagem ou reparo de centros redox Fe-S).

Em trabalhos que envolvem pesquisas com alimentos e plantas e diferentes habitats, a análise da expressão de genes com microarranjos é uma ferramenta poderosa (Hall et al., 2000). Em ambos os casos, o entendimento das vias e interações que ocorrem nas células e organismos é um aspecto importante. Esta tecnologia poderia ser útil, por exemplo: a) na investigação dos efeitos funcionais e toxicológicos de componentes alimentares e b) no desvendamento de funções de genes e vias metabólicas em plantas.

Neste contexto, Spiro et al. (2000) citam o uso de microarranjos como eficiente para o estabelecimento de perfis de comunidades microbianas e quantificação das mudanças na microbiota do solo, de sedimentos e de água como indicadores de biorremediação.

No Brasil, Marques et al. (2003) foram pioneiros em analisar a expressão dos genes relacionados com a regulação de sacarose em plantas. Para isto, 1.370 genes foram analisados através da comparação de variedades híbridas comerciais de cana-de-açúcar, SP87-396 e SP83-2847, apresentando características opostas quanto à eficiência e velocidade no acúmulo de sacarose.

Na interação genética do patossistema soja – *M. javanica*, algumas perguntas básicas, permanecem ainda sem resposta. Qual a diferença na expressão gênica entre um genótipo suscetível e um resistente? Que fator(es) determina(m) esta diferença a nível molecular? As respostas a estas perguntas são fundamentais não apenas para nosso conhecimento básico sobre a interação soja-nematóide e seus aspectos evolutivos, mas também, para uso potencial desta informação na identificação de genes de resistência que possam ser incorporados em cultivares suscetíveis.

A investigação de tais questões a nível transcricional, depende do estabelecimento de um banco de dados contendo amostra significativa de seqüências parciais de genes ("Expressed Sequence Tags" – EST) de soja e de amostras de RNA de genótipos suscetível e resistente inoculados com *Meloidogyne javanica*. Utilizando estas seqüências de cDNA e a metodologia de microarranjos, foi analisado o perfil de expressão gênica de genótipos de soja inoculados e não inoculados com o patógeno.

Avanços significativos sobre a interação *Glycine max* – *M. javanica* dependem de informações sobre a estrutura gênica. A partir destas informações podem ser realizados estudos nas áreas de genética molecular, bioquímica, biotecnologia e fisiologia celular. Estes estudos propiciam a identificação de vias metabólicas básicas, de genes envolvidos no reconhecimento planta – patógeno, pelo sistema receptor-elicitor, genes envolvidos na síntese de enzimas que degradam a parede celular e permitem a infecção, genes de interesse para a obtenção de plantas resistentes a fitopatógenos e de substâncias para utilização como biocontrole.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Produção de seqüências gênicas para impressão em lâminas de vidro

3.1.1 Construção das seqüências gênicas para os microarranjos

❖ Material Biológico

O material biológico foi preparado na casa de vegetação da Nematologia, Embrapa Soja. 20 vasos (15 L) contendo areia lavada foram semeados para cada genótipo de soja resistente (JF 7056) e suscetível (266-S) ao nematóide *Meloidogyne javanica*. Após 8 dias da emergência, as plantas foram inoculadas com uma suspensão de nematóides J2 na concentração de 6.700 nematóides por vaso. Ao primeiro e terceiro dia após a inoculação, as raízes foram lavadas em água corrente, separadas do restante da planta e congeladas em nitrogênio líquido. Em seguida, as raízes foram armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até o momento de extração de RNA. Raízes de plantas não inoculadas foram preparadas da mesma forma e utilizadas como testemunha.

❖ Extração de RNA total utilizando o reagente Trizol (Invitrogen)

Para extração de RNA foi utilizada a metodologia descrita por Chomczynski & Sacchi (1987): utilizando-se da solução monofásica de

fenol e isotiocianato de guanidina – Trizol, (Reagent, Life Technologies Cat 15596-026). Os tecidos de raízes (7 g) foram macerados em nitrogênio líquido e adicionados de 20 mL de Trizol. Em seguida o material foi misturado em vórtex, acrescido 2 mL de clorofórmio e novamente misturado. As amostras homogeneizadas foram mantidas por 3 min. a 23°C para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Em seguida o material foi centrifugado a 7500 x g por 10 min. a 6°C. Após a centrifugação, a fase aquosa formada foi transferida para um tubo novo e o RNA foi precipitado pela adição de 2,5 mL de álcool isopropílico. A solução foi mantida a 23°C por 10 min. e centrifugada a 12000 x g por 10 min. a 6°C. Removido o sobrenadante, o sedimento formado foi lavado com 5 mL de etanol 75%. As amostras foram misturadas gentilmente e centrifugadas por 7500 x g por 5 min. a 6°C. No final do procedimento, o RNA foi seco rapidamente e solubilizado em H₂O livre de RNA (água DEPC - 0,01%).

❖ **Análise da qualidade do RNA total**

A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose (1,2%) contendo 5 mL de 10 x tampão (200 mM MOPS, 50 mM acetato de sódio, 10 mM EDTA em 50 mL de H₂O_{DEPC}) e 9 mL de formaldeído absoluto. Foram dissolvidos aproximadamente 1-2 µg de RNA em 5 µL de formamida deionizada e adicionado 5 µL de “RNA loading solution” (1 µL de tampão 10 x formaldeído, 2 µL de formaldeído absoluto, 1 µL de brometo de etídio – 400 µg/mL e 1 µL de H₂O_{DEPC}) e aquecidos por 10 min, a 65°C. Em seguida, 1 µL de 10 x SDS/glicerol (200 mM EDTA, 0,1% SDS, 50% glicerol, 0,2% azul de bromofenol, 0,2% xileno cianol) foi adicionado para cada amostra e aplicado no gel. A corrida eletroforética foi conduzida em tampão 1 x (20 mM MOPS, 5 mM

acetato de sódio, 1 mM EDTA), durante 1 h a 80 V. Como marcador molecular de tamanho de RNA foi utilizado o "RNA Ladder" (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), com fragmentos visualizados de 0,24 a 9,49 kb. A quantificação do RNA total foi realizada em espectrofotômetro (BECKMAN-DU 640), medindo-se a absorbância em contraste com uma amostra de H_2O_{DEPC} , nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Para estimar a quantidade do DNA foi utilizado o padrão de que uma unidade de densidade óptica (DO) equivale a 40 μ g de RNA por mL de solução (Sambrook et al., 1989).

❖ **Purificação do RNA total e Digestão com DNase**

Após a extração com Trizol, os RNAs foram purificados e tratados com DNase através do kit NucleoSpin® RNA II (MN Macherey-Nagel). Para a purificação, foram adicionados em 100 μ L de cada amostra de RNA, 400 μ L de tampão RA1. Após agitação, 0,7 volumes de etanol 96% foram adicionados e agitados. Cada solução foi transferida para um tubo de 2 mL contendo uma coluna de RNA NucleoSpin e centrifugados por 30 s a 8000 x g. As colunas foram transferidas para outro tubo de 2 mL e centrifugados em velocidade máxima por 1 min. Foram aplicadas nas amostras, 95 μ L de DNase e mantidas a 23 °C por 15 min. Após o tratamento com DNase, 500 μ L de tampão RA2 foram adicionados na coluna e centrifugados por 30 s a 8000 x g. As colunas foram transferidas para outro tubo e 600 μ L de tampão RA3 foram adicionados, centrifugados por 30 s a 8000 x g e o fluido descartado. As colunas foram novamente transferidas e 250 μ L de RA3 foram adicionados e centrifugados por 2 min. em velocidade máxima para secar completamente a membrana. As colunas foram transferidas para outro

tubo, os RNAs foram eluídos em 100 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ e centrifugados em velocidade máxima por 1 min. a 23°C.

❖ **Quantificação do RNA total**

Para RNA existe uma relação entre a densidade óptica (DO) medida a 260 nm e a concentração do ácido nucléico em solução, que é aproximadamente 40 $\mu\text{g/mL}$ para cada unidade de absorbância (Sambrook et al., 1989). Ainda, a relação ($\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$) é utilizada como um indicativo da pureza da preparação (razão entre 1,8–2,0). Assim, a quantificação do RNA foi realizada colocando-se 2 μL da solução em cubeta de quartzo e completando-se o volume para 100 μL com $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, utilizando-se $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ como branco.

❖ **Extração de mRNA utilizando a coluna de oligo dT (Messenger Maker™).**

Primeiramente, as amostras de RNA foram ajustadas para uma concentração de 0,55 mg/mL, aquecidas à 65°C por 5 min. e acrescentado 0,1 volume de 5 M NaCl. A suspensão de oligo (dT) foi misturada nas amostras e mantida por 10 min. a 37°C. Para a etapa de transferência, o êmbolo da seringa foi removido e acrescentado a solução para a filtragem do material. A coluna foi lavada com tampão de lavagem e o material eluído em $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$. Para a seleção dupla, o RNA eluído foi aquecido por 5 min. a 65°C ajustando a concentração de sal da amostra para 0,5 M com NaCl 5 M. A segunda seleção foi realizada utilizando-se a mesma coluna oligo (dT) celullöse usada na primeira seleção. Esta foi lavada com tampão de lavagem antes da transferência do oligo (dT) cellulöse

ressuspendido na solução de RNA. A coluna foi mantida por 10 min. a 23°C para que ocorra a hibridização. Esta coluna foi novamente lavada e o RNA eluído em H₂O_{DEPC}.

❖ **Construção de bibliotecas de cDNA**

Para a construção das bibliotecas de cDNA, foram utilizados uma mistura dos mRNAs referentes as amostras citadas no item Material Biológico. As bibliotecas de cDNA foram construídas com kits Smart cDNA library Construction TM (Clontech) e SuperScript Gateway (Invitrogen). A viabilidade das bibliotecas de cDNA foi baseada na porcentagem de recombinantes (teste do IPTG, X-gal e Minipreps), número de fagos por micrograma de cDNA (título), tamanho dos fragmentos inseridos e redundância de clones determinados através de um seqüenciamento inicial de 100 a 200 clones e análise por bioinformática.

❖ **Seqüenciamento e organização de clones**

Os plasmídeos contendo os insertos para seqüenciamento foram obtidos pela preparação de minipreps de colônias de *E. coli* das bibliotecas de cDNA. Todo o trabalho foi feito em placas de 96 poços onde cópias de cada clone foram organizadas e armazenadas em glicerol a - 80°C.

O seqüenciamento dos insertos foi conduzido utilizando a técnica da PCR (Cycle Sequencing). Os kits ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v. 2.0 e v. 3.0 (Applied Biosystems) foram usados nas reações de seqüenciamento e a separação dos fragmentos ocorreu num seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). As seqüências obtidas foram processadas no laboratório de bioinformática da Embrapa Soja com auxílio do programa Phred.

❖ **Construção dos microarranjos**

Os materiais genéticos utilizados na construção dos microarranjos se constituem de fragmentos inseridos em plasmídeos de *E. coli*, amplificados via PCR com oligonucleotídeos específicos (5' CCG AGA TCT GGA CGA GCT T 3') e (5' CGA ATT GGC CAA GTG AGC 3') que se anelam a seqüências que flanqueiam a região de inserto do fragmento de cDNA.

O volume final da reação foi de 100 µL, contendo 60 ng de DNA plasmidial, 10 mM dNTPs (Invitrogen, CA, USA), Taq DNA polimerase (5 U/µL) (Invitrogen, CA, USA), 3 pMol de cada oligonucleotídeo, tampão de PCR 10 x (50 mM KCl e 200 mM Tris-HCl) e 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen, CA, USA). A amplificação foi realizada em um Termociclador M. J. Research PTC – 100™ utilizando-se o seguinte programa de amplificação: um ciclo a 94°C por 2 min., 30 ciclos (94°C por 30 seg., 60,5°C por 30 seg. e 68°C por 1 min.) e um ciclo final a 72°C por 10 min. Após a reação de amplificação, 5 µL de tampão de "loading buffer" (40% de glicerol e 0,02 % de azul de bromofenol) foi adicionado a 2 µL de cada amostra do produto amplificado. Um volume de 7 µL desta mistura foi aplicado nas canaletas do gel de agarose 1,0 %, contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e submetidas à eletroforese horizontal por 1,5 horas, a 100 V constante. O sistema foi conduzido em tampão TEB 1 X (TRIS 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), também adicionado de brometo de etídio (0,5 µg/mL).

Na eletroforese, foi utilizado como padrão de concentração o DNA do fago λ cortado com a enzima de restrição *Hind*III. Este DNA, de concentração conhecida (50 ng/µL) foi aplicado em diferentes volumes (1 µL – 50 ng, 2 µL – 100 ng e 4 µL – 200 ng) para comparação visual da intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídeo e cálculo da concentração do material. Além deste marcador, foi também utilizada uma

amostra de DNA de fragmentos variáveis, de tamanho conhecido de 1 kb (Invitrogen Carlsbad, CA, USA), para referência de migração eletroforética. Os fragmentos foram visualizados sob luz UV e documentados em um fotodocumentador modelo GEL DOC 1000 (Bio Rad).

3.1.2 Controles positivos e negativos

Os controles utilizados neste experimento foram obtidos pelo kit "Lucidea Universal ScoreCard – Amersham Biosciences". Estes controles exógenos compreendem 23 genes artificiais que servem para validação, filtragem e normalização dos dados obtidos pelo microarray. Estes controles são compostos de seqüências de DNA de regiões intergênicas de levedura e mostram-se independentes de várias espécies, incluindo humano, rato, levedura, *Arabidopsis* spp, archaeabactéria e *E. coli*. "Lucidea Universal ScoreCard" (Amersham Biosciences). Através da utilização destes controles é possível validar os dados experimentais, determinar a acurácia e a precisão da razão dos resultados e descobrir os erros do experimento, normalizar os dados e comparar com cada experimento. Há 4 tipos de controles: calibração, razão, utilidade e negativo.

O controle de calibração permite avaliar a dinâmica e a sensibilidade do sistema através de uma curva que é gerada pelos valores de concentração de cada controle de calibração. Os controles de razão servem como referência para medir um baixo ou alto nível de expressão, com uma variação de 2,5 de magnitude e permitem analisar o sucesso da normalização. Já os controles de utilidade avaliam a qualidade do processo de purificação do mRNA e estimam sua eficiência. É possível

também utilizá-lo como controle negativo para avaliar o grau de reações não específicas durante a hibridização.

A normalização dos dados através do kit "Lucidea Universal ScoreCard" permite compensar a diferença entre a incorporação dos fluoróforos e suas fluorescências e comparar os dados através de múltiplas hibridizações por três passos: um fator constante de normalização, a normalização baseada no sinal e na curva de calibração.

Após quantificação 2 - 3 μg de cada produto amplificado foi liofilizada e ressuspensa em DMSO 50%, para posterior fixação das amostras nas lâminas de vidro.

3.1.3 Impressão robótica dos produtos de PCR purificados

Os produtos de PCR foram selecionados após a verificação da qualidade de amplificação e do seu tamanho dentro do previsto (300 - 1000 pb), por meio da visualização em gel de agarose 1%. Após a seleção, os produtos foram ajustados para a concentração de 100 - 300 ng/ μL , liofilizados e ressuspensados em 50 μL de 50 % DMSO. Os clones que não resultaram um produto de PCR na concentração de 100 - 300 ng/ μL foram novamente amplificados até a obtenção da concentração e padrão desejados. Segundo Diehl et al. (2002), na produção dos arranjos de produtos de PCR, a purificação dos fragmentos de DNA amplificados representa um alto custo, além disso, uma considerável quantidade de material é perdida durante o processo. Desta forma, os arranjos foram produzidos a partir de produtos de PCR não purificados. A impressão dos microarranjos foi feita em lâminas de vidro previamente tratadas com aminosilano (GMT-GAPS, Corning, Cat. nº 40004) por um dispositivo robotizado modelo GMS 417 Arrayer (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA,

USA). Os "spots" foram impressos a uma distância de 250 μm na forma de arranjo, em triplicata (total de três "spots"/amostra).

3.1.4 Fixação dos DNAs nas lâminas

Os DNAs impressos foram rehidratados com vapor de um banho de água regulado a 42°C por cerca de 10 s (as lâminas foram mantidas suspensas, com a face contendo os arranjos para baixo) e mantidos por 1 min, a 70°C. Em seguida, o DNA foi fixado através de uma câmara de UV "cross-link" regulada para 1300 x 100 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ e as lâminas foram novamente mantidas a 70°C, por 2 h, e armazenadas em dessecador até a hibridização.

3.2 Produção de cDNAs marcados para hibridização nos Microarranjos

Para a extração de RNA e posterior síntese de cDNA marcado, foram utilizados RNA referentes as amostras citadas no item Material Biológico (3.1.1).

3.2.1 Construção do cDNA por marcação indireta com fluorescentes Cy3 e Cy5

A obtenção de cDNAs fluorescentes para as reações de hibridização foi realizada pelo uso do kit CyScribe cDNA Post Labelling kit (Amersham Biosciences, nº Cat RPN 5660). Em microtubos individuais de 1,5 mL foram adicionados 30 μg de RNA dos genótipos de soja, 3 μL de "random primer" (Amersham Bioscience NIF-1822), 1 μL do controle (spike) e água para completar o volume final para 11 μL . Esta mistura foi agitada

por pipetagens, incubada a 70°C por 5 min, mantida em gelo por 10 min e, após a incubação, aos tubos foram adicionados 4 µL de tampão 5 x CyScript (pH 8,3), 2 µL de 0,1 M de DTT, 1 µL mix de nucleotídeos (dCTP, dGTP, dATP, dTTP), 1 µL de AA-dUTP e 1 µL da enzima transcriptase reversa CyScript (100 U/ µL, pH 8,3). As reações foram misturadas, centrifugadas por 15 s e mantidas a 37°C por 3 h. Para a degradação do RNA, 2 µL de 2,5 M de NaOH foram adicionados para cada tubo e estes foram agitados, centrifugados por 15 s e mantidos a 37°C por 15 min e aos tubos adicionou-se 20 µL de 2 M de HEPES. Os cDNAs marcados foram precipitados com 3 µL de 3 M de Acetato de sódio e 75 µL de etanol absoluto. Os tubos foram agitados, centrifugados por 15 s e mantidos a - 20°C por toda a noite. Os tubos foram centrifugados a 13.800 x g por 15 min a 25°C e o sobrenadante descartado. Os resíduos foram lavados por centrifugação a 13.800 x g, por 15 min, a 25°C com 1 mL de etanol 70%. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco em Hetto vac. Antes da marcação, o "CyDye" foi ressuspendido em 40 µL de 0,1 M de bicarbonato de sódio, pH 9,0 e acrescentado sobre os tubos contendo os precipitados de cDNAs. Os tubos foram misturados e mantidos a 25°C, no escuro, por 1 h. Após a incubação, adicionou-se aos tubos 15 µL de 4 M de hidroxilamina e incubou-se por 15 min, a 25°C, no escuro. As amostras foram ressuspendidas em 400 µL de tampão TE (10 mM Tris e 1 mM EDTA, pH 8,0) e concentradas em uma coluna tipo Microcon - YM30 (Millipore). A eficiência da marcação foi monitorada pela medida da absorbância a 260 nm (para concentração de DNA), 550 nm (para Cy3) e 650 nm (para Cy5). A quantificação e a qualidade da incorporação dos corantes fluorescentes durante a síntese foram analisadas por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose (1,0 %). As condições eletroforéticas foram as mesmas descritas no item 3.1.5. As

medidas de absorvância dos cDNAs marcados com Cy3 ou Cy5 foram feitas em espectrofotômetro (BECKMAN – DU 640) nos comprimentos de onda de 260, 280, 450, 520, 650 e 750 nm. Estas medidas são úteis na verificação de possíveis problemas com a qualidade do cDNA marcado. A estimativa de incorporação (em pMol) do Cy3 e Cy5 durante a síntese de cDNA foi calculada utilizando seus respectivos coeficientes ($150.000 \times 1 \text{ mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ a 550 nm para Cy3 e $250.000 \times 1 \text{ mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ a 650 nm para Cy5) como descrito:

$$\text{Para Cy5} = \frac{\text{leitura a } A_{650} \times \text{volume da amostra} \times \text{fator de diluição}}{0,25}$$

$$\text{Para Cy3} = \frac{\text{leitura a } A_{550} \times \text{volume da amostra} \times \text{fator de diluição}}{0,15}$$

3.3 Análise da imagem e obtenção dos dados

3.3.1 Hibridização dos microarranjos com os cDNAs marcados:

As etapas de hibridização e lavagem foram realizadas em um aparelho "GeneTac hybridization" (Genomic Solutions™, Ann Arbor, Michigan, USA). Inicialmente, as lâminas foram mantidas a 65°C por 5 min. Sobre essas lâminas foi aplicada a solução de hibridização contendo 8 µL de líquido bloqueador (Amersham Biosciences RPN 3601), 19 µL de SSC 20 x (3 M NaCl e 0,3 M de Citrato de Sódio), 5,5 µL SDS 2%, 100 pMol de cada cDNA marcado com Cy3 e Cy5 e água para completar o volume final para 110 µL. A hibridização foi feita a temperatura de 42°C por 12 h. Após a hibridização, as lâminas foram lavadas de acordo com os ciclos abaixo: SSC 2 x /SDS 0,5%, a 25°C, com 10 s de fluxo, 20 s de

incubação e 10 ciclos; SSC 0,5 x, a 25°C, com 10 s de fluxo, 20 s de incubação e 10 ciclos; SSC 0,05 x, a 25°C, com 10 s de fluxo, 20 s de incubação e 10 ciclos e secagem por 15 min. Após este período, as lâminas foram centrifugadas individualmente dentro de tubos de centrífuga de 50 mL (tubo Falcon) por 5 min a 201 x g.

3.3.2 Obtenção e análise das imagens:

As imagens foram obtidas por um equipamento modelo GMS™ 418 Arrayer Scanner (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) que automatiza a obtenção da imagem, com até dois marcadores fluorescentes. As leituras foram feitas sob diferentes comprimentos de onda, para permitir a excitação dos marcadores fluorescentes contidos nos cDNAs: 550 nm (Cy3) e 650 nm (Cy5). A localização e identidade de cada gene na lâmina foram definidas em um arquivo texto, criado com auxílio do Programa CloneTracker2 (BioDiscovery, Los Angeles, USA). A quantificação do sinal para cada gene foi feita pelo Programa ImaGene (v. 4.1 BioDiscovery, Los Angeles, USA) e os dados gerados foram transformados no GeneSight (BioDiscovery, Los Angeles, USA). No ImaGene, as imagens foram sobrepostas (Cy5 e Cy3), criando um "overlap" entre cada "spot" (sinal da hibridização referente a cada gene). Os "spots" foram quantificados pela medida da intensidade de todos os pixel delimitados por um círculo fixo. O "background" também foi quantificado para cada "spot" pela medida da intensidade de todos os pixels do local ao redor do "spot". Um arquivo de textos contendo as colunas e os dados da quantificação, foi exportado para o GeneSight. Na transformação dos dados, foi feita a correção do "background" local para cada "spot". Todos os "spots" foram usados para o cálculo de um fator de normalização, dividindo-se todos os valores pela média de cada

condição experimental. Consequentemente, o sinal emitido para cada canal (Cy3 ou Cy5) foi dividido pelo seu valor médio. As réplicas dentro da lâmina tiveram seus valores medianos de expressão combinados em um único valor. A análise estatística foi realizada utilizando o Programa SAM (Significance Analysis of Microarrays) (Tusher et al., 2001). Esta análise baseia-se em uma série de testes-t específicos para cada gene, adaptados para a detecção em larga escala de genes diferencialmente expressos.

3.3.3 Desenho Experimental

O desenho experimental utilizado consistiu de três preparações independentes de cDNA marcado com fluoróforos, derivados de RNAs de três repetições independentes de cada condição biológica. Estes cDNAs foram hibridizados separadamente em lâminas contendo produtos de PCRs impressos em triplicata. Amostras de plantas resistentes ou susceptíveis, inoculadas com *M. javanica*, foram consideradas nesta análise como a condição experimental (marcada com fluoróforo Cy3) e amostras de plantas resistentes ou susceptíveis não inoculadas com *M. javanica* como controle (marcada com fluoróforo Cy5).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Padronização da técnica de microarranjos

4.1.1 Produção dos microarranjos para os genótipos de soja

O acúmulo de informações presentes com o seqüenciamento de organismos ofereceu uma enorme oportunidade para o entendimento das funções biológicas de muitos genes previamente desconhecidos (Lashkari et al., 1997). Para este estudo, uma estratégia foi desenvolvida para monitorar múltiplos genes simultaneamente. O produto de PCR contendo cada gene de interesse foi arranjado na lâmina de vidro para posterior monitoramento dos níveis de expressão gênica.

A concentração e o tamanho do produto final para cada clone amplificado foi de aproximadamente 200 -300 ng/ μ L com a maioria dos tamanhos dos fragmentos entre 300 a 1.000 pb (Figura 3). Estes produtos não purificados foram ressuspensos em DMSO 50%, o qual é bastante utilizado em experimentos com arranjos, primeiramente devido a sua propriedade higroscópica e baixa evaporação permitindo, desse modo, a armazenagem do DNA por longos períodos, proporcionando uma maior uniformidade na área do "spot" (Hegde et al., 2000). Estudos recentes em microarranjos, utilizando produtos amplificados sem purificação, enfatizam diferenças não significativas entre os produtos de PCR purificados e não purificados, apresentando alteração do sinal de hibridização em apenas 6% em relação aos produtos purificados (Diehl et al., 2002; Travensolo, 2004).

Figura 3 - Perfil eletroforético dos produtos amplificados das placas BRSGMMJ1PCR001 (A01 a H12 -canaletas de 1 a 48) e BRSGMMJ1PCR002 (A01 a H12). M (padrão de peso molecular 1 kb) e (produtos amplificados)

O arranjo final obtido apresentou aproximadamente 3.000 spots oriundos da triplicação de cada produto amplificado (gene). Estes produtos foram dispostos na lâmina na forma de arranjo com a distância de 250 μm . O adensamento permitiu minimizar o volume da solução de hibridização para a lâmina inteira. Outro ponto favorável é a concentração do cDNA marcado, que devido ao volume de hibridização ser de 110 μL , foi possível manter a concentração de 100 - 300 pMol/cDNA marcado.

4.1.2 Produção dos cDNAs marcados

Metodologias de obtenção de cDNA marcado utilizam, no mínimo, 10 μg de RNA total tendo em vista que apenas 1 a 2% do RNA obtido corresponde a mRNA (Deyholos e Galbraith, 2001). Como exemplo, na Tabela 2 e Figura 4 encontram-se os rendimentos dos RNAs obtidos dos genótipos de soja resistente (JF 7056) e suscetível (266-S), inoculados e não inoculados com *M. javanica*.

Como pode ser observado, o resultado apresentado na Tabela 2 mostrou que a relação 260/280 das amostras foi similar e adequada. A relação entre a absorbância a 260 nm e 280 nm estima o grau de pureza do RNA. Entretanto, essa relação é influenciada pelo pH, sendo assim, se o RNA é diluído em água para a leitura espectrofotométrica a relação 260/280 deve ficar entre 1,5-1,9, por outro lado se o RNA é diluído em tampão Tris-HCl 10 mM com pH 7,5, a relação 260/280 fica entre 1,8 e 2,1 (Rneasy Mini Handbook, QIAGEN Companies, p.56, maio de 1999).

Tabela 1 - Características dos genótipos de soja resistente (JF 7056) e suscetível (266-S) não inoculados (NI) e inoculados (I) com 6.700 juvenis J2 de *M. javanica*

GENÓTIPOS SOJA	GRAU MATURAÇÃO	Cruzamento	Nº Galhas	TRATAMENTO	
JF 7056	L	BR5x Pi	66	Inoculada	(I)
				Não Inoculada	(NI)
266-S	L	BR5x Pi	205,7	Inoculada	(I)
				Não Inoculada	(NI)

Tabela 2 - RNAs obtidos dos genótipos de soja inoculados e não inoculados com *M. javanica*

Amostras	Relação 260/280 nm	Concentração RNA (µg/µL)	Rendimento RNA (µg) ¹
JF 7056 I	1,67	2,72	1088,0
JF 7056 NI	1,68	1,44	576,0
266-S I	1,61	1,12	448,0
266-S NI	1,61	2,90	1160,0

¹ O RNA foi ressuspendido em 400 µL de H₂O_{DEPC},

Figura 4 - Perfil eletroforético de amostras de RNA dos genótipos de soja: resistente JF 7056 inoculado e não inoculado com *M. javanica* – (canaletas 1 e 2); e suscetível 266-S inoculado e não inoculado (canaletas 3 e 4). PM (padrão de tamanho molecular-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

No perfil eletroforético do RNA em gel de agarose, foram visualizadas duas bandas bem definidas correspondentes aos rRNA 23S e 16S de tamanhos 2,9 e 1,5 kb, respectivamente (Figura 4). Este perfil das amostras na eletroforese comprova que o RNA está intacto (Birren et al., 1997).

A marcação indireta do cDNA foi realizada através do kit "CyScribe cDNA Post Labelling" que contém reagentes para a preparação de cDNAs marcados com Cy3 e Cy5. Este protocolo foi desenvolvido baseado em dois passos: o primeiro passo envolve a incorporação do aminoallyl-dUTP (AA-dUTP) durante a síntese do cDNA com uma mistura de nucleotídeos.

O segundo passo envolve a marcação química do cDNA aminoallyl-modificado utilizando CyDye™ NHS- éster. Os dados de análise espectrofotométrica desse material revelaram quantidade variando de 233,0 a 626,0 pMol totais (Tabela 3).

Tabela 3 - Quantificação da eficiência do cDNA marcado utilizando-se o conjunto de “random primer” e o kit “CyScribe cDNA Post Labelling”

Parâmetros analisados	JF7056 inoculado	JF7056 não inoc.	266-S inoculado	266-S não inoc.
Corante utilizado	Cy3	Cy5	Cy3	Cy5
Absorbância (550 nm – Cy3)	0,0519	-	0,0255	-
Absorbância (650 nm – Cy5)	-	0,1081	-	0,0279
pmol Totais	501,7	626,0	212,5	233,0

O perfil eletroforético do cDNA, o qual apresentou resultados satisfatórios, produziram um bandejamento difuso com tamanho entre 100 e 1000 pb (Figura 5).

Pelos resultados observados na quantificação do cDNA no espectrofotômetro, a medida de absorbância no comprimento de onda de A₂₆₀, refere-se à eficiência da síntese do cDNA. A concentração ideal do cDNA deve estar acima de 1 µg. Tendo em vista que a concentração adequada de cDNA marcado não possa ser considerada somente pela leitura deste valor, devido a presença de fragmentos de RNA residual,

um valor baixo de A_{260} é um indicativo de quantidades inadequadas de cDNA marcado.

Em relação às medidas de absorbância nos comprimentos de onda de A_{550} (Cy3) e A_{650} (Cy5), verificou-se que valores maiores que os indicados na Tabela 3 (0,051 – 0,108), provavelmente refere-se a uma maior concentração de “dyes” livres (não incorporados). Desse modo, através da leitura nos comprimentos de onda de A_{260} , A_{550} e A_{650} é possível detectar falhas na atividade da enzima transcriptase reversa ou a degradação do RNA durante a reação de síntese do cDNA.

Figura 5 - Perfil eletroforético de amostras de cDNA dos genótipos de soja, marcados com fluoróforos Cy3 e Cy5. PM (padrão de tamanho molecular - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), canaletas 1-4 (amostras de RNA dos genótipos 7056 Inoculado, 7056 Não Inoculado, 266-S Inoculado e 266-S Não inoculado)

4.2 Análise genética utilizando a ferramenta SAM

Na figura 6 observa-se a predominância da expressão de genes induzidos em plantas resistentes e suscetíveis inoculadas com o nematóide em comparação com plantas não inoculadas. Destacam-se genes que codificam proteínas relacionadas à interação patógeno-hospedeiro, apresentando 11 genes com expressão induzida para cada uma das duas condições estudadas. As categorias de proteínas sem função conhecida e sem homologia em banco de dados (SH) não foram incluídas na distribuição gráfica (Figura 6). Os genes expressos na planta resistente inoculada e suscetível foram totalmente distintos. Estes genes que podem ser incluídos em categorias metabólicas relacionadas a síntese de parede celular, transporte de metabólitos, síntese de estruturas celulares, biossíntese de aminoácidos e síntese de proteínas foram diferencialmente expressos nas plantas resistentes. Já os genes diferencialmente expressos exclusivamente nas plantas resistentes durante o ataque do nematóide enquadraram-se nas categorias de síntese de parede celular, transporte de metabólitos e biossíntese de aminoácidos. Apenas a categoria de genes relacionados com a biossíntese de ácidos graxos foi exclusiva para planta suscetível.

Figura 6 - Número de genes, por categoria funcional, expressos diferencialmente em plantas resistentes e suscetíveis. RI: planta resistente com expressão gênica induzida, RR: planta resistente com expressão gênica reprimida, SI: planta suscetível com expressão gênica induzida e SR: planta suscetível com expressão gênica reprimida

4.3 Comparação dos genes diferencialmente expressos nas plantas resistentes inoculadas e não inoculadas com *M. javanica*

A comparação do perfil da expressão gênica nas plantas resistentes foi analisada através da ferramenta estatística SAM. A significância da diferença da expressão dos genes foi calculada através da razão da mediana da intensidade de fluorescência para cada condição, tendo como parâmetros um Δ de 0,407 e 100 permutações. A análise dos dados resultou numa taxa de falsos positivos (FSN – False Significant Number) de 0,38 e, de genes detectados falsamente (FDR – False Discovery Rate) numa taxa de 0,16, significando que 99,84 % do experimento apresenta resultados positivos e 0,16 % resultados falsos (Figura 7, Tabela 4 e 5). Dentre aproximadamente 1000 genes estudados, um total de 208 genes apresentaram expressão diferencial, entre eles 158 genes foram induzidos e 50 genes foram reprimidos nas plantas resistentes a *M. javanica*.

Os genes expressos foram distribuídos em diferentes categorias funcionais. É importante mencionar que as funções dos genes foram atribuídas apenas por homologia com proteínas de outros organismos depositados em bancos de dados, sendo que nenhum gene foi funcionalmente estudado.

Através da análise dos dados foi possível observar que os genes induzidos em plantas resistentes inoculadas com *M. javanica* (Tabela 4) ocorreram em maior número que os genes reprimidos. Nas plantas resistentes inoculadas, foi observada a indução de 77,7 % do total de genes significantes e apenas 22,3 % de genes reprimidos quando comparado a planta resistente não inoculada.

Figura 7 - Identificação dos genes diferencialmente expressos para os genótipos: resistente inoculado (pontos vermelhos) e resistente não inoculado (pontos verdes). Gráfico da diferença relativa observada $d(i)$ versus a diferença relativa esperada $dE(i)$. A linha contínua (em azul) indica quando o $d(i) = dE(i)$, ou seja, quando a diferença relativa observada é idêntica a diferença relativa esperada. As linhas pontilhadas são referentes a distância $\Delta = 0,49$ da linha contínua

4.3.1 Genes com expressão induzida em plantas resistentes a *M. javanica*

Genes relacionados à interação patógeno – hospedeiro e defesa de plantas.

Através da análise do SAM foi possível caracterizar nove genes relacionados com a interação patógeno - hospedeiro cujos produtos são: chalcona sintase (BRSOGMMJ1021D08), uma proteína similar a chalcona flavonona (BRSOGMMJ1024G02), α – manosidase (BRSOGM MJ120A04), proteína STH-2 relacionada a patogenicidade (PR proteína), (BRSOGMMJ1010E11), álcool desidrogenase (BRSOGMMJ10 12F07), inibidora de cisteína proteinase (BRSOGMMJ1012F07), proteína de fator de virulência VrrB (BRSOGMMJ1010E09), xiloglucana endotransglicosilase (BRSOGMMJ1020D02) e o receptor do gene de resistência a nematóide Hs1pro-1 (BRSOGMMJ1003C02).

As enzimas álcool desidrogenase, chalcona sintase e a chalcona flavonona fazem parte da biossíntese de fitoalexinas flavonóides denominadas gliceolinas em soja (Bednar & Hadcock, 1988). A parede celular apresenta uma função importante na ativação de defesa da planta, influenciando nos mecanismos de resistência. As fitoalexinas são substâncias antimicrobianas de baixo peso molecular, sintetizadas e acumuladas na parede celular das plantas após a invasão de microrganismos (Braga & Dietrich, 1987; Seki et al., 1999; Pelicice et al., 2000). As enzimas que catalizam sua síntese, aparecem em baixas concentrações ou estão ausentes em plantas saudáveis. Estas podem ser sintetizadas quando as plantas são infectadas por certos patógenos ou influenciados por outros fatores abióticos (ferimentos, temperaturas extremas, etc.) (Chet, 1993). A produção de fitoalexinas é induzida pela ação de alguns fatores como elicitores exógenos que são produzidos pelo patógeno ou endógenos produzidos pela planta em resposta a situações

de estresse (Seki et al., 1999). Por exemplo, um mecanismo de defesa de leguminosas a infecções por míldio é o rápido acúmulo de fitoalexinas antimicrobianas e isoflavonóides na área infectada (Dixon, 1986), incluindo a produção de fenilpropanóides (Dixon and Harrison, 1990).

A indução da expressão de genes (álcool desidrogenase, chalcona sintase e chalcona flavonona) relacionados com a biossíntese de fitoalexinas foi observada na planta resistente inoculada com *M. javanica*. Este resultado sugere que a produção de fitoalexinas é um dos principais mecanismos de defesa da planta, conferindo a característica de resistência ao genótipo JF 7056. Além disso, na comparação com a condição de planta resistente não inoculada, estes genes não são expressos. Portanto, a hipótese de que a síntese de fitoalexinas é ativada por elicitor exógeno, produzido pelo nematóide apenas quando a planta é infectada, deve ser averiguada em trabalhos complementares.

A proteína STH-2 participa na indução de resposta de hipersensibilidade (RH) em plantas e faz parte de uma classe distinta de proteínas relacionadas a patogenicidade (PR). As proteínas PR1, com a qual a STH-2 possui homologia, são expressas em condições de estresse osmótico (Iturriaga et al., 1994), ferimentos (Warner et al., 1992) e durante a colonização do patógeno (Chang & Hadwiger, 1990). Constable & Brisson, 1992 evidenciaram a expressão das proteínas *STH-2* and *STH-21* durante a infecção por *Cladosporium fulvum* em tomate e durante a infecção por *Phytophthora infestans* em batata (Matton et al., 1993). Foi observada uma correlação entre a expressão de genes PR e a concentração de ácido salicílico (AS). Vydia et al., (1999) analisaram uma biblioteca de cDNA de *Licopersicum* induzida com concentrações altas de ácido salicílico que ativa a resistência sistêmica adquirida (SAR) em diversas espécies vegetais e observaram o aumento no nível de transcritos de TSI-1, que apresenta o máximo de homologia com os

genes PR STH-1 e STH-2, indicando que o AS regula a expressão deste gene.

Ao relacionar a indução do gene relacionado com a proteína PR STH-2 na planta resistente inoculada com resultados encontrados na literatura, é possível que esta proteína esteja envolvida no desencadeamento da resposta de hipersensibilidade nas plantas de soja resistentes ao nematóide. Uma forma de comprovar este fato e verificar se a regulação da expressão deste gene ocorre em diferentes concentrações de AS é por meio da quantificação individualizada da expressão deste gene por RT-PCR, comparando-se planta resistente inoculada e não inoculada em diferentes concentrações de ácido salicílico.

Foi observado o aumento na expressão do clone BRSGMMJ1010E10 que codifica uma proteína inibidora da cisteína proteinase. Recentemente, esta proteína tem sido utilizada como um fator de resistência contra determinados organismos (Gutierrez-Campos et al., 1999). Vírus da família *Potiviridae* (Clark & Moyer, 1988) codificam uma poliproteína que necessita ser proteolisada em produtos gênicos individuais através da enzima cisteína proteinase (Bladenvoorde et al., 2000). Campos et al. (1999) inseriram um gene inibidor de cisteína proteinase em plantas de fumo e batata transgênicos e constataram a resistência ao vírus TEV (tobacco etch virus) e PUY (potato virus Y).

A indução do clone BRSGMMJ1010E10 que codifica uma proteína inibidora da cisteína proteinase também ocorreu na planta suscetível inoculada com *M. javanica*. Parece que a expressão deste gene não é um fator determinante para conferir a característica de resistência no patossistema soja-nematóide.

A enzima Xyloglucana endotransglicosilase (BRSGMMJ020D02) está envolvida na síntese de hemicelulose e pectinas que são componentes da parede celular de plantas. A hemicelulose predominante

na parede primária de plantas dicotiledôneas é a xyloglucana a qual consiste basicamente de um esqueleto carbônico de moléculas de D-glicose, com ligações glicosídicas β -1, 4 e ramificações de xilose em ligações β -1,6 (Pascholati, 1995). Folhas de pepino resistentes a *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans* inoculados com o patógeno restringiram a sua colonização a pequenas áreas entre as nervuras, levando a uma redução do inoculo bem como a um menor número de folhas doentes por planta. A presença de tecidos com células de paredes espessas podem contribuir para a restrição da colonização das plantas por fitopatógenos e a indução na expressão deste gene na planta resistente é um fato interessante que pode ser estudado com maior ênfase em trabalhos posteriores.

Em relação aos genes de resistência específicos a nematóides, o gene Hs1pro-1 (BRSOGMMJ1003C02) apresentou expressão diferenciada em plantas inoculadas. Este gene é responsável pela resistência em beterraba, ao nematóide *H. schachtii* por causar a degeneração do sincício e impedir que o nematóide consiga completar seu ciclo de vida. Hs1pro-1 apresenta muitas características típicas de genes de resistência como número de repetições ricas em leucina (LRR) e domínio transmembrana.

A indução deste gene apenas na condição da planta resistente inoculada incita estudos mais aprofundados visando seu isolamento e caracterização por meio da quantificação dos níveis de expressão correlacionada com a análise da frequência do gene entre diferentes genótipos de soja.

Genes relacionados com transporte de membrana

A análise revelou a expressão diferencial dos clones: BRSGMMJ1016E04 que codifica para a proteína vacuolar ATPase, BRSGMMJ1018C10 que codifica uma porina de membrana plastidial externa, BRSGMMJ1018C11 que codifica um transportador ATP-ADP plastídico e BRSGMMJ1019C02 que codifica uma enzima H⁺- ATPse.

A enzima proteína vacuolar ATPase está relacionada com transporte de cátions e representa uma classe importante no mecanismo de bombeamento de prótons encontrados no sistema endomembrana de células eucarióticas, e estão envolvidas na regulação do pH. Em trabalhos sobre expressão gênica de patógenos de raízes, foi verificado que durante o processo inicial de infecção com *Heterobasidion annosum*, em pinus, sete genes foram regulados, incluindo genes que codificam proteínas mitocondriais, citocromo P450 e para a enzima vacuolar ATP sintase (Karlsson et al., 2003). Os transportadores de membrana são importantes para mudanças metabólicas dentro da interação patógeno-raiz de hospedeiro e a expressão diferencial destes genes em plantas resistentes na presença do patógeno pode ser um indicativo da ativação de mecanismos de defesa da planta associados com esta classe de genes.

Genes relacionados com a transcrição e tradução.

Os clones BRSGMMJ1023A03 (proteína de tradução de sinal), BRSGMMJ1025A06 (proteína de domínio C2 captura de zinco- "zinc finger"), BRSGMMJ1021H09 (proteína ribossomal S3 da subunidade 40S), clone BRSGMMJ1023A043 (proteína de tradução de sinal) estão relacionados com a transcrição e tradução. Genes incluídos nesta categoria induzem a multiplicação celular pois um número maior de

ribossomos e uma velocidade maior de síntese proteica são características observadas em células em divisão celular acelerada (Grumberg – Manago, 1996).

Genes relacionados com proteínas hipotéticas

As seqüências dos genes relacionados com proteínas hipotéticas foram submetidas no formato FASTA ao programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) (Altschul et al., 1997) para comparar com sequencias depositadas no banco de dados público mundial (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Aproximadamente 83% (132 genes) dos 158 genes diferencialmente expressos não apresentaram homologia sendo provavelmente específicos em soja que ainda não foram identificados quanto a sua função. Estes genes devem ser posteriormente analisados através de outras ferramentas de bioinformática para relacionar uma possível função com as condições estudadas.

Tabela 4 - Genes com expressão induzida no genótipo de soja resistente (JF 7056)

CLONE	DESCRIÇÃO	*Score d
Genes induzidos em plantas resistentes inoculadas com <i>M. javanica</i>		
¹ BRSOGMMJ1016E04	vacuolar ATPase putativa	1,91
BRSOGMMJ1010D04	SH**	1,73
BRSOGMMJ1021D08	chalcona sintase (<i>Glycine max</i>)	1,62
BRSOGMMJ1023F06	SH	1,60
BRSOGMMJ1016A01	Proteína sem função conhecida	1,60
BRSOGMMJ1020A04	α -manosidase putativa (<i>Oryza sativa</i>)	1,56
BRSOGMMJ1018C10	Proteína de membrana plastidial-porina	1,51
BRSOGMMJ1022B08	SH	1,43
BRSOGMMJ1024B11	SH	1,43
BRSOGMMJ1017D05	SH	1,39
BRSOGMMJ1013D06	SH	1,39
BRSOGMMJ1016D05	SH	1,36
BRSOGMMJ1023F08	SH	1,35
BRSOGMMJ1010A10	SH	1,35
BRSOGMMJ1014F03	SH	1,34
BRSOGMMJ109D02	SH	1,33
BRSOGMMJ1020C08	SH	1,29
BRSOGMMJ1022B01	SH	1,28
BRSOGMMJ1022C07	Precursor serina carboxypeptidase (<i>M. camomila</i>)	1,28
BRSOGMMJ1001G03	SH	1,26
BRSOGMMJ1024C07	SH	1,22
BRSOGMMJ1016D08	SH	1,20
BRSOGMMJ1018B10	SH	1,20
BRSOGMMJ1019G12	SH	1,17
BRSOGMMJ1001G01	SH	1,16

* Razão Cy5/Cy3 score posit.: expressão induzida; score neg: expressão reprimida.

** SH – sequência gênica sem homologia em banco de dados.

¹BRSOMJJ – Acesso ao banco de dados (www.cnpso.embrapa.br/bioinformatica)

Tabela 4- Genes com expressão induzida no genótipo de soja resistente (JF 7056)

CLONE	DESCRIÇÃO	Score d
Genes induzidos em plantas resistentes inoculadas com <i>M. javanica</i>		
BR SOGMMJ1022H03	SH	1,16
BR SOGMMJ1019G09	SH	1,15
BR SOGMMJ1018C12	SH	1,15
BR SOGMMJ1004D09	SH	1,14
BR SOGMMJ1022H02	SH	1,13
BR SOGMMJ1013D12	SH	1,13
BR SOGMMJ1021A09	SH	1,12
BR SOGMMJ1024E11	SH	1,12
BR SOGMMJ1022H02	SH	1,11
BR SOGMMJ1001D04	SH	1,11
BR SOGMMJ1015E09	Proteína sem função conhecida	1,11
BR SOGMMJ1021F04	SH	1,11
BR SOGMMJ1014F11	SH	1,10
BR SOGMMJ1009A10	Proteína sem função conhecida	1,09
BR SOGMMJ1010E11	PR -Proteína STH-2 (Relacionada a Patogenicidade)	1,08
BR SOGMMJ1021B07	SH	1,07
BR SOGMMJ1008A08	SH	1,06
BR SOGMMJ1023A03	Proteína putat. de transdução de sinal (<i>Oryza sativa</i>)	1,05
BR SOGMMJ1001F03	Histona H4	1,04
BR SOGMMJ1019D03	Proteína sem função conhecida	1,02
BR SOGMMJ1010D04	SH	1,02
BR SOGMMJ1025H02	SH	1,00
BR SOGMMJ1003D01	Proteína sem função conhecida (<i>Arabidopsis</i>)	1,00
BR SOGMMJ1016H11	SH	0,97
BR SOGMMJ1013E02	Proteína sem função conhecida (<i>Oryza sativa</i>)	0,97
BR SOGMMJ1023A02	SH	0,95
BR SOGMMJ1021D12	SH	0,95
BR SOGMMJ1021D12	SH	0,95
BR SOGMMJ1018D03	SH	1,16

Tabela 4- Genes com expressão induzida no genótipo de soja resistente (JF 7056)

CLONE	DESCRIÇÃO	Score d
Genes induzidos em plantas resistentes inoculadas com <i>M. javanica</i>		
BRSOGMMJ1016G08	SH	0,94
BRSOGMMJ1021D12	SH	0,93
BRSOGMMJ1018C11	transportador plastidico ATP/ADP (<i>Citrus</i> cultivar)	0,92
BRSOGMMJ1023A10	SH	0,92
BRSOGMMJ1005H11	SH	0,91
BRSOGMMJ1014A03	Proteína sem função conhecida (<i>Oryza sativa</i>)	0,89
BRSOGMMJ1009C10	SH	0,89
BRSOGMMJ1025B10	SH	0,89
BRSOGMMJ1005B06	SH	0,89
BRSOGMMJ1023F03	SH	0,88
BRSOGMMJ1012F07	Alcool- dehydrogenase (<i>Glycine max</i>)	0,87
BRSOGMMJ1003C12	SH	0,87
BRSOGMMJ1010E05	SH	0,87
BRSOGMMJ1023C08	SH	0,87
BRSOGMMJ1020C12	Proteína sem função conhecida (<i>Medicago</i>)	0,87
BRSOGMMJ1009D04	SH	0,85
BRSOGMMJ1025A06	Proteina dominio C2 - zinc finger	0,85
BRSOGMMJ1009C10	SH	0,85
BRSOGMMJ1021A01	SH	0,85
BRSOGMMJ1017C06	SH	0,84
BRSOGMMJ1013H12	SH	0,84
BRSOGMMJ1012E09	SH	0,83
BRSOGMMJ1025H09	Proteína sem função conhecida	0,83
BRSOGMMJ1012A09	SH	0,83
BRSOGMMJ1023B07	SH	0,82
BRSOGMMJ1023F08	SH	0,82
BRSOGMMJ1015H08	SH	0,81
BRSOGMMJ1024E11	SH	0,81

Tabela 4- Genes com expressão induzida no genótipo de soja resistente (JF 7056)

CLONE	DESCRIÇÃO	Score d
Genes induzidos em plantas resistentes inoculadas com <i>M. javanica</i>		
BRSOGMMJ1022A11	SH	0,80
BRSOGMMJ1021B07	SH	0,79
BRSOGMMJ1021E06	SH	0,79
BRSOGMMJ1022E06	SH	0,79
BRSOGMMJ1021E03	Proteína sem função conhecida (<i>Arabidopsis</i>)	0,78
BRSOGMMJ1015C11	SH	0,77
BRSOGMMJ1019G08	SH	0,77
BRSOGMMJ1012B01	SH	0,77
BRSOGMMJ1021H09	Proteína S3 ribossomal 40S	0,77
BRSOGMMJ1018D07	Proteína sem função conhecida	0,77
BRSOGMMJ1019C02	P-tipo H ⁺ -ATPase (<i>Vicia faba</i>)	0,77
BRSOGMMJ1022H09	SH	0,77
BRSOGMMJ1018C02	SH	0,77
BRSOGMMJ1022A06	SH	0,77
BRSOGMMJ1021A01	SH	0,77
BRSOGMMJ1024F09	SH	0,75
BRSOGMMJ123A043	Proteína putat. de transdução de sinal (<i>Oriza sativa</i>)	0,75
BRSOGMMJ1018F11	SH	0,75
BRSOGMMJ1020D10	SH	0,74
BRSOGMMJ1023B07	SH	0,74
BRSOGMMJ1020G08	Proteína específica de floema Vein1 (<i>Fava bean</i>)	0,74
BRSOGMMJ1015F10	SH	0,74
BRSOGMMJ1016G04	SH	0,73
BRSOGMMJ1015G12	SH	0,73
BRSOGMMJ1025C10	SH	0,73
BRSOGMMJ1014A08	SH	0,72
BRSOGMMJ1023E10	SH	0,70
BRSOGMMJ1014G03	Proteína sem função conhecida ([<i>Arabidopsis</i>)	0,70

Tabela 4- Genes com expressão induzida no genótipo de soja resistente (JF 7056)

CLONE	DESCRIÇÃO	Score d
Genes induzidos em plantas resistentes inoculadas com <i>M. javanica</i>		
BRSOGMMJ1021E06	SH	0,70
BRSOGMMJ1021E04	SH	0,70
BRSOGMMJ1011G09	Proteína putativa glutaredoxina	0,69
BRSOGMMJ1017E07	Proteína induzida por fermento (<i>Medicago sativa</i>)	0,68
BRSOGMMJ1020H11	Actina (<i>Setaria italica</i>)	0,68
BRSOGMMJ1008D07	SH	0,67
BRSOGMMJ1023D09	SH	0,67
BRSOGMMJ1005D03	Proteína sem função conhecida	0,66
BRSOGMMJ1024A02	SH	0,66
BRSOGMMJ1018C01	SH	0,65
BRSOGMMJ1003B12	SH	0,65
BRSOGMMJ1018F10	SH	0,64
BRSOGMMJ1024G02	Proteína similar a Chalcona-Flavonona	0,64
BRSOGMMJ1003H05	SH	0,64
BRSOGMMJ1022F03	Geranylgeranyl transferase subunidade beta tipo I	0,64
BRSOGMMJ1021H04	SH	0,63
BRSOGMMJ1018D09	precursor da glicose-6-fosfato/fosfato transl plastidio	0,63
BRSOGMMJ1021H09	proteína S3 ribossomal 40S	0,62
BRSOGMMJ1016D10	Metiltetrahydropteroiltriglutamato homocisteína metiltransferase	0,62
BRSOGMMJ1025C04	SH	0,62
BRSOGMMJ1019A03	SH	0,62
BRSOGMMJ1012H02	SH	0,62
BRSOGMMJ1020F04	SH	0,62
BRSOGMMJ1024F09	SH	0,61
BRSOGMMJ101D04	SH	0,61
BRSOGMMJ1023G02	SH	0,61
BRSOGMMJ1018F12	SH	0,61
BRSOGMMJ1010E10	Inibidor da cisteína proteinase– soja (fragmento)	0,61

Tabela 4- Genes com expressão induzida no genótipo de soja resistente (JF 7056)

CLONE	DESCRIÇÃO	Score d
Genes induzidos em plantas resistentes inoculadas com <i>M. javanica</i>		
BRSOGMMJ1025H02	SH	0,61
BRSOGMMJ1009B02	SH	0,61
BRSOGMMJ1023E10	SH	0,60
BRSOGMMJ1022H02	SH	0,60
BRSOGMMJ1021E06	SH	0,60
BRSOGMMJ1015G02	SH	0,60
BRSOGMMJ1023G02	SH	0,59
BRSOGMMJ1013C09	SH	0,59
BRSOGMMJ1010E09	VrrB putativo (<i>Bacillus cereus</i>)	0,59
BRSOGMMJ1017D11	SH	0,58
BRSOGMMJ1020D02	xyloglucana endotransglycosylase (<i>Malus domestica</i>)	0,58
BRSOGMMJ1005C05	SH	0,58
BRSOGMMJ1018C06	SH	0,57
BRSOGMMJ1010F01	SH	0,57
BRSOGMMJ1003C02	Hs1pro-1: Gene Resistência a nematóide	0,57
BRSOGMMJ1016C10	SH	0,57
BRSOGMMJ1019C07	SH	0,57
BRSOGMMJ1019H07	SH	0,56
BRSOGMMJ1023C08	SH	0,56

4.3.2 Genes com expressão reprimida em plantas resistentes a *M. javanica*

Dentre os genes reprimidos na condição da planta resistente inoculada quando comparada ao controle, foi observada a expressão dos clones BRSOGMMJ1007G04, uma proteína de choque térmico de 17,5 KD, BRSOGMMJ1006F07 uma glyoxalase I (lactoILglutational), BRSOGMMJ1008F05 que é homóloga a uma chaperonina, e BRSOGMMJ1004E12, que é uma proteína associada com a senescência e BRSOGMMJ1003F05, com homologia ao etileno fator 4 (Tabela 5).

As proteínas de choque térmico atuam como chaperonas moleculares, inicialmente verificadas em resposta ao estresse térmico, e atualmente já foram descritas relacionadas a diversos estresses biótico e abiótico (Nepomuceno et al., 2002).

O clone BRSOGMMJ1006F07, o qual codifica a enzima lactoilglutational liase, faz parte de um grupo de genes que são regulados em resposta a determinados fatores de estresse. Zhu-Salzman et al. (2004) comparam a resposta transcricional em plantas de *Sorghum bicolor* elicitados por *Schizaphis graminæ*, ácido salicílico e ácido jasmônico, observando que o ataque deste inseto foi responsável por mudanças na expressão de genes de defesa, antioxidantes como o gene da lactoilglutational liase, genes relacionados ao estresse abiótico, de assimilação de nitrogênio, fotossíntese e de funções desconhecidas.

Em relação ao clone BRSOGMMJ1004E12, a proteína envolvida com a senescência já foi relatada em outros artigos sobre a expressão de genes e está envolvida com a defesa de plantas (Obregón et al. 2001; Quirino et al. 2000). Dois genes associados com a senescência (*sen1* e *sen5*) foram superexpressos em resposta a indução de defesa na planta (Maleck et al., 2000).

Tabela 5 - Genes com expressão reprimida no genótipo de soja resistente (JF 7056)

CLONE	DESCRIÇÃO	*Score d
Genes reprimidos em plantas resistentes inoculadas com <i>M. javanica</i>		
¹ BRSOGMMJ1009H05	**SH	-1,89
BRSOGMMJ1019B05	SH	-1,78
BRSOGMMJ1009C10	SH	-1,67
BRSOGMMJ1010D09	SH	-1,58
BRSOGMMJ1010D02	Epoxido hidrolase	-1,44
BRSOGMMJ1009G10	SH	-1,43
BRSOGMMJ1010E01	Proteína de ligação alfa rica em Purina	-1,41
BRSOGMMJ1003B05	citocromo-b5 redutase	-1,34
BRSOGMMJ1003A11	SH	-1,27
BRSOGMMJ1005H02	Fosfoglicerato dehydrogenase	-1,26
BRSOGMMJ1009G06	Proteína de Choque Termico rica em tirosina	-1,25
BRSOGMMJ1005B11	Frutokinase (<i>Cicer atietinum</i>)	-1,24
BRSOGMMJ1003B11	SH	-1,23
BRSOGMMJ1001B05	SH	-1,22
BRSOGMMJ1019B02	SH	-1,22
BRSOGMMJ1004E12	Proteína associada a senescência	-1,20
BRSOGMMJ1001B02	SH	-1,17
BRSOGMMJ1012H06	SH	-1,17
BRSOGMMJ1001C05	Xaa-Pro aminopeptidase 1 (<i>L. esculentum</i>)	-1,16
BRSOGMMJ1007D06	SH	-1,14
BRSOGMMJ1006F07	glyoxalase I – lactoilglutathione	-1,12
BRSOGMMJ1010H08	20S proteasoma alfa subunidade A	-1,12
BRSOGMMJ1010G09	4-difosfocitidil-2C-metil D-eritritol kinase (cloroplasto)	-1,12
BRSOGMMJ1014G10	SH	-1,10

* Razão Cy5/Cy3, score positiv: expressão induzida; score negat: expressão reprimida.

** SH – sequência gênica sem homologia em banco de dados.

¹BRSOMJJ – Acesso ao banco de dados (www.cnpso.embrapa.br/bioinformática)

Tabela 5 - Genes com expressão reprimida no genótipo de soja resistente (JF 7056)

CLONE	DESCRIÇÃO	Score d
Genes reprimidos em plantas resistentes inoculadas com <i>M. javanica</i>		
BR SOGMMJ1009C03	SH	-1,09
BR SOGMMJ1009C09	SH	-1,09
BR SOGMMJ1005A09	SH	-1,09
BR SOGMMJ1008F05	proteína T-complexo 1 similar a chaperonina	-1,09
BR SOGMMJ1003B03	SH	-1,08
BR SOGMMJ1015D06	SH	-1,05
BR SOGMMJ1020C02	SH	-1,04
BR SOGMMJ1011C11	Proteína de repetição WD	-1,04
BR SOGMMJ1003F05	Etileno Fator 4 (<i>L. esculentum</i>)	-1,02
BR SOGMMJ1009B07	SH	-1,01
BR SOGMMJ1003B09	Proteína sem função conhecida	-1,01
BR SOGMMJ1020B11	proteína 40s ribossomal s14	-1,01
BR SOGMMJ1013F01	Proteína sem função conhecida	-1,01
BR SOGMMJ1001A02	SH	-1,00
BR SOGMMJ1007G04	Proteína de Choque térmico, 17.5 KD Classe I	-1,00
BR SOGMMJ1005F09	SH	-1,00
BR SOGMMJ1010G11	SH	-0,98
BR SOGMMJ1010G05	Proteína sem função conhecida	-0,98
BR SOGMMJ1004C09	SH	-0,97
BR SOGMMJ1019D10	Proteína sem função conhecida (<i>Arabidopsis</i>)	-0,97
BR SOGMMJ1012D10	Proteína sem função conhecida	-0,97
BR SOGMMJ1019D12	Proteína sem função conhecida (<i>Arabidopsis</i>)	-0,96
BR SOGMMJ1018E08	SH	-0,96
BR SOGMMJ1015D02	Família FAD-oxidoreductase	-0,96
BR SOGMMJ1006C06	SH	-0,94

4.4 Comparação dos genes diferencialmente expressos nas plantas suscetíveis inoculadas e não inoculadas com *M. javanica*

O perfil da expressão gênica nas plantas suscetíveis também foi comparado por meio da ferramenta estatística SAM. O número de genes induzidos e reprimidos na planta suscetível foi 50,48% menor quando comparado com a expressão de genes nas plantas resistentes. Dentre aproximadamente 1000 genes estudados, um total de 103 genes apresentaram expressão diferencial, entre eles 76 genes foram induzidos e 27 genes foram reprimidos nas plantas suscetíveis a *M. javanica*.

Através da análise dos dados foi possível observar que os genes induzidos em plantas suscetíveis inoculadas com *M. javanica* ocorreram em maior número que os genes diferencialmente expressos em plantas suscetíveis não inoculadas (genes reprimidos em plantas inoculadas). Nas plantas suscetíveis inoculadas foi observada a indução de 73 % do total de genes significantes em relação a apenas 27 % para plantas não inoculadas (Tabela 6 e 7, Figura 8.). Estes genes foram divididos em categorias funcionais distintas.

A significância da diferença da expressão dos genes foi calculada através da razão da mediana da intensidade de fluorescência para cada condição, com formato de dados pareados e 100 permutações. A análise dos dados resultou numa taxa de falsos positivos (FSN – False Significant Number) de 0,38 e o valor de Δ de 0,08 (Figura 8).

Figura 8 - Disposição gráfica dos genes diferencialmente expressos para os genótipos: suscetível inoculado (pontos vermelhos) e suscetível não inoculado (pontos verdes). Gráfico da diferença relativa observada $d(i)$ versus a diferença relativa esperada $dE(i)$. A linha contínua (em azul) indica quando o $d(i) = dE(i)$, ou seja, quando a diferença relativa observada é idêntica a diferença relativa esperada. As linhas pontilhadas são referentes a distância $\Delta = 0,08$ da linha contínua

4.4.1 Genes com expressão induzida em plantas suscetíveis a *M. javanica*

Dentre os 103 genes diferencialmente expressos, 76 genes deles foram induzidos nas plantas suscetíveis a *M. javanica*. Estes foram divididos em diferentes categorias funcionais descritas abaixo. Aproximadamente 64,47% (49 genes SH) dos genes expressos não apresentaram homologia sendo provavelmente específicos em soja. As seqüências dos genes relacionados com proteínas hipotéticas submetidas ao programa BLAST tiveram uma freqüência de 14,47% (11 genes).

Genes relacionados com metabolismo de hormônios e metabólitos secundários.

Nas plantas suscetíveis inoculadas com nematóide foram observadas a expressão de genes relacionados com a síntese de hormônios e metabólitos secundários, como exemplo, etileno (clone BRSGMMJ1022C11) auxinas (clone BRSGMMJ1007B11), giberelinas (clone BRSGMMJ1022F12) e difosfomevalonato decarboxilase (clone BRSGMMJ1013E11).

O etileno é um hormônio envolvido na resposta ao estresse. Schenk et al. (2000) demonstraram que os genes SAG12 (cisteína proteinase associada a senescência), PDF1.1, PDF1.2, chalcone sintase, ácido oxidase, lipoxigenase, Lox1 e o receptor de etileno ERS2 foram super-regulados por etileno enquanto outros genes associados a etileno foram reprimidos. O etileno mostrou um papel importante tanto na resistência quanto na suscetibilidade a doenças (Feys & Parker, 2000). Mazarei et al., (2002) caracteriza o etileno como membro de uma família de fatores de transcrição em plantas, denominados proteína de ligação ao elemento responsivo-etileno ("Ethylene-responsive element binding proteins" - EREBPs). Os domínios conservados de EREBP destas proteínas se ligam ao GCC box, um elemento promotor de etileno-responsivo encontrado

em muitos genes PR, relacionados a patogenicidade. O GCC box é necessário e suficiente para a regulação de etileno em genes de plantas. A abundância do nível de expressão destes EREBPs mostrou-se alterada durante o processo de infecção por nematóide do cisto *Heterodera glycines* em soja, aumentando na cultivar resistente Hatwig e diminuindo na cultivar suscetível Corsoy 79. O etileno conjuntamente com o ácido salicílico, também está envolvido na indução do gene *Pti4*, sendo que o produto formado é fosforilado pela *Pto kinase* (Gu et al., 2000).

Auxinas e giberelinas são essenciais para planta e influenciam em muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento, incluindo divisão celular, germinação, alongação, diferenciação, tropismo, dominância apical, senescência, abscisão, florescimento e biossíntese da antocianina (Davis, 1995; Hooley, 1994). A biossíntese de auxinas, principalmente o ácido indol acético (AIA), ocorre no tecido apical de raiz e é ativamente transportada para toda a planta (Aloni, 1995). De acordo com Bartel (1997), a síntese de auxinas pode ser catalisada não apenas pôr enzimas endógenas, mas também pôr enzimas codificadas em plasmídeos de patógenos como o *Agrobacterium tumefaciens*. O transporte deste hormônio parece ser mediado pôr proteínas específicas e o direcionamento do fluxo de auxina foi atribuído à distribuição polar de carregadores de efluxo nas células da membrana (Raven, 1975).

A giberelina, também caracterizada como um importante fitohormônio, é responsável, como citado acima, pelo desenvolvimento da planta, exemplo, durante a iniciação das raízes laterais. Este hormônio é sintetizado do diterpeno tetracíclico pelas enzimas dioxigenases 20-oxidase e 3 β -hidroxilase e pesquisas realizadas por Hedden & Kamiya (1997) observaram que as propriedades enzimáticas destas enzimas foram similares com as produzidas em *E. coli*. A expressão significativa deste gene pode ser um fator importante de resposta da planta contra o ataque do nematóide.

A enzima difosfomevalonato decarboxilase (clone BRSOGMMJ1013E11) faz parte da via metabólica dos isoprenóides em eucariotos (Osterman & Overbeek, 2003). Os isoprenóides, também chamados terpenóides, são compostos responsáveis por funções essenciais nos organismos como os esteróis que são requeridos como componentes estruturais, dolicol como transportador de açúcar na glicosilação de proteínas, ubiquinona e plastoquinona como transportadores de elétrons na fotossíntese e respiração e ácido abscísico, citoquininas, giberelinas e esteróides como hormônios que controlam processos fisiológicos (Campos et al., 2001). Yahyaoui et al. (2004), descreveram a indução significativa do gene que codifica a enzima difosfomevalonato decarboxilase durante a interação simbiótica entre uma planta leguminosa *Medicago truncatula* e a bactéria *Sinorhizobium meliloti*. De acordo com os autores, a expressão deste gene pode estar relacionada com a formação do nódulo além de outros processos metabólicos como moléculas de defesa da planta.

Não é possível afirmar que este gene está diretamente relacionado a resposta ao ataque do nematóide, pois a nodulação é um processo que ocorre tanto no genótipo resistente quanto no suscetível e estudos adicionais seriam necessários para correlacionar o envolvimento destes genes especificamente na resposta a inoculação com *M. javanica*.

Genes relacionados com a parede celular.

Na categoria de genes relacionados à parede celular, foi observada a expressão do clone BRSOGMMJ1003A08 que codifica uma proteína denominada de fitocianina.

Normalmente, as proteínas de membrana possuem um ou mais domínios na transmembrana que transversa a bicamada lipídica hidrofóbica. A âncora formada pôr um componente denominado glicosilfosfatidilinositol (GPI) é um meio alternativo, encontrado em

organismos eucarióticos, de ligação de uma proteína na membrana (Udenfriend & Kodukula, 1995). O C terminal da GPI – ancorada a uma proteína (GAP) é covalentemente unida via fosfoetanolamina e uma glicana conservada para fosfatidilinositol ou uma ceramida (Kinoshita & Inoue, 2000). As fitocianinas pertencem a família de proteínas GAP que se ligam ao cobre e em *Arabidopsis* estão diretamente relacionadas à formação das nodulinas iniciais (Borner et al., 2002). As nodulinas constituem um grupo de proteínas das plantas leguminosas que são expressas especificamente em nódulos simbióticos de raiz. Um pequeno número de genes da família das fitocianinas – relacionados a nódulos iniciais, nomeado *gmn315* ou *nod55*, foi primeiro identificado em soja e posteriormente genes ortólogos *mtnod16* e 20 foram identificados em *Medicago truncatula* (Greene et al., 1998). Seus produtos provavelmente perderam o sítio de ligação ao cobre, embora sua estrutura tridimensional é muito similar a das fitocianinas. Entretanto, a sua função como nodulina primitiva permanece desconhecida (Yoshizaki et al., 2000).

As plantas suscetíveis possivelmente estão apresentando a produção e atividade alterada na síntese de proteínas relacionadas a parede celular em resposta à presença de *M. javanica*.

Genes relacionados com metabolismo de RNA.

A análise revelou a expressão aumentada, em plantas suscetíveis inoculadas com nematóide, dos clones BRSOGMMJ1006B10, BRSOGMMJ1015F04 e BRSOGMMJ1012A07 relacionados ao metabolismo de RNA. Estes clones codificam a subunidade da RNA polimerase II, proteína ribossomal S18 da subunidade 40S e o fator de transcrição Myb1, respectivamente. A principal função da RNA polimerase II é a síntese dos mRNAs e alguns RNAs especializados. A enzima eucariótica é muito complexa do que sua contrapartida bacteriana, embora a

subunidade maior apresenta um alto grau de homologia com a subunidade β' da RNA polimerase bacteriana. Esta enzima de 12 subunidades necessita de um dispositivo de outras proteínas, denominados fatores de transcrição, ordenados para formar um complexo de transcrição ativo (Nelson & Cox, 2002). Já a proteína apresenta como função o reconhecimento eficiente e a ligação com os mRNAs através da subunidade 40S do ribossomo durante o processo de tradução.

O fator de transcrição Myb1 também está envolvido com a resposta da plantas ao estresse. Alguns estudos demonstraram uma sobreposição entre a resposta de defesa e de estresse em plantas indicando que os fatores de transcrição podem ter uma função importante na mediação de resposta à infecção pelo patógeno (Rose et al., 1999; Wang et al. 2002). O nematóide pode afetar a transcrição e tradução dos tecidos infectados. Este pode ser o motivo pelo qual a expressão destes genes foi induzida nas plantas suscetíveis.

Genes relacionados com divisão celular.

Nas plantas suscetíveis inoculadas, dois genes induzidos estão relacionados com a expressão de serina/treonina proteína quinase (clones BRSOGMMJ1012C05 e BRSOGMMJ1020A08). Durante o crescimento e desenvolvimento de muitos organismos eucarióticos, as proteínas quinases funcionam em uma variedade de vias de sinalização para a divisão celular, metabolismo e resposta hormonal, desenvolvimento e estímulo ambiental. Perrimon (1995) afirma que a atividade das quinases pode ser regulada de acordo com as seqüências alvo. O conhecimento de como as proteínas quinases são reguladas, é a chave para o entendimento de processos celulares básicos ocorridos no desenvolvimento de plantas. Uma das quinases mais estudada é a SNF1/AMPKs, uma serina/treonina proteína quinase identificada em

fungos, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, mamíferos e plantas (McCartney & Schmidt, 2001). Gong et al. (2002) trabalharam com mutantes do gene *sos2*, que codifica uma serina/treonina proteína quinase, e mostraram ser um componente crítico para a via de sinalização ao estresse salino.

Liu et al. (2002) afirmam que genes de resistência a plantas (genes R), o qual conferem um tipo de resistência gene a gene, podem ser classificados em seis grupos baseados nas estruturas de suas proteínas codificadas como serina/treonina quinase, proteínas com um nucleotídeo-sítio de ligação e repetidas leucinas (LRR – leucine rich repeats), proteínas contendo LRR extracelular com ou sem um domínio de transmembrana, receptor serina/treonina como quinase (RLK – receptor like kinase) e uma proteína sem homologia significativa as proteínas conhecidas. Um exemplo é o gene *pto* de tomate que confere resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* contendo um *avr* gene *avrPto*, que codifica a serina/treonina kinase (Pto) o qual interage com o *avrPto* e várias outras proteínas conhecidas por Ptois (Tang et al., 1996). Neste caso, a Pto quinase pode autofosforilar oito resíduos de serina e treonina e este processo é realizado via um mecanismo intramolecular (Sessa et al., 2000). A sequência de aminoácidos desta proteína Pto indica que esta faz parte de uma grande família de proteínas quinases conhecidas como RD quinases, o qual tem uma arginina imediatamente precedendo o aspartato catalítico conservado (Johnson et al., 1996). A substituição de um aminoácido específico nesta região resulta na indução constitutiva da resposta sensitiva na ausência do *avrPto* (Rathjen et al., 1999).

Outro gene induzido em plantas suscetíveis e relacionado a patogenicidade foi o clone BRSOGMMJ1013E02. Este gene codifica um elicitor glicolipídico de baixo peso molecular denominado siringolide. De acordo com Pascholati & Leite (1995) os elicitores são compostos de

origem microbiana ou do próprio hospedeiro (planta), que induzem a produção de fitoalexinas, compostos antimicrobianos sintetizados pela planta que se acumulam nas células vegetais em resposta à infecção microbiana. Pesquisadores observaram que cultivares de soja contendo o gene de resistência *Rpg4* são resistentes a isolados de *Pseudomonas syringae* que expressam o gene de avirulência *avrD*. Na bactéria, o *avrD* direciona a produção de siringolide e esta elícita a morte celular por hipersensibilidade em cultivares de soja *Rpg4*, o que não ocorre nos cultivares suscetíveis *rpg4*. Adicionalmente, a siringolide não induz o acúmulo suficiente de fitoalexina. Uma proteína de ligação a siringolide foi encontrada, a P34, que é processada por um precursor de 46 Kda, que possui homologia com cisteína proteinases. (Herma et al., 1990; Hagihara et al., 2004). No presente estudo, apesar da indução da expressão do gene que codifica siringolide no genótipo suscetível, não ocorre a elicitação de hipersensibilidade pois estas plantas possivelmente não possuem o gene de resistência *Rpg4* e portanto não ocorre acúmulo de fitoalexinas.

Foi observada também a expressão aumentada do clone BRSOGMMJ1010E10 o qual codifica uma proteína inibidora da cisteína proteinase. Recentemente, esta proteína tem sido utilizada como um fator de resistência contra vírus da família *Potiviridae* (Clark & Moyer, 1988). Embora existam estas referências sobre sua atuação como fator de resistência, neste estudo foi observada a indução da expressão do inibidor de cisteína proteinase tanto no genótipo resistente quanto no suscetível. Adicionalmente, um precursor com homologia a proteína cisteinase foi relacionado com siringolide, como descrito acima. Uma hipótese para a indução deste gene em plantas suscetíveis é a sua atuação como inibidor deste precursor da proteína de ligação a siringolide, impedindo desta forma a produção suficiente do elicitor que desencadeia a síntese de fitoalexinas.

Tabela 6 - Genes com expressão induzida no genótipo de soja suscetível (266-S)

CLONE	DESCRIÇÃO	* Score d
Genes induzidos em plantas suscetíveis inoculadas com <i>M. javanica</i>		
BRSOGMMJ1019D04	**SH	1,74
BRSOGMMJ1019H05	SH	1,67
BRSOGMMJ1013B01	SH	1,62
BRSOGMMJ1013B11	SH	1,57
BRSOGMMJ1016E09	Proteína sem função conhecida	1,48
BRSOGMMJ1019F02	SH	1,45
BRSOGMMJ1018G02	SH	1,35
BRSOGMMJ1012D10	Proteína sem função conhecida	1,27
BRSOGMMJ1016C06	SH	1,13
BRSOGMMJ1013E11	Difosfomevalonato decarboxilase	1,10
BRSOGMMJ1014G12	SH	1,01
BRSOGMMJ1012E03	Hidroquinona glucosiltransferase (Arbutina sintase)	0,93
BRSOGMMJ1012C05	Serina/threonina-kinase	0,92
BRSOGMMJ1018A03	SH	0,92
BRSOGMMJ1012C07	SH	0,90
BRSOGMMJ1020C07	SH	0,89
BRSOGMMJ1012E09	SH	0,89
BRSOGMMJ1013F06	SH	0,88
BRSOGMMJ1016D11	SH	0,86
BRSOGMMJ1007B11	Proteína indutora de auxina	0,86
BRSOGMMJ1016C12	SH	0,85
BRSOGMMJ1016B01	SH	0,83
BRSOGMMJ1013E02	Proteína indutora de Siringolide B13-1-1	0,82
BRSOGMMJ1022F12	Giberelina 20-oxidase	0,82

*Razão Cy5/Cy3, log positivo = expressão induzida; log negativo = expressão reprimida.

**SH – seqüência gênica sem homologia em banco de dados.

¹BRSOMJJ – Acesso ao banco de dados (www.cnpso.embrapa.br/bioinformática)

Tabela 6 - Genes com expressão induzida no genótipo de soja suscetível (266-S)

CLONE	DESCRIÇÃO	Score d
Genes induzidos em plantas suscetíveis inoculadas com <i>M. javanica</i>		
BRSOGMMJ1012C03	SH	0,82
BRSOGMMJ1016C02	SH	0,81
BRSOGMMJ1024F09	SH	0,79
BRSOGMMJ1019D07	SH	0,79
BRSOGMMJ1006B10	Subunidade da RNA polimerase II	0,78
BRSOGMMJ1013F01	Proteína sem função conhecida	0,77
BRSOGMMJ1011C11	Proteína sem função conhecida	0,76
BRSOGMMJ1019D03	Proteína sem função conhecida	0,76
BRSOGMMJ1015F04	Proteína S18 ribossomal 40S	0,75
BRSOGMMJ1020D04	SH	0,75
BRSOGMMJ1016A07	SH	0,74
BRSOGMMJ1010E10	Inibidor da cisteína proteinase	0,73
BRSOGMMJ1003G12	SH	0,73
BRSOGMMJ021C04	SH	0,73
BRSOGMMJ1016C10	SH	0,73
BRSOGMMJ1015F10	SH	0,72
BRSOGMMJ1011D06	Proteína sem função conhecida	0,71
BRSOGMMJ1022C11	Proteína de indução ao etileno	0,70
BRSOGMMJ1016D05	SH	0,69
BRSOGMMJ1014A03	Proteína sem função conhecida	0,68
BRSOGMMJ1012F03	Proteína sem função conhecida	0,68
BRSOGMMJ1016C04	SH	0,68
BRSOGMMJ1012A07	Fator de transcrição Myb1	0,67
BRSOGMMJ1013B05	SH	0,67
BRSOGMMJ1015D10	SH	0,66
BRSOGMMJ1003A08	Fitocianina	0,64
BRSOGMMJ1013C01	SH	0,64
BRSOGMMJ010B01	SH	0,63
BRSOGMMJ1014B03	SH	0,63

Tabela 6 - Genes com expressão induzida no genótipo de soja suscetível (266-S)

CLONE	DESCRIÇÃO	Score d
Genes induzidos em plantas suscetíveis inoculadas com <i>M. javanica</i>		
BRSOGMMJ1017F11	SH	0,62
BRSOGMMJ1016B04	SH	0,62
BRSOGMMJ1020B02	SH	0,61
BRSOGMMJ1013C04	SH	0,60
BRSOGMMJ1021A05	Proteína sem função conhecida	0,60
BRSOGMMJ1020A08	Serina-treonina kinase	0,60
BRSOGMMJ1013F11	SH	0,60
BRSOGMMJ1024A04	SH	0,59
BRSOGMMJ1013H08	Proteína de interação RanGAP1	0,59
BRSOGMMJ1022E06	SH	0,59
BRSOGMMJ1012E06	Proteína sem função conhecida	0,59
BRSOGMMJ1014D03	SH	0,58
BRSOGMMJ1018A07	SH	0,57
BRSOGMMJ1008B01	Proteína sem função conhecida	0,57
BRSOGMMJ1022B10	SH	0,57
BRSOGMMJ1005C09	SH	0,56
BRSOGMMJ109G02	SH	0,55
BRSOGMMJ1005E08	SH	0,55
BRSOGMMJ1013D12	SH	0,53
BRSOGMMJ1001A05	SH	0,53
BRSOGMMJ1021G06	Proteína transmembrana de Repetição Rica em Leucina	0,53
BRSOGMMJ1015E11	SH	0,51
BRSOGMMJ1020C11	Proton vacuolar/pirofosfatase inorgânica	0,51

4.4.2 Genes com expressão reprimida em plantas suscetíveis a *M. javanica*

A análise revelou a expressão reprimida de alguns genes relacionados com a interação patógeno-hospedeiro. Entre eles destacam-se BRSOGMMJ1025E12 (proteína quinase homóloga a tioredoxina C), BRSOGMMJ1004D04 (O – ligado a N – acetil glicosamina transferase), BRSOGMMJ1009H08 (nodulina), BRSOGMMJ1006F07 (lactoilglutationaliase), álcool desidrogenase (BRSOGMMJ011B11) e BRSOGMMJ1003D06 (provável serina/treonina quinase).

A proteína quinase homóloga a tioredoxina C faz parte de um grupo de proteínas, codificadas por algumas bactérias fitopatogênicas, que interferem no trabalho de sinalização celular das células hospedeiras e na sobrevivência de promotores bacterianos (Koul et al., 2001).

Em relação à proteína codificada pelo clone BRSOGMMJ1004D04, a O – ligado a N – acetil glicosamina transferase (GlcNAc transferase), é uma glicosiltransferase envolvida na biossíntese de glicanas e atuam pela adição de monossacarídeos (moléculas doadoras) em posições específicas em aceptores de moléculas (Price et al., 2002).

Como descrito anteriormente, os genes relacionados a nodulina, constituem um grupo de proteínas das plantas leguminosas que são expressas especificamente em nódulos simbióticos de raiz. Em relação a álcool desidrogenase, lactoilglutationaliase, e uma provável serina/treonina quinase, estes genes foram diferencialmente expressos tanto na condição de planta resistente quanto na suscetível.

Tabela 7 - Genes com expressão reprimida no genótipo de soja suscetível (266-S)

CLONE	DESCRIÇÃO	Score d
Genes reprimidos em plantas suscetíveis inoculadas com <i>M. javanica</i>		
BRSOGMMJ1009B12	**SH	-1,36
BRSOGMMJ1009C03	SH	-1,31
BRSOGMMJ1025E12	Proteína kinase homologa a Thioredoxina C	-1,06
BRSOGMMJ1008C06	SH	-1,04
BRSOGMMJ1021D02	SH	-1,04
BRSOGMMJ1004D04	O – ligação GlcNAc transferase	-0,94
BRSOGMMJ1009G10	SH	-0,93
BRSOGMMJ1009H08	Nodulina (<i>Arabidopsis</i>)	-0,92
BRSOGMMJ1010B09	Fotossistema I subun. IV A/precursor do cloroplasto	-0,89
BRSOGMMJ1007A01	SH	-0,89
BRSOGMMJ1009H05	SH	-0,86
BRSOGMMJ1010F12	Proteína sem função conhecida	-0,85
BRSOGMMJ1010E03	Proteína de maturação PM3 -soja	-0,85
BRSOGMMJ1019H04	SH	-0,85
BRSOGMMJ1006F07	Lactoilglutathione liase	-0,85
BRSOGMMJ1006A11	SH	-0,82
BRSOGMMJ1011B11	Alcool desidrogenase	-0,82
BRSOGMMJ1003G08	SH	-0,79
BRSOGMMJ1010D02	SH	-0,77
BRSOGMMJ1020E09	SH	-0,76
BRSOGMMJ1009H02	SH	-0,75
BRSOGMMJ1009G06	Proteína sem função conhecida	-0,75
BRSOGMMJ1003D06	Serine treonina kinase	-0,74
BRSOGMMJ1019C02	P – tipo H ⁺ ATPase	-0,74
BRSOGMMJ1009H12	SH	-0,74
BRSOGMMJ1006D07	SH	-0,74
BRSOGMMJ1006F11	SH	-0,73

Considerações Finais

A prioridade deste trabalho foi identificar genes relacionados com a defesa de plantas e com a interação patógeno-hospedeiro. O estudo da expressão comparativa destes genes em genótipos de soja, considerados resistentes e suscetíveis a *Meloidogyne javanica*, representou um excelente avanço para a seleção genética visando à resistência de soja a doenças causadas por nematóides fitoparasitas. O conhecimento da seqüência de genes envolvidos na resposta ao ataque do patógeno apenas, não é suficiente para evidenciar o seu papel biológico, entretanto, esta proposição pode ser alcançada com a constatação de quando e onde ocorre a sua expressão. Os microarranjos revolucionaram os estudos da expressão diferencial de genes devido a sua ampla capacidade para analisar padrões de expressão quantitativa de milhares de genes simultânea e comparativamente entre duas ou mais condições experimentais. Além de permitir a interpretação imediata dos resultados da hibridização, também permitem analisar a expressão de genes desconhecidos por comparação com seqüências depositadas em banco de dados. A partir desta análise foi possível categorizar a sua provável função e inferir sobre a sua relação com genes similares presentes em outros organismos.

Este trabalho empregando a técnica de microarranjos para analisar a interação entre planta e fitonematóides foi pioneiro na Embrapa Soja e no Brasil. Foi possível estabelecer um método funcional para explorar bibliotecas de cDNA de soja - *M. javanica* e analisar a expressão de genes envolvidos nesta interação. Esta técnica ainda é recente no País, devido ao alto custo dos equipamentos robotizados que são utilizados para fixação dos produtos de DNA nas lâminas de vidro, hibridização sistemática dos cDNAs, do scanner à laiser que faz a leitura da imagem gerada pelos fluoróforos em dois comprimentos

de onda distintos e dos softwares para captura e análise das imagens. Uma forma de otimização dos recursos para a utilização em larga escala desta técnica é a formação de parcerias com centros de referência que possuam esta tecnologia.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que nas plantas do genótipo resistente, não ocorre a expressão de genes relacionados com a produção dos hormônios auxina, giberelina e etileno. A produção destes hormônios é ativada por toxinas do nematóide que são injetadas nas células da planta para a formação de células gigantes ou nutridoras. No entanto, foi observada a indução da expressão de vários destes genes nas plantas correspondentes ao genótipo suscetível. Dentre os genes expressos diferencialmente na planta resistente foram encontrados genes relacionados com a síntese de fitoalexinas, produção de PR proteínas e genes de resistência propriamente ditos. É possível que a expressão dos genes envolvidos com a interação patógeno-hospedeiro seja induzida na planta resistente para ativar a resposta de hipersensibilidade e atuar no processo de reconhecimento do patógeno, impedindo a hiperplasia e hipertrofia de células e o conseqüente desenvolvimento da área de nutrição do nematóide na planta.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, no qual foi comparado o perfil de expressão dos genes regulados nos genótipos resistente (JF 7056) e suscetível (266-S) inoculados com o nematóide *M. javanica*, pode-se concluir que:

- a tecnologia de microarranjos foi eficiente para detectar expressão diferencial de genes nos genótipos de soja resistente e suscetível ao nematóide;
- o perfil da expressão gênica é regulado pela interação patógeno – hospedeiro e diferenciado entre genótipos resistentes e suscetíveis à *M. javanica*;
- um total de 158 genes apresentou expressão induzida e de 50 genes apresentou expressão reprimida no genótipo resistente, distribuídos nas categorias: proteínas relacionadas à interação patógeno-hospedeiro, ao transporte de membrana, a transcrição e tradução, proteínas sem função conhecida e sem homologia;
- um total de 76 genes apresentou expressão induzida e de 27 genes apresentou expressão reprimida no genótipo suscetível, distribuídos nas categorias: metabolismo de hormônios, metabólitos secundários, parede celular e metabolismo de RNA.

- A expressão induzida nas plantas resistentes inoculadas está relacionada com genes que atuam na defesa do hospedeiro contra o patógeno, entre eles o gene de resistência a nematóides Hs1pro-1, e de PR proteínas. A expressão induzida nas plantas suscetíveis inoculadas refere-se a genes relacionados a produção dos hormônios auxina, etileno e giberelina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.D.; KELLEY, J.M.; GOCAYNE, J.D.; DUBNICK, M.; POLYMERPOULOS, M.H.; XIAO, H.; MERRIL, C.R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R.F. Complementary DNA sequencing expressed sequence tags and human genome Project. **Science**, v. 252, p. 1651-1656, 1991.
- ALCANTARA, V.S.B.; MIRANDA, M.A.C.; LORDELLO, R.R.A. Experimento de resistência de cinco cultivares de soja a *Meloidogyne incognita*. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, 4., Mossoró, 1980. **Trabalhos apresentados**. Mossoró: SBN, 1980, p.171-176.
- ALONI, R. The induction of vascular tissues by auxin and cytokinin. 2 ed. In: Davies, P.J. Kluwer, Dordrecht Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands: 1995. p.531-546.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

- ANTONIO, H.; DALL'AGNOL, A. Avaliação de resistência a *Meloidogyne arenaria* nas cultivares de soja recomendadas no Brasil em 1980. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, 6., Piracicaba, 1982. **Trabalhos Apresentados**. Piracicaba: SBN, 1982. p.33-41.
- BARTEL, B. Annual review of plant physiology. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 51, 1994.
- BASSET, D.E.; EISEN, M.B.; BOGUSKI, M.S. Gene expression informatics-it's all in your mine. **Nature Genetics Supplement**, v. 21, p. 51-55, 1999.
- BEDNAR, R.A; HADCOCK, J.R. Purification and characterisation of chalcone isomerase from soybeans. **Journal Biological Chemistry**, v. 263, p. 9582-9588, 1988.
- BIRD, D.M. Manipulation of host gene expression by root-knot nematodes. **Journal of Parasitology**, v. 82, p. 881-888, 1996.
- BIRD, D.M.; OPPERMAN, C.H.; JONES, S.J.M.; BAILLIE, D.L. The *Caenorhabditis elegans* genome: a guide in the post genomics age. **Annual Review Phytopathology**, v. 37, p. 247-265, 1999.
- BIRREN, B. Genome analysis: a laboratory manual. **Detecting Genes**, v. 2, p. 49-58, 1997.

- BLADENVOORDE, M.F.J.; BRAND, H.S.; HENSKENS, Y.M.C.; VEERMAN, E.C.I.; AMERONGEN, A.V.N. Protease inhibitors in health and disease control – Medical and industrial aspects. In: Michaud, D. (Ed). **Recombinant protease inhibitors in plants**. Landes Bioscience, Georgetown, TX, 2000.
- BLATTNER, F.R.; PLUNKETT I.G.; BLOCH, C.A.; PERNA, N.T. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, p.1453-1462, 1997.
- BOER, J.M.; MCDERMOTT, J.P.; WANG, X.; MAIER, T.; QUI, F.; HUSSEY, R.S.; DAVIS, E.L.; BAUM, T.J. The use of DNA microarrays for the developmental expression analysis of cDNAs from the oesophageal gland cell region of *Heterodera glycines*. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, n. 4, p. 261-270, 2002.
- BOERMA, H.R.; HUSSEY, R.S. Breeding plants for resistance to nematodes. **Journal of Nematology**, v. 24, p 242-252, 1992.
- BORNER, G.H.H; SHERRIER, D.J.; STEVENS, T.J.; ARKIN, I.T.; DUPREE, P. Prediction of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis. A genomic analysis. **Plant Physiology**, v. 129, p. 486-499, 2002.
- BRAGA M.R.; DIETRICH, S.M.C. Defesas químicas de plantas: fitoalexinas. **Acta Botânica Brasileira**, v. 1, p. 3-16, 1987.
- CAI, D.; KLEINE, M.; KILFE, S.; et al. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. **Science**, v. 275, p. 832-834, 1997.

- CAMPOS, N.; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; SAURET-GUETO, S.; GALLEG0, F.; LOIS, L.M.; BORONAT, A. *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevaltonate: a novel system for the genetic analysis of the 2-C-methyk-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. **Biochemical Journal**, v. 353, p. 59-67, 2001.
- CAMPOS, R.G.; ACOSTA, J.A.T.; ARIAS, L.J.S.; LIM, M.A.G. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 1223-1226, 1999.
- CHANG, C.C.; HADWIGER, L.A. Cloning and characterization of a disease resistance response gene in pea inducible by *Fusarium solani*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 3, p. 78-85, 1990.
- CHET, I. **Biotechnology in plant disease control**. New York: Wiley-Liss. 1993. p...
- CLARK, C.A.; MOYER, J.W. **Compedium of sweetpotato disease**. USA: The American Phytopathological Society, Minnesota 1988.
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) Indicadores da Agropecuária, Brasília, 2004. www.conab.gov.br. (out. 2004).
- CONSTABLE, C.P; BRISSON, N. The defense-related STH-2 gene product of potato shows race-specific accumulation after inoculation with low concentrations of *Phytophthora infestans* zoospores. **Planta**, v. 188, p. 289-295, 1992.

COVOLO, G. Contribuição ao estudo de susceptibilidade de algumas variedades de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] ao nematóide *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. Santa Maria, 1975. 31p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria.

CUMMINGS, C.A; RELMAN, D.A. Using DNA Microarrays to study Host-Microbe interactions. **Genomics**, v. 6, p. 513-525, 2000.

DAVIES, P.J. The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: **Plant Hormones- Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. 2. ed., Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic, 1995. p. 1-12.

DeRISI, J.L.; IYER, V.R.; BROWN, P.O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. **Science**, v. 278, p.680-694, 1997.

DEYHOLOS, M.K.; GALBRAITH, D.W. High-Density DNA microarrays for gene expression analysis. **Cytometry**, v. 43, p. 229-238, 2001.

DIAS NETO, E.; GARCIA, C.R.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; BRIONES, M.R. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. **Proceedings of the National Academic of Science**, v. 97, p. 3491-3496, 2000.

DIEHL, F.; BECKMANN, B.; KELLNER, N.; HAUSER, N.C., DIEHL, S.; HOHEISEL, J.D. Manufacturing DNA microarrays from unpurified PCR products. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 16, p. 2-6, 2002.

DIEHN, M.; RELMAN, D.A. Comparing functional genomic datasets: lessons from DNA microarray analyses of host-pathogen interactions. **Current Opinion in Microbiology**. v. 4, p. 95-101, 2001.

DIXON, R.A. The phytoalexin response: elicitation, signaling and the control of host gene expression. **Botanical Review**, v.61, p. 239-291, 1986.

DIXON, R.A.; HARRISON, M.J. Activation, structure and organization of genes involved in microbial defense in plants. **Advanced Genetics**, v. 28, p. 165-234, 1990.

EINSENBACK, J.D.; HIRSCHMANN, H., SASSER, J.N., TRIANTAPHYLLOU, A.C. **A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne species*) with a pictorial key**. Raleigh: NC, USA, North Carolina State University graphics, 1981. 45 p.

FAVERY, B.; LECOMTE, P.; GIL, N.; BECHTOLD, N.; BOUCHEZ, D. *Rpe*, a plant gene involved in early developmental steps of nematode feeding cells. **EMBO Journal**, v. 17, p. 6799-6811, 1998.

FRAZER, C.M.; GOCAYNE, J.D.; WHITE, O.; ADAMS, M.D.; CLAYTON, R.A.; FLEISCHMANN, R.D.; BULT, C.J.; KERLAVAGE, A.R.; SUTTON, G.; KELLEY, J.M. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. **Science**, v. 270, p. 397-403, 1995.

FEYS, J.F.; PARKER, J.E. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. **Trends Genetic**, v. 16, p. 449-445, 2000.

- FENOLL, C.; GRUNDLER, F.M.W.; OHL, S.A. **Celullar and Molecular aspects of Plant-Nematode Interactions** Dordrecht, The Netherlands, Kluwer, 1997.
- FERRAZ, L.C.C.B. As meloidoginoses da soja, passado, presente e futuro. In: SILVA, J.F.V.; MAZAFFERA, P.; CARNEIRO, R.G.; ASMUS, G.L., FERRAZ, L.C.C.B. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja, Sociedade de Nematologia, 2001. 127p.
- FERRAZ, L.C.C.B.; MONTEIRO, A.R. Nematóides. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, cap. 8. 1995. 919p.
- FERRAZ, S. Reação de algumas variedades de soja a *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, 3., Mossoró, 1978. **Trabalhos Apresentados**. Mossoró: SBN, 1978. p. 93-94.
- FLEISCHMANN, R.D.; ADAMS, M.D.; WHITE, O.; CLAYTON, R.A.; KIRKNESS, E.F.; KERLAVAGE, A.R.; BULT, C.J.; TOMB, J.F.; DOUGHERTY, B.A.; MERRICK, J.M. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, v. 28, n. 269, p. 496-512. 1995.
- FREEMAN, W.M.; ROBERTSON, D.J.; VRANA, K.E. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. **Biotechniques**, v. 29, p. 1042-1055, 2000.

GHEYSEN, G.; ALMEIDA, D.; ENGLER, J.; VAN MONTAGU, M. Cell cycle regulation in nematode feeding sites. In: FENOLL, C.; GRUNDLER, F. M.W.; OHL, S.A. **Cellular and Molecular aspects of Plant-Nematode Interactions**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer, 1997.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B.G.; BUSSEY, H. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, p. 546-567, 1996.

GONG, D.; GUO, Y.; JAGENDORF, A.T.; ZHU, J.K. Biochemical characterization of the Arabidopsis protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance. **Plant Physiology**, v. 130, p. 256-264. 2002.

GOOD, J.M. Nematodes. In: CALDWELL, B.E. (Ed.). Soybeans: improved, production and uses. Winconsin: American Society of Agronomy, (Agronomy, 16),p.527-543, 1973.

GOUVEIA, L.; SILVA, J.F.V. Reação de cultivares de soja recomendadas para a região dos cerrados brasileiros frente a *Meloidogyne javanica*. In: Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, **Trabalhos apresentados**, Uberlândia, 1996.

GREENE, E.A.; ERARD, M.; DEDIEU, A.; BARKER, D.G. MtENOD16 and 20 are members of a family of phytocyanin-related early nodulins. **Plant Molecular Biology**, v. 36, p. 775-783, 1998.

- GRUMBERG-MANAGO, M. Regulation of the expression of aminoacyl-tRNA synthetases e translation factor, p. 1432-1457. In: NEIDHARDT, F.D.; CURTISS R.; INGRAHAN, 1996.
- GU, Y.Q.; YANG, C.; THARA, V.K.; ZHOU, J.; MARTIN, G.B. *Pti4* is induced by ethylene and salicylic acid, and its products is phosphorylated by the Pto kinase. **Plant Cell**, v. 12, p. 771-785, 2000.
- GUIGO, R. Computational gene identification: an open problem. **Computers Chemistry**, v. 21, p. 215-222, 1997.
- GUTIERREZ-CAMPOS, R.; TORRES-ACOSTA, J.A.; SAUCEDO-ARIAS, L. J.; GOMEZ-LIM, M.A. The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 1223-1226, 1999.
- HAGIHARA, T.; HASHI, M.; TAKEUSHI, Y. Cloning of soybean genes induced during hypersensitive cell death caused by syringolidae elicitor. **Planta**. v. 218, p. 606-614. 2004.
- HALL, N.L.W. et al. The application of DNA microarrays in gene expression analysis. **Journal of Biotechnology**, v. 78, p. 271-280, 2000.
- HEDDEN, P.; KAMIYA, Y. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 431-460, 1997.

- HEGDE, P. et al. A concise guide to cDNA microarray analysis. **Biotechniques**, v. 29, p. 548-562, 2000.
- HERMAN, E.M.; MELROY, D.L.; BUCKHOUT, T.J. Apparent processing of a soybean oil body membrane protein accompanies the onset of oil mobilization. **Plant Physiology**, v. 94, p. 341-349, 1990.
- HERMSMEIER, D.; HART, J.K.; BYZOVA, M.; RODERMEL, S.R.; BAUM, T.J. Changes in mRNA abundance within *Heterodera schachtii*-infected roots of *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant - Microbe Interaction**, v.13, p.390-415, 2000.
- HOOLEY, R. Gibberellins: perception, transduction and responses. **Plant Molecular Biology**, v. 26, p. 1529-1555, 1994.
- HUANG, C.S. Formation, anatomy, and physiology of giant cells induced by root-knot nematodes. In: SASSER, J.N.; CARTER, C. (Ed.) **An advanced treatise on Meloidogyne. Vol. 1: Biology and control**. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. p. 155-164.
- HUSSEY, R.S. Host-parasite relationships and associated physiological changes. In: SASSER, J.N.; CARTER, C. (Ed) **An advanced treatise on Meloidogyne. Vol. 1: Biology and control**. Raleigh: North Caroline State University Graphics, USA, 1985. 422p.
- ITURRIAGA, E.A.; LEECH, M.J.; BARRATT, D.H.P.; WANG, T.L. Two ABA-responsive proteins from pea (*Pisum sativum* L) are closely related to intracellular pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 24, p. 235-240, 1994.

- JANSSEN, G.J.W; SCHOLTEN, O.F.; VAN NOREL, A.; HOOGENDORN, C.J.
Selection of virulence in *Meloidogyne chitwoodi* to resistance in the wild potato *Solanum fendleri*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, p. 645-651, 1998.
- JOHNSON, L.N.; NOBLE, M.E.; OWEN, D.J. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. **Cell**, v. 85, 149-158, 1996.
- KAPLAN, D.T.; DAVIS, E.L. Mechanisms of plant incompatibility with nematodes. In: **Vistas on Nematology**. VEECH, J.A.; DICKSON, D.W. (Ed). Hyattsville: M. D. Soc. Nematology, 1987. p. 267-276.
- KAPLAN, D.T.; KEEN, N.T.; THOMASON, I.J. Studies on the mode of action of glyceollin in soybean incompatibility to the root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Physiology Plant Pathology**, v. 16, p. 319-325, 1980.
- KAPLAN, D.T.; THOMASON, I.J.; VAN GUNDY, S.D. Histological study of the compatible and incompatible interaction of soybeans and *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, v.11, n. 2, p 338-343, 1979.
- KARLSSON, M.; OLSON, A.; STENLID, J. Expressed sequences from the basidiomycetous tree pathogen *Heterobasidion annosum* during early infection of scots pine. **Fungal Genetic Biology**, v. 39, p. 51-59, 2003.

- KINLOCH, R.A. Screening for resistance to root-knot nematodes. In: **Methods for evaluating plant species for resistance to plant-parasitic nematodes**. STARR, J.L., Maryland: Society of Nematologists, 1990. p.16-23.
- KINOSHITA, T.; INOUE, N. Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis. **Current Opinion Chemical Biology**, v. 4, p. 632-638, 2000.
- KOUL, A.; CHOIDAS, A.; TYAGI, A.K.; DRLICA, K.; SINGH, Y.; ULRICH, A. Serine/threonine protein kinases PknF and PKnG of *Mycobacterium tuberculosis* characterization and localization. **Microbiology**, v. 147, p. 2307-2314, 2001.
- LASHKARI, D.A.; DeRISI, J.L.; MCCUSKER, J.H.; NAMATH, A.F.; GENTILE, C.; HWANG, S.Y.; BROWN, P.O.; DAVIS, R.W. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. **Proceedings of the National Academic of Science**, v. 94, n. 24, p. 13057-13062, 1997.
- LIU, G.Z.; PI, L.Y.; WALKERS, J.C.; RONALD, P.C.; SONG, W.Y. Biochemical characterization of the kinase domain of the rice disease resistance receptor-like kinase XA21. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 23, p. 20264-20269, 2002.
- LOCKHART, D.J.; WINZELER, E.A. Genomics, gene expression and DNA arrays. **Nature**, v. 405, p. 827-836, 2000.

LOCKHART, D.J.; DONG, H.; BYRNE, M.C.; FOLLETTIE, M.T.; GALLO, M.V.; CHEE, M.S.; MITTMANN, M.; WANG, C.; KOBAYASHI, M.; HORTON, H.; BROWN, E. L. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 1675-1680, 1996.

McCARNEY, R.R.; SCHMIDT, M.C. Regulation of Snf1 kinase: activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. **Journal Biology Chemistry**, v. 276, p. 36460-36466, 2001.

MALECK, K.; LEVINE, A.; EULGEM, T.; MORGAN, A.; SCHMID, J.; LAWTON, K.A.; DANGL, J.L.; DIETRICH, R.A. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. **Nature Genetic**, v. 26, p. 403-410, 2000.

MAGUIRE, T.L.; GRIMMOND, S.; FORREST, A.; ITURBE-ORMAETXE, I.; MEKSEM, K.; GRESSHOFF, P.M. cDNA microarray analysis of soybean (*Glycine max*): tissue-specific gene expression. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, p.1361-1374, 2002.

MARQUES, J. O. Etiquetas de seqüências expressas (ESTs) de cana de açúcar diferentemente expressos em folha e colmo maduros. Jaboticabal, 2003. 98 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista de Jaboticabal.

MARSHALL, A.E; HODGSON, J. DNA chips: an array of possibilities. **Nature Biotechnology**, v.16, p. 27-31, 1998.

MARTINI, A.M.; SILVA, J.F.V. Avaliação da resistência de genótipos de soja frente a *Meloidogyne javanica*. In: Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 28., Uberlândia, 1996. **Trabalhos apresentados.**

MATTON, D.P.; PRESCOTT, G.; BERTRAND, C.; CAMIRAND, A.; BRISSON, N. Identification of cis-acting elements involved in the regulation of the pathogenesis-related gene STH-2 in potato. **Plant Molecular Biology**, v. 22 n. 2, p. 279-291, 1993.

MAXAM, A.M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academic of Science**, v. 74, p. 560-564, 1977.

MAZAREI, M.; PUTHOFF, D.P.; HART, J.K.; RODERMEL, S.R.; BAUM, T.J. Ethylene-Responsive Element Binding Protein gene whose mRNA expression changes during soybean cyst nematode infection. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 15, p. 577-586, 2002.

MONTEIRO, A. R.; FERRAZ, L. C. C. B.; INOMOTO, M. M. **Curso de Nematologia Agrícola**. Departamento de Fitopatologia, Entomologia e Zoologia Agrícola.. Piracicaba; ESALQ/USP, 2001. 150p.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger- Princípios de bioquímica. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.

- NEPOMUCENO, A.L.; OOSTERHUIS, D.; STEWART, J.M. TURLEY, R.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J.R.B. Expression of heat shock protein and trehalose-6-phosphate synthase homologues induced during water deficit in cotton. **Brasilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, n. 1, p. 11-20, 2002.
- OBREGÓN P.; MARTIN, R.; SANZ, A.; CASTRESANA, C. Activation of defence-related genes during senescence: a correlation between gene expression and cellular damage. **Plant Molecular Biology**, v. 46, p. 67-77, 2001.
- OPPERMAN, C.H.; TAYLOR, C.G.; CONKLIKG, M.A. Root-knot nematode directed expression of a plant root-specific gene. **Science**, v. 263, p. 221-223, 1994.
- OSTERMAN, A.; OVERBEEK, R. Missing genes in metabolic pathways: a comparative genomics approach. **Current opinion**, v. 7, p. 238-251, 2003.
- PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: Arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed). **Manual de Fitopatologia**. 1995, p. 354.
- PELICICE F.M.; DIETRICH, S.M.C.; BRAGA, M.R. Phytoalexin response of fifteen Brazilian soybean cultivars. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 45-53, 2000.
- PERRIMON, N. Hedgehog and beyond. **Cell**, v. 80, p. 517-520, 1995.

- PERRY, R. N.; JONES, J.T. The use of molecular biology techniques in plant nematology: past, present and future. **Russian Journal of Nematology**, v. 6, n. 1, p. 47-56, 1998.
- PRICE, J.N.; RIETER, W.D.; RALKHEL, N. Molecular genetics of Non-processive glycosyltransferase. **The Arabidopsis Book**. American Society of Plant Biologist. 2002. p. 1-9.
- 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. **The Plant Journal**, v. 33, p. 911-921, 2003.
- QUIRINO, B.F.; NOH, Y.S.; HIMELBLAU, E.; AMASINO, R.M. Molecular aspects of leaf senescence. **Trends Plant Science**, v. 5, p. 278-282, 2000.
- RAMSAY, G. DNA chips: state-of-the art. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 40-44, 1998.
- RATHJEN, J.P.; CHANG, J.H.; STASKAWICZ, B.S.; MICHELMORE, R.W. Constitutively Active *Pto* Induces a *Prf*-dependent Hypersensitive Response in the Absence of *avrPto*. **EMBO Journal**, v. 18, p. 3232-3240, 1999.
- RASTLAN, S.E; BEELEY, L.J. Functional genomics: going forward from the databases. **Genome and Evolution**, v. 7, p.777-783, 1997.

- RAVEN, J.A. Transport of indoleacetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. **New Phytology**, v. 75, p. 163-172, 1975.
- REYMOND, P. DNA microarrays and plant defense. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 39, p. 313-321, 2001.
- RICHMOND, C.S. Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 3821-3835, 1999.
- ROBERTS, P.A. Resistance to nematodes. Definitions, concepts and consequences. In: STARR, J. L. **Methods for evaluating plant species for resistance to plant-parasitic nematodes.**, Maryland: Society of Nematologists, 1990. p.1-15.
- ROBERTS, P.A. Current status of the availability, development and use of host plant resistance to nematodes. **Journal of Nematology**, v. 24, p. 213-227, 1992.
- ROBERTS, P.A.; MATTHEWS, C.; VEREMIS, J.C. Genetic mechanisms of host-plant resistance to nematodes. In: **Plant and nematode interactions.** BARKER, K.R.; PEDERSON, G.A.; WINDHAM, G.L. Madison: American Society of Agronomy, 1998. p.209-238.
- ROSE, A.; MEIER, I.; WIENAND, U. The tomato I-box binding factor LeMybI is a member of a novel class of Myb-like proteins. **The Plant Journal**, v. 20, p. 641-652, 1999.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual.** 2 ed. New York: Cold Spring Harbor. 1989. 756 p.

SASSER, J.N. **Plant-parasitic nematodes: the farmer's hidden enemy.** Raleigh: North Carolina State University, 1989. 115p.

SASSER, J.N.; CARTER, C.C. Overview of the international *Meloidogyne* project 1975-1984. In: SASSER, J.N.; CARTER, C. (Ed.) **An advanced treatise on Meloidogyne.** Vol 1: biology and control. Raleigh, NC, USA: North Carolina State University Graphics, 1985. 422p.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W.; BROWN, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v. 270, p. 467-470, 1995.

SCHENA, M., SHALON, D., HELLER, R., CHAI, A., BROWN, P.O.; DAVIS R.W. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. **Proceedings of the National Academic of Science**, v. 93, p.10614-10619, 1996.

SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; WILSON, I., ANDERSON, J.P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S.C.; MANNERS, J.M. Co-ordinated plant defense response in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academic of Science**, v. 97, p. 11655-11660, 2000.

SCHMITT, D.P.; NOEL, G.R. Nematodes parasites of soybean. In: NICKLE, W.R. **Plant and insect nematodes.** New York, Marcel Dekker, 1984, p.13-59.

SESSA, G.; D'ASCENZO, M.; MARTIN, G.B. Thr-38 and Ser-198 are *Pto* autophosphorylation sites required for the *AvrPto-Pto* mediated hypersensitive response. **EMBO Journal**, v. 19, p. 2257-2269, 2000.

SHALON, D.; SMITH, S.J.; BROWN, P.O.A. DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. **Genome Research**, v. 6, p. 639-645, 1996.

SEKI, H.; NAGASUGI, Y.; SHIRAISHI, T.; YAMADA, T. Changes in vivo DNA-protein interactions in pea phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase gene promoter induced by fungal signal molecules. **Plant Cell Physiology**, v. 40, p. 88-95, 1999.

SILVA, J.F.V. Problemas fitossanitários da soja no Brasil, com ênfase em nematóides. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 21., Maringá, 1998. **Anais**. Maringá: UEM, 1998. p.16-20.

SILVA, J.F.V. Genética quantitativa associada ao uso de marcadores moleculares para seleção de genótipos de soja com resistência a *Meloidogyne javanica*. Piracicaba, 2001a. 73 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

SILVA, J.F.V. Resistência genética da soja a nematóides do gênero *Meloidogyne*. In: SILVA, J.F.V.; MAZAFFERA, P.; CARNEIRO, R.G.; ASMUS, G.L.; FERRAZ, L.C.C.B. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja. Sociedade de Nematologia, 2001b. 127p.

SILVA, J.G.; LORDELLO, L.G.E.; MIYASAKA, S. Observações sobre a resistência de algumas variedades de soja ao nematóide das galhas. **Bragantia**, v. 12 , p. 59-63, 1952.

SIMPSON, A. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v. 406, p. 151-157, 2000.

SPIRO, A.; LOWE, M.; BROWN, D. A bead-based methods for multiplexed identification and quantification of DNA sequences using flow cytometry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4258-4265, 2000.

STARR, J. L. **Methods for evaluating plant species for resistance to plant-parasitic nematodes**. Hyattsville, MD: Society of Nematologists, 1990. 85p.

STAUDT, L.M.; BROWN, P.O. Genomic views of the immune system. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 829-859, 2000.

STERKY, F.; LUNDEBERG, J. Sequence analysis of genes and genomes. **Journal of Biotechnology**, v .76, p. 1-31, 2000.

STRAUSS, E.; FALKOW, S. Microbial pathogenesis: genomics and beyond. **Science**,v. 276, p. 707-712, 1997.

TANG, X.; FREDERICK, R.; HALTERMAN, D.; ZHOU, J.; MARTIN, G.B. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of *AvrPto* with *Pto* kinase. **Science**, v. 274, p. 2060-2063, 1996.

TIHOHOD, D.; FERRAZ, S. Comportamento de cultivares e linhagens de soja frente a uma população de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 9, p.13-14, 1985. (Resumo).

TRAVENTSOLO, R.F. Análise da expressão gênica da bactéria *Xylella fastidiosa* por microarranjos de DNA. Jaboticabal, 2004. 117 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista de Jaboticabal.

TRANTAPHYLLOU, A.C. Genetics of nematode parasitism of plants. In: **Vistas on Nematology**. VEECH, J.A.; DICKSON, D.W. Hyattsville, M. D. Soc. Nematology, 1987. p. 354-363.

TRANTAPHYLLOU, A.C. Cytogenesis, cytotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. In: SASSER, J.N.; CARTER, C. (Ed.) **An advanced treatise on Meloidogyne**. Raleigh, NC, USA: North Carolina State University Graphics, 1985. p. 113-126.

TUSHER, V.; TIBSHIRANI, R.; CHU, G. Significance analysis of microarrays applied to transcriptional responses to ionizing radiation. **Proceedings of the National Academic of Science**, v. 98, p. 5116-5121, 2001.

- UDENFRIEND, S.; KODUKULA. K. How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 563-591, 1995.
- VEECH, J.A.; ENDO, B.Y. Comparative morphology and enzyme histochemistry of root - knot resistant and susceptible soybean. **Phytopathology**, v. 60, p.896-902, 1970.
- VIDYA, C.S.S.; MANOHARAN, M.; SITA, L.G. Cloning and characterization of salicylic acid-induced, intracellular pathogenesis-related gene from tomato (*Lycopersicum esculentum*). **Journal of Biosciences**, v. 24, n. 3, p. 287-293, 1999.
- WARNER, S.A.J.; SCOTT, R.; DRAPER, J. Characterization of a wound-induced transcript from the monocot asparagus that shares similarity with a class of intracellular pathogenesis-related (PR) proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 19, p. 555-561, 1992.
- WANG, W.; DONG, L.; SAVILLE, B.; SAFE, S. Transcriptional activation of E2F1 gene expression by 17beta-estradiol in MCF-7 cells is regulated by NF-Y-Sp1/estrogen receptor interactions. **Molecular Endocrinology**, v. 13, p. 1373-1387, 1999.
- WALLRAFF, G. LABADIE, J.; BROCK, P.; DIPIETRO, R. et al. DNA sequencing on a chip. **Chemtechnology**, v. 12, p. 22-32, 1997.
- WEI, Y. Hight-density microarray mediated gene expression profiling of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 2, p. 545-556, 2001.

- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p 6531-6535, 1990.
- WODICKA, L.; DONG, H.; MITTMANN, M.; HO, M.H.; LOCKHART, D.J. Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature Biotechnology**, v. 15, p.1359-1367, 1997.
- YANG, Y.H. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p 2-10, 2002.
- YAHYAOU, F.E.; KÜSTER, H.; AMOR, B.B.; HOHNJE, N.; PÜHLER, A.; BECKER, A.; GOUZY, J.; VERNIE, T.; GOUGH, C.; NIEBEL, A.; GODIARD, L.; GAMAS, P. Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program. **Plant Physiology**, v. 136, p. 3159-3176, 2004.
- YOSHIZAKI, M.; FURUMOTO, T.; HATA, S.; SHINOZAKU, M.; IZUI, K. Characterization of a novel gene encoding a phytocyanin-related protein in morning glory (*Pharbitis nil*). **Biochemical and biophysical research communications**, v. 268, p. 466-470, 2000.
- YOUNG, L.D. Breeding for nematode resistance and tolerance. In: BARKER, K.R.; PEDERSON, G.A.; WINDHAM, G.L. **Plant and nematode interactions**. Madison: American Society of Agronomy, 1998. p.197-208.

ZHENG, M. DNA microarray mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 4562-4570, 2001.

ZHU-SALZMAN, K.; SALZMAN, R.A; AHN, J.E; KOIWA, H. Transcriptional regulation of *Sorghum* defense determinants against a phloem-feeding aphid. **Plant Physiology**, v. 134, p. 420-431, 2004.

APÊNDICE

Resultado da comparação de seqüências depositadas em Banco de Dados utilizando a ferramenta BLAST (Laboratório de Biotecnologia, Embrapa Soja - www.cnpso.embrapa.br/bioinformática).

	BLAST	Score	E-Value
BRSOGMMJ1001A01.b			
BRSOGMMJ1001A03.b	gb AAO41981.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	68.2	3e-011
BRSOGMMJ1001A06.b	ref NP_196993.1 putative protein; protein id: At5g14890.1 [Arabidopsis thaliana]	66.6	1e-010
BRSOGMMJ1001B05.b			
BRSOGMMJ1001B06.b	dbj BAB90499.1 putative 60S ribosomal protein L18A [Oryza sativa (japonica	78.6	1e-016
BRSOGMMJ1001C05.b	emb CAC59823.1 Xaa-Pro aminopeptidase 1 [Lycopersicon esculentum]	57.0	1e-014
BRSOGMMJ1001D01.b	gb AAL98709.1 AF279267_1 4-coumarate:coenzyme A ligase [Glycine max]	162	2e-039
BRSOGMMJ1001D05.b			
BRSOGMMJ1001F03.b	prf I101277A histone H4	74.7	3e-013
BRSOGMMJ1001F04.b	pir JQ2128 metallothionein - soybean	85.9	1e-016
BRSOGMMJ1001G01.b			
BRSOGMMJ1001H05.b			
BRSOGMMJ1003A01.b			
BRSOGMMJ1003A02.b	dbj BAB08742.1 nucleotide-binding protein [Arabidopsis thaliana]	266	1e-070
BRSOGMMJ1003A03.b	gb AAB88617.1 ubiquitin conjugating enzyme [Zea mays]	176	8e-044
BRSOGMMJ1003A08.b	emb CAC39044.1 uclacyanin 3-like protein [Oryza sativa]	123	2e-027
BRSOGMMJ1003A10.b	dbj BAC43661.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	111	2e-024
BRSOGMMJ1003B04.b			
BRSOGMMJ1003B05.b	ref NP_568391.1 cytochrome-b5 reductase - like protein; protein id: At5g20080.1,	95.1	4e-019
BRSOGMMJ1003B09.b	ref NP_198135.1 putative protein; protein id: At5g27830.1, supported by cDNA:	79.7	8e-015
BRSOGMMJ1003B11.b			
BRSOGMMJ1003C02.b	gb AAG44839.1 AF280812_1 putative Hs1 pro-1-like receptor [Glycine max]	110	4e-024
BRSOGMMJ1003C03.b	ref NP_187300.2 putative pyruvate dehydrogenase kinase; protein id: At3g06483.1	202	2e-051
BRSOGMMJ1003C06.b			
BRSOGMMJ1003D01.b	ref NP_182078.1 unknown protein; protein id: At2g45540.1 [Arabidopsis thaliana]	133	5e-031
BRSOGMMJ1003D06.b	pir T14735 probable serine/threonine kinase (EC 2.7.1.-) SNFL1 - sorghum	131	2e-030
BRSOGMMJ1003D10.b	gb AAM22748.1 polyubiquitin 2 [Deschampsia antarctica]	125	2e-028
BRSOGMMJ1003E08.b	gb AAO34706.1 ethylene response factor 4 [Lycopersicon esculentum]	100	2e-020
BRSOGMMJ1003E09.b			
BRSOGMMJ1003E11.b			
BRSOGMMJ1003F04.b			
BRSOGMMJ1003F05.b			
BRSOGMMJ1003F09.b	pir B85045 probable calcium channel [imported] - Arabidopsis thaliana	55.1	4e-007
BRSOGMMJ1003F11.b	ref NP_563974.1 expressed protein; protein id: At1g15390.1, supported by cDNA:	82.0	4e-015
BRSOGMMJ1003G02.b	gb AAM18135.1 AF498359_1 small G-protein ROP9 [Medicago truncatula]	224	6e-058
BRSOGMMJ1003G04.b	emb CAC10208.1 cytosolic malate dehydrogenase [Cicer arietinum]	85.5	2e-016

BRSOGMMJ1003G10.b			
BRSOGMMJ1003H04.b	sp P43309 PPO_MALDO Polyphenol oxidase, chloroplast precursor (PPO) (Catechol oxidase)	107	3e-023
BRSOGMMJ1003H07.b	pir T09251 embryonic abundant protein EMB24 - white spruce	63.2	3e-009
BRSOGMMJ1003H08.b	pir S18612 lipoxygenase (EC 1.13.11.12) - soybean (fragment)	273	9e-073
BRSOGMMJ1003H12.b			
BRSOGMMJ1004A07.b	ref NP_175330.1 unknown protein; protein id: At1g49000.1 [Arabidopsis thaliana]	87.8	1e-016
BRSOGMMJ1004A08.b	emb CAB65284.1 putative wound-induced protein [Medicago sativa subsp. x varia]	136	2e-031
BRSOGMMJ1004A10.b	dbj BAB63604.1 P0403C05.26 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	109	3e-023
BRSOGMMJ1004B04.b	emb CAA63107.1 ribosomal protein L23 [Spinacia oleracea]	221	5e-057
BRSOGMMJ1004B09.b	pir S56647 trypsin inhibitor precursor (clone ATI18) - alfalfa	184	6e-046
BRSOGMMJ1004B10.b	sp P21820 TPIS_COPJA Triosephosphate isomerase, cytosolic (TIM)	159	1e-058
BRSOGMMJ1004C03.b	pir A96608 hypothetical protein F25P12.93 [imported] - Arabidopsis thaliana	226	2e-058
BRSOGMMJ1004D02.b	ref NP_192819.1 putative protein; protein id: At4g10810.1, supported by cDNA:	48.9	4e-005
BRSOGMMJ1004D04.b	ref NP_187074.1 putative O-linked GlcNAc transferase; protein id: At3g04240.1,	349	2e-095
BRSOGMMJ1004E02.b	pir T31428 fiber annexin - upland cotton	252	2e-066
BRSOGMMJ1004E04.b	ref NP_182061.1 hypothetical protein; protein id: At2g45360.1 [Arabidopsis	50.8	4e-006
BRSOGMMJ1004E10.b	dbj BAB86891.1 syringolide-induced protein 14-1-1 [Glycine max]	67.4	5e-011
BRSOGMMJ1004E11.b	gb AAL09920.1 ferritin [Glycine max]	150	9e-036
BRSOGMMJ1004E12.b	ref NP_190146.1 putative protein; protein id: At3g45600.1, supported by cDNA:	272	2e-072
BRSOGMMJ1004F08.b			
BRSOGMMJ1004G03.b	dbj BAC42701.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	331	3e-090
BRSOGMMJ1004G05.b	gb AAM63041.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	183	1e-045
BRSOGMMJ1004G06.b	gb AAO12854.1 thioredoxin h [Pisum sativum]	182	3e-045
BRSOGMMJ1004G08.b	ref NP_173230.1 transcription factor, putative; protein id: At1g17880.1, supported	218	4e-056
BRSOGMMJ1004G10.b	gb AAG43558.1 AF211540_1 Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 75 [Nicotiana tabacum]	50.4	2e-005
BRSOGMMJ1004G12.b	gb AAO72533.1 pyruvate decarboxylase 1 [Lotus corniculatus]	404	e-112
BRSOGMMJ1004H03.b	dbj BAC42011.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	329	1e-089
BRSOGMMJ1004H05.b	gb AAF31705.1 AF221856_1 heat-shock protein 80 [Euphorbia esula]	223	1e-069
BRSOGMMJ1004H10.b	sp P13565 CALM_HORVU CALMODULIN	298	5e-080
BRSOGMMJ1005A02.b	emb CAD56504.1 steroid 5-alpha reductase [Cicer arietinum]	315	4e-085
BRSOGMMJ1005A05.b	gb AAM62507.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	129	2e-029
BRSOGMMJ1005A06.b	ref NP_188902.1 20S proteasome beta subunit D (PBD1); protein id: At3g22630.1,	316	2e-085
BRSOGMMJ1005A07.b			
BRSOGMMJ1005B11.b	emb CAD31714.1 fructokinase-like protein [Cicer arietinum]	137	5e-033
BRSOGMMJ1005C01.b	ref NP_187696.1 glyoxalase II (hydroxyacylglutathione hydrolase)(GLX2-2); protein	173	4e-043
BRSOGMMJ1005C06.b	gb AAL36326.1 putative arginine methyltransferase pam1 [Arabidopsis thaliana]	280	2e-074
BRSOGMMJ1005C08.b			
BRSOGMMJ1005D03.b	ref NP_565634.1 expressed protein; protein id: At2g27080.1, supported by cDNA:	121	8e-027

BRSOGMMJ1005D06.b			
BRSOGMMJ1005D08.b	gb AAF23311.1 AC016661_36 putative RNA helicase [Arabidopsis thaliana]	94.0	1e-018
BRSOGMMJ1005D11.b			
BRSOGMMJ1005F01.b	dbj BAC07421.1 P0039H02.8 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	43.9	6e-004
BRSOGMMJ1005G05.b	gb AAB51577.1 germin-like protein [Arabidopsis thaliana]	267	9e-071
BRSOGMMJ1005G06.b	ref NP_568750.1 ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit (ClpD), ERD1 protein	181	2e-045
BRSOGMMJ1005G07.b	gb AAK38843.1 AF346308_1 histidine-containing phosphotransfer protein [Catharanthus roseus]	206	2e-052
BRSOGMMJ1005H02.b	ref NP_564034.1 expressed protein; protein id: At1g17745.1, supported by cDNA:	268	2e-071
BRSOGMMJ1005H04.b	dbj BAA04838.1 ORF [Lilium longiflorum]	235	3e-061
BRSOGMMJ1005H12.b	ref NP_195390.1 putative protein; protein id: At4g36720.1 [Arabidopsis thaliana]	229	2e-059
BRSOGMMJ1006A12.b	ref NP_186875.1 unknown protein; protein id: At3g02260.1 [Arabidopsis thaliana]	114	6e-025
BRSOGMMJ1006B03.b	ref NP_174314.1 elongation factor 1-beta, putative; protein id: At1g30230.1	231	6e-060
BRSOGMMJ1006B06.b	ref NP_201203.1 3(2),5-bisphosphate nucleotidase; protein id: At5g63980.1,	104	2e-055
BRSOGMMJ1006B10.b	ref NP_196554.1 15.9 kDa subunit of RNA polymerase II (gb AAB95261.1); protein id:	255	3e-067
BRSOGMMJ1006C02.b	ref NP_188887.1 prefoldin-like protein; protein id: At3g22480.1, supported by cDNA:	144	1e-033
BRSOGMMJ1006C05.b	ref NP_563916.1 vacuolar ATP synthase subunit C, putative; protein id: At1g12840.1,	208	4e-053
BRSOGMMJ1006D01.b			
BRSOGMMJ1006D10.b	ref NP_200131.1 MtN3 protein-like; protein id: At5g53190.1 [Arabidopsis thaliana]	106	2e-022
BRSOGMMJ1006E04.b	pir T12197 immunophilin - fava bean	220	8e-057
BRSOGMMJ1006E07.b			
BRSOGMMJ1006E10.b	ref NP_195696.1 putative protein; protein id: At4g39860.1, supported by cDNA:	197	1e-049
BRSOGMMJ1006E12.b	sp P29001 INVA_PHAAU ACID BETA-FRUCTOFURANOSIDASE PRECURSOR (ACID SUCROSE-6-PHOSPHATE	323	2e-089
BRSOGMMJ1006F02.b	gb AAL24250.1 At1g19180/T29M8_5 [Arabidopsis thaliana]	97.8	1e-019
BRSOGMMJ1006F03.b	ref NP_195891.1 putative protein; protein id: At5g02710.1, supported by cDNA:	190	1e-047
BRSOGMMJ1006F05.b	sp Q9M4S8 TPIC_FRAAN Triosephosphate isomerase, chloroplast precursor (TIM)	269	2e-071
BRSOGMMJ1006F06.b	gb AAM61038.1 S-ribonuclease binding protein SBP1, putative [Arabidopsis	167	8e-041
BRSOGMMJ1006F07.b	emb CAB09799.1 hypothetical protein [Citrus x paradisi]	327	6e-089
BRSOGMMJ1006F09.b	gb AAM62411.1 AF480489_1 EDS1 [Nicotiana tabacum]	67.4	1e-010
BRSOGMMJ1006F12.b	gb AAM62926.1 cinnamoyl CoA reductase-like protein [Arabidopsis thaliana]	202	2e-051
BRSOGMMJ1006G08.b			
BRSOGMMJ1006H02.b	ref NP_563861.1 expressed protein; protein id: At1g10140.1, supported by cDNA:	92.8	3e-018
BRSOGMMJ1006H04.b			
BRSOGMMJ1006H06.b	ref NP_200657.1 cinnamoyl-CoA reductase - like protein; protein id: At5g58490.1,	255	4e-067
BRSOGMMJ1006H10.b	ref NP_175683.1 putative histone H2A; protein id: At1g52740.1, supported by cDNA:	228	4e-059
BRSOGMMJ1007A01.b			

BRSOGMMJ1007A09.b			
BRSOGMMJ1007B02.b	ref NP_175779.1 hypothetical protein; protein id: Atlg53760.1 [Arabidopsis	246	1e-064
BRSOGMMJ1007B06.b	ref NP_177939.1 unknown protein; protein id: Atlg78150.1 [Arabidopsis thaliana]	135	4e-031
BRSOGMMJ1007B09.b	dbj BAB10647.1 contains similarity to RNA-binding protein~gene_id:MSL3.12	165	3e-040
BRSOGMMJ1007B10.b	pir T07621 hydroxyproline-rich protein - soybean (fragment)	89.7	2e-017
BRSOGMMJ1007B11.b	emb CAC84709.1 aux/IAA protein [Populus tremula x Populus tremuloides]	140	1e-032
BRSOGMMJ1007C02.b	ref NP_683304.1 unknown protein; protein id: Atlg13360.1 [Arabidopsis thaliana]	70.5	1e-011
BRSOGMMJ1007C04.b	gb AAO73433.1 vacuolar membrane ATPase subunit c" [Citrus limon]	284	6e-076
BRSOGMMJ1007C12.b	gb AAM83095.1 AF525402_1 SOS2-like protein kinase [Glycine max]	196	2e-049
BRSOGMMJ1007D10.b	ref NP_564034.1 expressed protein; protein id: Atlg17745.1, supported by cDNA:	296	1e-079
BRSOGMMJ1007D11.b	ref NP_187729.1 putative nucleic acid binding protein; protein id: At3g11200.1,	204	6e-052
BRSOGMMJ1007D12.b	dbj BAB02011.1 contains similarity to signal peptidase (leader	144	7e-034
BRSOGMMJ1007E01.b			
BRSOGMMJ1007E07.b	emb CAA65634.1 PS60 [Nicotiana tabacum]	327	1e-088
BRSOGMMJ1007F06.b	ref NP_566844.1 expressed protein; protein id: At3g29170.1, supported by cDNA:	143	2e-033
BRSOGMMJ1007F07.b	ref NP_179367.2 putative chloroplast nucleoid DNA-binding protein; protein id:	254	8e-067
BRSOGMMJ1007F08.b	ref NP_568867.1 Expressed protein; protein id: At5g57815.1, supported by cDNA:	155	2e-037
BRSOGMMJ1007F10.b			
BRSOGMMJ1007G04.b	gb AAD15628.1 low molecular weight heat-shock protein [Corylus avellana]	124	1e-027
BRSOGMMJ1007G10.b	ref NP_194945.2 putative protein; protein id: At4g32180.1, supported by cDNA:	204	6e-052
BRSOGMMJ1007G11.b	sp O22644 RL2B_FRIAG 60S RIBOSOMAL PROTEIN L23A	238	4e-062
BRSOGMMJ1007G12.b	ref NP_565590.1 expressed protein; protein id: At2g25280.1, supported by cDNA:	271	6e-072
BRSOGMMJ1007H02.b	gb AAM14957.1 hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]	107	8e-023
BRSOGMMJ1007H05.b			
BRSOGMMJ1007H06.b	gb AAF75749.1 AF261139_1 dehydration-induced protein ERD15 [Lycopersicon esculentum]	71.2	7e-012
BRSOGMMJ1008A10.b	gb AAL06485.1 AF411796_1 AT3g62580/T12C14_280 [Arabidopsis thaliana]	228	3e-059
BRSOGMMJ1008A11.b	dbj BAA94511.1 ABC transporter homolog [Populus nigra]	183	2e-050
BRSOGMMJ1008B01.b	ref NP_683304.1 unknown protein; protein id: Atlg13360.1 [Arabidopsis thaliana]	83.6	9e-020
BRSOGMMJ1008B05.b	gb AAF17578.1 AF202184_1 isoflavone reductase homolog 2 [Glycine max]	276	e-102
BRSOGMMJ1008B10.b	emb CAA76145.1 neutral invertase [Daucus carota]	360	6e-099
BRSOGMMJ1008D08.b	gb AAM64668.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	130	1e-029
BRSOGMMJ1008D10.b	ref NP_191871.1 putative protein; protein id: At3g63120.1, supported by cDNA:	50.4	1e-005
BRSOGMMJ1008E02.b			
BRSOGMMJ1008E03.b	pir T05790 hypothetical protein M7J2.60 - Arabidopsis thaliana	226	2e-058
BRSOGMMJ1008E04.b	emb CAA07230.1 putative cytidine deaminase; putative deoxycytidylate deaminase	167	4e-073
BRSOGMMJ1008E11.b	emb CAA04703.1 cytochrome b5 [Olea europaea]	248	6e-065
BRSOGMMJ1008F05.b	gb AAD11431.1 T-complex protein 1 epsilon subunit [Mesembryanthemum crystallinum]	359	2e-098
BRSOGMMJ1008F12.b			
BRSOGMMJ1008H01.b			

BRSOGMMJ1008H08.b	gb AAD34615.1 AF153283_1 putative progesterone-binding protein homolog [Arabidopsis]	223	1e-057
BRSOGMMJ1008H10.b	ref NP_592971.1 hypothetical protein; very low similarity to S. cerevisiae YDR512C;	48.5	6e-005
BRSOGMMJ1009A10.b	ref NP_171929.1 unknown protein; protein id: Atlg04340.1, supported by cDNA:	72.8	2e-012
BRSOGMMJ1009B01.b	gb AAL31695.1 AC092390_16 putative calcineurin B-like protein [Oryza sativa]	211	8e-055
BRSOGMMJ1009B09.b	ref NP_188674.1 translational inhibitor protein, putative; protein id: At3g20390.1,	68.6	4e-011
BRSOGMMJ1009C08.b			
BRSOGMMJ1009D01.b	ref NP_194907.1 methyltransferase - like protein; protein id: At4g31790.1,	166	2e-040
BRSOGMMJ1009D04.b			
BRSOGMMJ1009E01.b	gb AAD01541.1 late-embryogenesis abundant protein [Glycine max]	210	1e-053
BRSOGMMJ1009E05.b	sp P26204 BGLS_TRIRP NON-CYANOGENIC BETA-GLUCOSIDASE PRECURSOR	214	7e-055
BRSOGMMJ1009G06.b	gb AAN31908.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	338	3e-092
BRSOGMMJ1009H04.b	ref NP_175584.1 unknown protein; protein id: Atlg51730.1, supported by cDNA:	202	3e-051
BRSOGMMJ1009H08.b	ref NP_192570.1 nodulin-like protein; protein id: At4g08300.1 [Arabidopsis]	225	2e-058
BRSOGMMJ1009H10.b	sp P40590 RL34_PEA 60S RIBOSOMAL PROTEIN L34	189	2e-047
BRSOGMMJ1010A04.b	pir T09602 probable zinc finger protein SCOF-1, cold-inducible - soybean	271	4e-072
BRSOGMMJ1010A08.b	ref NP_174636.1 transcription factor TINY, putative; protein id: Atlg33760.1	128	7e-029
BRSOGMMJ1010A12.b	ref NP_197312.1 eukaryotic cap-binding protein (gb AAC17220.1); protein id:	215	2e-055
BRSOGMMJ1010B05.b	gb AAG44839.1 AF280812_1 putative Hs1pro-1-like receptor [Glycine max]	276	5e-079
BRSOGMMJ1010B07.b			
BRSOGMMJ1010B09.b	sp Q41228 PSE1_NICSY Photosystem I reaction center subunit IV A, chloroplast precursor	140	1e-032
BRSOGMMJ1010B10.b	gb AAG44839.1 AF280812_1 putative Hs1pro-1-like receptor [Glycine max]	387	e-107
BRSOGMMJ1010C09.b	emb CAA55294.1 epoxide hydrolase [Glycine max]	286	1e-076
BRSOGMMJ1010D01.b			
BRSOGMMJ1010D02.b			
BRSOGMMJ1010D11.b	gb AAG45488.1 phospholipase PLDb2 [Lycopersicon esculentum]	267	7e-071
BRSOGMMJ1010E01.b	gb AAL31888.1 AF419556_1 At2g32080/F22D22.17 [Arabidopsis thaliana]	301	3e-081
BRSOGMMJ1010E03.b	pir T07661 maturation protein PM3 - soybean	294	8e-079
BRSOGMMJ1010E04.b	pir T06794 vacuolar sorting receptor protein BP-80 - garden pea	322	3e-087
BRSOGMMJ1010E09.b	gb AAF86203.1 AF238888_1 putative VrrB [Bacillus cereus]	46.2	4e-004
BRSOGMMJ1010E10.b	pir T07051 cysteine proteinase inhibitor - soybean (fragment)	177	8e-044
BRSOGMMJ1010E11.b	sp P17642 PRS2_SOLTU Pathogenesis-related protein STH-2	185	3e-046
BRSOGMMJ1010F08.b	emb CAA09042.1 40S ribosomal protein S6 [Cicer arietinum]	106	1e-022
BRSOGMMJ1010F12.b	ref NP_197590.1 putative protein; protein id: At5g20900.1, supported by cDNA:	48.5	4e-005
BRSOGMMJ1010G01.b	ref NP_179680.1 putative secretory carrier-associated membrane protein; protein id:	144	6e-038
BRSOGMMJ1010G03.b	ref NP_175630.1 peptide transporter, putative; protein id: Atlg52190.1 [Arabidopsis]	176	3e-043
BRSOGMMJ1010G05.b	dbj BAB11089.1 contains similarity to unknown	254	1e-066
BRSOGMMJ1010G09.b	sp P93841 ISPE_LYCES 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase, chloroplast	195	5e-049

BRSOGMMJ1010G10.b	ref NP_200137.1 arabinogalactan-protein, putative (AGP22); protein id: At5g53250.1	62.8	1e-009
BRSOGMMJ1010H05.b	pir T00420 probable small nuclear ribonucleoprotein D2 [imported] -	209	3e-053
BRSOGMMJ1010H08.b	sp O48551 PSA6_SOYBN Proteasome subunit alpha type 6 (20S proteasome alpha subunit A)	294	8e-079
BRSOGMMJ1011A10.b			
BRSOGMMJ1011A11.b	emb CAA04703.1 cytochrome b5 [Olea europaea]	148	5e-035
BRSOGMMJ1011B03.b	ref NP_198128.1 putative protein; protein id: At5g27760.1, supported by cDNA:	110	1e-023
BRSOGMMJ1011B08.b	ref NP_176647.1 methionine/cystathionine gamma lyase, putative; protein id:	119	2e-026
BRSOGMMJ1011B09.b	ref NP_175528.1 unknown protein; protein id: At1g51160.1 [Arabidopsis thaliana]	171	4e-042
BRSOGMMJ1011B11.b	pir T02174 probable alcohol dehydrogenase [imported] - Arabidopsis thaliana	159	6e-039
BRSOGMMJ1011C06.b	ref NP_188256.1 putative MYB family transcription factor; protein id: At3g16350.1	106	2e-022
BRSOGMMJ1011C08.b			
BRSOGMMJ1011C11.b	dbj BAB02318.1 contains similarity to unknown protein~gb AAF27128.1~gene_id:MSJ11.27	76.6	7e-014
BRSOGMMJ1011D06.b	gb AAM62501.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	60.5	2e-008
BRSOGMMJ1011E03.b	gb AAL82617.1 AF475939_1 elongation factor 1-gamma [Glycine max]	282	3e-075
BRSOGMMJ1011G06.b	gb AAM64753.1 ribosomal protein, putative [Arabidopsis thaliana]	308	2e-083
BRSOGMMJ1011G07.b	ref NP_566416.1 expressed protein; protein id: At3g12260.1, supported by cDNA:	179	1e-044
BRSOGMMJ1011G09.b	ref NP_174170.1 glutaredoxin, putative; protein id: At1g28480.1, supported by cDNA:	117	9e-026
BRSOGMMJ1012A07.b	gb AAO45179.1 transcription factor Myb1 [Malus xiaojinensis]	92.0	4e-018
BRSOGMMJ1012A09.b			
BRSOGMMJ1012A12.b	ref NP_186788.1 vacuolar membrane ATPase subunit G (AVMA10); protein id:	89.7	2e-017
BRSOGMMJ1012C03.b			
BRSOGMMJ1012C04.b	ref NP_187740.1 integral membrane protein, putative; protein id: At3g11320.1	266	1e-070
BRSOGMMJ1012C05.b	gb AAF79602.1 AC027665_3 F5M15.3 [Arabidopsis thaliana]	56.2	2e-007
BRSOGMMJ1012D09.b	gb AAL76261.1 AF466824_1 putative permease 1 [Arabidopsis thaliana]	174	7e-043
BRSOGMMJ1012D10.b	ref NP_564267.1 expressed protein; protein id: At1g26940.1, supported by cDNA:	104	5e-039
BRSOGMMJ1012E03.b	sp Q9AR73 HQGT_RAUSE Hydroquinone glucosyltransferase (Arbutin synthase)	219	1e-056
BRSOGMMJ1012E06.b	pir T00675 hypothetical protein At2g43950 [imported] - Arabidopsis thaliana	170	1e-041
BRSOGMMJ1012F03.b	ref NP_565793.1 Expressed protein; protein id: At2g34585.1, supported by cDNA:	70.1	2e-011
BRSOGMMJ1012F05.b	pir T10675 hypothetical protein F3L17.20 - Arabidopsis thaliana	171	6e-042
BRSOGMMJ1012F07.b	pir S53307 alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) 1 - Phaseolus acutifolius	314	6e-085
BRSOGMMJ1012G07.b	gb AAF75749.1 AF261139_1 dehydration-induced protein ERD15 [Lycopersicon esculentum]	129	2e-029
BRSOGMMJ1012G08.b	gb AAG59645.1 AC084319_3 hypothetical protein [Oryza sativa]	142	2e-033
BRSOGMMJ1012G11.b	ref NP_198874.1 20S proteasome beta subunit B (PBB2); protein id: At5g40580.1,	275	2e-073
BRSOGMMJ1012H01.b			
BRSOGMMJ1012H03.b			
BRSOGMMJ1013A05.b	gb AAL91165.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	130	9e-030

BRSOGMMJ1013B01.b			
BRSOGMMJ1013B03.b			
BRSOGMMJ1013B05.b	gb AAK08102.1 AF338343_1 mago nashi-like protein [Oryza sativa]	280	1e-074
BRSOGMMJ1013B09.b	ref NP_565314.1 Expressed protein; protein id: At2g04795.1, supported by cDNA:	83.6	1e-015
BRSOGMMJ1013C01.b	gb AAO22685.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	56.6	2e-007
BRSOGMMJ1013C09.b			
BRSOGMMJ1013D02.b	ref NP_568985.1 expressed protein; protein id: At5g64130.1, supported by cDNA:	159	2e-038
BRSOGMMJ1013D10.b	gb AAM63723.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	52.0	2e-006
BRSOGMMJ1013D11.b	gb AAD30864.1 AF117884_1 seed maturation protein PM30 [Glycine max]	222	2e-057
BRSOGMMJ1013D12.b			
BRSOGMMJ1013E02.b	dbj BAB56021.1 P0481E12.6 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	83.6	2e-015
BRSOGMMJ1013E03.b	gb AAL07535.1 resistance gene analog PU3 [Helianthus annuus]	166	2e-040
BRSOGMMJ1013E04.b	dbj BAC42395.1 putative cationic amino acid transporter [Arabidopsis thaliana]	93.2	7e-039
BRSOGMMJ1013E07.b	ref NP_564781.1 expressed protein; protein id: At1g61620.1, supported by cDNA:	256	1e-067
BRSOGMMJ1013E09.b	gb AAF27918.1 AF220202_1 soluble inorganic pyrophosphatase [Malus x domestica]	79.3	3e-014
BRSOGMMJ1013E11.b	pir T47584 diphosphomevalonate decarboxylase (EC 4.1.1.33) F24B22.210	265	2e-070
BRSOGMMJ1013E12.b	dbj BAB86897.1 syringolide-induced protein B13-1-1 [Glycine max]	114	2e-025
BRSOGMMJ1013F01.b	ref NP_194639.1 putative protein; protein id: At4g29100.1, supported by cDNA:	57.8	1e-007
BRSOGMMJ1013F02.b	ref NP_566621.1 expressed protein; protein id: At3g18940.1, supported by cDNA: 75.	241	4e-063
BRSOGMMJ1013F06.b	dbj BAB83762.1 l-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase [Phaseolus lunatus]	265	3e-070
BRSOGMMJ1013F09.b	emb CAB46520.1 putative fructose-bisphosphate aldolase [Phleum pratense]	75.1	2e-013
BRSOGMMJ1013G04.b	pir C71447 hypothetical protein - Arabidopsis thaliana	132	2e-030
BRSOGMMJ1013G06.b	pir T51459 hypothetical protein K10A8_30 - Arabidopsis thaliana	193	9e-049
BRSOGMMJ1013G10.b			
BRSOGMMJ1013H06.b	ref NP_189085.1 unknown protein; protein id: At3g24420.1 [Arabidopsis thaliana]	118	3e-026
BRSOGMMJ1013H08.b	ref NP_187193.1 unknown protein; protein id: At3g05420.1 [Arabidopsis thaliana]	224	6e-058
BRSOGMMJ1014A02.b	ref NP_193372.2 salt-inducible protein homolog; protein id: At4g16390.1	231	5e-060
BRSOGMMJ1014A03.b	gb AAM95691.1 hypothetical protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	57.8	8e-008
BRSOGMMJ1014B06.b	emb CAC43238.1 calcium binding protein [Sesbania rostrata]	213	1e-054
BRSOGMMJ1014B07.b	ref NP_190556.2 ADP-RIBOSYLATION FACTOR -like protein; protein id: At3g49870.1,	349	2e-095
BRSOGMMJ1014C05.b	dbj BAB92011.1 pleiotropic drug resistance like protein [Nicotiana tabacum]	255	1e-072
BRSOGMMJ1014C06.b	ref NP_565834.1 E2, ubiquitin-conjugating enzyme, putative; protein id:	244	5e-064
BRSOGMMJ1014C08.b	pir F86393 protein T24P13.4 [imported] - Arabidopsis thaliana	76.3	3e-013
BRSOGMMJ1014C11.b	ref NP_176568.1 unknown protein; protein id: At1g63830.1, supported by cDNA:	259	1e-068
BRSOGMMJ1014D07.b	ref NP_565128.1 expressed protein; protein id: At1g76200.1, supported by cDNA:	90.1	6e-018
BRSOGMMJ1014E04.b	pir S68989 hypothetical protein 1 - Madagascar periwinkle	76.3	3e-013
BRSOGMMJ1014E05.b	sp Q41112 SRP_PHAVU Stress-related protein (PvSRP)	310	8e-084
BRSOGMMJ1014F05.b	gb AAM93434.1 40S ribosomal S4 protein [Glycine max]	322	4e-087

BRSOGMMJ1014F06.b	gb AAK28643.1 AF360346_1 putative N-acetylornithine deacetylase [Arabidopsis thaliana]	269	2e-071
BRSOGMMJ1014F07.b			
BRSOGMMJ1014G03.b	gb AAM67086.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	155	4e-037
BRSOGMMJ1014G06.b	gb AAM74330.2 AC114474_22 Hypothetical protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	69.7	9e-012
BRSOGMMJ1014H09.b	dbj BAC41935.1 putative Ca2+-transporting ATPase [Arabidopsis thaliana]	298	4e-080
BRSOGMMJ1015B04.b	gb AAD26116.1 AF106954_1 galactinol synthase [Brassica napus]	247	1e-064
BRSOGMMJ1015B05.b	ref NP_191640.1 putative protein; protein id: At3g60810.1 [Arabidopsis thaliana]	154	8e-037
BRSOGMMJ1015B10.b	dbj BAC58012.1 S-adenosyl-L-methionine: daidzein 7-0-methyltransferase	262	3e-069
BRSOGMMJ1015B11.b			
BRSOGMMJ1015C12.b	pir T04508 hypothetical protein F8F16.230 - Arabidopsis thaliana	130	2e-029
BRSOGMMJ1015D02.b	ref NP_193816.1 FAD-linked oxidoreductase family; protein id: At4g20840.1	74.7	7e-013
BRSOGMMJ1015D04.b			
BRSOGMMJ1015D08.b			
BRSOGMMJ1015E09.b	ref NP_177591.1 hypothetical protein; protein id: At1g74510.1 [Arabidopsis	270	2e-079
BRSOGMMJ1015F04.b	ref NP_173692.1 putative 40S ribosomal protein S18; protein id: At1g22780.1,	266	1e-070
BRSOGMMJ1015F05.b	ref NP_194568.1 mitochondrial ADP,ATP carrier protein, putative; protein id:	306	1e-082
BRSOGMMJ1015H04.b	pir JQ2249 naringenin-chalcone synthase (EC 2.3.1.74) - soybean	410	e-114
BRSOGMMJ1015H11.b			
BRSOGMMJ1015H12.b	ref NP_197006.1 transcriptional regulatory - like protein; protein id: At5g15020.1	102	4e-021
BRSOGMMJ1016A01.b	ref NP_565233.1 expressed protein; protein id: At1g80180.1, supported by cDNA:	96.7	2e-019
BRSOGMMJ1016A03.b	pir D86465 probable integral membrane protein [imported] - Arabidopsis thaliana	380	e-105
BRSOGMMJ1016B04.b	gb AAF01467.1 AF190450_1 enoyl-CoA-hydratase [Avicennia marina]	61.6	5e-009
BRSOGMMJ1016B05.b	sp P53504 ACT1_SORBI ACTIN 1	390	e-108
BRSOGMMJ1016C06.b			
BRSOGMMJ1016D07.b	dbj BAC10905.1 Moco containing protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	68.9	4e-011
BRSOGMMJ1016D09.b			
BRSOGMMJ1016D10.b	sp Q42662 METE_SOLSC 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	369	e-101
BRSOGMMJ1016E04.b	ref NP_192171.1 putative vacuolar ATPase; protein id: At4g02620.1, supported by	215	4e-055
BRSOGMMJ1016E09.b	ref NP_683562.1 hypothetical protein; protein id: At3g13275.1 [Arabidopsis	47.8	6e-005
BRSOGMMJ1016E11.b	ref NP_171820.1 unknown protein; protein id: At1g03210.1, supported by cDNA:	108	4e-023
BRSOGMMJ1016F02.b			
BRSOGMMJ1016F03.b	gb AAM62634.1 lipid transfer protein, putative [Arabidopsis thaliana]	138	9e-032
BRSOGMMJ1016F08.b	sp Q9SEE4 PIRL_LYCES Pirin-like protein	290	9e-078
BRSOGMMJ1016F11.b			
BRSOGMMJ1016F12.b	ref NP_564399.1 expressed protein; protein id: At1g32400.1, supported by cDNA:	241	7e-063
BRSOGMMJ1016G01.b	dbj BAB86225.1 putative hydroxymethyltransferase [Oryza sativa (japonica	96.7	3e-019
BRSOGMMJ1016G02.b			
BRSOGMMJ1016G06.b			
BRSOGMMJ1016G08.b			

BRSOGMMJ1016G11.b	ref NP_568128.1 auxin-regulated protein; protein id: At5g03880.1, supported by	200	1e-050
BRSOGMMJ1016H03.b	dbj BAB39916.1 hypothetical protein~similar to Arabidopsis thaliana chromosome 2,	154	1e-036
BRSOGMMJ1016H04.b	pir S21426 conglutin gamma precursor - narrow-leaved blue lupine	80.5	2e-014
BRSOGMMJ1017A07.b	ref NP_172414.1 unknown protein; protein id: At1g09430.1 [Arabidopsis thaliana]	336	2e-091
BRSOGMMJ1017B01.b	emb CAD40830.1 OSJNBa0086B14.2 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	278	5e-074
BRSOGMMJ1017B03.b	ref NP_188170.1 putative jasmonic acid regulatory protein; protein id: At3g15510.1,	292	2e-078
BRSOGMMJ1017B08.b	ref NP_178239.1 predicted by genscan and genefinder; protein id: At2g01300.1,	65.1	8e-010
BRSOGMMJ1017C03.b	gb AAO72389.1 synaptobrevin-like protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	278	4e-074
BRSOGMMJ1017C07.b	gb AAF26161.1 AC008261_18 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	80.9	7e-015
BRSOGMMJ1017D01.b	ref NP_566877.1 zinc finger protein; protein id: At3g45260.1, supported by cDNA:	77.8	9e-014
BRSOGMMJ1017D02.b			
BRSOGMMJ1017D05.b			
BRSOGMMJ1017E07.b	emb CAB65284.1 putative wound-induced protein [Medicago sativa subsp. x varia]	106	2e-022
BRSOGMMJ1018A03.b			
BRSOGMMJ1018B03.b	ref NP_680778.1 similar to Probable microsomal signal peptidase 12 kDa subunit (EC;	134	6e-031
BRSOGMMJ1018B08.b	pir S28420 ubiquitin / ribosomal protein CEP52 - wood tobacco	223	1e-057
BRSOGMMJ1018B09.b	ref NP_178516.1 putative acyl-CoA synthetase; protein id: At2g04350.1, supported by	153	2e-036
BRSOGMMJ1018C10.b	sp P42054 PORI_PEA Outer plastidial membrane protein porin (Voltage-dependent	330	9e-090
BRSOGMMJ1018C11.b	gb AAM29152.1 plastidic ATP/ADP transporter [Citrus hybrid cultivar]	206	e-105
BRSOGMMJ1018D07.b	ref NP_564808.1 expressed protein; protein id: At1g63060.1, supported by cDNA:	98.6	6e-020
BRSOGMMJ1018D09.b	pir T06254 glucose-6-phosphate/phosphate-translocator precursor, plastid -	306	2e-082
BRSOGMMJ1018E10.b	ref NP_180251.1 putative choline kinase; protein id: At2g26830.1, supported by	237	9e-062
BRSOGMMJ1018F04.b	emb CAC33768.1 S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase	190	1e-047
BRSOGMMJ1018F07.b	sp Q9LW96 INO1_TOBAC Inositol-3-phosphate synthase (Myo-inositol-1-phosphate synthase)	409	e-113
BRSOGMMJ1018H04.b	ref NP_565832.1 expressed protein; protein id: At2g36020.1, supported by cDNA:	179	3e-044
BRSOGMMJ1019A04.b	gb AAN65180.1 mitogen-activated protein kinase 4 [Petroselinum crispum]	354	6e-097
BRSOGMMJ1019A04.b			
BRSOGMMJ1019B09.b			
BRSOGMMJ1019C01.b	dbj BAA92902.1 unnamed protein product [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	248	5e-065
BRSOGMMJ1019C02.b	dbj BAA37150.1 p-type H ⁺ -ATPase [Vicia faba]	399	e-110
BRSOGMMJ1019C04.b	pir T11610 probable cinnamyl-alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.195) CPRD14 -	330	6e-090
BRSOGMMJ1019C09.b	gb AAM61614.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	191	8e-048
BRSOGMMJ1019D02.b	ref NP_198370.1 putative protein; protein id: At5g35200.1, supported by cDNA:	191	5e-048
BRSOGMMJ1019D03.b	ref NP_191467.1 putative protein; protein id: At3g59080.1, supported by cDNA:	318	3e-086

BRSOGMMJ1019D08.b			
BRSOGMMJ1019D10.b	gb AAM64972.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	149	3e-035
BRSOGMMJ1019D12.b	ref NP_193968.1 hypothetical protein; protein id: At4g22370.1 [Arabidopsis]	69.3	4e-011
BRSOGMMJ1019E01.b	gb AAK98703.1 AC069158_15 Putative PAP-specific phosphatase [Oryza sativa]	244	1e-063
BRSOGMMJ1019E02.b	ref NP_197149.1 expressed protein; protein id: At5g16450.1, supported by cDNA:	298	5e-080
BRSOGMMJ1019E03.b	dbj BAB09798.1 developmental protein SINA (seven in absentia) [Arabidopsis]	99.4	4e-020
BRSOGMMJ1019E05.b	sp P16064 CI1_PHAAN Subtilisin inhibitor I (ASI-I) [Contains: Subtilisin inhibitor II]	94.7	1e-018
BRSOGMMJ1019F03.b	sp O65759 H2A_CICAR Histone H2A	197	8e-050
BRSOGMMJ1019F07.b	pir F86214 protein T6D22.2 [imported] - Arabidopsis thaliana	235	4e-061
BRSOGMMJ1019F11.b	ref NP_565968.1 expressed protein; protein id: At2g42210.1, supported by cDNA:	181	6e-045
BRSOGMMJ1019F12.b	ref NP_567685.1 Expressed protein; protein id: At4g23496.1, supported by cDNA:	77.0	2e-013
BRSOGMMJ1019G10.b	dbj BAC43045.1 putative protein phosphatase 2C [Arabidopsis thaliana]	312	2e-084
BRSOGMMJ1019G12.b			
BRSOGMMJ1019H02.b	dbj BAA96221.1 unnamed protein product [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	84.7	7e-016
BRSOGMMJ1020A02.b	tpg DAA00283.1 TPA: putative phytosulfokine peptide precursor [Glycine max]	82.4	3e-015
BRSOGMMJ1020A04.b	gb AAL73069.1 AC090873_15 Putative alpha-mannosidase [Oryza sativa]	127	1e-028
BRSOGMMJ1020A05.b	ref NP_193404.1 hypothetical protein; protein id: At4g16710.1 [Arabidopsis]	197	9e-050
BRSOGMMJ1020A08.b	ref NP_178075.1 hypothetical protein; protein id: At1g79570.1 [Arabidopsis thaliana]	67.4	2e-010
BRSOGMMJ1020B03.b	ref NP_566657.1 expressed protein; protein id: At3g20290.1, supported by cDNA:	248	7e-065
BRSOGMMJ1020B07.b	ref NP_196822.1 NAM-like protein; protein id: At5g13180.1, supported by cDNA:	152	4e-036
BRSOGMMJ1020B11.b	sp O22584 RS14_LUPLU 40S RIBOSOMAL PROTEIN S14	226	3e-058
BRSOGMMJ1020C03.b	gb AAF79236.1 AC006917_21 F10B6.25 [Arabidopsis thaliana]	241	8e-066
BRSOGMMJ1020C07.b			
BRSOGMMJ1020C11.b	dbj BAC41250.1 vacuolar proton-inorganic pyrophosphatase [Pyrus communis]	366	e-100
BRSOGMMJ1020C12.b	emb CAA75589.1 MtN19 [Medicago truncatula]	236	2e-061
BRSOGMMJ1020D01.b	gb AAD38039.1 AF149917_1 acyl CoA reductase [Simmondsia chinensis]	142	6e-053
BRSOGMMJ1020D02.b	gb AAN07898.1 xyloglucan endotransglycosylase [Malus x domestica]	228	1e-082
BRSOGMMJ1020D04.b			
BRSOGMMJ1020E11.b	sp P48621 FD3C_SOYBN Omega-3 fatty acid desaturase, chloroplast precursor	111	1e-023
BRSOGMMJ1020F10.b	ref NP_567069.1 putative protein; protein id: At3g58530.1, supported by cDNA:	223	2e-057
BRSOGMMJ1020G03.b	emb CAD29731.1 protease inhibitor [Sesbania rostrata]	323	2e-087
BRSOGMMJ1020G06.b	dbj BAB62580.1 putative 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate	335	4e-091
BRSOGMMJ1020G08.b	pir S66340 phloem-specific protein Vein1 - fava bean	55.1	6e-007
BRSOGMMJ1020H11.b	gb AAG10041.1 AF288226_1 actin [Setaria italica]	43.1	8e-004
BRSOGMMJ1021A01.b			
BRSOGMMJ1021A05.b	ref NP_188794.1 hypothetical protein; protein id: At3g21570.1 [Arabidopsis]	72.0	4e-012
BRSOGMMJ1021B02.b	dbj BAC15525.1 contains ESTs AU094470(E11056),C73573(E11056)-similar to	280	9e-075
BRSOGMMJ1021B12.b	gb AAK33098.1 amino acid transporter [Glycine max]	202	2e-096

BRSOGMMJ1021C02.b	ref NP_174357.1 FAD-linked oxidoreductase family; protein id: At1g30700.1,	265	4e-070
BRSOGMMJ1021C04.b			
BRSOGMMJ1021C07.b	ref NP_563777.1 expressed protein; protein id: At1g07040.1, supported by cDNA:	313	1e-084
BRSOGMMJ1021C09.b			
BRSOGMMJ1021C11.b			
BRSOGMMJ1021C12.b	ref NP_567761.1 putative dihydrolipoamide succinyltransferase; protein id:	333	9e-091
BRSOGMMJ1021D04.b	gb AAL66291.1 AF452451_1 cysteine synthase [Glycine max]	354	6e-097
BRSOGMMJ1021D08.b	sp P30081 CHS7_SOYBN Chalcone synthase 7 (Naringenin-chalcone synthase 7)	125	6e-028
BRSOGMMJ1021E03.b	gb AAN41287.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	331	7e-090
BRSOGMMJ1021E11.b	pir T06666 26S proteasome regulatory particle chain RPN7 homolog F617.30 -	298	2e-083
BRSOGMMJ1021G06.b	pir A86211 hypothetical protein [imported] - Arabidopsis thaliana	350	8e-096
BRSOGMMJ1021G11.b	ref NP_565895.1 expressed protein; protein id: At2g38740.1, supported by cDNA:	291	7e-078
BRSOGMMJ1021H01.b	ref NP_198523.1 putative protein; protein id: At5g37070.1 [Arabidopsis thaliana]	278	4e-074
BRSOGMMJ1021H06.b	gb AAD26116.1 AF106954_1 galactinol synthase [Brassica napus]	233	1e-060
BRSOGMMJ1021H09.b	ref NP_180719.1 40S ribosomal protein S3, putative; protein id: At2g31610.1,	354	6e-097
BRSOGMMJ1022A02.b	gb AAK26751.1 NOD26-like membrane integral protein ZmNIP2-1 [Zea mays]	175	4e-043
BRSOGMMJ1022B05.b			
BRSOGMMJ1022B11.b			
BRSOGMMJ1022B12.b			
BRSOGMMJ1022C07.b	gb AAD42963.2 AF141384_1 serine carboxypeptidase precursor [Matricaria chamomilla]	249	3e-065
BRSOGMMJ1022C11.b	ref NP_191814.1 putative protein; protein id: At3g62550.1, supported by cDNA:	156	2e-037
BRSOGMMJ1022D01.b	gb AAM61635.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	118	6e-026
BRSOGMMJ1022D05.b	gb AAM63845.1 putative signal sequence receptor, alpha subunit (SSR-alpha)	171	9e-043
BRSOGMMJ1022E02.b	gb AAF43953.1 AC012188_30 Strong similarity to an unknown protein from Arabidopsis thaliana	359	1e-098
BRSOGMMJ1022F02.b	gb AAO20069.1 putative proteasome regulatory non-ATPase subunit [Oryza sativa]	267	8e-071
BRSOGMMJ1022F03.b	ref NP_181487.1 geranylgeranyl transferase type I beta subunit (GGT-IB); protein	257	7e-068
BRSOGMMJ1022F12.b	emb CAB88075.1 hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]	233	1e-060
BRSOGMMJ1023A03.b	ref NP_172965.1 unknown protein; protein id: At1g15130.1 [Arabidopsis thaliana]	309	2e-083
BRSOGMMJ1023B02.b	gb AAN60486.1 Putative aminotransferase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	185	2e-046
BRSOGMMJ1023D01.b	ref NP_568600.1 putative protein; protein id: At5g42050.1, supported by cDNA:	60.5	2e-008
BRSOGMMJ1023D08.b	ref NP_566354.1 expressed protein; protein id: At3g09740.1, supported by cDNA:	221	7e-057
BRSOGMMJ1023E09.b	ref NP_568600.1 putative protein; protein id: At5g42050.1, supported by cDNA:	46.2	3e-004
BRSOGMMJ1023E11.b	pir C86151 F22M8.7 protein - Arabidopsis thaliana	293	2e-078
BRSOGMMJ1023E12.b	dbj BAB08899.1 gene_id:MIJ24.17~unknown protein [Arabidopsis thaliana]	125	5e-028
BRSOGMMJ1023F02.b	pir C86390 hypothetical protein T1K7.26 - Arabidopsis thaliana	133	2e-030
BRSOGMMJ1023F07.b	emb CAB96652.1 DEAD BOX RNA helicase RH15-like protein [Arabidopsis thaliana]	276	2e-073
BRSOGMMJ1023G03.b	sp O03376 AOX3_SOYBN Alternative oxidase 3, mitochondrial precursor	444	e-124
BRSOGMMJ1023G04.b	ref NP_171916.2 unknown protein; protein id: At1g04200.1, supported by cDNA:	278	4e-074

BRSOGMMJ1023G06.b	ref NP_680135.1 expressed protein; protein id: At5g01750.2, supported by cDNA:	267	1e-070
BRSOGMMJ1023H04.b	gb AAC61805.1 Pto kinase interactor 1 [Lycopersicon esculentum]	160	1e-038
BRSOGMMJ1023H07.b	ref NP_190549.1 putative protein; protein id: At3g49800.1, supported by cDNA:	74.3	2e-023
BRSOGMMJ1024A06.b	ref NP_174753.1 hyoscyamine 6-dioxygenase hydroxylase, putative; protein id:	262	4e-069
BRSOGMMJ1024A09.b	ref NP_191524.1 putative protein; protein id: At3g59650.1, supported by cDNA:	209	2e-053
BRSOGMMJ1024A11.b	ref NP_565410.1 expressed protein; protein id: At2g17240.1, supported by cDNA:	86.7	2e-016
BRSOGMMJ1024B05.b			
BRSOGMMJ1024D09.b			
BRSOGMMJ1024E09.b	sp Q06652 GSHH_CITS Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx)	285	3e-076
BRSOGMMJ1024E10.b	gb AAG34805.1 AF243370_1 glutathione S-transferase GST 15 [Glycine max]	425	e-118
BRSOGMMJ1024F09.b			
BRSOGMMJ1024G02.b	ref NP_568154.1 putative protein; protein id: At5g05270.1 [Arabidopsis thaliana]	160	1e-045
BRSOGMMJ1024G03.b	ref NP_565894.1 expressed protein; protein id: At2g38710.1, supported by cDNA:	282	3e-075
BRSOGMMJ1024H02.b	ref NP_197169.2 putative protein; similar to unknown protein (gb AAF26969.1);	130	2e-029
BRSOGMMJ1024H09.b	ref NP_175691.1 putative oxidoreductase; protein id: At1g52820.1 [Arabidopsis	173	2e-042
BRSOGMMJ1025A02.b			
BRSOGMMJ1025A03.b			
BRSOGMMJ1025A06.b	ref NP_565001.1 zinc finger and C2 domain protein, putative; protein id:	230	1e-059
BRSOGMMJ1025A12.b			
BRSOGMMJ1025C08.b	gb AAM96992.1 putative protein [Arabidopsis thaliana]	75.5	4e-013
BRSOGMMJ1025C11.b	emb CAA10129.1 hypothetical protein [Cicer arietinum]	149	2e-035
BRSOGMMJ1025D05.b	ref NP_187709.1 unknown protein; protein id: At3g10980.1 [Arabidopsis thaliana]	176	2e-043
BRSOGMMJ1025E10.b			
BRSOGMMJ1025E12.b	gb AAM64945.1 PDI-like protein [Arabidopsis thaliana]	257	7e-068
BRSOGMMJ1025F08.b	ref NP_188169.1 putative jasmonic acid regulatory protein; protein id: At3g15500.1,	306	1e-082
BRSOGMMJ1025G04.b	emb CAA04701.1 small GTP-binding protein [Daucus carota]	213	1e-056
BRSOGMMJ1025H02.b			
BRSOGMMJ1025H09.b	dbj BAB01942.1 gb AAD15386.1~gene_id:MMP21.2~similar to unknown protein	64.7	6e-010
BRSOGMMJ1069A07.b	gb AAM65005.1 GSH-dependent dehydroascorbate reductase 1, putative [Arabidopsis	280	9e-075
BRSOGMMJ1069A11.b	pir T09617 isoliquiritigenin 2'-O-methyltransferase - alfalfa	121	5e-027
BRSOGMMJ1069B10.b	ref NP_187609.2 unknown protein; protein id: At3g09980.1, supported by cDNA:	213	2e-054
BRSOGMMJ1069B12.b	gb AAN60069.1 stromal ascorbate peroxidase [Retama raetam]	197	8e-050
BRSOGMMJ1069C01.b	gb AAM65570.1 nodulin-like protein [Arabidopsis thaliana]	159	2e-038
BRSOGMMJ1069C02.b			
BRSOGMMJ1069C03.b	ref NP_190479.1 signal recognition particle subunit 9 - like; protein id:	171	4e-042
BRSOGMMJ1069C04.b			
BRSOGMMJ1069C09.b	ref NP_195242.1 O-methyltransferase, family 2 family; protein id: At4g35160.1,	150	1e-035
BRSOGMMJ1069C10.b	gb AAD51625.1 AF169022_1 seed maturation protein PM37 [Glycine max]	358	4e-098
BRSOGMMJ1069D02.b	ref NP_564126.1 cysteine proteinase XCP2; protein id: At1g20850.1, supported by	266	1e-070

BRSOGMMJ1069D03.b	pir T07614 homeobox-leucine zipper protein homolog h1 - soybean	84.7	4e-021
BRSOGMMJ1069D06.b	pir H96531 hypothetical protein F13F21.5 [imported] - Arabidopsis thaliana	159	4e-038
BRSOGMMJ1069D09.b			
BRSOGMMJ1069E07.b	pir T10451 FPF1 protein - white mustard	139	1e-032
BRSOGMMJ1069E12.b	sp P48631 FD62_SOYBN Omega-6 fatty acid desaturase, endoplasmic reticulum isozyme 2	346	1e-094
BRSOGMMJ1069F04.b	gb AAN76362.1 serpin-like protein [Citrus x paradisi]	238	4e-062
BRSOGMMJ1069F06.b	ref NP_063976.1 orf114a [Beta vulgaris]	79.0	1e-014
BRSOGMMJ1069G04.b	ref NP_187142.1 putative mitogen activated protein kinase kinase; protein id:	192	2e-048
BRSOGMMJ1069G05.b	dbj BAA76420.1 multidrug resistance protein [Cicer arietinum]	266	2e-070
BRSOGMMJ1069H05.b	gb AAN62336.1 AF506028_3 CTV.2 [Poncirus trifoliata]	313	2e-084
BRSOGMMJ1069H07.b			
BRSOGMMJ1070A05.b	pir T09390 21K protein precursor - alfalfa	226	2e-058
BRSOGMMJ1070B03.b	ref NP_175986.2 unknown protein; protein id: Atlg55900.1, supported by cDNA:	205	2e-052
BRSOGMMJ1070B04.b	gb AAM60990.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	315	2e-085
BRSOGMMJ1070B08.b	ref NP_173608.1 transmembrane protein, putative; protein id: Atlg21900.1, supported	155	3e-037
BRSOGMMJ1070B12.b	dbj BAB86896.1 syringolide-induced protein 13-1-1 [Glycine max]	161	5e-039
BRSOGMMJ1070C02.b	gb AAO46881.1 60S ribosomal protein [Medicago sativa]	302	2e-081
BRSOGMMJ1070C06.b	emb CAD32500.1 protein kinase Ck2 regulatory subunit 2 [Nicotiana tabacum]	164	6e-040
BRSOGMMJ1070C11.b	gb AAL02122.1 copper-transporting P-type ATPase [Brassica napus]	94.4	3e-019
BRSOGMMJ1070D05.b	ref NP_175343.1 hypothetical protein; protein id: Atlg49170.1 [Arabidopsis	115	3e-025
BRSOGMMJ1070D06.b			
BRSOGMMJ1070D08.b	gb AAM64270.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	71.6	7e-012
BRSOGMMJ1070D11.b	dbj BAB78491.1 26S proteasome regulatory particle triple-A ATPase subunit2b [Oryza	227	8e-059
BRSOGMMJ1070E09.b	ref NP_172826.1 unknown protein; protein id: Atlg13700.1 [Arabidopsis thaliana]	169	6e-042
BRSOGMMJ1070E12.b	ref NP_193606.1 shaggy-like protein kinase etha (EC 2.7.1.-); protein id:	214	2e-064
BRSOGMMJ1070F07.b	gb AAM66025.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	90.9	7e-018
BRSOGMMJ1070F10.b	ref NP_199233.1 nuclear cap binding protein CBP20; protein id: At5g44200.1	271	4e-072
BRSOGMMJ1070F12.b	dbj BAB90364.1 B1065E10.15 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	123	2e-027
BRSOGMMJ1070G01.b	ref NP_566732.1 expressed protein; protein id: At3g23600.1, supported by cDNA:	229	1e-059
BRSOGMMJ1070G04.b			
BRSOGMMJ1070G09.b	ref NP_179387.1 hypothetical protein; protein id: At2g17970.1 [Arabidopsis	103	2e-021
BRSOGMMJ1070H04.b	ref NP_567644.1 WRKY family transcription factor; protein id: At4g22070.1,	105	4e-022
BRSOGMMJ1071A01.b	gb AAM65777.1 putative pollen surface protein [Arabidopsis thaliana]	185	3e-046
BRSOGMMJ1071A07.b	ref NP_179476.1 unknown protein; protein id: At2g18860.1 [Arabidopsis thaliana]	138	3e-032
BRSOGMMJ1071A10.b	ref NP_192994.1 polyubiquitin-like protein; protein id: At4g12570.1 [Arabidopsis	224	7e-058
BRSOGMMJ1071A12.b	sp P19142 PAL2_PHAVU Phenylalanine ammonia-lyase class II	286	7e-077
BRSOGMMJ1071B01.b	gb AAN76362.1 serpin-like protein [Citrus x paradisi]	156	1e-037
BRSOGMMJ1071C01.b	ref NP_567038.1 protein kinase C inhibitor-like protein; protein id: At3g56490.1,	239	1e-062
BRSOGMMJ1071C03.b	ref NP_197393.1 putative protein; protein id: At5g18920.1, supported by cDNA:	91.3	3e-018

BRSOGMMJ1071C04.b	ref NP_181409.1 putative annexin; protein id: At2g38750.1, supported by cDNA:	171	4e-042
BRSOGMMJ1071D04.b	ref NP_181956.1 hypothetical protein; protein id: At2g44270.1 [Arabidopsis	265	3e-070
BRSOGMMJ1071E01.b	ref NP_175413.1 mitotic checkpoint protein, putative; protein id: At1g49910.1	189	5e-048
BRSOGMMJ1071E05.b	ref NP_568148.1 E2, ubiquitin-conjugating enzyme, putative; protein id:	129	1e-029
BRSOGMMJ1071E10.b	pir T07095 2'-hydroxyisoflavone reductase (EC 1.3.1.45) - soybean	313	6e-085
BRSOGMMJ1071F10.b	sp P16313 NO21_SOYBN NODULIN 21 (N-21)	120	1e-026
BRSOGMMJ1071G03.b	emb CAC69138.1 MAP kinase kinase [Medicago sativa subsp. x varia]	124	3e-028
BRSOGMMJ1071G07.b	ref NP_564235.1 expressed protein; protein id: At1g25420.1, supported by cDNA:	299	2e-080
BRSOGMMJ1071H01.b			
BRSOGMMJ1071H10.b	ref NP_564163.1 Expressed protein; protein id: At1g22270.1, supported by cDNA:	102	3e-021
BRSOGMMJ1072B02.b			
BRSOGMMJ1072B04.b	ref NP_566307.1 expressed protein; protein id: At3g07430.1, supported by cDNA:	94.0	1e-018
BRSOGMMJ1072B06.b	sp Q39839 NDK1_SOYBN NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KINASE I (NDK I) (NDP KINASE I)	276	2e-073
BRSOGMMJ1072B07.b			
BRSOGMMJ1072B09.b	ref NP_196758.1 putative protein; protein id: At5g11970.1, supported by cDNA:	62.0	2e-009
BRSOGMMJ1072B11.b	gb AAM67227.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	104	3e-022
BRSOGMMJ1072B12.b	ref NP_201244.2 KH domain protein; protein id: At5g64390.1 [Arabidopsis thaliana]	107	9e-023
BRSOGMMJ1072C04.b	pir T02203 finger protein Dof - common tobacco (fragment)	43.9	5e-004
BRSOGMMJ1072D04.b	pir T03803 tumor-related protein, clone NF34 - common tobacco	137	7e-032
BRSOGMMJ1072E04.b	ref NP_179170.1 putative calmodulin-like protein; protein id: At2g15680.1	103	2e-021
BRSOGMMJ1072E10.b	ref NP_172989.1 unknown protein; protein id: At1g15370.1, supported by cDNA:	233	5e-061
BRSOGMMJ1072E12.b	ref NP_567300.1 coded for by A. thaliana cDNA Z18000; protein id: At4g05530.1,	161	3e-039
BRSOGMMJ1072F07.b	ref NP_172256.1 ribosomal protein S15; protein id: At1g07770.1, supported by cDNA:	259	2e-068
BRSOGMMJ1072F09.b			
BRSOGMMJ1072G02.b	dbj BAB86891.1 syringolide-induced protein 14-1-1 [Glycine max]	182	3e-045
BRSOGMMJ1072G06.b	gb AAM45475.1 ethylene-responsive element binding protein 1 [Glycine max]	122	2e-027
BRSOGMMJ1072G07.b	ref NP_199794.1 putative protein; protein id: At5g49830.1, supported by cDNA:	287	7e-077
BRSOGMMJ1072G12.b	gb AAK43885.1 AF370508_1 putative protein kinase gb AAD22129 [Arabidopsis thaliana]	227	4e-059
BRSOGMMJ1072H01.b	sp P52178 CPT2_BRAOL Triose phosphate/phosphate translocator, non-green plastid,	216	2e-055
BRSOGMMJ1072H03.b			
BRSOGMMJ1073B06.b	ref NP_192145.1 putative protein; protein id: At4g02360.1 [Arabidopsis thaliana]	159	3e-038
BRSOGMMJ1073B12.b	gb AAF78432.1 AC018748_11 Contains similarity to an unknown glyoxalase II from Arabidopsis	156	1e-037
BRSOGMMJ1073C07.b	ref NP_680266.1 hypothetical protein; protein id: At5g30495.1 [Arabidopsis	101	4e-021
BRSOGMMJ1073D01.b	pir A86349_F8K7.2 protein - Arabidopsis thaliana	123	2e-027
BRSOGMMJ1073D02.b	gb AAF74983.1 AF082893_1 methionine synthase [Solanum tuberosum]	382	e-105
BRSOGMMJ1073D11.b			

BRSOGMMJ1073E05.b	pir T05942 cytochrome P450 82C1 - soybean	187	7e-047
BRSOGMMJ1073E10.b	ref NP_172940.1 unknown protein; protein id: Atlg14870.1, supported by cDNA:	199	1e-050
BRSOGMMJ1073E11.b	pir E71405 probable ankyrin - Arabidopsis thaliana	228	1e-059
BRSOGMMJ1073F04.b	sp P38385 S61G_ORYSA PROTEIN TRANSPORT PROTEIN SEC61 GAMMA SUBUNIT	104	4e-022
BRSOGMMJ1073G02.b	emb CAA51821.1 ubiquitin conjugating enzyme E2 [Lycopersicon esculentum]	307	7e-083
BRSOGMMJ1073G04.b	pir S57478 GTP-binding protein GTP13 - garden pea	271	5e-072
BRSOGMMJ1073G06.b	emb CAB96990.1 putative 14-kDa proline-rich protein [Cicer arietinum]	187	1e-046
BRSOGMMJ1073H07.b	ref NP_177210.1 putative protein kinase; protein id: Atlg70530.1 [Arabidopsis	90.9	1e-017
BRSOGMMJ1073H08.b	gb AAO18639.1 galactose dehydrogenase [Actinidia deliciosa]	169	2e-041
BRSOGMMJ1073H11.b			
BRSOGMMJ1074A01.b			
BRSOGMMJ1074A07.b			
BRSOGMMJ1074A11.b	pir T04242 abdominal segment formation protein pumilio homolog F14M19.160 -	90.1	7e-018
BRSOGMMJ1074B06.b			
BRSOGMMJ1074B08.b	ref NP_187728.1 putative leucoanthocyanidin dioxygenase; protein id: At3g11180.1	63.9	5e-010
BRSOGMMJ1074B12.b	pir H86366 protein F26F24.12 [imported] - Arabidopsis thaliana	107	5e-023
BRSOGMMJ1074C03.b	gb AAG48831.1 AC084218_1 similar to Arabidopsis thaliana putative ATPase (ISW2-like)	211	2e-054
BRSOGMMJ1074C11.b	ref NP_198343.1 putative protein; protein id: At5g34930.1, supported by cDNA:	87.4	4e-017
BRSOGMMJ1074C12.b	sp Q42798 C931_SOYBN Cytochrome P450 93A1	146	8e-035
BRSOGMMJ1074D08.b			
BRSOGMMJ1074D11.b	gb AAO49473.1 putative serine/threonine kinase [Vitis vinifera]	158	1e-038
BRSOGMMJ1074E06.b	pir F84663 probable nitrate transporter [imported] - Arabidopsis thaliana	208	1e-053
BRSOGMMJ1074E08.b	sp P40691 A115_TOBAC AUXIN-INDUCED PROTEIN PCNT115	136	8e-032
BRSOGMMJ1074E09.b	sp Q9ZRS8 R37A_PSEMZ 60S ribosomal protein L37a	186	5e-047
BRSOGMMJ1074F04.b	emb CAA75308.1 annexin [Medicago truncatula]	194	3e-049
BRSOGMMJ1074F11.b			
BRSOGMMJ1074G03.b	dbj BAB09795.1 proline-rich cell wall protein-like [Arabidopsis thaliana]	114	2e-025
BRSOGMMJ1074G04.b	ref NP_175669.1 signal peptidase subunit, putative; protein id: Atlg52600.1,	120	5e-027
BRSOGMMJ1074G10.b	sp P50346 RLA0_SOYBN 60S ACIDIC RIBOSOMAL PROTEIN P0	52.0	2e-006
BRSOGMMJ1074G11.b	ref NP_564604.1 bZIP protein, putative; protein id: Atlg52320.1, supported by cDNA:	118	2e-026
BRSOGMMJ1075B05.b			
BRSOGMMJ1075B06.b	dbj BAB67929.1 putative high-affinity potassium transporter [Oryza sativa	130	6e-030
BRSOGMMJ1075C05.b			
BRSOGMMJ1075D02.b	ref NP_565233.1 expressed protein; protein id: Atlg80180.1, supported by cDNA:	68.9	2e-011
BRSOGMMJ1075D09.b	gb AAO00855.1 putative protein [Arabidopsis thaliana]	105	2e-022
BRSOGMMJ1075D11.b	ref NP_188871.1 RNA polymerase I, II and III 24.3 kDa subunit; protein id:	74.7	3e-013
BRSOGMMJ1075F05.b	sp Q9MAV7 RL31_PANGI 60S ribosomal protein L31	110	4e-024
BRSOGMMJ1075F08.b	ref NP_565615.1 G-protein beta family; protein id: At2g26060.1, supported by cDNA:	49.3	8e-013

BRSOGMMJ1075F12.b			
BRSOGMMJ1075G05.b			
BRSOGMMJ1075G06.b			
BRSOGMMJ1075H07.b	emb CAC43327.1 putative beta6 proteasome subunit [<i>Nicotiana tabacum</i>]	184	3e-046
BRSOGMMJ1076A08.b	ref NP_181669.1 putative embryo-abundant protein; protein id: At2g41380.1,	245	3e-064
BRSOGMMJ1076C04.b	ref NP_173894.2 hypothetical protein; protein id: At1g25230.1, supported by cDNA:	55.1	5e-007
BRSOGMMJ1076D03.b	ref NP_566902.1 putative protein; protein id: At3g48360.1, supported by cDNA:	209	3e-053
BRSOGMMJ1076D04.b	ref NP_568286.1 putative protein; protein id: At5g13190.1, supported by cDNA:	200	1e-050
BRSOGMMJ1076F02.b	ref NP_198582.1 putative protein; protein id: At5g37660.1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	144	6e-034
BRSOGMMJ1076F04.b	ref NP_568170.1 glycolate oxidase subunit D-like; D-lactate dehydrogenase-like;	137	5e-032
BRSOGMMJ1076F06.b	ref NP_201280.1 putative protein; protein id: At5g64750.1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	132	2e-030
BRSOGMMJ1076G11.b	emb CAA98170.1 RAB7C [<i>Lotus japonicus</i>]	271	2e-072
BRSOGMMJ1076H01.b	ref NP_563697.1 expressed protein; protein id: At1g04000.1, supported by cDNA:	46.6	1e-004
BRSOGMMJ1079A09.b			
BRSOGMMJ1079A12.b	emb CAD56219.1 ribosomal protein S3a [<i>Cicer arietinum</i>]	231	5e-060
BRSOGMMJ1079B04.b	pir T06426 ribosomal protein L27 - garden pea	228	4e-059
BRSOGMMJ1079B07.b	ref NP_179569.1 putative clathrin assembly protein; protein id: At2g19790.1,	267	2e-071
BRSOGMMJ1079B11.b	emb CAD29733.1 pectin methylesterase [<i>Sesbania rostrata</i>]	259	8e-069
BRSOGMMJ1079C01.b	gb AAG43410.1 self-pruning interacting protein 1 [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	50.8	4e-006
BRSOGMMJ1079C02.b	ref NP_188045.1 unknown protein; protein id: At3g14280.1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	67.4	2e-010
BRSOGMMJ1079C03.b	ref NP_176773.1 type 2 peroxiredoxin, putative; protein id: At1g65980.1, supported	260	9e-069
BRSOGMMJ1079C11.b	gb AAL37041.1 AF303583_1 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A [<i>Pisum sativum</i>]	168	4e-078
BRSOGMMJ1079D07.b	gb AAM78552.1 AF522185_1 ribosomal protein small subunit 28 kDa [<i>Helianthus annuus</i>]	97.1	1e-019
BRSOGMMJ1079D10.b	dbj BAC43220.1 unknown protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	95.9	3e-019
BRSOGMMJ1079E01.b			
BRSOGMMJ1079E02.b	dbj BAA76744.1 asparaginyl endopeptidase (VmPE-1) [<i>Vigna mungo</i>]	313	1e-084
BRSOGMMJ1079F02.b	pir T09622 protein kinase MMK4 (EC 2.7.1.-), cold- and drought-induced -	170	9e-042
BRSOGMMJ1079F02.b			
BRSOGMMJ1079F03.b			
BRSOGMMJ1079F04.b	pir T50644 oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide) (EC 1.2.4.2) E1 chain	270	8e-072
BRSOGMMJ1079G01.b	gb AAL67991.1 dehydration-induced protein RD22-like protein [<i>Gossypium hirsutum</i>]	103	1e-021
BRSOGMMJ1079G03.b	pir S68805 pectin acetylesterase (EC 3.1.1.-) precursor - mung bean	365	e-100
BRSOGMMJ1079G08.b	dbj BAC42443.1 unknown protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	189	1e-047
BRSOGMMJ1079G12.b			
BRSOGMMJ1079H01.b	gb AAM64577.1 putative nitrilase-associated protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	54.7	7e-007
BRSOGMMJ1079H08.b	ref NP_194034.1 putative protein; protein id: At4g23030.1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	211	7e-054
BRSOGMMJ1079H10.b	ref NP_567472.1 expressed protein; protein id: At4g15610.1, supported by cDNA:	85.1	2e-016
BRSOGMMJ1079H12.b	emb CAA07232.1 putative Pi starvation-induced protein [<i>Cicer arietinum</i>]	145	3e-034

BRSOGMMJ1080A04.b	emb CAB43571.1 carbonic anhydrase [Glycine max]	266	2e-070
BRSOGMMJ1080B03.b	gb AAK63009.1 AF320025_1 heme oxygenase 3 [Glycine max]	325	3e-088
BRSOGMMJ1080B04.b	pir T51252 dTDPglucose 4,6-dehydratase (EC 4.2.1.46) [imported] - chickpea	305	4e-082
BRSOGMMJ1080B11.b	dbj BAC41936.1 GPI-anchored protein [Arabidopsis thaliana]	257	6e-068
BRSOGMMJ1080C04.b	sp Q8VZB9 R10A_ARATH 60S ribosomal protein L10a-1	274	6e-073
BRSOGMMJ1080C10.b	emb CAA78267.1 precursor alliinase [Allium cepa]	87.4	2e-016
BRSOGMMJ1080C11.b	gb AAL30452.1 AF362947_1 endo-beta-1,4-glucanase precursor [Nicotiana tabacum]	77.8	1e-013
BRSOGMMJ1080D04.b			
BRSOGMMJ1080D08.b			
BRSOGMMJ1080E01.b			
BRSOGMMJ1080E02.b	dbj BAC43250.1 putative beta-1,3-glucanase [Arabidopsis thaliana]	194	7e-049
BRSOGMMJ1080E10.b	ref NP_196647.1 putative protein; protein id: At5g10860.1, supported by cDNA:	289	2e-077
BRSOGMMJ1080E12.b	sp Q42807 STAD_SOYBN Acyl-[acyl-carrier protein] desaturase, chloroplast precursor	301	6e-081
BRSOGMMJ1080F05.b	sp Q9MAS5 V726_ARATH Putative vesicle-associated membrane protein 726 (AtVAMP726)	189	1e-047
BRSOGMMJ1080G02.b	pir JC4786 dnaK-type molecular chaperone hsc70-3 - tomato	293	1e-078
BRSOGMMJ1080G08.b	pir S35942 probable ATP synthase chain - soybean	276	8e-074
BRSOGMMJ1080H06.b	gb AAM62683.1 arabinogalactan protein-like [Arabidopsis thaliana]	108	6e-023
BRSOGMMJ1080H07.b	ref NP_568789.1 putative protein; protein id: At5g53310.1, supported by cDNA:	197	9e-050
BRSOGMMJ1081A04.b	pir F86205 hypothetical protein [imported] - Arabidopsis thaliana	216	2e-055
BRSOGMMJ1081A05.b	ref NP_175387.1 hypothetical protein; protein id: At1g49640.1 [Arabidopsis	131	6e-030
BRSOGMMJ1081A06.b	pir T52558 translation elongation factor eEF1Balpha (clone 2) [validated] -	134	9e-031
BRSOGMMJ1081A07.b	ref NP_198811.1 thioredoxin; protein id: At5g39950.1, supported by cDNA: 7791.,	164	1e-039
BRSOGMMJ1077A02.b			
BRSOGMMJ1077A03.b	sp P50346 RLA0_SOYBN 60S ACIDIC RIBOSOMAL PROTEIN P0	261	1e-069
BRSOGMMJ1077A04.b			
BRSOGMMJ1077A08.b	ref NP_201169.1 putative protein; protein id: At5g63640.1, supported by cDNA:	69.3	1e-011
BRSOGMMJ1077A09.b	gb AAL25091.1 AF428256_1 acyl carrier protein [Olea europaea]	101	2e-021
BRSOGMMJ1077A12.b	ref NP_199097.1 N-hydroxycinnamoyl benzoyltransferase-like protein; protein id:	92.8	1e-018
BRSOGMMJ1077B01.b	ref NP_197590.1 putative protein; protein id: At5g20900.1, supported by cDNA:	48.5	2e-005
BRSOGMMJ1077B12.b			
BRSOGMMJ1077C05.b	dbj BAC41960.1 putative BCS1 protein [Arabidopsis thaliana]	139	1e-039
BRSOGMMJ1077C08.b			
BRSOGMMJ1077C12.b	ref NP_566968.1 E2, ubiquitin-conjugating enzyme, putative; protein id:	168	1e-041
BRSOGMMJ1077D07.b	sp Q9M5P8 SNAA_SOLTU Alpha-soluble NSF attachment protein (Alpha-SNAP)	197	5e-050
BRSOGMMJ1077E10.b	ref NP_564495.1 expressed protein; protein id: At1g45688.1, supported by cDNA:	183	1e-045
BRSOGMMJ1077F07.b	gb AAM53283.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	73.6	1e-012
BRSOGMMJ1077G03.b			
BRSOGMMJ1077G04.b			
BRSOGMMJ1077G05.b	pir T02382 hypothetical protein At2g44260 [imported] - Arabidopsis thaliana	168	3e-041

BRSOGMMJ1077G09.b	ref NP_186857.1 putative 40S ribosomal protein S19; protein id: At3g02080.1,	216	7e-056
BRSOGMMJ1077H03.b	gb AAK44146.1 AF370331_1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	49.7	2e-005
BRSOGMMJ1077H07.b	ref NP_565528.1 putative beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase; protein id: At2g22230.1,	97.8	3e-020
BRSOGMMJ1077H11.b	ref NP_192835.1 putative protein; protein id: At4g10970.1, supported by cDNA:	129	7e-030
BRSOGMMJ1078A07.b	emb CAB85628.1 putative ripening-related protein [Vitis vinifera]	139	7e-033
BRSOGMMJ1078B08.b			
BRSOGMMJ1078B11.b	ref NP_191984.1 hypothetical protein; protein id: At4g00750.1 [Arabidopsis	181	3e-045
BRSOGMMJ1078B12.b			
BRSOGMMJ1078C04.b	gb AAM92008.1 AF527779_1 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [Solanum tuberosum]	104	3e-022
BRSOGMMJ1078C11.b	pir T51481 hypothetical protein T21H19_30 - Arabidopsis thaliana	70.5	5e-012
BRSOGMMJ1078D07.b	gb AAD00708.1 ethylene-responsive element binding protein homolog [Stylosanthes	101	3e-021
BRSOGMMJ1078D08.b	emb CAA10289.1 hypothetical protein [Cicer arietinum]	219	6e-057
BRSOGMMJ1078D09.b	ref NP_172371.1 putative transcription factor; protein id: At1g08970.1, supported	199	6e-051
BRSOGMMJ1078E01.b	ref NP_567515.1 triacylglycerol lipase like protein; protein id: At4g16820.1	115	2e-025
BRSOGMMJ1078E10.b	ref NP_566732.1 expressed protein; protein id: At3g23600.1, supported by cDNA:	120	3e-027
BRSOGMMJ1078F02.b	emb CAC48323.1 2-Cys peroxiredoxin [Pisum sativum]	130	5e-030
BRSOGMMJ1078F04.b	ref NP_193461.2 hypothetical protein; protein id: At4g17280.1, supported by cDNA:	46.2	9e-005
BRSOGMMJ1078F10.b	dbj BAA89232.1 wsus [Citrullus lanatus]	248	1e-065
BRSOGMMJ1078F11.b	gb AAK69514.1 1L-myo-inositol-1-phosphate synthase [Phaseolus vulgaris]	157	2e-038
BRSOGMMJ1078G02.b	sp P52581 IFRI_LUPAL ISOFLAVONE REDUCTASE HOMOLOG	145	2e-034
BRSOGMMJ1078G09.b	ref NP_188598.1 unknown protein; protein id: At3g19640.1 [Arabidopsis thaliana]	114	3e-025
BRSOGMMJ1078G11.b	ref NP_201070.1 putative protein; protein id: At5g62640.1, supported by cDNA:	73.6	6e-013
BRSOGMMJ1078H12.b			
BRSOGMMJ1079A01.b	gb AAK14411.1 AC087851_3 unknown protein [Oryza sativa]	120	1e-026
BRSOGMMJ1081B01.b	gb AAN13056.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	110	2e-034
BRSOGMMJ1081B02.b	gb AAK73280.1 drought-induced protein [Retama raetam]	39.3	4e-008
BRSOGMMJ1081B07.b	gb AAF04904.1 AC011437_19 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	256	9e-068
BRSOGMMJ1081B12.b	ref NP_174500.1 defender against cell death protein, putative; protein id:	207	6e-053
BRSOGMMJ1081D05.b	emb CAA75092.1 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase [Morinda	366	e-100
BRSOGMMJ1081D12.b	dbj BAA82391.1 ESTs C99174(E10437),D22295(C10709) correspond to a region of the	160	8e-039
BRSOGMMJ1081E05.b	dbj BAC43285.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	113	1e-024
BRSOGMMJ1081E08.b	sp Q9LSU2 PSA2_ORYSA Proteasome subunit alpha type 2 (20S proteasome alpha subunit B)	318	3e-086
BRSOGMMJ1081F02.b	ref NP_182260.1 putative cytochrome c oxidase Vc subunit; protein id: At2g47380.1,	95.1	4e-019
BRSOGMMJ1081F11.b	pir T12041 cysteine proteinase (EC 3.4.22.-) 3 precursor - kidney bean	243	8e-064
BRSOGMMJ1081F12.b	pir T14282 embryogenic callus protein 181 - carrot (fragment)	322	2e-087
BRSOGMMJ1081G10.b	pir T07786 UDP-glucose glucosyltransferase (EC 2.4.1.-) - potato	166	2e-040

BRSOGMMJ1081G12.b	gb AAL31902.1 AF419570_1 AT4g17230/dl4650c [Arabidopsis thaliana]	217	7e-056
BRSOGMMJ1081H02.b	sp P82412 RRP3_SPIOI Plastid-specific 30S ribosomal protein 3, chloroplast precursor	183	2e-045
BRSOGMMJ1081H04.b	gb AAM14957.1 hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]	198	4e-050
BRSOGMMJ1081H09.b	ref NP_196446.1 putative protein; protein id: At5g08290.1, supported by cDNA:	292	2e-078
BRSOGMMJ1081H10.b	pir S33612 isocitrate dehydrogenase (NADP) (EC 1.1.1.42) - soybean	195	4e-049
BRSOGMMJ1082A11.b			
BRSOGMMJ1082B04.b	sp P05477 HS21_SOYBN 17.9 KD CLASS II HEAT SHOCK PROTEIN	321	4e-087
BRSOGMMJ1082B11.b	ref NP_680357.1 similar to non-LTR reverse transcriptase, putative; protein id:	62.4	2e-009
BRSOGMMJ1082C02.b	sp P46301 RS25_LYCES 40S RIBOSOMAL PROTEIN S25	131	5e-030
BRSOGMMJ1082C05.b	ref NP_564325.1 expressed protein; protein id: At1g29250.1, supported by cDNA:	185	3e-046
BRSOGMMJ1082C08.b	gb AAM64554.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	102	5e-021
BRSOGMMJ1082C09.b	gb AAF73132.1 AF149017_1 homogentisate 1,2-dioxygenase [Lycopersicon esculentum]	326	2e-088
BRSOGMMJ1082D11.b	ref NP_680728.1 zinc-finger protein Lsd1; protein id: At4g20380.2, supported by	190	1e-047
BRSOGMMJ1082E03.b			
BRSOGMMJ1082E06.b	dbj BAB85123.1 iron regulated metal transporter [Oryza sativa]	33.5	5e-005
BRSOGMMJ1082E07.b			
BRSOGMMJ1082F03.b	sp Q09054 G3PD_MAIZE Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 2	199	2e-050
BRSOGMMJ1082F04.b	pir T52337 phosphoprotein phosphatase (EC 3.1.3.16) 2C [imported] - common ice	154	5e-037
BRSOGMMJ1082F06.b			
BRSOGMMJ1082F11.b	gb AAO85509.1 SGT1 [Nicotiana benthamiana]	187	7e-047
BRSOGMMJ1082G09.b	pir T04917 hypothetical protein T10I14.190 - Arabidopsis thaliana	87.4	6e-017
BRSOGMMJ1082G11.b	ref NP_187533.1 laccase (diphenol oxidase) family; protein id: At3g09220.1	97.4	7e-020
BRSOGMMJ1082H02.b	ref NP_566330.1 expressed protein; protein id: At3g08610.1, supported by cDNA:	108	5e-023
BRSOGMMJ1082H08.b	gb AAL32040.1 AF439281_1 ribosomal S15 protein [Retama raetam]	275	4e-073
BRSOGMMJ1083A01.b	dbj BAB86520.1 ribosomal protein L28-like [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	210	4e-054
BRSOGMMJ1083A02.b	ref NP_566171.1 expressed protein; protein id: At3g02420.1, supported by cDNA:	146	7e-035
BRSOGMMJ1083A04.b	ref NP_187110.1 putative tryptophanyl-tRNA synthetase; protein id: At3g04600.1,	230	8e-060
BRSOGMMJ1083A12.b	dbj BAB89541.1 P0435B05.20 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	169	2e-041
BRSOGMMJ1083B09.b	dbj BAA74451.1 cytokinin-specific binding protein [Vigna radiata]	66.6	2e-010
BRSOGMMJ1083C01.b	gb AAM08614.1 AC107314_5 Putative Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor [Oryza sativa]	142	3e-033
BRSOGMMJ1083C06.b			
BRSOGMMJ1083C08.b	sp P35694 BRU1_SOYBN Brassinosteroid-regulated protein BRU1 precursor	378	e-104
BRSOGMMJ1083D06.b	pir T06227 peroxidase (EC 1.11.1.7) 2, cationic - soybean	361	5e-099
BRSOGMMJ1083D07.b			
BRSOGMMJ1083D12.b	gb AAM62553.1 snap25a [Arabidopsis thaliana]	177	8e-044
BRSOGMMJ1083E01.b			
BRSOGMMJ1083E02.b	gb AAD25944.1 AF085279_17 hypothetical EIF-2-Alpha [Arabidopsis thaliana]	244	3e-064

BRSOGMMJ1083E03.b	gb AAM64611.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	172	2e-042
BRSOGMMJ1083E05.b	ref NP_196762.1 putative protein; protein id: At5g12010.1, supported by cDNA:	107	1e-022
BRSOGMMJ1083E06.b	ref NP_566369.1 expressed protein; protein id: At3g10210.1, supported by cDNA:	294	6e-079
BRSOGMMJ1083F01.b			
BRSOGMMJ1083F06.b	gb AAL07539.1 resistance gene analog NBS4 [Helianthus annuus]	117	1e-025
BRSOGMMJ1083F08.b	dbj BAB47119.1 14-3-3 protein [Vigna angularis]	305	4e-082
BRSOGMMJ1083F10.b			
BRSOGMMJ1083F11.b	gb AAO22738.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	122	2e-027
BRSOGMMJ1083G11.b	ref NP_198663.1 DNA repair protein RAD23 homolog; protein id: At5g38470.1,	153	5e-047
BRSOGMMJ1083H06.b	dbj BAC42842.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	124	7e-028

This report was automatically generated by a Perl program written in the Biotechnology and Bioinformatics Laboratory of Embrapa Soja.
Please feel free to send your suggestion.