**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Análise, via RNAseq, do transcrito do feijoeiro e identificação de genes expressos em resposta à infecção pelo nematoide das galhas

Luciane Santini

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2014**

Luciane Santini
Engenheira Agrônoma

Análise, via RNAseq, do transcrito do feijoeiro e identificação de genes expressos em resposta à infecção pelo nematoide das galhas

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **MARIA LUCIA CARNEIRO VIEIRA**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Santini, Luciane

Análise, via RNAseq, do transcrito do feijoeiro e identificação de genes expressos em resposta à infecção pelo nematoide das galhas / Luciane Santini. - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014. 118 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. *Phaseolus vulgaris* 2. *Meloidogyne incognita* 3. RNAseq 4. Interatoma 5. Expressão diferencial de genes 6. Anotação funcional 7. Genes de defesa vegetal I. Título

CDD 635.652
S235a

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

A Deus, pela graça da existência,
aos meus pais por tudo que sei e sou,
à minha madrinha pelo apoio,
à minha avó (*in memorian*),
aos "meus anjos",
aos meus familiares,
e a todos os amigos que me
apoiam,
com carinho, dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido chegar até aqui.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e ao Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas, por toda minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.

À professora Dra Maria Lucia Carneiro Vieira, pela orientação, pelos ensinamentos, pelo apoio e principalmente, pela confiança em mim depositada, desde a minha Iniciação Científica.

Aos professores da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e em especial aos professores do Departamento de Genética, pelos ensinamentos.

Ao Professor Dr. Mário Massayuki Inomoto por ter aceitado participar deste trabalho, por me receber em seu laboratório e me orientar em todas as etapas nematológicas.

Ao Professor Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, da ESALQ/USP, pelas sugestões e colaboração durante o planejamento experimental.

À Professora Dra. Claudia de Barros Monteiro-Vitorello, da ESALQ/USP, pela colaboração durante o desenvolvimento desse trabalho.

À professora Dra Siu Mui Tsai, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), à Dra Rosana Pereira Vianello, da Embrapa Arroz e Feijão, ao MSc. Enéas Ricardo Konzen e ao Dr Mauro Bonfim Jr. por fornecerem as sementes de feijoeiro.

Ao Professor Dr Luiz Lehmann Coutinho, pelo sequenciamento das bibliotecas de RNAseq.

A Gustavo Gasparin e Marcela Mendes por me auxiliarem a entender o procedimento de RNAseq.

Ao Dr Marcelo Mendes Brandão, pelas sugestões e toda a colaboração durante o planejamento e a execução das análises de bioinformática.

Ao Dr Horacio Montenegro, por todo o auxílio na utilização do cluster para análises de bioinformática e por me ajudar quando o computador deixava de funcionar.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular de Plantas Cultivadas, Alessandra, Anselmo, Augusto, Bruna, Bruno, Carla, Carlos, Carmelice, Cássia, João Paulo, Lourdes, Luiz Augusto, Rafael, Taislene e Zirlane, por toda a colaboração, apoio e companheirismo.

Ao técnico Carlos Alberto de Oliveira, pela amizade e pelo auxílio prestado.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e ao técnico Rafael, por toda a colaboração prestada.

Aos amigos do Laboratório de Nematologia, Mauro, Tiarla, Ricardo, Pedro e Vitor, pela agradável convivência.

À Dr. Rosana Bessi e ao Dr. Claudio Marcelo Gonçalves de Oliveira, pelos ensinamentos e preciosas sugestões.

À técnica Sonia Antedomenico e ao Sr. Joaquim pelos ensinamentos, colaboração e amizade,

Aos amigos Cristiane, Victor, Igor, Mauro e Mariana, pelo apoio e pelos momentos de convivência.

Ao amigo Rodrigo, que esteve presente nos momentos de maior dificuldade.

Aos amigos Carmelice, Evandro, Augusto e Igor, pela ajuda durante a montagem dos experimentos.

À amiga Carla de Freitas Munhoz, por todos os anos de convivência, pela amizade e constante ajuda.

À Milena Moura de Araujo, Patricia Schaker, Lucas Taniguti, Guilherme Pereira e João Ricardo B. F. Rosa, pelas sugestões e experiências compartilhadas.

À Léia, secretária do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento e a Carlos Macedônio, técnico de informática do Departamento de Genética da ESALQ/USP, por toda a colaboração.

Aos colegas e aos funcionários do Departamento de Genética, por todas as contribuições.

Aos funcionários da Divisão de Biblioteca e Documentação da ESALQ/USP, em especial, aos responsáveis pelos serviços de Normalização e Editoração.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação e para a realização desse trabalho.

"Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota"

Madre Teresa de Calcutá

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
Importância da cultura	17
Estudos genéticos	19
Principais problemas fitossanitários	20
Nematoides das galhas	22
Melhoramento genético para resistência a nematoides	24
Interação planta-nematoide.....	25
Resistência e tolerância	28
Estudo dos transcritomas da interação planta-nematoide.....	31
RNAseq.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Avaliação da reação de cultivares de feijoeiro ao nematoide das galhas e preparo do inóculo.....	35
3.2 Determinação dos períodos de coleta de RNA das plantas inoculadas	37
3.3 Ensaio de inoculação para a construção das bibliotecas de expressão	38
<i>Coleta de raízes para a construção das bibliotecas de expressão.....</i>	<i>38</i>
<i>Cálculo do FR.....</i>	<i>42</i>
3.4 Extração de RNA	42
3.5 Construção das bibliotecas de RNAseq.....	43
3.5.1 Preparo das amostras de RNA.....	43
3.5.2 Obtenção do RNAm	44
3.5.3 Fragmentação do RNAm	44
3.5.4 Síntese do cDNA	45
3.5.5 Reparo das extremidades.....	46
3.5.6 Adenilação da extremidade 3'	46
3.5.7 Ligação dos adaptadores	47
3.5.8 Enriquecimento da biblioteca.....	47
3.5.9 Quantificação das bibliotecas e sequenciamento	48
3.6 Análises das sequências.....	49
3.6.1 Avaliação da qualidade das sequências e filtragem dos dados	49
3.6.2 Mapeamento de <i>reads</i> e identificação de transcritos	49

3.6.3	Análise quantitativa da expressão gênica	50
3.6.4	Anotação das sequências	51
4	RESULTADOS	53
4.1	Avaliação da reação de cultivares de feijoeiro ao nematoide das galhas....	53
4.2	Determinação dos períodos de coleta de RNA das plantas inoculadas	54
4.3	Ensaio de inoculação para a construção das bibliotecas de expressão	56
	<i>Coleta de raízes para a construção das bibliotecas de expressão</i>	56
	<i>Cálculo do FR</i>	57
4.4	Extração de RNA	57
4.5	Construção das bibliotecas de RNAseq	59
4.6	Análise das sequências	61
4.6.1	Avaliação da qualidade das sequências e filtragem dos dados	61
4.6.2	Mapeamento de reads e identificação de transcritos	63
4.6.3	Análise quantitativa da expressão gênica	65
4.6.4	Anotação das bibliotecas de RNAseq	71
	<i>Plataforma Blast2GO</i>	71
	<i>Plataforma MapMan</i>	83
5	DISCUSSÃO	87
5.1	Avaliação da reação de cultivares de feijoeiro ao nematoide das galhas....	87
5.2	Processamento e análises dos transcritos	88
6	CONCLUSÕES.....	97
	REFERÊNCIAS	99
	ANEXOS.....	113

RESUMO

Análise, via RNAseq, do transcrito do feijoeiro e identificação de genes expressos em resposta à infecção pelo nematoide das galhas

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) é atacado por uma gama de patógenos que afetam a produtividade das lavouras e a qualidade dos grãos. Dentre os patógenos de importância econômica para a cultura no Brasil, destaca-se o nematoide das galhas (*Meloidogyne incognita*). Embora haja relatos sobre a avaliação de cultivares na presença de *M. incognita*, as fontes de resistência tem se mostrado pouco efetivas. Por isso, pesquisas que possibilitem um melhor entendimento sobre a interação planta-nematoide são de extrema valia e devem nortear novas estratégias para o melhoramento do feijoeiro. Assim, no presente estudo, 18 cultivares de *P. vulgaris* foram avaliadas quanto à resistência a *M. incognita* raça 3, sendo que quatro comportaram-se como pouco suscetíveis, 11 como moderadamente suscetíveis e três altamente suscetíveis. A cultivar IPR Saracura mostrou menor grau de suscetibilidade e foi, então, usada na construção de 12 bibliotecas de RNAseq, visando à identificação dos genes envolvidos na resposta à infecção pelo nematoide. Foram adotados dois tratamentos, 4 e 10 DAI (dias após inoculação), compostos de plantas inoculadas e controles. Primeiramente, realizou-se o mapeamento dos transcritos de cada biblioteca, tomando como referência o genoma de *P. vulgaris* (G19833), o que resultou na identificação de 27.195 unigenes. Em seguida, foi realizada a quantificação da expressão dos transcritos mapeados e genes diferencialmente expressos foram identificados. No total, 191 genes do hospedeiro apresentaram expressão diferencial, considerando-se: i) o tratamento inoculado em relação ao controle; ii) a razão de expressão (*Fold Change* - *FC*) mínima absoluta igual a 4; iii) o nível de significância $\alpha = 0,05$. Do total, 120 genes foram identificados aos 4 DAI e 71 aos 10 DAI. As sequências mapeadas foram contrastadas àquelas dos bancos de dados NCBI e TAIR, usando a ferramenta BLASTx e, posteriormente, anotadas usando os softwares Blast2GO e MapMan. Detectou-se similaridade com genes codificadores de proteínas conhecidas para 90% (24.604/27.195) dos unigenes, sendo que 69% (16.991/24.604) deles foram anotados. Quanto à expressão diferencial, 98% (188/191) dos transcritos mostraram similaridade com proteínas conhecidas e 67% (127/188) puderam ser anotados. Os transcritos foram atribuídos a diferentes categorias funcionais putativas, predominando o termo ontológico 'processos metabólicos', em ambas as plataformas. A anotação dos genes na plataforma MapMan mostrou abundância das categorias da via de resposta a estresse, com predominância de genes de defesa superexpressos aos 4 DAI e reprimidos aos 10 DAI. Por fim, 10 genes mostraram expressão diferencial tanto aos 4 como aos 10 DAI: sete deles foram estáveis, sendo superexpressos nas plantas inoculadas, e três apresentaram comportamentos opostos nos momentos avaliados. Ênfase foi dada a um gene que codifica uma 'probable inactive ADP-ribosyltransferase' e a quatro genes de resposta a ferimento.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*; *Meloidogyne incognita*; RNAseq; Interatoma; Expressão diferencial de genes; Anotação funcional; Genes de defesa vegetal

ABSTRACT

RNA-Seq based transcriptome analysis and identification of common bean genes expressed in response to root-knot nematode infection

The common bean (*Phaseolus vulgaris*) is attacked by a range of pathogens, which affect crop yield and the quality of grains. Among the pathogens of economic significance to the crop in Brazil, the root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*) deserve attention. Though there are some reports on cultivar evaluation in presence of *M. incognita*, the resistance sources have not being effective. Therefore, it is of valuable importance research projects that could lead to a better understanding of plant-nematode interaction and to indicate new strategies for common bean breeding. In the present study, 18 cultivars of *P. vulgaris* were evaluated in regard to their resistance to *M. incognita* race 3; four were less susceptible, 11 moderately susceptible, and three were highly susceptible. 'IPR Saracura' behaved as the less susceptible cultivar and then was selected for the construction of 12 RNAseq libraries, aiming at the identification of genes differentially expressed in response to nematode infection. Two treatments were adopted, 4 and 10 days after inoculation (DAI), each comprised of inoculated and control plants. Firstly, the transcripts were mapped to the reference genome of *P. vulgaris* (G19833), resulting in the identification of 27,195 unigenes. Then, the mapped transcript's expression was quantified and differentially expressed genes were identified. In total, 191 genes of the host plant showed differential expression taking into consideration: *i*) the inoculated treatments in relation to their control; *ii*) an absolute fold change ($FC \geq 4$; *iii*) a level of significance $\alpha = 0,05$. Of the total, 120 genes were detected at 4 DAI and 71 at 10 DAI. The mapped sequences were compared against those deposited in NCBI and TAIR databanks using BLASTx and subsequently annotated using Blast2GO and MapMan softwares. Similarity to known proteins was detected for 90% of the unigenes (24,604/27,195) and 69% (16,991/24,604) of them were annotated. Regarding assessing differential expression, 98% (188/191) of the transcripts showed similarity to known proteins and 67% (127/188) were annotated. Transcripts were attributed to different putative functional categories and the ontological term 'metabolic process' was predominant within both platforms. Gene annotation within MapMan platform showed predominance of stress-related pathway categories, with prevalence of defense genes overexpressed at 4 DAI and repressed at 10 DAI. Finally, 10 genes showed differential expression at both 4 and 10 DAI: seven were stably overexpressed in the inoculated plants, and three showed an opposite behavior regarding the evaluation periods. Attention was given to a gene encoding a probable inactive ADP-ribosyltransferase and four genes related to wound response.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*; *Meloidogyne incognita*; RNAseq; Interactome; Differential gene expression; Functional annotation; Plant defense genes

1 INTRODUÇÃO

Os feijões são as leguminosas destinadas ao consumo direto de grãos mais importantes do mundo, com destaque para o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). Cultivado principalmente na América Latina e na África tropical, o feijão comum é um alimento rico em proteínas e minerais, constituindo uma importante fonte protéica, sobretudo para as populações de baixa renda (GEPTS et al., 2008). Dessa forma, tem-se o aumento de produtividade das lavouras e a melhoria da qualidade dos grãos como necessidades de cunho econômico e social.

No cenário mundial, o Brasil é o terceiro maior produtor e o segundo no ranking de consumidores do feijão comum (FAO, 2013), com uma produção estimada em 3,56 milhões de toneladas para a safra atual (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014). No entanto, o país ainda apresenta sérios problemas que limitam a produtividade das lavouras e a qualidade dos grãos, os quais são, principalmente, de ordem fitossanitária. A espécie é atacada por uma ampla gama de patógenos, fungos, vírus, bactérias e fitonematoides. Nesse aspecto, têm-se os fitonematoides como alvos relevantes de estudo, pois estes apresentam ampla distribuição geográfica, são polípagos e podem causar danos e perdas consideráveis no campo. O gênero *Meloidogyne* é particularmente prejudicial ao feijoeiro, ocasionando perdas de até 90% na produção (ABAWI; MULLÍN; MAÍ, 2005). Tal perda deve-se, basicamente, ao fato de os nematoides atuarem como um dreno, captando os nutrientes da planta para seu próprio desenvolvimento (CAROMEL; GEBHARDT, 2011). Além disso, causam a alteração do metabolismo da planta tornando-a mais suscetível a estresses bióticos e abióticos (ABAWI; MULLÍN; MAÍ, 2005).

Uma das principais formas de controle de fitonematoides é o cultivo de plantas resistentes. No entanto, a resistência genética aos nematoides é mais frequente em espécies silvestres, o que dificulta seu uso em programas de melhoramento, já que reunir resistência aos outros caracteres agronomicamente desejáveis é um processo dispendioso e que demanda longo tempo (CAROMEL; GEBHARDT, 2011).

Visando superar esse desafio, várias pesquisas foram realizadas nas últimas décadas com o intuito de ampliar o conhecimento a respeito da interação planta-nematoide. Atualmente, têm-se alguns genes de resistência a nematoides identificados e caracterizados. Igualmente, alguns QTL's (*Quantitative Trait Loci*) de

resistência a nematoides foram mapeados em batata, tomate, pimenta, soja, algodão, trigo, cevada e arroz (CAROMEL; GEBHARDT, 2011). Todavia, o conhecimento adquirido ainda permanece muito aquém do desejável.

Graças ao avanço das técnicas empregadas em biologia molecular e ao advento das “ômicas”, a quantidade de sequências de DNA, de transcritos e de proteínas disponíveis tem aumentado exponencialmente em curtíssimo espaço de tempo, favorecendo o desenvolvimento de projetos direcionados ao estudo de expressão gênica e da interação planta-patógeno. Por isso, o enfoque atual das pesquisas sobre resistência está nos transcritos e proteínas expressas durante a interação. No que se refere ao estudo da interação planta-*Meloidogyne*, tem-se duas vertentes de pesquisa: uma direcionada às proteínas secretadas pelo nematoide durante a infecção e outra direcionada às proteínas sintetizadas pela planta em resposta ao ataque. Várias metodologias de análise de transcrito têm sido empregadas nesses estudos, como microarranjos (FULLER et al., 2007), *differential display* (WANG; POTTER; JONES, 2003), bibliotecas de cDNA (BARBOSA et al., 2009), sequenciamento de RNA (RNAseq) (JI et al., 2013), entre outras. Frente ao panorama exposto, este trabalho teve o intuito de estudar o transcrito expresso pelo feijoeiro em resposta ao ataque de *M. incognita*, usando a abordagem RNAseq, e identificar os genes diferencialmente expressos. Pretende-se, assim, contribuir para o entendimento da interação feijoeiro-nematoide das galhas e, indiretamente, para a geração de marcadores moleculares funcionais, o mapeamento de QTLs e a seleção de genótipos resistentes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Importância da cultura

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L., $2n = 2x = 22$) é uma espécie da família Leguminosae, que apresenta grande importância econômica e social, sobretudo no cenário mundial, pois a segurança alimentar é prioridade e assim culturas como o feijoeiro ganham destaque devido ao seu alto valor nutricional (BROUGHTON et al., 2003). O fato dos grãos serem ricos em ferro e zinco e fornecerem o aminoácido essencial lisina, além de certas vitaminas, faz do consumo de feijão uma excelente alternativa nutricional, principalmente para as populações da América Latina e África tropical (BROUGHTON et al., 2003; CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL - CIAT, 2013). Cerca de 13% do feijão produzido pelos países em desenvolvimento tem sido exportado, sendo o restante destinado ao consumo interno, o que evidencia a sua importância na dieta dessas populações (GEPTS et al., 2008).

No cenário mundial, o Brasil está entre os maiores produtores, tendo ocupado o 3º lugar no ranking, com aproximadamente 2.795 mil toneladas produzidas em 2012 (FAO, 2013). Além disso, o país é 2º maior mercado consumidor de feijão. Em 2011 chegou a importar cerca de 207 mil toneladas (FAO, 2013). Dados estatísticos recentes sobre a produção nacional mostram um crescimento de 288,3 mil ha na área plantada (9,4%). Estima-se que o total produzido atingirá 3,56 milhões de toneladas, com um aumento de 15,9% na produtividade em relação à safra anterior (CONAB, 2014).

Apesar do referido aumento, a produtividade média da cultura (1.058 kg/ha) ainda permanece muito aquém do desejável, principalmente, quando comparada à de outros grãos como o milho, que tem uma produtividade média nacional de 4.908 kg/ha (CONAB, 2014). Quando se considera a importância do feijão para a população brasileira, a baixa produtividade torna-se ainda mais alarmante, uma vez que, juntamente com o arroz, constitui a base da alimentação popular. Há anos, avaliações de desempenho de cultivares tem mostrado que, em condições de alta tecnologia, produtividades superiores a 4.000 kg/ha podem ser atingidas (VIEIRA et al., 2005; BRANDALIZZE, 2011). No entanto, este valor ainda é inferior à

produtividade apresentada por acessos de feijoeiro avaliados na década de 1980 (veja VIEIRA et al., 2005).

Perante as evidências de que a produtividade das lavouras de feijão pode ser aumentada, surge a dúvida sobre quais são os fatores que a estão limitando. Dentre eles, pode-se destacar: *i)* as condições edafoclimáticas, com principal relevância para a região da África Subsaariana (CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL - CIAT, 2013) e demais áreas com solos com baixas fertilidade e disponibilidade de água; *ii)* o baixo potencial produtivo de algumas cultivares; *iii)* e os problemas fitossanitários encontrados de forma generalizada nas áreas de produção (KIMATI; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 1997; SCHWARTZ et al., 2005; PRIA; SILVA, 2010).

Entretanto, é importante mencionar que os setores de pesquisa estão empenhados em desenvolver cultivares e tecnologias que possibilitem a adaptação do cultivo às exigências do mercado e às particularidades das áreas de produção. O cultivo do feijoeiro no Brasil se estende por todas as regiões, com destaque para os estados do Paraná, Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Bahia, em sistemas de produção solteiro ou consorciado, em propriedades de agricultura familiar ou altamente tecnificadas (POSSE et al., 2010; FANCELLI, 2011; CONAB, 2014). A grande diferença entre as regiões produtoras reside nos sistemas de produção (FANCELLI, 2011) e no potencial produtivo das cultivares (principalmente quando comparam-se genótipos com diferentes hábitos de crescimento), o que resultou na implantação de múltiplos programas de melhoramento genético (VIEIRA et al., 2005). Assim, instituições de diversas regiões brasileiras possuem programas específicos de melhoramento genético de feijoeiro, tais como o Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), a Universidade Federal de Lavras (UFLA), a Universidade Federal de Viçosa (UFV), a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais (EPAMIG), a Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária (EMCAPA), o Instituto Agrônomo (IAC) e o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) (ZIMMERMANN et al., 1996).

Para dar suporte aos programas mundiais de melhoramento da espécie, estudos genéticos tem sido desenvolvidos ao longo dos anos, mas ainda há muito a ser feito para que seja possível obter cultivares adaptadas às peculiaridades das regiões produtoras, sobretudo no que se diz respeito à tolerância ou resistência aos

problemas fitossanitários existentes (SINGH; SCHWARTZ, 2010, 2011; SCHWARTZ; SINGH, 2013).

Estudos genéticos

P. vulgaris é uma espécie amplamente estudada: há linhas de pesquisa direcionadas a diversos aspectos da genética e do desenvolvimento da planta, o que impossibilita uma descrição detalhada dos avanços atuais obtidos. Portanto, somente os aspectos de maior relevância para o melhoramento genético serão brevemente apresentados a seguir.

O feijoeiro comum apresenta grande variabilidade genética quando comparado às outras autógamas cultivadas (GEPTS et al., 2008). É originário do Continente Americano, no qual identificam-se dois *pools* gênicos principais, o Mesoamericano (proveniente da América Central e México) e o Andino (região sul dos Andes). Estudos morfológicos (GEPTS; DEBOUCK, 1991; SINGH et al., 1991; CHIORATO et al., 2005) e moleculares (VELASQUEZ; GEPTS, 1994; FREYRE et al., 1996; BLAIR et al., 2006; BENCHIMOL et al., 2007; HANAI et al., 2007; KWAK; GEPTS, 2009; DINIZ et al., 2014) possibilitaram, ao longo dos anos, uma melhor caracterização dos *pools* gênicos, bem como das populações silvestres de *P. vulgaris*. Em adição aos *pools* gênicos principais, foi sugerida a existência de um terceiro centro de domesticação na região que compreende o Norte do Peru e o Equador (DEBOUCK et al., 1993; KAMI et al., 1995). Recentemente, análises baseadas em diversidade nucleotídica, reforçaram a hipótese da origem mesoamericana do feijoeiro e de eventos independentes de migração, gerando efeito gargalo e a consequente variabilidade reconhecida na espécie (BITOCCHI et al., 2012 apud BELLUCCI et al., 2014).

Esta variabilidade tem sido amplamente explorada por diversos grupos de pesquisa e projetos de grande abrangência tem sido desenvolvidos, como é o caso do Consórcio internacional “Phaseomics”, criado com o intuito de gerar conhecimento e *background* genético apropriados para a obtenção de cultivares resistentes a estresses bióticos e abióticos e com alto rendimento e qualidade de grãos (BROUGHTON et al., 2003).

Populações segregantes para características de interesse foram obtidas ao longo dos anos e mapas de ligação foram construídos para auxiliar nos estudos de

herança, possibilitando o mapeamento de locos qualitativos e quantitativos (QTL) para diversas características. As informações obtidas a partir de 12 mapas foram reunidas em um mapa consenso (FREYRE et al., 1998) obtido para a população 'Bat93' x 'Jalo EEP558'. Posteriormente, a integração entre o mapa físico e o mapa de ligação (PEDROSA et al., 2003) possibilitou a uniformização das informações a respeito da localização de genes e QTL. Inúmeros trabalhos de mapeamento genético continuam a ser publicados (BLAIR et al., 2007; HANAI et al., 2010; CAMPOS et al., 2011) visando uma melhor caracterização das regiões genômicas incluindo o mapeamento fino de QTL (OBLESSUC et al., 2013; RICHARD et al., 2014). Outras tendências atuais de pesquisa são a análise da diversidade nucleotídica de genes específicos (DINIZ et al., 2014), a genotipagem em larga escala para a identificação de SNP e o mapeamento associativo (OSORNO; MCCLEAN, 2014)

Recentemente, três projetos concomitantes de sequenciamento de *P. vulgaris* foram desenvolvidos. O genoma de um representante do *pool* gênico andino, 'G19833' foi sequenciado pelo "US Department of Energy Joint Genome Institute"; já os genótipos mesoamericanos 'BAT93' e 'OAC-Rex' foram sequenciados, respectivamente, pelo "Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnologia para El Desarrollo" (CYTED) e pelo "Applied Bean Genomics and Bioproducts", do Canadá. Apesar dos genomas não terem sido oficialmente publicados, as sequências de 'G19833' (<http://goo.gl/fV40pE>) e 'BAT93' (<http://www.genoma-cyted.org/>) estão disponíveis para a comunidade científica.

A reunião dos dados obtidos pelo sequenciamento genômico e por detalhadas análises citogenéticas (PEDROSA-HARAND et al., 2009; ALTROCK; FONSÊCA; PEDROSA-HARAND, 2011; BONIFÁCIO et al., 2012) mostram um panorama muito promissor para a continuidade das pesquisas em desenvolvimento e em estudos futuros, com grande potencial para uso no melhoramento.

Principais problemas fitossanitários

Por ser cultivado durante todo o ano e em variados ambientes, o feijoeiro comum está sujeito a uma ampla gama de problemas fitossanitários. Mais de 73 doenças foram descritas, causadas por fungos, bactérias, nematoides, vírus, fitoplasmas e por agentes abióticos (SCHWARTZ et al., 2005; PRIA; SILVA, 2010). A

maioria das doenças que acometem a cultura atacam a parte aérea, como o crestamento bacteriano, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, os vírus do mosaico comum e do mosaico dourado, além de diversas doenças fúngicas, sendo as maiores perdas causadas por *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Pseudocercospora griseola*. Como patógenos de solo, destacam-se *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, além dos nematoides fitoparasitas (POSSE et al., 2010).

Muito se tem estudado a respeito dos patógenos fúngicos, bacterianos e virais de ocorrência na cultura, o que tem resultado na obtenção de cultivares resistentes por diferentes instituições de pesquisa. No Brasil, pode ser citado o feijoeiro transgênico resistente ao vírus do mosaico dourado desenvolvido pela Embrapa (BONFIM et al., 2007; ARAGÃO; FARIA, 2009).

Por outro lado, em relação à resistência aos fitonematoides, os estudos ainda são incipientes. São muitos os nematoides associados à cultura no mundo. Há relatos de plantas parasitadas por *Rotylenchulus reniformis*, *Heterodera glycines*, *Belonolaimus longicaudatus*, *Helicotylenchus dihystra*, *Tylenchorhynchus* spp. e *Criconemoides ovantus* (ABAWI; MULLÍN; MAÍ, 2005). No entanto, estas espécies não costumam ser encontradas em grandes densidades populacionais em cultivos de feijão e, conseqüentemente, não são consideradas problemáticas. Os fitonematoides de maior importância fazem parte dos gêneros *Meloidogyne* (nematoides formadores de galhas) e *Pratylenchus* (nematoides das lesões), os quais apresentam ampla distribuição geográfica, são polívoros e podem causar danos e perdas consideráveis no campo (ABAWI; MULLÍN; MAÍ, 2005; POSSE et al., 2010). Foram registradas em feijoeiro perdas produtivas de 80 e 90% causadas, respectivamente, por *Pratylenchus* spp. e *Meloidogyne* spp (ABAWI; MULLÍN; MAÍ, 2005). Tal perda deve-se, principalmente, ao fato de os nematoides atuarem como um dreno, captando os nutrientes da planta para seu próprio desenvolvimento (CAROMEL; GEBHARDT, 2011). Além disso, causam a alteração do metabolismo da planta, tornando-a mais suscetível a estresses bióticos e abióticos (ABAWI; MULLÍN; MAÍ, 2005).

Frente aos vários problemas enfrentados pela cultura, o desenvolvimento de métodos de controle é imprescindível, sobretudo daqueles que possibilitem reduzir ao máximo o emprego do controle químico, dispendioso e tóxico. Dentre as alternativas de controle de doenças em feijoeiro, destaca-se a obtenção de plantas

geneticamente resistentes (SINGH; SCHWARTZ, 2010, 2011; SCHWARTZ; SINGH, 2013).

Nematoides das galhas

Conhecidos como "os inimigos invisíveis", os fitonematoides causam enormes perdas nas áreas de produção agrícola mundial, com especial importância para os endoparasitas que estabelecem complexos sítios de alimentação no interior das raízes hospedeiras (PERRY; MOENS, 2011). Dentre os nematoides de maior importância estão os da família Heteroderidae, os nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) e os nematoides dos cistos (*Heterodera* spp. e *Globodera* spp.).

As espécies de *Meloidogyne* são consideradas as causadoras dos maiores danos econômicos ao redor do mundo (MOENS et al 2009, apud PERRY; MOENS, 2011) pelo fato de apresentarem uma ampla gama de hospedeiros, representantes da maioria das angiospermas. Assim, conseguem adaptar-se e sobreviver por longo período em diferentes ecossistemas naturais ou áreas de cultivo. Uma vez presentes na área, alterações no agroecossistema, como a introdução de um monocultivo, podem acarretar na multiplicação acelerada do patógeno, resultando em drásticas perdas em um curto espaço de tempo (FERRAZ, 2001).

Há 98 espécies de *Meloidogyne* (JONES et al., 2013), nas quais observa-se variação em suas formas de reprodução, de anfigimixia meiótica a partenogênese mitótica. Apesar de machos serem encontrados em praticamente todas as espécies, aquelas que apresentam maior importância econômica caracterizam-se pela reprodução por partenogênese, como é o caso das espécies tropicais *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* e da espécie de clima temperado *M. hapla* (CHITWOOD; PERRY, 2009; SOMMER; STREIT, 2011). Machos de *M. incognita* são encontrados, em especial, sob condições de alta densidade populacional. Frente a uma possível limitação de recursos, alguns juvenis de quarto estágio (J4) dão origem aos machos adultos, o que reduz a competição por alimento, uma vez que não há relatos de machos atuando como parasitas de plantas (FERRAZ, 2001).

Os nematoides das galhas apresentam ploidia variável entre espécies e diferentes populações de uma mesma espécie. *M. incognita* (n = 18), se reproduz por partenogênese mitótica obrigatória, com ocorrência de poliploidia e aneuploidia.

Mais de 95% das populações estudadas apresentaram $2n = 36$ a 42 (ABAD; MCCARTER, 2011).

A complexidade existente em *M. incognita* estende-se às raças fisiológicas, definidas a partir dos hospedeiros diferenciais de algodoeiro (Deltapine 16) e de fumo (NC95). Quatro raças podem ser identificadas de acordo com a compatibilidade patógeno-hospedeiro, da seguinte forma: *i*) raça 1: apresenta incompatibilidade com algodoeiro e fumo; *ii*) raça 2: reação incompatível com algodoeiro; *iii*) raça 3: incompatível com fumo; *iv*) raça 4: compatível com ambos os hospedeiros (SASSER, 1980).

O ciclo de vida de *M. incognita* se completa em cerca de 25 dias, a uma temperatura de 27°C. Uma fêmea adulta oviposita aproximadamente 500 ovos, que permanecem envoltos em uma substância gelatinosa, formando uma massa de ovos. A formação da massa de ovos pode ocorrer no interior das raízes (em meio ao parênquima cortical) ou em sua superfície (FERRAZ; MONTEIRO, 1995; AGRIOS, 2005). No interior do ovo, o juvenil de primeiro estágio (J1) sofre a primeira ecdise, originando o J2. Em seguida, ocorre a eclosão e o juvenil infestante J2 se movimenta pelo solo em busca de um hospedeiro. Os J2 são orientados pelo gradiente de potencial elétrico e pela elevada temperatura na região de alongação das raízes, local preferencial de infecção (PERRY; MOENS, 2011). A penetração dos juvenis no sistema radicular se dá pela secreção de enzimas de degradação da parede celular, produzidas pelas glândulas subventrais do nematoide e secretadas pelo estilete. A migração do J2 ocorre pelos espaços intercelulares, inicialmente, em direção à ponta da raiz. Ao se deparar com a barreira da endoderme, o J2 faz uma curva e retorna pela raiz até encontrar um sítio próximo ao cilindro vascular, onde induz à formação das células gigantes ou nutridoras. A partir daí, inicia-se a fase sedentária do nematoide. Cada J2 induz a rediferenciação de cinco a sete células do parênquima radicular, as quais se tornam multinucleadas e hipertrofiadas (ABAD et al., 2009; JONES; GOTO, 2011; PERRY; MOENS, 2011). Em sua forma sedentária, o nematoide permanece se alimentando exclusivamente do conteúdo da célula nutridora, aumenta de tamanho e sofre três ecdises até atingir o estágio adulto (ABAD et al., 2009). A hiperplasia e hipertrofia das células do cilindro central e ao redor do corpo do nematoide levam ao surgimento das galhas, que podem ou não ser visíveis a olho nu. Apesar de ser o sintoma direto mais conhecido do ataque

deste nematoide, a ocorrência de galhas não é obrigatória nesta interação. Em algumas reações de compatibilidade, as galhas não se desenvolvem.

Melhoramento genético para resistência a nematoides

A resistência genética aos nematoides é mais frequentemente encontrada em espécies vegetais silvestres, o que dificulta o seu uso em programas de melhoramento, já que reunir resistência aos outros caracteres agronomicamente desejáveis é um processo dispendioso e que demanda longo tempo (CAROMEL; GEBHARDT, 2011). Um ponto chave no melhoramento visando à resistência a nematoides é que além das considerações habituais relativas à cultura, é imprescindível conhecer as espécies e, eventualmente, as diferentes raças dos nematoides presentes na região de cultivo, pois a variabilidade intraespecífica do patógeno poderá contribuir para a quebra da resistência (STARR; MERCER, 2010 apud MATSUO et al., 2012).

No hemisfério norte, o emprego da resistência genética tem se mostrado efetivo. Cultivares de fumo, tomate e algodão resistentes a *M. incognita*, assim como soja resistente a *Heterodera glycines* e batata resistente aos nematoides dos cistos (*Globodera rostochiensis*) são plantadas nos Estados Unidos. Outro exemplo é o cultivo de batata resistente a *Globodera* spp. cultivada no Reino Unido (STARR; BRIDGE; COOK, 2002).

Apesar de sua grande importância para cultivos em regiões tropicais, a condução de um programa de melhoramento para resistência a nematoides é mais complexo nessas áreas. O maior número de espécies e raças do patógeno existente em solos tropicais dificulta a identificação de cultivares resistentes (STARR; BRIDGE; COOK, 2002). Além disso, certos genes de resistência perdem sua eficiência em temperaturas elevadas, como é o caso do gene *Mi-1* em temperaturas superiores a 28°C. Mesmo nos casos em que a resistência a *Meloidogyne* spp. foi reportada, como em pimentão, berinjela, feijão e tomate, o uso de genótipos resistentes pode não ser efetivo em determinadas áreas. Essa situação reforça a necessidade de estudos mais aprofundados a respeito da resistência de plantas a nematoides.

Segundo Matsuo et al. (2012), existem atualmente programas visando obter resistência a nematoides em algodão, arroz, cana-de-açúcar, milheto, milho, sorgo,

soja e olerícolas. No Brasil, os programas de melhoramento de soja já disponibilizaram cultivares resistentes ou moderadamente resistentes a *H. glycines*, *M. incognita* e *M. javanica*. Cultivares resistentes a *Rotylenchulus reniformis* e a *Pratylenchus brachyurus* estão em desenvolvimento.

Mundialmente, estudos sobre a base genética e molecular da resistência de plantas a nematoides possibilitaram nas últimas décadas: *i*) a obtenção de marcadores moleculares com potencial uso em seleção assistida; *ii*) o mapeamento de genes e de QTL para resistência; *iii*) a clonagem de genes de resistência com potencial utilização em transgenia (CAROMEL; GEBHARDT, 2011). Um exemplo importante de seleção assistida foi a uso do marcador REX-1 para selecionar genótipos de tomateiro resistentes ao nematoide das galhas (WILLIAMSON 1994, 1998 apud CAROMEL; GEBHARDT, 2011). Ainda, genes de resistência a nematoides foram mapeados em batata, pimenta, algodão, trigo, beterraba, batata doce, amendoim, cenoura e café, e QTL foram identificados em soja, algodão, citros e uva (CAROMEL; GEBHARDT, 2011). Todavia, o conhecimento adquirido ainda permanece muito aquém do desejável do ponto de vista de sua aplicação.

Interação planta-nematoide

Como para qualquer patógeno biotrófico, o sucesso adaptativo dos nematoides depende de sua capacidade de estabelecer uma reação parasitária que não ocasione a morte do hospedeiro antes que o seu ciclo de vida se complete. Há constante pressão de seleção, que escolhe aqueles com maior habilidade de suprimir o sistema de defesa do hospedeiro e estabelecer os sítios de alimentação.

Os genes responsáveis por promover a interação parasitária são denominados genes de parasitismo e codificam proteínas secretadas pelo nematoide que interagem diretamente com as moléculas do hospedeiro, proporcionando a interação parasitária. Como exemplos podem ser citadas aquelas produzidas na hipoderme, nos anfídios ou nas glândulas do esôfago (BAUM; HUSSEY; DAVIS, 2007). A liberação direta de secreções pelo estilete do nematoide no citoplasma hospedeiro (Figura 1) faz com que alguns autores considerem esse sistema de secreção funcionalmente análogo aos sistemas secretores do tipo II ou III das bactérias patogênicas (JAOUANNET; ROSSO, 2013).

Sabe-se que as moléculas efetoras produzidas pelos nematoides são direcionadas a diferentes compartimentos celulares (ROSSO et al., 2011; QUENTIN; ABAD; FAVERY, 2013). A calreticulina (Mi-CRT) é secretada em abundância para o apoplasma celular por *M. incognita* durante a indução e a manutenção das células nutridoras, atuando como supressora da imunidade inata do hospedeiro (JOUANNET et al 2013 apud JAOUANNET; ROSSO, 2013). Dentre os efetores liberados no citoplasma, pode-se citar Hs19C07, secretado pelo nematoide dos cistos da beterraba (*Heterodera schachtii*), que interage com o transportador transmembranar de auxina LAX3. Acredita-se que este efector altera o influxo de auxina, permitindo a diferenciação da célula nutridora (LEE et al 2010 apud ROSSO; GRENIER, 2011). Efetores direcionados ao núcleo celular foram identificados interferindo diretamente na regulação transcricional do hospedeiro. Através de sistemas de duplo-híbrido, foram encontradas evidências da interação do efector 16D10, do nematoide das galhas, com um fator de transcrição putativo, SCARECROW (HUANG et al 2006 apud JAOUANNET; ROSSO, 2013), envolvido na organização radial das células radiculares (DILAURENZIO et al., 1996).

Se por um lado o nematoide produz uma série de efetores buscando sobrepujar o sistema de defesa do hospedeiro, por outro lado, a planta tenta resistir ao ataque. O maior sucesso no bloqueio da atuação parasitária do nematoide é alcançado pelas plantas imunes ou não hospedeiras, embora a resistência também possa ser encontrada em espécies hospedeiras. Uma cultivar resistente transforma o sítio de alimentação do nematoide em um verdadeiro campo de batalha, lançando mão de um arsenal químico capaz de matar a própria célula, isolar e exterminar o invasor, caracterizando a resposta de hipersensibilidade (*hypersensitive response* – HR). A HR ocorre em interações altamente específicas, nas quais um efector do patógeno é reconhecido por um gene de resistência do hospedeiro (SMANT; JONES, 2011).

Apesar do conhecimento atualmente disponível sobre a interação planta-nematoide ser incipiente, comparativamente ao que se conhece a respeito de outras interações, sabe-se que o reconhecimento do nematoide pelo hospedeiro é a etapa primordial para a ativação do sistema de defesa. Evidências experimentais mostram que alguns princípios da resposta de plantas ao ataque bacteriano podem ser estendidos para a resposta à infecção por nematoides.

Estudos sugerem que PAMPs (*Pathogens Associated Molecular Patterns*) derivados da quitina presente no estilete de nematoides podem desencadear a resposta imune de plantas (GOLINOWSKY et al, 1997 apud SMANT; JONES, 2011) e ocasionar a deposição de calose no local (Figura 1). Porém, PAMPs não são as únicas moléculas sinalizadoras da infecção por nematoides. A degradação das células do hospedeiro resultante da invasão pelo patógeno libera moléculas reconhecidas pelo sistema imune, as denominadas DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns*), importantes elicitores de resposta de defesa a patógenos. Além disso, uma ampla gama de efetores, produzida pelos nematoides, é reconhecida como sinal de perigo pelo hospedeiro.

Figura 1 - Representação esquemática das proteínas produzidas nas glândulas do esôfago (em vermelho) e das secreções anfídais do nematoide (identificadas pela seta tracejada), que interagem com as moléculas do hospedeiro e estabelecem a reação parasitária. As proteínas liberadas pelo nematoide podem atuar como ligantes extracelulares ou intracelulares; componentes de transdução de sinal; ser importadas para o núcleo; ou agir em organelas citoplasmáticas, modificando a célula hospedeira. Tais proteínas também atuam na formação do tubo de alimentação do nematoide (identificado pela cor laranja) (BAUM; HUSSEY; DAVIS, 2007)

Assim com em outras interações planta-patógeno, o processo de defesa atuante é classificado de acordo com a molécula responsável por sua ativação. O reconhecimento de PAMPs ocasiona a chamada PTI (*PAMP-triggered immunity*), pertencente ao sistema de imunidade basal de amplo espectro. Uma vez ativada a

PTI, o patógeno utiliza seus efetores para subvertê-la. A planta por sua vez, pode reconhecer o efector, ativando a ETI (*Effector triggered immunity*). Quando o reconhecimento ocorre via DAMP, recebe o nome de DAMP-*triggered immunity* (veja MAZZOTTA; KEMMERLING, 2011). As proteínas de resistência podem reconhecer diretamente as proteínas de avirulência do patógeno (Avr), atuando no modelo receptor ligante, ou podem atuar nos modelos guarda ou *decoy*, nos quais as proteínas R monitoram perturbações sofridas por outras proteínas do hospedeiro. Os sistemas de defesa baseados nos modelos guarda ou *decoy* possibilitam que um único gene R atue na resposta ao ataque por diferentes patógeno, como é o caso de Mi-1.2 que confere resistência aos nematoides das galhas e a alguns insetos (KALOSHIAN; DESMOND; ATAMIAN, 2011).

Apesar da planta utilizar diversas estratégias na tentativa de combater o patógeno, em muitos casos, não consegue vencê-lo, a reação de compatibilidade acontece e a doença se desenvolve.

Resistência e tolerância

No estudo das interações planta-nematoide encontra-se situação semelhante àquela dos demais patossistemas conhecidos, em que o desenvolvimento de doenças é uma exceção em meio à gama de patógenos aos quais as plantas estão expostas. Em sua maioria, as plantas são imunes ou não hospedeiras dos fitonematoides. Nestes casos, os nematoides não conseguem infectar as plantas, tampouco causar danos (ROBERTS, 2002).

Quanto ao conceito de resistência, torna-se necessário enfatizar que, em nematologia, o termo é usado para descrever a habilidade da planta em suprimir o desenvolvimento e a reprodução do nematoide. Pode ser classificada em diversos níveis, de resistência parcial a resistência completa, sendo determinada de forma relativa. Em uma planta resistente, a reprodução do nematoide é muito baixa ou quase nula, enquanto uma planta moderadamente resistente permite a reprodução intermediária. O termo suscetibilidade é usado para designar o oposto da resistência, ou seja, aos hospedeiros que permitem ao nematoide atingir elevadas taxas reprodutivas, resultando na expressão da doença associada à interação (ROBERTS, 2002).

Nas interações planta-nematoide, o hospedeiro também pode ser classificado de acordo com a sua habilidade de suportar os danos causados pelo patógeno. Hospedeiros tolerantes conseguem manter seu crescimento e uma boa produção, mesmo sob condições de alta infestação (JONES et al., 2013). Plantas resistentes geralmente são mais tolerantes às injúrias causadas, porém, resistência e tolerância podem ou não ocorrerem em um mesmo genótipo. Estudos mostram que em alguns casos, diferentes mecanismos genéticos controlam essas características (ROBERTS, 2002).

Em primeira instância, o plantio de cultivares tolerantes pode parecer benéfico à produção agrícola, no entanto, sabendo que os nematoides necessitam da planta hospedeira para sua sobrevivência, identifica-se um ponto chave nessa interação. Plantas tolerantes ao ataque do patógeno são capazes de produzir novas raízes e compensar os danos sofridos pelas raízes parasitadas (GRECO; DI VITO, 2009). Essa capacidade de suportar ao ataque pode trazer consequências prejudiciais, pois uma vez que novas raízes sejam produzidas, os patógenos terão mais tecidos para parasitar e conseqüentemente, maiores chances de reprodução, aumentando o inóculo na área.

No caso específico da resistência ao nematoide das galhas, genes de resposta ao ataque de nematoides bloqueiam ou suprimem uma ou mais etapas do parasitismo. São frequentemente específicos e sua eliciação e expressão podem ocorrer em vários níveis. Em linhas gerais, na resistência de plantas aos nematoides das galhas, podem estar envolvidos: *i)* vários genes de resistência de uma mesma espécie vegetal; *ii)* genes com resistência diferencial a espécies de *Meloidogyne*; *iii)* genes com resposta diferencial a populações de uma mesma espécie de *Meloidogyne* (WILLIAMSON; ROBERTS, 2009).

Diversas espécies cultivadas apresentam fontes de resistência a *Meloidogyne* spp. Em alguns casos, genes de resistência foram identificados e caracterizados (veja WILLIAMSON; ROBERTS, 2009), porém, a grande maioria das cultivares tem sua classificação de resistência determinada unicamente por avaliações do fator de reprodução (FR) do nematoide ou pelo índice de galhas desenvolvidas (veja MATSUO et al., 2012). Em muitas reações incompatíveis, o hospedeiro apresenta poucas galhas ao redor do sítio de infecção ou não as apresenta, dependendo dos mecanismos envolvidos na interação. No entanto, a não formação de galhas não significa que o hospedeiro seja resistente. Em alguns estudos, foram identificados

genes envolvidos na supressão de galhas e que não afetam a multiplicação do nematoide (veja WILLIAMSON; ROBERTS, 2009).

Perante isso, fica evidente que a classificação de resistência ao nematoides não é tão simples como, a princípio, se imagina. Como diversos processos podem ser envolvidos nesta interação, a resistência tanto pode ser monogênica, conferida por genes R específicos, como pode ser resultado da interação de vários genes, apresentando herança oligogênica ou poligênica. Devido à constante pressão exercida pelo patógeno para subverter os mecanismos de resistência do hospedeiro, a resistência quantitativa tende a apresentar maior estabilidade (ROBERTS, 2002).

O exemplo clássico de resistência aos nematoides das galhas é encontrado em tomateiro (*Solanum lycopersicum*). A maioria das cultivares atuais possui o gene *Mi* introgridido a partir da espécie *S. peruvianum*. Este gene confere resistência a *Meloidogyne* spp., mas perde sua eficiência a temperaturas superiores a 28°C (HUSSEY; JANSSEN, 2002; KALOSHIAN; DESMOND; ATAMIAN, 2011). Outros genes *Mi* foram identificados (*Mi-2* a *Mi-8*), com diferenças na efetividade e na sensibilidade a altas temperaturas (veja HUSSEY; JANSSEN, 2002). São genes R que reconhecem um fator de avirulência do nematoide (Avr), desencadeando uma cascata de sinais que normalmente culmina na HR e evita a colonização do sistema radicular pelo patógeno (JONES; GOTO, 2011). Provavelmente, dentre os genes *Mi* conhecidos, *Mi-1.2* é o melhor estudado, tendo sido identificado como responsável pela resistência a *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* e aos insetos *Macrosiphum euphorbiae* e *Bemisia tabaci* (veja WONDAFRASH; VAN DAM; TYTGAT, 2013). Este gene codifica uma proteína citoplasmática com domínio de ligação a nucleotídeos (NB-LRR) que interage com o efector *Mi-Cg1* produzido pelo nematoide e ativa o sistema imune da planta (SMANT; JONES, 2011). Mutações causadas no gene *Rme1* ocasionaram a perda de resistência a nematoides e afídios em tomateiro portador do gene *Mi-1.2*, sugerindo sua atuação no sistema guarda (KALOSHIAN; DESMOND; ATAMIAN, 2011).

Outros exemplos de genes de resistência aos nematoides das galhas são *Rmc1*, *Rmc2* e *Rmi1*. Os genes dominantes *Rmc1* e *Rmc2* foram encontrados em espécies silvestres de batata e atuam na resistência às espécies *M. chitwoodi*, *M. fallax* e *M. hapla*, de importância nos Estados Unidos e Europa. Já o gene *Rmi1* apresenta efeito aditivo e condiciona a resistência parcial de soja a *M. incognita* (HUSSEY; JANSSEN, 2002).

Estudo dos transcritomas da interação planta-nematoide

Em condições naturais, as plantas estabelecem múltiplas interações com microrganismos, a maioria delas benéfica ou não prejudicial. Proporcionalmente, a ocorrência de efeitos prejudiciais causados pelos microrganismos em plantas são muito inferiores às interações neutras ou benéficas. Apesar de mais raros, os efeitos nocivos são facilmente perceptíveis. O resultado das interações planta-microrganismo é igualmente influenciado por fatores de estresse abiótico como a seca, temperatura, salinidade, acidez do solo e alagamento (SCHENK; CARVALHAIS; KAZAN, 2012).

Em situações nas quais a planta entra em contato com microrganismos patogênicos, como fungos, oomicetos, vírus, bactérias e nematoides, inicia-se a ativação de mecanismos de defesa, que podem ou não culminar em reações de compatibilidade. As plantas possuem diversas frentes de defesa, como: barreiras pré-formadas, resistência específica (ou de não hospedeiro), resistência raça-específica e raça não específica e defesa basal (HAMMOND-KOSACK; PARKER, 2003). Patogênica ou não, toda a interação de plantas e microrganismos envolve complexos eventos de reconhecimento, levando à ativação de cascatas de sinalização e regulação de inúmeros genes. Conhecer os mecanismos envolvidos nessa sinalização pode favorecer o entendimento das relações planta-patógeno e, conseqüentemente, auxiliar na busca por resistência.

Neste contexto, o estudo do transcritoma é uma excelente alternativa para a identificação dos genes envolvidos na interação. Um transcritoma pode ser definido como o conjunto completo de transcritos de uma célula e sua abundância em um estágio específico de desenvolvimento ou condição fisiológica (WANDER et al., 2009 apud TAN et al., 2009). Diferentes estratégias podem ser empregadas para o estudo de transcritos como: bibliotecas de cDNA, microarranjo, SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), bibliotecas SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*), *differential display*, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) a partir de seqüências expressas (cDNA-AFLP) e RNAseq (RODRIGUES; MAFRA; MACHADO, 2013).

No que se refere a interação planta-nematoide, vários estudos de expressão diferencial foram realizados. Na década de 90, o gene *TobRB7* foi identificado em superexpressão, em uma biblioteca de cDNA construída a partir de células gigantes

de fumo infectado por *Meloidogyne* sp. (OPPERMAN et al., 1994 apud ESCOBAR; BROWN; MITCHUM, 2011). Ainda a partir de bibliotecas de cDNA foram detectados genes diferencialmente expressos em alfafa e tomate, infectados por *Meloidogyne* sp., e em soja infectada por *Heterodera glycines*.

O primeiro estudo de microarranjo relatado foi a análise comparativa entre os genes expressos em raízes de *A. thaliana* infectadas por *H. glycines* (reação incompatível) e os genes expressos em resposta a *H. schachtii* (reação compatível). As análises mostraram um total de 128 genes diferencialmente expressos e confirmaram relatos anteriores que, em reações de compatibilidade, o nematoide altera a regulação de genes envolvidos: na resposta a hormônios, na modificação da parede celular e no ciclo celular, resultando no desenvolvimento do sincício (PUFHOF et al., 2003 apud ESCOBAR; BROWN; MITCHUM, 2011).

Vários trabalhos de expressão gênica na interação planta-nematoide foram desenvolvidos utilizando microarranjos (ESCOBAR; BROWN; MITCHUM, 2011) e, mais recentemente, foram publicados resultados de expressão diferencial avaliada pela construção de bibliotecas de cDNA (BARBOSA et al., 2009) e RNAseq (BENEVENTI et al., 2013; JI et al., 2013). A partir de bibliotecas de cDNA foram detectados genes diferencialmente expressos na interação *M. incognita*-*Gossypium hirsutum* (BARBOSA et al., 2009). Os autores avaliaram os genótipos de algodoeiro resistentes e suscetíveis a *M. incognita* e perceberam que 20 genes foram expressos unicamente na reação incompatível, sendo relacionados ao reconhecimento do patógeno, transdução de sinal, mecanismos de defesa, síntese, transporte e ativação de proteínas. Estudando a interação soja-*M. javanica*, Beneventi et al. (2013) detectaram a indução de hormônios e de genes de resposta a estresse, bem como o aumento de metabolismo de carboidratos.

RNAseq

Apesar de todas as tecnologias acima apresentadas serem úteis nas análises de transcritomas, observa-se que a introdução de novas tecnologias tende a superar limitações antes existentes, e resultar em avanços significativos na compreensão de processos biológicos. Situação como essa foi verificada há algumas décadas atrás com o surgimento dos microarranjos, permitindo avaliar, simultaneamente, mudanças no nível de expressão de muitos genes (WESTERMANN; GORSKI; VOGEL, 2012). O mesmo parece acontecer com a introdução da tecnologia

RNAseq, que permite a análise de milhões de transcritos e pode ser empregada para avaliações simultâneas de sequências expressas oriundas de diferentes organismos (*Dual RNAseq*), tendo alta aplicabilidade em estudos de interação patógeno-hospedeiro (WESTERMANN; GORSKI; VOGEL, 2012).

Basicamente, RNAseq consiste no sequenciamento em larga escala de regiões transcritas, gerando pequenos fragmentos (*reads*) com tamanho variável (30 - 400 pb), de acordo com a plataforma de sequenciamento empregada. O RNA é convertido em cDNA que é ligado a adaptadores, que possuem sequências complementares às dos *primers* usados nas reações de sequenciamento. Os adaptadores podem ser ligados a uma (*single end*) ou a ambas as extremidades dos fragmentos (*paired-ends*), permitindo o sequenciamento dos fragmentos em duas direções (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Após o sequenciamento, os milhões de *reads* gerados são submetidos a análises de bioinformática para a discriminação das sequências oriundas dos dois organismos sequenciados (*Dual RNAseq*) e análise do transcrito. Resumidamente, as etapas de análise consistem em: *i*) avaliação da qualidade das sequências; *ii*) filtragem dos dados de acordo com os critérios de qualidade adequados; *iii*) alinhamento dos transcritos com sequências de referência; *iv*) normalização dos dados; *v*) quantificação das sequências expressas e análise da expressão diferencial; *iv*) anotação funcional (RAMSKÖLD; KAVAK; SANDBERG, 2012). Na inexistência de genomas de referência ou quando o genoma referência não é anotado, utiliza-se a abordagem '*de novo assembly*' para a montagem do transcrito (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009; ROBERTSON et al., 2010). Várias metodologias de análise de dados de RNAseq estão atualmente disponíveis, no entanto, muitos bioinformatas procuram adaptar os *softwares* disponíveis para as necessidades dos dados oriundos de diversas áreas da Biologia, que utilizam dessa metodologia de sequenciamento. Como exemplo de projetos amplamente difundidos, se pode citar os *softwares* livres disponíveis no repositório Bioconductor (www.bioconductor.org) e na plataforma Galaxy (GOECKS et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido através de uma parceria entre dois laboratórios da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. As etapas nematológicas foram realizadas no Laboratório de Nematologia, pertencente ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia e os estudos moleculares foram realizados no Laboratório de Genética Molecular de Plantas Cultivadas, pertencente ao Departamento de Genética.

3.1 Avaliação da reação de cultivares de feijoeiro ao nematoide das galhas e preparo do inóculo

Primeiramente, foi conduzido um experimento preliminar com o intuito de avaliar a resposta de diferentes genótipos de feijoeiro a *Meloidogyne incognita* e selecionar aquele que apresentasse resistência ou menor grau de suscetibilidade ao nematoide. Para isso, foram utilizadas 18 cultivares de feijoeiro comum (Tabela 1), sendo que um milho (híbrido DKB330) e um algodoeiro (Fibermax 966) foram usados como padrões de suscetibilidade. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, seguindo o delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento e um total de 120 parcelas.

As sementes foram semeadas em rolos de papel Germitest® (CIAL) umedecidos, e mantidas a 28°C por três dias. Após este período, as plântulas foram transferidas para sacos de polietileno (1 L), contendo terra (73% areia, 20% argila, 7% silte) autoclavada a 120°C por 2 h.

O inóculo de *M. incognita* foi multiplicado em plantas de algodão e milho por um período de 60 dias e, em seguida, extraído dos sistemas radiculares utilizando-se o método de liquidificador, peneiramento e flutuação centrífuga em solução de sacarose (COOLEN; D'HERDE, 1972). Posteriormente, determinou-se a concentração de nematoides (ovos/mL) do inóculo e procedeu-se à inoculação.

A inoculação com *M. incognita* ocorreu quatro dias após o transplante, em dois orifícios cilíndricos abertos no solo, o primeiro com 7 mm de diâmetro e 20 mm de profundidade e o outro com 7 mm de diâmetro e 40 mm de profundidade. Calibrou-se a suspensão do inóculo para 150 espécimes (ovos + J2)/mL. Posteriormente, inoculou-se 2 mL da suspensão por planta, perfazendo uma população inicial (P_i) de 300 espécimes. Sessenta e oito dias após a inoculação, os

nematoides foram extraídos dos sistemas radiculares (COOLEN; D'HERDE, 1972) e quantificados em lâmina de Peters sob microscópio óptico. Posteriormente, foram calculados: a população final (P_f), o número de nematoides/g de raiz (Nem./g) para cada parcela e o fator de reprodução [$FR = (P_f)/(P_i)$], segundo OOSTENBRINK (1966). Os valores das variáveis FR e Nem./g foram submetidos à transformação $\log x$ e posteriormente à análise de variância usando-se o *software* InfoStat (DI RIENZO et al., 2008). Os valores médios de cada variável foram comparados pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Por fim, as cultivares avaliadas foram classificadas de acordo com os valores de FR.

Tabela 1 – Cultivares de feijoeiro comum, grupo comercial e procedência

Grupo	Procedência				
	USP/CENA ¹	Embrapa ²	FT Sementes ³	IAC ⁴	IAPAR ⁵
Preto		Diamante Negro BRS Grafite	FT Nativo	Rio Tibagi	IAPAR 44
Carioca		Aporé BRS Requite BRS Pérola BRS Pontal		Carioca	IAPAR 31 IPR Siriri IPR Saracura
Roxinho		BRS Pitanga			
Rosinha		BRS Vereda			
Tipo Jalo		Jalo Precoce			
Crioulo	Serro Azul Brilhante Serro Azul Fosco				

¹Universidade de São Paulo/Centro de Energia Nuclear na Agricultura <<http://goo.gl/jgLLjm>>

²Embrapa Arroz e Feijão <<http://www.cnpaf.embrapa.br>>

³FT Sementes <<http://www.ftsementes.com.br/feijao.php>>

⁴Instituto Agrônomo de Campinas <<http://www.iac.sp.gov.br/>>

⁵Instituto Agrônomo do IAPAR <<http://goo.gl/HMYZOG>>

3.2 Determinação dos períodos de coleta de RNA das plantas inoculadas

Uma vez escolhido o genótipo de feijoeiro, tornou-se necessário determinar os períodos mais adequados para a extração de RNA e construção da biblioteca de RNAseq. Isso porque, desejava-se amostrar os genes expressos pelo feijoeiro nas diferentes etapas do ataque do nematoide, as quais podem ser evidenciadas por meio da visualização dos estádios de desenvolvimento do patógeno no interior da planta (Figura 2). Para tanto, foi conduzido, em casa de vegetação, um ensaio inteiramente casualizado, no qual uma única cultivar de feijoeiro (IPR Saracura) foi avaliada em oito diferentes períodos quais sejam: 1, 2, 4, 10, 16, 22, 30 e 36 dias após a inoculação com *M. incognita*. O inóculo foi obtido pelo método de Baermann modificado para recipiente raso (HOOPER, 1986) e cada planta foi inoculada com 1000 juvenis infectantes (J2). Quatro repetições foram usadas, totalizando 32 parcelas. As raízes foram submetidas à coloração por fucsina ácida (BYBD; KIRKPATRICK; BARKER, 1983) e examinadas sob microscópio ótico, visando à visualização dos nematoides em seu interior.

Figura 2 - Ciclo de vida de *M. incognita* e seus estádios do desenvolvimento no interior radicular (AGRIOS, 2004)

3.3 Ensaio de inoculação para a construção das bibliotecas de expressão

Após determinados os períodos de coleta de RNA (item 3.2), foi realizado um ensaio visando coletar as amostras para a construção das bibliotecas de expressão, conduzido em uma gaiola anti-afídeos (Figura 3) montada no interior de uma casa de vegetação. Esta gaiola foi confeccionada para evitar eventuais ataques de insetos.

Figura 3 - Ensaio de inoculação de feijoeiro comum com *M. incognita* aos 2 DAI. O primeiro conjunto de plantas foi destinado à construção das bibliotecas de expressão e o segundo para fins de cálculo do FR

Coleta de raízes para a construção das bibliotecas de expressão

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, constando de dois tratamentos (inoculado e controle), com 24 repetições por tratamento, totalizando 48 plantas. A inoculação foi realizada conforme descrito no item 3.2. As avaliações foram feitas aos 3, 4, 10 e 30 DAI. Para cada avaliação, foram coletadas seis plantas inoculadas e seis plantas controle (Figura 4). Nos períodos de avaliação, cada uma das plantas foi retirada do saco plástico e suas raízes foram cuidadosamente lavadas em água corrente para retirar a terra. Em seguida, as raízes foram lavadas em 50 mL de uma solução 20% de NaOCl comercial (4 min). As raízes foram novamente lavadas em água corrente por 30 s e depois colocadas em béqueres

contendo 100 mL de água, nos quais ficaram imersas durante 15 min. A imersão do sistema radicular em água promoveu a retirada do resíduo de hipoclorito de sódio das amostras (Figura 5). Durante todas as etapas de limpeza, as plantas permaneceram intactas para evitar a oxidação dos tecidos e a degradação do RNA. Ao final, a parte aérea foi separada do sistema radicular. As raízes foram então separadas longitudinalmente em duas porções (Figura 6). Uma delas foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C , para ser utilizada na extração de RNA. A outra porção foi utilizada no processo de coloração, descrito a seguir.

As raízes foram colocadas em uma solução aquosa 50:1 do corante fucsina ácida¹ e submetidas ao banho-maria por 30 s a 100°C . Em seguida, as amostras radiculares foram resfriadas à temperatura ambiente e transferidas para recipientes de vidro contendo 20 mL de glicerina acidificada². Novamente, as amostras foram levadas ao banho-maria até atingir 100°C . A glicerina acidificada promoveu a clarificação do tecido radicular, permitindo que os nematoides corados fossem visualizados no interior das raízes, utilizando-se o microscópio Olympus modelo BX50 e câmera digital Optika modelo Optikam B3. Além disso, a glicerina permitiu a conservação das amostras durante vários meses.

¹ Corante fucsina ácida: 3,5 g.L⁻¹ de fucsina ácida; 250 mL.L⁻¹ de ácido acético; água destilada qsp

² Glicerina acidificada: glicerina acidificada com HCl 5N

Figura 4 - Representação esquemática do número de repetições utilizado

Figura 5 - Representação esquemática da coleta de raízes de feijoeiro comum provenientes da inoculação com o nematoide. Etapas: 1, Retirada dos sacos plásticos; 2, 3 e 4, Lavagem das raízes em água corrente, em solução de NaOCl (20% da mistura comercial) e em água corrente; 5, Imersão das raízes em água; 6 e 7, Descarte da parte aérea e separação do sistema radicular para coloração com fucsina ácida e extração do RNA

Figura 6 - Representação esquemática da separação longitudinal das raízes de feijoeiro comum provenientes da inoculação com o nematoide. 1. Porção radicular destinada à coloração para visualização dos nematoides no interior radicular; 2. Porção radicular destinada à extração de RNA total

Cálculo do FR

Em paralelo, o segundo conjunto de plantas composto por 10 amostras inoculadas e 10 controles foi avaliado aos 68 DAI. As amostras foram processadas de acordo com o procedimento descrito no item 3.1 e observadas sob microscópio ótico, utilizando lâmina de Peters. O tratamento inoculado foi utilizado para o cálculo do FR e o tratamento controle foi empregado para verificar uma possível contaminação das amostras pelo nematoide.

3.4 Extração de RNA

As raízes de IPR Saracura (item 3.3) foram maceradas em nitrogênio líquido para fins de extração de RNA total usando o reagente TRIzol® (Invitrogen), de acordo com o protocolo resumido a seguir.

Aproximadamente 200 mg de tecido radicular macerado e congelado foram adicionados a microtubos com capacidade para 2 mL, pré-resfriados em nitrogênio

líquido. Em seguida, foi adicionado 1 mL de TRIzol a cada amostra. As misturas resultantes foram homogeneizadas e incubadas em gelo por 5 min., permitindo a dissolução das nucleoproteínas. Foram então adicionados 0,2 mL de clorofórmio a cada microtubo, com posterior homogeneização. As amostras foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugadas a 11.000 rpm e 4°C por 15 min. Após a centrifugação, a fase aquosa superior (contendo o RNA) foi transferida para novos microtubos. Seguiu-se a precipitação do RNA pela adição de 0,5 mL de isopropanol e centrifugação das amostras a 11.000 rpm a 4°C por 10 min. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75%. As amostras foram novamente centrifugadas (9.500 rpm a 4°C por 5 min) e o sobrenadante foi descartado. Os *pellets* foram parcialmente secos à temperatura ambiente e, por fim, dissolvidos em 20 µL de água tratada com DEPC 0,01%. Em todas as etapas, foi utilizada a centrífuga da marca Eppendorf® com o rotor F-45-30-11. Finalizando, foram adicionadas 3 U da enzima RQ1 DNase (Promega) e 3 µL de tampão de reação 10 x (Promega) a cada uma das amostras de RNA, que foram incubadas a 37°C por 30 min.

A concentração e a qualidade das amostras de RNA total foram estimadas por espectrofotometria, no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo), nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. Foram consideradas como amostras de boa qualidade apenas aquelas que apresentaram valores da razão de absorbância (A_{260}/A_{280}) entre 1,8 e 2,1. Além disso, a integridade das amostras foi confirmada por eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose 1,5% contendo formaldeído 2% e o corante SYBR Safe (0,5x) em tampão TAE 1x. O resultado da eletroforese foi visualizado sob luz UV e digitalizado utilizando-se o equipamento de fotodocumentação Multi Doc-It Digital Imaging System (UVP).

3.5 Construção das bibliotecas de RNAseq

A construção e o sequenciamento das bibliotecas de RNAseq foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP.

3.5.1 Preparo das amostras de RNA

Para a construção das bibliotecas de RNAseq, foram preparadas diluições do RNA total de cada amostra, de modo a obter uma concentração de 500 ng/µL. A

qualidade do RNA foi novamente verificada, utilizando o equipamento 2100 Bioanalyser (Agilent) e o protocolo Agilent RNA 6000 Nano Assay. A construção das bibliotecas de RNAseq *paired-end* foi feita usando o kit “TruSeq RNA Sample Prep v2 Low Throughput (LT)” (Illumina), de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante e descritos a seguir.

3.5.2 Obtenção do RNAm

Como o intuito deste trabalho foi identificar os transcritos envolvidos no interatoma *P. vulgaris*-*M. incognita*, fez-se necessário isolar somente o RNAm presente nas amostras. Para tanto, utilizou-se a etapa de purificação que consta do kit de sequenciamento. O RNAm foi separado do RNA total pela utilização de *beads* magnéticas ligadas a moléculas poli-T, capazes de capturar o RNAm devido a sua complementariedade à cauda poli-A. Primeiramente, o RNA total foi eluído em 50 µL de água ultrapura livre de nucleases. Em seguida, foram adicionados a cada amostra, 50 µL da solução *RNA purification beads* (kit Illumina), previamente ressuspendida. Após a homogeneização das amostras por pipetagem, estas foram submetidas à desnaturação em termociclador (65 °C por 5 min, com finalização a 4 °C). Após desnaturadas, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente (5 min), permitindo a ligação das *beads* à cauda poli-A do RNAm; para separá-las do restante da solução, a placa contendo as amostras foi colocada sobre um suporte magnético, no qual permaneceu por 5 min. Assim, o RNAm ficou temporariamente aderido a lateral da placa, enquanto o volume total de solução foi removido por pipetagem.

Realizou-se, então, a limpeza das amostras em 200 µL do *Bead Washing Buffer* (kit Illumina). Após a homogeneização da solução por pipetagem, as amostras foram novamente colocadas no suporte magnético (5 min) para separação da solução de limpeza. Todo o sobrenadante foi removido e assim foram descartadas as moléculas de RNAr e demais contaminantes. Em seguida, foram adicionados 50 µL de *Elution Buffer* (kit Illumina) às amostras, as quais foram levadas ao termociclador (80°C por 2 min, com finalização a 25°C) promovendo, assim, a separação do RNAm das *beads* magnéticas e a finalização desta etapa.

3.5.3 Fragmentação do RNAm

Após a purificação, o RNAm foi novamente ligado a *beads* magnéticas, com a

adição de 50 μ L do *Bead Binding Buffer* (kit Illumina) às amostras, com posterior incubação à temperatura ambiente (5 min). A placa de amostras foi então colocada sobre o suporte magnético por 5 min. Uma vez que o RNAm ligado às *beads* ficou aderido à placa de amostras, todo o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, realizou-se uma limpeza das amostras pela adição de 200 μ L de *Bead Washing Buffer* e incubação à temperatura ambiente (5 min). A placa foi colocada sobre o suporte magnético (5 min) e o sobrenadante descartado. Em seguida, retirou-se a placa e adicionaram-se 19,5 μ L de *Elute, Prime, Fragment Mix* (kit Illumina) a cada amostra. Realizou-se a homogeneização por pipetagem e estas foram levadas ao termociclador (94°C por 8 min, com finalização a 4°C) para a eluição, fragmentação e preparo do RNAm para a síntese de cDNA.

3.5.4 Síntese do cDNA

As amostras foram retiradas do termociclador e colocadas sobre o suporte magnético por 5 min. Em seguida, 17 μ L do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa de PCR. A cada uma das amostras foram adicionados 1 μ L da transcriptase reversa *Super Script II* e 7 μ L de *First Strand Master Mix* (kit Illumina). Após a homogeneização, a placa foi selada e levada ao termociclador para a síntese da primeira fita de cDNA. A ciclagem de amplificação constou de 10 min a 25°C, 50 min a 42°C e 15 min a 70°C e finalização a 4°C. Terminada a síntese da primeira fita de cDNA, procedeu-se imediatamente a síntese da segunda fita. Para tanto, foram adicionados 25 μ L de *Second Strand Master Mix* (kit Illumina) a cada amostra, com homogeneização por pipetagem. A placa foi novamente vedada com folha adesiva e incubada a 16°C por 60 min em termociclador. Posteriormente, 90 μ L de *AMPure XP beads* (kit Illumina) foram adicionados aos 50 μ L de cDNA dupla fita resultantes da etapa anterior. Seguiu-se com a incubação das amostras à temperatura ambiente (15 min). Ao final desse período, a placa foi colocada sobre suporte magnético (5 min), promovendo a fixação das moléculas de cDNA ligadas às *beads* à placa de PCR. Daí, foram descartados 135 μ L de sobrenadante. Visando eliminar os resíduos de tampão e demais reagentes, foram realizadas duas etapas de limpeza, adicionando-se 200 μ L de etanol 80% (v/v) às amostras, com incubação à temperatura ambiente por 30 s. O etanol foi descartado e as amostras foram deixadas à temperatura ambiente para secarem (15 min). Em seguida, a placa de amostras foi retirada do suporte magnético, 52,5 μ L de *Resuspension Buffer* (kit

Illumina) foram adicionados e homogeneizados por pipetagem, com incubação à temperatura ambiente (2 min). A placa foi novamente colocada sobre o suporte magnético (5 min). Finalizando, 50 µL do sobrenadante, contendo cDNA dupla fita purificado, foram transferidos para uma nova placa de PCR.

3.5.5 Reparo das extremidades

Nesta etapa, as extremidades resultantes da fragmentação do RNA foram reparadas pela ação de enzimas polimerases e exonucleases que promovem o preenchimento das extremidades 5' e a remoção das bases sobressalentes da extremidade 3' permitindo, assim, a ligação dos adaptadores. Foram adicionados às amostras de cDNA dupla fita, 10 µL de uma diluição *End Repair Control* (1 µL *End Repair Control* + 99 µL *Resuspension Buffer*) e 40 µL de *End Repair Mix* (kit Illumina). A mistura foi homogeneizada por pipetagem, a placa foi vedada com uma folha adesiva e incubada em termociclador a 30°C por 30 min. Ao final da incubação, adicionaram-se 160 µL de *AMPure XP Beads* às amostras, com homogeneização e incubação à temperatura ambiente (15 min). A placa foi então colocada sobre o suporte magnético (5 min) e depois duas alíquotas de 127,5 µL de sobrenadante foram descartadas. Com a placa ainda sobre o suporte, foram realizadas duas etapas de limpeza, nas quais 200 µL de etanol 80% (v/v) foram adicionados às amostras à temperatura ambiente somente por 30 s. O etanol foi descartado e a placa deixada para a secagem (15 min). Daí, a placa foi retirada do suporte, adicionaram-se 17,5 µL de *Resuspension Buffer* e a incubação se deu à temperatura ambiente (2 min). A placa foi novamente colocada sobre o suporte magnético (~5 min), no qual permaneceu até que a solução ficasse transparente. Em seguida, 15 µL do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa de PCR.

3.5.6 Adenilação da extremidade 3'

Para evitar ou reduzir a taxa de formação de quimeras geradas pela junção de dois fragmentos *templates*, realizou-se a adenilação das extremidades 3'. A adição de uma adenina aos fragmentos abruptos evita que se liguem entre si durante a etapa de ligação dos adaptadores. Estes, por sua vez, possuem uma timina na extremidade 3', que é complementar à adenina do fragmento *template*, favorecendo a ligação. A placa de PCR contendo as amostras resultantes da etapa de reparo das extremidades foi centrifugada a 280 g durante 1 min. Posteriormente, foram

adicionados 2,5 µL da diluição 1:100 do tampão de controle *A-Tailing Control* (99 µL *Resuspension Buffer* + 1 µL *A-Tailing Control*) (kit Illumina) a cada amostra. Fez-se a homogeneização das amostras por pipetagem, seguida pela adição de 12,5 µL de *A-Tailing Mix* (kit Illumina). A placa foi vedada com o adesivo apropriado e incubada em termociclador pré-aquecido a 37°C por 30 min.

3.5.7 Ligação dos adaptadores

Nesta etapa ocorre a ligação de adaptadores com múltiplos *index* às extremidades do cDNA, possibilitando sua hibridização à *flowcell* de sequenciamento. A cada amostra foram adicionados 2,5 µL do tampão da DNA ligase e 2,5 µL da diluição (1:100) do tampão *Ligase Control* (99 µL *Resuspension Buffer* + 1 µL *Ligase Control*) (kit Illumina). Em seguida, foram adicionados 2,5 µL de cada adaptador *RNA Adapter Index* (AR001-AR012) (kit Illumina), de acordo com as amostras a serem sequenciadas. Foi feita a homogeneização por pipetagem, a placa foi selada com adesivo e incubada em termociclador pré-aquecido a 30°C por 10 min. Para finalizar a ligação, foram adicionados 5 µL de *Stop Ligase Mix* (kit Illumina) a cada amostra, com posterior homogeneização. Procedeu-se uma nova etapa de limpeza das amostras adicionando-se 42 µL de *AMPure XP Beads* às amostras, com homogeneização e incubação a temperatura ambiente (15 min). A placa foi colocada sobre o suporte magnético (5 min) e 79,5 µL de sobrenadante foram descartados. Em seguida, realizou-se a limpeza das amostras de acordo com o descrito no item 3.5.4, resultando em 50 µL, aos quais foram adicionados 50 µL de *AMPure XP Beads*. Após homogeneização e incubação à temperatura ambiente por 15 min, descartaram-se 95 µL de sobrenadante. O volume restante foi submetido à dupla limpeza com etanol 80% (v/v), como descrito anteriormente. As amostras foram ressuspensas em 22,5 µL de *Resuspension Buffer* e incubadas à temperatura ambiente por 2 min. Por fim, 20 µL do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa de PCR para serem utilizados nas etapas subsequentes.

3.5.8 Enriquecimento da biblioteca

Esta etapa visa promover uma amplificação para selecionar e aumentar o número de cópias dos fragmentos de DNA que possuem adaptadores ligados às duas extremidades. Para isso, é utilizado na PCR um coquetel de *primers*

complementares aos adaptadores utilizados. Foram adicionados 5 μ L de PCR *Primer Cocktail* e 25 μ L de PCR *Master Mix* (kit Illumina) a cada amostra. Em seguida, realizou-se a homogeneização por pipetagem. A amplificação se deu inicialmente por 30 s a 98°C, seguindo-se 15 ciclos de 10 s a 98°C, 30 s a 60°C e 30 s a 72°C. A extensão final dos fragmentos foi feita por 5 min a 72°C. Ao final, foi realizada uma nova etapa de limpeza, com a adição de 50 μ L de *AMPure XP Beads* às amostras, homogeneização e incubação à temperatura ambiente (15 min). A placa foi colocada sobre o suporte magnético (5 min) e fez-se o descarte de 95 μ L de sobrenadante, seguindo-se a etapa de dupla limpeza em etanol 80% (v/v). A ressuspensão das amostras foi feita em 32,5 μ L de *Resuspension Buffer*, conforme descrito no item 3.5.4. Em seguida, 30 μ L do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa de PCR.

3.5.9 Quantificação das bibliotecas e sequenciamento

Anteriormente a quantificação, foi realizada a avaliação de qualidade das bibliotecas usando o equipamento 2100 Bioanalyser (Agilent) com o chip específico para DNA, Agilent DNA-1000, seguindo as recomendações do fabricante. Fez-se a quantificação preliminar das bibliotecas em fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen). Em seguida, procedeu-se a quantificação por PCR quantitativa (qPCR), usando a metodologia descrita em *Sequencing Library qPCR Quantification Guide* (Illumina™) e o termociclador StepOne (Applied Biosystems®). Resumidamente, o procedimento consta de uma qPCR com uma diluição seriada de uma amostra controle e as amostras das bibliotecas em uma concentração estimada de 2nM. As diluições foram feitas em Tween 20 (0,1%). Para a amostra controle, realizou-se uma curva de diluição variando de 20 a 0,0002 pM. As reações de amplificação foram compostas de 2 μ L de DNA (do controle ou da biblioteca); 0,2 μ M do qPCR Primer 1 (5' AATGATACGGCGACCAACGAGAT 3'); 0,2 μ M do qPCR Primer 2 (5' CAAGCAGAAGACGGCATACGA 3'); 2X do tampão *KAPA SYBR FAST Master Mix Universal* (Kapa Biosystems) e água ultrapura livre de nucleases para completar o volume (20 μ L). O programa de amplificação iniciou-se a 95°C por 10 min, seguindo-se 40 ciclos a 95°C por 10 s e a 60°C por 30 s. Após a quantificação das bibliotecas, o sequenciamento se deu no aparato MyScan (Illumina). Foram sequenciadas 6 bibliotecas por *lane* da *flowcell*, em uma concentração inicial de 17 pM de DNA por *lane*.

3.6 Análises das sequências

Os dados foram analisados com base nos algoritmos de análise de transcriptoma implementados no *software* CLC Genomics Workbench® (versão 7).

3.6.1 Avaliação da qualidade das sequências e filtragem dos dados

Para iniciar as análises, todas as sequências obtidas por RNAseq foram importadas para a área de trabalho do CLC Genomics Workbench. A importação dos dados foi feita selecionando-se a opção *Illumina paired end sequence* com distância entre *reads* mínima de 100 pb e máxima 200 pb. O parâmetro de determinação de qualidade foi *Illumina Pipeline 1.8 and later*. Posteriormente, foi realizada a avaliação da qualidade das sequências por meio de *QC reports* e a eliminação das sequências de baixa qualidade a partir do *Quality Trimmer*. Como parâmetros utilizaram-se: *i)* *Quality score* igual a 0,01, permitindo a existência de uma base errada a cada 100 pb; *ii)* número máximo de nucleotídeos ambíguos igual a 2; *iii)* tamanho mínimo das *reads* obtidas igual a 50 pb. Para garantir que somente regiões com alta qualidade de sequenciamento fossem selecionadas, optou-se pela eliminação de 5 nucleotídeos da extremidade 5' e 1 nucleotídeo da extremidade 3' de cada uma das sequências analisadas.

3.6.2 Mapeamento de *reads* e identificação de transcritos

As sequências com alta qualidade foram alinhadas aos genomas de referência, para a identificação de genes e demais transcritos. Dessa forma, duas análises independentes foram realizadas, uma delas tendo como referência o genoma de *P. vulgaris* e a outra, o genoma de *M. incognita*.

A versão Pvulgaris_218, do genoma do feijoeiro 'G19833', disponível no banco de dados Phytozome (<http://goo.gl/fV40pE>) foi adotada. Para o mapeamento das bibliotecas, foi empregada a ferramenta *RNA-Seq Analysis*, do pacote computacional CLC Genomic Workbench®. Fez-se a anotação do genoma de referência usando as informações de genes e transcritos e o mapeamento das sequências de cada biblioteca em modo *batch*, permitindo a análise dos resultados de forma individualizada. As regiões intergênicas do genoma de referência foram incluídas na análise de mapeamento.

Como parâmetros utilizaram-se: i) penalidade para *mismatches*: 2; ii) penalidade para inserção: 3; iii) custo para deleção: 3; iv) fração mínima de comprimento: 0,90 v) fração mínima de similaridade: 0,95; v) número máximo de *hits* por *read*: 10; e distância entre *paired reads* determinada automaticamente. Os valores de expressão gênica foram contabilizados em RPKM (*Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads*), inclusive para os genes sem anotação de RNAm, como por exemplo, RNAt. Os valores de RPKM foram obtidos de acordo com a equação apresentada a seguir (MORTAZAVI et al., 2008).

$$RPKM = \frac{\text{total de exons}}{\text{número de reads mapeadas (em milhões)} \times \text{comprimento dos exons (Kb)}}$$

Em que,

- total de exons: número total de *reads* mapeadas em exons;
- comprimento dos exons: soma do comprimento de todos os exons;
- número de *reads* mapeados: total de *reads* mapeados.

O procedimento descrito acima foi também adotado para o mapeamento dos *reads* no genoma de *M. incognita*, projeto PRJEA28837, versão WS241, disponível no banco de dados Wormbase (http://www.wormbase.org/species/m_incognita#0--10).

3.6.3 Análise quantitativa da expressão gênica

Após o alinhamento dos *reads* com os genomas de referência, as sequências mapeadas foram usadas na determinação da expressão gênica diferencial putativa. Inicialmente, foram analisados os genes diferencialmente expressos durante a interação *P. vulgaris*-*M. incognita* aos 4 DAI, visando identificar os genes mais atuantes no início do processo. Uma segunda comparação foi feita entre os genes expressos no tratamento controle e no tratamento inoculado aos 10 DAI, fase na qual os nematoides já estabeleceram seus sítios de alimentação no interior do hospedeiro.

As comparações foram definidas no *software* CLC Genomics, através da opção *Set Up Experiment*, pertencente ao conjunto de ferramentas destinadas as análises de transcritomas.

A existência de genes diferencialmente expressos foi verificada pela análise empírica de expressão diferencial, implementada no mesmo pacote (CLC Genomics Workbench[®], versão 7) e baseada na metodologia *Exact Test* (ROBINSON; SMYTH, 2008). Essa metodologia é apropriada para análises comparativas de dados de contagem de dois grupos de amostras. Assume uma distribuição binomial negativa e leva em consideração a variação existente entre as amostras de cada grupo de comparação (ROBINSON; SMYTH, 2008; CLC BIO, 2014). Foram considerados diferencialmente expressos os genes que apresentaram uma razão de expressão (*Fold-change*) com valor mínimo absoluto igual a 4. A significância estatística foi determinada considerando o *p-valor* corrigido para múltiplos testes pela metodologia FDR (*False Discovery Rates*) (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995) e o nível de significância $\alpha = 0,05$.

3.6.4 Anotação das sequências

A anotação das bibliotecas de expressão foi realizada a partir da determinação da função putativa das sequências genômicas contra as quais as bibliotecas foram mapeadas. Para isso, foi utilizado o *software* Blast2GO[®], versão 2.7.1 (CONESA et al., 2005). As sequências foram comparadas com aquelas presentes no banco de dados do NCBI, empregando o algoritmo BLASTx e considerando um número máximo de 10 *hits* por entrada e o *Expect Value* mínimo de 10^{-6} ($Evalue \leq 1.10^{-6}$). Em seguida, realizou-se o mapeamento dos termos do *Gene Ontology* (THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2000) e a anotação das sequências, usando os parâmetros *default* do Blast2GO.

Paralelamente, foi realizada a anotação funcional dos transcritos diferencialmente expressos a partir do BLASTx com sequências de *Arabidopsis thaliana*, presentes no banco de dados protéico TAIR10 (<http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>), empregando a ferramenta TAIR BLAST 2.2.8. Foi considerado como limiar para aceitação dos alinhamentos o $Evalue \leq 1.10^{-5}$. As sequências redundantes (que apresentaram similaridade com o mesmo código TAIR) foram retiradas das análises subsequentes. Os valores de expressão correspondentes às sequências não redundantes foram convertidos em $\log_2(Fold\ change)$, utilizando o pacote computacional R (R CORE TEAM, 2012). Em seguida, os dados transformados foram analisados usando-se o *software* MAPMAN, versão 3.5.1R2 (THIMM et al., 2004; USADEL et al., 2005), possibilitando a

determinação das vias biológicas às quais os transcritos diferencialmente expressos se relacionam.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da reação de cultivares de feijoeiro ao nematoide das galhas

Dentre as 18 cultivares de feijoeiro comum avaliadas para a resposta a *M. incognita* (raça 3), não foram identificados genótipos resistentes. Estes, de acordo com os critérios adotados, deveriam apresentar $FR \leq 1,0$. No entanto, após interpretar os resultados das análises estatísticas, foi possível detectar que as cultivares estudadas mostraram graus de suscetibilidade distintos (Tabela 2). O teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), permitiu a separação dessas cultivares em três grupos quanto ao FR e em quatro grupos quanto à variável Nem./g. As variedades IPR Saracura, BRS Grafite e Diamante Negro, com FR entre 4,02 e 5,76 foram classificadas como pouco suscetíveis (PS) quando comparadas às demais. As cultivares BRS Pontal, Serro Azul Fosco e FT Nativo foram as que apresentaram os maiores valores de FR (de 25,42 a 52,74) e foram classificadas como altamente suscetíveis (AS); já as demais cultivares, comportaram-se como moderadamente suscetíveis (MS). Com base nisto, selecionou-se a cultivar IPR Saracura para o estudo da expressão diferencial na interação *P. vulgaris*-*M. incognita*.

Tabela 2 – População final (Pf), fator de reprodução (FR), número médio de nematoides por grama de raízes frescas (Nem./g) e reação de cultivares de feijoeiro comum a *M. incognita* aos 68 DAI

Cultivares	Pf	FR	Nem./g	Reação
IPR Saracura	1206	4,02 a	95 ab	PS ¹
BRS Grafite	1491	5,50 a	77 a	PS ¹
Diamante Negro	1729	5,76 a	90 ab	PS ¹
Carioca	2272	7,17 ab	149 abcd	PS ¹
IPR Siriri	2238	7,46 ab	174 abcd	MS ²
BRS Pitanga	2879	9,60 a	160 abc	MS ²
Rio Tibagi	3197	10,66 abc	172 abcd	MS ²
BRS Requite	3343	11,14 abc	118 abcd	MS ²
IAPAR 31	3885	13,92 abc	195 abcd	MS ²
Serro Azul Brilhante	4136	13,99 abc	195 abcd	MS ²
Aporé	4329	14,43 abc	272 abcd	MS ²
Pérola	5022	16,74 abc	294 abcd	MS ²
BRS Vereda	5602	18,67 abc	385 abcd	MS ²
Jalo Precoce	5116	22,25 abc	233 abcd	MS ²
IAPAR 44	7504	25,01 abc	365 abcd	MS ²
BRS Pontal	6979	25,42 abc	337 abcd	AS ³
Serro Azul Fosco	11463	38,21 bc	541 cd	AS ³
FT Nativo	15822	52,74 c	749 d	AS ³
Fibermax 966	2608	8,69	120	Padrão
DKB 330	1620	5,40	34	Padrão

Médias obtidas a partir de seis repetições; as médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$); Pf: ovos + J2; CV = 39,42 para FR; CV = 17,82 para Nem./g; ¹PS: pouco suscetível; ²MS: moderadamente suscetível; ³AS: altamente suscetível

4.2 Determinação dos períodos de coleta de RNA das plantas inoculadas

No experimento realizado para avaliar a penetração e o desenvolvimento dos nematoides no interior das raízes da cultivar IPR Saracura, foram observadas a presença de juvenis infectantes, a formação de células nutridoras, a presença de fêmeas adultas e a formação de massas de ovos, como pode ser observado na tabela 3 e figura 7. Nas primeiras avaliações (1 e 2 DAI), nenhum nematoide foi observado no interior das raízes do feijoeiro, mostrando que, nesses períodos, não houve tempo suficiente para que os nematoides se deslocassem pelo solo e penetrassem no tecido radicular.

Tabela 3 - Estádios de desenvolvimento de *M. incognita* no interior das raízes de IPR Saracura. As raízes foram coradas pelo método de fucsina ácida e examinadas sob microscópio ótico

Avaliação	Juvenis	Célula nutridora	Fêmea adulta	Massa de ovos
1 DAI				
2 DAI				
4 DAI	✓			
10 DAI	✓	✓		
16 DAI	✓	✓		
22 DAI		✓	✓	
30 DAI		✓	✓	✓
36 DAI	✓	✓	✓	✓

¹Época de avaliação em dias após a inoculação (DAI)

Figura 7 - Estádios de desenvolvimento de *M. incognita* no interior das raízes do feijoeiro IPR Saracura sob microscopia ótica; A. Juvenis infectantes (J2) no interior das raízes aos 4 DAI; B. Juvenis em estágio salsichóides, célula nutridora formada, e formação de galhas (10 DAI); C. Juvenil salsichóide se alimentando, e aumento no tamanho da galha (16 DAI); D. Fêmeas jovens (22 DAI); E. Fêmeas adultas (30 DAI); F. Fêmea adulta, com formação de massa de ovos e reaparecimento de J2, identificado pela seta (36 DAI). Barra = 100 µm

4.3 Ensaio de inoculação para a construção das bibliotecas de expressão

Coleta de raízes para a construção das bibliotecas de expressão

Ao longo das quatro épocas de avaliação do experimento (3, 4, 10 e 30 DAI), não foram observadas galhas visíveis a olho nu, tampouco observaram-se sintomas na parte aérea, característicos da presença de nematoide (Figura 8).

Figura 8 - *P. vulgaris*, cultivar IPR Saracura. Plantas avaliadas aos 30 DAI com *M. incognita*, raça 3. À esquerda estão duas linhas com 3 plantas inoculadas e à direita estão 2 linhas com 3 plantas controle. Não há sintomas visíveis na parte aérea

Ao serem observadas sob estereoscópio e microscópio ótico, as galhas foram identificadas a partir dos 10 DAI. A quantidade de J2 no interior das raízes foi visivelmente maior nas amostras coletadas aos 4 DAI, o que fez com que estas fossem selecionadas para a construção das bibliotecas representativas do período inicial da interação. A observação de células nutritoras já estabelecidas aos 10 DAI (item 4.2), resultou na escolha deste período para a obtenção das bibliotecas e avaliação da expressão gênica em um estágio intermediário da interação.

Cálculo do FR

A avaliação do experimento confirmou o sucesso da inoculação e da multiplicação dos nematoides nas raízes de IPR Saracura. Todas as 20 amostras resultantes (10 parcelas controle e 10 parcelas inoculadas) foram avaliadas sob microscopia ótica. Nenhum *M. incognita* foi encontrado nas amostras oriundas do tratamento controle, demonstrando que não houve contaminação entre as parcelas. O fator de reprodução (FR) foi calculado pela a somatória do número de ovos e de nematoides contidos em cada amostra. Os valores de FR variaram de 1,6 a 56,9, com valor médio de 22,6 (Tabela 4). As amostras foram nomeadas considerando a época de avaliação (65 DAI), o tratamento (inoculado) e número da repetição.

Tabela 4 - População final (Pf) e fator de reprodução (FR) de *M. incognita* no interior das raízes do feijoeiro IPR Saracura aos 65 DAI

Amostra	Pf (ovos + nem.) ¹	FR ²
65DI1	13762,5	13,8
65DI2	21375,0	21,4
65DI3	5400,0	5,4
65DI4	34170,0	34,2
65DI5	56850,0	56,9
65DI6	24060,0	24,1
65DI7	41602,5	41,6
65DI8	7455,0	7,5
65DI9	19783,8	19,8
65DI10	1568,8	1,6
Média	22602,8	22,6

¹Os valores correspondem à média de duas contagens. ²Desvio padrão = 17,40

4.4 Extração de RNA

Todas as plantas coletadas no ensaio de inoculação (itens 3.3 e 4.3) foram utilizadas na extração de RNA, totalizando 48 amostras. O resultado da extração foi satisfatório, com a concentração variando de 100 a 1000 ng.µL⁻¹ sendo que o rendimento das extrações variou de 1.000 a 10.000 ng. Os critérios de qualidade estabelecidos, como a razão de absorbância (A_{260}/A_{280}) entre 1,8 e 2,1 e a integridade do RNA visualizado em gel de agarose também foram atendidos (Figura 9). Assim, optou-se por sequenciar 3 amostras inoculadas e 3 amostras controle das duas épocas de avaliação (4 e 10 DAI). As amostras de RNA mais concentradas e com melhor perfil eletroforético foram selecionadas para compor as 12 bibliotecas de RNAseq (Tabela 5). Na figura 9 pode ser visualizado o resultado da eletroforese das

amostras avaliadas aos 4 DAI e empregadas na construção das bibliotecas de expressão.

Tabela 5 - Nomenclatura das amostras submetidas ao sequenciamento (RNAseq), considerando a época de avaliação, tratamento e número da repetição

Avaliação ¹	Tratamento	Repetição	Nomenclatura
4 DAI	controle	1	4DC1
4 DAI	controle	2	4DC2
4 DAI	controle	3	4DC3
4 DAI	inoculado	1	4DI1
4 DAI	inoculado	2	4DI2
4 DAI	inoculado	3	4DI3
10 DAI	controle	1	10DC1
10 DAI	controle	2	10DC2
10 DAI	controle	3	10DC3
10 DAI	inoculado	1	10DI1
10 DAI	inoculado	2	10DI2
10 DAI	inoculado	3	10DI3

¹Época de avaliação em dias após a inoculação (DAI)

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 1,5 % contendo formaldeído 2 % e o corante SYBR Safe (0,5x) em tampão TAE 1x. Amostras utilizadas na obtenção de bibliotecas de expressão. A e B: amostras controle coletadas aos 4 DAI e aos 10 DAI, respectivamente. M: Marcadores de massa molecular *ladder* 100 pb

4.5 Construção das bibliotecas de RNAseq

O resultado da determinação da qualidade das amostras de RNA enviadas para o sequenciamento foi satisfatório. Como pode ser evidenciado nas figuras 9 e 10, todas as amostras estavam aptas a serem sequenciadas, apresentando um padrão bem definido de bandas correspondentes aos RNAs ribossomais (Figura 10) e valor de RIN (*RNA integrity number*) superior a 8 (Figura 11).

Figura 10 - Padrão de bandas do RNA total fornecido pelo equipamento 2100 Bioanalyser (Agilent). A integridade das amostras é inferida pela visualização das bandas dos RNAs ribossomais. Em A e B: amostras referentes ao tratamento controle e ao tratamento inoculado, respectivamente

Figura 11 - Eletroferograma das amostras de RNA usadas para a construção das bibliotecas de expressão. A: RNA das raízes de feijoeiro inoculadas com *M. incognita*, aos 4 e 10 DAI, respectivamente. B: RNA radicular das plantas controle. Os picos visualizados correspondem aos rRNAs 5S, 18S, 28S, respectivamente

O sequenciamento das bibliotecas gerou aproximadamente 385 milhões de *paired reads* (Tabela 6), das quais, 187 milhões foram provenientes da coleta aos 4 DAI e 198 milhões da amostragem realizada aos 10 DAI. As amostras controle geraram em média 32 e 35 milhões de *paired reads* e as inoculadas geraram 30 e 31 milhões de sequências para as avaliações aos 4 e 10 DAI, respectivamente (Tabela 7). Houve um menor número de sequências geradas para as bibliotecas do tratamento inoculado. O tratamento inoculado responde por 48,06% das sequências obtidas aos 4 DAI e por 47,01% das sequências obtidas aos 10 DAI (Tabela 6).

Tabela 6 - Total de sequências em *paired reads* gerado para cada tratamento do experimento de inoculação de *P. vulgaris* com *M. incognita*

	Época de avaliação ¹		Total por tratamento
	4 DAI ²	10 DAI ²	
Controle	97,15 (51,94%)	104,89 (52,99%)	202,04
Inoculado	89,89 (48,06%)	93,07 (47,01%)	182,96
Total	187,03 (100,00%)	197,96 (100,00%)	384,99

¹Época de avaliação em dias após a inoculação (DAI); ²Total (em milhões) de *reads* gerado para as três repetições sequenciadas por tratamento.

Tabela 7 - Total de sequências em *paired reads* gerado em cada biblioteca proveniente da inoculação de *P. vulgaris* com *M. incognita*

		Época de avaliação ¹		
		4 DAI		10 DAI
Tratamento	Biblioteca	<i>Paired reads</i> ²	Biblioteca	<i>Paired reads</i> ²
Controle	4DC1	30,83	10DC1	31,70
	4DC2	38,79	10DC2	40,60
	4DC3	27,52	10DC3	32,59
	Média	32,38	Média	34,96
Inoculado	4DI1	26,40	10DI1	26,66
	4DI2	36,22	10DI2	42,68
	4DI3	27,27	10DI3	23,73
	Média	29,96	Média	31,02

¹Época de avaliação em dias após a inoculação (DAI); ²Número em milhões de *reads*.

4.6 Análise das sequências

4.6.1 Avaliação da qualidade das sequências e filtragem dos dados

O sequenciamento gerou *reads* com comprimento de 101 pb, no entanto, como é intrínseco a todas as metodologias de sequenciamento, algumas regiões apresentaram sequências com baixa qualidade. A filtragem das sequências, seguindo os critérios descritos no item 3.6.1, resultou na formação de dois subgrupos para cada biblioteca (Tabela 8). Um subgrupo refere-se às sequências únicas, originadas de *reads* cujos pares foram eliminados durante a filtragem e o outro refere-se às sequências em pares (*paired reads*). De forma geral, as bibliotecas apresentaram boa qualidade, com aproveitamento médio de 73 e 80% para as bibliotecas do tratamento inoculado e controle, respectivamente (Tabela 8 e Figura 12).

Tabela 8 - Total de sequências de cada biblioteca de expressão antes e após a filtragem dos dados baseada na qualidade do sequenciamento e no tamanho mínimo dos *reads*

Biblioteca	Sem filtragem			Após filtragem			Rend. ² (%)
	Sequências únicas ¹	<i>Paired</i> <i>reads</i> ¹	Total ¹	Sequências únicas ¹	<i>Paired</i> <i>reads</i> ¹	Total ¹	
4DC1	-	30,83	61,66	2,18	23,79	49,76	80,71
4DC2	-	38,79	77,59	2,67	30,22	63,10	81,33
4DC3	-	27,52	55,05	1,94	21,23	44,39	80,64
Média		32,38	64,76	2,26	25,08	52,42	80,90
4DI1	-	26,40	52,80	2,74	18,08	38,91	73,69
4DI2	-	36,22	72,44	3,73	24,83	53,40	73,71
4DI3	-	27,27	54,54	2,75	18,25	39,26	71,98
Média		29,96	59,93	3,08	20,39	43,85	73,13
10DC1	-	31,70	63,40	2,27	24,29	50,85	80,21
10DC2	-	40,60	81,20	2,89	31,27	65,42	80,57
10DC3	-	32,59	65,19	2,33	25,10	52,53	80,58
Média		34,96	69,93	2,50	26,89	56,27	80,46
10DI1	-	26,66	53,32	2,75	18,25	39,26	73,63
10DI2	-	42,68	85,35	4,37	29,35	63,07	73,89
10DI3	-	23,73	47,47	2,42	16,36	35,15	74,05
Média	-	31,02	62,05	3,18	21,32	45,83	73,86

¹Número em milhões de *reads*; ²Rendimento das bibliotecas considerando o total de sequências geradas e o número de sequências de alta qualidade que restaram após a filtragem dos dados

Figura 12 - Distribuição do número de sequências em cada biblioteca, antes (barras vermelhas) e após (barras rosadas) a filtragem dos dados. À esquerda estão as bibliotecas geradas a partir das amostras coletadas aos 4 DAI: as barras de 1 a 6 correspondem ao controle e as barras de 7 a 12 ao tratamento inoculado. À direita, estão as amostras de 10 DAI: barras 13 a 18 referem-se ao controle e barras de 19 a 24 às amostras inoculadas

4.6.2 Mapeamento de *reads* e identificação de transcritos

Cerca de 327 milhões de sequências de RNAseq foram mapeadas no genoma de referência (*P. vulgaris*), o que corresponde a 55,03% do total das sequências obtidas após o processamento. As bibliotecas de expressão referentes aos 4 DAI geraram em média 29,0 milhões de sequências mapeadas para o tratamento controle e 26,4 milhões para o tratamento inoculado (Tabela 9). A partir das bibliotecas geradas aos 10 DAI, foram mapeadas, em média, 26,7 e 27,0 milhões de sequências, para os tratamentos controle e inoculado, respectivamente. O mapeamento de todas as bibliotecas de RNAseq aqui obtidas possibilitou a identificação de 27.195 unigenes, valor próximo aos 27.197 genes presentes no genoma de referência (<http://goo.gl/fV40pE>).

No que se refere ao mapeamento das bibliotecas contra o genoma de *M. incognita*, um pequeno número de sequências foi mapeado (Tabela 10). O número máximo de *reads* mapeados foi 64.551, referentes à biblioteca 10DI1. A média de *reads* mapeados para o tratamento controle foi de 30,3 e 41,0 *reads* aos 4 e 10 DAI, respectivamente.

Para o tratamento inoculado, foram mapeadas em média 2.929 (4 DAI) e 32.691 (10 DAI) sequências. A proporção entre as sequências mapeadas no genoma do nematoide foi muito baixa. Por isso, daqui por diante, todos os resultados apresentados referem-se a comparações com o genoma do feijoeiro.

Tabela 9 - Número de sequências mapeadas de cada biblioteca, utilizando como referência o genoma de *P. vulgaris*

Biblioteca	Sequências únicas ¹	<i>Paired reads</i> ¹	Total ¹
4DC1	0,56	12,08	24,72
4DC2	5,71	15,38	36,46
4DC3	4,18	10,83	25,84
Média	3,48	12,76	29,01
4DI1	5,02	8,96	22,94
4DI2	6,74	12,60	31,94
4DI3	4,97	9,65	24,28
Média	5,58	10,40	26,39
10DC1	2,18	11,01	24,20
10DC2	2,78	14,23	31,24
10DC3	2,25	11,25	24,75
Média	2,40	12,16	26,73
10DI1	4,77	9,18	23,12
10DI2	7,68	14,89	37,47
10DI3	4,10	8,22	20,54
Média	5,51	10,76	27,04

¹Número em milhões de *reads*

Tabela 10 - Número de sequências mapeadas de cada biblioteca, utilizando como referência o genoma de *M. incognita*

Biblioteca	Sequências únicas ¹	Paired reads ¹	Total ¹
4DC1	18,0	4,0	26,0
4DC2	14,0	4,0	22,0
4DC3	19,0	12,0	43,0
Média	17,0	6,7	30,3
4DI1	430,0	1026,0	2482,0
4DI2	489,0	1354,0	3197,0
4DI3	482,0	1313,0	3108,0
Média	467,0	1231,0	2929,0
10DC1	16,0	2,0	20,0
10DC2	20,0	6,0	32,0
10DC3	43,0	14,0	71,0
Média	26,3	7,3	41,0
10DI1	21517,0	21517,0	64551,0
10DI2	4970,0	4970,0	14910,0
10DI3	2655,0	7979,0	18613,0
Média	9714,0	11488,7	32691,3

¹Número em unidades de *reads*

4.6.3 Análise quantitativa da expressão gênica

Foram identificados 191 genes diferencialmente expressos durante a interação feijoeiro-nematoide das galhas. Aos 4 DAI, foram identificados 120 genes com expressão diferencial e aos 10 DAI os demais 71 genes (Tabelas 11 e 12). No período inicial da interação, 68% dos genes expressos estavam superexpressos em relação ao controle. Já na avaliação feita aos 10 DAI, o contrário foi observado, somente 32% dos genes foram mais expressos no tratamento inoculado (Figura 13). A razão de expressão para os genes amostrados aos 4 DAI variou de -9,3 (indicando expressão reprimida) a 12,8 (indicando superexpressão), tendo como referência o tratamento controle (Tabela 11). Para os genes amostrados aos 10 DAI, a variação de expressão foi de -14,6 a 16,7 (Tabela 12).

Genes diferencialmente expressos foram localizados nos 11 cromossomos de *P. vulgaris*. O maior número de genes com expressão diferencial aos 4 DAI foi localizado no cromossomo Pv05, sendo 10 genes superexpressos e 3 reprimidos (Figura 14A). Para a mesma época de avaliação, o maior número de genes superexpressos mapeados foi 10. Estes locos estão nos cromossomos Pv04 e Pv09.

Em contrapartida, o maior número de genes reprimidos detectados foi 6, localizados em Pv02 e Pv05. No cromossomo Pv10 nenhum gene reprimido foi detectado.

Quanto aos genes com expressão diferencial aos 10 DAI (Figura 14B), o número de genes mapeados por cromossomo variou de 3 (Pv02 e Pv04) a 11 (Pv08). O maior número de locos superexpressos (6) está localizado em Pv05 enquanto o maior número de locos reprimidos (7) localiza-se em Pv11.

Figura 13 - Proporção de genes superexpressos (azul) e reprimidos (vermelho) identificados na análise empírica de expressão diferencial, considerando *Fold-change* mínimo absoluto igual a 4 e nível de significância corrigido por FDR ($\alpha = 0,05$). A e B: genes diferencialmente expressos aos 4 DAI e aos 10 DAI, respectivamente

A construção de um diagrama de Venn possibilitou a identificação de genes: *i*) superexpressos nas duas épocas de avaliação (7); *ii*) superexpressos aos 4 DAI e reprimidos aos 10 DAI (2); e *iii*) reprimidos aos 4 e superexpressos aos 10 DAI (1). Além disso, foram identificados genes com expressão diferencial específica por época de avaliação, sendo, 72 genes superexpressos aos 4 DAI e 15 superexpressos aos 10 DAI. Quanto aos genes reprimidos, identificaram-se respectivamente, 38 e 46, considerando as épocas de avaliação supracitadas (Figura 15).

Os sete genes superexpressos nas duas épocas de avaliação foram mapeados em 4 cromossomos, sendo 4 em Pv05 e os demais em Pv04, Pv09 e Pv11. Os dois genes superexpressos aos 4 e reprimidos aos 10 DAI localizaram-se em Pv04 e Pv06, e o gene reprimido aos 4 e superexpresso aos 10 DAI foi mapeado em Pv02.

Figura 14 - Número de genes diferencialmente expressos detectados por cromossomo (Pv). Barras vermelhas: genes reprimidos. Barras azuis: genes superexpressos. A e B: genes detectados aos 4 DAI e aos 10 DAI, respectivamente

Figura 15 - Diagrama de Venn mostrando a intersecção entre os conjuntos de dados e o número de genes diferencialmente expressos amostrados aos 4 e 10 DAI. Azul e Amarelo: genes superexpressos e reprimidos aos 4 DAI, respectivamente; Verde e Vermelho: genes superexpressos e reprimidos aos 10 DAI, respectivamente. *Intersecções inexistentes: um determinado conjunto gênico não pode estar superexpresso e reprimido em um mesmo período de tempo

Tabela 11 - Genes diferencialmente expressos identificados durante a interação *P. vulgaris*-*M. incognita* aos 4 DAI

(continua)

Nº	Sequência ¹	FC ²	p-valor (FDR) ³	C ⁴	Nº	Sequência ¹	FC ²	p-valor (FDR) ³	C ⁴
1	Phvul.006G147200	-9,33	3E-08	Pv06	61	Phvul.009G243000	4,45	1E-10	Pv09
2	Phvul.002G004100	-9,17	9E-14	Pv02	62	Phvul.004G069000	4,49	4E-09	Pv04
3	Phvul.005G022500	-7,55	9E-16	Pv05	63	Phvul.004G153900	4,50	5E-03	Pv04
4	Phvul.005G046200	-7,13	1E-05	Pv05	64	Phvul.001G056300	4,54	1E-02	Pv01
5	Phvul.004G114300	-6,88	3E-04	Pv04	65	Phvul.006G193800	4,60	3E-02	Pv06
6	Phvul.009G137500	-6,66	5E-05	Pv09	66	Phvul.004G134900	4,63	3E-10	Pv04
7	Phvul.011G109600	-6,59	2E-03	Pv11	67	Phvul.001G245800	4,65	1E-02	Pv01
8	Phvul.011G051600	-6,40	1E-10	Pv11	68	Phvul.006G017400	4,70	9E-21	Pv06
9	Phvul.005G038300	-6,21	2E-10	Pv05	69	Phvul.007G200700	4,79	2E-05	Pv07
10	Phvul.001G160200	-6,16	4E-03	Pv01	70	Phvul.005G108000	4,80	3E-07	Pv05
11	Phvul.006G147300	-5,61	2E-06	Pv06	71	Phvul.004G153100	4,83	2E-05	Pv04
12	Phvul.007G211900	-5,46	2E-11	Pv07	72	Phvul.005G095400	4,85	1E-03	Pv05
13	Phvul.006G046000	-5,24	1E-04	Pv06	73	Phvul.008G184800	4,88	3E-10	Pv08
14	Phvul.002G030100	-5,24	4E-10	Pv02	74	Phvul.011G050000	4,89	9E-07	Pv11
15	Phvul.003G284000	-5,14	7E-03	Pv03	75	Phvul.007G276100	4,90	3E-02	Pv07
16	Phvul.011G109700	-5,04	4E-02	Pv11	76	Phvul.010G021700	4,94	1E-09	Pv10
17	Phvul.001G170800	-4,87	2E-14	Pv01	77	Phvul.009G244100	4,95	2E-19	Pv09
18	Phvul.002G195900	-4,85	3E-06	Pv02	78	Phvul.008G166000	4,97	8E-04	Pv08
19	Phvul.005G070900	-4,72	3E-02	Pv05	79	Phvul.008G150300	4,99	2E-10	Pv08
20	Phvul.011G119500	-4,68	2E-02	Pv11	80	Phvul.001G064100	5,05	1E-14	Pv01
21	Phvul.007G160800	-4,63	2E-05	Pv07	81	Phvul.004G041600	5,05	4E-05	Pv04
22	Phvul.008G016600	-4,62	2E-02	Pv08	82	Phvul.005G108400	5,25	3E-04	Pv05
23	Phvul.002G231500	-4,60	7E-06	Pv02	83	Phvul.008G124300	5,39	1E-02	Pv08
24	Phvul.009G045600	-4,57	8E-10	Pv09	84	Phvul.007G106300	5,39	2E-14	Pv07
25	Phvul.003G239800	-4,50	1E-04	Pv03	85	Phvul.011G050200	5,54	4E-03	Pv11
26	Phvul.002G231700	-4,45	4E-06	Pv02	86	Phvul.010G078000	5,62	8E-07	Pv10
27	Phvul.005G038400	-4,43	1E-07	Pv05	87	Phvul.008G043100	5,68	1E-11	Pv08
28	Phvul.009G261400	-4,33	2E-04	Pv09	88	Phvul.002G107700	5,69	5E-05	Pv02
29	Phvul.001G039700	-4,29	7E-05	Pv01	89	Phvul.007G174900	5,70	3E-03	Pv07
30	Phvul.004G121900	-4,29	2E-11	Pv04	90	Phvul.003G034000	5,75	4E-09	Pv03
31	Phvul.001G071200	-4,24	1E-02	Pv01	91	Phvul.004G157100	5,87	1E-13	Pv04
32	Phvul.004G021200	-4,23	3E-08	Pv04	92	Phvul.005G108200	6,00	7E-06	Pv05
33	Phvul.008G016500	-4,22	3E-04	Pv08	93	Phvul.011G008000	6,00	4E-03	Pv11
34	Phvul.003G112700	-4,17	3E-05	Pv03	94	Phvul.009G262700	6,08	6E-03	Pv09
35	Phvul.001G106300	-4,17	4E-06	Pv01	95	Phvul.001G114800	6,08	2E-04	Pv01
36	Phvul.009G152500	-4,16	2E-03	Pv09	96	Phvul.011G110800	6,17	3E-06	Pv11
37	Phvul.005G040000	-4,13	7E-05	Pv05	97	Phvul.005G108100	6,22	1E-04	Pv05
38	Phvul.002G194700	-4,05	9E-07	Pv02	98	Phvul.001G201300	6,23	4E-02	Pv01
39	Phvul.001G020300	-4,03	9E-04	Pv01	99	Phvul.004G028800	6,29	3E-03	Pv04

¹Código de identificação da sequência genômica referência de *P. vulgaris*; ²FC (*Fold change*): razão de expressão dos genes diferencialmente expressos em relação ao tratamento controle (o sinal negativo indica que o gene está menos expresso no tratamento inoculado); ³p-valor corrigido para múltiplos testes pela correção FDR (*False Discovery Rates*); ⁴C: cromossomo de *P. vulgaris* no qual se encontra a sequência de referência

Tabela 11 - Genes diferencialmente expressos identificados durante a interação *P. vulgaris*-*M. incognita* aos 4 DAI

					(conclusão)				
Nº	Sequência ¹	FC ²	p-valor (FDR) ³	C ⁴	Nº	Sequência ¹	FC ²	p-valor (FDR) ³	C ⁴
40	Phvul.002G270900	4,07	1E-06	Pv02	100	Phvul.011G059100	6,35	2E-09	Pv11
41	Phvul.004G152600	4,07	4E-04	Pv04	101	Phvul.001G114000	6,36	3E-04	Pv01
42	Phvul.002G083600	4,08	2E-05	Pv02	102	Phvul.009G077300	6,42	7E-11	Pv09
43	Phvul.006G129800	4,13	2E-04	Pv06	103	Phvul.008G218800	6,52	6E-04	Pv08
44	Phvul.005G087200	4,14	3E-06	Pv05	104	Phvul.009G145900	6,69	1E-04	Pv09
45	Phvul.010G137900	4,15	1E-03	Pv10	105	Phvul.004G064700	6,73	1E-06	Pv04
46	Phvul.002G263100	4,15	2E-06	Pv02	106	Phvul.010G129800	6,87	4E-10	Pv10
47	Phvul.003G249200	4,23	1E-03	Pv03	107	Phvul.002G023200	7,03	2E-09	Pv02
48	Phvul.007G115400	4,24	2E-02	Pv07	108	Phvul.009G178500	7,09	1E-07	Pv09
49	Phvul.011G199600	4,25	1E-03	Pv11	109	Phvul.011G077800	7,22	5E-04	Pv11
50	Phvul.005G087300	4,26	8E-04	Pv05	110	Phvul.003G247800	7,69	4E-04	Pv03
51	Phvul.009G053800	4,27	2E-07	Pv09	111	Phvul.007G224600	8,05	8E-08	Pv07
52	Phvul.001G248400	4,32	3E-02	Pv01	112	Phvul.005G151700	8,19	2E-10	Pv05
53	Phvul.003G261900	4,33	3E-07	Pv03	113	Phvul.004G118200	8,30	5E-09	Pv04
54	Phvul.009G149500	4,39	5E-03	Pv09	114	Phvul.006G086100	9,78	4E-04	Pv06
55	Phvul.009G096200	4,39	6E-04	Pv09	115	Phvul.010G150100	9,93	2E-03	Pv10
56	Phvul.005G004600	4,40	3E-02	Pv05	116	Phvul.008G123300	10,15	3E-03	Pv08
57	Phvul.002G216400	4,42	5E-05	Pv02	117	Phvul.001G185100	10,20	7E-09	Pv01
58	Phvul.007G239800	4,43	1E-06	Pv07	118	Phvul.010G067200	10,46	3E-07	Pv10
59	Phvul.008G195300	4,44	9E-04	Pv08	119	Phvul.007G226400	11,29	1E-03	Pv07
60	Phvul.009G076300	4,45	8E-03	Pv09	120	Phvul.011G003900	12,87	5E-02	Pv11

¹Código de identificação da sequência genômica de *P. vulgaris* usada como referência; ²FC (*Fold change*): razão de expressão dos genes diferencialmente expressos em relação ao tratamento controle (o sinal negativo indica que o gene está menos expresso no tratamento inoculado); ³p-valor corrigido para múltiplos testes pela correção FDR (*False Discovery Rates*); ⁴C: cromossomo de *P. vulgaris* no qual se encontra a sequência de referência

Tabela 12 - Genes diferencialmente expressos identificados durante a interação *P. vulgaris*-*M. incognita* aos 10 DAI

Nº	Sequência ¹	FC ²	p-valor (FDR) ³	C ⁴	Nº	Sequência ¹	FC ²	p-valor (FDR) ³	C ⁴
1	Phvul.011G105900	-14,66	5E-19	Pv11	37	Phvul.008G259900	-4,44	1E-06	Pv08
2	Phvul.006G109000	-14,64	2E-02	Pv06	38	Phvul.008G178000	-4,32	9E-05	Pv08
3	Phvul.006G017400	-13,15	7E-05	Pv06	39	Phvul.008G128700	-4,27	5E-04	Pv08
4	Phvul.010G129700	-10,15	1E-02	Pv10	40	Phvul.008G252800	-4,26	3E-05	Pv08
5	Phvul.006G139100	-10,06	2E-09	Pv06	41	Phvul.004G153100	-4,24	2E-02	Pv04
6	Phvul.005G112600	-9,78	2E-05	Pv05	42	Phvul.008G213900	-4,15	2E-02	Pv08
7	Phvul.010G135600	-9,63	2E-05	Pv10	43	Phvul.004G038600	-4,13	5E-06	Pv04
8	Phvul.005G067900	-9,51	1E-02	Pv05	44	Phvul.010G101800	-4,12	1E-03	Pv10
9	Phvul.009G252900	-9,19	1E-03	Pv09	45	Phvul.003G219100	-4,09	1E-03	Pv03
10	Phvul.010G077000	-7,70	2E-11	Pv10	46	Phvul.009G187400	-4,06	1E-02	Pv09
11	Phvul.001G127200	-7,13	9E-06	Pv01	47	Phvul.001G186000	-4,01	1E-05	Pv01
12	Phvul.010G152300	-6,67	5E-10	Pv10	48	Phvul.009G144100	-4,01	1E-03	Pv09
13	Phvul.001G003800	-6,37	8E-04	Pv01	49	Phvul.009G192400	4,01	2E-04	Pv09
14	Phvul.011G068000	-6,27	3E-08	Pv11	50	Phvul.002G106300	4,06	2E-04	Pv02
15	Phvul.003G218800	-6,13	5E-07	Pv03	51	Phvul.002G114100	4,33	2E-03	Pv02
16	Phvul.007G238200	-6,12	2E-04	Pv07	52	Phvul.009G178500	4,35	4E-02	Pv09
17	Phvul.011G122300	-6,00	1E-03	Pv11	53	Phvul.004G064700	4,43	3E-02	Pv04
18	Phvul.007G094500	-5,98	1E-03	Pv07	54	Phvul.008G151500	4,53	9E-05	Pv08
19	Phvul.009G108100	-5,93	4E-13	Pv09	55	Phvul.006G007500	4,54	3E-08	Pv06
20	Phvul.001G127300	-5,92	2E-06	Pv01	56	Phvul.011G055800	4,56	5E-02	Pv11
21	Phvul.011G122000	-5,72	3E-03	Pv11	57	Phvul.003G109400	4,74	1E-02	Pv03
22	Phvul.007G248400	-5,53	7E-05	Pv07	58	Phvul.011G110900	4,92	9E-06	Pv11
23	Phvul.005G122200	-5,53	1E-02	Pv05	59	Phvul.005G108300	4,96	2E-09	Pv05
24	Phvul.009G038500	-5,47	6E-05	Pv09	60	Phvul.005G162800	5,06	1E-03	Pv05
25	Phvul.007G135600	-5,11	2E-07	Pv07	61	Phvul.008G276500	5,08	3E-02	Pv08
26	Phvul.003G219200	-5,09	2E-04	Pv03	62	Phvul.006G045800	5,16	3E-09	Pv06
27	Phvul.001G020200	-5,08	8E-04	Pv01	63	Phvul.005G087300	5,31	2E-04	Pv05
28	Phvul.011G068300	-4,92	3E-07	Pv11	64	Phvul.008G164500	5,34	7E-04	Pv08
29	Phvul.007G152900	-4,78	4E-08	Pv07	65	Phvul.008G164600	5,44	6E-04	Pv08
30	Phvul.008G018700	-4,76	2E-07	Pv08	66	Phvul.002G004100	5,53	9E-11	Pv02
31	Phvul.007G238100	-4,76	3E-06	Pv07	67	Phvul.008G150900	5,72	1E-05	Pv08
32	Phvul.011G046300	-4,68	2E-02	Pv11	68	Phvul.011G110800	6,04	5E-05	Pv11
33	Phvul.006G077200	-4,59	2E-02	Pv06	69	Phvul.005G108200	8,15	9E-11	Pv05
34	Phvul.003G227700	-4,59	7E-04	Pv03	70	Phvul.005G108000	11,78	2E-11	Pv05
35	Phvul.011G019300	-4,56	7E-06	Pv11	71	Phvul.005G108400	16,76	7E-09	Pv05
36	Phvul.003G047100	-4,45	4E-03	Pv03					

¹Código de identificação da sequência genômica de *P. vulgaris* usada como referência; ²FC (*Fold change*): razão de expressão dos genes diferencialmente expressos em relação ao tratamento controle (o sinal negativo indica que o gene está menos expresso no tratamento inoculado); ³p-valor corrigido para múltiplos testes pela correção FDR (*False Discovery Rates*); ⁴C: cromossomo de *P. vulgaris* no qual se encontra a sequência de referência

4.6.4 Anotação das bibliotecas de RNAseq

Plataforma Blast2GO

Um total de 24.604 unigenes (90,5%) foi identificado a partir do BLASTx, 152 (0,5%) não apresentaram similaridade com proteínas conhecidas e 2.439 (9,0%) das sequências ultrapassaram o tamanho máximo (8.000 pb) suportado pelo BLASTx *online*. Dentre os genes identificados por BLASTx, 16.991 (69,1%) foram anotados. Alguns genes tiveram mais de um termo GO a eles atribuídos, sendo classificados em mais de uma categoria funcional. No total, foram identificados 54.854 termos GO relacionados às sequências anotadas, assim distribuídos nas categorias funcionais de nível 1: 28.124 termos pertencentes a 'processos biológicos'; 15.200 termos à 'funções moleculares'; e 11.530 termos a 'componentes celulares'.

A categorização funcional dos genes no nível hierárquico 2 (Figura 16) mostrou que dentro de 'processos biológicos', foram preferencialmente atribuídos aos unigenes, funções relativas a 'processos metabólicos' (27%) e 'processos celulares' (25%) (Figura 16A). Em 'funções moleculares', as classes mais representadas foram a de 'ligação' e 'atividade catalítica', ambas com 42% dos termos atribuídos. Na classe 'componentes celulares', as três subcategorias mais representativas foram 'célula' (36%), 'organela' (26%) e 'membrana' (22%).

Todos os 120 genes diferencialmente expressos aos 4 DAI foram identificados por BLASTx (Tabela 13) e 81 (67,5%) deles foram anotados. Na categorização dos termos GO no nível 2 (Figura 16B), o maior número de subcategorias (12) foi detectado em 'processos biológicos'. Dentre elas, a maior proporção foi atribuída a 'processos metabólicos' (32%). Assim como ocorreu para a anotação do total de unigenes, as subcategorias mais representadas em 'funções moleculares' foram a de 'ligação' (45%) e 'atividade catalítica' (41%). Já em 'componentes celulares', a maioria dos termos (46%) foi atribuída à 'célula'.

Quanto aos genes diferencialmente expressos aos 10 DAI, 68 (95,8%) foram identificados por BLASTx (Tabela 14), um (1,4%) não mostrou similaridade com proteínas conhecidas e dois deles (2,8%) ultrapassaram o tamanho máximo suportado pela anotação. Dos genes identificados, 46 (64,8%) puderam ser anotados. A categorização no nível 2 (Figura 16C) mostrou que: *i*) 50% dos termos atribuídos a 'processos biológicos' estão relacionados à subclasse 'processos metabólicos'; *ii*) em 'funções moleculares', a atividade catalítica responde por 56%;

iii) em ‘componentes celulares’, os termos relacionados à ‘região extracelular’ e ‘célula’ foram os mais representados, com 38 e 31%, respectivamente.

Tabela 13 - Resultado do BLASTx e razão de expressão dos genes diferencialmente expressos identificados durante a interação *P. vulgaris*-*M. incognita* aos 4 DAI (continua)

Nº	Sequência ¹	Descrição ²	Tamanho (pb) ³	Evalue ⁴	FC ⁵	p-valor (FDR) ⁶
1	Phvul.006G147200	stigma-specific stig1 family	396	2E-67	-9,33	3E-08
2	Phvul.002G004100	expansin-like b1-like	1514	1E-59	-9,17	9E-14
3	Phvul.005G022500	polygalacturonase precursor	4528	2E-98	-7,55	9E-16
4	Phvul.005G046200	zinc finger protein zat11-like	507	8E-121	-7,13	1E-05
5	Phvul.004G114300	cytokinin hydroxylase-like	3593	2E-104	-6,88	3E-04
6	Phvul.009G137500	probable wrky transcription factor 53-like	1811	0E+00	-6,66	5E-05
7	Phvul.011G109600	myb-related protein myb4-like	1458	5E-150	-6,59	2E-03
8	Phvul.011G051600	hypothetical protein PHAVU_011G051600g	623	4E-46	-6,4	1E-10
9	Phvul.005G038300	hypothetical protein PHAVU_005G038300g	278	3E-17	-6,21	2E-10
10	Phvul.001G160200	ethylene-responsive transcription factor 1b-like	636	3E-130	-6,16	4E-03
11	Phvul.006G147300	stigma-specific stig1 family	480	1E-98	-5,61	2E-06
12	Phvul.007G211900	myb transcription factor myb76	1202	4E-125	-5,46	2E-11
13	Phvul.006G046000	small heat shock chloroplastic-like	992	3E-176	-5,24	1E-04
14	Phvul.002G030100	hypothetical protein PHAVU_002G030100g	579	1E-61	-5,24	4E-10
15	Phvul.003G284000	transcription factor myb39-like isoform x2	1582	7E-169	-5,14	8E-03
16	Phvul.011G109700	myb-related protein myb4-like	1493	8E-166	-5,04	4E-02

¹Código de identificação da sequência genômica de *P. vulgaris* usada como referência; ²Descrição do melhor alinhamento (*top hit*) encontrado; ³Tamanho em pares de base da sequência genômica usada no BLASTx; ⁴Evalue do *top hit*; ⁵FC (*Fold change*): razão de expressão dos genes diferencialmente expressos em relação ao tratamento controle (o sinal negativo indica que o gene está menos expresso no tratamento inoculado); ⁶p-valor corrigido para múltiplos testes pela correção FDR (*False Discovery Rates*)

Tabela 13 - Resultado do BLASTx e razão de expressão dos genes diferencialmente expressos identificados durante a interação *P. vulgaris*-*M. incognita* aos 4 DAI (continuação)

Nº	Sequência ¹	Descrição ²	Tamanho (pb) ³	Evalue ⁴	FC ⁵	p-valor (FDR) ⁶
17	Phvul.001G170800	zinc finger protein	1472	5E-103	-4,87	2E-14
18	Phvul.002G195900	ribonuclease h protein at1g65750-like	7371	3E-134	-4,85	3E-06
19	Phvul.005G070900	dynein light cytoplasmic-like	910	2E-44	-4,72	3E-02
20	Phvul.011G119500	transcription factor bhlh36-like	1152	6E-87	-4,68	2E-02
21	Phvul.007G160800	hypothetical protein	615	5E-99	-4,63	2E-05
22	Phvul.008G016600	bcl-2-associated athanogene-like protein	1274	3E-117	-4,62	2E-02
23	Phvul.002G231500	kda class i heat shock protein	800	1E-87	-4,6	7E-06
24	Phvul.009G045600	hypothetical protein	748	4E-97	-4,57	8E-10
25	Phvul.003G239800	hypothetical protein	661	4E-68	-4,5	1E-04
26	Phvul.002G231700	kda class i heat shock	687	9E-89	-4,45	5E-06
27	Phvul.005G038400	hypothetical protein PHAVU_005G038400g	574	1E-08	-4,43	1E-07
28	Phvul.009G261400	ring-h2 finger protein at13	2149	1E-129	-4,33	3E-04
29	Phvul.001G039700	heat shock protein	848	2E-90	-4,29	7E-05
30	Phvul.004G121900	multidrug and toxin extrusion protein 2-like	1716	0E+00	-4,29	2E-11
31	Phvul.001G071200	probable receptor-like protein kinase at1g11050-like	1827	0E+00	-4,24	1E-02
32	Phvul.004G021200	cytochrome p450	1963	0E+00	-4,23	4E-08
33	Phvul.008G016500	bcl-2-associated athanogene-like protein	1233	3E-141	-4,22	3E-04
34	Phvul.003G112700	hypothetical protein	543	1E-43	-4,17	3E-05
35	Phvul.001G106300	hypothetical protein	1477	5E-22	-4,17	4E-06

¹Código de identificação da sequência genômica referência de *P. vulgaris*; ²Descrição do melhor alinhamento (*top hit*) encontrado; ³Tamanho em pares de base da sequência genômica usada no BLASTx; ⁴Evalue do *top hit*; ⁵FC (*Fold change*): razão de expressão dos genes diferencialmente expressos em relação ao tratamento controle (o sinal negativo indica que o gene está menos expresso no tratamento inoculado); ⁶p-valor corrigido para múltiplos testes pela correção FDR (*False Discovery Rates*)

Tabela 13 - Resultado do BLASTx e razão de expressão dos genes diferencialmente expressos identificados durante a interação *P. vulgaris*-*M. incognita* aos 4 DAI

(continuação)

Nº	Sequência ¹	Descrição ²	Tamanho (pb) ³	Evalue ⁴	FC ⁵	p-valor (FDR) ⁶
36	Phvul.009G152500	kda class i heat shock protein	462	8E-105	-4,16	2E-03
37	Phvul.005G040000	homeobox-leucine zipper protein hox11-like	2288	7E-58	-4,13	7E-05
38	Phvul.002G194700	hypothetical protein	718	9E-38	-4,05	9E-07
39	Phvul.001G020300	patatin-like protein	2198	0E+00	-4,03	9E-04
40	Phvul.002G270900	probable pectinesterase pectinesterase inhibitor 51-like	2486	0E+00	4,07	1E-06
41	Phvul.004G152600	auxin-induced protein 5ng4	2294	7E-64	4,07	4E-04
42	Phvul.002G083600	expansin 4 family protein	2120	3E-59	4,08	3E-05
43	Phvul.006G129800	peroxidase	4115	4E-106	4,13	2E-04
44	Phvul.005G087200	wound-induced protein	1937	7E-70	4,14	3E-06
45	Phvul.010G137900	beta- cell wall isozyme-like	4732	0E+00	4,15	1E-03
46	Phvul.002G263100	hypothetical protein	520	1E-34	4,15	2E-06
47	Phvul.003G249200	hypothetical protein	1346	8E-54	4,23	1E-03
48	Phvul.007G115400	upf0481 protein at3g02645-like	1854	0E+00	4,24	2E-02
49	Phvul.011G199600	hypothetical protein	981	0E+00	4,25	1E-03
50	Phvul.005G087300	hypothetical protein	678	2E-41	4,26	8E-04
51	Phvul.009G053800	glutamate synthase	4146	1E-81	4,27	2E-07
52	Phvul.001G248400	hypothetical protein	1014	2E-27	4,32	3E-02
53	Phvul.003G261900	flavanone 3-hydroxylase	3427	2E-136	4,33	3E-07
54	Phvul.009G149500	alcohol-dehydrogenase family protein	3526	7E-96	4,39	5E-03

¹Código de identificação da sequência genômica referência de *P. vulgaris*; ²Descrição do melhor alinhamento (*top hit*) encontrado; ³Tamanho em pares de base da sequência genômica usada no BLASTx; ⁴Evalue do *top hit*; ⁵FC (*Fold change*): razão de expressão dos genes diferencialmente expressos em relação ao tratamento controle (o sinal negativo indica que o gene está menos expresso no tratamento inoculado); ⁶p-valor corrigido para múltiplos testes pela correção FDR (*False Discovery Rates*)

Tabela 13 - Resultado do BLASTx e razão de expressão dos genes diferencialmente expressos identificados durante a interação *P. vulgaris*-*M. incognita* aos 4 DAI (continuação)

Nº	Sequência ¹	Descrição ²	Tamanho (pb) ³	Value ⁴	FC ⁵	p-valor (FDR) ⁶
55	Phvul.009G096200	pleiotropic drug resistance protein 1-like	7551	0E+00	4,39	6E-04
56	Phvul.005G004600	fad-linked oxidoreductase	1594	0E+00	4,4	3E-02
57	Phvul.002G216400	hypothetical protein	628	6E-37	4,42	5E-05
58	Phvul.007G239800	lectin precursor	950	0E+00	4,43	1E-06
59	Phvul.008G195300	tmv resistance protein n-like	6003	0E+00	4,44	9E-04
60	Phvul.009G076300	probable protein phosphatase 2c 72-like	1850	1E-143	4,45	8E-03
61	Phvul.009G243000	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein	3857	3E-55	4,45	1E-10
62	Phvul.004G069000	nudix hydrolase mitochondrial-like	5386	2E-47	4,49	4E-09
63	Phvul.004G153900	hypothetical protein	333	9E-48	4,5	5E-03
64	Phvul.001G056300	molybdate transporter 1-like	1464	0E+00	4,54	1E-02
65	Phvul.006G193800	zinc finger protein constans-like 2-like	696	3E-81	4,6	3E-02
66	Phvul.004G134900	hypothetical protein	5192	2E-39	4,63	3E-10
67	Phvul.001G245800	lob domain-containing protein 12-like	909	5E-58	4,65	1E-02
68	Phvul.006G017400	udp-glycosyltransferase 85a5-like	4928	0E+00	4,7	9E-21
69	Phvul.007G200700	universal stress protein a-like protein	1026	8E-76	4,79	2E-05
70	Phvul.005G108000	wound-induced protein	678	2E-39	4,8	3E-07
71	Phvul.004G153100	lysine-specific demethylase 5a-like	2304	3E-49	4,83	2E-05
72	Phvul.005G095400	heavy metal-associated isoprenylated plant protein 26-like	1325	7E-76	4,85	1E-03

¹Código de identificação da sequência genômica referência de *P. vulgaris*; ²Descrição do melhor alinhamento (*top hit*) encontrado; ³Tamanho em pares de base da sequência genômica usada no BLASTx; ⁴Value do *top hit*; ⁵FC (*Fold change*): razão de expressão dos genes diferencialmente expressos em relação ao tratamento controle (o sinal negativo indica que o gene está menos expresso no tratamento inoculado); ⁶p-valor corrigido para múltiplos testes pela correção FDR (*False Discovery Rates*)

Tabela 13 - Resultado do BLASTx e razão de expressão dos genes diferencialmente expressos identificados durante a interação *P. vulgaris*-*M. incognita* aos 4 DAI (continuação)

Nº	Sequência ¹	Descrição ²	Tamanho (pb) ³	Evalúe ⁴	FC ⁵	p-valor (FDR) ⁶
73	Phvul.008G184800	transcription factor bhlh93	1763	1E-146	4,88	3E-10
74	Phvul.011G050000	hypothetical protein	649	2E-33	4,89	9E-07
75	Phvul.007G276100	hypothetical protein	1521	3E-160	4,9	3E-02
76	Phvul.010G021700	hypothetical protein	6315	3E-106	4,94	1E-09
77	Phvul.009G244100	isoflavone 2 -hydroxylase-like	1850	0E+00	4,95	2E-19
78	Phvul.008G166000	flavonol synthase	4391	2E-97	4,97	8E-04
79	Phvul.008G150300	kelch repeat-containing protein at3g27220-like	3516	3E-63	4,99	2E-10
80	Phvul.001G064100	stearoyl-acp desaturase	1751	2E-135	5,05	1E-14
81	Phvul.004G041600	alpha- -glucan-protein synthase	2954	1E-83	5,05	4E-05
82	Phvul.005G108400	wound-responsive family protein	294	1E-41	5,25	3E-04
83	Phvul.008G124300	receptor protein kinase 1-like	2961	0E+00	5,39	1E-02
84	Phvul.007G106300	geraniol 8-hydroxylase-like	2040	0E+00	5,39	2E-14
85	Phvul.011G050200	hypothetical protein	234	8E-47	5,54	4E-03
86	Phvul.010G078000	thiamine pyrophosphate dependent pyruvate decarboxylase family protein	4673	1E-156	5,62	8E-07
87	Phvul.008G043100	2-aminoethanethiol dioxygenase	4158	5E-39	5,68	1E-11
88	Phvul.002G107700	rhodanese-like domain-containing protein 17-like	1272	5E-20	5,69	5E-05
89	Phvul.007G174900	zinc finger protein nutcracker-like	3803	2E-120	5,7	3E-03
90	Phvul.003G034000	e3 ubiquitin-protein ligase	706	6E-115	5,75	4E-09

¹Código de identificação da sequência genômica referência de *P. vulgaris*; ²Descrição do melhor alinhamento (*top hit*) encontrado; ³Tamanho em pares de base da sequência genômica usada no BLASTx; ⁴Evalúe do *top hit*; ⁵FC (*Fold change*): razão de expressão dos genes diferencialmente expressos em relação ao tratamento controle (o sinal negativo indica que o gene está menos expresso no tratamento inoculado); ⁶p-valor corrigido para múltiplos testes pela correção FDR (*False Discovery Rates*)

Tabela 13 - Resultado do BLASTx e razão de expressão dos genes diferencialmente expressos identificados durante a interação *P. vulgaris*-*M. incognita* aos 4 DAI (continuação)

Nº	Sequência ¹	Descrição ²	Tamanho (pb) ³	Eval ⁴	FC ⁵	p-valor (FDR) ⁶
91	Phvul.004G157100	lob domain-containing protein 41-like	1831	2E-116	5,87	1E-13
92	Phvul.005G108200	hypothetical protein	273	7E-40	6	7E-06
93	Phvul.011G008000	hypothetical protein	742	1E-21	6	4E-03
94	Phvul.009G262700	potassium transporter 5-like	4316	0E+00	6,08	6E-03
95	Phvul.001G114800	2-aminoethanethiol dioxygenase	2369	2E-62	6,08	2E-04
96	Phvul.011G110800	hypothetical protein	577	3E-41	6,17	3E-06
97	Phvul.005G108100	hypothetical protein	270	1E-31	6,22	1E-04
98	Phvul.001G201300	peroxidase 3-like	1520	1E-133	6,23	4E-02
99	Phvul.004G028800	gasa4-like protein	2455	4E-17	6,29	3E-03
100	Phvul.011G059100	hypothetical protein	315	5E-18	6,35	3E-09
101	Phvul.001G114000	hypothetical protein	234	1E-36	6,36	3E-04
102	Phvul.009G077300	myb-like protein j-like	1590	9E-54	6,42	7E-11
103	Phvul.008G218800	hypothetical protein	863	5E-34	6,52	6E-04
104	Phvul.009G145900	hypothetical protein	935	2E-24	6,69	1E-04
105	Phvul.004G064700	lob domain-containing protein 41-like	2914	1E-128	6,73	1E-06
106	Phvul.010G129800	germin-like protein	627	4E-141	6,87	4E-10
107	Phvul.002G023200	hypothetical protein	738	3E-63	7,03	2E-09
108	Phvul.009G178500	probable inactive ADP-ribosyltransferase	2913	2E-132	7,09	1E-07

¹Código de identificação da sequência genômica referência de *P. vulgaris*; ²Descrição do melhor alinhamento (*top hit*) encontrado; ³Tamanho em pares de base da sequência genômica usada no BLASTx; ⁴Eval do *top hit*; ⁵FC (*Fold change*): razão de expressão dos genes diferencialmente expressos em relação ao tratamento controle (o sinal negativo indica que o gene está menos expresso no tratamento inoculado); ⁶p-valor corrigido para múltiplos testes pela correção FDR (*False Discovery Rates*)

Tabela 13 - Resultado do BLASTx e razão de expressão dos genes diferencialmente expressos identificados durante a interação *P. vulgaris*-*M. incognita* aos 4 DAI (conclusão)

Nº	Sequência ¹	Descrição ²	Tamanho (pb) ³	Evalue ⁴	FC ⁵	p-valor (FDR) ⁶
109	Phvul.011G077800	hypothetical protein	1595	2E-167	7,22	5E-04
110	Phvul.003G247800	l-ascorbate oxidase homolog	4991	3E-75	7,69	4E-04
111	Phvul.007G224600	sequence-specific dna binding transcription factors isoform 2	2093	0E+00	8,05	8E-08
112	Phvul.005G151700	beta-glucosidase 12-like isoform x2	4042	7E-119	8,19	2E-10
113	Phvul.004G118200	ring u-box superfamily	1188	1E-161	8,3	5E-09
114	Phvul.006G086100	probable acyl-activating enzyme peroxisomal-like	2782	0E+00	9,78	4E-04
115	Phvul.010G150100	hypothetical protein	1109	5E-36	9,93	2E-03
116	Phvul.008G123300	hypothetical protein	2600	5E-90	10,15	3E-03
117	Phvul.001G185100	shoot2 protein	1940	0E+00	10,2	7E-09
118	Phvul.010G067200	aspartate mitochondrial-like	3526	2E-53	10,46	3E-07
119	Phvul.007G226400	2 -deoxymugineic-acid 2 -dioxxygenase-like	2547	3E-58	11,29	1E-03
120	Phvul.011G003900	protein bearskin1-like	2222	2E-125	12,87	5E-02

¹Código de identificação da sequência genômica referência de *P. vulgaris*; ²Descrição do melhor alinhamento (*top hit*) encontrado; ³Tamanho em pares de base da sequência genômica usada no BLASTx; ⁴Evalue do *top hit*; ⁵FC (*Fold change*): razão de expressão dos genes diferencialmente expressos em relação ao tratamento controle (o sinal negativo indica que o gene está menos expresso no tratamento inoculado); ⁶p-valor corrigido para múltiplos testes pela correção FDR (*False Discovery Rates*)

Tabela 14 - Resultado do BLASTx dos genes diferencialmente expressos identificados durante a interação *P. vulgaris*-*M. incognita* aos 10 DAI (continua)

Nº	Sequência ¹	Descrição ²	Tamanho (pb) ³	Value ⁴	FC ⁵	p-valor (FDR) ⁶
1	Phvul.011G105900	peroxidase 3-like	2236	5E-104	-14,66	5E-19
2	Phvul.006G109000	acidic endochitinase	903	0E+00	-14,64	2E-02
3	Phvul.006G017400	udp-glycosyltransferase 85a5-like	4928	0E+00	-13,15	7E-05
4	Phvul.010G129700	germin-like protein	849	2E-134	-10,15	1E-02
5	Phvul.006G139100	14 kda proline-rich protein	933	9E-65	-10,06	2E-09
6	Phvul.005G112600	blue copper	1471	2E-91	-9,78	2E-05
7	Phvul.010G135600	seed linoleate 9s-lipoxygenase-like	3441	0E+00	-9,63	2E-05
8	Phvul.005G067900	clavata3 esr -related protein 5-like	252	6E-40	-9,51	1E-02
9	Phvul.009G252900	aba-responsive protein abr17	1801	5E-56	-9,19	1E-03
10	Phvul.010G077000	cytochrome p450 83b1-like	1918	0E+00	-7,7	2E-11
11	Phvul.001G127200	gibberellin 20 oxidase	1983	1E-89	-7,13	9E-06
12	Phvul.010G152300	probable 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase -like	1667	3E-78	-6,67	5E-10
13	Phvul.001G003800	peroxidase 64	1956	5E-84	-6,37	8E-04
14	Phvul.011G068000	dirigent protein 10-like	897	9E-142	-6,27	3E-08
15	Phvul.003G218800	14 kda proline-rich	997	3E-31	-6,13	5E-07
16	Phvul.007G238200	dirigent protein 16-like	903	6E-157	-6,12	2E-04
17	Phvul.011G122300	trans-resveratrol di-o-methyltransferase-like	2433	7E-116	-6	1E-03
18	Phvul.007G094500	hypothetical protein	168	2E-30	-5,98	1E-03
19	Phvul.009G108100	probable protein pop3-like	1180	3E-37	-5,93	4E-13
20	Phvul.001G127300	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase aop2-like	1619	7E-82	-5,92	2E-06
21	Phvul.011G122000	trans-resveratrol di-o-methyltransferase-like	1320	7E-140	-5,72	3E-03
22	Phvul.007G248400	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	2153	2E-81	-5,53	7E-05
23	Phvul.005G122200	casparian strip membrane protein	1231	5E-54	-5,53	1E-02
24	Phvul.009G038500	-	1564	-	-5,47	6E-05
25	Phvul.007G135600	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	1589	8E-77	-5,11	2E-07

¹Código de identificação da sequência genômica referência de *P. vulgaris*; ²Descrição do melhor alinhamento (*top hit*) encontrado; ³Tamanho em pares de base da sequência genômica usada no BLASTx; ⁴Value do *top hit*; ⁵FC (*Fold change*): razão de expressão dos genes diferencialmente expressos em relação ao tratamento controle (o sinal negativo indica que o gene está menos expresso no tratamento inoculado); ⁶p-valor corrigido para múltiplos testes pela correção FDR (*False Discovery Rates*)

Tabela 14 - Resultado do BLASTx dos genes diferencialmente expressos identificados durante a interação *P. vulgaris*-*M. incognita* aos 10 DAI (continuação)

Nº	Sequência ¹	Descrição ²	Tamanho (pb) ³	Evalue ⁴	FC ⁵	p-valor (FDR) ⁶
26	Phvul.003G219200	proline-rich 14 kda protein	1261	4E-64	-5,09	2E-04
27	Phvul.001G020200	patatin-like protein	3527	7E-129	-5,08	8E-04
28	Phvul.011G068300	dirigent protein 10-like	1049	7E-136	-4,92	3E-07
29	Phvul.007G152900	casparian strip membrane protein 1-like	1267	5E-44	-4,78	4E-08
30	Phvul.008G018700	dirigent protein 9-like	1707	0E+00	-4,76	2E-07
31	Phvul.007G238100	dirigent protein 18-like	744	7E-141	-4,76	3E-06
32	Phvul.011G046300	burp domain-containing protein	1339	0E+00	-4,68	2E-02
33	Phvul.006G077200	expansin-a8-like precursor	2469	3E-55	-4,59	2E-02
34	Phvul.003G227700	plant invertase pectin methylesterase inhibitor superfamily	811	6E-114	-4,59	7E-04
35	Phvul.011G019300	s-norcochlorogenic synthase-like	1268	8E-39	-4,56	7E-06
36	Phvul.003G047100	udp-glucose flavonoid 3-o-glucosyltransferase 7-like	1689	0E+00	-4,45	4E-03
37	Phvul.008G259900	asparagine synthetase	5158	1E-170	-4,44	1E-06
38	Phvul.008G178000	probable 2-oxoglutarate fe - dependent dioxygenase-like	3534	7E-101	-4,32	9E-05
39	Phvul.008G128700	c93e1_soybn ame: full=beta-amyrin 24-hydroxylase ame: full=cytochrome p450 93e1 ame: full=sophoradiol 24-hydroxylase	2738	0E+00	-4,27	5E-04
40	Phvul.008G252800	laccase 3	2952	0E+00	-4,26	3E-05
41	Phvul.004G153100	lysine-specific demethylase 5a-like	2304	3E-49	-4,24	2E-02
42	Phvul.008G213900	1-aminocyclopropane-1-carboxylate partial	927	4E-50	-4,15	2E-02
43	Phvul.004G038600	hypothetical protein	608	2E-66	-4,13	5E-06
44	Phvul.010G101800	udp-glucose flavonoid 3-o-glucosyltransferase 7-like	1749	0E+00	-4,12	1E-03
45	Phvul.003G219100	proline-rich 14 kda protein	949	2E-65	-4,09	1E-03
46	Phvul.009G187400	gip1-like protein	1539	7E-32	-4,06	1E-02
47	Phvul.001G186000	peroxiredoxin- chloroplastic-like	1088	5E-126	-4,01	1E-05

¹Código de identificação da sequência genômica referência de *P. vulgaris*; ²Descrição do melhor alinhamento (*top hit*) encontrado; ³Tamanho em pares de base da sequência genômica usada no BLASTx; ⁴Evalue do *top hit*; ⁵FC (*Fold change*): razão de expressão dos genes diferencialmente expressos em relação ao tratamento controle (o sinal negativo indica que o gene está menos expresso no tratamento inoculado); ⁶p-valor corrigido para múltiplos testes pela correção FDR (*False Discovery Rates*)

Tabela 14 - Resultado do BLASTx dos genes diferencialmente expressos identificados durante a interação *P. vulgaris*-*M. incognita* aos 10 DAI (conclusão)

Nº	Sequência ¹	Descrição ²	Tamanho (pb) ³	Value ⁴	FC ⁵	p-valor (FDR) ⁶
48	Phvul.009G144100	protein aspartic protease in guard cell 2-like	2277	0E+00	-4,01	1E-03
49	Phvul.009G192400	flavonoid 3 -hydroxylase	4622	3E-136	4,01	2E-04
50	Phvul.002G106300	gdsI esterase lipase exl3-like	2835	3E-51	4,06	2E-04
51	Phvul.002G114100	basic chitinase	1754	9E-96	4,33	2E-03
52	Phvul.009G178500	probable inactive ADP-ribosyltransferase	2913	2E-132	4,35	4E-02
53	Phvul.004G064700	lob domain-containing protein 41-like	2914	1E-128	4,43	3E-02
54	Phvul.008G151500	germin-like protein subfamily 1 member 7-like	747	2E-151	4,53	9E-05
55	Phvul.006G007500	nudix hydrolase	2730	8E-66	4,54	3E-08
56	Phvul.011G055800	beta-glucosidase 12-like	3735	2E-155	4,56	5E-02
57	Phvul.003G109400	pathogenesis-related protein partial	868	5E-56	4,74	1E-02
58	Phvul.011G110900	hypothetical protein	1296	4E-34	4,92	9E-06
59	Phvul.005G108300	hypothetical protein	828	6E-55	4,96	2E-09
60	Phvul.005G162800	-	461	-	5,06	1E-03
61	Phvul.008G276500	abc transporter c family member 3-like	789	1E-71	5,08	3E-02
62	Phvul.006G045800	gdsI esterase lipase	2991	1E-45	5,16	3E-09
63	Phvul.005G087300	hypothetical protein	678	2E-41	5,31	2E-04
64	Phvul.008G164500	receptor-like protein kinase	2974	1E-86	5,34	7E-04
65	Phvul.008G164600	-	13080	-	5,44	6E-04
66	Phvul.002G004100	expansin-like b1-like	1514	1E-59	5,53	9E-11
67	Phvul.008G150900	germin-like protein subfamily 1 member 7-like	809	1E-99	5,72	1E-05
68	Phvul.011G110800	hypothetical protein	577	3E-41	6,04	5E-05
69	Phvul.005G108200	hypothetical protein	273	7E-40	8,15	9E-11
70	Phvul.005G108000	wound-induced protein	678	2E-39	11,78	2E-11
71	Phvul.005G108400	wound-responsive family protein	294	1E-41	16,76	7E-09

¹Código de identificação da sequência genômica referência de *P. vulgaris*; ²Descrição do melhor alinhamento (*top hit*) encontrado; ³Tamanho em pares de base da sequência genômica usada no BLASTx; ⁴Value do *top hit*; ⁵FC (*Fold change*): razão de expressão dos genes diferencialmente expressos em relação ao tratamento controle (o sinal negativo indica que o gene está menos expresso no tratamento inoculado); ⁶p-valor corrigido para múltiplos testes pela correção FDR (*False Discovery Rates*)

Figura 16 - Distribuição dos termos de ontologia do nível 2 nas categoriais: 'processo biológico', 'função molecular' e 'componente celular'. A: termos ontológicos identificados para os unigenes obtidos de todas as bibliotecas; B e C: anotação dos genes diferencialmente expressos aos 4 DAI e aos 10 DAI, respectivamente

Plataforma MapMan

Para facilitar, os resultados da anotação funcional dos genes diferencialmente expressos serão apresentados por período de avaliação, seja, aos 4 e 10 DAI.

A anotação dos 120 genes diferencialmente expressos detectados aos 4 DAI resultou em 89 códigos TAIR não redundantes. Destes, 88 genes foram atribuídos a 17 das 36 categorias hierárquicas principais implementadas no MapMan e denominadas BINs (Tabela 15). A categoria mais frequente foi a de 'RNA', com 17 genes, seguida pelas categorias de genes com função indefinida ('*not assigned*') e de 'miscelânea de famílias enzimáticas', com 14 e 10 genes atribuídos, respectivamente. Os genes identificados estão envolvidos em diversas rotas biológicas. Obviamente, devido à natureza do presente trabalho (interação planta-nematoide), optou-se por investigar as vias de resposta ao estresse, cujo gráfico está apresentado na Figura 17. Além disso, na referida via, estão presentes 7 dos 17 BINs aos quais os genes foram atribuídos. Vinte e nove genes diferencialmente expressos foram representados em 33 categorias de diferentes níveis hierárquicos (subBINs) na via de 'resposta ao estresse'. Dois genes superexpressos e quatro reprimidos foram identificados como responsivos ao 'estresse abiótico'. Os superexpressos referem-se a uma proteína de resposta a ferimentos e GLP3 oxalato oxidase, cujos locos estão nos cromossomos Pv11 e Pv10, respectivamente. As sequências dos genes com nível de expressão reduzido apresentaram similaridade àquelas codificadoras de proteínas de resposta ao calor (*heat shock proteins*) e foram mapeadas nos cromossomos Pv01, Pv02 e Pv06. Duas proteínas peroxidases foram mapeadas em Pv01 e Pv06, ambas com expressão induzida. Um receptor quinase, com provável atuação na sinalização durante a resposta a estresse biótico, localizado em Pv01, teve expressão reduzida. A expressão dos fatores de transcrição WRKY53 (Pv09) e MYB (Pv03, Pv07 e Pv11) mostrou-se reprimida. Em contrapartida, as sequências de dois genes superexpressos, mapeados nos cromossomos Pv08 e Pv09, apresentaram similaridade aos fatores de transcrição da família MYB. Também, em superexpressão, foram detectados metabólitos secundários, localizados em Pv03, Pv07 e Pv08. Três genes relacionados à proteólise foram identificados, sendo dois superexpressos (Pv03 e Pv04) e um reprimido (Pv09). Cinco genes envolvidos na modificação da parede celular apresentaram expressão diferencial. Dois deles foram reprimidos (localizados em Pv02 e Pv05) e os outros três foram superexpressos (2 localizados em Pv02 e 1 em

Pv04). Dois fatores de resposta ao etileno foram identificados, sendo um deles (localizado em Pv01) reprimido e o outro (Pv07) superexpresso. Importante dizer que, na via de resposta a patógenos, foi detectada a superexpressão de uma proteína PR (localizada em Pv08), que apresenta o domínio TIR-NBS-LRR

Tabela 15 - Número de genes diferencialmente expressos aos 4 DAI atribuídos às categorias hierárquicas principais (BINs) do software MapMan

BIN	Categorias	Nº de genes atribuídos
2	Major carbohydrates	1
5	Fermentation	2
10	Cell wall	5
11	Lipid metabolism	3
12	Nitrogen assimilation	1
13	Aminoacid metabolism	2
15	Metal handling	1
16	Secondary metabolism	3
17	Hormones	3
20	Stress	7
23	Nucleotide metabolism	1
26	Miscellaneous enzyme families	10
27	RNA	17
29	Protein	7
30	Signalling	1
31	Cell	1
33	Development	6
34	Transport	3
35	Not assigned	14

No que se refere aos genes com expressão diferencial detectada aos 10 DAI, a anotação dos 71 genes resultou em 42 códigos TAIR não redundantes, dos quais, 41 foram atribuídos a 10 BINs do MapMan (Tabela 16). As categorias mais representadas foram 'estresse' e 'miscelânea de famílias enzimáticas', ambas com 10 genes a elas atribuídos.

Vinte e um genes diferencialmente expressos foram atribuídos a categorias de diferentes níveis hierárquicos (subBINs) na via de resposta ao estresse (Figura 18). Dois genes de resposta ao estresse abiótico foram identificados, sendo um superexpresso e dois reprimidos. Os superexpressos estão localizados nos cromossomos Pv05 e Pv08, enquanto o gene reprimido em Pv09. Em resposta à oxidação, foi detectada a redução da expressão de uma peroxirredoxina, cujo loco

foi mapeado em Pv01, e também de duas peroxidases, localizadas em Pv01 e Pv11. Atuando na sinalização durante a resposta a estresse biótico, foram identificados dois receptores quinase, codificados por genes aqui superexpressos e mapeados em Pv08. Quatro metabólitos secundários foram identificados, um deles superexpresso, codificado por um gene de Pv09 e três reprimidos, codificados por dois genes localizados em Pv08 e um em Pv11. Dois genes envolvidos na modificação da parede celular apresentaram expressão diferencial, um localizado em Pv02 (superexpresso) e outro em Pv06 (reprimido). Apenas um gene codificador de proteína responsiva ao etileno foi detectado com expressão reduzida (localizado em Pv07). Por fim, 7 proteínas relacionadas à patogênese (PR proteins) foram identificadas, todas com expressão reduzida em relação ao tratamento controle. Os genes codificadores destas proteínas PR estão localizados nos cromossomos Pv06, Pv07 (2 genes), Pv08, Pv09 e Pv11.

Tabela 16 - Número de genes diferencialmente expressos aos 10 DAI atribuídos às categorias hierárquicas principais (BINs) do software MapMan

BIN	Categoria	Nº de genes atribuídos
10	Cell wall	2
13	Aminoacid metabolism	1
16	Secondary metabolism	4
17	Hormones	3
20	Stress	10
21	Redox	1
26	Miscellaneous enzyme families	10
27	RNA	2
30	Signalling	2
35	Not assigned	4

Figura 17 - Expressão gênica diferencial aos 4 DAI de interação. Representação das vias de resposta a estresse biótico e abiótico. Em tonalidades de azul: genes superexpressos no tratamento inoculado; em tonalidades de vermelho: genes reprimidos no tratamento inoculado. À direita, encontra-se a escala de cores indicativa do razão de expressão, dada em $\log_2(\text{Fold change})$. Figura editada a partir dos resultados fornecidos pelo software MapMan

Figura 18 - Expressão gênica diferencial aos 10 DAI de interação. Representação das vias de resposta a estresse biótico e abiótico. Em tonalidades de azul: genes superexpressos no tratamento inoculado; em tonalidades de vermelho: genes reprimidos no tratamento inoculado. À direita, encontra-se a escala de cores indicativa do razão de expressão, dada em $\log_2(\text{Fold change})$. Figura editada a partir dos resultados fornecidos pelo software MapMan

5 DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da reação de cultivares de feijoeiro ao nematoide das galhas

Vários trabalhos de avaliação da resposta de plantas a nematoides tem sido desenvolvidos ao longo dos anos e alguns genótipos já foram indicados como promissores para uso em programas de melhoramento genético de diversas espécies (STARR; COOK; BRIDGE, 2002; MATSUO et al., 2012). No entanto, a variabilidade existente entre raças e populações do patógeno tem dificultado a identificação da resistência.

Nenhum dos genótipos de feijoeiro avaliados no presente estudo foi resistente a *M. incognita*, porém apresentaram níveis diferenciados de FR. As três cultivares classificadas como pouco suscetíveis fazem parte dos grupos comerciais de maior importância para o mercado interno brasileiro: carioca (IPR Saracura) e preto (Grafite e Diamante Negro). Entretanto, a cultivar Pérola, uma das mais plantadas no país, apresentou elevado FR, o que é motivo de preocupação no momento de escolha da área de produção. Seu plantio em áreas com incidência do nematoide pode resultar em aumento da população do patógeno e potenciais perdas de produção.

Os resultados obtidos neste trabalho foram concordantes com alguns dados apresentados por Juliatti e colaboradores (2010) que, estimando o FR, verificaram que a cultivar Pérola foi suscetível às raças 1, 2 e 3, porém resistente à raça 4 de *M. incognita*; Jalo Precoce foi suscetível a todas as raças; e Diamante Negro e Aporé foram resistentes somente à raça 4. No entanto, esses mesmos autores verificaram que IAPAR 31 foi resistente às raças 3 e 4, o que não foi confirmado neste trabalho, usando a raça 3 de *M. incognita*. Estudos anteriores classificaram a cultivar Carioca como fonte de resistência aos nematoides do gênero *Meloidogyne* (ABAWI; MULLÍN; MAÍ, 2005), entretanto, Carneiro e Ferraz (1992) mostraram que essa cultivar é suscetível a *M. incognita* raça 3, assim como constatado no presente estudo.

Com base nos resultados apresentados, as cultivares não são recomendadas para o cultivo em regiões de incidência de *M. incognita*, já que permitem a sua multiplicação. Ao se comparar os resultados de diferentes grupos de pesquisa, há grande divergência quanto à classificação de resistência dos feijoeiros (CARNEIRO; FERRAZ, 1992; FERREIRA et al., 2010; JULIATTI et al., 2010; PEREIRA et al., 2013). Entre os fatores que favorecem a discrepância entre as publicações é a falta

de padronização na metodologia empregada para a mensuração da resistência e a dificuldade enfrentada pelos nematologistas durante as avaliações.

Conhecidamente, o coeficiente de variação é relativamente alto nesses ensaios, devido à grande variação existente no nível de reprodução dos nematoides em cada uma das parcelas experimentais (Tabela 9).

Apesar da maioria dos trabalhos considerar como resistentes as plantas com $FR \leq 1$ (OOSTENBRINK, 1966), alguns pesquisadores preferem avaliar as cultivares quanto ao índice de massas de ovos ou ao número de galhas desenvolvidas (VITO et al., 2007). Interessante comentar que o critério de classificação pela formação de galhas pode incorrer a erros, uma vez que foram identificados genes envolvidos na supressão de galhas e que não afetam a multiplicação do nematoide (WILLIAMSON; ROBERTS, 2009).

Além disso, possíveis perdas de nematoides durante o processamento das amostras podem ocasionar uma contagem subestimada da população final e consequentemente do FR, favorecendo a classificação inadequada de uma cultivar como resistente.

Frente às dificuldades para precisar o nível de resistência de *P. vulgaris* a *M. incognita*, o estudo da expressão gênica aqui realizado deve contribuir para um melhor entendimento desta interação e consequentemente colaborar com os pesquisadores da área agrônoma. Reforçando, nenhuma das cultivares aqui estudadas foi resistente ao patógeno, por isso aquela que apresentou o menor FR foi escolhida para o estudo de expressão.

5.2 Processamento e análises dos transcritos

A construção de bibliotecas de RNAseq é considerada uma técnica eficiente para estudos de interações baseados na identificação de transcritos. Especialmente útil na investigação de genes diferencialmente expressos em interações planta-patógeno, já que permite a detecção concomitante de transcritos de ambos os organismos (*Dual RNAseq*) (WESTERMANN; GORSKI; VOGEL, 2012; YAZAWA et al., 2013). No entanto, a captura e o sequenciamento de RNAm está sujeita a quantidade inicial de tecido dos organismos envolvidos na interação, o que foi observado no presente trabalho.

As bibliotecas de expressão foram predominantemente formadas pelos transcritos originados de *P. vulgaris*, o que pôde ser verificado a partir das análises de mapeamento (Tabelas 9 e 10). Este resultado já era esperado, uma vez que as bibliotecas foram obtidas pelo sequenciamento do RNA proveniente de uma grande porção do sistema radicular, incluindo regiões onde os nematoídes não estavam presentes. Dessa forma, a quantidade amostrada de transcritos do nematoíde foi ínfima comparativamente ao total de transcritos sequenciados. Isto não se configura como um problema, já que o intuito deste trabalho foi detectar os genes de *P. vulgaris* envolvidos na resposta ao nematoíde. Em situações nas quais se deseja realizar análises de expressão gênica concomitantes para o patógeno e o hospedeiro, é aconselhável limitar o tecido utilizado para a extração de RNA às proximidades do local de infecção (WESTERMANN; GORSKI; VOGEL, 2012).

Interessante salientar que em estudos de interação patógeno-hospedeiro usando RNAseq, torna-se necessário separar os genes oriundos de cada organismo, o que é realizado a partir de análises de bioinformática. Neste estudo, graças à disponibilidade de genomas de referência, foi possível a separação dos transcritos de ambos os organismos, através do mapeamento destes nos genomas anotados com sequências expressas. De forma similar, pesquisadores que estudaram o interatoma planta-patógeno de organismos eucariotos, utilizaram a estratégia do mapeamento de transcritos em sequências expressas de referência para a identificação dos *reads* originados (GAO et al., 2013; DE CREMER et al., 2013). Assim, perante a baixa identificação de transcritos de *M.incognita* neste trabalho, os resultados de expressão gênica aqui apresentados representam unicamente a resposta de defesa da planta ao ataque do nematoíde.

O processamento das sequências revelou uma boa qualidade do sequenciamento. Utilizando critérios rigorosos durante a filtragem dos dados (item 3.6.1), foi obtido um aproveitamento médio de 80% e 73% para as bibliotecas dos tratamentos controle e inoculado, respectivamente. Um exemplo do rigor empregado no controle da qualidade das sequências é o tamanho mínimo admitido. No presente estudo, foram consideradas somente sequências com comprimento igual ou superior a 50 pb, reduzindo os alinhamentos inespecíficos. Em comparação, De Cremer et al. (2013), ao estudarem o interatoma *Lactuca sativa-Botrytis cinerea*, consideraram em suas análises de RNAseq, transcritos com tamanho igual ou superior a 26 pb, reforçando a confiabilidade dos resultados de expressão aqui obtidos.

Com o advento da técnica de RNAseq e demais tecnologias de sequenciamento em larga escala surgiu a necessidade de adaptar as metodologias estatístico-computacionais para lidar com o montante de dados obtidos (GARBER et al., 2011; ZHANG et al., 2014). Entre os maiores desafios decorrentes das análises de RNAseq estão a manipulação de pequenos transcritos (em torno de 36 a 125 pb) sequenciados na escala de centenas de milhares de cópias.

Assim, várias abordagens estatísticas e computacionais tem sido desenvolvidas, resultando em constantes publicações a respeito de metodologias de análise e de pacotes computacionais específicos, destinados a execução das etapas básicas: *i)* mapeamento dos transcritos às sequências de referência; *ii)* detecção de genes expressos e isoformas; *iii)* quantificação da abundância de genes e isoformas; e *iv)* análise da expressão diferencial (GARBER et al., 2011). No entanto, a gama de opções disponível para análises de RNAseq dificulta a escolha dos melhores métodos e parâmetros a serem empregados. Como no presente trabalho não houve o objetivo de comparar metodologias, optou-se por empregar aquelas que se adaptaram adequadamente ao problema biológico estudado e que permitiram maior rapidez na obtenção dos resultados. Dessa forma, como descrito no item 3.6, foram utilizadas nas análises de mapeamento e quantificação da expressão gênica as ferramentas implementadas no *software user-friendly* CLC Genomics Workbench® (versão 7). Em linhas gerais, para a análise de expressão diferencial optou-se pela ferramenta *Empirical analysis of DGE*, baseada na metodologia *Exact Test* (ROBINSON; SMYTH, 2008), que considera uma distribuição binomial negativa e utiliza uma abordagem combinada de ajustes simples e máxima verossimilhança condicional. Este método é apropriado para situações nas quais há um grande número de sequências e um pequeno número de repetições (ROBINSON; SMYTH, 2008), se adequando ao presente trabalho, onde se tem milhares de *reads* gerados a partir de três repetições por tratamento, em cada época de avaliação. Além disso, recentemente foi publicada uma comparação entre softwares de análise de expressão gênica diferencial, e o *software* EdgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010), que também é baseado na metodologia *Exact Test*, mostrou maior capacidade de detecção de positivos (ZHANG et al., 2014).

Em primeira instância, pode-se pensar que o número de genes diferencialmente expressos aqui detectados foi baixo (120 genes aos 4 DAI e 71 aos 10 DAI); no entanto, esses valores são resultantes do período de avaliação e

critérios adotados que consideraram, simultaneamente, o valor de FC mínimo absoluto igual a 4 e a significância estatística $\alpha = 0,05$. Esta abordagem foi definida com o intuito de diminuir a ocorrência de falsos-positivos e de selecionar somente os genes de maior efeito na interação. Em células gigantes de arroz infectado por *M. graminicola*, foram detectados nos estádios iniciais da formação das células (caracterizado pela presença de juvenis J2 e J3) 156 genes diferencialmente expressos (KYNDT et al., 2012) e em estádios mais avançados da interação (presença de J3 e J4) 7.059 genes mostraram expressão diferencial (JI et al., 2013). Em ambos os trabalhos, o único critério apresentado para a determinação da expressão diferencial foi a significância estatística ($\alpha = 0,05$). Isto confirma que o número de genes com expressão diferencial encontrado em estudos de interação está fortemente relacionado ao momento estudado e ao rigor adotado na determinação dos critérios de quantificação.

Em um panorama geral, a anotação das sequências segundo os termos de 'nível 2' do Gene Ontology, revelou sua categorização em diversos 'processos biológicos', mostrando a complexidade da interação *P. vulgaris*-*M. incognita*. Houve predominância de termos ontológicos atribuídos às categorias 'processos metabólicos' e 'processos celulares', tanto para o conjunto de unigenes obtidos, quanto para os genes diferencialmente expressos em cada época de avaliação (Figura 16). Resultados semelhantes foram obtidos por Barcala et al. (2010) ao estudar a expressão em células gigantes induzidas em *A. thaliana* por *M. javanica*, que encontraram o maior número de genes diferencialmente expressos no grupo funcional de metabolismo. Isto se deve, em parte, ao fato de as células gigantes serem metabolicamente hiperativas, servindo como fonte de nutrientes para o nematoide (CAILLAUD et al., 2008).

A classificação dos genes com expressão diferencial em diversas categorias aqui obtida corrobora os dados apresentados por diversos autores, que detectaram, em reações de compatibilidade, genes relacionados a aspectos fundamentais do desenvolvimento vegetal, como: defesa e resposta a sinalização hormonal, alterações da parede celular, ciclo celular e organização do citoesqueleto (CAILLAUD et al., 2008).

Em relação ao número de genes expressos na interação planta-nematoide, há indícios que em reações de incompatibilidade o número de genes diferencialmente expressos é menor (BARBOSA et al., 2009). Estudando a expressão gênica de

algodoeiro infectado por *M. incognita* e usando bibliotecas de cDNA esses autores encontraram uma série de genes putativos atuando na resistência da planta ao nematoide e culminando na resposta de hipersensibilidade. Segundo eles, a biblioteca oriunda do genótipo suscetível apresentou um maior número de genes.

Considerando a anotação funcional baseada nas categorias pertencentes às vias de resposta a estresse da plataforma MapMan (Figuras 17 e 18), é interessante aqui observar a dinâmica da resposta de defesa. No primeiro momento estudado (4 DAI), observa-se a tentativa do hospedeiro de combater o patógeno, a partir da superexpressão de genes relacionados à defesa. No entanto, o nematoide consegue subverter o sistema de defesa da planta, causando a repressão de genes que desempenham importante papel no referido processo (Figura 13). Esta interação culmina na reação de compatibilidade e no desenvolvimento da doença.

Como anteriormente relatado, 29 genes foram identificados participando das vias de defesa aos 4 DAI, sendo a maioria deles superexpresso (Tabela 1 do Anexo A). Em cinco categorias houve tanto genes induzidos quanto reprimidos, quais sejam: 'estresse abiótico', 'MYB', 'proteólise', 'parede celular' e 'etileno'. Às categorias 'metabólitos secundários' e 'peroxidases' foram atribuídos genes em superexpressão (Figura 17 e Tabela 1 do Anexo A).

Obviamente, genes relacionados à resposta a estresses abióticos também são induzidos durante a interação *P. vulgaris*-*M. incognita*, já que ao penetrar no tecido radicular do hospedeiro, o nematoide causa danos comparáveis aos danos mecânicos originados por fatores abióticos. Nessa categoria funcional, foram identificados quatro genes codificadores de *heat shock proteins* com a expressão reprimida, diferente do observado por outros pesquisadores. Estudando a expressão diferencial na interação *A. thaliana*-*M. javanica*, Barcala et al. (2010) detectaram a superexpressão de *heat shock proteins* durante a formação de células gigantes. Um outro exemplo de proteínas atuando concomitantemente em resposta a estresse biótico e abiótico é a classe das proteínas AGPs (*Arabinogalactan-proteins*), envolvidas na resposta à salinidade e à infecção por nematoides. A indução de genes codificadores de AGPs foi verificada na soja PI595099, resistente a *M. javanica* (BENEVENTI et al., 2013). Ainda na categoria de resposta ao estresse abiótico foram identificados dois genes superexpressos, sendo um codificador de uma proteína de resposta a ferimentos e o gene GLP3. Sabe-se que proteínas da família GLP (*Germin Like Protein*) atuam em diversos processos de desenvolvimento

e resposta a estresses bióticos e abióticos em plantas (LU et al., 2010; RIETZ; BERNSDORFF; CAI, 2012). GLP3 foi identificado atuando na interação *A. thaliana*-*Verticillium longisporum*, sendo reprimido nos estádios iniciais e superexpresso em estádios tardios (FLOERL et al., 2012).

No que se refere à sinalização hormonal, foram identificadas alterações no nível de expressão de dois genes relacionados ao etileno, sendo: *ethylene response factor* (ERF1b-like), que teve sua expressão reduzida; e *stress protein a-like* (UspA), que apresentou expressão aumentada. Apesar do papel dos fitohormônios na resposta de defesa de plantas aos nematoides formadores de galhas não ter sido totalmente elucidado, a alteração na expressão dos genes envolvidos em suas vias biossintéticas foi verificada em diversos estudos (SZAKASITS et al., 2009; BARCALA et al., 2010; BENEVENTI et al., 2013). Sabe-se que há uma interligação das vias de sinalização hormonal e as alterações na comunicação entre essas vias pode definir a resposta de plantas aos estresses bióticos e abióticos. Os fatores de transcrição da família ERF1 desempenham importante papel nessa comunicação (LORENZO et al., 2003; CHENG et al., 2013). Vários estudos tem sido dedicados a determinação da função dos fatores ERF, mas seu papel na resposta de plantas ao estresse ainda não é totalmente entendido (BERROCAL-LOBO; MOLINA; SOLANO, 2002; YANG et al., 2011; LIU et al., 2013). Plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando ERF1 mostraram resistência a fungos necrotróficos. No entanto, a superexpressão do mesmo gene reduziu a tolerância de *Arabidopsis* a *Pseudomonas syringae* tomato DC3000 (BERROCAL-LOBO; MOLINA; SOLANO, 2002). Em relação a UspA, sabe-se que a expressão dos genes codificadores dessa proteína foi altamente induzida em arroz alagado, indicando sua atuação na adaptabilidade a condição de estresse. Além disso, a superexpressão desses genes também foi identificada em células em divisão e expansão celular (SAUTER et al., 2002). Assim, no presente estudo, o aumento da expressão de UspA pode ser resultado concomitante do estresse causado pela infecção do nematoide e da alteração na divisão celular ocasionada pela indução das células nutridoras (dados não apresentados).

Outras categorias funcionais aqui identificadas e que merecem destaque são: a dos codificadores do fator de transcrição WRKY e a das proteínas PR. O fator de transcrição identificado corresponde ao WRKY53 que apresentou expressão reduzida, o que em linhas gerais, pode representar a supressão do sistema basal de

defesa do hospedeiro (MURRAY et al., 2007). Por outro lado, como resposta da planta à infecção, houve a indução de uma proteína similar à proteína de resistência ao vírus do mosaico do tabaco (TMV) (WHITHAM et al., 1994) e que foi atribuída à categoria das proteínas PR.

Com o decorrer dos dias, houve uma sensível mudança no padrão de expressão apresentado pelo hospedeiro. Aos 10 DAI, 71% (15/21) dos genes relacionados à resposta a estresse foram reprimidos (Figura 18 e Tabela 2 do Anexo A), em especial aqueles relacionados ao estresse oxidativo e às proteínas PR, caracterizando o desenvolvimento da reação de compatibilidade. Dados de expressão diferencial reunidos por Goto et al. (2013) sugerem que o balanço entre genes reprimidos e superexpressos é variável nos diferentes experimentos conduzidos em estádios similares da interação planta-*Meloidogyne*.

Como foi observado, a maior parte dos genes diferencialmente expressos (94,24%) foi específica a uma das épocas de avaliação (Figura 15). Porém, 10 genes mostraram expressão diferencial tanto aos 4 como aos 10 DAI (veja Anexo A, Tabela 3). Sete deles apresentaram uma atuação estável, sendo superexpressos nas plantas inoculadas tanto aos 4 quanto aos 10 DAI e três apresentaram níveis opostos de expressão em cada um dos momentos avaliados. Dentre os genes superexpressos, cinco codificam proteínas de uma família responsiva a ferimentos e estão localizados nos cromossomos Pv05 e Pv11. Os genes do Pv05 apresentaram expressão crescente ao longo do tempo, com valor de FC entre 4,26 e 6,00 aos 4 DAI, e entre 5,31 e 16,76 aos 10 DAI. Já a razão de expressão do gene localizado em Pv11 se manteve em torno de 6, em ambas as épocas de avaliação. Genes de resposta a ferimentos foram detectados em diversas interações planta-nematoide, normalmente induzidos. O que se deve ao fato do nematoide causar danos ao tecido da planta durante sua penetração e locomoção no interior radicular. Tais genes apresentaram superexpressão tanto em reações compatíveis quanto incompatíveis (GHEYSEN; FENOLL, 2002).

Os outros dois genes em superexpressão, em ambas as avaliações, correspondem ao codificador de uma proteína da família LBD (*Lateral Organ Boundaries Domain*) cujo loco se encontra no cromossomo Pv04 e ao codificador de uma 'probable inactive ADP-ribosyltransferase', localizado em Pv09. Proteínas da família LBD são específicas de plantas e estão envolvidas em diversos processos de desenvolvimento vegetal e no metabolismo de nitrogênio e antocianina (MAJER;

HOCHHOLDINGER, 2011). Assim, a superexpressão desses genes deve-se, provavelmente, ao estímulo à produção de raízes laterais induzido pela infecção. Por sua vez, a 'probable inactive ADP-ribosyltransferase' possui o domínio RST (RCD1-SRO-TAF4), envolvido em processos de desenvolvimento e na interação com as espécies reativas de oxigênio (ROS), originadas da resposta de plantas a estresses bióticos e abióticos (KANGASJÄRVI; KANGASJÄRVI, 2014). No presente estudo, esta proteína foi produzida em maior quantidade nos momentos iniciais da interação, o que pode ser verificado pelos valores de FC 7,09 (aos 4DAI) e 4,35 (aos 10 DAI).

Superexpressos aos 4 e reprimidos aos 10 DAI, foram identificados: um gene presente em Pv06, codificador da UDP-glicosiltransferase (UGT85A5), e um gene do cromossomo Pv04, codificador de uma proteína similar à desmetilase específica de lisina 5a. A maior variação de expressão foi verificada para o gene UGT85A5 que foi 4 vezes superexpresso aos 4 DAI e 13 vezes reprimido aos 10 DAI. Glicosiltransferases realizam a glicosilação de diferentes moléculas, desempenhando papéis importantes no desenvolvimento da planta, metabolismo e defesa (ROSS et al., 2001; SUN et al., 2013). A família UGT85A codifica enzimas associadas à membrana plasmática, que apresentam expressão localizada e possível envolvimento na regulação do ciclo celular (WOO et al., 2007). Neste aspecto, uma hipótese poderia ser lançada a respeito da atuação de UGT85A5 no processo de divisão celular, explicando o fato deste gene estar superexpresso durante o início da interação *P. vulgaris*-*M. incognita* e reprimido aos 10 DAI, período no qual houve a indução de células nutridoras e a consequente inibição da divisão celular localizada. Por outro lado, apesar de não terem sido encontrados relatos do envolvimento de UGT85A5 com a resposta a patógenos, Sun et al. (2013) comprovaram a atuação desta enzima na resposta a estresse abiótico. Esses autores evidenciaram que plantas transgênicas de tabaco expressando ectopicamente UGT85A5 foram mais tolerantes à salinidade. Uma segunda hipótese poderia ser cogitada, a de que as alterações celulares causadas pela infecção da célula hospedeira pelo nematoide (a partir da degradação da parede celular e da injeção de secreções) resultariam em alterações no balanço iônico e consequentemente na expressão de UGT85A5.

Quanto à desmetilase de lisina 5a, trata-se de uma família de proteína homóloga àquela encontrada em animais e responsável pelo controle epigenético via desmetilação de histonas. Mudanças ambientais e condições de estresse estão

entre as causas das modificações epigenéticas (HAUSER et al., 2011; SINGH; SINGH; NANDI, 2014). Na interação *P. vulgaris*-*M. incognita*, aqui estudada, os valores de FC 4,83 (4 DAI) e -4,24 (10 DAI) indicam que genes expressos aos 4 DAI foram silenciados aos 10 DAI por, possivelmente, estarem metilados.

Por fim, o gene que codifica uma proteína similar a expansina b1 também apresentou um padrão de expressão contrastante nas duas avaliações. No início da interação, aos 4 DAI, sua expressão foi altamente reprimida (FC = -9,17), enquanto aos 10 DAI foi superexpressa (FC = 5,53). Estes resultados corroboram com aqueles de vários autores, nos quais foi detectada a superexpressão de expansinas (CAILLAUD et al., 2008; SOBCZAK; FUDALI; WIECZOREK, 2011). Apesar dos mecanismos que desencadeiam a indução de expansinas ainda não ter sido totalmente elucidado, supõem-se que estas proteínas atuem no processo de modificação da parede celular durante a formação das células gigantes (SOBCZAK; FUDALI; WIECZOREK, 2011).

Os resultados aqui discutidos são inéditos no que diz respeito à interação *P. vulgaris*-*M. incognita* e traduzem sua complexidade, porém mostram que há muitos aspectos desta interação a serem elucidados em trabalhos futuros.

6 CONCLUSÕES

As bibliotecas de expressão aqui construídas via RNAseq, representam satisfatoriamente dois momentos da interação *P. vulgaris*-*M. incognita* e disponibilizam um grande número de sequências do transcrito do hospedeiro, com especial destaque para os 191 transcritos diferencialmente expressos na reação compatível. Ênfase deve ser dada a um gene que codifica uma 'probable inactive ADP-ribosyltransferase' e a quatro genes de resposta a ferimento.

REFERÊNCIAS

- ABAD, P.; MCCARTER, J.P. Genome analysis of plant parasitic nematodes. In: JONES, J.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. (Ed.). **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. New York: Springer Verlag, 2011. p. 103-117.
- ABAD, P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; ROSSO, M.-N.; ENGLER, J. DE A.; FAVERY, B. (Ed.). Invasion, feeding and development. In: PERRY, R.N.; MOENS, M.; STARR, J.L. **Root-knot nematodes**. Cambridge: CABI North American Office, 2009. p. 163–181.
- ABAWI, G.S.; MULLÍN, B.A.; MAÍ, W.F. Diseases caused by nematodes. In: SCHWARTZ, H.F.; STEADMAN, J.R.; HALL, R. (Ed.). **Compendium of bean diseases**. 2nd ed. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 2005. p. 54–57.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5 ed. Boston: Elsevier Academic Press, 2005. 992 p.
- ALTROCK, S.; FONSÊCA, A.; PEDROSA-HARAND, A. Chromosome identification in the Andean common bean accession G19833 (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 34, n. 3, p. 459–463, 2011.
- ARAGÃO, F.J.L.; FARIA, J.C. First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. **Nature Biotechnology**, New York, v. 27, n. 12, p. 1086–1088, 2009.
- BARBOSA, A. E. A. D.; DA ROCHA FRAGOSO, R.; DE LIMA E SOUZA, D. DOS S.; FREIRE, É.; DE OLIVEIRA NETO, O. B.; VIANA, A. A. B.; TOGAWA, R. C.; GUIMARÃES, L. M.; MARTINS, N. F.; CIA, E. Differentially expressed genes in cotton plant genotypes infected with *Meloidogyne incognita*. **Plant Science**, Limerick, v. 177, p. 492–497, 2009.
- BARCALA, M.; GARCÍA, A.; CABRERA, J.; CASSON, S.; LINDSEY, K.; FAVERY, B.; GARCÍA-CASADO, G.; SOLANO, R.; FENOLL, C.; ESCOBAR, C. Early transcriptomic events in microdissected *Arabidopsis* nematode-induced giant cells. **The Plant Journal**, Oxford, v. 61, n. 4, p. 698–712, 2010.
- BAUM, T.J.; HUSSEY, R.S.; DAVIS, E.L. Root-knot and cyst nematode parasitism genes: the molecular basis of plant parasitism. In: SETLOW, J.K. (Ed.). **Genetic engineering**. Boston: Springer US, 2007. v. 28, p. 17–43.
- BELLUCCI, E.; BITOCCHI, E.; RAU, D.; RODRIGUEZ, M.; BIAGETTI, E.; GIARDINI, A.; ATTENE, G.; NANNI, L.; PAPA, R. Genomics of origin, domestication and evolution of *Phaseolus vulgaris*. In: TUBEROSA, R.; GRANER, A.; FRISON, E. (Ed.). **Genomics of plant genetic resources**. Amsterdam: Springer Netherlands, 2014. p. 483–507.

BENCHIMOL, L.L.; CAMPOS, T. de; CARBONELL, S.A.M.; COLOMBO, C.A.; CHIORATTO, A.F.; FORMIGHIERI, E.F.; GOUVÊA, L.R.L.; SOUZA, A.P. de. Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 54, n. 8, p. 1747–1762, 2007.

BENEVENTI, M.; DA SILVA, O.; DE SÁ, M. E.; FIRMINO, A. A.; DE AMORIM, R. M.; ALBUQUERQUE, É. V.; DA SILVA, M. C.; DA SILVA, J.; CAMPOS, M. DE A.; LOPES, M. J.; TOGAWA, R.; PAPPAS, G.; GROSSI-DE-SA, M. Transcription profile of soybean-root-knot nematode interaction reveals a key role of phytohormones in the resistance reaction. **BMC Genomics**, London, v. 14, n. 1, p. 322, 2013.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, London, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995.

BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA, A.; SOLANO, R. Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. **The Plant Journal**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 23–32, 2002.

BLAIR, M.W.; GIRALDO, M.C.; BUENDÍA, H.F.; TOVAR, E.; DUQUE, M.C.; BEEBE, S.E. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 113, n. 1, p. 100–109, 2006.

BLAIR, M.W.; RODRIGUEZ, L.M.; PEDRAZA, F.; MORALES, F.; BEEBE, S. Genetic mapping of the bean golden yellow mosaic geminivirus resistance gene bgm-1 and linkage with potyvirus resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 114, n. 2, p. 261–271, 2007.

BONFIM, K.; FARIA, J.C.; NOGUEIRA, E.O.P.L.; MENDES, É.A.; ARAGÃO, F.J.L. RNAi-mediated resistance to bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, n. 6, p. 717–726, 2007.

BONIFÁCIO, E.M.; FONSÊCA, A.; ALMEIDA, C.; SANTOS, K.G.B. dos; PEDROSA-HARAND, A. Comparative cytogenetic mapping between the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 124, n. 8, p. 1513–1520, 2012.

BRANDALIZZE, W. Realidade e perspectivas de mercado e comercialização de feijão. In: FANCELLI, A.L. (Ed.). **Feijão: tecnologia da produção**. Piracicaba: USP, ESALQ, LPV, 2011. p. 1–11.

BROUGHTON, W.J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus spp.*): model food legumes. **Plant and Soil**, The Hague, v. 252, n. 1, p. 55–128, 2003.

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

CAILLAUD, M.-C.; DUBREUIL, G.; QUENTIN, M.; PERFUS-BARBEOCH, L.; LECOMTE, P.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; ABAD, P.; ROSSO, M.-N.; FAVERY, B. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, n. 1, p. 104–113, 2008.

CAMPOS, T.; OBLESSUC, P.R.; SFORÇA, D.A.; CARDOSO, J.M.K.; BARONI, R.M.; SOUSA, A.C.B.; CARBONELL, S.A.M.; CHIORATTO, A.F.; GARCIA, A.A.F.; RUBIANO, L.B.; SOUZA, A.P. Inheritance of growth habit detected by genetic linkage analysis using microsatellites in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 27, n. 4, p. 549–560, 2011.

CARNEIRO, R.G.; FERRAZ, S. Reação de cultivares de feijoeiro a *Meloidogyne incognita* raça 3. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 16, p. 35–40, 1992.

CAROMEL, B.; GEBHARDT, C. Breeding for nematode resistance: use of genomic information. In: JONES, J.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. (Ed.). **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. New York: Springer Verlag, 2011. p. 465–492.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **A bean revolution in sub-Saharan Africa**. 2013. Disponível em: <http://eiard.org/media/uploads/File/Case%20studies/2013_SDC%20funded/CIAT%20-%20A%20bean%20revolution%20in%20sub-Saharan%20Africa.pdf>. Acesso em: 01 mar. 2014.

CHENG, M.-C.; LIAO, P.-M.; KUO, W.-W.; LIN, T.-P. The *Arabidopsis* ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals. **Plant Physiology**, Stuttgart, v. 162, n. 1566-1582, 2013.

CHIORATO, A.F.; CARBONELL, S.A.M.; COLOMBO, C.A.; DIAS, L.A.S.; ITO, M.F. Genetic diversity of common bean accessions in the germplasm bank of the Instituto Agrônômico - IAC. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2005.

CHITWOOD, D.J.; PERRY, R.N. Reproduction, physiology and biochemistry. In: PERRY, R.N.; MOENS, M.; STARR, J.L. (Ed.). **Root-knot nematodes**. Cambridge: CABI North American Office, 2009. p. 182-200.

CLC BIO. **CLC manuals**. Disponível em: <http://www.clcsupport.com/clcgenomicsworkbench/current/index.php?manual=Introduction_CLC_Genomics_Workbench.html>. Acesso em: 28 abr. 2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira:** grãos, safra 2013/2014, oitavo levantamento. 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_05_08_10_11_00_boletim_graos_maio_2014.pdf>. Acesso em: 19 maio 2014.

CONESA, A.; GOTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALON, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 18, p. 3674–3676, 2005.

COOLEN, W.A.; D'HERDE, C.J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: State Nematology and Entomology Research Station, 1972. 77 p.

DE CREMER, K.; MATHYS, J.; VOS, C.; FROENICKE, L.; MICHELMORE, R.W.; CAMMUE, B.P.A.; DE CONINCK, B. RNAseq-based transcriptome analysis of *Lactuca sativa* infected by the fungal necrotroph *Botrytis cinerea*. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 36, p. 1992–2007, 2013.

DEBOUCK, D.G.; TORO, O.; PAREDES, O.M.; JOHNSON, W.C.; GEPTS, P. Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in Northwestern South America. **Economic Botany**, Bronx, v. 47, n. 4, p. 408–423, 1993.

DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.W. **InfoStat, versión 2008**. Córdoba: Grupo InfoStat; Universidad Nacional de Córdoba, FCA, 2008.

DILAURENZIO, L.; WY SOCKADILLER, J.; MALAMY, J.; PYSH, L.; HELARIUTTA, Y.; FRESHOUR, G.; HAHN, M.; FELDMANN, K.; BENFEY, P. The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. **Cell**, Cambridge, v. 86, n. 3, p. 423–433, 1996.

DINIZ, A.L.; ZUCCHI, M.; SANTINI, L.; BENCHIMOL, L.L.; FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Nucleotide diversity based on phaseolin and iron reductase genes in common bean accessions of different geographical origins. **Genome**, Ottawa, v. 57, n. 2, p. 69–77, 2014.

ESCOBAR, C.; BROWN, S.; MITCHUM, M. G. Transcriptomic and Proteomic Analysis of the Plant Response to Nematode Infection. In: JONES, J.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. (Eds). **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. Dordrecht; New York: Springer Verlag, 2011.

FANCELLI, A.L. (Ed). **Feijão: tecnologia da produção**. Piracicaba: USP, ESALQ, LPV, 2011. 164 p.

FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/T/TP/E>>. Acesso em: 28 fev. 2014.

FERRAZ, L.C.C.B. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In: FERRAZ, L.C.C.B.; ASMUS, G.L.; CARNEIRO, R.G.; MAZAFFERA, P.; SILVA, J.F.V. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 15–38.

FERRAZ, L.C.C.B.; MONTEIRO, A.R. Nematóides. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agnômica Ceres, 1995. v. 1, p. 168–201.

FERREIRA, S.; GOMES, L.A.A.; MALUF, W.R.; CAMPOS, V.P.; CARVALHO FILHO, J.L.S. de; SANTOS, D.C. Resistance of dry bean and snap bean cultivars to root-knot nematodes. **HortScience**, Alexandria, v. 45, n. 2, p. 320–322, 2010.

FLOERL, S.; MAJCHERCZYK, A.; POSSIENKE, M.; FEUSSNER, K.; TAPPE, H.; GATZ, C.; FEUSSNER, I.; KÜES, U.; POLLE, A. *Verticillium longisporum* infection affects the leaf apoplastic proteome, metabolome, and cell wall properties in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. e31435, 2012.

FREYRE, R.; RÍOS, R.; GUZMÁN, L.; DEBOUCK, D.; GEPTS, P. Ecogeographic distribution of *Phaseolus spp.* (Fabaceae) in Bolivia. **Economic Botany**, Bronx, v. 50, n. 2, p. 195–215, 1996.

FREYRE, R.; SKROCH, P. W.; GEFFROY, V.; ADAM-BLONDON, A.-F.; SHIRMOHAMADALI, A.; JOHNSON, W. C.; LLACA, V.; NODARI, R. O.; PEREIRA, P. A.; TSAI, S.-M.; TOHME, J.; DRON, M.; NIENHUIS, J.; VALLEJOS, C. E.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 5-6, p. 847–856, 1998.

FULLER, V. L.; LILLEY, C. J.; ATKINSON, H. J.; URWIN, P. E. Differential gene expression in *Arabidopsis* following infection by plant-parasitic nematodes *Meloidogyne incognita* and *Heterodera schachtii*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 8, p. 595–609. 2007.

GAO, L.; TU, Z.; MILLETT, B.P.; BRADEEN, J.M. Insights into organ-specific pathogen defense responses in plants: RNA-seq analysis of potato tuber-*Phytophthora infestans* interactions. **BMC Genomics**, London, v. 14, n. 1, p. 340, 2013.

GARBER, M.; GRABHERR, M.G.; GUTTMAN, M.; TRAPNELL, C. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. **Nature Methods**, New York, v. 8, n. 6, p. 469–477, 2011.

GEPTS, P.; ARAGÃO, F.J.L.; BARROS, E.; BLAIR, M.W.; BRONDANI, R.; BROUGHTON, W.; GALASSO, I.; HERNÁNDEZ, G.; KAMI, J.; LARIGUET, P.; MCCLEAN, P.; MELOTTO, M.; MIKLAS, P.; PAULS, P.; PEDROSA-HARAND, A.; PORCH, T.; SÁNCHEZ, F.; SPARVOLI, F.; YU, K. Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. In: MOORE, P.H.; MING, R. (Ed.). **Genomics of tropical crop plants**. New York: Springer, 2008. p. 113-143.

GEPTS, P.; DEBOUCK, D. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: SCHOONHOVEN, A.V.; VOYSEST, O. (Ed.). **Common Beans: research for crop improvement**. Wallingford: Commonwealth Agricultural Bureaux International (CABI), 1991. p. 7–53.

GHEYSEN, G.; FENOLL, C. GENE EXPRESSION IN NEMATODE FEEDING SITES. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, n. 1, p. 191–219, 2002.

GOECKS, J.; NEKRUTENKO, A.; TAYLOR, J.; GALAXY TEAM, T. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. **Genome Biology**, London, v. 11, n. 8, p. R86, 2010.

GOTO, D. B.; MIYAZAWA, H.; MAR, J. C.; SATO, M. Not to be suppressed? Rethinking the host response at a root-parasite interface. **Plant Science**, Limerick, v. 213, p. 9–17, 2013.

GRECO, N.; DI VITO, M. Population dynamics and damage levels. In: PERRY, R.N.; MOENS, M.; STARR, J.L (Eds). **Root-knot nematodes**. Cambridge: CABI North American Office, 2009. p. 246–274.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; PARKER, J. E. Deciphering plant–pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, n. 2, p. 177–193, 2003.

HANAI, L.R.; SANTINI, L.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; GEPTS, P.; TSAI, S.M.; VIEIRA, M.L.C. Extension of the core map of common bean with EST-SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 25, n. 1, p. 25–45, 2010.

HANAI, L.R.; CAMPOS, T.; CAMARGO, L.E.A.; BENCHIMOL, L.L.; SOUZA, A.P. de; MELOTTO, M.; CARBONELL, S.A.M.; CHIORATTO, A.F.; CONSOLI, L.; FORMIGHIERI, E.F.; SIQUEIRA, M.V.B.M.; TSAI, S.M.; VIEIRA, M.L.C. Development, characterization, and comparative analysis of polymorphism at common bean SSR loci isolated from genic and genomic sources. **Genome**, Ottawa, v. 50, n. 3, p. 266–277, 2007.

HAUSER, M.-T.; AUFSATZ, W.; JONAK, C.; LUSCHNIG, C. Transgenerational epigenetic inheritance in plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, Amsterdam, v. 1809, n. 8, p. 459–468, 2011.

HOOPER, D.J. Extration of free-living stages from soil. In: SOUTHEY, J.F. (Ed.) **Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes**. London: Her Majesty's Stationery Office, 1986. p. 5-30.

HUSSEY, R.S.; JANSSEN, G.J.W. Root-knot nematodes. In: STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Eds). **Plant resistance to parasitic nematodes**. New York: CABI Publ., 2002. p. 43-70.

JAOUANNET, M.; ROSSO, M.-N. Effectors of root sedentary nematodes target diverse plant cell compartments to manipulate plant functions and promote infection. **Plant Signaling & Behavior**, Edinburgh, v. 8, n. 9, p. e25507, 2013.

JI, H.; GHEYSEN, G.; DENIL, S.; LINDSEY, K.; TOPPING, J.F.; NAHAR, K.; HAEGEMAN, A.; DE VOS, W.H.; TROOSKENS, G.; VAN CRIEKINGE, W.; DE MEYER, T.; KYNDT, T. Transcriptional analysis through RNA sequencing of giant cells induced by *Meloidogyne graminicola* in rice roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 12, p. 3885–3898, 2013.

JONES, J.T.; HAEGEMAN, A.; DANCHIN, E.G.J.; GAUR, H.S.; HELDER, J.; JONES, M.G.K.; KIKUCHI, T.; MANZANILLA-LÓPEZ, R.; PALOMARES-RIUS, J.E.; WESEMAEL, W.M.L.; PERRY, R.N. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology: top 10 plant-parasitic nematodes. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 14, n. 9, p. 946–961, 2013.

JONES, M.G.K.; GOTO, D.B. Root-knot nematodes and giant cells. In: JONES, J.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. (Ed.). **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. Dordrecht; New York: Springer Verlag, 2011. p. 83-100.

JULIATTI, F.C.; WALBER, R.; SANTOS, M.A.; SAGATA, E. Reação de acessos de feijoeiro a nematoides de galhas. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 5, p. 763-769, 2010.

KALOSHIAN, I.; DESMOND, O.J.; ATAMIAN, H.S. Disease resistance-genes responses during incompatible interactions. In: JONES, J.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. (Ed.). **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. Dordrecht; New York: Springer Verlag, 2011. p. 309-324.

KAMI, J.; VELÁSQUEZ, V.B.; DEBOUCK, D.G.; GEPTS, P. Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 92, p. 1101–1104, 1995.

KANGASJÄRVI, S.; KANGASJÄRVI, J. Towards understanding extracellular ROS sensory and signaling systems in plants. **Advances in Botany**, New York, v. 2014, p. 1–10, 2014.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. Doenças das Plantas Cultivadas. 3. ed. v. 2. São Paulo: Agnômica Ceres, 1997. 774 p.

KWAK, M.; GEPTS, P. Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 118, n. 5, p. 979–992, 2009.

KYNDT, T.; DENIL, S.; HAEGEMAN, A.; TROOSKENS, G.; BAUTERS, L.; VAN CRIEKINGE, W.; DE MEYER, T.; GHEYSEN, G. Transcriptional reprogramming by root knot and migratory nematode infection in rice. **New Phytologist**, Cambridge, v. 196, n. 3, p. 887–900, 2012.

LIU, M.; PIRRELLO, J.; KESARI, R.; MILA, I.; ROUSTAN, J.-P.; LI, Z.; LATCHÉ, A.; PECH, J.-C.; BOUZAYEN, M.; REGAD, F. A dominant repressor version of the tomato SI-ERF.B3 gene confers ethylene hypersensitivity via feedback regulation of ethylene signaling and response components. **The Plant Journal**, Oxford, v. 76, n. 3, p. 406–419, 2013.

LORENZO, O.; PIQUERAS, R.; SÁNCHEZ-SERRANO, J. J.; SOLANO, R. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **The Plant Cell**, Berlin, v. 15, n. 1, p. 165–178, 2003.

LU, M.; HAN, Y.-P.; GAO, J.-G.; WANG, X.-J.; LI, W.-B. Identification and analysis of the germin-like gene family in soybean. **BMC Genomics**, London, v. 11, n. 1, p. 620, 2010.

MAJER, C.; HOCHHOLDINGER, F. Defining the boundaries: structure and function of LOB domain proteins. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 47–52, 2011.

MATSUO, É.; FERREIRA, P.A.; SEDIYAMA, T.; FERRAZ, S.; BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. Melhoramento para resistência a nematoides. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de plantas para condições de estresses bióticos**. Viçosa: [s.n.], 2012. p. 121-152.

MAZZOTTA, S.; KEMMERLING, B. Pattern recognition in plant innate immunity. **Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 93, n. 1, p. 7–17, 2011.

MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B.A.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, New York, v. 5, n. 7, p. 621–628, 2008.

MURRAY, S.L.; INGLE, R.A.; PETERSEN, L.N.; DENBY, K.J. Basal resistance against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis* involves WRKY53 and a protein with homology to a nematode resistance protein. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, n. 11, p. 1431–1438, 2007.

OBLESSUC, P.R.; CARDOSO PERSEGUINI, J.M.K.; BARONI, R.M.; CHIORATO, A.F.; CARBONELL, S.A.M.; MONDEGO, J.M.C.; VIDAL, R.O.; CAMARGO, L.E.A.; BENCHIMOL-REIS, L.L. Increasing the density of markers around a major QTL controlling resistance to angular leaf spot in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 126, n. 10, p. 2451–2465, 2013.

OOSTENBRINK, M. **Major characteristics of the relation between nematodes and plants**. [s.l.] H. Veenman & Zonen, 1966. 48 p.

OSORNO, J.; MCCLEAN, P. Common bean genomics and its applications in breeding programs. In: GUPTA, S.; NADARAJAN, N.; GUPTA, D.S. (Ed.). **Legumes in the omic era**. New York: Springer, 2014. p. 185–206.

PEDROSA, A.; VALLEJOS, C.; BACHMAIR, A.; SCHWEIZER, D. Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n. 2, p. 205–212, 2003.

PEDROSA-HARAND, A.; KAMI, J.; GEPTS, P.; GEFFROY, V.; SCHWEIZER, D. Cytogenetic mapping of common bean chromosomes reveals a less compartmentalized small-genome plant species. **Chromosome Research**, Oxford, v. 17, n. 3, p. 405–417, 2009.

PEREIRA, P.R.; FIDELIS, R.R.; SANTOS, M.M. dos; SANTOS, G.R. dos; NASCIMENTO, I.R. do. Tolerância de cultivares de feijoeiro comum a *Meloidogyne incognita* raça 2 em condições de temperatura elevada. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 8, n. 4, p. 202–207, 2013.

PERRY, R.N.; MOENS, M. Introduction to plant-parasitic nematodes; modes of parasitism. In: JONES, J.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. (Ed.). **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. Dordrecht; New York: Springer Verlag, 2011. p. 3-20.

POSSE, S.C.P.; RIVA-SOUZA, E.M.; SILVA, G.M. da; FASOLO, L.M.; SILVA, M.B. da; ROCHA, M.A.M. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central-brasileira: 2009-2011**. Vitória: DCM-Incaper, 2010. 245 p.

PRIA, M.D.; SILVA, O.C. (Ed.). **Cultura do feijão: doenças e controle**. Ponta Grossa: UEPG, 2010. 454 p.

QUENTIN, M.; ABAD, P.; FAVERY, B. Plant parasitic nematode effectors target host defense and nuclear functions to establish feeding cells. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, n. 53, p. 1-7, 2013.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2012.

RAMSKÖLD, D.; KAVAK, E.; SANDBERG, R. How to Analyze Gene Expression Using RNA-Sequencing Data. In: WANG, J.; TAN, A. C.; TIAN, T. (Ed.). **Next Generation Microarray Bioinformatics**. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. v. 802, p. 259–274.

RICHARD, M.M.S.; PFLIEGER, S.; SÉVIGNAC, M.; THAREAU, V.; BLANCHET, S.; LI, Y.; JACKSON, S.A.; GEFFROY, V. Fine mapping of Co-x, an anthracnose resistance gene to a highly virulent strain of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, 2014. (DOI 10.1007/s00122-014-2328-5).

RIETZ, S.; BERNSDORFF, F.E.M.; CAI, D. Members of the germin-like protein family in *Brassica napus* are candidates for the initiation of an oxidative burst that impedes pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 15, p. 5507–5519, 2012.

ROBERTS, P.A. Concepts and consequences of resistance. In: STARR, J.L.; BRIDGE, J.; COOK, R. (Ed.). **Plant resistance to parasitic nematodes**. New York: CABI Publ., 2002. p. 23–41.

ROBERTSON, G.; SCHEIN, J.; CHIU, R.; CORBETT, R.; FIELD, M.; JACKMAN, S. D.; MUNGALL, K.; LEE, S.; OKADA, H. M.; QIAN, J. Q.; GRIFFITH, M.; RAYMOND, A.; THIESSEN, N.; CEZARD, T.; BUTTERFIELD, Y. S.; NEWSOME, R.; CHAN, S. K.; SHE, R.; VARHOL, R.; KAMOH, B.; PRABHU, A.-L.; TAM, A.; ZHAO, Y.; MOORE, R. A.; HIRST, M.; MARRA, M. A.; JONES, S. J. M.; HOODLESS, P. A.; BIROL, I. De novo assembly and analysis of RNA-seq data. **Nature Methods**, New York, v. 7, n. 11, p. 909–912, 2010.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 139–140, 2010.

ROBINSON, M.D.; SMYTH, G.K. Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. **Biostatistics**, New York, v. 9, n. 2, p. 321–332, 2008.

RODRIGUES, C. M.; MAFRA, V.; MACHADO, M. A. Transcritômica. In: BORÉM, A. L.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Ômicas 360°: aplicações e estratégias para o melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 2013.

ROSS, J.; LI, Y.; LIM, E.-K.; BOWLES, D.J. Higher plant glycosyltransferases. **Genome Biology**, London, v. 2, n. 2, p. 1–6, 2001.

ROSSO, M.-N.; GRENIER, E. Other nematodes effectors and evolutionary constraints. In: JONES, J.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. (Ed.). **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. Dordrecht; New York: Springer Verlag, 2011. p. 287–308.

ROSSO, M.-N.; VIEIRA, P.; DE ALMEIDA-ENGLER, J.; CASTAGNONE-SERENO, P. Proteins secreted by root-knot nematodes accumulate in the extracellular compartment during root infection. **Plant Signaling & Behavior**, Edinburgh, v. 6, n. 8, p. 1232–1234, 2011.

SAINI, S.; SHARMA, I.; KAUR, N.; PATI, P. K. Auxin: a master regulator in plant root development. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 32, n. 6, p. 741–757, 2013.

SASSER, J.N. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, n. 1, p. 36, 1980.

SAUTER, M.; RZEWUSKI, G.; MARWEDEL, T.; LORBIECKE, R. The novel ethylene-regulated gene OsUsp1 from rice encodes a member of a plant protein family related to prokaryotic universal stress proteins. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 379, p. 2325–2331, 2002.

SCHENK, P.M.; CARVALHAIS, L.C.; KAZAN, K. Unraveling plant–microbe interactions: can multi-species transcriptomics help? **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 177–184, 2012.

SCHWARTZ, H.F.; SINGH, S.P. Breeding common bean for resistance to white mold: a review. **Crop Science**, Madison, v. 53, n. 5, p. 1832, 2013.

SCHWARTZ, H.F.; STEADMAN, J.R.; HALL, R.; FORSTER, R.L. (Ed.). **Compendium of bean diseases**. 2nd ed. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 2005. 109 p.

SINGH, S.P.; SCHWARTZ, H.F. Review: breeding common bean for resistance to insect pests and nematodes. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 91, n. 2, p. 239–250, 2011.

SINGH, S.P.; SCHWARTZ, H.F. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. **Crop Science**, Madison, v. 50, n. 6, p. 2199–2223, 2010.

SINGH, S.P.; GUTIÉRREZ, J.A.; MOLINA, A.; URREA, C.; GEPTS, P. Genetic diversity in cultivated common bean: II. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. **Crop Science**, Madison, v. 31, n. 1, p. 23, 1991.

SINGH, V.; SINGH, D.; NANDI, A.K. *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS D influences systemic-acquired resistance-induced expression and histone modifications of WRKY genes. **Journal of Bioscience**, Karnataka, v. 39, n. 1, p. 119–126, 2014.

SMANT, G.; JONES, J. Supression of plant defences by nematodes. In: JONES, J.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. (Ed.). **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. Dordrecht; New York: Springer Verlag, 2011. p. 273-286.

SOBCZAK, M.; FUDALI, S.; WIECZOREK, K. Cell wall modifications induced by nematodes. In: JONES, J.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. (Ed.). **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. Dordrecht; New York: Springer Verlag, 2011. p. 395-422.

SOMMER, R.J.; STREIT, A. Comparative genetics and genomics of nematodes: genome structure, development, and lifestyle. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 45, p. 1–20, 2011.

STARR, J.L.; BRIDGE, J.; COOK, R. Resistance to plant-parasitic nematodes: history, current use and future potencial. In: STARR, J.L.; BRIDGE, J.; COOK, R. (Ed.). **Plant resistance to parasitic nematodes**. New York: CABI Publ., 2002. p. 1-22.

STARR, J.L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant resistance to parasitic nematodes**. New York: CABI Publ., 2002. 258 p.

SUN, Y.-G.; WANG, B.; JIN, S.-H.; QU, X.-X.; LI, Y.-J.; HOU, B.-K. Ectopic expression of *Arabidopsis* glycosyltransferase UGT85A5 enhances salt stress tolerance in tobacco. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. e59924, 2013.

TAN, K.-C.; IPCHO, S. V. S.; TRENGOVE, R. D.; OLIVER, R. P.; SOLOMON, P. S. Assessing the impact of transcriptomics, proteomics and metabolomics on fungal phytopathology. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 10, n. 5, p. 703–715, 2009.

THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. Gene ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, New York, v. 25, p. 25–29, 2000.

THIMM, O.; BLÄSING, O.; GIBON, Y.; NAGEL, A.; MEYER, S.; KRÜGER, P.; SELBIG, J.; MÜLLER, L.A.; RHEE, S.Y.; STITT, M. MapMan: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, n. 6, p. 914–939, 2004.

USADEL, B.; NAGEL, A.; THIMM, O.; REDESTIG, H.; BLAESING, O. E.; PALACIOS-ROJAS, N.; SELBIG, J.; HANNEMANN, J.; PIQUES, M. C.; STEINHAUSER, D.; SCHEIBLE, W.-R.; GIBON, Y.; MORCUENDE, R.; WEICHT, D.; MEYER, S.; STITT, M. Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of coresponding genes, and comparison with known responses. **Plant Physiology**, Stuttgart, v. 138, n. 3, p. 1195–1204, 2005.

VELASQUEZ, V.; GEPTS, P. RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centres of origin. **Genome**, Ottawa, v. 37, n. 2, p. 256–263, Apr. 1994.

VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M.A.P.; CARNEIRO, J.E.S. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2005. p. 301–391.

VITO, M.D.; PARISI, B.; CARBONI, A.; RANALLI, P.; CATALANO, F. Genetics and introgression of resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne spp.*) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 35, p. 193–198, 2007.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2009.

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

WESTERMANN, A.J.; GORSKI, S.A.; VOGEL, J. Dual RNA-seq of pathogen and host. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 10, n. 9, p. 618–630, 2012.

WHITHAM, S.; DINESH-KUMAR, S. P.; CHOI, D.; HEHL, R.; CORR, C.; BAKER, B. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: Similarity to toll and the interleukin-1 receptor. **Cell**, Cambridge, v. 78, n. 6, p. 1101–1115, 1994.

WILLIAMSON, V.M.; ROBERTS, P.A. Mechanisms and genetics of resistance. In: PERRY, R.N.; MOENS, M.; STARR, J. (Ed.). **Root-knot nematodes**. Cambridge: CABI North American Office, 2009. p. 301–325.

WONDAFRASH, M.; VAN DAM, N.M.; TYTGAT, T.O.G. Plant systemic induced responses mediate interactions between root parasitic nematodes and aboveground herbivorous insects. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, p. 1-15, 2013.

WOO, H.-H.; JEONG, B.R.; HIRSCH, A.M.; HAWES, M.C. Characterization of Arabidopsis AtUGT85A and AtGUS gene families and their expression in rapidly dividing tissues. **Genomics**, San Diego, v. 90, n. 1, p. 143–153, 2007.

YANG, X.-Y.; XIE, J.-X.; LU, X.-P.; LIU, Y.-Z.; PENG, S.-A. Isolation of a citrus ethylene-responsive element binding factor gene and its expression in response to abiotic stress, girdling and shading. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 127, p. 275–281, 2011

YAZAWA, T.; KAWAHIGASHI, H.; MATSUMOTO, T.; MIZUNO, H. Simultaneous transcriptome analysis of *Sorghum* and *Bipolaris sorghicola* by using RNA-seq in combination with de novo transcriptome assembly. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 4, p. e62460, 2013.

ZHANG, Z.H.; JHAVERI, D.J.; MARSHALL, V.M.; BAUER, D.C.; EDSON, J.; NARAYANAN, R.K.; ROBINSON, G.J.; LUNDBERG, A.E.; BARTLETT, P.F.; WRAY, N.R.; ZHAO, Q. A comparative study of techniques for differential expression analysis on RNA-Seq data. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 8, p. e103207, 2014.

ZIMMERMANN, M.J.O.; CARNEIRO, J.E.S.; PELOSO, M.J.D.; COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A.; SARTORATO, A.; PEREIRA, P.A.A. Melhoramento genético e cultivares. In: ARAUJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. (Ed.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996. v. 1. p. 223–273.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 1 - Resultado da anotação funcional dos genes diferencialmente expressos aos 4DAI, considerando os termos ontológicos presentes na plataforma MapMan e relacionados as vias de resposta ao estresse (continua)

Sequência ¹	Descrição ²	Categoria MapMan	log ₂ (FC) ³	C ⁴
Phvul.001G039700	heat shock protein	abiotic stress /heat shock protein	-2.10	Pv01
Phvul.002G231500	kda class i heat shock protein	abiotic stress /heat shock protein	-2.20	Pv02
Phvul.002G231700	kda class i heat shock	abiotic stress /heat shock protein	-2.16	Pv02
Phvul.006G046000	small heat shock chloroplastic-like	abiotic stress /heat shock protein	-2.39	Pv06
Phvul.010G129800	germin-like protein (GLP3)	abiotic stress/unspecified	2.78	Pv10
Phvul.011G110800	hypothetical protein	abiotic stress/wounding	2.62	Pv11
Phvul.002G004100	expansin-like b1-like	cell wall	-3.20	Pv02
Phvul.002G083600	expansin 4 family protein	cell wall	2.03	Pv02
Phvul.002G270900	probable pectinesterase pectinesterase inhibitor 51-like	cell wall	2.02	Pv02
Phvul.004G041600	alpha- -glucan-protein synthase	cell wall	2.34	Pv04
Phvul.005G022500	-	cell wall	-2.92	Pv05
Phvul.001G160200	ethylene-responsive transcription factor 1b-like	ethylene	-2.62	Pv01
Phvul.007G200700	universal stress protein a-like protein	ethylene	2.26	Pv07
Phvul.003G284000	transcription factor myb39-like isoform x2	MYB	-2.36	Pv03
Phvul.007G211900	myb transcription factor myb76	MYB	-2.45	Pv07
Phvul.008G150300	kelch repeat-containing protein at3g27220-like	MYB	2.32	Pv08
Phvul.011G109600	myb-related protein myb4-like	MYB	-2.72	Pv11

¹Código de identificação da sequência genômica referência de *P. vulgaris*; ²Descrição do melhor alinhamento (*top hit*) encontrado no BLASTx; ³log₂(FC): logaritmo na base 2 da razão de expressão (*Fold change*) dos genes diferencialmente expressos (o sinal negativo indica que o gene está menos expresso no tratamento inoculado do que no controle); ⁴C: cromossomo de *P. vulgaris* no qual se encontra a sequência de referência

Tabela 1 - Resultado da anotação funcional dos genes diferencialmente expressos aos 4 DAI, considerando os termos ontológicos presentes na plataforma MapMan e relacionados as vias de resposta ao estresse (conclusão)

Sequência ¹	Descrição ²	Categoria MapMan	log ₂ (FC) ³	C ⁴
Phvul.006G129800	peroxidase	peroxidases	2.05	Pv06
Phvul.001G201300	peroxidase 3-like	peroxidases	2.64	Pv01
Phvul.008G195300	TMV resistance protein n-like	PR protein	2.15	Pv08
Phvul.003G034000	e3 ubiquitin-protein ligase	proteolysis	2,52	Pv03
Phvul.004G118200	ring u-box superfamily	proteolysis	3,05	Pv04
Phvul.009G261400	ring-h2 finger protein at13	proteolysis	-2,12	Pv09
Phvul.003G261900	flavanone 3-hydroxylase	secondary metabolism	2,12	Pv03
Phvul.007G226400	2 -deoxymugineic-acid 2 - dioxxygenase-like	secondary metabolism	3,50	Pv07
Phvul.008G166000	flavonol synthase	secondary metabolism	2,31	Pv08
Phvul.001G071200	probable receptor-like protein kinase at1g11050-like	signalling	-2,08	Pv01
Phvul.009G137500	probable wrky transcription factor 53-like	WRKY	-2,73	Pv08

¹Código de identificação da sequência genômica referência de *P. vulgaris*; ²Descrição do melhor alinhamento (*top hit*) encontrado no BLASTx; ³log₂(FC): logaritmo na base 2 da razão de expressão (*Fold change*) dos genes diferencialmente expressos (o sinal negativo indica que o gene está menos expresso no tratamento inoculado do que no controle); ⁴C: cromossomo de *P. vulgaris* no qual se encontra a sequência de referência

Tabela 2 - Resultado da anotação funcional dos genes diferencialmente expressos aos 10 DAI, considerando os termos ontológicos presentes na plataforma MapMan e relacionados as vias de resposta ao estresse

Sequência ¹	Descrição ²	Categoria MapMan	log ₂ (FC) ³	C ⁴
Phvul.009G038500	-	abiotic stress/cold	-2,45	Pv09
Phvul.008G151500	germin-like protein subfamily 1 member 7-like	abiotic stress/unspecified	2,18	Pv08
Phvul.005G108000	wound-induced protein	abiotic stress/wounding	3,56	Pv05
Phvul.002G004100	expansin-like b1-like	cell wall	2,47	Pv02
Phvul.006G077200	expansin-a8-like precursor	cell wall	-2,20	Pv06
Phvul.007G135600	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	ethylene	-2,35	Pv07
Phvul.001G003800	peroxidase 64	peroxidases	-2,67	Pv01
Phvul.011G105900	peroxidase 3-like	peroxidases	-3,87	Pv11
Phvul.006G139100	14 kda proline-rich protein	PR proteins	-3,33	Pv06
Phvul.007G238100	dirigent protein 18-like	PR proteins	-2,25	Pv07
Phvul.007G238200	dirigent protein 16-like	PR proteins	-2,61	Pv07
Phvul.008G018700	dirigent protein 9-like	PR proteins	-2,25	Pv07
Phvul.009G144100	protein aspartic protease in guard cell 2-like	PR proteins	-2,00	Pv09
Phvul.011G068000	-	PR proteins	-2,65	Pv11
Phvul.001G186000	peroxiredoxin- chloroplastic-like	redox state	-2,00	Pv01
Phvul.008G178000	probable 2-oxoglutarate fe - dependent dioxygenase-like	secondary metabolites	-2,11	Pv08
Phvul.008G252800	laccase 3	secondary metabolites	-2,09	Pv08
Phvul.009G192400	flavonoid 3 -hydroxylase	secondary metabolites	2,00	Pv09
Phvul.011G122000	trans-resveratrol di-o-methyltransferase-like	secondary metabolites	-2,52	Pv11
Phvul.008G164500	receptor-like protein kinase	sinalling	2,42	Pv08
Phvul.008G164600	-	sinalling	2,44	Pv08

¹Código de identificação da sequência genômica referência de *P. vulgaris*; ²Descrição do melhor alinhamento (*top hit*) encontrado no BLASTx; ³log₂(FC): logaritmo na base 2 da razão de expressão (*Fold change*) dos genes diferencialmente expressos (o sinal negativo indica que o gene está menos expresso no tratamento inoculado do que no controle); ⁴C: cromossomo de *P. vulgaris* no qual se encontra a sequência de referência

Tabela 3 - Genes diferencialmente expressos identificados durante a interação *P. vulgaris*-*M. incognita* nas duas épocas de avaliação

Sequência ¹	Descrição ²	4DAI FC ³	10DAI FC ⁴	C ⁵
Phvul.005G087300	hypothetical protein (wound-induced domain)	4,26	5,30	Pv05
Phvul.005G108000	wound-induced protein	4,80	11,78	Pv05
Phvul.005G108400	wound-responsive family protein	5,25	16,76	Pv05
Phvul.005G108200	hypothetical protein (wound-induced domain)	6,00	8,15	Pv05
Phvul.011G110800	hypothetical protein (wound-induced domain)	6,17	6,04	Pv11
Phvul.004G064700	lob domain-containing protein 41-like	6,73	4,43	Pv04
Phvul.009G178500	probable inactive ADP-ribosyltransferase	7,09	4,35	Pv09
Phvul.006G017400	udp-glycosyltransferase 85a5-like	4,70	-13,15	Pv06
Phvul.004G153100	lysine-specific demethylase 5a-like	4,83	-4,24	Pv04
Phvul.002G004100	expansin-like b1-like	-9,17	5,53	Pv02

¹Código de identificação da sequência genômica referência de *P. vulgaris*; ²Descrição do melhor alinhamento (*top hit*) encontrado no BLASTx; ³*Fold Change* (FC) aos 4 DAI; ⁴*Fold Change* (FC) aos 10 DAI; ⁵C: cromossomo de *P. vulgaris* no qual se encontra a sequência de referência. O sinal negativo indica que o gene está menos expresso no tratamento inoculado do que no controle