**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA INDUZIDA POR
Diatraea saccharalis EM CANA-DE-AÇÚCAR VIA
MACROARRANJOS DE COLÔNIAS BACTERIANAS**

CARLA FERNANDA BARSALOBRES

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Agronomia, Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo – Brasil

Julho – 2004

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA INDUZIDA POR
Diatraea saccharalis EM CANA-DE-AÇÚCAR VIA
MACROARRANJOS DE COLÔNIAS BACTERIANAS**

CARLA FERNANDA BARSALOBRES

Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. **MARCIO DE CASTRO SILVA FILHO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Agronomia, Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo – Brasil

Julho – 2004

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

Barsalobres, Carla Fernanda

Análise da expressão gênica induzida por *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar
via macroarranjos de colônias bacterianas.
228 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.
Bibliografia.

1. Brocas (insetos nocivos) 2. Cana-de-açúcar 3. Expressão gênica 4. Resistência
genética vegetal I. Título

CDD 633.61

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

“Quem não valorizar pequenos progressos não conseguirá obter grandes progressos. Os grandes progressos são resultado da perseverante manutenção da força de vontade. Contudo, por maior que seja a força de vontade, se a pessoa não tiver sonhos elevados e grandiosos não conseguirá realizar grandes obras. O sonho faz a mente definir um rumo visando a sua realização; e a força de vontade possibilita-nos manter vivo o sonho e perseverar até sua concretização”

Masaharu Taniguchi

Dedico este trabalho aos meus pais,
PEDRO e ROSÂNGELA, que propiciaram
as condições para minha formação
profissional, servindo-me de carinho,
incentivo, confiança e compreensão em
todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. MARCIO DE CASTRO SILVA FILHO, meu orientador, pela oportunidade, confiança e amizade.

Ao Dr. WILLIAN LEE BURNQUIST, gerente de fitotecnia do Centro de Tecnologia Copersucar, por ter permitido a realização deste trabalho.

Ao Dr. EUGÊNIO CÉSAR ULIAN (Seção de Biologia Molecular do Centro de Tecnologia Copersucar) pelo apoio no trabalho e pela amizade.

Ao Prof. Dr. JESUS A. FERRO, à Profa. Dra. SÔNIA M. Z. DI MAURO e aos alunos JULIANA REGINA ROSSI, NÁDIA SUELI CICILINI DA SILVA, RAFAEL FONSECA HECK e THAIZA G. M. DA SILVA (Centro Brasileiro de Estocagem de Clones - FCAV - UNESP, *Campus* de Jaboticabal) pelo suporte técnico e hospitalidade.

Ao Dr. ENRICO DE BENI ARRIGONI, ao Dr. LUIZ CARLOS DE ALMEIDA e à SUELI A. PIACENTINI (Seção de Entomologia do Centro de Tecnologia Copersucar) pela cessão dos insetos utilizados neste estudo e pela amizade.

À Dra. PATRÍCIA POMPERMAYER SESSO (Laboratório de Biologia Molecular de Plantas - ESALQ - USP, *Campus* de Piracicaba) pelo auxílio e empenho na realização dos experimentos e sobretudo pela amizade.

Ao Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO POSTALI PARRA e seus alunos (Laboratório de Biologia de Insetos - ESALQ - USP, *Campus* de Piracicaba) pelo empréstimo dos equipamentos para a montagem dos bioensaios.

Às Dras. SABRINA MOUTINHO CHABREGAS e MARIA CRISTINA FALCO (Seção de Biologia Molecular do Centro de Tecnologia Copersucar) pelo espaço e material cedidos para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. MARCELO MENOSSI e aos amigos, o Dr. FÁBIO T. S. NOGUEIRA e também o Dr. VICENTE E. DE ROSA JR. (Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - UNICAMP) pela colaboração, atenção e apoio.

Aos colegas RENATO VICENTINI DOS SANTOS e JULIANA DE MARIA FÉLIX (Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - UNICAMP) pelos ensinamentos de bioinformática e ajuda sempre que solicitada.

Ao Prof. Dr. FLÁVIO VIEIRA MEIRELLES e toda sua equipe (Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento - FZEA - USP, *Campus* de Pirassununga) por terem permitido o uso de seus equipamentos para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. ANTÔNIO AUGUSTO FRANCO GARCIA (Depto. de Genética - ESALQ - USP, *Campus* de Piracicaba) e ao aluno de pós-graduação ANTÔNIO WILLIAMS MOITA (Depto. de Ciências Exatas - ESALQ - USP, *Campus* de Piracicaba) pelo apoio nas análises estatísticas.

Ao Dr. DANIEL SCHERER DE MOURA (Jovem Pesquisador do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas - ESALQ - USP, *Campus* de Piracicaba) pela dedicação em revisar criteriosamente o conteúdo deste trabalho, e principalmente pelo incentivo, paciência e amizade.

Ao Prof. Dr. ANTONIO VARGAS DE OLIVEIRA FIGUEIRA (Laboratório de Melhoramento de Plantas - CENA - USP, *Campus* de Piracicaba), ao Prof. Dr. LUIZ LEHMANN COUTINHO (Laboratório de Biotecnologia Animal - Depto de Zootecnia - ESALQ - USP, *Campus* de Piracicaba), e aos seus alunos MUITO OBRIGADA pelo apoio técnico nos momentos decisivos desta tese...

Às amigas ALINE BRASILEIRO (AMÉLIA MON), ANA PAULA SALDANHA DE AGUIAR (OLÍVIA) e ROBERTA ENGELS DO NASCIMENTO (BORN) pelo ombro amigo nas horas difíceis e pelos ótimos momentos de alegria (e um brinde ao Dr. Clark!).

Aos amigos DANIELA BRIOSCHI e HENRIQUE MARQUES BARBOSA DE SOUZA pelos ótimos momentos em que passamos juntos.

Aos amigos Dr. MARCOS A. GIMENES e Dr. DARIO A. PALMIERI (Depto. de Genética - IB - UNESP, *Campus* de Botucatu) pelos ensinamentos, incentivo e amizade.

A TODOS os funcionários do Centro de Tecnologia COPERSUCAR pela amizade, apoio e solidariedade.

À minha FAMÍLIA pela compreensão nos momentos de minha ausência e pelo incentivo a cada novo rumo em que tomo nesta louca vida.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos, e à COPERSUCAR, PRONEX, CNPQ e FAPESP pelo financiamento deste projeto.

Aos COLEGAS do curso de pós-graduação, PROFESSORES e FUNCIONÁRIOS do Depto. de *Genética*, em especial, aos do Laboratório de *Biologia Molecular de Plantas*, pelo saudável relacionamento profissional e pessoal.

A todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

De maneira muito especial, agradeço ao meu amigo, amado e amante, MARCELO MATTOS CAVALLARI, pela sua colaboração e apoio na realização deste trabalho, sendo meu porto-seguro nos momentos difíceis e me inspirando e estimulando a cada novo dia.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Projetos Para Obtenção de Seqüências Expressas (<i>ESTs – Expressed Sequence Tags</i>).....	4
2.2 Análise em Larga Escala da Expressão Gênica.....	6
2.3 Gênero <i>Saccharum</i>	13
2.4 Broca do colmo <i>Diatraea saccharalis</i>	15
2.5 Mecanismos de Defesa das Plantas Contra Insetos Herbívoros.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Macroarranjos de Colônias Bacterianas.....	27
3.1.1 Seleção de Clones para a Confecção dos Macroarranjos.....	27
3.1.2 Confecção das Membranas.....	28
3.1.2.1 Transferência das Bactérias para a Membrana de Náilon.....	28
3.1.2.2 Crescimento das Bactérias na Membrana.....	32
3.1.2.3 Processamento da Membrana após o Crescimento das Bactérias	32
3.1.3 Normalização das Membranas.....	33
3.1.3.1 Hibridização com a Sonda <i>Overgo</i>	33
3.1.3.2 Análise dos Experimentos para Otimização da Técnica.....	37

	x
3.1.3.3 Contagem do Número de Unidades Formadoras de Colônias.....	38
3.1.4 Análise dos Experimentos para Normalização com a Sonda <i>Overgo</i>	39
3.2 Avaliação da Expressão Gênica em Resposta a Herbivoria.....	39
3.2.1 Material Vegetal: Cana-de-açúcar.....	39
3.2.2 Insetos: <i>Diatraea Saccharalis</i>	40
3.2.3 Ensaio Biológico.....	42
3.2.4 Extração de RNA Total.....	46
3.2.5 Quantificação do RNA Total.....	48
3.2.5 Preparo das Sondas e Hibridização.....	49
3.2.6 Hibridização dos Macroarranjos.....	50
3.2.7 Análise dos Dados de Expressão Gênica Responsiva a Herbivoria...	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1 Otimização da Técnica de Macroarranjos de DNA a partir de Colônias Bacterianas.....	53
4.1.1 Determinação do Tempo de Crescimento das Bactérias em Membranas de Náilon.....	53
4.1.2 Contagem do Número de Unidades Formadoras de Colônias.....	57
4.2 Análise da Expressão Gênica em Resposta à Herbivoria.....	58
4.2.1 Normalização com a Sonda <i>Overgo</i>	58
4.2.2 Normalização com as Sondas de cDNA de Cana-de-açúcar.....	59
4.2.3 Análise da Variedade SP80-3280 (Susceptível).....	62
4.2.4 Análise da Variedade SP81-3250 (Tolerante).....	80
4.3 Comparação Entre Variedade Susceptível e Tolerante.....	94
4.4 Alguns Genes de Interesse Induzidos em Resposta à Herbivoria.....	109
4.4.1 Sinais Sistêmicos.....	109
4.4.2 Proteínas de Defesa.....	113
5 CONCLUSÕES.....	119
ANEXOS.....	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149
APÊNDICES.....	181

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

(p/v)	peso / volume
(v/v)	volume / volume
μ	micro - 10^{-6} (μL , μM)
3x C	indução pelo menos 3 vezes maior que o valor de C
ABA	ácido abscísico
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylate
ACO	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
AOS	alene oxido sintase
BRIX	teor de sólidos solúveis por cento de caldo
BSA	albumina de soro bovino
C	intensidade de sinal emitida pelas plantas controle
cDNA	DNA complementar ao mRNA
CG	<i>Circle Grow Medium</i>
CS	tratamento controle da variedade susceptível (SP80-3280)
CT	tratamento controle da variedade tolerante (SP81-3250)
CTC	Centro de Tecnologia Copersucar
Cys	cisteína
DEPC	dietil pirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	deoxiribonucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
DsPTP1	<i>dual specificity protein phosphatase 1</i>
DTT	ditiotetol
EDTA	ácido etileno diamino tetraacético

ESTs	seqüências expressas (<i>Expressed Sequence Tags</i>)
F	variável do teste F
G	aceleração da gravidade
g	grama
GFP	proteína verde fluorescente (<i>green-fluorescent protein</i>)
GL	grau de liberdade
GSH	glutathiona
GSK-3	<i>glycogen synthase kinase 3</i>
h	hora
IP	<i>Image Plate</i>
JA	ácido jasmônico ou jasmonato
l	litro
log	logaritmo na base 10
log ₂	logaritmo na base 2
longESTs	maiores seqüências expressas
LOX	lipoxigenase
m	mili - 10 ⁻³ (ml, mg, mM)
M	molar
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MeJA	metil-jasmonato
met. 2 ^{ário}	metabolismo secundário
met. aa.	metabolismo de aminoácidos
met.	metabolismo
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)-propanos-sulfônico
mRNA	RNA mensageiro
MtN3	gene nódulo-específico de <i>Medicago truncatula</i>
n	nano - 10 ⁻⁹ (nl, ng, nM)
N, S, P	nitrogênio, enxofre, fósforo
ND	classe gênica cujos genes têm função não determinada
PAL	L-fenilalanina amônia-liase

pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato salino
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PI	inibidor de proteases
POL	sacarose aparente por cento de caldo
PPO	polifenol oxidase
Pr	probabilidade
QM	quadrado médio
RNA	ácido ribonucléico
RNAse	ribonuclease
ROS	espécies reativas de oxigênio
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
S	variedade susceptível (SP80-3280) submetida à herbivoria
Sarcosil	Sodium Lauryl Sarcosinate ou N-lauroilsarcosina
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
SQ	soma dos quadrados
SSC	tampão salino de citrato de sódio
SSP	<i>seed storage protein</i>
SUCEST	projeto de obtenção de <i>ESTs</i> de cana-de-açúcar
SUS	variedade susceptível (SP80-3280)
T	variedade tolerante (SP81-3250) submetida à herbivoria
TAL	L-tirosina amonia-liase
TOL	variedade tolerante (SP81-3250)
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
UFC	unidade formadora de colônia
UR	umidade relativa do ar
VSP	<i>vegetative storage protein</i>
$\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP	citossina marcada com ^{33}P na posição alfa do nucleotídeo

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA INDUZIDA POR *Diatraea saccharalis*
EM CANA-DE-AÇÚCAR VIA MACROARRANJOS DE
COLÔNIAS BACTERIANAS**

Autora: CARLA FERNANDA BARSALOBRES

Orientador: Prof. Dr. MARCIO DE CASTRO SILVA FILHO

RESUMO

O seqüenciamento em larga-escala e a aplicação da tecnologia de seqüências expressas (*ESTs*) permitiram a identificação de milhares de seqüências genômicas de vários organismos. Através de projetos como o de obtenção de *ESTs* de cana-de-açúcar (*SUCEST – Sugarcane EST Project*), a tecnologia de macro e microarranjos de DNA pôde ser aplicada para o monitoramento da expressão gênica. O primeiro passo deste trabalho foi otimizar a técnica de macroarranjos utilizando-se colônias bacterianas. Os arranjos foram construídos com o auxílio do robô Q-Bot. Células bacterianas contendo clones de cDNA de cana-de-açúcar foram arranjadas em duplicata em membranas de náilon e crescidas por 6 e 12 horas. Como resultado, concluiu-se que é possível estudar a expressão gênica em larga-escala usando macroarranjos de colônias bacterianas crescidas por 6 horas. Na segunda parte, o objetivo foi identificar genes de defesa em duas variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), em resposta ao herbívoro *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). A cana-de-açúcar é de grande importância para a

agricultura brasileira e para a economia geral de muitos países em desenvolvimento. Estas plantas são atacadas por *D. saccharalis*, a mais importante praga desta cultura, causando significativas perdas econômicas. Como é sabido, as plantas desenvolveram complexas estratégias para se protegerem do ataque de insetos-praga. As variedades SP80-3280 (susceptível) e SP81-3250 (tolerante) de cana-de-açúcar foram expostas à *D. saccharalis*. Plantas submetidas à lagarta e plantas controle foram coletadas em 0,5, 6, 12 e 24 horas de experimento. As análises permitiram a identificação de genes diferencialmente expressos em resposta à lagarta nas duas variedades. Foram analisados o tempo, dinâmica e regulação da expressão de 3.840 clones do *SUCEST*, os quais foram crescidos na membrana de náilon por 6 horas. Estes *ESTs* foram agrupados em dezesseis classes: metabolismo de aminoácidos, crescimento/desenvolvimento, metabolismo de proteínas, metabolismo de RNA, metabolismo secundário, resposta à diferentes condições de estresse, transporte, bioenergética, transdução de sinal, dinâmica celular, metabolismo de DNA, metabolismo de lipídios, elementos móveis, metabolismo de nitrogênio, sulfato e fosfato, metabolismo de nucleotídeos e função não determinada (ND). Estes resultados ajudam elucidar as estratégias de defesa desenvolvidas pela cana-de-açúcar para evitar os danos causados por esta praga. Neste estudo, os dados do macroarray revelaram 580 *ESTs* com expressão aumentada, oriundos das duas variedades. Estes resultados são importantes não somente porque este é o primeiro estudo em larga-escala da expressão gênica de uma monocotiledônea em resposta ao ataque de herbívoros, mas também porque permite a comparação dos perfis de expressão entre genótipos susceptível e tolerante de cana-de-açúcar. Este estudo abre possibilidades para a engenharia genética de plantas de cana-de-açúcar inseto-resistentes e também para o uso destes genes como marcadores moleculares em programas de melhoramento assistido.

ANALYSIS OF EXPRESSED GENES INDUCED BY *Diatraea saccharalis* IN SUGARCANE USING BACTERIAL COLONIES ARRAYS

Author: CARLA FERNANDA BARSALOBRES

Adviser: Prof. Dr. MARCIO DE CASTRO SILVA FILHO

SUMMARY

Large-scale sequencing and the application of expressed sequence tag (EST) technology has led to the identification of hundreds of thousands of genomic sequences from various organisms. Through projects like the *Sugarcane Expressed Sequence Tag (SUCEST)*, DNA arrays technology could be applied in monitoring gene expression. The first step of this work was to optimize the macroarray technique with bacterial colonies. Arrays were robotically constructed (Q-Bot). Bacterial cells carrying sugarcane cDNA clones were arrayed in duplicate onto nylon membrane and grown for 6 and 12 hours. As a result, we conclude that is possible to study the gene expression in large-scale using macroarray through bacterial colony that grown for 6 hours. The second part of this work was to study how different two sugarcane varieties (*Saccharum* sp.) are in response resistance against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Sugarcane is of great importance for Brazilian's agriculture and for the general economy of many tropical developing countries. These plants are attacked by *D. saccharalis*, the most important insect pest of sugarcane, causing significant economic losses. As it is well known, plants have

evolved complex defense strategies to protect them in opposition to attack by insects. The varieties SP80-3280 (susceptible) and SP81-3250 (tolerant) were exposed to *D. saccharalis*. Plants materials from plants with the borer and control plants (without the borer) were collected at 0.5, 6, 12 and 24 hours time points. The analysis revealed genes differentially expressed in response to sugarcane borer in both varieties. We analyzed the timing, dynamics, and regulation of the expression of 3,840 *SUCEST* clones, which were grown on a nylon membrane for 6 h. These *ESTs* was grouped into 16 broad categories: amino-acid metabolism, plant grow and development, protein metabolism, RNA metabolism, secondary metabolism, stress response, transport, bioenergetics, signal transduction, cellular dynamics, DNA metabolism, lipid, fatty-acid metabolism, mobile genetic elements, nitrogen, sulphur and phosphate metabolism, nucleotide metabolism, and the group matched to unable to classify, which no indication of the function of the gene product are known. These results help to elucidate the defense strategies developed by sugarcane in order to prevent against insect damage. In this study, macroarray analyses revealed 580 *ESTs* with increased expression, from both varieties. These results are important not only because this is the first large-scale gene expression study of a monocot in response to insect attack, but also because it allows the comparison of the gene expression pattern between susceptible and tolerant genotypes. This study opens possibilities for genetically-engineering of insect-resistant sugarcane and for using these genes as molecular markers in conventional breeding programs.

1 INTRODUÇÃO

Desde as descobertas pioneiras de Mendel, os princípios de crescimento, desenvolvimento e respostas dos organismos ao ambiente têm sido estudados como programas determinados pela expressão dos genes. Assim, uma das questões mais relevantes seja entender como os elementos na seqüência de DNA são utilizados para a expressão de seus genes, em que condições cada produto gênico é sintetizado e, uma vez sintetizado, qual a sua função.

Vários projetos objetivando estudar o conjunto de genes de algumas espécies de gramíneas foram desenvolvidos, tais como o projeto de seqüências expressas (*ESTs – Expressed Sequence Tags*) do arroz (*Oryza sativa* L.) (Sasaki, 1998) e o do milho (*Zea mays*) (Gai et al., 2000). Também foram lançados diferentes programas para entender o mecanismo genético da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). Estes projetos estão sendo conduzidos, por exemplo, na Austrália (*Bureau of Sugar Experimental Stations – BSES*), na África do Sul (*South African Sugar Association Experiment Station – SASEX*), nos Estados Unidos da América (*American Society of Sugar Cane Technologists – ASSCT*) e no Brasil (COPERSUCAR e FAPESP).

A agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil tem uma produção anual de 300 milhões de toneladas, o que equivale a 25% do que é gerado no mundo. Metade desse volume vai para a produção de etanol (álcool) e a outra metade para a de açúcar. Além destes produtos, a cana-de-açúcar também constitui base para produção de matérias primas como bagaço, melaço, e outras de utilização crescente (Stupiello, 1987).

No entanto, muitos fatores são responsáveis pela redução dos rendimentos agroindustriais da cultura, tais como a ação de pragas que causam significativas perdas por unidade de área. Entre essas pragas, destaca-se a broca do colmo (*Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794), pela sua ampla distribuição nos canaviais do Brasil e de outras localidades no continente americano de maneira geral (Terán, 1987; Vendramim et al., 1989). A broca ataca a cultura da cana-de-açúcar pela abertura de galerias nos colmos, provocando perda de peso, morte das gemas e "coração morto", que além de reduzir a tonelagem por área, não raro, exige custosos replantes. Ocorrem também prejuízos indiretos consideráveis, pois as aberturas (orifícios e galerias) permitem a entrada dos fungos *Colletotrichum falcatum* Went e *Fusarium moniliforme*, que invertem a sacarose em glucose, diminuindo a pureza do caldo e o peso do açúcar (Guagliumi, 1972/73). Estima-se que para cada 1% de intensidade de infestação perdem-se 0,14% de cana em peso no campo e 0,48% de açúcar no processo de extração na indústria (Orlando-Filho et al., 1994).

Um crescente interesse por experimentos de expressão gênica tem sido verificado nas pesquisas médica, biológica e agrícola. Com o advento de projetos *ESTs*, como o *SUCEST (Sugarcane EST Project)*, surgiram novas técnicas capazes de avaliar a expressão de milhares de genes simultaneamente. Dois exemplos dessas técnicas são os micro e macroarranjos de DNA, que permitem a obtenção de informações sobre a expressão de milhares de *ESTs* geradas nestes projetos. Nestas técnicas, o arranjo de diferentes formas de DNA permite o monitoramento simultâneo dos níveis de expressão em larga escala, possibilitando a análise de genes em diferentes tipos de células ou em diferentes condições fisiológicas. Isto é possível porque as variações nos níveis de transcritos celulares correspondem às diferenças na expressão gênica, que podem ser mensuradas por fluorescência em lâminas de vidro (Gasch et al., 2001) ou por radioisótopos em membranas de náilon (Jung & Hwang, 2000).

O desenvolvimento da tecnologia microarranjos de DNA está revolucionando os estudos de genômica funcional. A densidade de genes em arranjos de vidro pode atingir uma magnitude muito maior quando comparado à técnica de macroarranjos. Entretanto, esta metodologia é limitada, dado os altos custos destes ensaios. Para o estudo do diferencial de expressão gênica, através desta técnica, duas sondas são utilizadas (Cy3 e Cy5) para serem hibridizadas no arranjo, e para a detecção da intensidade de sinal é necessário um equipamento especial. Assim, a hibridização de microarranjos requer investimentos muito maiores que os necessários para arranjos em membranas de náilon. Além disso, é um consenso que a padronização dessa metodologia é muito mais complexa (Nadon & Shoemaker, 2002).

Macroarranjos de DNA, em membranas de náilon, empregam metodologias rotineiras, robustas e de fácil implementação na maioria dos laboratórios de biologia molecular, sem a necessidade de investimentos vultosos e longos períodos de padronização. Aliado a isso, o uso de colônias bacterianas para o arranjo torna a técnica significativamente mais barata e uma alternativa para a análise da expressão gênica em larga escala (Cox, 2001).

Assim, através deste trabalho, procurou-se otimizar a técnica de macroarranjos de colônias bacterianas para estudos da expressão gênica em larga escala, devido à simplicidade na tecnologia quando comparado com microarranjos de DNA, e também analisar a expressão de 3.840 *ESTs* de cana-de-açúcar, com o objetivo de identificar e caracterizar genes expressos, como mecanismo de defesa, em duas variedades de cana-de-açúcar: SP80-3280 (susceptível à broca da cana) e SP81-3250 (tolerante à broca da cana).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Projetos Para Obtenção de Sequências Expressas (*ESTs – Expressed Sequence Tags*)

Sequências expressas (*ESTs*) são obtidas a partir do seqüenciamento do DNA complementar (cDNA) derivado da transcrição reversa do RNA mensageiro (mRNA) de um organismo, tecido ou ainda de um único tipo celular. São caracterizadas por serem seqüenciadas uma única vez (*single-pass*) e por este motivo, incompletas. Ou seja, geralmente são pequenas, com cerca de 600 pares de bases (*pb*), e contêm seqüências parciais do mRNA de origem. Uma vez seqüenciadas as várias *ESTs*, torna-se possível a análise funcional dessa informação, não só para a identificação dos genes de interesse, mas também para conhecer o padrão de expressão gênica em diferentes condições ambientais.

Diversos organismos de interesse científico e/ou econômico têm sido investigados através de *ESTs*. Em tomate (*Lycopersicon esculentum*), organismo utilizado como modelo para diversos estudos relacionados à biologia das plantas, foram obtidas mais de 150.000 *ESTs* a partir de 26 bibliotecas de cDNA (Hoeven et al., 2002). Estas seqüências estão sendo utilizadas para a identificação de genes específicos a tecidos e fases do desenvolvimento, e também para identificar genes expressos em resposta aos estresses bióticos e abióticos. Uma vez identificadas, estas seqüências compreendem a base de dados de *ESTs* do tomate em *The Institute for Genomic Research (TIGR)*, <http://www.tigr.org/tdb/tgi/lgi/>.

Com os mesmos objetivos, as empresas *North Central Soybean Research* e *United Soybean Board* subsidiaram o projeto de *ESTs* para a soja. O objetivo do programa foi gerar mais de 200.000 *ESTs*, representando genes expressos em diversos tecidos, órgãos e condições ambientais. Para esta espécie, aproximadamente 65 bibliotecas de cDNA foram criadas (Maguire et al., 2002).

Há também projetos de obtenção de *ESTs* para *Arabidopsis*, trigo, milho e arroz, entre outras plantas. O número de *ESTs* conhecido para estes organismos, segundo o banco de dados de *ESTs* do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>), é de mais de 188.000 *ESTs* para *Arabidopsis*, 499.000 para trigo, 360.000 para milho e 260.000 para arroz.

Carson & Botha (2000) realizaram uma análise preliminar de *ESTs* de cana-de-açúcar. Neste estudo, os autores apontaram informações úteis sobre as seqüências gênicas de cana-de-açúcar. Duzentos e cinquenta clones, oriundos de folhas, foram selecionados aleatoriamente e seqüenciados na extremidade 5' do vetor. Destes clones, 24% foram tidos como novas seqüências gênicas. Estes resultados apresentaram uma aplicação bem sucedida da análise de *ESTs* e forneceram uma indicação da expressão de genes no tecido foliar.

No Brasil, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Cooperativa dos Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo (COPERSUCAR), financiaram o projeto de obtenção de *ESTs* de cana-de-açúcar (*SUCEST – Sugarcane EST Project*). Neste projeto, 26 bibliotecas de cDNA foram construídas a partir da extração de RNA total de várias fontes: calos, raízes, diferentes estágios de folhas, colmos, plantas infectadas com patógenos, etc. (Vettore et al., 2001). Mais de 237.000 *ESTs* foram obtidas resultando em 43.141 *clusters*, que são agrupamentos das *ESTs* de acordo com o alinhamento das seqüências consenso (no sentido 5' → 3') (Telles & DaSilva, 2001).

Ma et al. (2003) seqüenciaram a extremidade 5' de 9.216 clones de cana-de-açúcar, a partir de três bibliotecas de cDNA oriundas do ápice floral, folhas e internos maduros. Estas seqüências aumentaram o número de *ESTs* de cana-de-açúcar no *GenBank* em aproximadamente 8 vezes, a 8.985 de 992 (de acordo com dados de 8 junho 2003), sendo que as *ESTs* prévias foram oriundas dos trabalhos de Carson & Botha (2000), Carson & Botha (2002) e Carson et al. (2002). Estas *ESTs* foram comparadas com a base de dados de dados do *SUCEST* (<http://sucest.lad.ic.unicamp.br/en/>) e um total de 302 seqüências eram ausentes neste banco, sugerindo, de acordo com os autores, que estas diferenças podem ser devidas à fatores ambientais.

A partir da publicação do trabalho de Vettore et al. (2003) a base de dados do *SUCEST* foi adicionada ao *GenBank*, aumentando o número de *ESTs* descritas de cana-de-açúcar a 246.301.

2.2 Análise em Larga Escala da Expressão Gênica

A obtenção de *ESTs* é um meio rápido e efetivo de produzir seqüências parciais para a maioria dos genes expressos (Nogueira et al., 2003). A comparação de uma seqüência desconhecida com o vasto número de *ESTs* é um instrumento importante e poderoso da pesquisa genética (Ohlrogge & Benning, 2000), e bancos de dados destas seqüências estão sendo utilizados na montagem de ferramentas para a análise em larga escala da expressão gênica (Cushman & Bohnert, 2000).

Segundo Perret et al. (1998), a concentração do mRNA de um determinado gene em relação à concentração total de mRNA da célula é um indicativo do quanto este gene está sendo expresso, isto é, do quanto a célula está investindo em seu maquinário bioquímico para produzir a proteína codificada por este gene. Assim, foram desenvolvidas metodologias para medir a concentração relativa de determinados transcritos. *Differential Display* (Liang & Pardee, 1992; Wan et al., 1996), *Serial Analysis of Gene Expression – SAGE*

(Velculescu et al., 1995), biblioteca subtrativa (Sargent, 1987; Nedevi et al., 1993; Diatchenko et al., 1996; Xiong et al., 2001), *Dot Blots* (Stohl & Lambowitz, 1983) e *RT-PCR* (Watakabe et al., 2001) são alguns dos métodos utilizados para monitorar mudanças na expressão gênica.

A partir de projetos *ESTs*, que produziram uma gigantesca quantidade de seqüências expressas, surgiram novas técnicas capazes de avaliar os níveis relativos de mRNA de milhares de genes simultaneamente (Adams et al., 1991; Baldwin et al., 1999; Kozian & Kirschbaum, 1999). Dois exemplos dessas técnicas são os micro e os macroarranjos de DNA (Khan et al., 1999; VanHal et al., 2000; Narusaka et al., 2003).

Os arranjos de DNA são constituídos de um suporte sólido (membranas de náilon ou placas de vidro) onde os DNAs-alvo (*ESTs*, produtos de PCR, plasmídeos ou ainda bactérias contendo plasmídeos) são depositados de maneira ordenada (Lennon & Hehrach, 1991; Nguyen et al., 1995). Os arranjos são então expostos para hibridização com uma população de mRNA marcada com fluoróforos ou isótopos radioativos. O sinal produzido por um determinado mRNA é proporcional à sua concentração na população original (Perret et al., 1998).

Convém ressaltar que existem diversos termos empregados para descrever os arranjos de DNA. O termo microarranjos será utilizado para descrever arranjos em vidro tais como *DNA arrays* (Schummer et al., 1999), *oligonucleotide arrays* (Cohen et al., 2000), *cDNA glass slides* (Ichikawa et al., 2000; Kuhn et al., 2001) e *microarrays* (White et al., 1999; Tanaka et al., 2000; Li et al., 2001). Já o termo macroarranjos será utilizado para descrever arranjos em membranas de náilon como, por exemplo, *high density membranes* (Gress et al., 1992; Zhao et al., 1995; Eckmann et al., 2000), *nylon arrays* (Cox, 2001), *cDNA macroarrays* (Sasaki et al., 2001; Watakabe et al., 2001) e *filter arrays* (Nogueira et al., 2003).

Os arranjos de DNA (micro e macroarranjos) podem ser diferenciados por três características: o suporte sólido empregado, o método de

detecção e o número de genes analisados. Quanto aos suportes, os microarranjos utilizam *slides* de vidro ou *chips* de silício, enquanto os macroarranjos utilizam membranas de náilon. A detecção dos sinais pode ser feita por meio de fluoróforos (Cy3 e Cy5) em microarranjos e por isótopos radioativos (^{32}P ou ^{33}P) em macroarranjos. Em relação ao número de genes representados no suporte, os microarranjos podem analisar até 20.000 genes, enquanto que os macroarranjos analisam até 5.000 (Schena et al., 1995; Lashkari et al., 1997; Kozian & Kirschbaum, 1999).

Em macroarranjos, dependendo do número de clones a serem arranjados e da densidade desejada, a aplicação nas membranas pode ser realizada manualmente ou por robô automático (Piétu et al., 1996). A Figura 1 representa um esquema da confecção de membranas de alta densidade (macroarranjos) e do preparo de sondas para análise em larga escala de transcritos celulares (mRNA). Nessas aplicações, clones de cDNA (ou produtos PCR) são arranjados em membranas de náilon através de um robô automático. As sondas complexas de cDNA são preparadas a partir dos mRNAs (RNA poli A+) ou do RNA total, submetidos à transcriptase reversa e marcação radioativa simultânea dos cDNAs resultantes (Bernard et al., 1996). A marcação radioativa é feita com ^{33}P preferencialmente, pois este radioisótopo permite maior resolução quando se trabalha com membranas de alta densidade (Passos et al., 2000).

Figura 1 – Esquema da confecção de membranas de alta densidade (macroarranjos) e preparo de sondas para análise em larga escala de transcritos celulares (mRNA)

Fonte: adaptado de Passos et al. (2000)

Tanto os micro como os macroarranjos de DNA baseiam-se no mesmo princípio: quanto maior a expressão de um determinado gene, em uma determinada condição (biológica ou ambiental), maior será o número de moléculas de mRNA referente àquele gene, sendo maior o número de cDNAs marcados na sonda sintetizada e, conseqüentemente, maior o valor de intensidade de sinal detectado quando a sonda é hibridada com a seqüência específica de DNA (Felix et al., 2002).

O primeiro relato na literatura sobre o uso de microarranjos para análise da expressão gênica em larga escala foi o de Schena et al. (1995), que realizaram testes para padronizar a quantificação dos níveis de expressão gênica em *Arabidopsis*. Desde então, vários estudos foram feitos em plantas empregando-se essa metodologia.

Desprez et al. (1998) identificaram genes diferencialmente expressos em plântulas de *Arabidopsis thaliana* crescidas na ausência e na presença de luz. Eles estudaram 800 genes de *Arabidopsis* e através da comparação dos perfis de expressão obtidos encontraram variações significativas nos níveis de mRNA para aproximadamente 16% dos genes investigados.

As interações intra-específicas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) em resposta ao ácaro *Tetranychus urticae* foram estudadas por Arimura et al. (2000a) utilizando a técnica de microarranjos. Os autores relataram neste trabalho a ativação diferencial de 324 genes dentre as 2.032 seqüências-alvo do arranjo.

Mudanças na expressão gênica em resposta a danos mecânicos e danos causados pela lagarta *Pieris rapae* em *Arabidopsis* foram relatadas por Reymond et al. (2000). O grupo mostrou que os perfis dos transcritos submetidos aos danos eram bem diferentes, sendo que somente um gene, o codificador da proteína tipo heveína (HEL), foi especificamente induzido pelo ataque da lagarta.

Genes responsivos ao nitrato foram estudados em *Arabidopsis* por Wang R. et al. (2000). Analisando 5.524 genes arranjados em *slides* de vidro, foram encontrados 40 genes fortemente induzidos na presença de nitrato. Foi observado também um padrão de indução, no qual quanto maiores as concentrações de nitrato, maior o número de genes induzidos. Wang et al. (2001) também realizaram o monitoramento do perfil de expressão gênica em raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). Neste trabalho foram utilizados 1.280 genes de tomate responsivos a diferentes tempos de exposição ao nitrato. Estes genes foram selecionados através de biblioteca subtrativa para a confecção das membranas de náilon. Foram encontrados 115 genes superexpressos para o excesso de exposição ao nitrato e também 14 genes que não são relacionados à nutrição vegetal.

A expressão de genes em resposta à deficiência de ferro foi analisada em raiz e parte aérea de *Arabidopsis* (Thimm et al., 2001). O perfil de expressão gênica foi investigado com o uso de 6.000 seqüências gênicas de *Arabidopsis*. Após 24 horas de exposição à deficiência de ferro foram identificados 227 genes induzidos e 219 genes reprimidos.

Com o objetivo de estudar a expressão de genes potencialmente regulados por ácido jasmônico, Sasaki et al. (2001) fizeram macroarranjos representando 2.880 genes de *Arabidopsis thaliana*. A análise dos resultados permitiu a identificação de 41 genes que respondem ao jasmonato.

Para identificar genes de defesa relacionados a patógenos em arroz (*Oryza sativa*), Xiong et al. (2001) arranjaram 288 colônias bacterianas em membranas de alta densidade. Eles identificaram 22 genes diferencialmente expressos em resposta à infecção pelo fungo *Pyricularia grisea*. A análise das seqüências indicou que a maioria destes genes são proteínas relacionadas a patógenos.

Seki et al. (2001) construíram bibliotecas de cDNAs utilizando mRNAs extraídos de plantas de *Arabidopsis* submetidas a diferentes condições ambientais, tais como estresse hídrico e frio. As avaliações foram feitas em

vários estágios de desenvolvimento da planta. Utilizando bibliotecas com seqüências expressas maiores (*longESTs*), aproximadamente 1.300 fragmentos de cDNAs foram amplificados por PCR e transferidos para *slide* de vidro. Como resultado, o grupo identificou 74 e 29 genes relacionados aos estresses hídrico e térmico respectivamente. Dos 103 genes identificados, 40 ainda não tinham sido reportados para estas condições.

Para identificar genes das plantas que respondem ao fotoperíodo, Schaffer et al. (2001) usaram microarranjos contendo 11.521 *ESTs* de *Arabidopsis*. Os autores coletaram amostras a cada 6 horas e determinaram que 11% dos genes eram induzidos ou reprimidos durante o dia e aproximadamente 2% estavam associados ao ritmo circadiano.

Carson et al. (2002) construíram bibliotecas subtrativas de colmos de cana-de-açúcar com baixo teor de sacarose e com maior teor, cujo resultado foram 400 seqüências de cDNA que estavam sendo diferencialmente expressas naquele experimento. Depois da clonagem destes fragmentos, os clones foram arranjados aleatoriamente em membranas de náilon e a análise dos resultados indicou que 36% e 30% do número total de *ESTs* analisadas eram diferencialmente expressas nos colmos com baixo e alto teor de sacarose respectivamente.

A resposta ao fungo *Alternaria brassicicola* em *Arabidopsis* foi estudada por Narusaka et al. (2003). O tipo selvagem de *Arabidopsis thaliana* (Columbia), resistente a *A. brassicicola*, foi contrastado com o mutante *pad3*, que não inibe o crescimento e desenvolvimento do patógeno. Microarranjos de 7.000 genes foram analisados e os resultados mostraram que o mutante *pad3* não somente tem um padrão alterado de expressão gênica, mas também sincronismo de expressão de muitos genes relacionados à defesa em resposta ao fungo *A. brassicicola*.

Estudos de Halitschke et al. (2003) revelaram que plantas de tabaco (*Nicotiana attenuata*) atacadas pelo inseto *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) apresentam um perfil transcricional diferente de plantas não

atacadas. Arranjos de 241 genes foram feitos em *slide* de vidro e mais de 68% dos genes tiveram perfis de expressão diferenciados. Ainda sobre estas interações, Hui et al. (2003) fizeram microarranjos de 115 genes e a análise mostrou 73 genes diferencialmente expressos.

Usando um macroarranjo de 1.536 *ESTs* transferidas manualmente para membranas de náilon, Nogueira et al. (2003) analisaram a expressão gênica em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. cv SP80-3280) expostas ao frio. Foram encontrados 34 genes induzidos pelo frio, dos quais 20 ainda não tinham sido relatados. Além destes, 25 *ESTs* foram identificadas como sendo inibidas durante a exposição ao frio.

2.3 Gênero *Saccharum*

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) é uma gramínea perene pertencente ao gênero *Saccharum*, tribo Andropogoneae, família Poaceae (Gramineae). Das seis espécies de cana-de-açúcar conhecidas, duas são consideradas silvestres: *S. robustum* e *S. spontaneum*, e quatro cultivadas: *S. officinarum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule* (Daniels & Roach, 1987).

Originária do Sudeste Asiático, a cana-de-açúcar é hoje uma das mais importantes espécies vegetais em todo o mundo. É cultivada em cerca de 130 países tropicais e subtropicais, alcançando uma área total de 19 milhões de hectares (Agrianual, 2000).

Oficialmente, foi Martim Affonso de Souza que em 1532 trouxe a primeira muda de cana ao Brasil e iniciou seu cultivo na Capitania de São Vicente. Lá, ele próprio construiu o primeiro engenho de açúcar. Mas foi no Nordeste, principalmente nas Capitanias de Pernambuco e da Bahia, que os engenhos de açúcar se multiplicaram (Matsouka et al., 1999).

A indústria sucro-alcooleira viveu um de seus maiores momentos quando o álcool passou a ser utilizado como combustível de automotivos, incentivado pelo Programa Nacional de Álcool – o Pró-Álcool – criado em 75/76

(Fernandes, 1996). Hoje, o Brasil é responsável por 25% da produção mundial de cana-de-açúcar, sendo o Estado de São Paulo produtor de 60% da produção nacional (Prossiga, 2002).

Apresentando um genoma complexo, o gênero *Saccharum* é caracterizado por um alto nível de ploidia, com número cromossômico variando de 40 a 140 e com conteúdo haplóide de DNA ao redor de 6 pg, equivalente a cerca de 7 – 8 vezes o genoma do arroz (Arumuganathan & Earle, 1991). As variedades comerciais, via de regra, são aneuplóides resultantes do processo conhecido como “nobilização”. Neste processo estão envolvidos cruzamentos interespecíficos entre *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum* e uma série de retrocruzamentos para *S. officinarum*, a chamada “cana nobre” (DaSilva et al., 1993). As outras espécies do gênero *Saccharum* que cruzam com cana nobre, tais como *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule*, formam o chamado “complexo *Saccharum*” (Screenivasan et al., 1987).

Importantes variedades oriundas de programas de melhoramento de instituições como COPERSUCAR, o Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e a Universidade de São Carlos (UFSCar) têm sido liberadas para cultivo. A COPERSUCAR trabalha com melhoramento genético de cana-de-açúcar desde 1969 e, até 1997, tinha desenvolvido cerca de 40 variedades. Desde que a lei dos cultivares entrou em vigor (LEI Nº 9.456, de 25 de abril de 1997), o programa de melhoramento desta cooperativa colocou no mercado mais de 17 variedades. Atualmente, 76% das usinas e destilarias associadas à COPERSUCAR e 50% das não-associadas de todo o país plantam as variedades liberadas por esta instituição (UDOP, 2001).

Os progressos no melhoramento genético da cana-de-açúcar, através de programas convencionais de cruzamentos, são limitados pelo elevado nível de ploidia, aliado à alta complexidade citogenética, e pela dificuldade de se realizar polinização controlada nestas plantas (Hogarth, 1987). Isso faz com que muitos materiais altamente promissores sejam abandonados por apresentarem falhas, como por exemplo, a suscetibilidade à alguma

doença. Assim, estes fatores tornam a cana-de-açúcar uma excelente candidata ao melhoramento por meio da engenharia genética (Roach, 1995).

2.4 Broca do colmo *Diatraea saccharalis*

A cultura da cana-de-açúcar sofre o ataque de inúmeros insetos-pragas, os quais constituem-se muitas vezes em fatores limitantes à produção sucro-alcooleira. Estima-se que os danos causados pelos insetos na cultura ultrapassem os 550 milhões de dólares por ano (Bento, 1999). A broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794), é a principal praga da cana, pertencendo à ordem Lepidoptera, família Crambidae, cuja provável origem foi nas Américas Central e do Sul (Sgrillo, 1979).

As lagartas de *D. saccharalis*, logo após a eclosão, alimentam-se do parênquima das folhas convergindo, a seguir, para a bainha das mesmas. Em seguida, as lagartas de primeira muda penetram nas gemas laterais e, a partir deste momento, abrem galerias dentro do colmo, onde completam o desenvolvimento larval (Vendramin, 1987).

De hábito noturno, as mariposas representam a fase adulta, e ovipositam geralmente na face abaxial das folhas de cana. O estágio larval é constituído de 5 a 6 ínstars, nos quais as lagartas se alimentam das folhas e do colmo da planta, como descrito acima. A fase pupal é aquela onde a lagarta se submete à transformação completa dentro de um casulo protetor, completando, assim, seu ciclo de vida (Gallo et al., 2002) A Figura 2 apresenta os diferentes estágios do ciclo de vida da broca da cana.

Figura 2 – Diferentes estágios do ciclo de vida do inseto *D. saccharalis*.

(A) Indivíduo adulto (B) Estágio larval (C) Pupas do inseto

Fonte: Centro de Tecnologia Copersucar

Plantas de cana-de-açúcar atacadas pela broca apresentam prejuízos diretos e indiretos. Os prejuízos diretos podem ser causados e observados em qualquer estágio do desenvolvimento da planta. Uma infestação no início da cultura (canas de até 4 meses de idade) pode danificar a região meristemática da planta (gema apical) causando o sintoma conhecido como "coração morto" (Figura 3), que é um dos responsáveis pelas falhas nos canaviais (Braga, 2001). Já em plantas adultas, os danos provocados causam brotações laterais, enraizamento aéreo, perda de peso, afinamento e quebra do colmo, atrofia de entrenós e morte da planta, o que leva a uma acentuada queda da produção (Parra, 1993).

Figura 3 – Sintoma conhecido como "coração morto", indicado pela seta vermelha, causado pela broca da cana

Fonte: Centro de Tecnologia Copersucar

Os prejuízos indiretos são os mais importantes, pois através dos orifícios e galerias dos colmos causados pelas lagartas, penetram, entre outros, os fungos *Glomerella tucumanensis* e *Colletotrichum falcatum*, causadores da "podridão-vermelha" (Figura 4). As plantas invadidas por estes patógenos reagem produzindo substâncias de defesa a partir da conversão da sacarose. Isto resulta em perdas de até 50% do teor de sólidos solúveis por cento de caldo (BRIX), diminuindo também a pureza do caldo e dando menor rendimento em açúcar e álcool, sendo que os colmos mais atacados podem morrer (Mélo, 1984).

Figura 4 – Galerias do colmo, causado pela lagarta *D. saccharalis*, apresentando diferentes níveis da "podridão-vermelha"

Fonte: Centro de Tecnologia Copersucar

Ainda não é conhecido nenhum mecanismo de resistência em cana-de-açúcar contra a *D. saccharalis*, pois poucos estudos de resistência varietal da cana à broca têm sido desenvolvidos sob condições de infestação natural (Terán et al., 1985). Box (1952) constatou que numa intensidade de infestação de 12,5% houve redução de 5,8% no teor de sacarose. Segundo Ingran & Lugas, citados por Metcalfe (1969), para cada 1% de entrenós perfurados ocorre uma queda de 0,5% de açúcar. Experimentos em condições controladas com 20 variedades comerciais mostraram que houve uma redução de 0,18% em POL (sacarose aparente por cento de caldo), 0,25% na produção de açúcar e 0,20% na produção de álcool a cada 1% de entrenós brocados (Centro de Tecnologia Copersucar, 1997). Estudos de transformação genética da cana com genes que codificam inibidores de proteases (*PIs*) ou a toxina *Cry1Ab* do *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) mostraram resultados positivos no controle da lagarta (Falco & Silva-Filho, 2003; Braga et al., 2003).

2.5 Mecanismos de Defesa das Plantas Contra Insetos Herbívoros

Com o objetivo de diminuir o ataque dos insetos, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos de defesa. Estes mecanismos envolvem complexas vias de sinalização, que incluem barreiras físicas e químicas (Falco et al., 2001; Mello & Silva-Filho, 2002). Dentre estas defesas estão a indução de proteínas de defesa (Haruta et al., 2001), a liberação para o ambiente de compostos voláteis que atraem predadores dos insetos herbívoros (Birkett, 2000), a síntese de metabólitos secundários (Baldwin, 2001; Kliebenstein et al., 2001) e o aumento da densidade de tricomas em folhas e caules (Fordyce & Agrawal, 2001). Em contrapartida, os insetos desenvolveram estratégias para superar tais barreiras impostas pelas plantas. Estas estratégias incluem a metabolização e seqüestro de compostos tóxicos (Scott & Wen, 2001; Nishida, 2002), mecanismos de fuga (Zangerl, 1990) e alteração nos padrões de expressão gênica (Silva et al., 2001).

O manejo da resistência da cana-de-açúcar a insetos e patógenos é um dos principais objetivos no melhoramento desta cultura. Diversas variedades são impossibilitadas de alcançar o mercado devido à susceptibilidade a determinadas doenças e pragas. Assim, o estudo dos mecanismos de resistência destas plantas tem assumido um papel importante nas pesquisas atuais para o desenvolvimento da cultura (White, 1993; Yencho et al., 2000). Segundo Falco & Silva-Filho (2001), a expressão de vários genes de defesa relatados na literatura contra herbívoros é também observada em cana-de-açúcar, sugerindo a existência de um mecanismo de defesa similar.

Uma classe de substâncias que está intimamente relacionada à defesa das plantas é a dos inibidores de proteases (*PIs*) (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002; Broadway & Duffey, 1986). Os níveis destes *PIs* em folhas são normalmente baixos podendo ser rapidamente induzidos a níveis elevados quando as plantas são atacadas por insetos ou quando sofrem danos mecânicos (Ryan, 1990; Broadway, 1996; Rakwal et al., 2001). Estes inibidores

funcionam como substratos específicos das proteases digestivas dos insetos, formando um complexo estável no qual a proteólise é limitada e extremamente lenta (Tiffin & Gaut, 2001). Em última instância, os *PIs* atuam causando uma deficiência em aminoácidos, afetando o crescimento e desenvolvimento dos insetos. Eventualmente podem levá-los a morte devido à inibição das proteases digestivas ou à produção maciça destas enzimas, que reduzem a digestibilidade dos aminoácidos essenciais (Duan et al., 1996; Jongsma & Bolter, 1997; Pompermayer et al., 2001).

A polifenol oxidase (*PPO*), uma outra classe de proteínas induzidas por insetos e dano mecânico em plantas, têm sido reportadas como proteínas antimetabólicas aos insetos. Possuem a propriedade de modificarem aminoácidos livres, reduzindo a assimilação e o valor nutritivo das proteínas (Mayer & Harel, 1979; Felton et al., 1992; Sommer et al., 1994; Constabel et al., 1995; Constabel et al., 2000).

Embora poucos sejam os trabalhos sobre mecanismos de defesa em cana-de-açúcar, a resposta das plantas contra herbivoria ou ferimento tem sido extensamente estudada em culturas como *Arabidopsis* (Reymond & Farmer, 1998; Glazebrook, 1999; Schenk et al., 2000), tomate (McGurl et al., 1992; Thaler et al., 1996; Howe et al., 1996; Stout et al., 1999; Fidantsef et al., 1999), batata (Bolter & Jongsma, 1995; Dammann et al., 1997; Korth & Dixon, 1997), tabaco (Wang J. et al., 2000; Hermsmeier et al., 2001; Schittko et al., 2001), pimenta (Jung & Hwang, 2000; Moura & Ryan, 2001; Kim et al., 2001) e arroz (Schweizer et al., 1997; Agrawal et al., 2000; Rakwal et al., 2001).

Em tomate foi mostrado que a calmodulina (Bergey & Ryan, 1999) e a *mitogen-activated protein kinases* – *MAP* quinase (Stratmann & Ryan, 1997) estão envolvidas na via de transdução de sinais que levam a expressão de genes codificadores das proteínas induzidas por ferimento. Embora a via de transdução de sinal não esteja completamente elucidada, muitos trabalhos mostram que a expressão de genes induzidos por ferimentos é regulada positivamente por ácido jasmônico (Farmer & Ryan, 1990), sistemina (Pearce et

al., 1991), etileno (O'Donnell et al., 1996) e ácido abscísico (Peña-Cortés et al., 1991).

Os octadecanóides, moléculas cíclicas com função de sinalização em plantas (Creelman & Mullet, 1997; León & Sánchez-Serrano, 1999), são derivados do ácido linolênico, o ácido graxo mais abundante nas folhas (Browse & Somerville, 1991). Não são encontrados ácidos graxos livres em concentrações significantes em células saudáveis da planta, mas o aumento do ácido linolênico livre é observado em células tratadas com elicitores (Gundlach et al., 1992). Concordantemente, a produção de ferimentos em folhas de tomate ocasiona um aumento relativo dos níveis de ácido linolênico (Conconi et al., 1996). Adicionalmente, foi relatado que o ferimento de folhas, estresse osmótico ou toque induzem a uma elevação dos níveis de ácido jasmônico, seguida de uma alteração na expressão de genes (Wasternack & Parthier, 1997).

O ácido jasmônico e também seu metil-éster derivado, o metil-jasmonato, ocorrem naturalmente em muitas espécies de plantas (Sembdner & Parthier, 1993) e sua biossíntese se utiliza da via octadecanóide (Vick & Zimmerman, 1984). A função do ácido jasmônico, dentre outras, é inibir ou estimular o crescimento e o desenvolvimento da planta (Turner et al., 2002).

Em *Nicotiana attenuata*, a síntese de ácido jasmônico induzido por pragas ou por danos mecânicos é suficiente para estimular a produção da toxina nicotina nas raízes da planta (Baldwin, 1996).

Em *Arabidopsis* foi mostrado que muitos genes são ativados por ferimento mecânico ou por herbivoria. Segundo Farmer et al. (1998), a expressão da maioria destes genes pode ser induzida por tratamento com ácido jasmônico ou com seu precursor, o ácido oxofitodienóico. Estes compostos, membros da família jasmonato, são, essencialmente, reguladores *in vivo* da expressão de genes de defesa (Reymond & Farmer, 1998).

Em tomate descobriu-se a sistemina, um peptídeo de 18 aminoácidos que é liberado em locais afetados por insetos ou ferimentos. A via de transdução de sinal que media a sinalização da sistemina envolve a

liberação de ácido linolênico das membranas e subseqüentemente conversão para o ácido jasmônico (Ryan & Pearce, 1998). De acordo com Ryan (2000), a sistemina é o primeiro polipeptídeo-hormônio, que regula a ativação de mais de 20 genes de defesa em resposta ao ferimento. Segundo Constabel et al. (1998), tomate e pimenta também apresentam pró-sistemina, o peptídeo precursor da sistemina.

Utilizando-se dos dados do projeto *SUCEST*, Falco et al. (2001) analisaram *in silico* genes expressos em cana-de-açúcar envolvidos no metabolismo secundário, concluindo que algumas das proteínas expressas poderiam estar agindo como barreiras defensivas ao ataque de insetos. Contudo, o gene que codifica a sistemina não foi encontrado em cana-de-açúcar, sugerindo que os mecanismos de resposta em plantas apresentem uma certa especificidade. Estas observações geram perguntas sobre quais sinais sistêmicos poderiam estar presentes em cana-de-açúcar.

Paradies et al. (1980) e Felix et al. (1991) relataram que danos mecânicos induzem à produção do etileno. Segundo O'Donnell et al. (1996), o etileno é requerido na regulação dos níveis endógenos de ácido jasmônico na planta, indicando que este regulador também atua no caminho de transdução de sinal em resposta ao ferimento. Botella et al. (1996), pré-tratando plantas de soja (*Glycine max* L.) com 2,5-norbornadieno (NBD), um inibidor de etileno, e depois submetendo-as a ferimento mecânico ou metil-jasmonato, encontraram a inibição de *PIs*. Com este resultado os autores mostraram que o etileno é um sinal requerido para ativar a expressão de *IPs*. Entretanto, em concentrações fisiológicas o etileno não induz à produção destes transcritos. Assim o grupo concluiu que o etileno é um agente potencializador do metil-jasmonato, funcionando sinergisticamente no mecanismo de defesa das plantas.

Vários trabalhos mostram que o ácido abscísico pode agir como um sinal inicial no mecanismo de defesa contra ferimentos em plantas de tomate e batata (Peña-Cortés et al., 1989; Herde et al., 1996; Wasternack et al., 1996). Segundo Peña-Cortés et al. (1996) e Wasternack & Parthier (1997), o

ácido abscísico é um componente chave na cascata de transdução do sinal que conduz à ativação dos genes de defesa. Entretanto, em 1974, Ryan relatou que o ácido abscísico era incapaz de induzir genes de defesa em plantas de tomate submetidas a cortes. Este resultado repetiu-se consistentemente quando plantas de tomate jovens ou adultas foram utilizadas (Schaller & Ryan, 1995). Adicionalmente, relatou-se esse resultado em calos (Kernan & Thornberg, 1989) e também em células de tabaco em suspensão (Rickauer et al., 1992), ambos tratados com ácido abscísico. Finalmente, Birkenmeier & Ryan (1998) evidenciaram que o ácido abscísico não é um sinal que conduz à ativação de genes de defesa, mas está envolvido, provavelmente, na manutenção de um equilíbrio hídrico da planta, uma vez que as maiores concentrações do ácido abscísico nas folhas feridas eram detectadas perto do local da ferida, sugerindo que o ácido abscísico pode ter se acumulado por causa da desidratação.

Segundo Janzen et al. (1986), os sinais de defesa das plantas podem estar agindo sozinhos ou em conjunto, contribuindo para a resistência destas contra os insetos-pragas. De acordo com Baldwin & Preston (1999), a indução de respostas de defesa em plantas é provavelmente ativada por sinais emitidos durante os primeiros estágios do ataque do herbívoro.

A Figura 5 mostra que os sinais de defesa podem ativar defesas diretas e indiretas de encontro ao ataque do herbívoro. Defesas diretas são toxinas, tais como nicotina ou curcubitacinas, e redutores de digestibilidade, como os *PIs* ou as *PPO*, que aumentam a resistência da planta ao ataque do herbívoro. As defesas indiretas aumentam a mortalidade dos insetos através de um nível trófico mais elevado, onde a emissão de mono-, sesqui- ou homoterpenos das plantas atacadas são liberados para aumentar a eficiência da caça dos herbívoros pelos seus inimigos naturais.

Figura 5 – Mecanismos de respostas de defesa em plantas contra herbívoros

Fonte: adaptado de Baldwin & Preston (1999)

Na maioria dos estudos de resposta a ferimentos, os danos mecânicos são usualmente feitos pelo esmagamento dos tecidos foliares. No entanto, há inúmeros estudos que indicam que a injúria das plantas por insetos resulta em respostas fisiológicas e bioquímicas diferentes daquelas produzidas por dano mecânico sozinho (Stratmann & Ryan, 1997; Arimura et al., 2000b; Kessler & Baldwin, 2001). Segundo Korth & Dixon (1997), o tempo de acúmulo de transcritos de diversos genes induzidos por ferimento é diferente em folhas feridas por insetos e por dano mecânico.

Buscando compostos que poderiam ser responsáveis pela ativação de genes específicos a um determinado inseto, Alborn et al. (1997) isolaram e identificaram o composto N-(17-hydroxylinolenoyl)-L-glutamina, denominado volicitina, obtido pela extração da secreção oral de lagartas de *Spodoptera exigua* alimentadas com plântulas de milho.

Korth & Dixon (1997) mostraram que quando se aplica o regurgitante isolado de lagartas de *Manduca sexta* ao local da folha de batata ferida mecanicamente, esta apresenta um acúmulo de transcritos idêntico àqueles acumulados em tecidos danificados pela lagarta. Aparentemente, um componente da saliva ou do conteúdo intestinal dos insetos pode agir como um elicitor da liberação de compostos voláteis, induzindo a resposta sistêmica da planta. Segundo os autores, a presença de um elicitor pode fornecer à planta um meio de reconhecimento do ataque de insetos pragas.

Estudos conduzidos por Turling e colaboradores (1990) mostraram que a liberação de componentes elicitores, que induzem a resposta sistêmica através de compostos voláteis, pode ser alcançada pelo tratamento do local ferido mecanicamente com regurgitante coletado de insetos fitófagos.

Paré & Tumlinson (1997) mediram os níveis de compostos voláteis emitidos por plantas de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) durante o ataque do inseto *Spodoptera exigua*. Eles observaram que estes compostos podem servir como um produto químico sinalizador, atraindo a atenção dos inimigos naturais do herbívoro à planta danificada. Análise de compostos voláteis das plantas danificadas artificialmente, com e sem secreção oral de lagartas, também foram realizadas. Os resultados mostraram que a aplicação da secreção oral também aumentou a produção e a liberação de diversos compostos voláteis, e sugerem que as plantas têm um papel ativo e dinâmico na mediação da interação entre os herbívoros e seus inimigos naturais.

Reymond et al. (2000), comparando os resultados do ferimento mecânico com os danos causados pelo ataque da lagarta *Pieris rapae* em *Arabidopsis*, observaram que os perfis de transcritos eram bem diferentes,

sendo que um gene foi especificamente induzido pelo ataque da lagarta, mas não pelo ferimento.

A alimentação pelo inseto *Manduca sexta* e a aplicação de secreções orais e regurgitantes destas lagartas, juntamente com feridas mecânicas, ativaram a liberação sistêmica de mono- e de sesquiterpenos, induzindo também a um aumento na produção de ácido jasmônico e a mudanças específicas na acumulação de seqüências expressas relacionadas ao crescimento e defesa da planta *Nicotiana attenuata* (Halitschke et al., 2001).

Hermesmeier et al. (2001) forneceram a primeira caracterização em nível transcricional de um sistema modelo de interação planta-inseto, através do estudo entre tabaco (*Nicotiana attenuata*) e *Manduca sexta*. Eles utilizaram a técnica *differential display* e encontraram 27 transcritos diferencialmente expressos em plantas atacadas pelo inseto. Utilizando este mesmo sistema planta-inseto, Schittko et al. (2001) estudaram os transcritos diferencialmente expressos com a técnica *northern blot*. Ferimentos causados na presença da lagarta e ferimentos com adição de regurgitantes orais dos insetos foram avaliados. Estes autores encontraram 8 transcritos isolados de plantas atacadas pelo inseto e somente 2 diferenciais em presença da secreção oral.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Macroarranjos de Colônias Bacterianas

3.1.1 Seleção de Clones para a Confecção dos Macroarranjos

Os macroarranjos foram construídos a partir da seleção de seqüências expressas (*ESTs – Expressed Sequence Tags*) obtidas no projeto de seqüenciamento de *ESTs* de cana-de-açúcar (*SUCEST – Sugarcane EST Project*; Vettore et al., 2001). Para este trabalho foram selecionados dois conjuntos de clones para a confecção das membranas. O primeiro constituiu-se de 4.608 *ESTs* de cana-de-açúcar oriundas da biblioteca RZ3, derivadas da zona de transição de folhas e raízes de plântulas de cana-de-açúcar. Estas seqüências foram tomadas ao acaso e utilizadas no experimento de determinação do tempo de crescimento bacteriano na membrana de náilon.

O segundo conjunto de clones foi utilizado para o estudo da expressão gênica de cana-de-açúcar em resposta a herbivoria pela *Diatraea saccharalis* e também para a análise comparativa entre duas variedades de cana. Neste conjunto foi utilizado um total de 3.840 *ESTs* sendo 384 homólogas a genes previamente relatados como envolvidos na resposta a estresses bióticos e abióticos, e 3.072 provenientes de bibliotecas de folha e colmo de cana-de-açúcar. Os genes relacionados à resposta a estresse biótico e abiótico foram oriundos de uma seleção feita por Fábio T. S. Nogueira e Vicente E. de Rosa Jr., ambos do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), UNICAMP, Campinas, SP (placa SCDG, Anexo A). As *ESTs* de

folhas e colmos foram escolhidas em função do hábito alimentar da *D. saccharalis*, que se alimenta tanto de folhas quanto de colmos de cana-de-açúcar. Foram tomadas ao acaso 1.536 *ESTs* da biblioteca de folhas, placas SCUG065 (Anexo B), SCUG066 (Anexo C), SCUG067 (Anexo D) e SCUG068 (Anexo E); e 1.536 *ESTs* da biblioteca de colmo, placas SCUG107 (Anexo F), SCUG108 (Anexo G), SCUG109 (Anexo H) e SCUG110 (Anexo I). Como controle negativo, foram utilizadas colônias bacterianas (clone GFP) contendo o gene da proteína GFP (*green-fluorescent protein*) obtido da alga *Aequorea victoria* (Prasher et al., 1992). Por se tratar de uma proteína exclusiva deste organismo, esta sequência não pode ser hibridizada com transcritos de plantas.

Para a seleção dos clones utilizados no segundo conjunto de membranas, ainda foi levado em consideração o tamanho de cada sequência. Assim, as maiores seqüências expressas (*longESTs*) foram utilizadas. Estas *longESTs* estão armazenadas a -80°C no Centro Brasileiro de Estocagem de Clones (CBEC), UNESP, Jaboticabal, SP.

3.1.2 Confeção das Membranas

3.1.2.1 Transferência das Bactérias para a Membrana de Náilon

Todas as membranas contendo arranjos de colônias bacterianas foram confeccionadas no CBEG. As colônias bacterianas utilizadas para a confecção destas membranas eram oriundas de placas GENETIX com 384 clones (colônias) diferentes. Os clones eram dispostos em 24 colunas (1 a 24) e 16 linhas (de A a P). Cada clone, portanto, ocupa um lugar definido na placa.

A transferência das colônias bacterianas para as membranas de náilon foi feita pelo robô Q-Bot (GENETIX). A partir de um filtro de náilon de alta densidade (PerForma II – GENETIX) com dimensões 22,5 X 22,5 cm² foram construídas seis membranas idênticas, com dimensões 8 X 12 cm². Cada membrana é dividida em 384 quadrantes e corresponde a um campo do filtro

(Figura 6). A posição do quadrante, por sua vez, indica a posição do clone em sua placa original. Desta forma, cada colônia bacteriana na membrana pode ser identificada quanto a sua posição de origem. Em cada quadrante (destaque em amarelo na Figura 6) foram depositados 20 (arranjo 5x4) ou 25 (arranjo 5x5) clones bacterianos.

Para determinação do tempo de crescimento bacteriano nas membranas de náilon foram feitos arranjos 5x5 dentro de cada quadrante da membrana. O clone central deste arranjo, representado pela letra G na Figura 7A, contém o gene codificador da proteína GFP (controle negativo). O tempo de transferência dos 4.608 clones em duplicata, das 13 placas GENETIX para as membranas, foi de 43 minutos.

O segundo conjunto de membranas, contendo 3.840 clones diferentes, foi transferido em 36 minutos. Em cada quadrante foram depositadas 2 cópias de 10 diferentes clones bacterianos, cada um proveniente de uma placa GENETIX, dispostos em um arranjo 5x4 (Figura 7B). A distribuição dos clones no arranjo 5x4 foi feita com objetivo de facilitar a visualização dos campos no filtro e foi estabelecida aleatoriamente. Cada número dentro do quadrante indica a placa de origem daquele clone. Assim, cada colônia bacteriana na membrana pode ser identificada quanto a sua placa (número dentro do quadrante) e posição de origem (quadrante dentro da membrana). A letra G representa o clone do controle negativo (GFP).

Para a transferência do material biológico às membranas, foram utilizadas placas GENETIX contendo 384 colônias bacterianas crescidas por 16–18 horas a 37°C (ORION, Estufa de Cultura 502, FAMEN – Controlador Modelo A-LT, São Paulo, Brasil) em meio líquido [4% (p/v) de CG (*Circle Grow Medium* – BIO 101) suplementado com 1% (p/v) de ampicilina (GIBCO–BRL) e 8% (v/v) de glicerol (MERCK)].

Figura 6 – Esquema da membrana utilizada para a construção dos macroarranjos. Cada quadrante, como o primeiro destacado em amarelo (posição A1), contém 20 ou 25 colônias bacterianas em arranjos 5x4 ou 5x5 respectivamente. Todas as colônias contidas neste quadrante são oriundas da posição A1 de suas respectivas placas de origem

A)					B)				
10	10	7	3	3	3	4	2	4	G
11	9	7	4	2	5	9	6	10	9
11	9	G	4	2	8	7	10	G	7
12	8	6	5	1	6	2	5	8	3
12	8	6	5	1					

Figura 7 – Arranjos das colônias bacterianas em cada quadrante da membrana. Estes quadrantes possuem arranjos de 5x5 (A) ou 5x4 (B) colônias bacterianas. Os números representam a placa à qual aquele clone pertence

Previamente à transferência dos clones, filtros de náilon umedecidos em meio 4% (p/v) de CG suplementado com 0,5% (p/v) de ampicilina foram colocados sobre papel Whatman 3M também umedecidos neste meio. Bolhas de ar ou excesso de meio líquido no papel de filtro ou na membrana podem prejudicar o crescimento bacteriano na membrana, e portanto, foram evitados.

No processo de transferência, o robô imergiu sua cabeça de 384 pinos (0,4 mm cada) por 3 segundos na placa contendo as colônias bacterianas e, em seguida, imprimiu na membrana, fazendo uma leve pressão por 10 milissegundos, depositando cerca de 20 nl de solução contendo bactérias viáveis. De acordo com Bertucci et al. (1999) são transferidos de 20-60 ng de plasmídeos inseridos nas bactérias para a membrana de náilon. Cada clone foi impresso a uma distância de 900 microns em relação aos outros. Este processo foi repetido de acordo com o arranjo pré-determinado para os 6 campos do filtro

de 22,5 x 22,5 cm². A seguir, a placa com as colônias bacterianas foi trocada, e a cabeça do robô foi lavada automaticamente em uma solução de água sanitária, seguida de lavagem em água Milli-Q, e por fim em etanol absoluto (SYNTH). Uma vez concluída a lavagem, os pinos foram secos com um jato de ar por 6 segundos. Após este processo de esterilização, o robô esperou mais 6 segundos para iniciar a transferência das colônias bacterianas da placa seguinte. O processo de limpeza e secagem foi repetido a cada troca de placa.

3.1.2.2 Crescimento das Bactérias na Membrana

Após a transferência das colônias bacterianas para o filtro de náilon, contendo as 6 membranas, este foi colocado em uma placa (QTray – GENETIX) contendo meio CG semi-sólido [4% (p/v) de CG, 4% (p/v) de agar (SIGMA) e 1% (p/v) de ampicilina]. As membranas foram invertidas e incubadas à 37°C por 6 ou 12 horas (ORION, Estufa de Cultura 502, FAMEN – Controlador Modelo A-LT, São Paulo, Brasil), para o crescimento das colônias bacterianas.

3.1.2.3 Processamento da Membrana após o Crescimento das Bactérias

Depois de 6 ou 12 horas a 37°C, os filtros foram colocados sobre papel Whatman 3M umedecido em solução desnaturante [1,5 M NaCl (SYNTH) e 0,5 M NaOH (MALLINCKRODT)], onde permaneceram por 4 minutos em temperatura ambiente. A seguir, os filtros foram colocados sobre outro papel Whatman 3M umedecido em solução desnaturante, onde permaneceram por 4 minutos em uma placa de vidro dentro do banho-maria com água fervente. Após este procedimento, os filtros foram transferidos para outro papel Whatman 3M umedecido desta vez em solução neutralizante [1,5 M NaCl, 1 M Trizma (SIGMA) pH 7.0], onde foram deixados por 4 minutos. Posteriormente, os filtros foram colocados sobre papel Whatman 3M seco e ali deixados por 4 minutos.

Transcorrido o tempo, os filtros foram transferidos para uma solução de proteinase K [5 M NaCl, 1 M Tris (INVITROGEN) e HCl (SYNTH) pH 8.0, 0,5 M de ácido etileno diamino tetraacético - EDTA (MALLINCKRODT) pH 8.0, 10X Sarcosil (Sodium Lauryl Sarcosinate – SIGMA), 1,5% (p/v) de Proteinase K (GIBCO–BRL)]. A proteinase K foi adicionada à solução momentos antes de seu uso. Assim, os filtros foram invertidos nesta solução, de modo que a face onde estavam as colônias ficasse totalmente submersa. Os filtros foram então incubados por 1 hora à 37°C em agitador orbital a 50 rpm (INNOVA 4230 – Refrigerated Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA). Após a incubação, o excesso de solução foi retirado com o auxílio de um papel filtro em cada uma de suas faces. A seguir, fixou-se o material genético das bactérias nos filtros utilizando-se o aparelho *Ultraviolet Crosslinker* (CL–508), através de exposição a 120.000 microjoules por cm² por 30 segundos.

3.1.3 Normalização das Membranas

3.1.3.1 Hibridização com a Sonda *Overgo*

Esta etapa foi realizada para selecionar os clones cujas duplicatas apresentavam quantidades similares de plasmídeo na membrana. Esta seleção foi feita com o auxílio de uma sonda chamada *overgo*.

Overgo é a denominação utilizada para a sonda correspondente a um fragmento de 36 pares de base do gene da β -lactamase. Bactérias transformadas com plasmídeos que codificam este gene são resistentes à ampicilina. As bibliotecas do *SUCEST* utilizadas na confecção das membranas de macroarranjo foram construídas com o plasmídeo pSPORT1 (*GenBank*–U12390.1, Vettore et al., 2001). Este plasmídeo, de 4.110 pares de bases, contém o gene de resistência a ampicilina e os promotores SP6 e T7 flanqueando os cDNAs clonados. Uma vez que todas as bactérias utilizadas

para a confecção das membranas continham o gene da resistência à ampicilina, o *overgo* pode ser utilizado para a normalização.

Na Figura 8 encontra-se a seqüência do fragmento do gene da β -lactamase no qual a sonda *overgo* marcada com o radioisótopo ^{33}P se liga às colônias bacterianas. Nesta região do gene, após a hibridização, um sinal radioativo é emitido de cada plasmídeo, permitindo que estes sejam quantificados em aparelho específico. Desta forma foi possível excluir os clones cuja quantidade de plasmídeo presente na membrana mostrou-se desigual.

Para síntese da sonda *overgo* foram utilizados oligonucleotídeos sintetizados pela empresa INVITROGEN (Figura 9), os quais foram diluídos a 100 μM (Solução Estoque).

5'...GTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTA...3'

Figura 8 – Fragmento do gene da β -lactamase presente no plasmídeo pSPORT1 (*GenBank*–U12390.1). Este fragmento foi utilizado para a síntese de oligonucleotídeos que constituem a sonda *overgo*

Fonte: Invitrogen (2001)

Figura 9 – Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na síntese da sonda *overgo*. Os oligos sintetizados se ligam por complementaridade de bases no gene da β -lactamase contido no plasmídeo pSPORT1. Em amarelo está representada a região de *overlap* dos oligos

Para a reação de marcação da sonda *overgo* com $\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP (AMERSHAM), utilizou-se uma solução com os dois oligonucleotídeos misturados a uma concentração final de 10 μM . Esta solução foi aquecida a 80°C por 5 minutos, em seguida, a 37°C por 10 minutos no termociclador (Programable Thermal Controller, PTC-100™) e imediatamente armazenada no gelo. Após este procedimento, adicionou-se 5% (v/v) de 0,2% (p/v) BSA (SIGMA), 20% (v/v) de solução OLB (APÊNDICE 1), 5% de $\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP (1 mCi/100 μl), 2 unidades da enzima DNA polimerase I (*Large KLENOW Fragment* – INVITROGEN) e 50% (v/v) de água Milli-Q autoclavada. Esta reação de marcação foi mantida em temperatura ambiente por uma hora. Após este período, o volume final foi ajustado para 50 μl e a sonda foi purificada em coluna G-50 (AMERSHAM BIOSCIENCES), de acordo com as instruções do fabricante. Uma vez purificada, a sonda foi desnaturada à 90°C por 10 minutos em banho-seco (Multi-Block Heater, Lab-Line) e utilizada imediatamente.

Antes de iniciar a pré-hibridização, o filtro de náilon contendo as 6 membranas foi cortado. Em seguida as membranas foram lavadas com solução fervente de 0,5% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS – BIOGRADE) por 5 minutos sob agitação, para diminuir o resíduo de fundo (*background*).

Todas as membranas foram colocadas em um mesmo recipiente para serem lavadas, pré-hibridizadas e hibridizadas, sendo separadas uma da outra por uma malha de filtro.

A pré-hibridização foi realizada com uma solução de 1% (p/v) de BSA, 0,2% (v/v) de 0,5 M de EDTA pH 8.0, 7% (p/v) de SDS e 50% (v/v) de 1 M Na_2HPO_4 (MERCK). Esta solução foi aquecida no forno de microondas a 58°C e adicionada às membranas, que foram então incubadas no agitador orbital (TECNAL, TE 420) por 4 horas a 60 rpm. Após este período, esta solução foi descartada.

A solução de hibridização tem a mesma composição da solução de pré-hibridização adicionada da quantidade de sonda *overgo* relativa ao número de membranas. A sonda, previamente desnaturada a 90°C por 10 minutos, foi adicionada a esta solução aquecida no forno de microondas a 58°C. As membranas foram incubadas nesta solução à 58°C por 18–20 horas, no agitador orbital a 60 rpm (TECNAL, TE 420).

Após a hibridização, as sondas foram descartadas em recipiente adequado para materiais radioativos e as membranas foram lavadas para que o excesso de sonda fosse removido. O processo envolveu duas lavagens com 2X SSC [1,8% (p/v) de NaCl e 1,5% (p/v) de ácido cítrico (MALLINCKRODT)] e 0,1% (p/v) de SDS por 15 minutos a temperatura ambiente. A seguir, foram realizadas duas lavagens com 1,5X SSC e 0,1% (p/v) de SDS por 15 minutos a 58°C (pré-aquecido). Por fim, as membranas foram lavadas duas vezes com 0,5X SSC e 0,1% (p/v) de SDS por 15 minutos a 58°C (pré-aquecido).

Após as lavagens, o excesso de solução foi retirado e as membranas foram expostas por 72 horas em *Imaging Plate (IP)* (BAS-IP MS 2340, Fuji Photo Film Co., LTD, Japão). Depois da exposição das membranas marcadas com *overgo*, o *IP* foi revelado utilizando o aparelho FLA-3000G *Image Analyzer* (Fujifilm™ I&I Imaging, Fujifilm Medical Systems, U.S.A., Inc.). Esta etapa do trabalho foi realizada no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), UNICAMP, Campinas, SP.

Após a revelação do sinal, a sonda foi retirada das membranas com uma solução fervente de 0,1% (p/v) de SDS por 15 minutos a 60 rpm (TECNAL, TE 420) em temperatura ambiente. O processo foi repetido 2 vezes. As membranas foram expostas novamente em IP por mais 24 horas, para a verificação de que toda a sonda foi removida. Após esta nova revelação, como nenhum sinal foi detectado, as membranas foram guardadas a -20°C.

Depois de capturadas as imagens, estas foram analisadas no *software Array Vision Evaluation 6.0* (Copyright (c) Imaging Research Inc. 1995-2002) para a quantificação do sinal emitido pelo *scanner*. O valor dos sinais da leitura corrigido pelo resíduo de fundo (nARVOL), produzido por este programa, foi utilizado para a normalização das membranas. Estes sinais foram utilizados para minimizar as variações da técnica de preparo das membranas. Para análise dos dados utilizou-se o programa estatístico SAS versão 8.0 (Copyright (c) 1999-2001 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3.1.3.2 Análise dos Experimentos para Otimização da Técnica

Para a avaliação de qual dos tempos de crescimento era mais apropriado para a confecção de macroarranjos de colônias bacterianas, testou-se os períodos de incubação de 6 e 12 horas. Os valores obtidos pelo programa *Array Vision Evaluation 6.0*, para cada um dos experimentos, foram comparados por análise de variância, utilizando-se o programa estatístico SAS versão 8.0. Antes da análise, porém, foi necessário eliminar os clones cujo valor era igual a zero, os quais representam as colônias bacterianas que não cresceram sobre a membrana de náilon. Para que os dados pudessem obedecer a uma distribuição normal, foi necessário transformar os valores das leituras dos clones restantes de acordo com a fórmula: intensidade de sinal = $\log(\text{valor da leitura} + 1)$, para cada clone (APÊNDICE 2). A análise de variância de cada um dos experimentos foi realizada para verificar se havia diferenças

entre repetições dos clones na mesma membrana e entre repetições dos clones em membranas diferentes.

O valor médio de resíduo de fundo também foi utilizado na análise dos experimentos para otimização da técnica. Estes valores foram obtidos de acordo com o programa *Array Vision Evaluation* 6.0.

3.1.3.3 Contagem do Número de Unidades Formadoras de Colônias

A contagem do número de unidades formadoras de colônias por μl (UFC/ μl) foi realizada em meio CG semi-sólido, segundo protocolo adaptado de Milles & Misra (1938). Esta contagem foi realizada para o clone do *SUCEST* SCCCAM1C08E06, o qual foi escolhido de forma aleatória. Este clone foi crescido em placa de Petri contendo meio CG semi-sólido por 16–18 horas a 37°C. Após este período, uma colônia foi colocada em 100 μl de meio CG líquido a 37°C por 6 ou 12 horas. A seguir, a suspensão bacteriana foi diluída em tampão fosfato-salino – PBS 10X pH 7.4 (100 mM Na_2HPO_4 , 17 mM KH_2PO_4 , 1,4 M NaCl, 27 mM KCl) em tubos tipo Eppendorf de 0,2 ml sucessivamente de 10^{-1} a 10^{-7} . As amostras foram homogeneizadas e aplicadas em 3 repetições de 2 μl por quadrante em placas de meio CG semi-sólido e, em seguida, incubadas por 24 horas em estufa (Biologic Oxygen Demand – BOD, TECNAL, TE 390) à temperatura de 37°C. A contagem foi efetuada na diluição onde as colônias apresentavam-se isoladas, entre o limite de 30 e 100 colônias. Os procedimentos que requereram ambiente estéril foram realizados em câmara de fluxo laminar vertical (VECO). Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.1.4 Análise dos Experimentos para Normalização com a Sonda *Overgo*

A seleção dos clones que apresentaram quantidades similares de plasmídeo na membrana também foi realizada utilizando-se o programa estatístico SAS. A partir dos valores de leitura transformados, obteve-se a variância de cada clone presente nas membranas de náilon (APÊNDICE 3). A seguir, os clones foram selecionados por homogeneidade de variância, ou seja, foi verificado se existem ou não diferenças significativas entre as variâncias das repetições dos clones analisados. Somente os clones com diferenças não significativas foram selecionados para análise da expressão gênica em cana-de-açúcar em resposta a herbivoria pela lagarta *Diatraea saccharalis*.

3.2 Avaliação da Expressão Gênica em Resposta a Herbivoria

3.2.1 Material Vegetal: Cana-de-açúcar

Foram utilizadas plantas de cana-de-açúcar das variedades comerciais SP80-3280 (Figura 10A) e SP81-3250 (Figura 10B), gentilmente cedidas pelo Dr. Eugênio César Ulian, Centro de Tecnologia Copersucar (CTC), Piracicaba, SP.

Nos testes de características agronômicas e tecnológicas para liberação de novas variedades, realizados pelo CTC, a variedade SP80-3280 é classificada como susceptível a *Diatraea saccharalis*. Nestes mesmos testes, a variedade SP81-3250 é classificada como tolerante a este inseto.

As plantas, obtidas através de propagação vegetativa de entrenós, cresceram em copos de plástico por 2 meses em estufa com cobertura de plástico, onde receberam os devidos tratos culturais.

3.2.2 Insetos: *Diatraea Saccharalis*

Foram gentilmente cedidas pelo Dr. Enrico Arrigoni (Centro de Tecnologia Copersucar – CTC, Piracicaba, SP), lagartas de *D. saccharalis* com 10 dias de idade (2º ínstar) para a montagem do experimento. As lagartas foram produzidas no CTC, e lá criadas até o sétimo dia de idade, em tubos de dieta (8 cm de diâmetro e 13 cm de altura) tampados com tela de inox, na proporção de 200 lagartas por tubo. Estas foram alimentadas com dieta artificial à base de farelo de soja e germe de trigo (King & Hartley, 1985) e mantidas a 25°C, 60±10% de umidade e fotoperíodo de 14/10 horas de claro/escuro. No sétimo dia, as lagartas, acondicionadas no frasco de dieta onde eclodiram e cresceram, foram recebidas, e então mantidas nas mesmas condições de fotoperíodo e temperatura em câmara climática (TECNAL, TE-400).

Figura 10 – Variedades comerciais Copersucar utilizadas nos experimentos para análise de genes diferencialmente expressos na presença da *Diatraea saccharalis*. (A) Variedade SP80-3280, susceptível à broca da cana (B) Variedade SP81-3250, tolerante à broca da cana

Foto cedida pelo Centro de Tecnologia Copersucar

3.2.3 Ensaio Biológico

O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia de Insetos, Departamento de Entomologia, ESALQ – USP, Piracicaba, SP. A montagem do ensaio biológico foi realizada em câmaras climáticas (FITOTRON – FAMEM Mod. 095E), com temperatura, luz e umidade relativa controladas (28°C, 14/10 horas de claro/escuro e 70% UR, respectivamente).

Foi realizado um estudo preliminar para determinar o número mínimo de lagartas de *D. saccharalis* a serem colocadas nas plantas de cana-de-açúcar, e o tempo para o início da herbivoria por estas lagartas. Neste estudo, observou-se que o tratamento com 2 lagartas mostrou-se ideal para um melhor monitoramento da herbivoria. Também foi possível observar que depois de 1 hora do início do experimento, já havia sinais de herbivoria pelas lagartas em todas as plantas, ou seja, folhas ou bainhas raspadas e presença de fezes (Figura 11A). Após 4 dias, as plantas apresentaram o sintoma de coração morto (Figura 11B).

Com base nos resultados obtidos no estudo preliminar, optou-se pela colocação de 2 lagartas de 2º ínstar em cada planta, para a realização dos experimentos subseqüentes. Os tempos de coleta de tecido vegetal para posterior análise foram escolhidos de acordo com relatos da literatura (Ryan, 2000; Hui, 2003). Assim, os experimentos foram realizados colocando-se lagartas de 2º ínstar de *D. saccharalis* em plantas de dois meses de idade de cana-de-açúcar e a coleta do material foi realizada nos tempos de 30 minutos, 6 horas, 12 horas e 24 horas após o início do experimento.

Figura 11 – Diferentes danos que a broca do colmo, *Diatraea saccharalis*, pode causar em cana-de-açúcar. (A) Raspagem das folhas (B) Galerias que culminam no coração morto e podridão vermelha

Uma semana antes da montagem do experimento, as plantas foram retiradas da estufa no CTC e levadas para o FITOTRON, onde foram aclimatadas. Foram utilizadas 16 plantas de cada variedade. Estas foram dispostas no FITOTRON em quatro prateleiras. Nas duas prateleiras superiores, dispuseram-se as plantas da variedade susceptível (SP80-3280), sendo que do lado direito ficaram as 8 plantas que receberiam as lagartas (tratamento S – susceptível), e do lado esquerdo, as 8 plantas controle (tratamento CS – controle susceptível). Nas duas prateleiras inferiores, dispuseram-se as plantas da variedade tolerante (SP81-3250), obedecendo-se ao mesmo esquema, do lado direito ficaram as 8 plantas que receberiam as

lagartas (tratamento T – tolerante), e do lado esquerdo, as 8 plantas controle (tratamento CT – controle tolerante). Em cada prateleira as plantas foram numeradas aleatoriamente de 1 a 8, e organizadas de modo que o espaço entre cada planta fosse de cerca de 20 cm.

Dezoito horas antes da montagem do experimento, as lagartas foram retiradas do frasco de dieta e transferidas para um frasco vazio, onde permaneceram em jejum até a montagem do experimento. Durante todo o tempo, as plantas e lagartas foram mantidas em câmara climática, nas mesmas condições de temperatura, luz e umidade relativa do experimento.

O experimento foi iniciado às 7 horas da manhã, quando foram colocadas duas lagartas na face superior da folha mais nova totalmente aberta de cada planta não controle (Figura 12). Após 30 minutos, realizou-se o sorteio de dois números entre 1 e 8, indicando assim as plantas que iriam ser coletadas neste tratamento (duas controle e duas com lagarta, por variedade). Este procedimento se repetiu para os tratamentos de 6, 12 e 24 horas após a montagem do experimento, conforme representado na Tabela 1.

Decorrido o tempo de cada tratamento, realizou-se a coleta do material vegetal. Toda a parte aérea de cada planta foi coletada e imediatamente congelada em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenada a -80°C, até o momento de sua utilização para a extração do RNA total.

Figura 12 – As setas indicam o local onde as lagartas de *Diatraea saccharalis* foram colocadas na planta durante a montagem do experimento. Cada planta recebeu 2 lagartas de 2º instar. As plantas de cana-de-açúcar estavam dispostas em prateleiras na câmara climática (FITOTRON)

Tabela 1. Tratamentos aplicados nas variedades susceptível (SP80-3280) e tolerante (SP81-3250) de cana-de-açúcar submetidas a herbivoria pela lagarta *D. saccharalis*. Cada tratamento constituiu-se de duas plantas

	SUSCEPTÍVEL		TOLERANTE	
	Lagartas	Controle	Lagartas	Controle
30 minutos	S0.5	CS0.5	T0.5	CT0.5
6 horas	S6	CS6	T6	CT6
12 horas	S12	CS12	T12	CT12
24 horas	S24	CS24	T24	CT24

3.2.4 Extração de RNA Total

Para a extração do RNA total foram utilizadas amostras de folhas de cana-de-açúcar coletadas no experimento. Cada amostra foi composta de 100 mg de tecido oriundo da parte mediana da folha mais nova totalmente aberta, da qual foi excluída a nervura central. As amostras foram pesadas em balança analítica (METTLER TOLEDO, PB602) e então maceradas com bastão de vidro livre de RNase em tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml, em presença de nitrogênio líquido.

Imediatamente após a maceração, acrescentou-se no tubo 1 ml de ácido guanidínico tiocianato-fenol-clorofórmio (TRIzol[®], GIBCO-BRL), e o tubo foi agitado intensamente até que o tecido macerado se homogeneizasse com o reagente. O tubo foi então deixado à temperatura ambiente por 15 minutos, sendo gentilmente invertido, cerca de 10 vezes, a cada 5 minutos, para que se desse uma melhor homogeneização do material. Então esta solução foi centrifugada a 12.000 x G (HETTICH ZENTRIFUGEN, MIKRO 22 R) por 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml (cerca de 1 ml).

A seguir, foi adicionado ao tubo 20% (v/v) de clorofórmio puro (MERCK) e imediatamente agitou-se o tubo. Após este procedimento o tubo foi incubado por 3 minutos à temperatura ambiente, sendo, a seguir, centrifugado novamente a 12.000 x G por 15 minutos a 4°C. Durante a centrifugação, a mistura separa-se em uma fase orgânica no fundo do tubo, uma interfase e uma fase aquosa, contendo o RNA, com volume de aproximadamente 60% do volume de TRIzol[®] utilizado na homogeneização.

Da fase aquosa, 600 µl foram transferidos para novo tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml, no qual realizou-se a precipitação do RNA. Para tal, adicionou-se 42% (v/v) de isopropanol (MALLINCKRODT) e em seguida, a este volume total, foi adicionado 29% (v/v) de uma solução preparada com 0,8 M de citrato de sódio (MALLINCKRODT) e 1,2 M de cloreto de sódio, em água tratada com 0,1% (v/v) de dietil pirocarbonato (DEPC, SIGMA). As amostras foram homogeneizadas através de inversões suaves. Então, as amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Após este período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x G por 15 minutos a 4°C. Ao fim deste processo, foi possível visualizar um *pellet* no fundo do tubo, e o sobrenadante foi descartado.

O *pellet* foi lavado uma vez com 1 ml de etanol 75% (v/v) [preparado com água tratada com 0,1% (v/v) de DEPC] e a amostra resultante foi misturada no *vortex* (SCIENTIFIC INDUSTRIES, Model G-560) até que o *pellet* se destacasse da parede do tubo, e então, centrifugada a 7.500 x G por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado novamente.

Após a lavagem, o *pellet* de RNA foi seco à temperatura ambiente por 10 minutos, com o tubo invertido sobre papel absorvente. Posteriormente, o *pellet* foi ressuscitado em 30 µl de água livre de RNase [tratada com 0,1% (v/v) de DEPC], sendo homogeneizado através da passagem da solução algumas vezes pela ponteira da pipeta, até que estivesse totalmente dissolvido.

Após este processo as amostras foram incubadas por 10 minutos à 60°C e, em seguida, armazenadas a -80°C até o momento do uso.

Para cada planta, realizou-se a extração de duas amostras separadamente. Como cada tratamento era composto de duas plantas, o RNA total de cada tratamento refere-se a quatro extrações independentes, cujo produto foi posteriormente homogeneizado em um único tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml.

3.2.5 Quantificação do RNA Total

Antes do preparo do gel, a cuba de eletroforese (LIFE TECHNOLOGIES, HORIZON® 58) foi tratada com solução 10% (v/v) de H₂O₂ preparada com água livre de RNase por 15 minutos [tratada com 0,1% (v/v) de DEPC] e lavada em água livre de RNase.

A quantificação do RNA total de cada tratamento foi realizada em gel desnaturante composto de 0,01% (p/v) de agarose (INVITROGEN), 1% (v/v) de tampão MOPS 10X pH 7.0 [0,2 M de ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfônico (MOPS – SIGMA), 50 mM de acetato de sódio (MALLINCKRODT) e 0,5 M de EDTA pH 8.0] e 0,05% (v/v) de formaldeído 37% (MALLINCKRODT), em água tratada com 0,1% (v/v) de DEPC.

Durante o tempo de polimerização do gel, as amostras de RNA eram preparadas para a quantificação. Assim, 1 µl de cada amostra de RNA foi colocado em 5 µl de tampão desnaturante, e esta solução foi aquecida no termociclador a 60°C por 10 minutos, e imediatamente incubada em gelo para então ser aplicada no gel. O tampão desnaturante foi composto de 17,5% (v/v) de formaldeído 37%, 10% (v/v) de MOPS 10X, 50% (v/v) de formamida deionizada [2,5% (p/v) de resina de troca iônica mista (AG501-X8) em formamida (MALLINCKRODT)], 8% (v/v) de brometo de etídio (BIOGRADE) 0,5% (p/v), 4,5% (v/v) de água tratada com 0,1% (v/v) de DEPC e 10% de tampão de amostra. Este tampão, por sua vez, foi previamente preparado de

0,25% (p/v) de azul de bromofenol (SIGMA), 0,25% (p/v) de xileno cianol FF (SIGMA) e 40% (p/v) de sacarose (SYNTH), em água tratada com 0,1% (v/v) de DEPC, e armazenado a -20°C até o momento do uso.

Após a aplicação das amostras no gel (6 µl), adicionou-se tampão MOPS 1X na cuba até que o gel estivesse totalmente submerso. Todas as corridas eletroforéticas foram realizadas à 130V por 30 minutos, utilizando LIFE TECHNOLOGIES, Model 250 como fonte de energia.

Após a eletroforese, o gel foi retirado da cuba, colocado sobre um transluminador UV (BIO-RAD, FLUOR-S™ MultImager), e fotodocumentado. A quantificação propriamente dita foi realizada através de comparação das bandas produzidas pelas amostras com bandas produzidas pelo RNA Ladder (0,24-9,5 Kb – INVITROGEN), que foi também colocado no gel. Cada 3 µl deste marcador (1 RNA Ladder : 1 tampão desnaturante) equivale a 0,5 µg de RNA. Esta amostra recebeu o mesmo tratamento térmico que as amostras de RNA. Depois da quantificação, cerca de 30 µg de RNA total de cada amostra foram liofilizados (HETO, FD4) e acondicionados em freezer -20°C até o momento do preparo das sondas. O restante do RNA total foi armazenado a -80°C.

3.2.5 Preparo das Sondas e Hibridização

O preparo das sondas e a hibridização das membranas foram realizados no Centro de Tecnologia Copersucar (CTC), Piracicaba, SP, conforme metodologia adaptada descrita por Hervé et al. (1996).

Para o preparo das sondas, cerca de 30 µg de RNA total liofilizado foram ressuspensos em 10 µl de água tratada com 0,1% (v/v) de DEPC, e aquecidos a 60°C por 10 minutos no termociclador. Imediatamente após este procedimento, as amostras foram colocadas no gelo. Então, adicionou-se 3% (v/v) de Oligo dT₁₈V (156 pmol, 100 µM, INVITROGEN) e as amostras foram aquecidas novamente no termociclador a 75°C por 10 minutos, sendo em seguida incubadas no gelo. Adicionou-se então a cada amostra 10% (v/v) de

First Strand Buffer (5X, GIBCO–BRL), 5% (v/v) de ditiontreitol (DTT, 100 mM, GIBCO–BRL), 4% (v/v) de *RNAguard™ RNase Inhibitor* (AMERSHAM BIOSCIENCES), 5% (v/v) de dNTPs (10 mM cada) – exceto para dCTP (GIBCO–BRL), e 10% (v/v) de $\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP (10 mCi/ml). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 42°C por 5 minutos em *heat-block*. Posteriormente, foram adicionadas 260 unidades da enzima *SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase* (INVITROGEN) às amostras, seguida de uma leve agitação. As amostras foram incubadas à 42°C por 20 minutos (TECNAL, TE 420). Em seguida, foi adicionado 2,6% (v/v) de dCTP (10 mM) e as amostras foram novamente incubadas à 42°C por 60 minutos. Após este período, foi adicionado 2% (v/v) de *polyadenylic acid Poly-A* (AMERSHAM BIOSCIENCES), e esta solução foi desnaturada a 94°C por 5 minutos no banho-seco (Multi-Block Heater, Lab-Line). A seguir, adicionou-se 2,8% (v/v) de 5 M NaOH e incubou-se à 37°C por 15 minutos. Por fim, as amostras receberam 2,8% (v/v) de 3,94 M HCl e 14% (v/v) de 1 M Tris-HCl pH 7.5. O volume final de reação foi de 44,9 µl. Para a purificação da sonda, este volume foi ajustado para 50 µl com água Milli-Q autoclavada. A purificação foi realizada em coluna G-50. Uma vez purificada, a sonda foi utilizada imediatamente.

3.2.6 Hibridização dos Macroarranjos

A hibridização foi feita em duas etapas, a pré-hibridização e a hibridização propriamente dita. Em ambas utilizaram-se garrafas de hibridização (WHEATON) de 20 x 3,5 cm para cada membrana. Para a pré-hibridização utilizou-se uma solução de 25% (v/v) de 2X SSC pH 7.0, 2% (v/v) de 1 M Tris-HCl pH 7.5, 50% (v/v) de formamida deionizada, 10% (v/v) de Denhardt's (100X, INVITROGEN), 10% (p/v) de SDS, 2% (v/v) de Água Milli-Q autoclavada e 1% (p/v) de esperma de salmão (AMERSHAM BIOSCIENCES) previamente desnaturado no termociclador a 94°C por 10 minutos. As membranas ficaram nesta solução por 2 horas a 42°C.

Neste ínterim, foi preparada a solução de hibridização, composta de 25% (v/v) de 2X SSC pH 7.0, 2% (v/v) de 1 M Tris-HCl pH 7.5, 50% (v/v) de formamida deionizada, 2% (v/v) de Denhardt's, 10% (v/v) de SDS, 10% (v/v) de *dextran sulphate* (AMERSHAM BIOSCIENCES) 50% (p/v) e 1% (p/v) de esperma de salmão previamente desnaturado no termociclador a 94°C por 10 minutos. Esta solução foi pré-aquecida em forno de microondas e depois deixada em forno de hibridização a 42°C. A esta solução foi adicionada a sonda obtida da cana-de-açúcar, que tinha sido previamente desnaturada no termociclador a 94°C por 3 minutos.

Após o descarte da solução de pré-hibridização, adicionou-se às membranas a solução de hibridização com a sonda. A hibridização foi realizada em um período de 18 – 20 horas a 42°C, no forno de hibridização.

Após a hibridização, as sondas foram descartadas em recipiente apropriado para material radioativo e as membranas foram lavadas, em um único recipiente, e expostas da mesma maneira descrita para a sonda *overgo*.

Após exposição, retirou-se a sonda das membranas utilizando-se uma solução de 0,4 N NaOH e 0,1% (p/v) de SDS, sendo incubada em agitador orbital a 60 rpm por 15 minutos à 65°C (TECNAL, TE 420). Este processo foi repetido duas vezes. Em seguida, a solução foi substituída por outra contendo 0,2 N Tris-HCl pH 8.0, 0,1% (p/v) de SDS e 0,1X SSC. Incubou-se de novo a 60 rpm por 15 minutos, porém em temperatura ambiente. Esse processo foi repetido duas vezes. Por fim, as membranas foram expostas novamente em IP por mais 24 horas. Após esta nova revelação, como nenhum sinal foi detectado, as membranas foram guardadas a -20°C.

3.2.7 Análise dos Dados de Expressão Gênica Responsiva a Herbivoria

A intensidade de sinal de cada membrana foi captada pelo sistema de análise de imagens *Image Reader* FLA-3000, no Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Pirassununga, SP. Depois de capturadas, as imagens foram analisadas no *software Array Vision Evaluation* 6.0 para a quantificação dos valores de leitura emitidos pelo *scanner*. O valor da leitura corrigido pelo resíduo de fundo (nARVOL), produzido por este programa, foi utilizado para o estudo do diferencial de expressão gênica dentro e entre os tratamentos.

O estudo comparativo da expressão gênica em cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) induzida pela broca da cana (*Diatraea saccharalis*) foi realizado utilizando-se o programa estatístico SAS versão 8.0 e o programa Excel (Office 2002, *Microsoft*). Primeiramente foram eliminados os clones que apresentaram crescimento diferenciado entre suas duas cópias, dados obtidos através da normalização com a sonda *overgo*. Então os valores das leituras dos clones restantes foram transformados de acordo com a fórmula: intensidade de sinal = $\log (\text{valor da leitura} + 1)$, para cada clone (APÊNDICE 4). A partir destes valores transformados, obteve-se a variância de cada clone e os clones foram selecionados por homogeneidade de variância, como descrito no item 3.1.4.

Para a variedade susceptível, a razão entre os tratamentos com lagarta e os controles foi calculada utilizando-se a média dos valores de leitura dos clones selecionados na normalização com a sonda de cDNA. O mesmo procedimento foi adotado para a variedade tolerante. Utilizando o programa Excel, foi possível identificar os genes cujo log da razão entre valores de leitura dos tratamentos com lagarta eram 2 vezes maiores ou menores (induzidos ou reprimidos) que os valores de leitura obtidos nos tratamentos das plantas controle.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização da Técnica de Macroarranjos de DNA a partir de Colônias Bacterianas

4.1.1 Determinação do Tempo de Crescimento das Bactérias em Membranas de Náilon

Inicialmente foram avaliados dois tempos de crescimento bacteriano (6 ou 12 horas) para se determinar o mais indicado para a confecção de macroarranjos de DNA utilizando-se colônias bacterianas. Membranas contendo 4.608 clones em duplicata foram hibridizadas com a sonda *overgo*. As imagens destas membranas foram capturadas pelo sistema de análise de imagens FLA-3000G *Image Analyzer*. A Figura 13 mostra um quadrante das membranas onde colônias bacterianas cresceram por 6 horas (quadro à esquerda) e 12 horas (quadro à direita). No quadro central da Figura 13 está representado o arranjo 5x5 dos clones bacterianos usado neste experimento. Observou-se, através destas imagens, que os clones crescidos por 6 horas são mais uniformes e estão mais distantes uns dos outros quando comparados com os crescidos por 12 horas. Depois de capturadas, as imagens foram quantificadas e analisadas utilizando-se o programa *Array Vision Evaluation* versão 6.0.

O processo de normalização foi realizado utilizando-se os valores de leitura transformados obtidos para cada um dos experimentos. De acordo com o item 3.1.3.2, foram selecionados para análise 3.954 clones (85,8% do total) nas membranas onde as bactérias foram crescidas por 6 horas. Estes

clones foram selecionados por apresentarem quantidades similares de plasmídeo em suas réplicas. Da mesma maneira, foram selecionados 4.017 clones (87,2%) para colônias bacterianas crescidas por 12 horas. No entanto, colônias bacterianas crescidas por 12 horas sobrepunham-se umas as outras, elevando o resíduo de fundo. O valor médio do resíduo de fundo foi de 68 para bactérias crescidas por 6 horas e de 371 para as crescidas por 12 horas, confirmando o observado na Figura 13.

Figura 13 – Quadrante das membranas com arranjo 5x5 hibridizadas com a sonda *overgo*. À esquerda tem-se uma representação das colônias bacterianas crescidas por 6 horas na membrana de náilon. Do lado oposto estão as bactérias crescidas por 12 horas. Ao centro está o esquema do arranjo de colônias bacterianas utilizado na confecção destas membranas, onde números iguais correspondem ao mesmo clone

Através da normalização com a sonda *overgo*, realizou-se análise de variância para verificar a existência de diferenças entre repetições dos clones na mesma membrana, e entre repetições dos clones em diferentes membranas, de acordo com Gomes (2000). Foi encontrado que os valores de leitura transformados dos 3.954 clones crescidos por 6 horas na membrana de náilon são diferentes entre si ($Pr < .0001$) (Tabela 2). Isto significa que os clones

apresentaram diferentes quantidades de plasmídeo entre si. Estas diferenças podem ser causadas devido aos diferentes produtos gênicos presentes nestes clones. De acordo com Baneyx (1999), indutores do promotor do operon *lac* podem estar presentes em células bacterianas e, se forem induzidos, podem produzir proteínas tóxicas à célula. Assim, a utilização das mesmas cepas de *Escherichia coli* e de vetores pSPORT1 para todas as colônias bacterianas não garante um crescimento uniforme para os diferentes clones. De acordo com a análise estatística apresentada na Tabela 2, nas membranas onde as bactérias cresceram por 6 horas não houve diferença significativa entre a quantidade de plasmídeo das repetições de um mesmo clone na mesma membrana [*spot(memb)*] e nem entre membranas (clones*memb). Estes dados indicam que o número de plasmídeos para um determinado clone é similar em todas as repetições e membranas, ou seja, não houve interação entre o crescimento bacteriano e o ambiente onde ele estava crescendo.

Tabela 2. Análise conjunta para colônias bacterianas crescidas por 6 horas sobre a membrana de náilon em arranjo 5x5

Causa de Variação	GL	SQ	QM	Pr>F
Memb	1	1.935088	6.25	0.0124
<i>spot(memb)</i>	2	0.031380	0.10	0.9035 **
clone	3953	1.240875	4.01	<.0001 *
clone*memb	3953	0.199890	0.65	1.0000 **

* valor significativo

** valor não significativo

As colônias bacterianas crescidas por 12 horas também apresentaram diferenças entre diferentes clones dentro da mesma membrana (Tabela 3). No entanto, estes clones não apresentaram um comportamento similar entre as membranas (clone*memb $\Rightarrow$ Pr<.0001). Os dados da análise de variância descritos na Tabela 3 indicam que o crescimento bacteriano por 12 horas foi influenciado diferencialmente pelos recursos e espaço disponíveis. Nesta análise também foi possível observar que as diferenças entre repetições dos clones dentro da mesma membrana foram não significativas.

Devido à presença de um baixo valor de resíduo de fundo e da ausência de interação entre clone e membrana, o tempo de 6 horas de crescimento das bactérias nas membranas de alta densidade foi adotado para a confecção do segundo conjunto de macroarranjos. Estes resultados são contrários ao sugerido por Nizetic et al. (1991) e Hemberger et al. (2001), que recomendam um crescimento de 12 horas. Entretanto, acredita-se que esta variação seja dependente de cada experimento, não sendo possível extrapolar para todos os tipos de ensaios.

Tabela 3. Análise conjunta para colônias bacterianas crescidas por 12 horas sobre a membrana de náilon em arranjo 5x5

Causa de Variação	GL	SQ	QM	Pr>F
memb	1	0.2361289	2.90	0.0886
spot(memb)	2	0.0128521	0.16	0.8540 **
clone	4016	0.2326057	2.86	<.0001 *
clone*memb	4016	0.1164171	1.43	<.0001 *

* valor significativo

** valor não significativo

4.1.2 Contagem do Número de Unidades Formadoras de Colônias

Com o objetivo de confirmar que o uso de macroarranjos com colônias bacterianas é melhor quando estas são crescidas por 6 horas, foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias por μl (UFC/ μl).

Quando incubado à 37°C por 6 horas, o clone SCCCAM1C08E06 apresentou 6.835 UFC/ μl , e quando incubado à 37°C por 12 horas, o clone apresentou 9.835 UFC/ μl . Estes resultados, quando plotados na curva de crescimento padrão para bactérias *E. coli*, mostraram que com um número de bactérias viáveis da ordem de 6.000 a 7.000 UFC// μl a cultura se encontra em fase exponencial de crescimento (Figura 14). De acordo com esta curva, o número de UFC/ μl obtido para 12 horas de crescimento (9.835 UFC/ μl) indica que a cultura já se encontra em fase estacionária (Figura 14). Estes resultados confirmam que a adoção do tempo de crescimento de 6 horas é o mais adequado para a confecção das membranas de alta densidade.

Figura 14 – Curva de crescimento padrão para *Escherichia coli*

Fonte: adaptado de Alterthum & Carvalho (1999)

4.2 Análise da Expressão Gênica em Resposta à Herbivoria

4.2.1 Normalização com a Sonda *Overgo*

Para o estudo da expressão gênica de cana-de-açúcar em resposta a herbivoria pela *Diatraea saccharalis* e também para a análise comparativa entre as variedades susceptível e tolerante de cana, foi utilizado o segundo conjunto de clones apresentado no item 3.1.1, dispostos em um arranjo 5x4.

A seleção dos clones com quantidades similares de plasmídeo em suas repetições foi realizada utilizando-se a sonda *overgo*. Os clones foram selecionados por homogeneidade de variância, como descrito no item 3.1.4.

Primeiramente, foram eliminados 759 clones que não cresceram na membrana de náilon. Assim, os valores da intensidade de sinal correspondentes à 3.081 clones foram transformados e analisados pela homogeneidade de variância. Destes, 342 não tiveram homogeneidade entre as repetições, quer seja dentro da membrana ou entre as 6 membranas. Assim,

foram selecionados 2.739 clones (71,3%) com intensidade de sinal homogêneos em relação ao número de plasmídeos por clone nas 6 membranas réplicas, de acordo com a saída emitida pelo programa SAS (Figura 15).

4.2.2 Normalização com as Sondas de cDNA de Cana-de-açúcar

Os 2.739 clones selecionados na normalização com a sonda *overgo* foram também submetidos à análise de homogeneidade de variância quando hibridizados com as sondas oriundas do RNA extraído de cana-de-açúcar, conforme descrito no item 3.2.7. Estas sondas estão apresentadas na Tabela 4, onde se encontra o número de clones selecionados para cada tratamento a que as variedades susceptível (S – SP80-3280) e tolerante (T – SP81-3250) foram submetidas.

Pode ser observado na Tabela 4 que a sonda CS6 (oriunda de plantas controle – C, sem lagarta – da variedade susceptível – S – submetidas ao tratamento de 6 horas) foi a que obteve o menor número de clones selecionados (75,2%). Já a sonda com maior número de clones foi a CS0.5, com 99,3% de seus clones selecionados.

Variância	Número de clones	Homogeneidade
1.65*	1	-
. *	2	-
. *		
. *	4	-
. *	2	-
. *	1	-
0.85*	1	-
. *	1	-
. *	2	-
. *	5	-
. *	21	-
. **	69	-
. *****	233	-
. *****	802	+
0.05*****	1937	+

Figura 15 – Saída do programa SAS para a análise de normalização com a sonda *overgo*. Os números à esquerda são as variâncias dos valores de leitura transformados. No centro estão indicados quantos clones apresentaram tal variação. À direita encontra-se o resultado da análise de homogeneidade de variância, calculado diretamente pelo programa. (*) pode representar até 41 clones. (-) dados não homogêneos (+) representa homogeneidade

Para as sondas oriundas de plantas susceptíveis, 1.466 clones foram comuns aos 4 tratamentos submetidos à herbivoria (S0.5, S6, S12, S24) e 1.857 clones comuns aos 4 tratamentos controle (CS0.5, CS6, CS12, CS24). No total 1.007 clones estavam presentes nos 8 tratamentos. Em relação à análise das sondas provenientes das plantas da variedade tolerante, foi encontrado 1.358 clones comuns aos 8 tratamentos, sendo que para os 4 tratamentos submetidos à herbivoria (T0.5, T6, T12, T24) encontrou-se 1.791 clones em comum, e 2.079 comuns aos tratamentos controle (CT0.5, CT6, CT12, CT24).

Tabela 4. Número de clones selecionados por homogeneidade de variância para cada sonda, a partir dos 2.739 selecionados no processo de normalização com a sonda *overgo*

SONDA ^{1;2}	NÚMERO DE CLONES SELECIONADOS ³
S0.5	2.680 (97,9%)
S6	2.080 (75,9%)
S12	2.484 (90,7%)
S24	2.093 (76,4%)
CS0.5	2.719 (99,3%)
CS6	2.060 (75,2%)
CS12	2.579 (94,2%)
CS24	2.538 (92,7%)
T0.5	2.712 (99,0%)
T6	2.149 (78,5%)
T12	2.632 (96,1%)
T24	2.293 (83,7%)
CT0.5	2.529 (92,3%)
CT6	2.683 (98,0%)
CT12	2.629 (96,0%)
CT24	2.273 (83,0%)

¹ Tratamentos realizados: S – variedade susceptível com lagarta, T – variedade tolerante com lagarta, CS ou CT representam os tratamentos controle

² Tempos de tratamento: 0.5 (0.5 h), 6 (6 h), 12 (12 h) e 24 (24 h)

³ Valores entre parênteses expressam a porcentagem de clones selecionados

4.2.3 Análise da Variedade SP80-3280 (Susceptível)

Dentre os clones que passaram pela normalização, encontraram-se 1.466 clones comuns aos quatro tratamentos submetidos à herbivoria (S0.5, S6, S12, S24) e 1.857 nos tratamentos controle (CS0.5, CS6, CS12, CS24). Um total de 1.007 clones foi comum aos dois conjuntos de tratamentos. Para estes 1.007 clones, foram selecionados os clones com log da razão entre valores de leitura dos tratamentos com lagarta que eram 2 vezes maiores ou menores (induzidos ou reprimidos) que os valores de leitura obtidos nos tratamentos das plantas controle.

Os genes induzidos foram agrupados em 4 padrões de expressão: os induzidos em somente um tempo avaliado; os que foram induzidos em dois tempos do experimento; os induzidos em três tempos; e aqueles que foram induzidos nos quatro tempos avaliados no experimento. Trezentos e cinquenta e oito clones não foram induzidos, 365 apresentaram indução em um dos tempos, 205 em dois tempos, 66 em três tempos e 13 nos quatro tempos avaliados (Tabela 5).

Tabela 5. Número de clones induzidos ou não para a variedade susceptível

NÃO INDUZIDOS	358
INDUZIDOS	649
1 TEMPO	365
2 TEMPOS	205
3 TEMPOS	66
4 TEMPOS	13
TOTAL	1.007

Dos 365 clones induzidos em um dos tempos, 103 foram no tempo de 30 minutos, 108 no tempo de 6 horas, 92 no tempo de 12 horas e 62 no tempo de 24 horas. Os clones estão descritos no APÊNDICE 5 onde também se encontram os respectivos produtos gênicos de cada clone, de acordo com levantamento realizado por Fábio T. S. Nogueira e Vicente E. de Rosa Júnior, ambos do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), UNICAMP, Campinas, SP.

Os genes induzidos foram agrupados em diversas classes utilizando-se a classificação funcional descrita no banco de dados do *SUCEST*. Dezesete classes gênicas foram distinguidas para esta variedade. Este procedimento também foi adotado nos trabalhos de Wang J. (2000), Sasaki et al. (2001) e Nogueira et al. (2003).

A Figura 16 representa a classificação gênica funcional dos clones induzidos uma única vez. Estes genes foram agrupados em dezesseis classes: metabolismo de aminoácidos, crescimento/desenvolvimento, metabolismo de proteínas, metabolismo de RNA, metabolismo secundário, resposta à diferentes condições de estresse, transporte, bioenergética, transdução de sinal, dinâmica celular, metabolismo de DNA, metabolismo de lipídios, elementos móveis, metabolismo de nitrogênio, sulfato e fosfato, metabolismo de nucleotídeos e função não determinada (ND). Nesta última classe, cujos genes têm função desconhecida, foram agrupados os clones denominados de *unknow protein*, *hypothetical protein*, *putative protein* e *unable to classify*. Através da Figura 16 é possível verificar que a maioria dos genes induzidos tem função não determinada (ND).

Figura 16 – Diferentes classes gênicas dos clones induzidos uma única vez. Esta classificação está representada da seguinte forma: ¹met. aa., ²crescimento/desenvolvimento, ³met. proteína, ⁴met. RNA, ⁵met. 2^{ário}, ⁶estresse, ⁷transporte, ⁸ND, ⁹bioenergética, ¹⁰transdução de sinal, ¹¹dinâmica celular, ¹²met. DNA, ¹³met. lipídeos, ¹⁴elementos móveis, ¹⁵met. N, S e P, ¹⁶met. nucleotídeos

Os 103 genes induzidos no tempo de 30 minutos (0.5 hora) foram agrupados em dez classes gênicas. Entre estas, as classes de metabolismo secundário e de resposta ao estresse foram as mais significativas, representando juntas 40% dos genes identificados, com 9 genes em cada classe. Neste tempo de tratamento ainda não havia sinais de herbivoria nas folhas das plantas com lagartas. Segundo Mauch et al. (1997), movimentos de toque em plântulas de trigo (*Triticum aestivum*) induziram o aumento dos níveis de transcritos do gene da lipoxigenase (LOX). De acordo com estes autores, a resposta ao toque ocorreu dentro de 1 hora. Bown et al. (2002) demonstraram que o caminhar de lagartas de *Heliothis virescens* e *Choristoneura rosaceana*, por 5 a 10 minutos, estimularam a síntese de compostos de defesa em folhas de tabaco e soja respectivamente.

Doze classes foram identificadas no tempo de 6 horas. Em relação ao tempo de 30 minutos, a diferença foi a presença das classes de crescimento/desenvolvimento, de metabolismo de lipídios, de elementos móveis e de metabolismo de nitrogênio, sulfato e fosfato; e a ausência das classes de metabolismo de RNA e de metabolismo secundário. Neste tempo, a classe de resposta ao estresse apresentou 12 genes induzidos, equivalente à 22% dos genes identificados.

Estavam presentes no tempo de 12 horas treze classes, sendo que as classes de metabolismo de proteínas e de bioenergética apresentaram juntas 10 (12%) genes induzidos, e a 35% dos genes identificados.

No tempo de 24 horas também foram identificadas treze classes gênicas. A classe com maior número de genes induzidos foi a de dinâmica celular, com 4 genes induzidos, representando 15% dos genes identificados.

Pôde ser observado que as classes de metabolismo de lipídios e de elementos móveis estavam presentes a partir do tempo de 6 horas. A classe de metabolismo de DNA tornou-se presente a partir do tempo de 12 horas. Os genes das classes de transporte e de bioenergética deixaram de ser induzidos no tempo de 24 horas.

Para os clones induzidos em dois tempos do experimento, foram selecionados 205 clones. Destes, 39 foram induzidos nos tempos de 6 e 24 horas; 30 nos tempos de 0.5 e 12 horas; 35 nos tempos de 6 e 12 horas; 27 nos tempos de 0.5 e 6 horas; 38 nos tempos de 12 e 24 horas; e 36 clones nos tempos de 0.5 e 24 horas. Tais padrões de indução podem ser observados na Figura 17. Os gráficos A e B desta figura representam genes com comportamento bimodal, ou seja, genes com dois picos de indução intercalados com um retorno aos níveis do controle. O gráfico C, da mesma figura, representa os genes com indução intermediária no processo de herbivoria, enquanto o gráfico D representa os genes responsivos nos primeiros estágios de defesa e o gráfico E, os com resposta tardia. O gráfico F representa os clones que se mostraram induzidos no primeiro e no último tempo do experimento. Estes clones estão descritos no APÊNDICE 6, onde também estão descritos os respectivos produtos gênicos.

Figura 17 – Padrões de indução gênica em dois tempos do experimento. (A) 6 e 24 h (B) 0.5 e 12 h (C) 6 e 12 h (D) 0.5 e 6 h (E) 12 e 24 h (F) 0.5 e 24 h No eixo y destes gráficos estão os valores C (intensidade de sinal encontrada em plantas controle) e os valores 3x C (indica indução gênica equivalente a pelo menos 3 vezes a intensidade de sinal encontrada nas plantas controle)

Na Figura 18 encontra-se a classificação funcional dos clones induzidos em dois tempos do experimento. Assim, nos tempos de 6 e 24 horas, foi possível identificar onze classes gênicas. Entre estas, a classe de bioenergética apresentou 4 genes induzidos, 10% do número total.

Oito classes gênicas foram identificadas nos tempos de 0.5 e 12 horas. Em relação ao padrão anterior, a diferença foi a presença das classes de metabolismo de DNA e de metabolismo de lipídios; e a ausência das classes de metabolismo de RNA, de proteína de armazenamento, de resposta ao estresse, de transporte e de dinâmica celular. Nestes tempos, a classe de transdução de sinal apresentou 4 genes, 39% dos identificados. Estes dados corroboram os relatos de Ryan (2000), que mostraram a ativação de componentes da via de transdução de sinais em estágios iniciais do mecanismo de defesa de folhas de tomate submetidas a ferimento mecânico ou sistemina.

Nos tempos de 6 e 12 horas os 35 genes induzidos também foram agrupados em oito classes, a saber: metabolismo de aminoácidos, transporte, transdução de sinal, função não determinada (ND), resposta à diferentes condições de estresse, crescimento/desenvolvimento, bioenergética e de dinâmica celular, sendo que as quatro últimas classes gênicas possuem 2 genes induzidos cada, representando juntas 77% dos genes identificados.

Foram identificadas sete classes gênicas nos tempos de 0.5 e 6 horas. A classe de elementos móveis apareceu apenas neste padrão e as classes de resposta ao estresse e de transdução de sinal, como pode ser observado na Figura 18, apresentaram 2 genes induzidos cada, representando juntas 14% do número total de genes induzidos.

Os 38 genes induzidos nos tempos de 12 e 24 horas foram agrupados em dez classes funcionais. Um gene da classe de metabolismo de nucleotídeos foi induzido neste padrão, correspondendo a 8% dos genes identificados. A classe com o maior número de genes induzidos foi a de metabolismo de proteínas, com 3 genes induzidos.

Figura 18 – Diferentes classes gênicas dos clones induzidos duas vezes. Esta classificação está representada da seguinte forma: ¹met. aa., ²crescimento/desenvolvimento, ³met. proteína, ⁴met. RNA, ⁵met. 2^{ário}, ⁶proteína de armazenamento, ⁷estresse, ⁸transporte, ⁹ND, ¹⁰bioenergética, ¹¹transdução de sinal, ¹²dinâmica celular, ¹³met. DNA, ¹⁴met. lipídeos, ¹⁵elementos móveis, ¹⁶met. N, S e P, ¹⁷met. nucleotídeos

Nos tempos de 0.5 e 24 horas, onze classes estavam presentes. A classe de metabolismo de nitrogênio, sulfato e fosfato aparece neste padrão com 1 (3%) gene induzido. As classes com maior número de genes foram as de transdução de sinal e de dinâmica celular, que apresentaram juntas 36% dos genes identificados, com 2 genes cada.

Sessenta e seis clones foram induzidos em três tempos do experimento. Catorze foram induzidos nos tempos de 0.5, 6 e 12 horas; 17 foram induzidos nos tempos de 0.5, 6 e 24 horas; 18 foram induzidos nos tempos de 0.5, 12 e 24 horas; e 17 clones foram induzidos nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os padrões de indução destes genes podem ser visualizados na Figura 19. O gráfico A desta figura representa os genes responsivos nos três primeiros tempos do experimento e o gráfico D, os com resposta nos três últimos. O gráfico B representa os genes induzidos nos tempos de 0.5, 6 e 24 horas, enquanto o gráfico C representa os genes responsivos nos tempos de 0.5, 12 e 24 horas. Estes clones estão descritos no APÊNDICE 7, que também apresenta os respectivos produtos gênicos de cada clone.

Figura 19 – Padrões de expressão para genes induzidos em três tempos do experimento. (A) 0.5, 6 e 12 h (B) 0.5, 6 e 24 h (C) 0.5, 12 e 24 h (D) 6, 12 e 24 h No eixo y destes gráficos estão os valores C (intensidade de sinal emitida pelo tratamento controle) e os valores 3x C (intensidade de sinal emitida pelo tratamento com lagartas, indicando que aquele clone foi induzido)

Na Figura 20 podem ser observados os grupos gênicos induzidos em 3 tempos do experimento. Estes genes foram agrupados em onze classes: metabolismo de aminoácidos, crescimento/desenvolvimento, metabolismo de proteínas, metabolismo de RNA, resposta ao estresse, transporte, bioenergética, transdução de sinal, metabolismo de DNA, metabolismo de lipídios e de proteínas de função não determinada (ND). Através desta figura é possível verificar que a maioria dos genes induzidos tem função não determinada (ND).

Figura 20 – Diferentes classes gênicas dos clones induzidos três vezes. Esta classificação está representada da seguinte forma: : ¹met. aa., ²crescimento/desenvolvimento, ³met. proteína, ⁴met. RNA, ⁵estresse, ⁶transporte, ⁷ND, ⁸bioenergética, ⁹transdução de sinal, ¹⁰met. DNA, ¹¹met. lipídeos

Foram identificadas quatro classes gênicas nos tempos de 0.5, 6 e 12 horas: metabolismo de proteínas, resposta ao estresse, transdução de sinal e função não determinada (ND). Entre estas, a classe de transdução de sinal apresentou 2 genes, representando 50% dos identificados. Uma das proteínas envolvidas nesta via são as quinases. Segundo Bögre et al. (1997), ferimentos mecânicos em folhas de alface induziram a ativação de um grupo específico de MAP quinases (*mitogen-activated protein kinases*) nos estágios iniciais do mecanismo de defesa. Estes dados também estão de acordo com relatos de Seo et al. (1999), que verificaram o aumento nos níveis de proteínas quinases em plantas de tabaco submetidas à ferimentos. A ativação de quinases também foi reportada em respostas da defesa contra patógenos e elicitores (Zhang & Klessig, 1998; Romeis et al., 1999; Yang et al., 2001).

Nos tempos de 0.5, 6 e 24 horas também foram identificadas quatro classes gênicas: crescimento/desenvolvimento, resposta ao estresse, transporte e proteínas cuja função ainda é desconhecida (ND). Nestes tempos, a classe de genes responsivos à diferentes tipos de estresses apresentou 3 genes induzidos, 18% dos identificados.

Seis classes gênicas estavam presentes nos tempos de 0.5, 12 e 24 horas: metabolismo de RNA, resposta ao estresse, bioenergética, metabolismo de DNA, metabolismo de lipídios e a classe de genes com função não determinada (ND). Todas as classes, com exceção da classe de genes com função não determinada (ND), apresentaram 1 gene induzido.

No padrão de expressão dos tempos de 6, 12 e 24 horas, de acordo com a Figura 20, também foram encontradas seis classes funcionais: metabolismo de aminoácidos, crescimento/desenvolvimento, metabolismo de RNA, resposta ao estresse, metabolismo de lipídios e de função não determinada (ND). A classe de metabolismo de aminoácidos foi a mais representativa, com 2 genes induzidos (33% dos genes identificados).

Categorização dos genes induzidos nos quatro tempos de tratamento

Figura 21 – Classes de genes induzidos em todos os tempos de tratamento. Esta classificação está representada da seguinte forma: ¹met. aa., ²resposta ao estresse, ³ND, ⁴bioenergética, ⁵transdução de sinal, ⁶dinâmica celular

Treze genes foram induzidos nos quatro tempos. Estes clones estão listados no APÊNDICE 8, onde estão descritos também seus respectivos produtos gênicos. A Figura 21 apresenta o agrupamento destes clones, os quais foram agrupados em seis classes: metabolismo de proteínas, resposta ao estresse, bioenergética, transdução de sinal, dinâmica celular e função não determinada (ND). A partir desta figura, como nos outros padrões de expressão gênica, pôde ser observado que existem muitos genes induzidos cuja função ainda é desconhecida (ND). Em relação às demais classes, somente 1 gene foi induzido em cada.

Os resultados obtidos para a variedade susceptível (SP80-3280) estão resumidamente apresentados na Tabela 6. Estes dados mostram que 270 genes foram induzidos no tempo de 6 horas, tempo com o maior número de genes induzidos. Já o tempo com o menor número foi o de 24 horas (com 240 induções). Os tempos de 30 minutos (0.5 hora) e de 12 horas apresentaram 258 e 257 genes induzidos respectivamente.

Dos 246 genes identificados, a classe menos representada foi a de proteína de armazenamento (um gene identificado). A classe com maior número de genes identificados foi a de resposta ao estresse, com 39 genes, seguida das classes de transdução de sinal e de metabolismo de proteínas, com 35 e 32 genes identificados respectivamente.

Analisando as classes gênicas em cada tempo (Tabela 6), é possível observar que algumas tiveram genes identificados em determinados tempos de indução, como foi o caso das classes de metabolismo secundário, de proteína de armazenamento, de metabolismo de nitrogênio, sulfato e fosfato e de metabolismo de nucleotídeos.

Tabela 6. Número de genes induzidos para cada classe funcional apresentada na variedade susceptível

CATEGORIAS GÊNICAS	TEMPOS DE INDUÇÃO															0.5 h					
																0.5 h	0.5 h	0.5 h	6 h	6 h	
																6 h	0.5 h	6 h	12 h	12 h	12 h
	0.5 h	6 h	12 h	24 h	24 h	6 h	12 h	12 h	6 h	24 h	24 h	12 h	24 h	24 h	24 h	24 h	TOTAL				
met. aa.	2	1	1	1	2	1	1				1				2		12				
crescimento/desenvolvimento		3	1	1	1	1	1	2		1	1		1		1		13				
met. proteína	4	9	5	3	3	1			1	3	1	1				1	32				
met. RNA	1		3		2					1					1	1	9				
met. 2 ^{ário}	9			1							1						11				
proteína de armazenamento					1												1				
estresse	9	12	4	1	1			2	2	1		1	3	1	1	1	39				
transporte	3	3	2		1			1		1	1		1				13				
bioenergética	5	3	5		4	1	2	1	2	1				1		1	26				
transdução de sinal	8	6	2	2	3	4	1	2	2	2	2	2				1	35				
dinâmica celular	4	5	4	4	2		2	1	2	2	2					1	27				
met. DNA			1	1			1				1				1		5				
met. lipídeos		5	3	2			1								1	1	13				
elementos móveis		1	1	1					1								4				
met. N, S e P		1		1							1						3				
met. nucleotídeos				2						1							3				
ND	58	59	60	42	19	20	24	19	24	24	10	12	13	11	8		403				
TOTAL	103	108	92	62	39	30	35	27	38	36	14	17	18	17	13		649				

Onze genes relacionados ao metabolismo secundário foram induzidos nos tempos de 30 minutos (0.5 hora; tempo mais representativo com 9 genes induzidos), um gene foi encontrado induzido no tempo de 24 horas e um clone presente nos tempos de 0.5 e 24 horas (Tabela 6). Entre estes genes estão: *flavonol 3-O-glucosyltransferase-like protein*, *jacalin homolog*, *putative flavonoid 3'-hydroxylase*, *isoflavone reductase*, *arginine decarboxylase*, *phenylalanine ammonia-lyase*, *dihydrokaempferol 4-reductase A* e *putative cinnamyl-alcohol dehydrogenase*. Estas substâncias podem ser agrupadas na classe dos compostos fenólicos, que consistem de um anel aromático, ao qual se ligam grupos do tipo hidroxila, carboxila e metoxila. A maioria é solúvel em água e ocorrem na forma de glicosídeos. Eles são originados a partir da via do ácido chiquímico e acumulam-se nos vacúolos das células vegetais. Os compostos fenólicos presentes nas plantas possuem diferentes efeitos sobre os

herbívoros (Gazzoni et al., 1997). A ativação desses compostos ocorre por oxidação, conforme estabelecido por Appel (1993). Segundo este autor, tais compostos inibem o consumo foliar e a digestão de determinados insetos, além de serem formadores de radicais livres. O efeito deterrente está relacionado à sensação adstringente, decorrente da capacidade dos compostos fenólicos em precipitar proteínas. A inibição da digestão pode ocorrer devido à formação de pontes de hidrogênio, ou ainda pela formação de ligações covalentes, com proteínas e enzimas digestivas. Ainda segundo Appel (1993), os radicais de hidroxila formados durante a oxidação dos compostos fenólicos possuem ação tóxica, pois ocasionam a ruptura da integridade da membrana e distúrbios de metabolismo no epitélio intestinal. Os flavonóides são compostos fenólicos, amplamente encontrados em materiais vegetais (Harborne, 1991). Nenhuma função universal referente aos flavonóides e seus glicosídeos foi estabelecida em relação a todas as plantas. Contudo, muitas funções em plantas específicas tem sido demonstradas, incluindo proteção contra raios ultravioleta, insetos, fungos, vírus e bactérias (Markham, 1989). Chiang et al. (1987), estudando plantas de soja submetidas à *Epilachna varivestis*, concluíram que o aumento do efeito anti-herbivoria estava correlacionado com os níveis de compostos fenólicos, onde foi observado uma alta atividade das enzimas PAL (L-fenilalanina amônia-liase) e TAL (L-tirosina amônia-liase). Já Sharma & Norris (1991), analisando nove compostos extraídos de soja, relataram que os flavonóides encontrados exibiram efeito deterrente ou antibiótico contra as larvas de *Trichoplusia ni* Hübner.

Patatin foi o único transcrito relatado na classe de proteína de armazenamento e foi induzido nos tempos de 6 e 24 horas. Esta glicoproteína, pertencente à família das fosfolipases, constitui de 20 a 40% da proteína total solúvel de tubérculos de batata (Racusen & Foote, 1980). *Patatin* é uma proteína de armazenamento que apresenta também atividade enzimática, hidrolisando ácidos graxos da membrana. Dados indicam que a *patatin* é uma enzima bioativa da planta com a atividade anti-nutritiva, como α -amilase,

inibidores de protease, lecitinas e globulinas (Negreiros et al., 1991; Sales et al., 2000; Franco et al., 2002). Strickland et al. (1995) observaram que o crescimento de lagartas de *Diabrotica sp.* foi inibido devido à dieta com *patatin* obtida de plantas de batata. Os autores sugerem que a *patatin* pode representar uma nova classe de proteínas para o controle de pragas.

Os genes induzidos da classe de metabolismo de nitrogênio, sulfato e fosfato, apresentados a seguir, estavam presentes nos tempos de 0.5, 6 e 24 horas respectivamente: *MtN3*, *nodulin-like protein* e *DsPTP1 protein*. A fixação simbiótica do nitrogênio é dependente da nitrogenase, uma enzima instável e reativa ao oxigênio. Para proteger as nitrogenases bacterianas da inativação pelo oxigênio (O_2), a concentração de oxigênio $[O_2]$ é mantida em um nível muito baixo nos nódulos infectados de leguminosas. Segundo Kuzma et al. (1993), a presença das leghemoglobinas nestes nódulos faz com que a $[O_2]$ seja de 30 a 50 nM em nódulos fixadores ativos, enquanto a $[O_2]$ na água do solo em equilíbrio com a atmosfera é de aproximadamente 260 μM . Uma outra proteína que pode estar envolvida no regulamento da barreira de difusão é a nodulina (Nap & Bisseling, 1990). Acúmulos de transcritos que codificam esta proteína foram encontradas em nódulos ativos de soja, ervilha, alfafa e feijão (Van de Wiel et al., 1990; Trese & Pueppke, 1991; Dehio & de Bruijn, 1992). Uma terceira proteína, a lecitina, foi encontrada em nódulos de amendoim (VandenBosch et al., 1994). Em relação aos genes envolvidos no metabolismo de enxofre, Maruyama-Nakashita et al. (2003) relataram que as plantas utilizam o sulfato para a síntese de vários compostos orgânicos, de acordo com Grossman & Takahashi (2001). Uma vez incorporado pela planta, o sulfato é reduzido e torna-se um constituinte das proteínas essenciais cisteína e metionina. A cisteína (Cys) é utilizada na produção da glutathione (GSH), que serve tanto para o controle redox, redução e oxidação de substâncias celulares, como também para a conjugação xenobiótica, ligando-se a compostos não degradados pelos organismos no ambiente (Asada, 1999). O enxofre é um elemento importante para os vegetais pois ele é convertido a uma ampla

variação de compostos secundários, essenciais para o regulamento e para a adaptação do crescimento aos estresses ambientais (Benning, 1998).

A classe de metabolismo de nucleotídeos, de acordo com a Tabela 6, teve três genes induzidos, dois no tempo de 24 horas (*glycyl-tRNA synthetase* e *putative nucleotide sugar epimerase*) e um nos tempos de 12 e 24 horas (*ADP-ribosylation factor-like protein*).

Os resultados apresentados na Tabela 6 também mostram que algumas classes gênicas funcionais foram induzidas em todos os tempos do experimento, tais como: metabolismo de proteínas, resposta ao estresse, bioenergética, transdução de sinal e dinâmica celular. A classe de elementos móveis, com 4 genes induzidos, não apresentou indução somente no tempo de 30 minutos (0.5 hora), tempo no qual as lagartas de *D. saccharalis* ainda não haviam causado danos nas plantas de cana-de-açúcar. Estudos recentes mostraram que elementos móveis podem ser induzidos por fatores ambientais, tais como ataque de herbívoros e elicitação por ácido jasmônico ou por ferimento mecânico (Capy et al., 2000; Heil & Baldwin, 2002). Também foi possível observar que a classe de metabolismo de DNA não teve genes induzidos no tempo de 6 horas.

4.2.4 Análise da Variedade SP81-3250 (Tolerante)

Para esta variedade foram encontrados 1.791 clones comuns aos quatro tratamentos de herbivoria (T0.5, T6, T12, T24) e 2.079 nos tratamentos controle (CT0.5, CT6, CT12, CT24). Destes, 1.358 clones estavam presentes nos dois conjuntos de experimentos. Conforme realizado para a variedade susceptível, foram selecionados somente os clones 2 vezes maiores ou menores (induzidos ou reprimidos) em relação ao log da razão entre valores de leitura dos tratamentos com lagarta e os valores de leitura obtidos nos tratamentos das plantas controle. Uma vez selecionados, estes clones também foram agrupados em 4 padrões de indução da expressão gênica em resposta à herbivoria, como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7. Número de clones induzidos ou não para a variedade tolerante

NÃO INDUZIDOS	532
INDUZIDOS	791
1 TEMPO	415
2 TEMPOS	285
3 TEMPOS	70
4 TEMPOS	21
TOTAL	1.323

De acordo com a Tabela 7, verificou-se que 532 clones não apresentaram sinal de indução, 415 foram induzidos em um dos tempos do experimento, 285 em dois tempos, 70 em três tempos e 21 nos quatro tempos de tratamento. Para esta variedade foram descritas dezessete classes gênicas funcionais.

Quatrocentos e quinze clones foram induzidos em um dos tempos do experimento, sendo 86 no tempo de 30 minutos (0.5 hora), 150 no tempo de 6 horas, 67 no tempo de 12 horas e 112 no tempo 24 de horas. Os clones e seus respectivos produtos gênicos estão descritos no APÊNDICE 9.

Os clones induzidos uma única vez foram agrupados em dezessete classes gênicas funcionais, a saber: metabolismo de aminoácidos, crescimento/desenvolvimento, metabolismo de proteínas, metabolismo de RNA, metabolismo secundário, proteína de armazenamento, resposta ao estresse, transporte, bioenergética, transdução de sinal, dinâmica celular, metabolismo de DNA, metabolismo de lipídios, elementos móveis, metabolismo de nitrogênio, sulfato e fosfato, metabolismo de nucleotídeos e função não determinada (ND). Através da Figura 22 é possível verificar que a maioria dos genes induzidos tem função desconhecida (classe ND).

No tempo de 30 minutos (0.5 hora), onde ainda não havia sinal de herbivoria nas plantas, os 86 genes induzidos foram agrupados em treze classes gênicas. Entre estas, a classe de resposta ao estresse foi a que apresentou um maior número de genes em relação às demais, 8 genes, representando 18% dos genes identificados.

Catorze classes foram identificadas no tempo de 6 horas. Em relação ao tempo de 30 minutos, a diferença foi a presença da classe de metabolismo de nitrogênio, sulfato e fosfato. Neste tempo, a classe de dinâmica celular foi a que mostrou maior porcentagem de genes induzidos (7%), com 10 genes identificados.

Os 67 genes induzidos no tempo de 12 horas foram agrupados em treze classes gênicas. Em relação ao tempo anterior, a diferença foi a presença da classe de metabolismo de lipídios, e a ausência das classes de elementos móveis e de metabolismo de nitrogênio, sulfato e fosfato. Neste tempo, a classe de metabolismo de proteínas apresentou 7 genes induzidos, equivalente à 25% dos genes identificados.

Figura 22 – Classes dos clones induzidos uma única vez, representados da seguinte forma: ¹met. aa., ²crescimento/desenvolvimento, ³met. proteína, ⁴met. RNA, ⁵met. 2^{ário}, ⁶proteína de armazenamento, ⁷estresse, ⁸transporte, ⁹ND, ¹⁰bioenergética, ¹¹transdução de sinal, ¹²dinâmica celular, ¹³met. DNA, ¹⁴met. lipídeos, ¹⁵elementos móveis, ¹⁶met. N, S e P, ¹⁷met. nucleotídeos

Estavam presentes no tempo de 24 horas catorze classes. As classes com maior número de genes induzidos foram as de metabolismo de proteínas e de transdução de sinal, com 8 genes identificados em cada, representando juntas 14% dos genes induzidos.

Constatou-se que a classe de metabolismo de nitrogênio, sulfato e fosfato só foi induzida nos tempos de 6 e 24 horas. Já a classe de metabolismo secundário foi induzida nos tempos de 0.5 e 12 horas. A classe de metabolismo de lipídios não foi induzida no tempo de 30 minutos (0.5 hora), e as classes de proteína de armazenamento e de metabolismo de nucleotídeos estiveram presentes somente no tempo de 24 horas. Os genes da classe de elementos móveis deixam de ser induzidos a partir do tempo 12 horas, e os das classes de metabolismo de aminoácidos e de metabolismo de DNA não foram identificados como induzidos no tempo de 24 horas.

No padrão de indução em dois tempos do experimento, como descrito anteriormente (Figura 17), foram selecionados 285 clones, nos quais, 55 foram induzidos nos tempos de 6 e 24 horas; 44 nos tempos de 0.5 e 12 horas; 56 nos tempos de 6 e 12 horas; 49 nos tempos de 0.5 e 6 horas; 45 nos tempos de 12 e 24 horas; e 36 clones nos tempos de 0.5 e 24 horas. Estes clones estão descritos no APÊNDICE 10, onde também estão descritos os respectivos produtos gênicos.

A Figura 23 apresenta a classificação funcional dos clones induzidos em dois tempos de tratamento. Estes genes foram agrupados em quinze classes: metabolismo de aminoácidos, crescimento/desenvolvimento, metabolismo de proteínas, metabolismo de RNA, metabolismo secundário, resposta ao estresse, transporte, bioenergética, transdução de sinal, dinâmica celular, metabolismo de DNA, metabolismo de lipídios, elementos móveis, metabolismo de nucleotídeos e a classe dos genes com função não determinada (ND). Através desta figura é possível verificar que a maioria dos genes induzidos tem função não conhecida.

Figura 23 – Diferentes classes gênicas dos clones induzidos duas vezes. Esta classificação está representada da seguinte forma: ¹met. aa., ²crescimento/desenvolvimento, ³met. proteína, ⁴met. RNA, ⁵met. secundário, ⁶estresse, ⁷transporte, ⁸ND, ⁹bioenergética, ¹⁰transdução de sinal, ¹¹dinâmica celular, ¹²met. DNA, ¹³met. lipídeos, ¹⁴elementos móveis, ¹⁵met. nucleotídeos

Os 55 genes induzidos nos tempos de 6 e 24 horas foram agrupados em doze classes gênicas. A classe de resposta ao estresse apresentou 7 genes induzidos, representando 25% dos genes identificados.

Foram identificadas dez classes nos tempos de 0.5 e 12 horas. Nestes tempos, a classe de dinâmica celular apresentou 9% dos genes induzidos, equivalendo a 4 genes identificados.

Cinquenta e seis genes foram agrupados em doze classes gênicas nos tempos de 6 e 12 horas. A classe contendo os genes de dinâmica celular foi a mais representativa, com 4 genes identificados (17%).

Onze classes estavam presentes nos tempos de 0.5 e 6 horas: metabolismo de aminoácidos, crescimento/desenvolvimento, metabolismo de proteínas, metabolismo secundário, resposta ao estresse, bioenergética, transdução de sinal, dinâmica celular, metabolismo de lipídios, metabolismo de nucleotídeos e a classe dos genes com função não determinada (ND). As classes com maior número de genes induzidos foram as de resposta ao estresse e de metabolismo de lipídios, com 3 genes identificados em cada.

Nos tempos de 12 e 24 horas, os 45 genes induzidos foram agrupados em onze classes, todas observadas no padrão anterior com exceção da classe de metabolismo de nucleotídeos, e com o acréscimo da classe de genes relacionados ao transporte celular. As classes de transdução de sinal e de transporte tiveram 4 genes induzidos cada, representando juntas 35% dos genes identificados.

Estavam presentes nos tempos de 0.5 e 24 horas dez classes gênicas. A classe de transdução de sinal se destacou mais uma vez como a classe mais representada, constituindo-se de 4 genes, 11% dos identificados.

Para os genes com padrão de indução em dois tempos, foi observado que as classes funcionais de metabolismo de proteínas, de resposta ao estresse, de transdução de sinal e de dinâmica celular foram as mais induzidas neste padrão.

Dos setenta clones que foram induzidos em três tempos do experimento, 18 foram induzidos nos tempos de 0.5, 6 e 12 horas; 16 foram induzidos nos tempos de 0.5, 6 e 24 horas; 11 foram induzidos nos tempos de 0.5, 12 e 24 horas; e 25 clones foram induzidos nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Estes clones e seus respectivos produtos gênicos estão descritos no APÊNDICE 11.

Estes clones seguem o mesmo padrão de expressão gênica descrito na Figura 19, e foram agrupados em treze classes gênicas funcionais: crescimento/desenvolvimento, metabolismo de proteínas, metabolismo de RNA, proteína de armazenamento, resposta ao estresse, transporte, bioenergética, transdução de sinal, dinâmica celular, metabolismo de lipídios, elementos móveis, metabolismo de nucleotídeos e função não determinada (ND). A Figura 24 apresenta o agrupamento destes clones. Através desta figura é possível verificar que a maioria dos genes induzidos tem função não determinada (ND).

Oito classes gênicas agruparam os 18 genes induzidos nos tempos de 0.5, 6 e 12 horas: crescimento/desenvolvimento, metabolismo de RNA, transporte, bioenergética, transdução de sinal, dinâmica celular, metabolismo de lipídios e função não determinada (ND). A classe relacionada à bioenergética apresentou 2 genes, sendo a classe com o maior número de genes induzidos em relação às demais.

No padrão de expressão dos tempos de 0.5, 6 e 24 horas foram identificadas quatro classes gênicas: resposta ao estresse, bioenergética, elementos móveis e função não determinada (ND). A classe de resposta ao estresse foi a que apresentou a maior porcentagem de genes induzidos em relação às demais (19%), com 3 genes identificados.

Figura 24 – Diferentes classes gênicas dos clones induzidos em três tempos do experimento. Esta classificação foi feita de acordo com o banco de dados do *SUCEST*, e estão representadas da seguinte forma: ¹crescimento/desenvolvimento, ²met. proteína, ³met. RNA, ⁴proteína de armazenamento ⁵estresse, ⁶transporte, ⁷ND, ⁸bioenergética, ⁹transdução de sinal, ¹⁰dinâmica celular, ¹¹met. lipídeos, ¹²elementos móveis, ¹³met. nucleotídeos

Estavam presentes nos tempos de 0.5, 12 e 24 horas quatro classes gênicas, a de resposta ao estresse, de dinâmica celular, de metabolismo de lipídios e de função não determinada (ND). Nestes tempos, a classe contendo genes responsivos à diferentes condições de estresse mostrou-se mais representativa, com 4 genes identificados, 36% dos induzidos.

Foram encontradas nove classes gênicas nos tempos de 6, 12 e 24 horas: metabolismo de proteínas, proteína de armazenamento, resposta ao estresse, transporte, bioenergética, transdução de sinal, dinâmica celular, metabolismo de nucleotídeos e função não determinada (ND). A classe com maior número de genes foi a de metabolismo de proteínas, contendo 3 genes que representam 12% dos genes induzidos.

Através da análise dos gráficos presentes na Figura 24, representando os genes induzidos em três tempos do experimento, pôde ser observado que as classes de crescimento/desenvolvimento e de metabolismo de RNA somente foram induzidas nos tempos de 0.5, 6 e 12 horas. O grupo dos elementos móveis aparece induzido somente nos tempos de 0.5, 6 e 24 horas, enquanto as classes de metabolismo de proteínas, de proteínas de armazenamento e de metabolismo de nucleotídeos estão presentes nos tempos de 6, 12 e 24 horas.

Vinte e um genes foram induzidos nos quatro tempos do experimento. Estes clones estão listados no APÊNDICE 12, onde estão descritos também seus respectivos produtos gênicos. A Figura 25 apresenta a classificação funcional dos mesmos, os quais foram agrupados em sete classes: metabolismo de RNA, resposta ao estresse, transporte, transdução de sinal, dinâmica celular, metabolismo de DNA e genes de função não determinada (ND). Neste grupo, as classes de transporte e de dinâmica celular foram as mais representativas, correspondendo a dois genes identificados em cada classe, equivalentes a 19% dos genes conhecidos neste padrão.

Genes induzidos nos quatro tempos de tratamento

Figura 25 – Diferentes classes gênicas dos clones induzidos nos quatro tempos de experimentação. Esta classificação está representada da seguinte forma: ¹met. RNA, ²resposta ao estresse, ³transporte, ⁴ND, ⁵transdução de sinal, ⁶dinâmica celular, ⁷met. DNA

Seguindo os mesmos procedimentos de análise realizados para a variedade susceptível, na Tabela 8 estão resumidamente apresentados os resultados obtidos para a variedade tolerante. A partir destes dados foi possível observar que o tempo mais significativo em relação à indução de genes foi o de 6 horas, correspondendo à 390 genes analisados. Os demais tempos de experimentação (0.5, 12 e 24 horas) não tiveram uma diferença significativa quanto ao número de genes induzidos, apresentando, respectivamente, 281, 287 e 321 genes induzidos em relação às plantas controle.

Tabela 8. Número de genes induzidos para cada classe funcional apresentada na variedade tolerante

CATEGORIAS GÊNICAS	TEMPOS DE INDUÇÃO															0.5 h
											0.5 h 0.5 h 0.5 h 6 h					6 h
	0.5 h	6 h	12 h	24 h	24 h	6 h	0.5 h	6 h	0.5 h	12 h	0.5 h	6 h	6 h	12 h	12 h	12 h
met. aa.	3	2	2				1		2		1					11
crescimento/desenvolvimento	1	6	2	4	1		3	1	2			1				21
met. proteína	5	6	7	8	2	2	3	2	1	2					3	41
met. RNA	1	1	1	2	1	3	2		2	1	1					16
met. 2 ^º	4		2	3		1	1	1	1	2						15
proteína de armazenamento				1											1	2
estresse	8	5	2	7	7	3	3	3	2	2			3	4	2	52
transporte	1	2	2	2	3	1	1		4	1	1			1	2	21
bioenergética	5	8	2	4	4	2		1	3	1	2	1		1		34
transdução de sinal	5	5	1	8	4	3	3	1	4	4	1			1	1	41
dinâmica celular	7	10	1	6	2	4	4	3	3	1	1			2	1	47
met. DNA	1	1	2		1										1	6
met. lipídeos		3	2	1	1		1	1	2		1			1		13
elementos móveis	1	2			3		1						1			8
met. N, S e P		1		1												2
met. nucleotídeos				1			1	1							1	4
ND	44	98	41	64	26	24	33	33	21	21	10	11	4	14	13	457
TOTAL	86	150	67	112	55	44	56	49	45	36	18	16	11	25	21	791

Dos 334 genes identificados, as classes menos representadas foram as de proteína de armazenamento e de metabolismo de nitrogênio, sulfato e fosfato, com 2 genes identificados em cada. Com 52 genes induzidos, a classe de resposta ao estresse foi a que apresentou o maior número de genes identificados.

De acordo com a Tabela 8, é possível observar que a classe de proteína de armazenamento não teve genes induzidos no tempo de 0.5 hora. Já a classe de metabolismo de nitrogênio, sulfato e fosfato não apresentou genes identificados nos tempos de 0.5 e 12 horas do experimento.

A classe de proteínas de armazenamento foi representada por 2 genes: a *vegetative storage protein*, induzida no tempo de 24 horas, e a *patatin*, identificada nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Este último gene também foi induzido na variedade susceptível, nos tempos de 6 e 24 horas. Estas

glicoproteínas são conhecidas por sua atividade de fosfolipases (Wittenbach, 1983), catalisando a hidrólise dos fosfolipídios que liberam ácidos graxos envolvidos em vários processos biológicos, incluindo o reparo da membrana plasmática, a transdução de sinais e o mecanismo de defesa em resposta à ferimentos mecânicos, herbívoros e também contra patógenos. As proteínas de armazenamento das plantas podem ser classificadas em *seed storage protein* (SSPs) e *vegetative storage protein* (VSPs). SSPs são proteínas que se acumulam nas sementes durante os estágios de seu desenvolvimento, sendo utilizadas como fonte nutritiva na plântula. Já as VSPs são proteínas que se acumulam em tecidos vegetativos, tais como, hipocótilos, folhas, flores, hastes e, dependendo da espécie, em tubérculos, podendo servir como um reservatório de aminoácidos para o uso em diferentes fases do crescimento e desenvolvimento. As proteínas VSPs estão relacionadas à adaptação da planta quando em condições de estresse (Noquet et al., 2001; Meuriot et al., 2004). De acordo com Reymond et al. (2000), as plantas induzem um grande número genes quando em presença de insetos herbívoros, respondendo assim, ao estresse do ferimento. Alguns destes genes induzidos participam da via octadecanóide de defesa, que culmina na biossíntese do jasmonato (JA). Howe et al. (1996) e McConn et al. (1997) relatam o JA como um componente chave da resistência da planta aos insetos, pois o ácido jasmônico é a substância que percebe a ferida e induz a expressão de genes de defesa. Berger (2002) relatou inibidores de protease (PIs) e VSP como proteínas reguladas após a síntese de JA nas plantas. Em soja, existem duas glicoproteínas vacuolares, *VSP α* e *VSP β* , que se acumulam nas folhas em níveis elevados após a remoção de ramos (Mason & Mullet, 1990). Segundo Creelman et al. (1992) um aumento nos níveis de JA e de MeJA é seguido de um acúmulo nos níveis de transcritos dos genes *vsp* em soja. Este mesmo autor relata que inibidores da lipoxigenase (LOX), uma enzima envolvida na biossíntese de JA, também inibe a produção de VSP. Em *Arabidopsis thaliana* há dois genes homólogos aos que codificam VSPs em soja, *vsp1* e *vsp2*, os quais também são induzidos por ácido

jasmonico (Benedetti et al., 1995) e ferimento mecânico (Utsugi et al. 1998), similar ao que ocorre com *VSPs* de soja. Segundo Staswick (1994), a indução de *VSPs* parece ser um mecanismo da adaptação ao estresse, promovendo um seqüestro de recursos da planta durante os períodos de herbivoria. Quando as circunstâncias se tornam favoráveis, *VSPs* assim como outros recursos tornam-se disponíveis para o crescimento e reprodução das plantas. Strauss & Agrawal (1999) relacionaram *VSPs* com o mecanismo indireto de defesa, sendo um provável constituinte da tolerância das plantas aos insetos herbívoros. No entanto, a função de defesa direta não pode ser excluída porque nenhum estudo da atividade antinutritiva das *VSPs* foram testadas. Estas *VSPs* também foram relatadas em alfafa, batata, chicória e em algumas leguminosas (Meyer et al., 1984; Ourry et al., 2001; Rossato et al., 2002).

Em relação aos genes da classe de metabolismo de nitrogênio, sulfato e fosfato, foi induzido no tempo de 6 horas o gene da proteína *DsPTP1*, e no tempo de 24 horas o gene da *MtN3*. A proteína *DsPTP1* também foi induzida na variedade susceptível, porém no tempo de 24 horas. Em *Arabidopsis*, esta proteína, *dual specificity protein phosphatase 1- DsPTP1*, é capaz de hidrolisar resíduos de fosfoserina/treonina e fosfotirosina dos substratos celulares (Yoo et al., 2004). Segundo estes autores esta proteína é Ca^{2+} dependente, pois o aumento nas concentrações de Ca^{2+} levou a um aumento na atividade bioquímica destas *DsPTP1*, indicando que a calmodulina pode diferencialmente regular a atividade das fosfatases, atuando na via de fosforilação e também na de defosforilação, dependendo do tipo de substrato. Neste trabalho, as *DsPTP1* podem estar envolvidas na via de degradação de proteínas, uma vez que houve um grande número de transcritos a partir do tempo de 6 horas. Sobre a proteína *MtN3*, também encontrada induzida na variedade susceptível no tempo de 0.5 hora, Asamizu et al. (2000) relataram a presença de *ESTs* desta proteína em plantas jovens da leguminosa *Lotus japonicus*. Segundo os autores, as seqüências expressas tinham grande similaridade com genes nódulo-específico de *Medicago truncatula* (Gamas et

al., 1996). Seki et al. (2002) reportaram que as proteínas *MtN3* foram induzidas quando plantas de *Arabidopsis* foram tratadas com ácido abscísico (ABA). Além das evidências de que o ABA está relacionado à salinidade e aos estresses hídrico e térmico (Birkenmeier & Ryan, 1998), este fitorregulador também pode estar envolvido na indução de NO^{3-} e PO_4^{3-} (Arteca, 1996; Oliveira et al., 2002). Análise de microarranjos de DNA, realizada por Vlieghe et al. (2003), indicaram que quando o metabolismo de nitrogênio é alterado em plantas transgênicas de *Arabidopsis*, a expressão de genes homólogos aos do nódulo de fixação de nitrogênio em *Medicago sativa* (*MtN3* e *nodulin*) também é alterada, apresentando uma relação direta com a assimilação de nitrogênio pela planta.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 8, observou-se que as classes gênicas de metabolismo de RNA, de estresse, de transporte, de transdução de sinal, de dinâmica celular e de metabolismo de DNA foram algumas das classes induzidas em todos os tempos do experimento.

4.3 Comparação Entre Variedade Susceptível e Tolerante

Para mensurar quão diferentes são as variedades susceptível (SP80-3280) e tolerante (SP81-3250) de cana-de-açúcar, foi realizado o estudo comparativo dos genes induzidos em resposta à herbivoria.

Em uma análise geral, foram descritas dezessete diferentes classes gênicas funcionais induzidas para estas variedades (Figura 27). De acordo com as classes descritas, pode-se constatar que a classe de genes desconhecidos representa cerca de 60% dos genes induzidos neste trabalho. Segundo Vettore et al. (2003), este grupo de genes (*unknown protein*, *hypothetical protein*, *putative protein* e *unable to classify*) contém 41,7% dos transcritos de cana-de-açúcar. Ainda de acordo com a base de dados de *SUCEST* (Vettore et al., 2003), as cinco classes mais expressas nas duas variedades foram: metabolismo de proteínas, resposta ao estresse, bioenergética, transdução de sinal e de dinâmica celular.

Foi realizado um processo de normalização das sondas para a seleção de genes induzidos nas duas variedades, no qual 522 clones foram selecionados por estarem presentes em ambas. Destes, 304 estavam induzidos na variedade susceptível e 296 na variedade tolerante. Observou-se que 192 clones estavam induzidos nas duas variedades (APÊNDICE 13), não necessariamente induzidos nos mesmos tempos de avaliação dos tratamentos.

Figura 27 – Diferentes classes gênicas para as duas variedades de cana. Este agrupamento foi realizado de acordo com o banco de dados do *SUCEST*, e estão representados da seguinte forma: ¹met. aa., ²crescimento/desenvolvimento, ³met. proteína, ⁴met. RNA, ⁵met. ²ário, ⁶proteína de armazenamento, ⁷estresse, ⁸transporte, ⁹ND, ¹⁰bioenergética, ¹¹transdução de sinal, ¹²dinâmica celular, ¹³met. DNA, ¹⁴met. lipídeos, ¹⁵elementos móveis, ¹⁶met. N, S e P, ¹⁷met. nucleotídeos

Figura 28 – Número de genes induzidos após o processo de normalização para as duas variedades de cana-de-açúcar

A Figura 28 representa os genes induzidos nas duas variedades. Dos 522 clones selecionados, 408 apresentaram indução gênica 2 vezes maiores ou menores (induzidos ou reprimidos) em relação ao log da razão entre valores de leitura dos tratamentos com lagarta e os valores de leitura obtidos nos tratamentos das plantas controle. Pôde-se notar que a maioria dos genes induzidos ocorre nas duas variedades (representados em azul na região de congruência dos círculos na Figura 28). O número apresentado na região em vermelho, da mesma figura, refere-se aos genes induzidos somente na variedade susceptível, enquanto o apresentado na região verde, somente os induzidos na variedade tolerante.

Quanto ao tempo de indução de genes responsivos à herbivoria, observou-se que no tempo de 6 horas um maior número de genes estavam induzidos para as duas variedades, 179 para a variedade susceptível e 255 na variedade tolerante. Como dito anteriormente, as lagartas de *D. saccharalis* iniciaram sua alimentação nas plantas de cana-de-açúcar depois de uma hora da montagem do experimento, apresentando alimentação contínua ao longo dos tempos de tratamento. Deste modo, os genes identificados no tempo de 6

horas são possíveis genes relacionados à defesa contra herbivoria. Estes dados estão de acordo com o reportado por Ryan (2000), o qual apresentou uma comparação relativa de classes gênicas induzidas ao longo do tempo e o diferencial de mRNAs codificadores de proteínas de defesa em plantas de tomate submetidas ao ferimento mecânico. Assim, o tempo de 6 horas foi analisado para o estudo de potenciais genes relacionados à resistência de plantas aos insetos. Devido à importância deste tempo, os genes inibidos nos tratamentos com lagarta também foram avaliados. Na variedade susceptível 241 genes estavam inibidos, enquanto na tolerante foram 293.

Os genes induzidos e inibidos das duas variedades foram classificados de acordo com o banco de dados do *SUCEST* e estão representados na Figura 29. Observa-se que o maior número de genes, para ambas variedades, apresenta função não determinada (ND). Nota-se que a variedade tolerante apresentou um maior número de genes envolvidos em dinâmica celular, podendo este ser um mecanismo genético para a resistência de plantas às pragas.

Figura 29 – Comparação entre número de genes e classes gênicas induzidas (+) ou reprimidas (-) nas variedades susceptível (SUS) e tolerante (TOL) no tempo de 6 horas de avaliação do experimento

A seguir, nas Tabelas 11 e 12, estão alguns genes induzidos nas variedades susceptível e tolerante respectivamente. Em relação aos genes induzidos, notou-se um maior número de genes das classes de metabolismo de proteínas, de metabolismo de RNA, de metabolismo secundário, de resposta ao estresse, de transporte, de dinâmica celular, de metabolismo de DNA, de elementos móveis e de metabolismo de nucleotídeos na variedade tolerante (Tabela 12), não existindo nenhuma classe sobressalente na variedade susceptível (Tabela 11).

Analisando os genes relacionados ao estresse encontrados induzidos na variedade tolerante (Tabela 12) podemos correlacionar com os dados de Cheong et al. (2002). Segundo trabalho realizado por este grupo, utilizando plantas de *Arabidopsis*, foi relatado que um grande número de genes responsivos ao ferimento mecânico codificam proteínas também envolvidas no mecanismo de defesa contra patógenos. Estes resultados também estão de acordo com os trabalhos de Arimura et al. (2000b) e Reymond et al. (2000), que utilizaram *ESTs* para a busca de genes responsivos à herbivoria em plantas de feijão e em *Arabidopsis* respectivamente. Segundo Lorenzo et al. (2003), alguns destes transcritos também são induzidos por aplicação exógena de etileno e jasmonato, corroborando os resultados aqui apresentados.

Tabela 11. Genes induzidos na variedade susceptível

Descrição	Longest	Log (Razão)			
		0.5 h	6 h	12 h	24 h
<i>Bioenergética</i>					
galactokinase GAL1	SCQGST3123F12	0,20	3,23	0,65	0,20
IN2-2 protein	SCACLR2014G02	0,20	3,47	-0,53	3,12
<i>Crescimento/Desenvolvimento</i>					
homeodomain transcription factor KNAT6	SCBGLR1100A10	0,45	-3,28	2,72	3,08
putative homeodomain protein	SCCCLR1C04A01	-0,18	3,45	0,12	-0,06
<i>Dinâmica Celular</i>					
cyclin D2.1 protein	SCSFST1064C07	0,41	1,12	-0,25	3,01
histone H2A.4	SCJLLR1105A01	0,25	3,27	-0,04	-1,20
myb-related protein 1	SCEQLR1094G05	0,18	-0,11	1,20	3,02
<i>Elementos Móveis</i>					
high mobility group I/Y-2	SCEQLR1094C08	0,48	2,71	0,34	-2,86
putative reverse transcriptase	SCQSST3115C01	2,78	2,43	-0,83	0,21
<i>Estresse</i>					
abrin-a	SCEZAD1078B05	0,09	-0,30	2,87	-0,38
acyltransferase homolog	SCCCLR2002D06	2,74	0,66	-0,41	2,54
Barwin, Basic Barley Seed Protein	SCBGRT1049B06	0,34	-2,73	2,82	0,32
DnaJ-like protein	SCJLLR1105F12	2,44	2,67	0,00	0,67
glutathione peroxidase	SCSGST1071C07	0,88	3,43	-0,56	-0,60
glutathione S-transferase GST 17	SCACLR1130D06	-1,25	3,20	0,21	1,15
metallothionein-like protein type 2	SCBGST3103A07	0,34	2,94	-2,56	1,58
MLA6 protein	SCACLR1126F06	0,08	0,28	0,57	3,12
peroxidase 4 precursor	SCBGST3106C01	3,17	-2,43	1,84	2,83
probable integral membrane protein	SCRFFL8037C01	0,75	2,58	0,16	0,27
putative aphid transmission factor	SCCCLR1C06A09	0,33	2,87	3,23	0,87
putative wound-induced protein	SCCCLR2C02A01	-0,13	2,70	-3,09	-0,48
receptor protein kinase	SCRLAD1140C02	0,35	2,65	0,93	-0,59
superoxide dismutase	SCQGLR1088H10	-0,03	-3,45	2,45	-2,66
<i>Metabolismo de aminoácidos</i>					
adenylsulfate kinase 1	SCBGST3108C02	0,81	-3,41	0,00	2,67
aspartame aminotransferase	SCSGLV1009G12	2,33	0,09	2,21	-0,59
EC 5.3.1.16	SCSFST3077F12	-0,60	2,48	2,13	0,64
phosphoserine aminotransferase	SCBGST3110G10	-0,13	3,60	0,43	0,87
<i>Metabolismo de Lipídeos</i>					
AMP-binding protein	SCVPST1063F10	0,20	1,88	3,23	2,91
HMG-CoA synthase	SCSBST3098E12	2,65	-2,22	3,07	0,41
Oxalyl-CoA decarboxylase	SCSBST3098C11	-0,22	2,76	-1,94	0,00
w-3 fatty acid desaturase	SCSFST3075A09	0,16	2,38	-0,90	-0,15
<i>Metabolismo de Nitrogênio, Enxofre e Fósforo</i>					
DsPTP1 protein	SCUTST3087E08	2,35	-0,11	0,26	3,01

Tabela 11. Genes induzidos na variedade susceptível

<i>Metabolismo de Proteína</i>					
AMP-binding protein	SCVPST1063F10	0,20	1,88	3,23	2,91
HMG-CoA synthase	SCSBST3098E12	2,65	-2,22	3,07	0,41
<i>Metabolismo de RNA</i>					
RNA-binding protein	SCCCST3001H10	0,04	3,58	2,29	3,23
putative transcription factor	SCSGST1069D04	2,53	0,38	3,41	0,83
<i>Metabolismo Secundário</i>					
flavonol 3-O-glucosyltransferase-like protein	SCJFST1048H08	2,77	0,00	0,34	-0,42
isoplavone reductase	SCSBST3096H07	0,51	0,90	2,49	1,91
putative UDP-glucose glucosyltransferase	SCUTLR2023E12	-0,85	2,80	1,97	0,00
<i>Não Determinados (ND)</i>					
ND	SCQSST3116C10	0,00	0,47	-0,48	3,30
ND	SCSGST1068C11	0,51	3,30	0,08	0,12
ND	SCCCST3004H05	-0,18	-0,26	2,73	3,28
ND	SCMCST1049B12	2,25	1,37	0,51	3,27
<i>Proteína de Armazenamento</i>					
patatin	SCQSST1040G01	-0,40	2,23	0,01	2,11
<i>Transdução de Sinal</i>					
transcription factor TINY	SCUTST3086B02	2,90	3,31	-0,09	-0,17
protein phosphatase 2A regulatory subunit B'	SCJFST1047C03	0,33	3,31	0,32	-0,87
calcium-dependent protein kinase	SCUTST3086B04	-0,01	3,16	-1,23	1,63
ARF2	SCBGLR1114G12	2,15	3,10	2,43	0,59
<i>Transporte</i>					
mitochondrial solute carrier protein	SCMCLR1125A10	-0,21	3,40	0,31	-0,18
PPR-repeat protein	SCCCLR1C01G12	0,36	3,14	-0,02	0,42

Tabela 12. Genes induzidos na variedade tolerante

Descrição	Longest	Log (Razão)			
		0.5 h	6 h	12 h	24 h
<i>Bioenergética</i>					
uncoupling protein mitochondrial	SCVPRZ3025F04	3,29	0,05	1,34	0,24
carbonate dehydratase	SCBGST3104F06	-0,22	-0,60	-0,15	3,26
putative anthocyanin 5-O-glucosyltransferase	SCSGLV1004A12	-0,94	-1,44	1,53	3,03
<i>Crescimento/Desenvolvimento</i>					
homeodomain transcription factor KNAT6	SCBGLR1100A10	0,07	-1,59	0,05	3,19
<i>Dinâmica Celular</i>					
probable transcription factor	SCCCFL5065C01	3,19	-0,24	1,98	-2,86
glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor	SCSFSB1102C09	0,69	0,25	3,18	0,46
chitinase	SCQGHR1013D01	0,10	0,47	0,08	3,08
<i>Elementos Móveis</i>					
putative gag/pol polyprotein	SCSGRT2061C02	3,14	2,81	0,00	0,96
retroelement pol polyprotein-like	SCVPST1063C05	-0,14	1,02	2,15	-2,83
<i>Estresse</i>					
putative phloem-specific lectin	SCACLR2007D05	0,10	-0,65	-0,16	3,48
pathogenesis-related protein	SCQGST3125F02	2,05	0,97	2,98	3,29
putative aphid transmission factor	SCCCLR1C06A09	-0,74	1,47	-1,35	3,17
polygalacturonase inhibitor	SCSGLV1007G11	3,16	0,10	-0,26	0,32
chitinase III C10150	SCJLRT1015B03	3,13	-0,88	2,53	0,59
disease resistance protein RPM1	SCUTST3130D10	-0,98	1,38	0,26	3,13
cysteine proteinase inhibitor	SCCCFL3003E06	3,11	-0,12	2,47	1,65
extensin homolog T9E8.80	SCSGST1068A02	-0,60	1,15	-0,09	3,11
drought-induced protein Di19	SCSGFL4189F01	0,34	0,62	2,77	0,84
putative wound-induced protein	SCCCLR2C02A01	0,70	-2,08	2,38	0,02
wound-induced protein	SCMCLR1122D11	-0,17	-2,06	-0,46	2,96
zinc finger protein	SCQGST3125E10	2,26	0,00	2,40	-0,62
heat shock protein 70	SCRFST1041E06	2,35	-0,58	2,64	2,97
peroxidase 4 precursor	SCBGST3106C01	0,47	1,58	2,40	0,97
metallothionein-like protein type 2	SCBGST3103A07	-0,78	0,50	-0,51	2,41
superoxide dismutase	SCQGLR1088H10	0,30	-0,26	2,04	-0,54
laccase	SCUTST3084C11	-3,21	2,99	0,30	2,78
Barwin, Basic Barley Seed Protein	SCRFRT3058D04	1,07	-0,25	2,02	0,74
disease resistance gene homolog 9N	SCMCST1052E09	-0,16	-0,30	2,05	2,39
MLA6 protein	SCCCST3002D02	-0,52	0,83	2,39	0,74
probable wound-induced protein	SCUTLR2008H11	2,17	0,92	-0,82	1,64
serine/threonine-specific receptor protein kinase	SCRFST1042D08	-0,30	1,37	2,17	-0,04
1,3-beta-glucanase PRm 6b	SCQGRT1042E04	1,06	-0,66	-0,27	2,70
germin-like protein 5	SCCCLR2C02D04	-2,05	-1,47	-3,25	2,66
<i>Metabolismo de Lipídeos</i>					
allene oxide synthase	SCVPAM2069B10	0,04	-2,40	2,01	-0,10
omega-6 fatty acid desaturase	SCRFST1044D02	-0,24	2,55	2,31	-2,60
putative phosphoserine aminotransferase	SCUTST3092C08	1,84	1,98	2,59	-3,42

Tabela 12. Genes induzidos na variedade tolerante

<i>Metabolismo Secundário</i>					
cinnamoyl-CoA reductase	SCSGST3118E05	3,47	0,26	0,21	-0,07
<i>Metabolismo de Proteína</i>					
putative 60S ribosomal protein L22	SCBGRT3075E02	3,30	0,31	1,72	-3,10
60S ribosomal protein L17	SCQGST3126E12	0,03	1,59	1,43	3,28
leucyl aminopeptidase - parsley	SCSGST1072B08	-0,89	0,01	-0,40	3,13
chaperonin; similar to GroEL protein	SCEZRT2020A03	3,12	-2,26	-0,89	0,00
heat shock protein hsp70	SCBGLR1118B05	1,36	0,77	-1,20	3,10
similar to translation initiation factor IF2	SCVPLR2012B03	3,00	-2,36	0,00	0,32
elongation factor Ts	SCJLLR1105G12	2,83	-2,79	1,59	0,14
probable carboxyl-terminal proteinase	SCJFST1047C06	2,98	-2,83	-1,02	3,36
<i>Metabolismo de RNA</i>					
putative U2 snRNP auxiliary factor	SCJLLR1108C11	-0,22	0,26	3,04	3,15
ND	SCCCLV1001H05	-2,96	0,77	0,29	3,13
MYB-related protein ZM1	SCSBST3093C10	2,46	2,16	2,52	3,06
RNA helicase	SCSGST1068F12	-0,88	2,55	1,76	-3,40
<i>Não Determinados (ND)</i>					
ND	SCRFAD1021H07	0,81	0,13	-2,94	3,71
ND	SCCCST3006H09	-0,93	0,03	-0,07	3,26
ND	SCCCLR1C03C06	-3,10	2,04	2,79	3,26
ND	SCSFLR2031A01	2,32	1,00	0,43	3,25
ND	SCCCST1C02D04	-0,96	3,05	-0,56	2,95
ND	SCRLLR1111C05	0,24	0,83	2,55	3,04
ND	SCACLR2022D07	2,13	3,04	2,29	2,48
ND	SCMCLR1122F09	-1,16	-0,70	2,10	3,00
<i>Proteína de Armazenamento</i>					
vegetative storage protein	SCJLFL1051A09	3,71	-0,76	0,59	-2,42
<i>Transdução de Sinal</i>					
serine/threonine kinases	SCCCLR2C01G05	-0,96	0,74	2,57	3,11
secreted glycoprotein 2	SCMCST1057G07	0,54	0,52	3,06	-2,78
lectin-like protein kinase-like	SCCCST1C06C01	-2,51	2,93	-0,05	-2,84
<i>Transporte</i>					
probable plasma membrane intrinsic protein	SCVPST1061H08	-0,20	-2,46	-2,71	3,28
putative calmodulin	SCAGLR2018B04	-0,72	2,80	2,51	3,08
sugar transporter protein	SCSGST3120A03	0,03	2,63	0,36	3,07
probable plasma membrane intrinsic protein	SCVPST1061H08	-0,20	-2,46	-2,71	3,28

Nas Tabelas 13 e 14 são apresentados alguns genes inibidos nas duas variedades. Na variedade susceptível (Tabela 13), quatro classes gênicas tiveram uma inibição significativa de seus genes, a saber: de dinâmica celular, de metabolismo de DNA, de metabolismo de lipídios e de elementos móveis. A única inibição significativa na variedade tolerante foi na classe de metabolismo de proteína. Um gene muito importante foi encontrado entre os genes inibidos na variedade tolerante, *auxin-induced protein*, agrupado na classe de crescimento e desenvolvimento da planta (Tabela 14). É sabido que a auxina regula o desenvolvimento da planta afetando a expressão de vários genes (Napier & Venis, 1995; Sitbon & Perrot-Rechenmann, 1997). Estes reguladores vegetais são importantes, pois ativam fatores de transcrição que participam de uma cascata de expressões gênicas (Abel et al., 1994; Kim et al., 1997). No entanto, a auxina exerce um efeito antagônico aos efeitos do ácido jasmônico (Creelman & Mullet, 1997; Rojo et al., 1998; Sasaki et al., 2001). Kernan & Thornburg (1989) reportaram a auxina como inibidor do gene *pin2* em plantas de tabaco. DeWald et al. (1994) mostraram que a auxina inibe a produção de metil-jasmonato e de *vegetative storage protein (VSP)* e que também inibe o gene da lipoxigenase em plantas de soja.

Tabela 13. Genes inibidos na variedade susceptível

Descrição	Longest	Log (Razão)				
		0.5 h	6 h	12 h	24 h	
<i>Bioenergética</i>						
peptidase alpha-II chain precursor	SCSGST3121A10	-0,34	-2,21	0,00	0,04	
nodulin	SCJLLR1106C06	0,05	-1,01	-0,37	-3,17	
putative anthocyanin 5-O-glucosyltransferase	SCSGLV1004A12	-1,50	0,00	2,73	-2,36	
glucanase; glucan endo-1,3-beta-glucosidase	SCSFAD1125E10	0,20	-0,44	-0,39	-3,12	
THA4	SCBGLR1119B11	0,70	-0,67	-2,40	-1,74	
light-harvesting complex protein	SCRLLR1131G03	-0,93	-0,42	-2,76	-2,47	
					-3,12	
<i>Crescimento/Desenvolvimento</i>						
homeodomain transcription factor KNAT6	SCBGLR1100A10	0,45	-3,28	2,72	3,08	
<i>Dinâmica Celular</i>						
myb factor protein	SUCASTE1	0,56	-3,43	-0,70	-0,79	
nucleoid DNA-binding protein cnd41-like protein	SCJLLR1107E12	-0,10	0,46	-2,20	0,77	
SP8 binding protein homolog	SCQGLB2042B04	0,37	-3,04	0,47	1,98	
tubulin beta-7 chain	SCQSST3114C01	-0,01	-0,55	-2,62	0,47	
myb-related transcription factor	SCBGST3108E12	0,24	2,90	0,34	-2,41	
alpha-expansin OsEXP7	SCJLLR1105G05	0,11	-0,42	-2,63	0,62	
MAP3K epsilon protein kinase	SCQGAM2028G06	0,45	-0,22	0,13	-2,51	
<i>Elementos Móveis</i>						
high mobility group I/Y-2	SCEQLR1094C08	0,48	2,71	0,34	-2,86	
putative gag-pol polyprotein	SCSBST3098H04	-0,07	-0,93	-0,49	-2,41	
putative reverse transcriptase	SCSFST3082E10	0,38	-2,65	0,64	-2,69	
<i>Estresse</i>						
putative wound-induced protein	SCCCLR2C02A01	-0,13	2,70	-3,09	-0,48	
wound-induced protein	SCMCLR1122D11	-2,58	-2,96	-1,57	-2,66	
peroxidase	SCSGSB1005A06	0,10	-0,28	-2,71	-1,42	
putative glutathione S-transferase OsGSTU4	SCCCL4015B02	1,48	0,42	-2,49	-0,13	
peroxidase 4 precursor	SCBGST3106C01	3,17	-2,43	1,84	2,83	
Metallothionein-like protein type 2	SCBGST3103A07	0,34	2,94	-2,56	1,58	
Superoxide dismutase	SCQGLR1088H10	-0,03	-3,45	2,45	-2,66	
pathogenesis related protein-1	SCEZLB1010C02	0,32	-0,60	-0,42	-2,70	
serine/threonine-specific receptor protein kinase	SCRFTST1042D08	-2,52	0,25	-0,99	-2,70	
whitefly-induced gp91-phox	SCEZHR1086B06	0,60	-1,34	-0,35	-2,60	
cysteine proteinase inhibitor	SCCFL3003E06	0,27	0,12	-0,01	-3,12	
Barwin, Basic Barley Seed Protein	SCBGRT1049B06	0,34	-2,73	2,82	0,32	
1,3-beta-glucanase PRm 6b	SCQGRT1042E04	0,30	0,14	-2,90	-3,06	
<i>Metabolismo Secundário</i>						
cinnamoyl-CoA reductase	SCQGLB1027G09	0,21	-0,91	-2,44	-0,20	
dihydrokaempferol 4-reductase A	SCJLRT1020E06	0,90	0,45	-2,55	-0,18	
<i>Metabolismo de Aminoácidos</i>						
Phosphoserine aminotransferase	SCAGLR2033C06	0,31	-2,64	-0,08	-2,82	
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor	SCSFST3076C11	0,61	-0,24	-2,61	-1,55	
acyl-CoA dehydrogenases	SCMCST1058D11	1,83	-0,78	-0,41	-3,70	

Tabela 13. Genes inibidos na variedade susceptível

<i>Metabolismo de DNA</i>					
Regulator of chromosome condensation-like protein	SCCCLR2001C02	0,07	2,21	0,00	-2,81
SSRP1 protein	SCBGST3108C09	0,61	-2,39	0,64	0,87
Peptide methionine sulfoxide reductase	SCAGLR2018F12	-0,77	-3,22	-0,19	2,71
histone H2A	SCJLLR1101A02	2,72	-3,40	-1,09	0,59
<i>Metabolismo de Lipídeos</i>					
lipase	SCUTLR2030E01	-0,14	-0,12	-0,61	-2,27
lysophospholipase-like protein	SCRFLR2038C11	-2,13	0,71	0,02	-2,56
HMG-CoA synthase	SCSBST3098E12	2,65	-2,22	3,07	0,41
lipxygenase	SCBGRT1053H02	0,62	-0,23	0,00	-3,06
phosphoinositide-specific phospholipase C	SCSBST3099D05	0,14	-2,34	1,05	0,29
acyl-CoA-binding protein	SCCCST3006H06	-0,31	0,35	-3,17	0,60
allene oxide synthase	SCJFRZ3C05G02	0,29	-0,10	-2,45	0,73
GDSL-motif lipase/hydrolase-like protein	SCSFLR2009E05	-0,81	0,90	-3,32	-0,36
lipase-like protein	SCCCLR2004B05	0,90	-2,88	2,61	2,83
<i>Metabolismo de Nitrogênio, Enxofre e Fosfato</i>					
MtN3	SCBGST3108B10	-0,18	2,73	-2,73	0,03
<i>Metabolismo de Nucleotídeos</i>					
Glycyl tRNA synthetase	SCMCST1056F08	0,12	-0,43	-2,26	2,69
ADP-ribosylation factor-like protein	SCMCLR1123E07	-0,33	-3,33	2,47	2,11
<i>Metabolismo de Proteína</i>					
cyclophilin-like protein	SCSGAD1009F02	0,84	-3,37	-2,46	0,36
translation initiation factor IF2	SCVPLR2012B03	0,59	1,38	-2,50	-0,21
ubiquitin protein	SCSFST1066F08	2,00	-2,65	0,00	-2,87
probable carboxyl-terminal proteinase	SCJFST1047C06	0,96	-0,20	-2,60	0,14
<i>Metabolismo de RNA</i>					
Small nuclear ribonucleoprotein G	SCBGLR1116D01	0,46	-2,75	-0,37	-0,58
RNA helicase	SCSGST1068F12	-0,65	-0,53	-2,59	-2,78
zinc finger protein	SCCCST3003D12	0,35	0,36	-2,17	-0,75
<i>Não Determinados (ND)</i>					
ND	SCAGLR2033C02	-2,41	1,71	2,51	-2,58
ND	SCCCLV1001E06	-0,41	-2,42	-0,77	0,06
ND	SCSFST1064H01	2,71	-3,30	-2,89	-1,30
ND	SCSFST1066C11	-0,56	3,35	-0,61	-3,25
<i>Transdução de Sinal</i>					
protein kinase-like protein	SCQSST3115B02	0,49	-2,91	-0,45	-0,13
receptor-protein kinase-like protein	SCSFLR2016D06	0,08	-0,03	-2,84	-0,32
probable serine/threonine-specific protein kinase	SCSGST1072H02	0,89	0,42	0,25	-3,12
calcium-dependent protein kinase 7	SCSBAD1126C01	0,39	-2,88	0,68	-0,81
calmodulin	SCJFLR2035A01	-2,28	0,00	-0,01	0,45
<i>Transporte</i>					
nonspecific lipid-transfer protein 1precursor	SCSGST3119G09	-0,04	-0,84	-0,45	-2,80
transport protein subunit-like	SCBGLR1114A02	-2,67	2,62	2,47	0,22
ferritin 1 precursor	SCEPAM1053E12	0,01	-0,07	0,49	-3,21

Tabela 14. Genes inibidos na variedade tolerante

Descrição	Longest	Log (Razão)			
		0.5 h	6 h	12 h	24 h
Bioenergética					
O-succinylhomoserine lyase	SCCCST3083E07	-1,33	1,42	-2,85	-0,49
high pI alpha-glucosidase	SCBGLR1120C02	-0,72	-2,44	-2,89	-0,47
seed starch branching enzyme	SCQSST3115G05	-0,48	0,25	-0,16	-2,04
Crescimento/Desenvolvimento					
auxin-induced protein	SCSGST3119D05	-0,95	1,64	-2,93	0,00
pectin acetylesterase	SCSGST1071E07	-2,97	-1,43	1,19	0,54
probable ethylene-response protein	SCAGAM2123E05	-0,12	-2,60	-0,86	0,83
ethylene receptor CS-ETR2	SCSGLV1006C01	-3,09	0,20	-0,74	0,01
Dinâmica Celular					
probable transcription factor	SCCCFL5065C01	3,19	-0,24	1,98	-2,86
proline-rich protein	SCSFST3073F10	-1,22	-0,52	-2,18	-0,07
pirin	SCCCLR2C02B09	-2,92	1,38	0,72	1,48
chitinase	SCCCRT3002H12	0,84	0,56	-2,01	2,33
ethylene-responsive transcriptional coactivator	SCCCLR2C02C02	-0,63	0,91	-2,21	0,00
Elementos Móveis					
putative reverse transcriptase	SCQSST3115C01	-0,32	-2,26	-0,46	-0,83
retroelement pol polyprotein-like	SCVPST1063C05	-0,14	1,02	2,15	-2,83
similar to putative reverse transcriptase	SCSFST3082E10	-0,62	1,02	-2,61	-0,67
Estresse					
putative wound-induced protein	SCCCLR2C02A01	0,70	-2,08	2,38	0,02
wound-induced protein	SCMCLR1122D11	-0,17	-2,06	-0,46	2,96
peroxidase	SCSGSB1005A06	1,11	-2,03	-0,02	0,43
putative glutathione S-transferase OsGSTU4	SCCCCL4015B02	-0,89	-2,21	0,00	-0,80
laccase	SCUTST3084C11	-3,21	2,99	0,30	2,78
MLA6 protein	SCACLR1126F06	1,85	0,00	0,09	-3,13
osmotin-like protein precursor	SCJFFL3C08E06	0,45	0,15	-2,32	-2,33
germin-like protein 5	SCCCLR2C02D04	-2,05	-1,47	-3,25	2,66
putative peroxidase P7X	SCCCAD1001C08	0,28	-2,67	0,40	-0,18
Metabolismo Secundário					
choline monooxygenase precursor	SCJFHR1030B02	0,28	0,39	2,71	-3,04
putative glucosyltransferase	SCCCST1C06B03	-0,78	0,33	-2,68	2,80
probable ferrochelataze	SCUTST3090H08	2,46	-2,00	-0,08	-0,02
Metabolismo de Aminoácidos					
probable tyrosine-tRNA ligase	SCCCLR1C01A11	-0,40	-3,16	0,85	-3,27
dihydroxy-acid dehydratase	SCACLR1132B04	-0,16	0,47	2,64	-2,85
cytosolic aldehyde dehydrogenase	SCCCLR1C06D07	-2,40	0,37	-2,79	0,13
GMP synthase	SCVPST1059H11	1,38	-2,04	-0,03	-1,96
Metabolismo de Lipídeos					
carnitine racemase like protein	SCAGLR2033B01	0,14	1,26	-2,72	0,31
allene oxide synthase	SCVPAM2069B10	0,04	-2,40	2,01	-0,10
lipase-like protein	SCCCLR2004B05	-0,16	-2,04	-2,06	-0,61

Tabela 14. Genes inibidos na variedade tolerante

<i>Metabolismo de Nitrogênio, Enxofre e Fosfato</i>					
DsPTP1 protein	SCUTST3087E08	-0,13	1,01	-2,46	0,06
<i>Metabolismo de Proteína</i>					
cyclophilin-like protein	SCSGAD1009F02	2,82	0,37	-0,45	-2,37
DnaJ protein, putative	SCACLR2022G09	-0,72	0,00	2,43	-2,90
probable heat shock protein EMB1	SCCCLR1C11A11	-0,22	0,37	2,72	-3,15
UDP-glucuronyltransferase-I	SCJFLR2035H01	-3,27	-1,60	-2,29	-0,13
polyubiquitin 5	SCCCST3001G10	-0,01	-3,08	-0,24	-0,02
40S ribosomal protein S12	SCEQLR1094F02	-0,28	0,59	-2,94	-0,32
elongation factor Ts	SCJLLR1105G12	2,83	-2,79	1,59	0,14
similar to translation initiation factor IF2	SCVPLR2012B03	3,00	-2,36	0,00	0,32
chaperonin; similar to GroEL protein	SCEZRT2020A03	3,12	-2,26	-0,89	0,00
splicing factor ATP-dependent RNA helicase	SCVPST1060G09	-0,44	1,33	-2,68	0,67
vesicle transport v-SNARE protein	SCUTLR2008D11	-0,59	0,00	0,48	-2,99
probable carboxyl-terminal proteinase	SCJFST1047C06	2,98	-2,83	-1,02	3,36
heat shock protein 17.2	SCCCLR1C06F08	-0,44	-2,12	0,33	-0,53
<i>Metabolismo de RNA</i>					
putative transcription factor	SCSGST1069D04	1,94	-1,90	-1,96	-3,28
RNA helicase	SCSGST1068F12	-0,88	2,55	1,76	-3,40
<i>Não Determinados (ND)</i>					
ND	SCSGST1068G03	-0,04	-2,03	-2,70	-0,13
ND	SCQGST3122E02	-0,60	0,00	-2,99	0,00
ND	SCJFLR2035E02	-2,50	1,13	-0,07	3,23
ND	SCJLLR2006A02	-0,94	1,27	-0,59	-2,71
ND	SCCCLR2003H06	-0,52	-2,12	-0,03	0,84
ND	SCQSST3114B03	-0,78	-2,48	-0,02	-2,86
ND	SCSFST3073A11	-0,36	-0,03	-2,29	1,91
ND	SCSGLV1009G06	-0,17	-2,29	-0,40	2,76
<i>Transdução de Sinal</i>					
AMP-activated protein kinase beta	SCCCLR1C01C11	-3,06	1,02	-0,80	0,25
protein kinase (PK)	SCRFLR2021H11	-0,97	-2,69	0,11	2,69
ring-box 1	SCBGLR1115D07	-0,41	1,86	2,30	-2,77
secreted glycoprotein 2	SCMCST1057G07	0,54	0,52	3,06	-2,78
lectin-like protein kinase-like	SCCCST1C06C01	-2,51	2,93	-0,05	-2,84
Sgt1	SCQSFL1129A07	0,05	0,07	-2,46	2,87
gigantea homologue	SCJFAD1014B07	0,06	-2,55	-1,00	0,64
<i>Transporte</i>					
mitochondrial energy transfer protein	SCBGST3105E03	-2,93	0,47	-0,10	0,67
putative peptide transporter	SCCCST1C02A04	-0,64	-0,65	-2,47	0,04
sodium proton exchanger Nhx1	SCJFLR2036G10	-0,03	-0,40	-0,18	-3,40

4.4 Alguns Genes de Interesse Induzidos em Resposta à Herbivoria

4.4.1 Sinais Sistêmicos

As plantas têm uma variedade de defesas químicas para se protegerem de seus inimigos naturais. A indução de respostas defensivas aos insetos pragas é ativada provavelmente por sinais liberados durante os primeiros estágios do ataque do herbívoro. Segundo Falco et al. (2001), estes sinais podem ser fragmentos de pectina derivados da parede celular, ácido jasmônico, ácido abscísico, potenciais elétricos, intermediários da via octadecanóide, ou outros sinais polipeptídicos da planta. De acordo com Ryan (2000), através destas substâncias as plantas podem impedir ou ter efeito deterrente sobre seus herbívoros. Outras respostas das plantas podem ser sinais temporários emitidos do local de ferimento, que atraem predadores naturais do inseto herbívoro, tais como vespas e ácaros (Karban & Baldwin, 1997).

Foram encontradas diversas *ESTs* de MAP quinases (*mitogen-activated protein kinases*), quinases dependentes de Ca^{2+} e fosfolipases induzidas nas duas variedades. Estas proteínas são envolvidas na ativação da via octadecanóide, associadas geralmente com ataques por herbívoros ou trauma físico similar (Falco et al., 2001).

O gene quinase glicogênio sintase 3 (*glycogen synthase kinase 3*, *GSK-3*) foi induzido na variedade susceptível no tempo de 0.5 hora (clone SCJFST1047H12). Segundo Jonak et al. (2000), alfalfa (*Medicago sativa* cv Europa) ferida mecanicamente apresenta indução deste gene *GSK-3*. De acordo com estes autores, os resultados aqui apresentados sugerem que o gene *GSK-3* pode ser induzido quando plantas de cana-de-açúcar são submetidas à herbivoria. Jonak et al. (2000) também detectaram que os transcritos deste gene são rapidamente acumulados após o ferimento. Assim, estes dados indicam que o gene *GSK-3* pode estar envolvido no mecanismo de

defesa nas plantas. Várias outras proteínas quinase também foram induzidas em cana-de-açúcar em resposta à *Diatraea saccharalis*.

A calmodulina foi induzida nos tratamentos T12 e T24 (clone SCJFLR2035H04). Segundo Bergey & Ryan (1999), plantas de tomate transgênicas, superexpressando o gene da pró-sistemina, apresentaram elevação dos níveis do mRNA e da proteína da calmodulina quando comparadas ao tipo-selvagem. Os níveis do mRNA e da proteína da calmodulina também foram altos nas folhas das plantas selvagens submetidas ao ferimento mecânico, ao tratamento com sistemina, metil-jasmonato ou ácido linolênico. Entretanto, estes autores encontraram uma indução de calmodulina 0.5 hora após o ferimento ou a aplicação dos tratamentos, observando o pico de indução no tempo de 1 hora após a montagem. O mesmo não foi observado neste trabalho, possivelmente porque as lagartas se alimentavam de forma contínua, e não em um tempo definido.

Representando as proteínas com atividade fosfolipídica, o gene da *vegetative storage protein* (VSP) foi induzido somente na variedade tolerante no tempo de 24 horas (clone SCRURZ3082B02). O clone SCQSST1040G01 codificador da proteína *patatin*, também conhecida por sua atividade de fosfolipase, foi identificado nos tempos de 6, 12 e 24 horas na variedade tolerante. Este gene também foi induzido na variedade susceptível, nos tempos de 6 e 24 horas.

A existência de vias de sinalização parece ser uma estratégia da planta para amplificar mecanismos de defesa em resposta ao ataque de insetos herbívoros. Dentro da classe de genes envolvidos na via octadecanóide, foram encontrados os genes da lipoxigenase (LOX) e do alene oxido sintase (AOS). Estas enzimas residem no cloroplasto onde eles participam na conversão de ácido linolênico a moléculas de ácido jasmônico, entre outras substâncias (Falco et al., 2001).

O gene da lipoxigenase (clone SCBGRT1053H02) foi induzido nas plantas da variedade susceptível. Este gene foi responsivo no tempo de 0.5 hora após a montagem do experimento, indicando uma resposta rápida de defesa da planta. O aumento dos níveis de lipoxigenase também foi detectado em plantas submetidas à herbivoria (Hildebrand, 1989), infecção por microorganismos (Keppler & Novacky, 1987; Koch et al., 1992; Fournier et al., 1993; Melan et al., 1993), estresse hídrico (Bell & Mullet, 1991), e danos mecânicos (Geerts et al., 1994; Saravitz e Siedow, 1995). Em soja (*Glycine max*) dois cDNAs contendo o gene da lipoxigenase (LOX) foram isolados. Estes clones representam os genes designados por LOX7 e LOX8. Em trabalho realizado por Saravitz & Siedow (1996) foi observado que a expressão destes genes era aumentada quando as folhas eram submetidas ao ferimento mecânico. Estes autores observaram que os níveis dos transcritos de ambos os genes eram detectados nas folhas feridas 8 horas após o ferimento. Somente a expressão de LOX7 indicou uma resposta sistêmica de defesa ao ferimento. Adicionalmente, eles observaram que a expressão elevada de LOX7 nas folhas feridas era transiente. Vinte e quatro horas após o ferimento, os transcritos de LOX7 já não eram mais detectáveis nas folhas. Ao contrário, os níveis dos transcritos de LOX8 elevavam nas folhas feridas após 8 a 72 horas de ferimento. Outro trabalho indicando a presença da lipoxigenase em ferimentos foi o de Heitz et al. (1997). Este grupo mostrou a expressão da lipoxigenase em plantas de tomate submetidas ao ferimento mecânico. Segundo estes autores, foram encontradas LOXC e LOXD. Os níveis de LOXD foram elevados após 30 a 50 minutos do ferimento, alcançando um máximo entre 1 e 2 horas. O mRNA de LOXC não foi detectado nas folhas após o ferimento. Raymond et al. (2000) encontraram o gene LOX2 envolvido na síntese ou no metabolismo dos membros da família dos jasmonatos, os quais foram induzidos nos primeiros estágios do mecanismo de defesa em plantas de *Arabidopsis* submetidas ao ferimento mecânico. Segundo Arimura et al. (2000a), a LOX também foi induzida em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) em resposta ao ácaro

Tetranicus urticae. Sasaki et al. (2001) relataram a indução da LOX em *Arabidopsis thaliana* como um gene potencialmente regulado por ácido jasmônico.

Uma outra proteína importante da via octadecanóide é a alene oxido sintase (AOS), que catalisa uma das etapas da biossíntese do ácido jasmônico a partir dos ácidos graxos livres. Esta proteína foi induzida nos tratamentos S24 (clone SCJFRZ3C05G02) e T12 (clone SCVPAM2069B10).

O clone SCSFHR1045B07 foi induzido na variedade susceptível nos tempos de 0.5 e 12 horas. O mesmo foi induzido na variedade tolerante, porém somente no tempo de 24 horas. Este clone codifica a proteína 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase. Na variedade tolerante outro clone, SCEZLR1009E06, também codificador desta proteína foi encontrado induzido nos tempos de 0.5 e 6 horas. Segundo Abeles et al. (1992), quando a ACC é oxidada pela enzima 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO), o etileno é obtido como produto final. De acordo com Kato et al. (2000), o fitorregulador etileno é produzido em resposta a vários tipos de estresses, tais como ferimentos, doenças, exposição à baixa temperatura ou à produtos químicos e estresse hídrico.

A fenilalanina amônia liase (*phenylalanina ammonia lyase*, PAL) foi induzida nas duas variedades. Foram encontradas nos tempos de S0.5 (clone SCQGSB1083E01), T0.5 e T24 (clone SCEZST3149F10). A PAL é uma enzima encontrada na fase inicial da síntese de compostos fenólicos, os quais são responsáveis pelas atividades antioxidantes das células (Larson, 1988). Segundo Martínez-Téllez & Lafuente (1997) a atividade da PAL foi aumentada em plantas de citrus submetidas ao estresse térmico, como também estudado por Lafuente et al. (2001). Esta enzima já foi igualmente relatada sendo induzida em plantas de *Arabidopsis* submetidas ao ferimento mecânico (Reymond et al., 2000), em mutantes de *Rhodotorula glutinis* A-97 submetidos à radiação gama (El-Batal et al., 2000), e em raízes de plantas de tomate submetidas à diferentes concentrações de nitrato (Wang et al., 2001). Segundo

Arimura et al. (2000a), a PAL também foi induzida em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) submetidas ao ácaro *Tetranychus urticae*.

Diversas moléculas foram relatadas sendo elicitoras de proteínas da defesa. Segundo Somerville et al. (2000), *thaumatin-like protein* tem como função sinalizar as células, desencadeando uma barreira protetora no local ferido que conduz o desenvolvimento de uma cascata de eventos que as mobiliza contra um possível ataque. Esta proteína foi encontrada induzida somente na variedade susceptível no tempo de 6 horas, representada pelo clone SCBFSD2035E07. Clones codificadores de substâncias antioxidantes também foram encontrados como sendo responsivos em cana-de-açúcar ao ferimento causado pela lagarta, tais como peroxidases, catalases e superóxido dismutase. No processo de desintoxicação celular, a ação combinada destes sistemas enzimáticos é importante para evitar danos oxidativos celulares, pois estas enzimas são capazes de remover ou neutralizar espécies de oxigênio reativas (ROS) no interior das células (Scandalios, 1993).

4.4.2 Proteínas de Defesa

De acordo com Ryan & Pearce (2001), uma acumulação rápida de inibidores pode ser observada não somente em folhas feridas mas também em folhas distantes não submetidas ao ferimento, indicando que um sinal (ou os sinais) liberado do local da ferida pode percorrer toda a planta. Estudando mecanismos de defesa em cana-de-açúcar contra a herbivoria, Falco et al. (2001) relataram que estes inibidores podem incluir inibidores de protease (PIs), inibidores de α -amilase, lecitinas, quitinases e polifenol oxidases (PPO). A seguir serão discutidos alguns dos genes induzidos neste trabalho.

Endopeptidases ou proteases são enzimas que clivam ligações internas dos peptídeos em sítios específicos, de acordo com o aminoácido que o compõe. Estes sítios podem ser do tipo serina, cisteína, proteases do ácido aspártico e metalloproteases. As proteases do tipo serina são as principais

enzimas digestivas encontradas quando o pH do lúmen do intestino médio do inseto é neutro ou alcalino, por exemplo em lepidópteros. As proteases do tipo cisteína e do ácido aspartico são encontradas em intestinos ácidos, como ocorrem nos coleópteros. Outras enzimas digestivas também estão presentes nos insetos, tais como amilases e lipases. Hemípteros não possuem proteases digestivas, assim sua fonte de nitrogênio é através da sucção de aminoácidos livres presentes no floema (Terra e Ferreira, 1994). No entanto, durante a evolução, plantas e insetos se adaptaram às novas condições ecológicas, fisiológicas e bioquímicas, a fim de diminuir os efeitos negativos desta interação (Mello e Silva-Filho, 2002). Como resultado, hoje encontramos plantas com mecanismos contra as proteases dos insetos, tais como o aumento da atividade de inibidores nos tecidos (Rakwal et al., 2001), a síntese de uma gama enorme de inibidores que possuem atividade contra várias enzimas (Christeller et al., 1998), a produção de inibidores bifuncionais que atuam contra amilases e proteases (Roy & Gupta, 2000), o aumento da complexidade dos inibidores com propriedades bioquímicas diferentes por meio da produção de isoinibidores (Tiffin & Gaut, 2001), a expressão de inibidores altamente específicos para as enzimas dos insetos (Falco et al., 2001) e a síntese de inibidores resistentes a proteólise e ativos sob várias condições de pH do trato digestivo de insetos (Christeller et al., 1998).

Representando a classe de proteínas anti-nutricionais, inibidores de protease do tipo cisteína (cistatinas) foram encontrados induzidos na variedade tolerante de cana-de-açúcar. Estes genes, representados pelos clones SCSGST3121C03 e SCCCFL3003E06, foram induzidos em três tempos dos experimentos. O primeiro clone foi induzido nos tempos de 6, 12 e 24 horas, já o segundo em 0.5, 12 e 24 horas. Nas plantas, as cistatinas são envolvidas na degradação das proteínas, exercendo um papel importante na resistência aos insetos. Estas cistatinas são distribuídas extensamente nas plantas e foram isoladas de arroz (Abe et al., 1987a,b), milho (Abe et al., 1992), e soja (Hines et al., 1991).

Inibidores de proteases do tipo quimotripsina foram induzidos na variedade susceptível nos tempos de 0.5, 6 e 24 horas, representado pelo clone SCSBRT3040B04. Inibidores de proteases do tipo quimotripsina induzidos por ferimento ou herbivoria pertencem à família dos inibidores Bowman-Birk (IBB) e foram isolados e caracterizados em milho (Rohrmeier & Lehle, 1993), alfafa (McGurl et al., 1995) e arroz (Rakwal et al., 2001). Recentemente foi reportado que a uma classe de inibidores de serino-proteases do tipo Bowman-Birk, composta por 7 isoformas, foi expressa em praticamente todos os tecidos da cana-de-açúcar (Mello et al., 2003). O significado fisiológico dos IBB está associado com suas três principais funções nas plantas: regulação das proteases endógenas, reserva de aminoácidos sulfurados e defesa contra o ataque de patógenos e insetos. No último caso, os IBB parecem atuar inibindo a atividade proteolítica das enzimas digestivas dos insetos, interferindo em seu desenvolvimento e reprodução (Tanaka et al., 1996; Pompermayer et al., 2001; Tiffin & Gaut, 2001; Pompermayer et al., 2003). Somente alguns estudos mostraram o uso potencial dos inibidores de protease do tipo serina (IBB) no controle de pragas (Gatehouse & Boulter, 1983; Leplé et al., 1995; Falco & Silva-Filho, 2003). Embora as atividades dos inibidores de protease do tipo serina sejam bem caracterizadas, o papel dos inibidores do tipo Bowman-Birk não foram totalmente elucidados (Pernas et al., 2000).

Outro inibidor que também atua no processo digestivo do inseto é a α -amilase, inibindo a digestão de carboidratos. O gene codificador deste inibidor foi induzido na variedade susceptível no tempo de 6 horas (clone SCEPCL6025G08). A atividade do inibidor da α -amilase é específica para amilases dos animais (incluindo os insetos) e dos microrganismos, sendo rara a sua atividade com carboidratos da planta. Considerável variabilidade é encontrada no sítio ativo destes inibidores. Assim, os inibidores de α -amilase são parte do mecanismo químico protetor das plantas (Ryan, 1990). Os inibidores de α -amilase do trigo são potentes inibidores de diversos insetos, incluindo *Tenebrio*, *Tribolium*, *Sitophilus* e *Oryzaephilus*. A propriedade

inseticida dos inibidores de α -amilase tem sido explorada em plantas transgênicas. Morton et al. (2000) utilizaram plantas de ervilha (*Pisum sativum*) transformadas com gene inibidor de α -amilase de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e observaram que a expressão deste gene, em sementes e em plantas de ervilhas sob condições de campo, pode inibir o inseto *Bruchus pisorum*, praga desta planta. De acordo com estes autores, as plantas transgênicas atrasaram o desenvolvimento larval do inseto, resultando em uma alta taxa de mortalidade nos primeiros estágios larvais.

O gene que codifica proteína inibidora da poligalacturonase foi identificado nos tratamentos T0.5 (clone SCSGLV1007G11S6), T6 (clone SCSGLV1007G11) e S6 (clone SCQGHR1012F03). Poligalacturonases são enzimas produzidas pelos insetos que rompem a pectina da parede celular nas plantas. No entanto, proteínas inibidoras de poligalacturonase (PIPG) são eficazes à prevenção por infecção por fungos e não é sabida a atuação destas proteínas em resposta ao ataque dos insetos (Abu-Goukh & Labavitch, 1983). A razão para a falta do conhecimento da atividade destas proteínas em insetos é porque poucas pesquisas foram conduzidas na busca destas enzimas em insetos. Trabalhando com *Diaprepes abbreviatus*, uma praga do citrus na Flórida, Doostdar et al. (2002) identificaram poligalacturonases no inseto e mostrou que estas podem ser inibidas por PIPG isoladas de cascas de uva.

Quitinases e endoquitinases também foram encontradas induzidas em cana-de-açúcar. As quitinase da classe III foram induzidas nos seguintes tratamentos: S0.5 (clone SCJLRT1015B03), S6 (clone SCSBRT3039E08), T0.5 (clone SCMCS1059D07), T6 (clone SCSBRT3039E08) e T24 (clone SCSBRT3039E08). Quitinases da classe V estavam presentes somente na variedade tolerante, no tempo de 24 horas (clone SCCCFL5057C01). O precursor das endoquitinases A2 foi encontrado somente nas plantas susceptíveis, nos tempos de 0.5 (clone SCSGLV1013A05) e 6 horas (clone SCJLLB2076C12). Broglie & Broglie (1993) descreveram estas enzimas como barreiras de proteção contra ataque de patógenos. Segundo Grison et al.

(1996), plantas transgênicas com a expressão constitutiva de quitinases mostraram níveis realçados de resistência à infecção contra os fungos *Cylindrosporium concentricum*, *Phoma lingam* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Embora estudado principalmente por suas propriedades anti-fúngicas, as quitinases estão interessando também como um agente de defesa contra os insetos, particularmente insetos da ordem Hemíptera (Gatehouse & Gatehouse, 1998). Nos insetos, a quitina está presente não somente como constituinte do exoesqueleto, mas também na membrana peritrófica, permitindo supor o efeito das quitinases na digestão do inseto (Jouanin et al., 1998). Plantas transgênicas de batata contendo o gene codificador da quitinase do feijão foram resistentes aos afídios *Aulacorthum solani* (Gatehouse & Gatehouse, 1998). A expressão de quitinases de insetos em plantas transgênicas causou danos severos ao besouro *Oryzaephilus mercator* (Wang et al., 1996). Endoquitinases foram descritas por Arimura et al. (2000a) como induzidas em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) em resposta ao ácaro *Tetranychus urticae* e quitinases foram relatadas como envolvidas no mecanismo de defesa em plantas de *Arabidopsis* submetidas ao ferimento mecânico (Reymond et al., 2000) e em plantas de arroz submetidas ao fungo *Pyricularia grisea* (Xiong et al., 2001).

Polifenol oxidase (PPO) foi também um gene induzido somente na variedade tolerante. Representado pelo clone SCEPAM1051D07, este gene foi induzido nos tempos de 0.5, 12 e 24 horas. O papel das PPOs no mecanismo de defesa das plantas em resposta aos insetos foi proposto e documentado por Felton et al. (1989). Durante o ferimento (raspagem ou corte) das plantas pelos insetos que estão se alimentando, misturas de PPO e compostos fenólicos geram substâncias altamente reativas que podem modificar covalentemente os aminoácidos livres dentro do aparelho digestivo dos insetos. Uma vez modificados, estes aminoácidos tornam-se alquilados e não podem ser assimilados eficientemente, reduzindo assim, o valor nutritivo das proteínas ingeridas (Felton et al., 1992). Este efeito anti-nutritivo das PPOs foi observado

em tomate, onde a indução de PPO ocorreu concomitantemente com outras proteínas sabidas de defesa (Constabel et al., 1995; Bergey et al., 1996).

Entre os genes de interesse induzidos em resposta à herbivoria, não houve diferença quanto aos sinais sistêmicos presentes nas duas variedades. Entretanto, em relação às proteínas de defesa, a variedade tolerante mostrou ser mais responsiva.

Uma outra observação importante desta avaliação em larga escala da resposta de plantas de cana-de-açúcar à *Diatraea saccharalis* é que na variedade tolerante o ataque da broca da cana mostrou um significativo aumento na expressão de genes no estádios iniciais da herbivoria, notadamente após 6 hs. Esta observação abre novas perspectivas no entendimento dos mecanismos genéticos que controlam a resistência de plantas às pragas. Caso estes dados sejam confirmados a partir de uma segunda análise do experimento, pode-se supor que um dos aspectos determinantes da resistência de uma planta ao ataque de uma praga seja mediado pela rapidez na ativação ou repressão de genes envolvidos no processo de defesa. Contudo, como comentado anteriormente, é necessário analisar estes dados não de forma absoluta, mas estudos complementares deverão ser realizados para permitir uma interpretação mais sólida do trabalho. Neste sentido, técnicas de análise de expressão gênica fornecerão subsídios importantes para um melhor entendimento sobre o modo das respostas de defesas das plantas de cana-de-açúcar à *Diatraea saccharalis* e sua relação com os aspectos levantados de mecanismos genéticos de tolerância e resistência.

5 CONCLUSÕES

- * A técnica de macroarranjos de colônias bacterianas é uma alternativa robusta e pouco dispendiosa para análise em larga escala da expressão gênica.
- * Macroarranjos de colônias bacterianas crescidas por 6 horas mostraram uma melhor uniformidade entre os clones, apresentando também um baixo valor de resíduo de fundo e ausência de interação entre clone e membrana.
- * A análise da expressão gênica em cana-de-açúcar, em resposta à indução pela herbivoria causada pela lagarta *Diatraea saccharalis*, apontou 246 genes identificados na variedade susceptível (SP80-3280), enquanto 334 foram identificados na variedade tolerante (SP81-3250).
- * Para ambas variedades, a classe gênica menos representativa foi a de proteínas de armazenamento e a mais representada foi a de resposta ao estresse.
- * Aproximadamente 50% dos genes responsivos a herbivoria foram comuns às variedades tolerantes e susceptíveis.
- * Nas duas variedades o tempo de 6 horas de avaliação do experimento apresentou um maior número de genes responsivos a herbivoria.

- * A variedade tolerante apresentou tanto o maior número de genes induzidos como também o maior em genes reprimidos, notadamente nas etapas iniciais de exposição à lagarta, podendo ser este um mecanismo genético associado à resistência de plantas às pragas.

ANEXOS

ANEXO A – PLACA SCGD

A01:SCSGAD1005F12	B18:SCRLST3165D07	D11:SCEPRT2045F01
A02:SCJLFL4100E03	B19:SCVPRT3086E09	D12:SCCCSD1C02F09
A03:SCQSAD1057B12	B20:SCJFAD1013H07	D13:SCMCRT2087A08
A04:SCEQFL5050C02	B21:SCBFRZ2017H07	D14:SCJFST1047B01
A05:SCRUAD1131F04	B22:SCSGAD1009A05	D15:SCCCRT3005B09
A06:SCCCFL5057C01	B23:SCEZRZ3051H10	D16:SCSBST3095E04
A07:SCEPAM1015D03	B24:SCUTAD1030E06	D17:SCEQRT3018B04
A08:SCAGFL8013D06	C01:SCSGAD1009F02	D18:SCCCST3C10E07
A09:SCBFAM2021B05	C02:SCJLFL4100D06	D19:SCBFRT3094E10
A10:SCRFHR1009A01	C03:SCQSAD1056G10	D20:SCEQAD1016D03
A11:SCRFAM2074G07	C04:SCRFFL5034F09	D21:SCVPRZ2036B05
A12:SCSBHR1052C05	C05:SCSFAD1125E10	D22:SCJFAD1014B07
A13:SCSGAM2106H05	C06:SCEZFL5086F01	D23:SCEPRZ3046D07
A14:SCVPLB1020A09	C07:SCEPAM1023F09	D24:SCEQAD1016E12
A15:SCCCCL4015B02	C08:SCRFFL8037C01	E01:SCUTAD1031C08
A16:SCCCLB2003F07	C09:SCQGAM2026D02	E02:SCSGFL4189F01
A17:SCMCCL6058E02	C10:SCJFHR1033F03	E03:SCRUAD1063E10
A18:SCPRLB2028D06	C11:SCVPAM2067B04	E04:SCEQFL5044A03
A19:SCUTFL1059C04	C12:SCEZHR1086B06	E05:SCSFAD1123E10
A20:SCBFLR1005D10	C13:SCRFAM2127F03	E06:SCSGFL5C04B02
A21:SCRLFL3004B10	C14:SCVPHR1095C03	E07:SCEPAM1051D07
A22:SCRFLR1055H03	C15:SCCCCL6001A04	E08:SCMCFL8030G03
A23:SCRUFL3068B02	C16:SCRULB1061C02	E09:SCBFAM2021D01
A24:SCACLR2007D05	C17:SCSGCL6072G02	E10:SCQSHR1021D08
B01:SCCCNR1004D08	C18:SCRLLB2033G11	E11:SCVPAM2069B10
B02:SCUTRZ3105B04	C19:SCJLFL1051A09	E12:SCEZHR1087E06
B03:SCJLRT1014F02	C20:SCEZLR1031G08	E13:SCRFAM2131A09
B04:SCBGSB1029A08	C21:SCCCFL3001G02	E14:SCEZLB1010C02
B05:SCQGRT1038F01	C22:SCJLLR1107G02	E15:SCACCL6010A10
B06:SCQGSB1083E01	C23:SCCCFL4002C10	E16:SCCCLB2008H02
B07:SCBFRT1068F03	C24:SCQGLR2025E03	E17:SCVPCL6064B05
B08:SCEPSB1135A06	D01:SCJFRT1005D06	E18:SCVPLB2086E09
B09:SCQSRT2033F06	D02:SCSBRZ3124H08	E19:SCVPFL1068G07
B10:SCQGSD1044D07	D03:SCEQRT1025H04	E20:SCUTLR1037C05
B11:SCAGRT2040B07	D04:SCACSB1035C04	E21:SCCCFL3003E06
B12:SCCCSD1093E04	D05:SCQGRT1042E04	E22:SCQGLR1088H10
B13:SCVPRT2081C04	D06:SCRUSB1078A12	E23:SCRLFL4004C05
B14:SCJLST1021G01	D07:SCBGRT1052A04	E24:SCJFLR2035H04
B15:SCCCRT3002H12	D08:SCEPSB1128C08	F01:SCJLRT1020E06
B16:SCSFST3074C01	D09:SCQSRT2033F09	F02:SCRLRZ3116E01
B17:SCPRRT3026B03	D10:SCUTSD1028D09	F03:SCQGRT1039E01

F04:SCBFSB1045E10	H01:SCEQRT1026E05	I22:SCBGLR1112G01
F05:SCBGRT1055E08	H02:SCSBRZ3125A10	I23:SCBGFL4055B08
F06:SCSBSB1095G08	H03:SCBGRT1046F02	I24:SCCCLR2C02D04
F07:SCBFRT1070B04	H04:SCSFSB1072C07	J01:SCJLRT1015D05
F08:SCACSB1125B12	H05:SCBGRT1049H04	J02:SCSGSB1005H05
F09:SCEQRT2026D05	H06:SCSFSB1102C09	J03:SCQGRT1041A06
F10:SCRFSD1023G05	H07:SCRURT2014D11	J04:SCUTSB1073D09
F11:SCAGRT2042A09	H08:SCQGSB1141E04	J05:SCBFRT1068D06
F12:SCEQSD1077F10	H09:SCAGRT2039D08	J06:SCMCSB1108C01
F13:SCMCRT2088A04	H10:SCBGSD1052D05	J07:SCRURT2011C12
F14:SCMCST1052A06	H11:SCSGRT2061C02	J08:SCQGSB1141F03
F15:SCCCRT3003E05	H12:SCBFSD2038B09	J09:SCJFRT2055F06
F16:SCBGST3104D08	H13:SCEQRT2101D05	J10:SCMCSD1059D07
F17:SCRFRT3058D04	H14:SCRFST1044F03	J11:SCSGRT2062D07
F18:SCCCST3C02H02	H15:SCSBRT3039E08	J12:SCBFSD2035E07
F19:SCEPRZ1011G10	H16:SCUTST3129E03	J13:SCMCRT2104C02
F20:SCACAD1038A11	H17:SCBGRT3075E02	J14:SCMCST1050B09
F21:SCVPRZ3025A03	H18:SCJFAD1013E04	J15:SCSBRT3038F01
F22:SCBGAD1025D02	H19:SCCCRZ2003A03	J16:SCEZST3147G12
F23:SCRURZ3082B02	H20:SCJFAD1010F07	J17:SCRURT3061H09
F22:SCJFAD1010C06	H21:SCVPRZ3027C09	J18:SCCAD1004H02
G01:SCUTAD1034C12	H22:SCCCAD1001C08	J19:SCJLRZ1020H06
G02:SCCCFL5003F09	H23:SCUTRZ3070E07	J20:SCSGAD1006A11
G03:SCRUAD1063C06	H24:SCACAD1038C10	J21:SCVPRZ3025F04
G04:SCEQFL5044F03	I01:SCACAD1038F12	J22:SCSGAD1009D03
G05:SCSBAD1126C01	I02:SCSGFL4196D02	J23:SCJLRZ3074D04
G06:SCEZFL5090G08	I03:SCEZAD1078B05	J24:SCRFAD1021H07
G07:SCEPAM1053E12	I04:SCRFFL5043A01	K01:SCUTAD1034A10
G08:SCQGHR1013D01	I05:SCRLAM1007D07	K02:SCMCFL5007C04
G09:SCQGAM2028G06	I06:SCEZFL5085C06	K03:SCBFAD1096D10
G10:SCJFHR1030B02	I07:SCJLAM1062A07	K04:SCEQFL5052B07
G11:SCQSAM2101D03	I08:SCQGHR1012F03	K05:SCJFAD1C11C05
G12:SCEZHR1087H12	I09:SCRLAM2052C05	K06:SCQGFL8015B01
G13:SCCCCL3120B10	I10:SCSFHR1045B07	K07:SCVPAM1058F05
G14:SCEPLB1044E11	I11:SCJLAM2092B09	K08:SCAGHR1016A10
G15:SCAGCL6016E06	I12:SCSGHR1072F02	K09:SCEZAM2035B12
G16:SCBGLB2015H05	I13:SCCCCL3120D10	K10:SCSBHR1056B11
G17:SCCCCL6C06G06	I14:SCQGLB1027G09	K11:SCSGAM2103C03
G18:SCBFLB2092E08	I15:SCAGCL6016G06	K12:SCVPHR1090F01
G19:SCRUFL1114A12	I16:SCEQLB2016C06	K13:SCCCCL3001F02
G20:SCBFLR1039C08	I17:SCSFCL6066C07	K14:SCQGLB1029A12
G21:SCJLFL3015D09	I18:SCBGLB2074B05	K15:SCACCL6007C04
G22:SCACLR1127G10	I19:SCRUFL1116F03	K16:SCPILB2024H06
G23:SCJFFL3C08E06	I20:SCEZLR1031F04	K17:SCCCCL7C02B09
G24:SCSGLV1007G11	I21:SCAGFL3025A11	K18:SCJLLB2076C12

K19:SCQSFL1129A07
K20:SCEQLR1029B05
K21:SCQSFL3034B10
K22:SCUTLR2008H11
K23:SCRLFL4058B01
K24:SCSGLV1013A05
L01:SCJLRT1015B03
L02:SCJFRZ3C05G02
L03:SCQSRT1036G11
L04:SCSFSB1069D05
L05:SCBGRT1052C01
L06:SCSFSB1103F10
L07:SCCCRT2004A03
L08:SCACSD1016E07
L09:SCJFRT2056F05
L10:SCEPSD1071B01
L11:SCVPRT2084E10
L12:SCMCSD2059H09
L13:SCCCRT3006D09
L14:SCQSST1040F12
L15:SCSBRT3040B04
L16:SCEZST3149F10
L17:SCQSRT3054H12
L18:SCSGAD1005A10
L19:SCJFRZ2033D06
L20:SCJFAD1012A08
L21:SCEQRZ3020B12
L22:SCRFAD1021G08
L23:SCSGRZ3063E01
L24:SCCCAD1003G06
M01:SCUTAD1030D06
M02:SCVPFL4C09C05
M03:SCRLAD1100F12
M04:SCCCFL5060B07
M05:SCRLAD1140C02
M06:SCQGFL8014C11
M07:SCJFAM1067F05
M08:SCRFHR1009D09
M09:SCEZAM2061C09
M10:SCSBHR1051H04
M11:SCAGAM2123E05
M12:SCVPHR1094E03

M13:SCCCCL3002E11
M14:SCQSLB1050B07
M15:SCEPCL6025G08
M16:SCQGLB2041B08
M17:SCRLFL1009B11
M18:SCMCLB2081C01
M19:SCQSFL1121G10
M20:SCRLLR1059G03
M21:SCQGFL3057F08
M22:SCVPLR2012F05
M23:SCRLFL4059G09
M24:SCQGLV1015E10
N01:SCJLRT1016G06
N02:SCSGSB1005A06
N03:SCBGRT1046D11
N04:SCEZSB1090H09
N05:SCBGRT1049B06
N06:SCSFSB1102B07
N07:SCQSRT2033C12
N08:SCCCSD1001D05
N09:SCEPRT2045C03
N10:SCSBSD1057C05
N11:SCEQRT2095B10
N12:SCEPSD2070C10
N13:SCCCRT2C02A08
N14:SCVPST1060H12
N15:SCRLRT3034F06
N16:SCUTST3152C01
N17:SCJFRZ1005D12
N18:SCBGAD1027E01
N19:SCJFRZ2015B03
N20:SCBGAD1028G08
N21:SCACRZ3033H01
N22:SCSGAD1005F12
N23:SCEQRZ3093G04
N24:SCJFAD1014E03
O01:SCBFAD1048D03
O02:SCACFL5028C04
O03:SCRLAD1100A11
O04:SCCCFL5065C01
O05:SCSGAD1144B06
O06:SCAGFL8012D03

O07:SCCCAM2002D04
O08:SCRFHR1005C09
O09:SCSGAM2079B12
O10:SCBGHR1057E05
O11:SCAGAM2122B09
O12:SCRUHR1077B04
O13:SCCCCL4010E02
O14:SCACLB1048C02
O15:SCMCCL6060H03
O16:SCQGLB2042B04
O17:SCJLFL1053G11
O18:SCEZLR1009E06
O19:SCBFFL1142C04
O20:SCEPLR1051B08
O21:SCQGFL3053E04
O22:SCUTLR2008F06
O23:SCQGFL4076B03
O24:SCCCRT1001G12
P01:SCEQRT1024F02
P02:SCRFBS1021F11
P03:SCQSRT1037H06
P04:SCEZSB1093B12
P05:SCBGRT1053H02
P06:SCACSB1120C03
P07:SCEZRT2020A03
P08:SCEPSD1005E12
P09:SCEPRT2044B07
P10:SCEZSD1080B02
P11:SCEQRT2096B12
P12:SCCCST1006B08
P13:SCCCRT3002G10
P14:SCSBST3096E03
P15:SCQGRT3045E08
P16:SCCCST3144E06
P17:SCEQRT3C01C05
P18:SCSGAD1008B04
P19:SCJFRZ2030D03
P20:SCJFAD1012F11
P21:SCEZRZ3050E02
P22:SCJFAD1011A09
P23:SCEZRZ3098B06
P24:SCBGAD1026F02

ANEXO B – PLACA SCUG 065

A01:SCQGLR1087F08	B17:SCJLLR1104E04	D09:SCJLLR1102H01
A02:SCEQLR1094D08	B18:SCRLLR1109F07	D10:SCJLLR1107H12
A03:SCQGLR1088C08	B19:SCJLLR1104G10	D11:SCJLLR1103D09
A04:SCEQLR1094H01	B20:SCRLLR1109H06	D12:SCJLLR1108D06
A05:SCQSLR1089A04	B21:SCJLLR1105C12	D13:SCJLLR1103G12
A06:SCBGLR1095E02	B22:SCRLLR1110C03	D14:SCJLLR1108H09
A07:SCQSLR1089F02	B23:SCJLLR1105G12	D15:SCJLLR1104B07
A08:SCBGLR1095G11	B24:SCRLLR1110G08	D16:SCRLLR1109C12
A09:SCQSLR1089H11	C01:SCQGLR1087F12	D17:SCJLLR1104E05
A10:SCBGLR1096C06	C02:SCEQLR1094E06	D18:SCRLLR1109F09
A11:SCQSLR1090H11	C03:SCQGLR1088C10	D19:SCJLLR1104H01
A12:SCBGLR1097A01	C04:SCEQLR1094H08	D20:SCRLLR1109H08
A13:SCEQLR1091D06	C05:SCQSLR1089A05	D21:SCJLLR1105F01
A14:SCBGLR1097E04	C06:SCBGLR1095E08	D22:SCRLLR1110D03
A15:SCEQLR1091G10	C07:SCQSLR1089F09	D23:SCJLLR1105H03
A16:SCBGLR1097G12	C08:SCBGLR1095H05	D24:SCRLLR1111A01
A17:SCEQLR1092A11	C09:SCQSLR1090A07	E01:SCQGLR1087G09
A18:SCBGLR1098G06	C10:SCBGLR1096C11	E02:SCEQLR1094F02
A19:SCEQLR1092H02	C11:SCEQLR1091B02	E03:SCQGLR1088D01
A20:SCBGLR1099C01	C12:SCBGLR1097A04	E04:SCBGLR1095A03
A21:SCEQLR1093D03	C13:SCEQLR1091D10	E05:SCQSLR1089B07
A22:SCBGLR1099G07	C14:SCBGLR1097E05	E06:SCBGLR1095E10
A23:SCEQLR1093H01	C15:SCEQLR1091H01	E07:SCQSLR1089F10
A24:SCBGLR1100D06	C16:SCBGLR1097H10	E08:SCBGLR1095H08
B01:SCBGLR1100H06	C17:SCEQLR1092B01	E09:SCQSLR1090D08
B02:SCJLLR1106B10	C18:SCBGLR1098G11	E10:SCBGLR1096C12
B03:SCJLLR1101D12	C19:SCEQLR1093A01	E11:SCEQLR1091C03
B04:SCJLLR1106F01	C20:SCBGLR1099C04	E12:SCBGLR1097A09
B05:SCJLLR1101G12	C21:SCEQLR1093D07	E13:SCEQLR1091D12
B06:SCJLLR1107B12	C22:SCBGLR1100A04	E14:SCBGLR1097E06
B07:SCJLLR1102D06	C23:SCEQLR1093H08	E15:SCEQLR1091H03
B08:SCJLLR1107F04	C24:SCBGLR1100D12	E16:SCBGLR1098A11
B09:SCJLLR1102G08	D01:SCJLLR1101A01	E17:SCEQLR1092B03
B10:SCJLLR1107H04	D02:SCJLLR1106C06	E18:SCBGLR1098G12
B11:SCJLLR1103D06	D03:SCJLLR1101E03	E19:SCEQLR1093A03
B12:SCJLLR1108C11	D04:SCJLLR1106G01	E20:SCBGLR1099D01
B13:SCJLLR1103G06	D05:SCJLLR1102A03	E21:SCEQLR1093E02
B14:SCJLLR1108G11	D06:SCJLLR1107C01	E22:SCBGLR1100A05
B15:SCJLLR1104A08	D07:SCJLLR1102E03	E23:SCEQLR1093H10
B16:SCRLLR1109C08	D08:SCJLLR1107F10	E24:SCBGLR1100E01

F01:SCJLLR1101A02
F02:SCJLLR1106C09
F03:SCJLLR1101E10
F04:SCJLLR1106G08
F05:SCJLLR1102B01
F06:SCJLLR1107C02
F07:SCJLLR1102E07
F08:SCJLLR1107F11
F09:SCJLLR1102H07
F10:SCJLLR1108A10
F11:SCJLLR1103D10
F12:SCJLLR1108D08
F13:SCJLLR1103H02
F14:SCRLLR1109A11
F15:SCJLLR1104B09
F16:SCRLLR1109D04
F17:SCJLLR1104E11
F18:SCRLLR1109F10
F19:SCJLLR1104H11
F20:SCRLLR1109H11
F21:SCJLLR1105F08
F22:SCRLLR1110D06
F23:SCJLLR1105H04
F24:SCRLLR1111A06
G01:SCQGLR1087H03
G02:SCEQLR1094F04
G03:SCQGLR1088F07
G04:SCBGLR1095B01
G05:SCQSLR1089B09
G06:SCBGLR1095F09
G07:SCQSLR1089F11
G08:SCBGLR1096A03
G09:SCQSLR1090E01
G10:SCBGLR1096D04
G11:SCEQLR1091C05
G12:SCBGLR1097B02
G13:SCEQLR1091E03
G14:SCBGLR1097E10
G15:SCEQLR1091H06
G16:SCBGLR1098B04
G17:SCEQLR1092C01
G18:SCBGLR1098H04
G19:SCEQLR1093A05
G20:SCBGLR1099D10
G21:SCEQLR1093E09

G22:SCBGLR1100A06
G23:SCEQLR1093H11
G24:SCBGLR1100F03
H01:SCJLLR1101A04
H02:SCJLLR1106C11
H03:SCJLLR1101E11
H04:SCJLLR1106G11
H05:SCJLLR1102B03
H06:SCJLLR1107C03
H07:SCJLLR1102E08
H08:SCJLLR1107G02
H09:SCJLLR1103A11
H10:SCJLLR1108A12
H11:SCJLLR1103E05
H12:SCJLLR1108D10
H13:SCJLLR1103H06
H14:SCRLLR1109B04
H15:SCJLLR1104C06
H16:SCRLLR1109D12
H17:SCJLLR1104F03
H18:SCRLLR1109G03
H19:SCJLLR1105A01
H20:SCRLLR1110A03
H21:SCJLLR1105F12
H22:SCRLLR1110D07
H23:SCJLLR1105H10
H24:SCRLLR1111B01
I01:SCQGLR1087H04
I02:SCEQLR1094G05
I03:SCQGLR1088G05
I04:SCBGLR1095C03
I05:SCQSLR1089C01
I06:SCBGLR1095F10
I07:SCQSLR1089G09
I08:SCBGLR1096A06
I09:SCQSLR1090E04
I10:SCBGLR1096D08
I11:SCEQLR1091C06
I12:SCBGLR1097D06
I13:SCEQLR1091E06
I14:SCBGLR1097F03
I15:SCEQLR1092A01
I16:SCBGLR1098B07
I17:SCEQLR1092C02
I18:SCBGLR1099A08

I19:SCEQLR1093A06
I20:SCBGLR1099E02
I21:SCEQLR1093E12
I22:SCBGLR1100A08
I23:SCEQLR1093H12
I24:SCBGLR1100F10
J01:SCJLLR1101B05
J02:SCJLLR1106D03
J03:SCJLLR1101F03
J04:SCJLLR1106G12
J05:SCJLLR1102B05
J06:SCJLLR1107D12
J07:SCJLLR1102F01
J08:SCJLLR1107G03
J09:SCJLLR1103B01
J10:SCJLLR1108B10
J11:SCJLLR1103E06
J12:SCJLLR1108D11
J13:SCJLLR1103H09
J14:SCRLLR1109B07
J15:SCJLLR1104C09
J16:SCRLLR1109E02
J17:SCJLLR1104F08
J18:SCRLLR1109G04
J19:SCJLLR1105A06
J20:SCRLLR1110B01
J21:SCJLLR1105G04
J22:SCRLLR1110D10
J23:SCJLLR1106A07
J24:SCRLLR1111B02
K01:SCQGLR1087H10
K02:SCEQLR1094G07
K03:SCQGLR1088G10
K04:SCBGLR1095D06
K05:SCQSLR1089D09
K06:SCBGLR1095G03
K07:SCQSLR1089H02
K08:SCBGLR1096A12
K09:SCQSLR1090E05
K10:SCBGLR1096D09
K11:SCEQLR1091C10
K12:SCBGLR1097D11
K13:SCEQLR1091F09
K14:SCBGLR1097F08
K15:SCEQLR1092A03

K16:SCBGLR1098C07
K17:SCEQLR1092D01
K18:SCBGLR1099A10
K19:SCEQLR1093B10
K20:SCBGLR1099E10
K21:SCEQLR1093G02
K22:SCBGLR1100A10
K23:SCEQLR1094A06
K24:SCBGLR1100F12
L01:SCJLLR1101B06
L02:SCJLLR1106E04
L03:SCJLLR1101F04
L04:SCJLLR1107B02
L05:SCJLLR1102B06
L06:SCJLLR1107E01
L07:SCJLLR1102F10
L08:SCJLLR1107G06
L09:SCJLLR1103C09
L10:SCJLLR1108C03
L11:SCJLLR1103E11
L12:SCJLLR1108E11
L13:SCJLLR1103H12
L14:SCRLLR1109B09
L15:SCJLLR1104C12
L16:SCRLLR1109F02
L17:SCJLLR1104G01
L18:SCRLLR1109G06
L19:SCJLLR1105B04
L20:SCRLLR1110B04
L21:SCJLLR1105G05
L22:SCRLLR1110F04
L23:SCJLLR1106A09
L24:SCRLLR1111C05
M01:SCQGLR1088A12
M02:SCEQLR1094G10
M03:SCQGLR1088H07
M04:SCBGLR1095D07
M05:SCQSLR1089D10
M06:SCBGLR1095G05
M07:SCQSLR1089H04
M08:SCBGLR1096B03
M09:SCQSLR1090E07
M10:SCBGLR1096H04

M11:SCEQLR1091D03
M12:SCBGLR1097D12
M13:SCEQLR1091G01
M14:SCBGLR1097F10
M15:SCEQLR1092A04
M16:SCBGLR1098D05
M17:SCEQLR1092E10
M18:SCBGLR1099B07
M19:SCEQLR1093B11
M20:SCBGLR1099F12
M21:SCEQLR1093G07
M22:SCBGLR1100B04
M23:SCEQLR1094B03
M24:SCBGLR1100G01
N01:SCJLLR1101B08
N02:SCJLLR1106E05
N03:SCJLLR1101F10
N04:SCJLLR1107B03
N05:SCJLLR1102B07
N06:SCJLLR1107E12
N07:SCJLLR1102G03
N08:SCJLLR1107G08
N09:SCJLLR1103C11
N10:SCJLLR1108C05
N11:SCJLLR1103F03
N12:SCJLLR1108F11
N13:SCJLLR1104A02
N14:SCRLLR1109C02
N15:SCJLLR1104D02
N16:SCRLLR1109F03
N17:SCJLLR1104G04
N18:SCRLLR1109G08
N19:SCJLLR1105C01
N20:SCRLLR1110B05
N21:SCJLLR1105G06
N22:SCRLLR1110G02
N23:SCJLLR1106A11
N24:SCRLLR1111D02
O01:SCQGLR1088B08
O02:SCEQLR1094G12
O03:SCQGLR1088H10
O04:SCBGLR1095E01
O05:SCQSLR1089E05

O06:SCBGLR1095G10
O07:SCQSLR1089H09
O08:SCBGLR1096B04
O09:SCQSLR1090G05
O10:SCBGLR1096H10
O11:SCEQLR1091D04
O12:SCBGLR1097E02
O13:SCEQLR1091G03
O14:SCBGLR1097G08
O15:SCEQLR1092A06
O16:SCBGLR1098G03
O17:SCEQLR1092F03
O18:SCBGLR1099B11
O19:SCEQLR1093C02
O20:SCBGLR1099G05
O21:SCEQLR1093G08
O22:SCBGLR1100C12
O23:SCEQLR1094C08
O24:SCBGLR1100G05
P01:SCJLLR1101C12
P02:SCJLLR1106E07
P03:SCJLLR1101G03
P04:SCJLLR1107B07
P05:SCJLLR1102B08
P06:SCJLLR1107F01
P07:SCJLLR1102G07
P08:SCJLLR1107G11
P09:SCJLLR1103D02
P10:SCJLLR1108C07
P11:SCJLLR1103F08
P12:SCJLLR1108G05
P13:SCJLLR1104A05
P14:SCRLLR1109C06
P15:SCJLLR1104D05
P16:SCRLLR1109F06
P17:SCJLLR1104G07
P18:SCRLLR1109G11
P19:SCJLLR1105C05
P20:SCRLLR1110B12
P21:SCJLLR1105G08
P22:SCRLLR1110G05
P23:SCJLLR1106B01
P24:SCRLLR1111D12

ANEXO C – PLACA SCUG 066

A01:SCRLLR1111E05	B17:SCACLR1127F11	D09:SCMCLR1125H05
A02:SCBGLR1117D09	B18:SCCCLR1C01D08	D10:SCRLLR1131G06
A03:SCRLLR1111H01	B19:SCACLR1128C02	D11:SCACLR1126D01
A04:SCBGLR1118B05	B20:SCCCLR1C03G05	D12:SCACLR1132B04
A05:SCBGLR1112D10	B21:SCACLR1128F11	D13:SCACLR1126F10
A06:SCBGLR1118F08	B22:SCCCLR1C04H05	D14:SCACLR1132E03
A07:SCBGLR1112H05	B23:SCACLR1129C03	D15:SCACLR1127D01
A08:SCBGLR1119E06	B24:SCCCLR1C06A07	D16:SCACLR1132G12
A09:SCBGLR1113E08	C01:SCRLLR1111E06	D17:SCACLR1127G10
A10:SCBGLR1119H10	C02:SCBGLR1117E04	D18:SCCCLR1C01G12
A11:SCBGLR1114A02	C03:SCRLLR1111H07	D19:SCACLR1128C03
A12:SCBGLR1120C02	C04:SCBGLR1118B09	D20:SCCCLR1C04A01
A13:SCBGLR1114D12	C05:SCBGLR1112D11	D21:SCACLR1128G02
A14:SCBGLR1120G04	C06:SCBGLR1118G09	D22:SCCCLR1C04H10
A15:SCBGLR1114G07	C07:SCBGLR1113A07	D23:SCACLR1129D02
A16:SCCCLR1121D03	C08:SCBGLR1119E11	D24:SCCCLR1C06A09
A17:SCBGLR1115B08	C09:SCBGLR1113E12	E01:SCRLLR1111F02
A18:SCMCLR1122B06	C10:SCBGLR1120A04	E02:SCBGLR1117E07
A19:SCBGLR1115G03	C11:SCBGLR1114A03	E03:SCBGLR1112A01
A20:SCMCLR1122D09	C12:SCBGLR1120C03	E04:SCBGLR1118C01
A21:SCBGLR1116D01	C13:SCBGLR1114E02	E05:SCBGLR1112E12
A22:SCMCLR1122H07	C14:SCBGLR1120G07	E06:SCBGLR1119B09
A23:SCBGLR1116H10	C15:SCBGLR1114G08	E07:SCBGLR1113A12
A24:SCMCLR1123E05	C16:SCCCLR1121D04	E08:SCBGLR1119F04
B01:SCMCLR1124B01	C17:SCBGLR1115C02	E09:SCBGLR1113F04
B02:SCACLR1129H11	C18:SCMCLR1122B09	E10:SCBGLR1120A05
B03:SCMCLR1124E09	C19:SCBGLR1115H09	E11:SCBGLR1114A09
B04:SCACLR1130C06	C20:SCMCLR1122D11	E12:SCBGLR1120C07
B05:SCMCLR1125A01	C21:SCBGLR1116D02	E13:SCBGLR1114E03
B06:SCACLR1130F07	C22:SCMCLR1123B02	E14:SCBGLR1120G08
B07:SCMCLR1125E02	C23:SCBGLR1117A01	E15:SCBGLR1114G11
B08:SCRLLR1131C09	C24:SCMCLR1123E06	E16:SCCCLR1121D05
B09:SCMCLR1125H02	D01:SCMCLR1124B05	E17:SCBGLR1115C04
B10:SCRLLR1131G03	D02:SCACLR1130A03	E18:SCMCLR1122B12
B11:SCACLR1126C11	D03:SCMCLR1124F01	E19:SCBGLR1115H12
B12:SCACLR1132B03	D04:SCACLR1130C08	E20:SCMCLR1122E06
B13:SCACLR1126F06	D05:SCMCLR1125A03	E21:SCBGLR1116D07
B14:SCACLR1132E02	D06:SCACLR1130G01	E22:SCMCLR1123B04
B15:SCACLR1127A08	D07:SCMCLR1125E04	E23:SCBGLR1117A03
B16:SCACLR1132G02	D08:SCRLLR1131D06	E24:SCMCLR1123E07

F01:SCMCLR1124B11	G22:SCMCLR1123B11	I19:SCBGLR1116A12
F02:SCACLR1130A07	G23:SCBGLR1117A09	I20:SCMCLR1122F09
F03:SCMCLR1124G01	G24:SCMCLR1123E09	I21:SCBGLR1116F06
F04:SCACLR1130D02	H01:SCMCLR1124C03	I22:SCMCLR1123C04
F05:SCMCLR1125A07	H02:SCACLR1130A09	I23:SCBGLR1117B12
F06:SCACLR1130H02	H03:SCMCLR1124G02	I24:SCMCLR1123E11
F07:SCMCLR1125E09	H04:SCACLR1130D06	J01:SCMCLR1124C06
F08:SCRLLR1131E01	H05:SCMCLR1125A10	J02:SCACLR1130B05
F09:SCACLR1126A04	H06:SCACLR1130H05	J03:SCMCLR1124G08
F10:SCRLLR1131G09	H07:SCMCLR1125F01	J04:SCACLR1130D12
F11:SCACLR1126D04	H08:SCRLLR1131E04	J05:SCMCLR1125B03
F12:SCACLR1132B05	H09:SCACLR1126A09	J06:SCACLR1130H06
F13:SCACLR1126G08	H10:SCACLR1132A02	J07:SCMCLR1125F11
F14:SCACLR1132E07	H11:SCACLR1126D05	J08:SCRLLR1131E07
F15:SCACLR1127D05	H12:SCACLR1132C07	J09:SCACLR1126B09
F16:SCACLR1132H04	H13:SCACLR1126G09	J10:SCACLR1132A05
F17:SCACLR1128A01	H14:SCACLR1132E12	J11:SCACLR1126D09
F18:SCCCLR1C02E01	H15:SCACLR1127D09	J12:SCACLR1132C09
F19:SCACLR1128C08	H16:SCCCLR1C01A04	J13:SCACLR1126H11
F20:SCCCLR1C04A06	H17:SCACLR1128A03	J14:SCACLR1132F04
F21:SCACLR1128G08	H18:SCCCLR1C02F11	J15:SCACLR1127D10
F22:SCCCLR1C04H11	H19:SCACLR1128C10	J16:SCCCLR1C01A11
F23:SCACLR1129E09	H20:SCCCLR1C04A07	J17:SCACLR1128A09
F24:SCCCLR1C06A12	H21:SCACLR1128H03	J18:SCCCLR1C02H03
G01:SCRLLR1111F03	H22:SCCCLR1C05A01	J19:SCACLR1128C11
G02:SCBGLR1117F03	H23:SCACLR1129F12	J20:SCCCLR1C04B08
G03:SCBGLR1112A08	H24:SCCCLR1C06B11	J21:SCACLR1128H06
G04:SCBGLR1118C02	I01:SCRLLR1111F05	J22:SCCCLR1C05E10
G05:SCBGLR1112F04	I02:SCBGLR1117F05	J23:SCACLR1129G06
G06:SCBGLR1119B11	I03:SCBGLR1112B09	J24:SCCCLR1C06C03
G07:SCBGLR1113B09	I04:SCBGLR1118C07	K01:SCRLLR1111F07
G08:SCBGLR1119G03	I05:SCBGLR1112F10	K02:SCBGLR1118A08
G09:SCBGLR1113F06	I06:SCBGLR1119C06	K03:SCBGLR1112B12
G10:SCBGLR1120A08	I07:SCBGLR1113C01	K04:SCBGLR1118E12
G11:SCBGLR1114B01	I08:SCBGLR1119G04	K05:SCBGLR1112G01
G12:SCBGLR1120D03	I09:SCBGLR1113G03	K06:SCBGLR1119D02
G13:SCBGLR1114E09	I10:SCBGLR1120A10	K07:SCBGLR1113C12
G14:SCBGLR1120G10	I11:SCBGLR1114B12	K08:SCBGLR1119H02
G15:SCBGLR1114G12	I12:SCBGLR1120D04	K09:SCBGLR1113G08
G16:SCCCLR1121D06	I13:SCBGLR1114E11	K10:SCBGLR1120B02
G17:SCBGLR1115C11	I14:SCBGLR1120G11	K11:SCBGLR1114C08
G18:SCMCLR1122C03	I15:SCBGLR1114H02	K12:SCBGLR1120E06
G19:SCBGLR1116A10	I16:SCCCLR1121F01	K13:SCBGLR1114F05
G20:SCMCLR1122E09	I17:SCBGLR1115D05	K14:SCBGLR1120G12
G21:SCBGLR1116F04	I18:SCMCLR1122D02	K15:SCBGLR1114H06

K16:SCCCLR1121H02	M11:SCBGLR1114C09	O06:SCBGLR1119D12
K17:SCBGLR1115D07	M12:SCBGLR1120E11	O07:SCBGLR1113D03
K18:SCMCLR1122D03	M13:SCBGLR1114G02	O08:SCBGLR1119H08
K19:SCBGLR1116B10	M14:SCCCLR1121A06	O09:SCBGLR1113H06
K20:SCMCLR1122G01	M15:SCBGLR1115A04	O10:SCBGLR1120B07
K21:SCBGLR1116G04	M16:SCMCLR1122A06	O11:SCBGLR1114C10
K22:SCMCLR1123C11	M17:SCBGLR1115E03	O12:SCBGLR1120F01
K23:SCBGLR1117C03	M18:SCMCLR1122D04	O13:SCBGLR1114G05
K24:SCMCLR1123F12	M19:SCBGLR1116C04	O14:SCCCLR1121B12
L01:SCMCLR1124C09	M20:SCMCLR1122G02	O15:SCBGLR1115A05
L02:SCACLR1130B10	M21:SCBGLR1116G06	O16:SCMCLR1122A07
L03:SCMCLR1124H05	M22:SCMCLR1123D10	O17:SCBGLR1115E11
L04:SCACLR1130E04	M23:SCBGLR1117C05	O18:SCMCLR1122D05
L05:SCMCLR1125B04	M24:SCMCLR1123H04	O19:SCBGLR1116C07
L06:SCACLR1130H09	N01:SCMCLR1124D07	O20:SCMCLR1122H05
L07:SCMCLR1125F12	N02:SCACLR1130C01	O21:SCBGLR1116H01
L08:SCRLLR1131F03	N03:SCMCLR1124H07	O22:SCMCLR1123D12
L09:SCACLR1126B11	N04:SCACLR1130E10	O23:SCBGLR1117C07
L10:SCACLR1132A07	N05:SCMCLR1125C06	O24:SCMCLR1124A06
L11:SCACLR1126E04	N06:SCRLLR1131A05	P01:SCMCLR1124D08
L12:SCACLR1132D05	N07:SCMCLR1125G01	P02:SCACLR1130C02
L13:SCACLR1127A05	N08:SCRLLR1131F07	P03:SCMCLR1124H11
L14:SCACLR1132F08	N09:SCACLR1126C01	P04:SCACLR1130F05
L15:SCACLR1127D12	N10:SCACLR1132A10	P05:SCMCLR1125C10
L16:SCCCLR1C01B12	N11:SCACLR1126E11	P06:SCRLLR1131C02
L17:SCACLR1128A10	N12:SCACLR1132D07	P07:SCMCLR1125G06
L18:SCCCLR1C02H09	N13:SCACLR1127A06	P08:SCRLLR1131F10
L19:SCACLR1128D03	N14:SCACLR1132F09	P09:SCACLR1126C09
L20:SCCCLR1C04C02	N15:SCACLR1127E11	P10:SCACLR1132B02
L21:SCACLR1128H07	N16:SCCCLR1C01C04	P11:SCACLR1126F01
L22:SCCCLR1C05F12	N17:SCACLR1128B12	P12:SCACLR1132D11
L23:SCACLR1129G09	N18:SCCCLR1C03A04	P13:SCACLR1127A07
L24:SCCCLR1C06D07	N19:SCACLR1128D10	P14:SCACLR1132G01
M01:SCRLLR1111F08	N20:SCCCLR1C04F09	P15:SCACLR1127F05
M02:SCBGLR1118A11	N21:SCACLR1129A11	P16:SCCCLR1C01C11
M03:SCBGLR1112C06	N22:SCCCLR1C05G04	P17:SCACLR1128C01
M04:SCBGLR1118F03	N23:SCACLR1129G11	P18:SCCCLR1C03C06
M05:SCBGLR1112G08	N24:SCCCLR1C06E11	P19:SCACLR1128F07
M06:SCBGLR1119D05	O01:SCRLLR1111G09	P20:SCCCLR1C04F10
M07:SCBGLR1113D01	O02:SCBGLR1118A12	P21:SCACLR1129A12
M08:SCBGLR1119H06	O03:SCBGLR1112C12	P22:SCCCLR1C05H11
M09:SCBGLR1113H02	O04:SCBGLR1118F05	P23:SCACLR1129H08
M10:SCBGLR1120B04	O05:SCBGLR1112H04	P24:SCCCLR1C06F01

ANEXO D – PLACA SCUG 067

A01:SCCCLR1C06F08	B17:SCUTLR2015E05	D09:SCJLLR2013B12
A02:SCCCLR2004H10	B18:SCACLR2022F05	D10:SCJLLR2020B06
A03:SCCCLR1C07F09	B19:SCSFLR2016B10	D11:SCJLLR2013F01
A04:SCVPLR2005F05	B20:SCUTLR2023C05	D12:SCRFLR2021A10
A05:SCCCLR1C09D05	B21:SCSFLR2016E07	D13:SCACLR2014E01
A06:SCJLLR2006A08	B22:SCUTLR2023H01	D14:SCRFLR2021E07
A07:SCCCLR1C10F06	B23:SCQGLR2017B04	D15:SCACLR2014G12
A08:SCJLLR2006E12	B24:SCSFLR2024C07	D16:SCACLR2022A09
A09:SCCCLR2001C07	C01:SCCCLR1C07A03	D17:SCUTLR2015G02
A10:SCJLLR2006H01	C02:SCVPLR2005A03	D18:SCACLR2022F07
A11:SCCCLR2001G12	C03:SCCCLR1C08C03	D19:SCSFLR2016C03
A12:SCACLR2007B09	C04:SCVPLR2005F09	D20:SCUTLR2023D03
A13:SCCCLR2002B04	C05:SCCCLR1C09E11	D21:SCSFLR2016G02
A14:SCACLR2007E07	C06:SCJLLR2006A11	D22:SCUTLR2023H07
A15:SCCCLR2002F04	C07:SCCCLR1C11A10	D23:SCQGLR2017B11
A16:SCUTLR2008A12	C08:SCJLLR2006F04	D24:SCSFLR2024C09
A17:SCCCLR2003A01	C09:SCCCLR2001C11	E01:SCCCLR1C07B11
A18:SCUTLR2008E10	C10:SCJLLR2006H11	E02:SCVPLR2005B02
A19:SCCCLR2003D09	C11:SCCCLR2001H10	E03:SCCCLR1C08E02
A20:SCUTLR2008H03	C12:SCACLR2007B11	E04:SCVPLR2005G02
A21:SCCCLR2004A03	C13:SCCCLR2002B12	E05:SCCCLR1C09H08
A22:SCSFLR2009E05	C14:SCACLR2007E09	E06:SCJLLR2006B06
A23:SCCCLR2004C03	C15:SCCCLR2002F06	E07:SCCCLR1C11A11
A24:SCQGLR2010D06	C16:SCUTLR2008B01	E08:SCJLLR2006F05
B01:SCAGLR2011B01	C17:SCCCLR2003A09	E09:SCCCLR2001C12
B02:SCQGLR2017E02	C18:SCUTLR2008E12	E10:SCACLR2007A05
B03:SCAGLR2011G03	C19:SCCCLR2003E12	E11:SCCCLR2001H11
B04:SCAGLR2018F12	C20:SCUTLR2008H11	E12:SCACLR2007C08
B05:SCVPLR2012C11	C21:SCCCLR2004A05	E13:SCCCLR2002D06
B06:SCVPLR2019A05	C22:SCSFLR2009F06	E14:SCACLR2007E10
B07:SCVPLR2012E08	C23:SCCCLR2004C05	E15:SCCCLR2002F12
B08:SCVPLR2019F01	C24:SCQGLR2010D10	E16:SCUTLR2008C06
B09:SCJLLR2013A06	D01:SCAGLR2011B04	E17:SCCCLR2003B10
B10:SCJLLR2020B05	D02:SCQGLR2017G06	E18:SCUTLR2008F02
B11:SCJLLR2013E09	D03:SCAGLR2011G10	E19:SCCCLR2003G03
B12:SCRFLR2021A07	D04:SCAGLR2018G04	E20:SCSFLR2009A02
B13:SCACLR2014D08	D05:SCVPLR2012D01	E21:SCCCLR2004A08
B14:SCRFLR2021E06	D06:SCVPLR2019B10	E22:SCSFLR2009F10
B15:SCACLR2014G09	D07:SCVPLR2012E12	E23:SCCCLR2004C09
B16:SCACLR2022A07	D08:SCVPLR2019F04	E24:SCQGLR2010G02

F01:SCAGLR2011B05
F02:SCAGLR2018A02
F03:SCVPLR2012A05
F04:SCAGLR2018G12
F05:SCVPLR2012D03
F06:SCVPLR2019C01
F07:SCVPLR2012F03
F08:SCVPLR2019G05
F09:SCJLLR2013C01
F10:SCJLLR2020E01
F11:SCJLLR2013G02
F12:SCRFLR2021B04
F13:SCACLR2014E09
F14:SCRFLR2021F06
F15:SCUTLR2015A02
F16:SCACLR2022A12
F17:SCUTLR2015G05
F18:SCACLR2022G06
F19:SCSFLR2016D02
F20:SCUTLR2023E01
F21:SCSFLR2016G03
F22:SCUTLR2023H10
F23:SCQGLR2017C02
F24:SCSFLR2024D09
G01:SCCCLR1C07C01
G02:SCVPLR2005D03
G03:SCCCLR1C08F09
G04:SCVPLR2005G11
G05:SCCCLR1C10B05
G06:SCJLLR2006B07
G07:SCCCLR1C11C06
G08:SCJLLR2006G03
G09:SCCCLR2001D04
G10:SCACLR2007A07
G11:SCCCLR2002A04
G12:SCACLR2007C12
G13:SCCCLR2002D08
G14:SCACLR2007E11
G15:SCCCLR2002G01
G16:SCUTLR2008C12
G17:SCCCLR2003C05
G18:SCUTLR2008F03
G19:SCCCLR2003G05
G20:SCSFLR2009A05
G21:SCCCLR2004B05

G22:SCSFLR2009H03
G23:SCCCLR2004D02
G24:SCQGLR2010G04
H01:SCAGLR2011B07
H02:SCAGLR2018A05
H03:SCVPLR2012A09
H04:SCAGLR2018H04
H05:SCVPLR2012D04
H06:SCVPLR2019C10
H07:SCVPLR2012F05
H08:SCVPLR2019G12
H09:SCJLLR2013C06
H10:SCJLLR2020E05
H11:SCJLLR2013G04
H12:SCRFLR2021B05
H13:SCACLR2014E11
H14:SCRFLR2021G01
H15:SCUTLR2015A07
H16:SCACLR2022B11
H17:SCUTLR2015G12
H18:SCACLR2022G07
H19:SCSFLR2016D03
H20:SCUTLR2023E11
H21:SCSFLR2016G11
H22:SCUTLR2023H11
H23:SCQGLR2017C06
H24:SCSFLR2024E10
I01:SCCCLR1C07C03
I02:SCVPLR2005D05
I03:SCCCLR1C08G10
I04:SCVPLR2005H03
I05:SCCCLR1C10B06
I06:SCJLLR2006C01
I07:SCCCLR1C11G01
I08:SCJLLR2006G04
I09:SCCCLR2001D05
I10:SCACLR2007A09
I11:SCCCLR2002A06
I12:SCACLR2007D03
I13:SCCCLR2002D10
I14:SCACLR2007F07
I15:SCCCLR2002G04
I16:SCUTLR2008D04
I17:SCCCLR2003C10
I18:SCUTLR2008F06

I19:SCCCLR2003H03
I20:SCSFLR2009B01
I21:SCCCLR2004B07
I22:SCSFLR2009H11
I23:SCCCLR2004D08
I24:SCQGLR2010H04
J01:SCAGLR2011C02
J02:SCAGLR2018A12
J03:SCVPLR2012B03
J04:SCAGLR2018H07
J05:SCVPLR2012D12
J06:SCVPLR2019D03
J07:SCVPLR2012G04
J08:SCVPLR2019H04
J09:SCJLLR2013C09
J10:SCJLLR2020F11
J11:SCJLLR2013G07
J12:SCRFLR2021B09
J13:SCACLR2014F07
J14:SCRFLR2021G05
J15:SCUTLR2015B06
J16:SCACLR2022C03
J17:SCUTLR2015H09
J18:SCACLR2022G09
J19:SCSFLR2016D06
J20:SCUTLR2023E12
J21:SCSFLR2016H03
J22:SCSFLR2024A09
J23:SCQGLR2017C08
J24:SCSFLR2024G05
K01:SCCCLR1C07D03
K02:SCVPLR2005D11
K03:SCCCLR1C09A07
K04:SCVPLR2005H12
K05:SCCCLR1C10C03
K06:SCJLLR2006C04
K07:SCCCLR1C11G11
K08:SCJLLR2006G06
K09:SCCCLR2001G02
K10:SCACLR2007A11
K11:SCCCLR2002A09
K12:SCACLR2007D05
K13:SCCCLR2002D11
K14:SCACLR2007G11
K15:SCCCLR2002G06

K16:SCUTLR2008D09
K17:SCCCLR2003D03
K18:SCUTLR2008G04
K19:SCCCLR2003H06
K20:SCSFLR2009B07
K21:SCCCLR2004B11
K22:SCQGLR2010A11
K23:SCCCLR2004E05
K24:SCQGLR2010H05
L01:SCAGLR2011E05
L02:SCAGLR2018B04
L03:SCVPLR2012B05
L04:SCAGLR2018H08
L05:SCVPLR2012E02
L06:SCVPLR2019D05
L07:SCVPLR2012H01
L08:SCVPLR2019H06
L09:SCJLLR2013C12
L10:SCJLLR2020G01
L11:SCJLLR2013H02
L12:SCRFLR2021D08
L13:SCACLR2014F09
L14:SCRFLR2021H11
L15:SCUTLR2015B09
L16:SCACLR2022D01
L17:SCSFLR2016A03
L18:SCACLR2022H01
L19:SCSFLR2016D09
L20:SCUTLR2023F01
L21:SCSFLR2016H10
L22:SCSFLR2024B01
L23:SCQGLR2017D04
L24:SCSFLR2024G12
M01:SCCCLR1C07E04
M02:SCVPLR2005E09
M03:SCCCLR1C09C02
M04:SCJLLR2006A02
M05:SCCCLR1C10D12
M06:SCJLLR2006C07
M07:SCCCLR2001B05
M08:SCJLLR2006G07
M09:SCCCLR2001G05
M10:SCACLR2007B03

M11:SCCCLR2002A10
M12:SCACLR2007D10
M13:SCCCLR2002E03
M14:SCUTLR2008A05
M15:SCCCLR2002H02
M16:SCUTLR2008D11
M17:SCCCLR2003D06
M18:SCUTLR2008G10
M19:SCCCLR2003H08
M20:SCSFLR2009B10
M21:SCCCLR2004C01
M22:SCQGLR2010C11
M23:SCCCLR2004E11
M24:SCAGLR2011A03
N01:SCAGLR2011E12
N02:SCAGLR2018C03
N03:SCVPLR2012B09
N04:SCAGLR2018H12
N05:SCVPLR2012E05
N06:SCVPLR2019D07
N07:SCVPLR2012H09
N08:SCJLLR2020A07
N09:SCJLLR2013D02
N10:SCJLLR2020G02
N11:SCJLLR2013H08
N12:SCRFLR2021D11
N13:SCACLR2014G02
N14:SCRFLR2021H12
N15:SCUTLR2015D07
N16:SCACLR2022D07
N17:SCSFLR2016B06
N18:SCUTLR2023A08
N19:SCSFLR2016E01
N20:SCUTLR2023F06
N21:SCQGLR2017A02
N22:SCSFLR2024B05
N23:SCQGLR2017D06
N24:SCSFLR2024H12
O01:SCCCLR1C07E06
O02:SCVPLR2005E11
O03:SCCCLR1C09C11
O04:SCJLLR2006A07
O05:SCCCLR1C10E08

O06:SCJLLR2006C12
O07:SCCCLR2001C02
O08:SCJLLR2006G12
O09:SCCCLR2001G10
O10:SCACLR2007B06
O11:SCCCLR2002B01
O12:SCACLR2007E03
O13:SCCCLR2002E09
O14:SCUTLR2008A11
O15:SCCCLR2002H08
O16:SCUTLR2008E02
O17:SCCCLR2003D08
O18:SCUTLR2008H01
O19:SCCCLR2003H12
O20:SCSFLR2009D05
O21:SCCCLR2004C02
O22:SCQGLR2010D05
O23:SCCCLR2004G03
O24:SCAGLR2011A11
P01:SCAGLR2011F11
P02:SCAGLR2018C08
P03:SCVPLR2012C01
P04:SCVPLR2019A01
P05:SCVPLR2012E06
P06:SCVPLR2019D12
P07:SCJLLR2013A03
P08:SCJLLR2020A10
P09:SCJLLR2013D11
P10:SCRFLR2021A04
P11:SCACLR2014C11
P12:SCRFLR2021E03
P13:SCACLR2014G05
P14:SCACLR2022A06
P15:SCUTLR2015E02
P16:SCACLR2022F04
P17:SCSFLR2016B07
P18:SCUTLR2023B01
P19:SCSFLR2016E06
P20:SCUTLR2023G06
P21:SCQGLR2017A12
P22:SCSFLR2024C04
P23:SCQGLR2017D07
P24:SCQGLR2025A06

ANEXO E – PLACA SCUG 068

A01:SCQGLR2025A08	B18:SCSGLV1009F02	D11:SCCCLR2C03D06
A02:SCSFLR2031H01	B19:SCCCLV1003C07	D12:SCSGLV1008C08
A03:SCQGLR2025E03	B20:SCSGLV1010C07	D13:SCCCLV1001B03
A04:SCQGLR2032F01	B21:SCCCLV1003H08	D14:SCSGLV1008H12
A05:SCQGLR2025H11	B22:SCSGLV1011A08	D15:SCCCLV1001E06
A06:SCAGLR2033B01	B23:SCSGLV1004D10	D16:SCSGLV1009C09
A07:SCAGLR2026F12	B24:SCSGLV1011H01	D17:SCCCLV1002C11
A08:SCAGLR2033D06	C01:SCQGLR2025A09	D18:SCSGLV1009F03
A09:SCVPLR2027A03	C02:SCSFLR2031H06	D19:SCCCLV1003D07
A10:SCAGLR2033H10	C03:SCQGLR2025E04	D20:SCSGLV1010D08
A11:SCVPLR2027D12	C04:SCQGLR2032G02	D21:SCCCLV1003H10
A12:SCRFLR2034E06	C05:SCAGLR2026A09	D22:SCSGLV1011A11
A13:SCJLLR2028A03	C06:SCAGLR2033B05	D23:SCSGLV1004E07
A14:SCJFLR2035E01	C07:SCAGLR2026G01	D24:SCSGLV1011H06
A15:SCJLLR2028F07	C08:SCAGLR2033D08	E01:SCQGLR2025A10
A16:SCJFLR2035H01	C09:SCVPLR2027A07	E02:SCQGLR2032B05
A17:SCACLR2029B07	C10:SCRFLR2034A02	E03:SCQGLR2025E05
A18:SCJFLR2036C09	C11:SCVPLR2027E06	E04:SCQGLR2032G06
A19:SCACLR2029H02	C12:SCRFLR2034E07	E05:SCAGLR2026B01
A20:SCJFLR2036G10	C13:SCJLLR2028B06	E06:SCAGLR2033C02
A21:SCUTLR2030E01	C14:SCJFLR2035E02	E07:SCAGLR2026G02
A22:SCRFLR2037C03	C15:SCJLLR2028F08	E08:SCAGLR2033D09
A23:SCSFLR2031A12	C16:SCJFLR2035H04	E09:SCVPLR2027A10
A24:SCRFLR2037H03	C17:SCACLR2029C03	E10:SCRFLR2034A07
B01:SCRFLR2038C11	C18:SCJFLR2036D05	E11:SCVPLR2027F01
B02:SCSGLV1005C02	C19:SCACLR2029H09	E12:SCRFLR2034H12
B03:SCCCLR2C01A12	C20:SCJFLR2036G11	E13:SCJLLR2028B07
B04:SCSGLV1006A03	C21:SCUTLR2030E04	E14:SCJFLR2035E10
B05:SCCCLR2C02A01	C22:SCRFLR2037D02	E15:SCJLLR2028G05
B06:SCSGLV1006H02	C23:SCSFLR2031C04	E16:SCJFLR2036A02
B07:SCCCLR2C02C02	C24:SCRFLR2037H06	E17:SCACLR2029D02
B08:SCSGLV1007D10	D01:SCRFLR2038D04	E18:SCJFLR2036D10
B09:SCCCLR2C02F08	D02:SCSGLV1005C06	E19:SCUTLR2030A04
B10:SCSGLV1007G07	D03:SCCCLR2C01B08	E20:SCJFLR2036H06
B11:SCCCLR2C03D04	D04:SCSGLV1006A10	E21:SCUTLR2030E07
B12:SCSGLV1008C05	D05:SCCCLR2C02A02	E22:SCRFLR2037E07
B13:SCCCLV1001A06	D06:SCSGLV1006H09	E23:SCSFLR2031E04
B14:SCSGLV1008H07	D07:SCCCLR2C02C09	E24:SCRFLR2037H11
B15:SCCCLV1001E05	D08:SCSGLV1007D12	F01:SCRFLR2038D07
B16:SCSGLV1009C06	D09:SCCCLR2C02F09	F02:SCSGLV1005C07
B17:SCCCLV1002A11	D10:SCSGLV1007G11	F03:SCCCLR2C01B10

F04:SCSGLV1006B06	H01:SCRFLR2038F06	I22:SCRFLR2037E12
F05:SCCCLR2C02A05	H02:SCSGLV1005D02	I23:SCSFLR2031E10
F06:SCSGLV1007A04	H03:SCCCLR2C01C08	I24:SCRFLR2038A11
F07:SCCCLR2C02D02	H04:SCSGLV1006C01	J01:SCRFLR2038F10
F08:SCSGLV1007E05	H05:SCCCLR2C02A12	J02:SCSGLV1005E05
F09:SCCCLR2C02G10	H06:SCSGLV1007A08	J03:SCCCLR2C01C11
F10:SCSGLV1007G12	H07:SCCCLR2C02D04	J04:SCSGLV1006C10
F11:SCCCLR2C03E02	H08:SCSGLV1007E06	J05:SCCCLR2C02B04
F12:SCSGLV1008E10	H09:SCCCLR2C02H05	J06:SCSGLV1007B04
F13:SCCCLV1001C03	H10:SCSGLV1007H04	J07:SCCCLR2C02D06
F14:SCSGLV1009A11	H11:SCCCLR2C03F07	J08:SCSGLV1007F06
F15:SCCCLV1001F07	H12:SCSGLV1008F02	J09:SCCCLR2C03A08
F16:SCSGLV1009C11	H13:SCCCLV1001C05	J10:SCSGLV1008A09
F17:SCCCLV1002D06	H14:SCSGLV1009B01	J11:SCCCLR2C03F08
F18:SCSGLV1009F07	H15:SCCCLV1001G08	J12:SCSGLV1008F06
F19:SCCCLV1003E06	H16:SCSGLV1009D03	J13:SCCCLV1001C09
F20:SCSGLV1010D10	H17:SCCCLV1002G12	J14:SCSGLV1009B02
F21:SCSGLV1004A02	H18:SCSGLV1009G06	J15:SCCCLV1001G09
F22:SCSGLV1011C06	H19:SCCCLV1003E11	J16:SCSGLV1009D06
F23:SCSGLV1004E08	H20:SCSGLV1010E01	J17:SCCCLV1002H05
F24:SCSGLV1011H11	H21:SCSGLV1004A04	J18:SCSGLV1009G12
G01:SCQGLR2025C06	H22:SCSGLV1011C09	J19:SCCCLV1003F02
G02:SCQGLR2032B10	H23:SCSGLV1004F11	J20:SCSGLV1010F06
G03:SCQGLR2025E08	H24:SCSGLV1012A03	J21:SCSGLV1004A12
G04:SCQGLR2032G07	I01:SCQGLR2025D06	J22:SCSGLV1011D02
G05:SCAGLR2026B05	I02:SCQGLR2032D03	J23:SCSGLV1004G01
G06:SCAGLR2033C06	I03:SCQGLR2025F06	J24:SCSGLV1012A09
G07:SCAGLR2026G05	I04:SCQGLR2032G12	K01:SCQGLR2025D10
G08:SCAGLR2033E09	I05:SCAGLR2026C07	K02:SCQGLR2032D06
G09:SCVPLR2027B10	I06:SCAGLR2033C09	K03:SCQGLR2025G12
G10:SCRFLR2034B04	I07:SCAGLR2026G07	K04:SCQGLR2032H01
G11:SCVPLR2027F07	I08:SCAGLR2033G01	K05:SCAGLR2026C10
G12:SCJFLR2035A01	I09:SCVPLR2027C08	K06:SCAGLR2033C10
G13:SCJLLR2028B10	I10:SCRFLR2034B05	K07:SCAGLR2026H05
G14:SCJFLR2035E12	I11:SCVPLR2027F08	K08:SCAGLR2033G09
G15:SCJLLR2028G06	I12:SCJFLR2035A07	K09:SCVPLR2027C11
G16:SCJFLR2036A04	I13:SCJLLR2028B11	K10:SCRFLR2034B07
G17:SCACLR2029D05	I14:SCJFLR2035F03	K11:SCVPLR2027G10
G18:SCJFLR2036F02	I15:SCJLLR2028G09	K12:SCJFLR2035C02
G19:SCUTLR2030A07	I16:SCJFLR2036B10	K13:SCJLLR2028C05
G20:SCJFLR2036H07	I17:SCACLR2029E02	K14:SCJFLR2035F04
G21:SCUTLR2030H01	I18:SCJFLR2036F07	K15:SCJLLR2028G10
G22:SCRFLR2037E08	I19:SCUTLR2030B11	K16:SCJFLR2036B11
G23:SCSFLR2031E06	I20:SCRFLR2037A04	K17:SCACLR2029E09
G24:SCRFLR2038A02	I21:SCUTLR2030H09	K18:SCJFLR2036F11

K19:SCUTLR2030C07
K20:SCRFLR2037B02
K21:SCSFLR2031A01
K22:SCRFLR2037F01
K23:SCSFLR2031E12
K24:SCRFLR2038B08
L01:SCRFLR2038H11
L02:SCSGLV1005E06
L03:SCCCLR2C01E07
L04:SCSGLV1006E06
L05:SCCCLR2C02B08
L06:SCSGLV1007C06
L07:SCCCLR2C02E04
L08:SCSGLV1007F11
L09:SCCCLR2C03B02
L10:SCSGLV1008B03
L11:SCCCLR2C03G04
L12:SCSGLV1008F12
L13:SCCCLV1001D01
L14:SCSGLV1009B07
L15:SCCCLV1001H05
L16:SCSGLV1009D11
L17:SCCCLV1003A01
L18:SCSGLV1009H12
L19:SCCCLV1003G02
L20:SCSGLV1010F12
L21:SCSGLV1004B01
L22:SCSGLV1011E09
L23:SCSGLV1004G02
L24:SCSGLV1012A10
M01:SCQGLR2025E01
M02:SCQGLR2032D11
M03:SCQGLR2025H08
M04:SCQGLR2032H12
M05:SCAGLR2026E05
M06:SCAGLR2033C11
M07:SCAGLR2026H11
M08:SCAGLR2033G11
M09:SCVPLR2027D03
M10:SCRFLR2034B11
M11:SCVPLR2027H01
M12:SCJFLR2035D10

M13:SCJLLR2028D03
M14:SCJFLR2035F06
M15:SCJLLR2028H08
M16:SCJFLR2036C01
M17:SCACLR2029F05
M18:SCJFLR2036G04
M19:SCUTLR2030C12
M20:SCRFLR2037B12
M21:SCSFLR2031A07
M22:SCRFLR2037F09
M23:SCSFLR2031F05
M24:SCRFLR2038B09
N01:SCRFLR2038H12
N02:SCSGLV1005G05
N03:SCCCLR2C01E09
N04:SCSGLV1006E08
N05:SCCCLR2C02B09
N06:SCSGLV1007C08
N07:SCCCLR2C02F01
N08:SCSGLV1007G01
N09:SCCCLR2C03D02
N10:SCSGLV1008B08
N11:SCCCLV1001A01
N12:SCSGLV1008G05
N13:SCCCLV1001D06
N14:SCSGLV1009B12
N15:SCCCLV1001H06
N16:SCSGLV1009E06
N17:SCCCLV1003A11
N18:SCSGLV1010A03
N19:SCCCLV1003G03
N20:SCSGLV1010G02
N21:SCSGLV1004B06
N22:SCSGLV1011F05
N23:SCSGLV1004G06
N24:SCSGLV1012B01
O01:SCQGLR2025E02
O02:SCQGLR2032E04
O03:SCQGLR2025H10
O04:SCAGLR2033A08
O05:SCAGLR2026F05
O06:SCAGLR2033D01

O07:SCAGLR2026H12
O08:SCAGLR2033H01
O09:SCVPLR2027D05
O10:SCRFLR2034D04
O11:SCVPLR2027H12
O12:SCJFLR2035D11
O13:SCJLLR2028E05
O14:SCJFLR2035G11
O15:SCACLR2029A05
O16:SCJFLR2036C03
O17:SCACLR2029H01
O18:SCJFLR2036G07
O19:SCUTLR2030D12
O20:SCRFLR2037C01
O21:SCSFLR2031A11
O22:SCRFLR2037G02
O23:SCSFLR2031G06
O24:SCRFLR2038C06
P01:SCCCLR2C01A03
P02:SCSGLV1005H10
P03:SCCCLR2C01G05
P04:SCSGLV1006F11
P05:SCCCLR2C02B11
P06:SCSGLV1007D05
P07:SCCCLR2C02F06
P08:SCSGLV1007G03
P09:SCCCLR2C03D03
P10:SCSGLV1008C01
P11:SCCCLV1001A04
P12:SCSGLV1008H05
P13:SCCCLV1001D08
P14:SCSGLV1009C03
P15:SCCCLV1002A09
P16:SCSGLV1009E12
P17:SCCCLV1003B07
P18:SCSGLV1010B03
P19:SCCCLV1003H07
P20:SCSGLV1011A05
P21:SCSGLV1004C01
P22:SCSGLV1011G01
P23:SCSGLV1005A11
P24:SCSGLV1012B03

ANEXO F – PLACA SCUG 107

A01:SCQSST1039E03	B18:SCMCST1056F04	D11:SCMCST1051A10
A02:SCRFST1044G04	B19:SCMCST1052E03	D12:SCMCST1055C09
A03:SCQSST1039H02	B20:SCMCST1056G10	D13:SCMCST1051C11
A04:SCRFST1045C11	B21:SCMCST1052H11	D14:SCMCST1055G02
A05:SCQSST1040D08	B22:SCMCST1057A10	D15:SCMCST1051F11
A06:SCRFST1045E10	B23:SCMCST1053B01	D16:SCMCST1056C12
A07:SCQSST1040G01	B24:SCMCST1057E01	D17:SCMCST1052B09
A08:SCRFST1045H02	C01:SCQSST1039E06	D18:SCMCST1056F05
A09:SCRFST1041C01	C02:SCRFST1044G05	D19:SCMCST1052E09
A10:SCRFST1046C07	C03:SCQSST1039H10	D20:SCMCST1056G12
A11:SCRFST1041E05	C04:SCRFST1045C12	D21:SCMCST1052H12
A12:SCJFST1047A03	C05:SCQSST1040D11	D22:SCMCST1057B02
A13:SCRFST1042A08	C06:SCRFST1045E11	D23:SCMCST1053B06
A14:SCJFST1047C11	C07:SCQSST1040G09	D24:SCMCST1057E03
A15:SCRFST1042D06	C08:SCRFST1045H03	E01:SCQSST1039E12
A16:SCJFST1047E02	C09:SCRFST1041C03	E02:SCRFST1044H04
A17:SCRFST1043A02	C10:SCRFST1046C10	E03:SCQSST1040A12
A18:SCJFST1047H11	C11:SCRFST1041E06	E04:SCRFST1045D01
A19:SCRFST1043D09	C12:SCJFST1047A05	E05:SCQSST1040E01
A20:SCJFST1048E06	C13:SCRFST1042A10	E06:SCRFST1045F01
A21:SCRFST1044A09	C14:SCJFST1047C12	E07:SCQSST1040H07
A22:SCJFST1048H01	C15:SCRFST1042D08	E08:SCRFST1045H04
A23:SCRFST1044D02	C16:SCJFST1047E11	E09:SCRFST1041C05
A24:SCMCST1049A08	C17:SCRFST1043A03	E10:SCRFST1046E04
B01:SCMCST1049C10	C18:SCJFST1047H12	E11:SCRFST1041F03
B02:SCMCST1053D07	C19:SCRFST1043E12	E12:SCJFST1047A10
B03:SCMCST1049F03	C20:SCJFST1048F08	E13:SCRFST1042B02
B04:SCMCST1053F02	C21:SCRFST1044B04	E14:SCJFST1047D01
B05:SCMCST1049H09	C22:SCJFST1048H03	E15:SCRFST1042D12
B06:SCMCST1054B02	C23:SCRFST1044D08	E16:SCJFST1047F10
B07:SCMCST1050D10	C24:SCMCST1049B01	E17:SCRFST1043A08
B08:SCMCST1054E10	D01:SCMCST1049D01	E18:SCJFST1048A01
B09:SCMCST1050F09	D02:SCMCST1053D08	E19:SCRFST1043F06
B10:SCMCST1054G12	D03:SCMCST1049F04	E20:SCJFST1048F09
B11:SCMCST1051A07	D04:SCMCST1053F08	E21:SCRFST1044B09
B12:SCMCST1055C08	D05:SCMCST1050A07	E22:SCJFST1048H04
B13:SCMCST1051C10	D06:SCMCST1054B03	E23:SCRFST1044D09
B14:SCMCST1055F12	D07:SCMCST1050E02	E24:SCMCST1049B10
B15:SCMCST1051F09	D08:SCMCST1054E11	F01:SCMCST1049D04
B16:SCMCST1056C10	D09:SCMCST1050F10	F02:SCMCST1053D12
B17:SCMCST1052B05	D10:SCMCST1054H07	F03:SCMCST1049F05

F04:SCMCST1053F11	H01:SCMCST1049D09	I22:SCJFST1048H08
F05:SCMCST1050B05	H02:SCMCST1053E02	I23:SCRFST1044F01
F06:SCMCST1054B09	H03:SCMCST1049F08	I24:SCMCST1049B12
F07:SCMCST1050E10	H04:SCMCST1053G08	J01:SCMCST1049D12
F08:SCMCST1054F01	H05:SCMCST1050B09	J02:SCMCST1053E03
F09:SCMCST1050G12	H06:SCMCST1054B12	J03:SCMCST1049F12
F10:SCMCST1055A06	H07:SCMCST1050E11	J04:SCMCST1053H04
F11:SCMCST1051A11	H08:SCMCST1054F03	J05:SCMCST1050C05
F12:SCMCST1055D01	H09:SCMCST1050H06	J06:SCMCST1054C11
F13:SCMCST1051D02	H10:SCMCST1055B01	J07:SCMCST1050F01
F14:SCMCST1055G10	H11:SCMCST1051B03	J08:SCMCST1054F06
F15:SCMCST1052A03	H12:SCMCST1055D09	J09:SCMCST1050H07
F16:SCMCST1056D06	H13:SCMCST1051D06	J10:SCMCST1055B08
F17:SCMCST1052C03	H14:SCMCST1055H08	J11:SCMCST1051B05
F18:SCMCST1056F08	H15:SCMCST1052A04	J12:SCMCST1055D10
F19:SCMCST1052E12	H16:SCMCST1056D08	J13:SCMCST1051D09
F20:SCMCST1056H01	H17:SCMCST1052C09	J14:SCMCST1055H12
F21:SCMCST1053A03	H18:SCMCST1056F10	J15:SCMCST1052A06
F22:SCMCST1057B06	H19:SCMCST1052F10	J16:SCMCST1056E03
F23:SCMCST1053B08	H20:SCMCST1056H07	J17:SCMCST1052C10
F24:SCMCST1057E09	H21:SCMCST1053A04	J18:SCMCST1056G02
G01:SCQSST1039F02	H22:SCMCST1057B07	J19:SCMCST1052G03
G02:SCRFST1044H06	H23:SCMCST1053C05	J20:SCMCST1057A04
G03:SCQSST1040B01	H24:SCMCST1057F01	J21:SCMCST1053A05
G04:SCRFST1045D05	I01:SCQSST1039F05	J22:SCMCST1057C02
G05:SCQSST1040E04	I02:SCRFST1044H07	J23:SCMCST1053C06
G06:SCRFST1045F09	I03:SCQSST1040B12	J24:SCMCST1057F02
G07:SCQSST1040H08	I04:SCRFST1045D07	K01:SCQSST1039F10
G08:SCRFST1045H09	I05:SCQSST1040E08	K02:SCRFST1045A11
G09:SCRFST1041D02	I06:SCRFST1045F11	K03:SCQSST1040C01
G10:SCRFST1046F05	I07:SCQSST1040H10	K04:SCRFST1045D11
G11:SCRFST1041G03	I08:SCRFST1045H12	K05:SCQSST1040F01
G12:SCJFST1047A11	I09:SCRFST1041D04	K06:SCRFST1045G05
G13:SCRFST1042B03	I10:SCRFST1046G02	K07:SCRFST1041A02
G14:SCJFST1047D04	I11:SCRFST1041G07	K08:SCRFST1046A04
G15:SCRFST1042E04	I12:SCJFST1047B01	K09:SCRFST1041D07
G16:SCJFST1047F11	I13:SCRFST1042B04	K10:SCRFST1046H05
G17:SCRFST1043C03	I14:SCJFST1047D07	K11:SCRFST1041G08
G18:SCJFST1048A02	I15:SCRFST1042E09	K12:SCJFST1047B11
G19:SCRFST1043G03	I16:SCJFST1047G02	K13:SCRFST1042B06
G20:SCJFST1048F11	I17:SCRFST1043C06	K14:SCJFST1047D08
G21:SCRFST1044C06	I18:SCJFST1048A10	K15:SCRFST1042G03
G22:SCJFST1048H07	I19:SCRFST1043G04	K16:SCJFST1047G04
G23:SCRFST1044E05	I20:SCJFST1048G04	K17:SCRFST1043C11
G24:SCMCST1049B11	I21:SCRFST1044C08	K18:SCJFST1048C09

K19:SCRFST1043H06
K20:SCJFST1048G05
K21:SCRFST1044C10
K22:SCJFST1048H11
K23:SCRFST1044F03
K24:SCMCST1049C05
L01:SCMCST1049E02
L02:SCMCST1053E06
L03:SCMCST1049G04
L04:SCMCST1053H12
L05:SCMCST1050C11
L06:SCMCST1054D04
L07:SCMCST1050F02
L08:SCMCST1054F10
L09:SCMCST1050H09
L10:SCMCST1055B09
L11:SCMCST1051B07
L12:SCMCST1055F01
L13:SCMCST1051E01
L14:SCMCST1056A11
L15:SCMCST1052A09
L16:SCMCST1056E04
L17:SCMCST1052D06
L18:SCMCST1056G07
L19:SCMCST1052G07
L20:SCMCST1057A05
L21:SCMCST1053A06
L22:SCMCST1057C10
L23:SCMCST1053C07
L24:SCMCST1057F06
M01:SCQSST1039G08
M02:SCRFST1045B03
M03:SCQSST1040C10
M04:SCRFST1045E05
M05:SCQSST1040F02
M06:SCRFST1045G09
M07:SCRFST1041A09
M08:SCRFST1046B03
M09:SCRFST1041D10
M10:SCRFST1046H06
M11:SCRFST1041H05
M12:SCJFST1047C03

M13:SCRFST1042C02
M14:SCJFST1047D10
M15:SCRFST1042G07
M16:SCJFST1047G12
M17:SCRFST1043D03
M18:SCJFST1048D12
M19:SCRFST1043H09
M20:SCJFST1048G07
M21:SCRFST1044C11
M22:SCMCST1049A02
M23:SCRFST1044F06
M24:SCMCST1049C07
N01:SCMCST1049E05
N02:SCMCST1053E10
N03:SCMCST1049G08
N04:SCMCST1054A05
N05:SCMCST1050C12
N06:SCMCST1054E03
N07:SCMCST1050F05
N08:SCMCST1054G04
N09:SCMCST1050H10
N10:SCMCST1055B11
N11:SCMCST1051B11
N12:SCMCST1055F03
N13:SCMCST1051E05
N14:SCMCST1056B05
N15:SCMCST1052B02
N16:SCMCST1056E07
N17:SCMCST1052D08
N18:SCMCST1056G08
N19:SCMCST1052G11
N20:SCMCST1057A06
N21:SCMCST1053A11
N22:SCMCST1057D03
N23:SCMCST1053D01
N24:SCMCST1057F12
O01:SCQSST1039G09
O02:SCRFST1045C02
O03:SCQSST1040D02
O04:SCRFST1045E09
O05:SCQSST1040F12
O06:SCRFST1045G10

O07:SCRFST1041B06
O08:SCRFST1046B08
O09:SCRFST1041E03
O10:SCRFST1046H11
O11:SCRFST1042A04
O12:SCJFST1047C06
O13:SCRFST1042C05
O14:SCJFST1047D11
O15:SCRFST1042H08
O16:SCJFST1047H05
O17:SCRFST1043D07
O18:SCJFST1048E05
O19:SCRFST1044A04
O20:SCJFST1048G08
O21:SCRFST1044C12
O22:SCMCST1049A07
O23:SCRFST1044F07
O24:SCMCST1049C08
P01:SCMCST1049F01
P02:SCMCST1053E11
P03:SCMCST1049H02
P04:SCMCST1054A06
P05:SCMCST1050D04
P06:SCMCST1054E04
P07:SCMCST1050F06
P08:SCMCST1054G09
P09:SCMCST1051A04
P10:SCMCST1055C06
P11:SCMCST1051C04
P12:SCMCST1055F08
P13:SCMCST1051E08
P14:SCMCST1056C05
P15:SCMCST1052B04
P16:SCMCST1056F02
P17:SCMCST1052E02
P18:SCMCST1056G09
P19:SCMCST1052H04
P20:SCMCST1057A08
P21:SCMCST1053A12
P22:SCMCST1057D06
P23:SCMCST1053D03
P24:SCMCST1057G01

ANEXO G – PLACA SCUG 108

A01:SCMCST1057G05	B18:SCCCST1C05B12	D11:SCSGST1068F12
A02:SCVPST1062B10	B19:SCSGST1070C10	D12:SCCCST1C02D08
A03:SCMCST1058A05	B20:SCCCST1C06B03	D13:SCSGST1069B05
A04:SCVPST1062D01	B21:SCSGST1070G05	D14:SCCCST1C03D04
A05:SCMCST1058C02	B22:SCCCST1C06E09	D15:SCSGST1069E11
A06:SCVPST1062G02	B23:SCSGST1071B11	D16:SCCCST1C04B04
A07:SCMCST1058G06	B24:SCCCST2001E08	D17:SCSGST1069H08
A08:SCVPST1063A12	C01:SCMCST1057G07	D18:SCCCST1C05C01
A09:SCVPST1059A10	C02:SCVPST1062C02	D19:SCSGST1070C11
A10:SCVPST1063E01	C03:SCMCST1058A06	D20:SCCCST1C06B08
A11:SCVPST1059F09	C04:SCVPST1062D07	D21:SCSGST1070G11
A12:SCVPST1063F10	C05:SCMCST1058C12	D22:SCCCST1C06F10
A13:SCVPST1060B03	C06:SCVPST1062G03	D23:SCSGST1071B12
A14:SCSFST1064B02	C07:SCMCST1058H03	D24:SCCCST2001G08
A15:SCVPST1060D07	C08:SCVPST1063B02	E01:SCMCST1057G09
A16:SCSFST1064G02	C09:SCVPST1059B02	E02:SCVPST1062C04
A17:SCVPST1060G07	C10:SCVPST1063E05	E03:SCMCST1058A07
A18:SCSFST1065B06	C11:SCVPST1059G01	E04:SCVPST1062E02
A19:SCVPST1061C06	C12:SCVPST1063G10	E05:SCMCST1058D07
A20:SCSFST1065E01	C13:SCVPST1060B04	E06:SCVPST1062G06
A21:SCVPST1061E10	C14:SCSFST1064B07	E07:SCMCST1058H08
A22:SCSFST1066B06	C15:SCVPST1060D09	E08:SCVPST1063B11
A23:SCVPST1061G12	C16:SCSFST1064G06	E09:SCVPST1059B08
A24:SCSFST1066F08	C17:SCVPST1060G09	E10:SCVPST1063E06
B01:SCSFST1066H11	C18:SCSFST1065B10	E11:SCVPST1059G11
B02:SCSGST1071E07	C19:SCVPST1061C09	E12:SCVPST1063G11
B03:SCSFST1067E07	C20:SCSFST1065E04	E13:SCVPST1060B06
B04:SCSGST1071H05	C21:SCVPST1061F03	E14:SCSFST1064B08
B05:SCSFST1067H09	C22:SCSFST1066C11	E15:SCVPST1060D10
B06:SCSGST1072C04	C23:SCVPST1061H02	E16:SCSFST1064G07
B07:SCSGST1068B09	C24:SCSFST1066F12	E17:SCVPST1060G10
B08:SCSGST1072F06	D01:SCSFST1067A09	E18:SCSFST1065B11
B09:SCSGST1068D05	D02:SCSGST1071E08	E19:SCVPST1061D03
B10:SCCCST1C01B03	D03:SCSFST1067E08	E20:SCSFST1065G05
B11:SCSGST1068F10	D04:SCSGST1071H06	E21:SCVPST1061F04
B12:SCCCST1C02D04	D05:SCSGST1068A01	E22:SCSFST1066D04
B13:SCSGST1069B02	D06:SCSGST1072C10	E23:SCVPST1061H08
B14:SCCCST1C03B10	D07:SCSGST1068B10	E24:SCSFST1066G01
B15:SCSGST1069E06	D08:SCSGST1072F08	F01:SCSFST1067B01
B16:SCCCST1C04A12	D09:SCSGST1068D07	F02:SCSGST1071F01
B17:SCSGST1069H03	D10:SCCCST1C01B10	F03:SCSFST1067E10

F04:SCSGST1072A01	H01:SCSFST1067B10	I22:SCSFST1066E05
F05:SCSGST1068A02	H02:SCSGST1071F03	I23:SCVPST1062A07
F06:SCSGST1072D04	H03:SCSFST1067F10	I24:SCSFST1066G08
F07:SCSGST1068C02	H04:SCSGST1072A04	J01:SCSFST1067B12
F08:SCSGST1072F10	H05:SCSGST1068A04	J02:SCSGST1071F05
F09:SCSGST1068E04	H06:SCSGST1072E02	J03:SCSFST1067F12
F10:SCCCST1C01G10	H07:SCSGST1068C04	J04:SCSGST1072A05
F11:SCSGST1068G01	H08:SCSGST1072G05	J05:SCSGST1068A08
F12:SCCCST1C02D11	H09:SCSGST1068E08	J06:SCSGST1072E03
F13:SCSGST1069C02	H10:SCCCST1C01H07	J07:SCSGST1068C10
F14:SCCCST1C03E09	H11:SCSGST1068G03	J08:SCSGST1072G11
F15:SCSGST1069F03	H12:SCCCST1C02E11	J09:SCSGST1068E09
F16:SCCCST1C04D02	H13:SCSGST1069C03	J10:SCCCST1C02A04
F17:SCSGST1069H09	H14:SCCCST1C03F10	J11:SCSGST1068G05
F18:SCCCST1C05C08	H15:SCSGST1069F05	J12:SCCCST1C02F10
F19:SCSGST1070D10	H16:SCCCST1C04E01	J13:SCSGST1069C07
F20:SCCCST1C06C01	H17:SCSGST1069H11	J14:SCCCST1C03G07
F21:SCSGST1070G12	H18:SCCCST1C05F01	J15:SCSGST1069F12
F22:SCCCST1C06H04	H19:SCSGST1070D11	J16:SCCCST1C04H05
F23:SCSGST1071C01	H20:SCCCST1C06C04	J17:SCSGST1069H12
F24:SCCCST2001H01	H21:SCSGST1070H05	J18:SCCCST1C05H11
G01:SCMCST1057G10	H22:SCCCST1C06H10	J19:SCSGST1070E06
G02:SCVPST1062C06	H23:SCSGST1071C02	J20:SCCCST1C06C07
G03:SCMCST1058B02	H24:SCCCST2002A02	J21:SCSGST1071A08
G04:SCVPST1062E07	I01:SCMCST1057H03	J22:SCCCST2001A07
G05:SCMCST1058D11	I02:SCVPST1062C07	J23:SCSGST1071C03
G06:SCVPST1062G12	I03:SCMCST1058B08	J24:SCCCST2002B07
G07:SCMCST1058H11	I04:SCVPST1062F02	K01:SCMCST1057H06
G08:SCVPST1063C04	I05:SCMCST1058E11	K02:SCVPST1062C09
G09:SCVPST1059D04	I06:SCVPST1062H04	K03:SCMCST1058B09
G10:SCVPST1063E08	I07:SCMCST1058H12	K04:SCVPST1062F03
G11:SCVPST1059H07	I08:SCVPST1063C05	K05:SCMCST1058G02
G12:SCVPST1063G12	I09:SCVPST1059D05	K06:SCVPST1062H11
G13:SCVPST1060B10	I10:SCVPST1063E10	K07:SCVPST1059A04
G14:SCSFST1064C03	I11:SCVPST1059H08	K08:SCVPST1063C06
G15:SCVPST1060E08	I12:SCVPST1063H10	K09:SCVPST1059E01
G16:SCSFST1064H01	I13:SCVPST1060B12	K10:SCVPST1063F01
G17:SCVPST1060H02	I14:SCSFST1064C07	K11:SCVPST1059H11
G18:SCSFST1065C03	I15:SCVPST1060E09	K12:SCSFST1064A06
G19:SCVPST1061D07	I16:SCSFST1064H04	K13:SCVPST1060C02
G20:SCSFST1065G11	I17:SCVPST1060H12	K14:SCSFST1064C10
G21:SCVPST1061F08	I18:SCSFST1065C06	K15:SCVPST1060F02
G22:SCSFST1066E03	I19:SCVPST1061D09	K16:SCSFST1064H11
G23:SCVPST1061H09	I20:SCSFST1065H03	K17:SCVPST1061A01
G24:SCSFST1066G03	I21:SCVPST1061F10	K18:SCSFST1065C07

K19:SCVPST1061D11	M13:SCVPST1060C06	O07:SCVPST1059A09
K20:SCSFST1065H10	M14:SCSFST1064D02	O08:SCVPST1063D12
K21:SCVPST1061G03	M15:SCVPST1060F07	O09:SCVPST1059F07
K22:SCSFST1066E06	M16:SCSFST1065A03	O10:SCVPST1063F09
K23:SCVPST1062B01	M17:SCVPST1061B09	O11:SCVPST1060B02
K24:SCSFST1066G09	M18:SCSFST1065C10	O12:SCSFST1064B01
L01:SCSFST1067C06	M19:SCVPST1061D12	O13:SCVPST1060D02
L02:SCSGST1071G01	M20:SCSFST1066A05	O14:SCSFST1064D10
L03:SCSFST1067G06	M21:SCVPST1061G05	O15:SCVPST1060G05
L04:SCSGST1072A08	M22:SCSFST1066E08	O16:SCSFST1065B01
L05:SCSGST1068A11	M23:SCVPST1062B04	O17:SCVPST1061B10
L06:SCSGST1072E07	M24:SCSFST1066G11	O18:SCSFST1065D06
L07:SCSGST1068C11	N01:SCSFST1067D04	O19:SCVPST1061E07
L08:SCSGST1072H01	N02:SCSGST1071G03	O20:SCSFST1066A11
L09:SCSGST1068F02	N03:SCSFST1067G11	O21:SCVPST1061G07
L10:SCCCST1C02A10	N04:SCSGST1072B08	O22:SCSFST1066E10
L11:SCSGST1068H03	N05:SCSGST1068B01	O23:SCVPST1062B08
L12:SCCCST1C02H05	N06:SCSGST1072F02	O24:SCSFST1066H04
L13:SCSGST1069C11	N07:SCSGST1068C12	P01:SCSFST1067E03
L14:SCCCST1C03H05	N08:SCSGST1072H02	P02:SCSGST1071G09
L15:SCSGST1069G05	N09:SCSGST1068F05	P03:SCSFST1067H05
L16:SCCCST1C04H09	N10:SCCCST1C02B11	P04:SCSGST1072C02
L17:SCSGST1070B04	N11:SCSGST1068H05	P05:SCSGST1068B05
L18:SCCCST1C06A01	N12:SCCCST1C02H07	P06:SCSGST1072F04
L19:SCSGST1070E09	N13:SCSGST1069D02	P07:SCSGST1068D04
L20:SCCCST1C06C09	N14:SCCCST1C03H09	P08:SCSGST1072H12
L21:SCSGST1071B01	N15:SCSGST1069G11	P09:SCSGST1068F09
L22:SCCCST2001B04	N16:SCCCST1C05A01	P10:SCCCST1C02C06
L23:SCSGST1071C04	N17:SCSGST1070B11	P11:SCSGST1068H09
L24:SCCCST2002E08	N18:SCCCST1C06A03	P12:SCCCST1C03B03
M01:SCMCST1057H08	N19:SCSGST1070F10	P13:SCSGST1069D04
M02:SCVPST1062C11	N20:SCCCST1C06D01	P14:SCCCST1C04A10
M03:SCMCST1058B10	N21:SCSGST1071B07	P15:SCSGST1069H02
M04:SCVPST1062F05	N22:SCCCST2001E01	P16:SCCCST1C05B02
M05:SCMCST1058G04	N23:SCSGST1071C07	P17:SCSGST1070C08
M06:SCVPST1062H12	N24:SCCCST2002G10	P18:SCCCST1C06A07
M07:SCVPST1059A06	O01:SCMCST1057H10	P19:SCSGST1070G02
M08:SCVPST1063C07	O02:SCVPST1062C12	P20:SCCCST1C06D03
M09:SCVPST1059F03	O03:SCMCST1058C01	P21:SCSGST1071B09
M10:SCVPST1063F02	O04:SCVPST1062F10	P22:SCCCST2001E04
M11:SCVPST1060A10	O05:SCMCST1058G05	P23:SCSGST1071C08
M12:SCSFST1064A12	O06:SCVPST1063A10	P24:SCCCST2002G12

ANEXO H – PLACA SCUG 109

A01:SCCCST2002H08	B18:SCSBST3101C10	D11:SCUTST3089A12
A02:SCSFST3074E02	B19:SCUTST3092C08	D12:SCSBST3099B04
A03:SCCCST2003F07	B20:SCSBST3102B03	D13:SCUTST3089H10
A04:SCSFST3075A09	B21:SCUTST3092G12	D14:SCSBST3099H08
A05:SCCCST2004G08	B22:SCSBST3102G10	D15:SCUTST3091A01
A06:SCSFST3076B12	B23:SCSBST3093D08	D16:SCSBST3100C11
A07:SCCCST3001D10	B24:SCBGST3103E12	D17:SCUTST3091F07
A08:SCSFST3077A10	C01:SCCCST2003B09	D18:SCSBST3101D08
A09:SCCCST3002C12	C02:SCSFST3074E12	D19:SCUTST3092D01
A10:SCSFST3077D09	C03:SCCCST2004B02	D20:SCSBST3102B07
A11:SCCCST3002G09	C04:SCSFST3075C04	D21:SCUTST3092H05
A12:SCSFST3078F06	C05:SCCCST2004H05	D22:SCBGST3103A02
A13:SCCCST3003H07	C06:SCSFST3076C11	D23:SCSBST3093E04
A14:SCSFST3079D01	C07:SCCCST3001E01	D24:SCBGST3103F08
A15:SCCCST3005A10	C08:SCSFST3077B02	E01:SCCCST2003C02
A16:SCSFST3080G06	C09:SCCCST3002D02	E02:SCSFST3074F02
A17:SCCCST3005H10	C10:SCSFST3077F12	E03:SCCCST2004C04
A18:SCSFST3081F11	C11:SCCCST3002G10	E04:SCSFST3075D07
A19:SCCCST3006G06	C12:SCSFST3078G01	E05:SCCCST3001B03
A20:SCSFST3082D06	C13:SCCCST3004A05	E06:SCSFST3076D07
A21:SCSFST3073A12	C14:SCSFST3079E04	E07:SCCCST3001F01
A22:SCCCST3083A07	C15:SCCCST3005B02	E08:SCSFST3077B12
A23:SCSFST3073H03	C16:SCSFST3080H07	E09:SCCCST3002D06
A24:SCCCST3083G12	C17:SCCCST3006B02	E10:SCSFST3077G07
B01:SCUTST3084G03	C18:SCSFST3081H01	E11:SCCCST3002H12
B02:SCSBST3094B10	C19:SCCCST3006G10	E12:SCSFST3078H05
B03:SCUTST3085F01	C20:SCSFST3082E05	E13:SCCCST3004A06
B04:SCSBST3095A07	C21:SCSFST3073C11	E14:SCSFST3079E08
B05:SCUTST3086E06	C22:SCCCST3083A12	E15:SCCCST3005C01
B06:SCSBST3095G06	C23:SCSFST3073H10	E16:SCSFST3080H09
B07:SCUTST3087E08	C24:SCCCST3083H05	E17:SCCCST3006B09
B08:SCSBST3096D09	D01:SCUTST3084G11	E18:SCSFST3081H12
B09:SCUTST3088C02	D02:SCSBST3094C09	E19:SCCCST3006H06
B10:SCSBST3098B01	D03:SCUTST3085G03	E20:SCSFST3082E09
B11:SCUTST3089A09	D04:SCSBST3095B06	E21:SCSFST3073C12
B12:SCSBST3098H04	D05:SCUTST3086E08	E22:SCCCST3083D10
B13:SCUTST3089F09	D06:SCSBST3095G12	E23:SCSFST3073H11
B14:SCSBST3099H05	D07:SCUTST3087E10	E24:SCUTST3084A01
B15:SCUTST3090H08	D08:SCSBST3096E03	F01:SCUTST3085B04
B16:SCSBST3100C09	D09:SCUTST3088C12	F02:SCSBST3094D09
B17:SCUTST3091F02	D10:SCSBST3098C11	F03:SCUTST3086A08

F04:SCSBST3095B09	H01:SCUTST3085B08	I22:SCCCST3083E04
F05:SCUTST3086E10	H02:SCSBST3094E04	I23:SCSFST3074D01
F06:SCSBST3095H03	H03:SCUTST3086B02	I24:SCUTST3084D09
F07:SCUTST3087F09	H04:SCSBST3095C01	J01:SCUTST3085B11
F08:SCSBST3096H07	H05:SCUTST3086E12	J02:SCSBST3094G06
F09:SCUTST3088D09	H06:SCSBST3095H05	J03:SCUTST3086B04
F10:SCSBST3098E03	H07:SCUTST3087G01	J04:SCSBST3095C09
F11:SCUTST3089B07	H08:SCSBST3097B03	J05:SCUTST3086F11
F12:SCSBST3099B12	H09:SCUTST3088D12	J06:SCSBST3096A08
F13:SCUTST3090A02	H10:SCSBST3098E09	J07:SCUTST3087H07
F14:SCSBST3100A01	H11:SCUTST3089C07	J08:SCSBST3097C08
F15:SCUTST3091B04	H12:SCSBST3099D05	J09:SCUTST3088E02
F16:SCSBST3100D07	H13:SCUTST3090C07	J10:SCSBST3098E12
F17:SCUTST3091G03	H14:SCSBST3100A09	J11:SCUTST3089C09
F18:SCSBST3101E01	H15:SCUTST3091C04	J12:SCSBST3099D08
F19:SCUTST3092D07	H16:SCSBST3100F06	J13:SCUTST3090C08
F20:SCSBST3102C02	H17:SCUTST3091G07	J14:SCSBST3100B06
F21:SCSBST3093A05	H18:SCSBST3101E06	J15:SCUTST3091C09
F22:SCBGST3103A03	H19:SCUTST3092D12	J16:SCSBST3100G06
F23:SCSBST3093E07	H20:SCSBST3102C05	J17:SCUTST3091G08
F24:SCBGST3103G10	H21:SCSBST3093A10	J18:SCSBST3101F03
G01:SCCCST2003D03	H22:SCBGST3103A07	J19:SCUTST3092F01
G02:SCSFST3074F09	H23:SCSBST3093E12	J20:SCSBST3102D02
G03:SCCCST2004D06	H24:SCBGST3103H10	J21:SCSBST3093B06
G04:SCSFST3075D10	I01:SCCCST2003D09	J22:SCBGST3103B01
G05:SCCCST3001B05	I02:SCSFST3074G01	J23:SCSBST3093F06
G06:SCSFST3076D08	I03:SCCCST2004E04	J24:SCBGST3104A02
G07:SCCCST3001F05	I04:SCSFST3075E04	K01:SCCCST2003D12
G08:SCSFST3077C02	I05:SCCCST3001B06	K02:SCSFST3074G07
G09:SCCCST3002E02	I06:SCSFST3076E02	K03:SCCCST2004E05
G10:SCSFST3077H03	I07:SCCCST3001G10	K04:SCSFST3075H02
G11:SCCCST3003D12	I08:SCSFST3077C10	K05:SCCCST3001C08
G12:SCSFST3079A05	I09:SCCCST3002F05	K06:SCSFST3076G09
G13:SCCCST3004B04	I10:SCSFST3078A07	K07:SCCCST3001H10
G14:SCSFST3079E11	I11:SCCCST3003E01	K08:SCSFST3077C11
G15:SCCCST3005C02	I12:SCSFST3079A10	K09:SCCCST3002F09
G16:SCSFST3081A09	I13:SCCCST3004D02	K10:SCSFST3078B04
G17:SCCCST3006C02	I14:SCSFST3079F05	K11:SCCCST3003H01
G18:SCSFST3082A04	I15:SCCCST3005C04	K12:SCSFST3079A12
G19:SCCCST3006H09	I16:SCSFST3081A11	K13:SCCCST3004E06
G20:SCSFST3082E10	I17:SCCCST3006C07	K14:SCSFST3079G05
G21:SCSFST3073D09	I18:SCSFST3082A07	K15:SCCCST3005C07
G22:SCCCST3083E03	I19:SCCCST3006H10	K16:SCSFST3081B10
G23:SCSFST3074C01	I20:SCSFST3082F05	K17:SCCCST3006D02
G24:SCUTST3084C11	I21:SCSFST3073D12	K18:SCSFST3082B01

K19:SCCCST3006H12
K20:SCSFST3082H01
K21:SCSFST3073F04
K22:SCCCST3083E07
K23:SCSFST3074D03
K24:SCUTST3084D12
L01:SCUTST3085C03
L02:SCSBST3094H06
L03:SCUTST3086B09
L04:SCSBST3095D11
L05:SCUTST3086G08
L06:SCSBST3096B09
L07:SCUTST3088A05
L08:SCSBST3097E03
L09:SCUTST3088E11
L10:SCSBST3098F02
L11:SCUTST3089D01
L12:SCSBST3099E06
L13:SCUTST3090F08
L14:SCSBST3100C06
L15:SCUTST3091D02
L16:SCSBST3100G10
L17:SCUTST3092B09
L18:SCSBST3101G12
L19:SCUTST3092F06
L20:SCSBST3102E01
L21:SCSBST3093C10
L22:SCBGST3103B06
L23:SCSBST3093G10
L24:SCBGST3104A03
M01:SCCCST2003E03
M02:SCSFST3074H05
M03:SCCCST2004G01
M04:SCSFST3076A03
M05:SCCCST3001C11
M06:SCSFST3076H12
M07:SCCCST3002B11
M08:SCSFST3077D04
M09:SCCCST3002F12
M10:SCSFST3078E06
M11:SCCCST3003H03
M12:SCSFST3079B04

M13:SCCCST3004H05
M14:SCSFST3080A03
M15:SCCCST3005C10
M16:SCSFST3081E10
M17:SCCCST3006F09
M18:SCSFST3082B08
M19:SCSFST3073A07
M20:SCSFST3082H06
M21:SCSFST3073F10
M22:SCCCST3083F09
M23:SCSFST3074D06
M24:SCUTST3084F04
N01:SCUTST3085E04
N02:SCSBST3094H07
N03:SCUTST3086D02
N04:SCSBST3095E04
N05:SCUTST3086H01
N06:SCSBST3096C04
N07:SCUTST3088A07
N08:SCSBST3097F11
N09:SCUTST3088G11
N10:SCSBST3098G01
N11:SCUTST3089E10
N12:SCSBST3099F02
N13:SCUTST3090G09
N14:SCSBST3100C07
N15:SCUTST3091D07
N16:SCSBST3101A01
N17:SCUTST3092C01
N18:SCSBST3101H09
N19:SCUTST3092F08
N20:SCSBST3102E06
N21:SCSBST3093D01
N22:SCBGST3103C06
N23:SCSBST3093G11
N24:SCBGST3104B03
O01:SCCCST2003F04
O02:SCSFST3075A02
O03:SCCCST2004G03
O04:SCSFST3076A06
O05:SCCCST3001D04
O06:SCSFST3077A03

O07:SCCCST3002C10
O08:SCSFST3077D07
O09:SCCCST3002G01
O10:SCSFST3078E07
O11:SCCCST3003H06
O12:SCSFST3079B10
O13:SCCCST3004H06
O14:SCSFST3080G05
O15:SCCCST3005E08
O16:SCSFST3081F05
O17:SCCCST3006G04
O18:SCSFST3082D02
O19:SCSFST3073A11
O20:SCCCST3083A06
O21:SCSFST3073F11
O22:SCCCST3083G06
O23:SCSFST3074D11
O24:SCUTST3084F06
P01:SCUTST3085E06
P02:SCSBST3094H08
P03:SCUTST3086D09
P04:SCSBST3095E05
P05:SCUTST3087C04
P06:SCSBST3096D01
P07:SCUTST3088B01
P08:SCSBST3097H01
P09:SCUTST3088H07
P10:SCSBST3098G09
P11:SCUTST3089F02
P12:SCSBST3099F11
P13:SCUTST3090G10
P14:SCSBST3100C08
P15:SCUTST3091D12
P16:SCSBST3101A12
P17:SCUTST3092C07
P18:SCSBST3102A07
P19:SCUTST3092G01
P20:SCSBST3102G07
P21:SCSBST3093D07
P22:SCBGST3103E10
P23:SCSBST3094B08
P24:SCBGST3104B12

ANEXO I – PLACA SCUG 110

A01:SCBGST3104C03	B18:SCUTST3131G02	D11:SCSGST3121D09
A02:SCBGST3111G05	B19:SCQGST3124A10	D12:SCUTST3129F01
A03:SCBGST3104F08	B20:SCBFST3132A03	D13:SCSGST3121G10
A04:SCBGST3112D07	B21:SCQGST3124F05	D14:SCUTST3130F01
A05:SCBGST3105C03	B22:SCBFST3132F11	D15:SCQGST3122E11
A06:SCQSST3113C09	B23:SCQGST3125E04	D16:SCUTST3130H01
A07:SCBGST3106D04	B24:SCBFST3133A01	D17:SCQGST3123E11
A08:SCQSST3114B03	C01:SCBGST3104C11	D18:SCUTST3131G03
A09:SCBGST3106G09	C02:SCBGST3111G11	D19:SCQGST3124C03
A10:SCQSST3114E08	C03:SCBGST3104G04	D20:SCBFST3132A04
A11:SCBGST3108B01	C04:SCBGST3112E12	D21:SCQGST3124G07
A12:SCQSST3115A12	C05:SCBGST3105E03	D22:SCBFST3132G01
A13:SCBGST3108C09	C06:SCQSST3113D04	D23:SCQGST3125E07
A14:SCQSST3115E04	C07:SCBGST3106D11	D24:SCBFST3133A02
A15:SCBGST3109C07	C08:SCQSST3114C01	E01:SCBGST3104D04
A16:SCQSST3116C01	C09:SCBGST3106G11	E02:SCBGST3111H03
A17:SCBGST3110C04	C10:SCQSST3114G02	E03:SCBGST3104H11
A18:SCQSST3116H09	C11:SCBGST3108B07	E04:SCBGST3112F01
A19:SCBGST3110F02	C12:SCQSST3115B02	E05:SCBGST3105E08
A20:SCSGST3117D05	C13:SCBGST3108D07	E06:SCQSST3113D06
A21:SCBGST3111A09	C14:SCQSST3115E06	E07:SCBGST3106E01
A22:SCSGST3118D10	C15:SCBGST3109D05	E08:SCQSST3114C05
A23:SCBGST3111C12	C16:SCQSST3116C10	E09:SCBGST3106H06
A24:SCSGST3118H09	C17:SCBGST3110C10	E10:SCQSST3114H03
B01:SCSGST3119D05	C18:SCSGST3117B08	E11:SCBGST3108B10
B02:SCQGST3126A07	C19:SCBGST3110G02	E12:SCQSST3115B12
B03:SCSGST3120A03	C20:SCSGST3117F05	E13:SCBGST3108E12
B04:SCQGST3126G05	C21:SCBGST3111A11	E14:SCQSST3115E09
B05:SCSGST3120C07	C22:SCSGST3118E04	E15:SCBGST3109D12
B06:SCUTST3127F05	C23:SCBGST3111D03	E16:SCQSST3116E05
B07:SCSGST3120F03	C24:SCSGST3118H10	E17:SCBGST3110C12
B08:SCUTST3127H10	D01:SCSGST3119E03	E18:SCSGST3117B12
B09:SCSGST3121A01	D02:SCQGST3126A12	E19:SCBGST3110G10
B10:SCUTST3128E01	D03:SCSGST3120A06	E20:SCSGST3117F11
B11:SCSGST3121D06	D04:SCQGST3126H11	E21:SCBGST3111B03
B12:SCUTST3129E06	D05:SCSGST3120C09	E22:SCSGST3118E05
B13:SCSGST3121G02	D06:SCUTST3127F08	E23:SCBGST3111D06
B14:SCUTST3130D10	D07:SCSGST3120F07	E24:SCSGST3119A07
B15:SCQGST3122E03	D08:SCUTST3128A04	F01:SCSGST3119F03
B16:SCUTST3130G09	D09:SCSGST3121A10	F02:SCQGST3126C03
B17:SCQGST3123E06	D10:SCUTST3128E09	F03:SCSGST3120A07

F04:SCUTST3127A02
F05:SCSGST3120C12
F06:SCUTST3127F09
F07:SCSGST3120G02
F08:SCUTST3128A09
F09:SCSGST3121B02
F10:SCUTST3128F05
F11:SCSGST3121D10
F12:SCUTST3129G12
F13:SCSGST3121H01
F14:SCUTST3130F03
F15:SCQGST3123A01
F16:SCUTST3130H06
F17:SCQGST3123F11
F18:SCUTST3131G04
F19:SCQGST3124D03
F20:SCBFST3132A08
F21:SCQGST3124H11
F22:SCBFST3132G06
F23:SCQGST3125E10
F24:SCBFST3133A06
G01:SCBGST3104D08
G02:SCBGST3112A09
G03:SCBGST3105A02
G04:SCBGST3112F02
G05:SCBGST3105H05
G06:SCQSST3113F05
G07:SCBGST3106E02
G08:SCQSST3114C11
G09:SCBGST3107A01
G10:SCQSST3114H08
G11:SCBGST3108C02
G12:SCQSST3115C01
G13:SCBGST3108F09
G14:SCQSST3115F05
G15:SCBGST3109F11
G16:SCQSST3116E07
G17:SCBGST3110D09
G18:SCSGST3117C06
G19:SCBGST3110H05
G20:SCSGST3117G09
G21:SCBGST3111B04
G22:SCSGST3118E11
G23:SCBGST3111E01
G24:SCSGST3119A08

H01:SCSGST3119F06
H02:SCQGST3126E03
H03:SCSGST3120B03
H04:SCUTST3127B11
H05:SCSGST3120D09
H06:SCUTST3127F11
H07:SCSGST3120G06
H08:SCUTST3128B05
H09:SCSGST3121B06
H10:SCUTST3128F07
H11:SCSGST3121E03
H12:SCUTST3129H10
H13:SCSGST3121H07
H14:SCUTST3130F04
H15:SCQGST3123C04
H16:SCUTST3130H07
H17:SCQGST3123F12
H18:SCUTST3131H01
H19:SCQGST3124D11
H20:SCBFST3132C10
H21:SCQGST3125B07
H22:SCBFST3132G08
H23:SCQGST3125F02
H24:SCBFST3133B05
I01:SCBGST3104D10
I02:SCBGST3112B10
I03:SCBGST3105A03
I04:SCBGST3112H12
I05:SCBGST3105H07
I06:SCQSST3113F09
I07:SCBGST3106E07
I08:SCQSST3114D01
I09:SCBGST3107B08
I10:SCQSST3114H09
I11:SCBGST3108C04
I12:SCQSST3115C06
I13:SCBGST3108H05
I14:SCQSST3115F07
I15:SCBGST3109H08
I16:SCQSST3116G12
I17:SCBGST3110D12
I18:SCSGST3117C08
I19:SCBGST3110H06
I20:SCSGST3117H05
I21:SCBGST3111B08

I22:SCSGST3118F01
I23:SCBGST3111E10
I24:SCSGST3119B03
J01:SCSGST3119F07
J02:SCQGST3126E09
J03:SCSGST3120B07
J04:SCUTST3127D03
J05:SCSGST3120D12
J06:SCUTST3127G01
J07:SCSGST3120G11
J08:SCUTST3128B07
J09:SCSGST3121C03
J10:SCUTST3128G06
J11:SCSGST3121E07
J12:SCUTST3130A02
J13:SCSGST3121H10
J14:SCUTST3130F09
J15:SCQGST3123C08
J16:SCUTST3130H09
J17:SCQGST3123H12
J18:SCUTST3131H03
J19:SCQGST3124E04
J20:SCBFST3132D09
J21:SCQGST3125C01
J22:SCBFST3132G09
J23:SCQGST3125F05
J24:SCBFST3133B06
K01:SCBGST3104E03
K02:SCBGST3112B11
K03:SCBGST3105A04
K04:SCQSST3113A04
K05:SCBGST3105H08
K06:SCQSST3113H01
K07:SCBGST3106E12
K08:SCQSST3114D03
K09:SCBGST3107E01
K10:SCQSST3115A01
K11:SCBGST3108C05
K12:SCQSST3115C07
K13:SCBGST3109A04
K14:SCQSST3115G05
K15:SCBGST3109H09
K16:SCQSST3116H01
K17:SCBGST3110E02
K18:SCSGST3117C09

K19:SCBGST3110H10
K20:SCSGST3117H11
K21:SCBGST3111C04
K22:SCSGST3118F03
K23:SCBGST3111F02
K24:SCSGST3119C02
L01:SCSGST3119F11
L02:SCQGST3126E12
L03:SCSGST3120B08
L04:SCUTST3127D05
L05:SCSGST3120E04
L06:SCUTST3127H03
L07:SCSGST3120H03
L08:SCUTST3128C06
L09:SCSGST3121C08
L10:SCUTST3129A01
L11:SCSGST3121E11
L12:SCUTST3130C10
L13:SCQGST3122A07
L14:SCUTST3130F12
L15:SCQGST3123D08
L16:SCUTST3131A12
L17:SCQGST3124A02
L18:SCUTST3131H06
L19:SCQGST3124E05
L20:SCBFST3132E02
L21:SCQGST3125C05
L22:SCBFST3132H01
L23:SCQGST3125G06
L24:SCBFST3133B07
M01:SCBGST3104F03
M02:SCBGST3112C01
M03:SCBGST3105A06
M04:SCQSST3113A05
M05:SCBGST3105H12
M06:SCQSST3114A02
M07:SCBGST3106F01
M08:SCQSST3114E01
M09:SCBGST3107F06
M10:SCQSST3115A03
M11:SCBGST3108C07
M12:SCQSST3115D10

M13:SCBGST3109A11
M14:SCQSST3116B02
M15:SCBGST3110B01
M16:SCQSST3116H05
M17:SCBGST3110E10
M18:SCSGST3117C10
M19:SCBGST3111A04
M20:SCSGST3118A02
M21:SCBGST3111C07
M22:SCSGST3118F06
M23:SCBGST3111F08
M24:SCSGST3119C04
N01:SCSGST3119G09
N02:SCQGST3126F06
N03:SCSGST3120B09
N04:SCUTST3127E11
N05:SCSGST3120E07
N06:SCUTST3127H07
N07:SCSGST3120H06
N08:SCUTST3128D05
N09:SCSGST3121C12
N10:SCUTST3129B06
N11:SCSGST3121F05
N12:SCUTST3130D05
N13:SCQGST3122A10
N14:SCUTST3130G02
N15:SCQGST3123D10
N16:SCUTST3131B08
N17:SCQGST3124A06
N18:SCUTST3131H12
N19:SCQGST3124E12
N20:SCBFST3132E08
N21:SCQGST3125C08
N22:SCBFST3132H06
N23:SCQGST3125G09
N24:SCBFST3133C04
O01:SCBGST3104F06
O02:SCBGST3112D01
O03:SCBGST3105B02
O04:SCQSST3113A12
O05:SCBGST3106C01
O06:SCQSST3114A10

O07:SCBGST3106G07
O08:SCQSST3114E04
O09:SCBGST3107G04
O10:SCQSST3115A05
O11:SCBGST3108C08
O12:SCQSST3115E03
O13:SCBGST3109B06
O14:SCQSST3116B04
O15:SCBGST3110B06
O16:SCQSST3116H07
O17:SCBGST3110E12
O18:SCSGST3117C11
O19:SCBGST3111A05
O20:SCSGST3118C09
O21:SCBGST3111C11
O22:SCSGST3118G07
O23:SCBGST3111F11
O24:SCSGST3119D02
P01:SCSGST3119G10
P02:SCQGST3126G01
P03:SCSGST3120B10
P04:SCUTST3127E12
P05:SCSGST3120F02
P06:SCUTST3127H08
P07:SCSGST3120H11
P08:SCUTST3128D10
P09:SCSGST3121D03
P10:SCUTST3129E03
P11:SCSGST3121F09
P12:SCUTST3130D06
P13:SCQGST3122E02
P14:SCUTST3130G07
P15:SCQGST3123D11
P16:SCUTST3131E02
P17:SCQGST3124A07
P18:SCBFST3132A02
P19:SCQGST3124F04
P20:SCBFST3132E10
P21:SCQGST3125D12
P22:SCBFST3132H10
P23:SCQGST3126A05
P24:SCBFST3133D04

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K.; EMORI, Y.; KONDO, H. et al. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin) - Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, p.16793-16797, 1987a.
- ABE, M.; KONDO, H.; ARAI, S. Purification and characterization of a rice cysteine proteinase inhibitor. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.51, p.2763-2768, 1987b.
- ABE, M.; ABE, K.; KUDORA, M. et al. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as novel cystatin superfamily member of plant origin. **European Journal of Biochemistry**, v.209, p.933-937, 1992.
- ABEL, S.; OELLER, P.W.; THEOLOGIS, A. Early auxin-induced genes encode short lived nuclear proteins. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.91, p.326-330, 1994.
- ABELES, F.B.; MORGAN, P.W.; SALTVEIT, M.E.J. **Ethylene in Plant Biology**. San Diego: Academic Press, 1992. 414p.
- ABU-GOUKH, A.A.; LABAVITCH, J.M. The in vivo role of 'Bartlett' pear fruit polygalacturonase inhibitors. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.23, p.123-135, 1983.
- ADAMS, M.D.; KELLEY, J.M.; GOCAYNE, J.D. et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**, v.252, p.1651-1656, 1991.

- AGRAWAL, G.K.; J.W.A., N.; RAKWAL, R. A novel rice (*Oriza sativa* L.) acidic PR1 gene highly responsive to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase inhibitors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.274, p.157-165, 2000.
- ALBORN, H.T.; TURLINGS, T.C.J.; JONES, T.H. et al. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. **Science**, v.276, p.945-944, 1997.
- ALTERTHUM, F.; CARVALHAL, M.L. Crescimento bacteriano. IN: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F. et al. (Ed.). **Microbiologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2000. cap.4. 586p.
- APPEL, H.M. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, p.1521-1551, 1993.
- ARIMURA, G.; TASHIRO, K.; KUHARA, S. et al. Gene responses in bean leaves induced by herbivory and by herbivore-induced volatiles. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.277, p.305-310, 2000a.
- ARIMURA, G.; OZAWA, R.; SHIMODA, T. et al. Herbivory-induced volatiles elicit defense genes in lima bean leaves. **Nature**, v.406, p.512-515, 2000b.
- ARTECA, R. **Plant Growth Substances: Principles and Applications**. New York: Chapman & Hall, 1996. 332p.
- ARUMUGANATHAN, K.; EARL, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.9, p.208-218, 1991.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.601-639, 1999.
- ASAMIZU, E.; NAKAMURA, Y.; SATO, S. et al. Generation of 7.137 non-redundant expressed sequence tags from a legume, *Lotus japonicus*. **DNA Research**, v.7, p.127-130, 2000.

- BALDWIN, D.; CRANE, V.; RICE, D. A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.96-103, 1999.
- BALDWIN, I.T. Methyl jasmonate-induced nicotine production in *Nicotiana attenuata*: inducing defenses in the field without wounding. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.80, p.213-220, 1996.
- BALDWIN, I.T.; PRESTON, C.A. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. **Planta**, v.208, p.137-145, 1999.
- BALDWIN, I.T. An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. **Plant Physiology**, v.127, n.4, p.1449-1458, 2001.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, p.411-421, 1999.
- BELL, E.; MULLET, J.E. Lipxygenase gene expression is modulated in plants by water deficit, wounding, and methyl jasmonate. **Molecular and General Genetics**, v.230, p.456-462, 1991.
- BENEDETTI, C.E.; XIE, D.; TURNER, J.G. *COI1*-dependent expression of an Arabidopsis vegetative storage protein in flowers and siliques and in response to coronatine and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, v.109, p.567-572, 1995.
- BENNING, C. Biosynthesis and function of the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.49, p.53-75, 1998.
- BENTO, J.M.S. Perdas por insetos na agricultura. **Ação Ambiental**, v. 2, p.19-21, 1999.
- BERGER, S. Jasmonate-related mutants of *Arabidopsis* as tools for studying stress signaling. **Planta**, v.214, p.497-504, 2002.
- BERGEY, D.R.; HOWE, G.A.; RYAN, C.A. Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.93, p.12053-12058, 1996.

- BERGEY, D.R.; RYAN, C.A. Wound- and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. **Plant Molecular Biology**, v.40, p.815-823, 1999.
- BERNARD, K.; AUPHAN, N.; GRANJEAUD, S. et al. Multiplex messenger assay: simultaneous, quantitative measurement of expression of many genes in the context of T cell activation. **Nucleic Acids Research**, v.24, p.1435-1443, 1996.
- BERTUCCI, F.; BERNARD, K.; LORIOD, B. et al. Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. **Human Molecular Genetics**, v.8, n.9, p.1715-1722, 1999.
- BIRKENMEIER, G.F.; RYAN, C.A. Wound signaling in tomato plants. **Plant Physiology**, v.117, p.687-693, 1998.
- BIRKETT, M.A. New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.97, n.16, p.9329-9334, 2000.
- BÖGRE, L.; LIGTERINK, W.; MESKIENE, I. et al. Wounding induces the rapid and transient activation of a specific map kinase pathway. **The Plant Cell**, v.9, p.75-83, 1997.
- BOLTER, C.J.; JONGSMA, M.A. Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. **Journal of Insect Physiology**, v.41, p.1071-1079, 1995.
- BOTELLA, M.A.; XU, Y.; PARVA, T.N. et al. Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, v.112, p.1201-1210, 1996.
- BOWN, A.W.; HALL, D.E.; MACGREGOR, K.B. Insect footsteps on leaves stimulate the accumulation of 4-aminobutyrate and can be visualized through increased chlorophyll fluorescence and superoxide production. **Plant Physiology**, v.129, p.1430-1434, 2002.

- BOX, H.E. **Informe preliminar sobre los taladradores de la caña de azúcar (*Diatraea* spp.) en Venezuela.** Maracay: Instituto Nacional de Agricultura, 1952. 93p. Boletín técnico 2.
- BRAGA, D.P.V. Caracterização de duas variedades de cana-de-açúcar transformadas geneticamente com o gene que codifica a proteína *cryIA(B)* de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para resistência a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Piracicaba, 2001. 71p. Tese (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- BRAGA, D.P.V.; ARRIGONI, E.D.B.; SILVA-FILHO, M.C. et al. Expression of the *Cry1Ab* protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seeds**, v.5, p.209-222, 2003.
- BROADWAY, R.M. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.32, n.1, p.39-53, 1996.
- BROADWAY, R.M.; DUFFEY, S.S. Plant proteinase inhibitor: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology**, v.32, p.827-833, 1986.
- BROGLIE, R.; BROGLIE, K. Chitinases and plant protection. IN: FRITIG, B.; LEGRAND, M. (Ed.). **Mechanisms of Plant Defense Responses.** Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.411-421.
- BROWSE, J.A.; SOMERVILLE, C. Glycerolipid metabolism: biochemistry and regulation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42, p.467-506, 1991.
- CAPY, P.; GASPERI, G.; BIEMONT, C. et al. Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? **Heredity**, v.85, p.101-106, 2000.
- CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties: a review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v.40, p.1515-1539, 2002.

- CARSON, D.L.; BOTHA, F.C. Preliminary analysis of expressed sequence tags for sugarcane. **Crop Science**, v.40, p.1769-1779, 2000.
- CARSON, D.L.; BOTHA, F.C. Genes expressed in sugarcane maturing internodal tissue. **Plant Cell Report**, v.20, p.1075-1081, 2002.
- CARSON, D.L.; HUCKETT, B.I.; BOTHA, F.C. Sugarcane ESTs differentially expressed in immature and maturing internodal tissue. **Plant Science**, v.162, p.289-300, 2002.
- CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR – CTC. **Relatório Anual 1996/97**. Piracicaba: CTC, 1997. 76p. (Relatório Anual Copersucar)
- CHEONG, Y.H.; CHANG, H.S.; GUPTA, R. et al. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.129, p.661-677, 2002.
- CHIANG, H.D.; NORRIS, M.; CIEPIELA, A. et al. Inducible versus constitutive soybean resistance to mexican bean beetle. **Journal of Chemical Ecology**, v.13, p.741-749, 1987.
- CHRISTELLER, J.T.; FARLEY, P.C.; RAMSAY, R.J. et al. Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. **European Journal of Biochemistry**, v.254, p.160-167, 1998.
- COHEN, P.; BOUABOULA, M.; BARON, V. et al. Monitoring cellular responses to *Listeria monocytogenes* with oligonucleotide arrays. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.11181-11190, 2000.
- CONCONI, A.; MIQUEL, M.; BROWSE, J.A. et al. Intracellular levels of free linoleic and linoleic acid increase in tomato leaves in response to wounding. **Plant Physiology**, v.111, p.797-803, 1996.
- CONSTABEL, C.P.; BERGEY, D.R.; RYAN, C.A. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.92, p.407-411, 1995.

- CONSTABEL, C.P.; YIP, L.; RYAN, C.A. Prosystemin from potato, black nightshade and bell pepper: primary structure and biological activity of predicted systemin polypeptides. **Plant Molecular Biology**, v.36, p.55-62, 1998.
- CONSTABEL, C.P.; LYNN, Y.; PATTON, J.J. et al. Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. **Plant Physiology**, v.124, p.285-295, 2000.
- COX, J.M. Applications of nylon membrane arrays to gene expression analysis. **Journal of Immunological Methods**, v.250, p.3-13, 2001.
- CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.41, p.355-381, 1997.
- CREELMAN, R.A.; TIERNEY, M.L.; MULLET, J.E. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.89, p.4938-4941, 1992.
- CUSHMAN, J.C.; BOHNERT, H.J. Genomic approaches to plant stress tolerance. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, p.117-124, 2000.
- DAMMANN, C.; ROJO, E.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.J. Absciscic acid and jasmonic acid activate wound-inducible genes in potato through separate, organ-specific signal transduction pathways. **The Plant Journal**, v.11, p.773-782, 1997.
- DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. IN: HEINZ, D. J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier Press, 1987. cap.2. pp.7-87.
- DaSILVA, J.A.G.; SORRELLS, M.E.; BURNQUIST, W.L. et al. RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. **Genome**, v.36, p.782-791, 1993.
- DEHIO, C.; DE BRUIJN, F.J. The early nodulin gene SrENOD2 from *Sesbania rostrata* is inducible by cytokinin. **The Plant Journal**, v.2, p.117-128, 1992.

- DESPREZ, T.; AMSELEM, J.; CABOCHE, M. et al. Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. **The Plant Journal**, v.14, p.643-652, 1998.
- DeWALD, D.B.; SADKA, A.; MULLET, J.E. Sucrose modulation of soybean *Vsp* gene expression is inhibited by auxin. **Plant Physiology**, v.104, p.439-444, 1994.
- DIATCHENKO, L.; LAU, Y.C.; CAMPBELL, A.P. et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.93, p.6025-6030, 1996.
- DOOSTDAR, H.; BULLOCK, R.C.; ADAIR, R.A. et al. When to spray? Population dynamics of *Diaprepes abbreviatus* in Indian River County citrus groves. **Diaprepes Task Force Meeting**. Lake Alfred: University of Florida, 2002. p.?
- DUAN, X.; LI, X.; XUE, Q. et al. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. **Nature Biotechnology**, v.14, p.494-498, 1996.
- ECKMANN, L.; SMITH, J.R.; HOUSLEY, M.P. et al. Analysis by high density cDNA arrays of altered gene expression in human intestinal epithelial cells in response to infection with the invasive enteric bacteria *Salmonella*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.14084-14094, 2000.
- EL-BATAL, A.I.; ABO-STATE, M.A.; SHIHAB, A. Phenylalanine ammonia lyase production by gamma irradiated and analog-resistant mutants of *Rhodotorula glutinis*. **Acta Microbiologica Polonica**, v.49, p.51-61, 2000.
- FALCO, M.C.; MARBACH, P.A.S.; POMPERMAYER, P. et al. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, p.113-122, 2001.
- FALCO, M.C.; SILVA-FIHO, M.C. Searching for insect resistance genes in sugarcane. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, v.24, p.547-550, 2001.

- FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: Effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.761-766, 2003.
- FARMER, E.E.; RYAN, C.A. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plants leaves. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.87, p.7713-7716, 1990.
- FARMER, E.E.; WEBER, H.; VOLLENWEIDER, S. Fatty acid signaling in *Arabidopsis*. **Planta**, v.206, p.167-174, 1998.
- FELIX, G.; GROSSKOPF, D.G.; REGENASS, M. et al. Elicitor-induced ethylene biosynthesis in tomato cells. Characterization and use as a bioassay for elicitor action. **Plant Physiology**, v.97, p.19-25, 1991.
- FELIX, J.M.; DRUMMOND, R.D.; NOGUEIRA, F.T.S. et al. Genoma funcional: uso de arranjos de DNA em náilon para a análise da expressão gênica em larga escala. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.24, p.60-67, 2002.
- FELTON, G.W.; DONATO, K.K.; DELVECCHIO, R.J. et al. Activation of foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of dietary protein for foliage for noctuid herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, v.15, p.2667–2693, 1989.
- FELTON, G.W.; DONATO, K.K.; BROADWAY, R. et al. Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dietary protein to a noctuid herbivore, *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology**, v.38, p.277-285, 1992.
- FERNANDES, A.C. Produção e produtividade da cana-de-açúcar no Brasil. IN: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DE TÉCNICOS AÇUCAREIROS E ALCOOLEIROS DO BRASIL – STAB, 6, Maceió, 1996. **Anais**. Maceió: STAB, 1996. p.602-612.

- FIDANTSEF, A.L.; STOUT, M.J.; THALER, J.S. et al. Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 54, p.97-114, 1999.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2000: Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo, 2000. 546p.
- FORDYCE, J.A.; AGRAWAL, A.A. The role of plant trichomes and caterpillar group size on growth and defense of the pipevine swallowtail *Battus philenor*. **The Journal of Animal Ecology**, v.70, n.6, p.997-1005, 2001.
- FOURNIER, J.; POUENAT, M.L.; RICKAUER, M. et al. Purification and characterization of elicitor-induced lipoxygenase in tobacco cells. **The Plant Journal**, v.3, p.63-70, 1993.
- FRANCO, O.L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F.R. et al. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. **European Journal of Biochemistry**, v.269, p.397-412, 2002.
- GAI, X.; LAL, S.; XING, L. et al. Gene discovery using the maize genome database ZmDB. **Nucleic Acids Research**, v.28, n.1, p.94-96, 2000.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S. et al. Pragas das plantas e seu controle. IN: GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S. et al. (Ed.). **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.
- GAMAS, P.; NIEBEL, F.D.C.; LESCURE, N. et al. Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.9, p.233-242, 1996.
- GASCH, A.P.; HUANG, M.; METZNER, S. Genomic expression responses to DNA-damaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p. **Molecular Biology of the Cell**, v.12, p.2987-3003, 2001.

- GATEHOUSE, A.M.R.; BOULTER, D. Assessment of the antimetabolic effects of trypsin inhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata*) and other legumes on development of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.34, p.345-350, 1983.
- GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A. Identifying proteins with insecticidal activity: Use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. **Pesticide Science**, v.52, p.165-175, 1998.
- GAZZONI, D.L.; HÜLSMEYER, A.; HOFFMANN-CAMPO, C.B. Efeito de diferentes doses de rutina e de quercetina na biologia de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lep., Noctuidae). **Revista da Pesquisa Agropecuária Brasileira On line**, v.32, n.7, 1997.
- GEERTS, A.; FELTKAMP, D.; ROSAHL, S. Expression of lipoxygenase in wounded tubers of *Solanum tuberosum* L. **Plant Physiology**, v.105, p.269-277, 1994.
- GLAZEBROOK, J. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.280-286, 1999.
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Frederico Pimentel Gomes, 2000. 477 p.
- GRESS, T.M.; HOHEISEL, J.D.; LENNON, G.G. et al. Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. **Mammalian Genome**, v.3, p.609-619, 1992.
- GRISON, R.; GREZES-BESSET, B.; SCHEIDER, M. et al. Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. **Nature Biotechnology**, v.14, p.643-646, 1996.
- GROSSMAN, A.; TAKAHASHI, H. Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p.163-210, 2001.
- GUAGLIUMI, P. **Pragas da cana-de-açúcar (Nordeste do Brasil)**. Rio de Janeiro: IAA, 1972/73. 622p.

- GUNDLACH, H.; MÜELLER, M.J.; KUTCHAN, T.M. et al. Jasmonic acid is a signal inducer in elicitor-induced plant-cell cultures. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.89, p.2389-2393, 1992.
- HALITSCHKE, R.; SCHITTKO, U.; POHNERT, G. et al. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty acid-amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore-specific plant responses. **Plant Physiology**, v.125, p.711-717, 2001.
- HALITSCHKE, R.; GASE, K.; HUI, D. et al. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VI. Microarray analysis reveals that most herbivore-specific transcriptional changes are mediated by fatty acid-amino acid conjugates. **Plant Physiology**, v.131, p.1894-1902, 2003.
- HARBORNE, J.B. Flavonoid pigments. In: ROSENTHAL, G.A.; BEREMBAUM, M.R. (Ed.). **Herbivores and their interaction with secondary metabolites**. London: Academic Press, 1991. p.389-429.
- HARUTA, M.; MAJOR, I.T.; CHRISTOPHER, M.E. et al. A Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. **Plant Molecular Biology**, v.46, n.3, p.347-359, 2001.
- HEIL, M.; BALDWIN, I.T. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. **Trends in Plant Science**, v.7, p.61-67, 2002.
- HEITZ, T.; BERGEY, D.R.; RYAN, C.A. A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, v.114, p.1085-1093, 1997.

- HEMBERGER, M.; CROSS, J.C.; ROPERS, H.H. et al. Unigene cDNA array-based monitoring of transcriptome changes during mouse placental development. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.98, p.13126-13131, 2001.
- HERDE, O.; ATZORN, R.; FISAHN, J. et al. Localized wounding by heat initiates the accumulation of proteinase inhibitor II in abscisic acid-deficient plants by triggering jasmonic acid biosynthesis. **Plant Physiology**, v.112, p.853-860, 1996.
- HERMSMEIER, D.; SCHITTKO, U.; BALDWIN, I.T. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. **Plant Physiology**, v.125, p.683-700, 2001.
- HERVÉ, C.; PERRET, E.; TREMOUSAYGUE, D. et al. Differential screening using high density filters reveals a dramatic change in gene expression at different grown phase in *Arabidopsis* cell suspension cultures. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.34, n.3, p.425-430, 1996.
- HILDEBRAND, D.F. Lipoxygenases. **Physiologia Plantarum**, v.76, p.249-253, 1989.
- HINES, M. E.; OSUALA, C. I.; NIELSEN, S. S. Isolation and partial characterization of a soybean cystatin cysteine proteinase inhibitor of Coleopteran digestive proteolytic activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p.1515-1520, 1991.
- HOEVEN, R.V.; RONNING, C.; GIOVANNONI, J. et al. Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. **The Plant Cell**, v.14, p.1441-1456, 2002.
- HOGARTH, D. Genetics of sugarcane. IN: HEINZ, D. J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier Press, 1987. p.255-271.

- HOWE, G.A.; LIGHTNER, J.; BROWSE, J. et al. An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. **The Plant Cell**, v.8, p.2067-2077, 1996.
- HUI, D.; IQBAL, J.; LEHMANN, K. et al. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. V. Microarray analysis and further characterization of large-scale changes in herbivore-induced mRNAs. **Plant Physiology**, v.131, p.1877-1893, 2003.
- ICHIKAWA, J.K.; NORRIS, A.; BANGERA, M.G. et al. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with epithelial cells: identification of differentially regulated genes by expression microarray analysis of human cDNAs. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.97, p.9659-9664, 2000.
- JANZEN, D.H.; RYAN, C.A.; LIENER, I.E. et al. Potentially defensive proteins in mature seeds of 59 species of tropical leguminosae. **Journal of Chemical Ecology**, v.12, p.1469-1480, 1986.
- JONAK, C.; BEISTEINER, D.; BEYERLY, J. et al. Wound-induced expression and activation of wip1, a novel glycogen synthase kinase 3. **The Plant Cell**, v.12, p.1467-1476, 2000.
- JONGSMA, M.A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v.43, n.10, p.885-895, 1997.
- JOUANIN, L.; BONADE-BOTTINO, M.; GIRARD, C. et al. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, v.131, p.1-11, 1998.
- JUNG, H.W.; HWANG, B.K. Isolation, partial sequencing and expression of pathogenesis-related cDNA genes from pepper leaves infected by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.13, p.136-142, 2000.
- KARBAN, R.; BALDWIN, I.T. **Induced responses to herbivory**. Illinois: University of Chicago Press, 1997. p.?

- KATO, M.; HAYAKAWA, Y.; HYODO, H. et al. Wound-induced ethylene synthesis and expression and formation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase, ACC oxidase, phenylalanine ammonia-lyase, and peroxidase in wounded mesocarp tissue of *Cucurubita maxima*. **Plant Cell Physiology**, v.41, p.440-447, 2000.
- KEPPLER, L.D.; NOVACKY, A. The initiation of membrane lipid peroxidation during bacteria-induced hypersensitive reaction. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.30, p.233-245, 1987.
- KERNAN, A.; THORNBERG, R.W. Auxin levels regulate the expression of a wound-inducible proteinase inhibitor II-chloramphenicol acetyl transferase gene fusion *in vitro* and *in vivo*. **Plant Physiology**, v.91, p.73-78, 1989.
- KESSLER, A.; BALDWIN, I.T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. **Science**, v.291, p.2141-2144, 2001.
- KHAN, J.; BITTNER, M.L.; CHEN, Y. et al. DNA microarray technology: the anticipated impact on the study of human disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1423, p.M17-M28, 1999.
- KIM, J.; HARTER, K.; THEOLOGIS, A. Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.94, p.11786-11791, 1997.
- KIM, S.; HONG, Y.; AN, C.S. et al. Expression characteristics of serine proteinase inhibitor II under variable environmental stress in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). **Plant Science**, v.161, p.27-33, 2001.
- KING, E.G.; HARTLEY, G.G. *Diatraea saccharalis*. IN: SINGH, H.P.; MOORE, R.F. (Ed.). **Handbook of insect rearing**. New York: Elsevier, 1985. p.265-270.
- KLIEBENSTEIN, D.J.; KROYMANN, J.; BROWN, P. et al. Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. **Plant Physiology**, v.126, n.2, p.8811-8825, 2001.

- KOCH, E.; MEIER, B.M.; EIBEN, H.G. et al. A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is induced in response to plant pathogenic pseudomonads. **Plant Physiology**, v.99, p.571-576, 1992.
- KORTH, K.L.; DIXON, R.A. Evidence for chewing insect-specific molecular events distinct from a general wound response in leaves. **Plant Physiology**, v.115, p.1299-1305, 1997.
- KOZIAN, D.H.; KIRSCHBAUM, B.J. Comparative gene-expression analysis. **Trends in Biotechnology**, v.17, p.73-78, 1999.
- KUHN, K.M.; DeRISI, J.L.; BROWN, P.O. et al. Global and specific translational regulation in the genomic response of *Saccharomyces cerevisiae* to a rapid transfer from a fermentable to a nonfermentable carbon source. **Molecular and Cellular Biology**, v.21, p.916-927, 2001.
- KUZMA, M.M.; HUNG, S.; LAYZELL, D.B. Role of oxygen in the limitation and inhibition of nitrogenase activity and respiration rate in individual soybean nodules. **Plant Physiology**, v.101, p.161-169, 1993.
- LAFUENTE, M.T.; ZACARIAS, L.; MARTINEZ-TELLEZ, M.A. et al. Phenylalanine ammonia-lyase as related to ethylene in the development of chilling symptoms during cold storage of citrus fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.6020-6025, 2001.
- LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v.27, p.969-978, 1988.
- LASHKARI, D.A.; DeRISI, J.L.; McCUSKER, J.H. et al. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.94, p.13057-13062, 1997.
- LENNON, G.G.; LEHRACH, H. Hybridization analyses of arrayed cDNA Libraries. **Trends in Genetics**, v.7, p.314-317, 1991.
- LEÓN, J.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.J. Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.37, p.373-380, 1999.

- LEPLÉ, J.C.; BONADE-BOTTINO, M.; AUGUSTIN, S. et al. Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. **Molecular Breeding**, v.1, p.319-328, 1995.
- LI, S.; ROSS, D.T.; KADIN, M.E. et al. Comparative genome-scale analysis of gene expression profiles in T cell lymphoma cells during malignant progression using a complementary DNA microarray. **American Journal of Pathology**, v.158, p.1231-1237, 2001.
- LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, v.257, p.967-971, 1992.
- LORENZO, O.; PIQUERAS, R.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.J. et al. Ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **The Plant Cell**, v.15, p.165-178, 2003.
- MA, H.M.; SCHULZE, S.; LEE, S. et al. An EST survey of the sugarcane transcriptome. **Theoretical and Applied Genetics**, publicação *on line* (29 nov. 2003).
- MAGUIRE, T.L.; GRIMMOND, S.; FORREST, A. et al. Tissue-specific gene expression in soybean (*Glycine max*) detected by cDNA microarray analysis. **Journal of Plant Physiology**, v.159, p.1361-1374, 2002.
- MARKHAM, K.R. Flavones, flavonols and their glycosides. In: MARKHAM, K.R. (Ed.). **Methods in plant biochemistry**. London: Academic Press, 1989. p.197-235.
- MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M.A.; LAFUENTE, M.T. Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia lyase, peroxidase and polyphenol oxidase activities in flavedo of chilling 'fortune' fruit. **Journal of Plant Physiology**, v.150, p.674-678, 1997.
- MARUYAMA-NAKASHITA, A.; INOUE, E.; WATANABE-TAKAHASHI, A. et al. Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in arabidopsis reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. **Plant Physiology**, v.132, p.597-605, 2003.

- MASON, H.S.; MULLET, J.E. Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding, and jasmonic acid. **The Plant Cell**, v.2, p.569-579, 1990.
- MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.F; ARIZONO, H. Melhoria da cana-de-açúcar. IN: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p.205-251.
- MAUCH, F.; KMECL, A.; SCHAFFRATH, U. et al. Mechanosensitive expression of a lipoxygenase gene in wheat. **Plant Physiology**, v.114, p.1561-1566, 1997.
- MAYER, A.M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, v.18, p.193-215, 1979.
- McCONN, M.; CREELMAN, R.A.; BELL, E. et al. Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.94, p.5473-5477, 1997.
- McGURL, B.; PEARCE, G.; OROZCO-CARDENAS, M. et al. Structure, expression and antisense inhibitor of the systemin precursor gene. **Science**, v.255, p.1570-1572, 1992.
- McGURL, B.; MUKHERJEE, S.; KAHN, M. et al. Characterization of two proteinase inhibitor (ATI) cDNAs from alfalfa leaves (*Medicago sativa* var. Vernema): the expression of ATI genes in response to wounding and soil microorganisms. **Plant Molecular Biology**, v.27, p.995-1001, 1995.
- MELAN, M.A.; DONG, X.; ENDARA, M.E. et al. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, v.101, p.441-450, 1993.
- MELLO, M.O.; SILVA-FILHO, M.C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.14, p.71-81, 2002.
- MELLO, M.O.; TANAKA, A.S.; SILVA-FILHO, M.C. Molecular evolution of Bowman-Birk type proteinase inhibitors in flowering plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.27, p.103-112, 2003.

- MÉLO, A.B.P. Biologia de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) em diferentes temperaturas para determinação das exigências térmicas. Piracicaba, 1984. 101p. Tese (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- METCALFE, J.R. The estimation of loss caused by sugar cane moth borers. IN: METCALFE, R.J. **Pest of sugar cane**. Amsterdam: Elsevier Publishing, 1969. p.61-75.
- MEURIOT, F.; NOQUET, C.; AVICEA, J.C. et al. Methyl jasmonate alters N partitioning, N reserves accumulation and induces gene expression of a 32-kDa vegetative storage protein that possesses chitinase activity in *Medicago sativa* taproots. **Physiologia Plantarum**, v.120, p.113-123, 2004.
- MEYER, A.; MIERSCH, O.; BUTTER, C. et al. Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.3, p.1-8, 1984.
- MILLES, A.A.L.; MISRA, S.S. The estimation of bacterial power of blood. **Journal of Hygiene**, v.38, p.732-749, 1938.
- MORTON, R.L.; SCHROEDER, H.E.; BATEMAN, K.S. et al. Bean α -amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.97, p.3820-3825, 2000.
- MOURA, D.S.; RYAN, C.A. Wound-inducible proteinase inhibitors in pepper. Differential regulation upon wounding, systemin, and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, v.126, p.289-298, 2001.
- NADON, R.; SHOEMAKER, J. Statistical issues with microarrays: processing and analysis. **Trends in Genetics**, v.18, n.5, p.265-271, 2002.
- NAP, J.P.; BISSELING, T. The roots of nodulins. **Physiologia Plantarum**, v.79, p.407-414, 1990.
- NAPIER, R.M.; VENIS, M.A. Auxin action and auxin-binding proteins. **New Phytologist**, v.129, p.167-201, 1995.

- NARUSAKA, Y.; NARUSAKA, M.; SEKI, M. et al. The cDNA microarray analysis using an *Arabidopsis pad3* mutant reveals the expression profiles and classification of genes induced by *Alternaria brassicicola* attack. **Plant and Cell Physiology**, v.44, p.377-387, 2003.
- NEDEVI, E.; HEVRONI, D.; NAOT, D. et al. Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning. **Nature**, v.361, p.718-722, 1993.
- NEGREIROS, A.N.M.; CARVALHO, M.M.; XAVIER-FILHO, J. et al. The complete amino acid sequence of the major Kunitz trypsin inhibitor from the seeds of *Prosopis juliflora*. **Phytochemistry**, v.30, p.2829-2833, 1991.
- NGUYEN, C.; ROCHA, D.; GRANJEAUD, S. et al. Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization on arrayed cDNA clones. **Genomics**, v.29, p.207-216, 1995.
- NISHIDA, R. Sequestration of defensive substances from plants by lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v.47, p.57-92, 2002.
- NIZETIC, D.; ZEHETNER, G.; MONACO, A.P. et al. Construction, arraying, and high-density screening of large insert libraries of human chromosomes X and 21: their potential use as reference libraries. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.88, p.3233-3237, 1991.
- NOGUEIRA, F.T.S.; DeROSA JÚNIOR., V.E.; MENOSSI, M. et al. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. **Plant Physiology**, v.132, p.1811-1824, 2003.
- NOQUET, C.; AVICE, J.C.; OURRY, A. et al. Effects of environmental factors and endogenous signals on N uptake, N partitioning and taproot storage protein accumulation in *Medicago sativa*, **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.279-288, 2001.
- O'DONNELL, P.J.; CALVERT, C.; ATZORN, R. et al. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. **Science**, v.274, p.1914-1917, 1996.

- OHLROGGE, J.; BENNING, C. Unraveling plant metabolism by EST analysis. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, p.224-228, 2000.
- OLIVEIRA, M.N.S.; OLIVA, M.A.; MARTÍNEZ, C.A. et al. Stomatal sensitivity to ABA related to pH and NO^{-3} , PO_4^{-3} and Ca^{+2} levels of xylem sap. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.14, p.117-123, 2002.
- ORLANDO-FILHO, J.; MACEDO, N.; TOKASHI, H. Seja doutor do seu canavial. **Arquivo do Agrônomo**, n.6, p.1-17, 1994.
- OURRY, A.; MacDUFF, J.; VOLENEC, J.J. et al. Nitrogen traffic during plant growth and development. IN: MOROT-GAUDRY, J.F.; LEA, P. (Ed.). **Plant Nitrogen**. Heidelberg: Springer Verlag, 2001. p 255-273.
- PARADIES, I.; KONZE, J.R.; ELSTNER, E.F. Ethylene. Indicator but not inducer of phytoalexin synthesis in soybean. **Plant Physiology**, v.66, p.1106-1109, 1980.
- PARÉ, P.W.; TUMLINSON, J.H. De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. **Plant Physiology**, v.114, p.1161-1167, 1997.
- PARRA, J.R.P. Controle das principais pragas da cana-de-açúcar. IN: CÂMARA, G.M.S.; OLIVEIRA, E.A.M. de (Ed.). **Produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: FEALQ, 1993. p.184-197.
- PASSOS, G.A.S.; NGUYEN, C.; JORDAN, B. Projeto transcriptoma: análise da expressão gênica em larga escala usando DNA-arrays. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.12, p.34-37, 2000.
- PEARCE, G.; STRYDOM, D.; JOHNSON, S. et al. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. **Science**, v.253, p.895-898, 1991.
- PEÑA-CORTÉS, H.; PRAT, S.; ATZORN, R. et al. Absciscic acid-deficient plants do not accumulate proteinase inhibitor II following systemin treatment. **Planta**, v.198, p.447-451, 1996.

- PEÑA-CORTÉS, H.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.J.; MERTENS, R. et al. Absciscic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.86, p.9851-9855, 1989.
- PEÑA-CORTÉS, H.; WILLMITZER, L.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.J. Absciscic acid mediates wound induction but not developmental-specific expression of the proteinase inhibitor II gene family. **The Plant Cell**, v.3, p.963-972, 1991.
- PERNAS, M.; SÁNCHEZ-MONGE, R.; SALCEDO, G. Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. **Federation of European Biochemical Societies**, v.467, p. 206-210, 2000.
- PERRET, E.; FERRAN, E.A.; MARINX, O. et al. Improved differential screening approach to analyse transcriptional variations in organized cDNA libraries. **Gene**, v.208, p.103-115, 1998.
- PIÉTU, G.; ALIBERT, O.; GUICHARD, V. et al. Novel gene transcripts preferentially expressed in human muscles revealed by quantitative hybridization of a high density cDNA array. **Genome Research**, v.6, p.429-503, 1996.
- POMPERMAYER, P.; LOPES, A.R.; TERRA, W.R. et al. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.99, p.79-85, 2001.
- POMPERMAYER, P.; FALCO, M.C.; PARRA, J.R.P. et al. Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz-type soybean proteinase inhibitor effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.109, p.217-224, 2003.
- PRASHER, D.C.; ECKENRODE, V.K.; WARD, W.W. et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. **Gene**, v.111, p.229-233, 1992.
- PROSSIGA. www.prossiga.br/basededados (20 nov. 2002).

- RACUSEN, D.; FOOTE, M. A major soluble glycoprotein of potato tuber. **Journal of Food Biochemistry**, v.4, p.43-52, 1980.
- RAKWAL, R.; AGRAWAL, G.K.; JWA, N. Characterization of a rice (*Oriza sativa* L.) bowman-birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. **Gene**, v.263, p.189-198, 2001.
- REYMOND, P.; FARMER, E.E. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. **Current Opinion in Plant Biology**, v.1, p.404-411, 1998.
- REYMOND, P.; WEBER H.; DAMOND, M. et al. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v.12, p.707-719, 2000.
- RICKAUER, M.; BOTTIN, A.; ESQUERRE-TUGAYE, M. Regulation of proteinase inhibitor production in tobacco cells by fungal elicitors, hormonal factors and methyl jasmonate. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.30, p.579-584, 1992.
- ROACH, B.T. Case for a core collection of sugarcane germplasm. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, v.21, p.339-350, 1995.
- ROHRMEIER, T.; LEHLE, L. WIP1, a wound-inducible gene from maize with homology to Bowman-Birk proteinase inhibitors. **Plant Molecular Biology**, v.22, p.783-792, 1993.
- ROJO, E.; TITARENKO, E.; LEON, J. et al. Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.13, p.153-165, 1998.
- ROMEIS, T.; PIEDRAS, P.; ZHANG, S. et al. Rapid Avr9- and Cf-9 -dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. **The Plant Cell**, v.11, p.273-287, 1999.

- ROSSATO, L.; MacDUFF, J.H.; LAINÉ, P. et al. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: effects of methyl jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth and VSP accumulation. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1131-1141, 2002.
- ROY, I.; GUPTA, M.N. Purification of a “double-headed” inhibitor of alpha-amylase/proteinase K from wheat germ by expanded bed chromatography. **Bioseparation**, v.9, p.239-245, 2000.
- RYAN, C.A. Assay and biochemical properties of the proteinase inhibitor-induced factor, a wound hormone. **Plant Physiology**, v.54, p.328-332, 1974.
- RYAN, C.A. Proteinase inhibitor in plants: genes for improving defense against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, p.425-449, 1990.
- RYAN, C.A. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1477, p.112-121, 2000.
- RYAN, C.A.; PEARCE, G. Systemin: a polypeptide signal for plant defensive genes. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.14, p.1-17, 1998.
- SALES, M.P.; GERHARDT, I.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. et al. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? **Plant Physiology**, v.124, p.515-522, 2000.
- SARAVITZ, D.M.; SIEDOW, J.N. The lipoxygenase isozymes in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) leaves: changes during leaf development, after wounding, and following reproductive sink removal. **Plant Physiology**, v.107, p.535-543, 1995.
- SARAVITZ, D.M.; SIEDOW, J.N. The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. **Plant Physiology**, v.110, p.287-299, 1996.
- SARGENT, T.D. Isolation of differentially expressed gene. **Methods in Enzymology**, v.152, p.423-432, 1987.

- SASAKI, T. The rice genome project in Japan. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.95, p.2027-2028, 1998.
- SASAKI, Y.; ASAMIZU, E.; SHIBATA, D. et al. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. **DNA Research**, v.8, p.153-161, 2001.
- SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v.101, p.7-12, 1993.
- SCHAFFER, R.; LANDGRAF, J.; ACCERBI, M. et al. Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v.13, p.113-123, 2001.
- SCHALLER, A.; RYAN, C.A. Systemin – a polypeptide defense signal in plants. **BioEssays**, v.18, p.27-33, 1995.
- SCHEMA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W. et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v.270, p.467-470, 1995.
- SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; HELLER, R. et al. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.97, p.11655-11660, 2000.
- SCHITTKO, U.; HERMSMEIER, D.; BALDWIN, I.T. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. II. Accumulation of plant mRNAs in response to insect-derived cues. **Plant Physiology**, v.125, p.701-710, 2001.
- SCHUMMER, M.; NG, W.V.; BUMGARNER, R.E. et al. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. **Gene**, v.238, p.375-385, 1999.

- SCHWEIZER, P.; BUCHALA, A.; METRAUX, J. Gene-expression patterns and levels of jasmonic acid in rice treated with the resistance inducer 2,6-dichloroisonicotinic acid. **Plant Physiology**, v.115, p.61-70, 1997.
- SCOTT, J.G.; WEN, Z.M. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. **Pest Management Science**, v.57, p.958-967, 2001.
- SCREENIVASAN, T.V.; AHLOOWALIA, B.S.; HEINZ, D.J. Cytogenetics. IN: HEINZ, D.J. (Ed.). **Sugarcane improvement trough breeding**. Amsterdam: Elsevier Press, 1987. p.211-253.
- SEKI, M.; ISHIDA, J.; NARUSAKA, M. et al. Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. **Functional & Integrative Genomics**, v.2, p.282-291, 2002.
- SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ABE, H. et al. Monitoring the expression pattern of 1,300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stress by using a full-length cDNA microarray. **The Plant Cell**, v.13, p.61-72, 2001.
- SEMBDNER, G.; PARTHIER, B. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.44, p.569-589, 1993.
- SEO, S.; SANO, H.; OHASHI, Y. Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of wipk, a tobacco mitogen-activated protein kinase. **The Plant Cell**, v.11, p.289-298, 1999.
- SGRILLO, R.B. Desenvolvimento de modelo matemático para população da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) e simulação da técnica do indivíduo estéril. Piracicaba, 1979. 189p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SHARMA, H.C.; NORRIS, D.M. Chemical basis of resistance in soyabean to cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.55, p.353-364, 1991.

- SILVA, C.P.; TERRA, W.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. et al. Induction of digestive α -amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α -amylase inhibitor 1. **Journal of Insect Physiology**, v.47, n.11, p.1283-1290, 2001.
- SITBON, F.; PERROT-RECHENMANN, C. Expression of auxin-regulated genes. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.443-455, 1997.
- SOMERVILLE, C.; BROWSE, J.; JAWORSKI, J.G. et al. Lipids. IN: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p.456-527.
- SOMMER, A.; NE'EMAN, E.; STEFFENS, J.C. et al. Importing, targeting, and processing of a plant polyphenol oxidase. **Plant Physiology**, v.105, p.1301-1311, 1994.
- STASWICK, P.E. Storage proteins of vegetative plant tissues. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.45, p.303-322, 1994.
- STOHL, L.L.; LAMBOWITZ, A.M. A colony filter-hybridization procedure for the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Analytical Biochemistry**, v.134, p.82-85, 1983.
- STOUT, M.J.; FIDANTSEF, A.L.; DUFFEY, S.S. et al. Signal interactions in pathogen and insect attack: systemic plant mediated interactions between pathogens and herbivores of the tomato, *Lycopersum esculentum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.54, p.115-130, 1999.
- STRATMANN, J.W.; RYAN, C.A. Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharidae elicitors. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.94, p.11085-11089, 1997.
- STRAUSS, S.Y.; AGRAWAL, A.A. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. **Trends in Ecology and Evolution**, v.14, p.79-185, 1999.

- STRICKLAND, J.A.; ORR, G.L.; WALSH, T.A. Inhibition of diabrotica larval growth by patatin, the lipid acyl hydrolase from potato tubers. **Plant Physiology**, v.109, p.667-674, 1995.
- STUPIELLO, J.P. A cana-de-açúcar como matéria prima. IN: PARANHOS, S.B. (Coord.). **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v.2, p.187-259.
- TANAKA, A.S.; SAMPAIO, M.U.; MENTELE, R. et al. Sequence of a new Bowman-Birk inhibitor from *Torresea acreana* seeds and comparison with *Torresea cearensis* trypsin inhibitor (TcTI2). **Journal of Protein Chemistry**, v.15, n.6, p.553-560, 1996.
- TANAKA, T.S.; JARADAT, S.A.; LIM, M.K. et al. Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse developmental cDNA microarray. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.97, p.9127-9132, 2000.
- TELLES, G.P.; DaSILVA, F.R. Trimming and clustering sugarcane ESTs. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, p.17-23, 2001.
- TERÁN, F.O. Pragas da cana-de-açúcar. IN: PARANHOS, S.B. (Coord.) **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v.2, p.605-628.
- TERÁN, F.O.; SANCHEZ, A.G.; PRECETTI, A.A.C.M. **Estudos sobre resistência da cana à broca em telado. Primeiros resultados**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1985. p.2-11. Boletim Técnico 29.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes - properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry**, v.109, p.1-62, 1994.
- THALER, J.S.; STOUT, M.J.; KARBAN, R. et al. Exogenous jasmonates simulate insect wounding in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in the laboratory and field. **Journal of Chemical Ecology**, v.22, p.1767-1781, 1996.

- THIMM, O.; ESSIGMANN, B.; KLOSKA, S. et al. Response of *Arabidopsis* to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. **Plant Physiology**, v.127, p.1030-1043, 2001.
- TIFFIN, P.; GAUT, B.S. Molecular evolution of the wound-induced serine proteinase inhibitor wip1 in zeo and related genera. **Molecular Biology and Evolution**, v.18, n.11, p.2092-2101, 2001.
- TRESE, A.T.; PUEPPKE, S.G. Cloning of cowpea (*Vigna unguiculata*) genes that are regulated during initiation of nodulation. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.4, p.46-51, 1991.
- TURLING, T.C.J.; TUMLINSON, J.K.; LEWIS, W.J. Exploration of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. **Science**, v.250, p.1251-1253, 1990.
- TURNER, J.G.; ELLIS, C.; DEVOTO, A. The jasmonate signal pathway. **The Plant Cell**, v.14, S153-S164, 2002.
- USINAS E DESTILARIAS DO OESTE PAULISTA – UDOP. **Copersucar comercializa 17 variedades de cana**. Agência UDOP de notícias. www.nuca.ie.ufrj.br/infosucro/arquivos/boletim020.htm#3_2 (13 nov. 2001).
- UTSUGI, S.; SAKAMOTO, W.; MURATA, M. et al. *Arabidopsis thaliana* vegetative storage protein (VSP) genes: gene organization and tissue-specific expression. **Plant Molecular Biology**, v.38, p.565-576, 1998.
- VAN DE WIEL, C.; NORRIS, J.H.; BOCHENEK, B. et al. Nodulin gene expression and ENOD2 localization in effective, nitrogen-fixing and ineffective, bacteria-free nodules of alfalfa. **The Plant Cell**, v.2, p.1009-1017, 1990.
- VANDENBOSCH, K.A.; RODGERS, L.R.; SHERRIER, D. et al. A peanut nodule lectin in infected cells and in vacuoles and the extracellular matrix of nodule parenchyma. **Plant Physiology**, v.104, p.327-337, 1994.
- VANHAL, N.L.; VORST, O.; VANHOUWELINGEN, A.M. et al. The application of DNA microarrays in gene expression analysis. **Journal of Biotechnology**, v.78, p.271-280, 2000.

- VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOLGENSTEIN, B. et al. Serial analysis of gene-expression. **Science**, v.270, p.484-487, 1995.
- VENDRAMIN, J.D. Técnicas para avaliação da infestação de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794, Lepidoptera: Pyralidae) em cultivares de cana-de-açúcar, com base no complexo broca-podridões. Piracicaba, 1987. 156p. Tese (Livre-Docência) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- VENDRAMIM, J.D.; SILVA, F.C.; CAMARGO, A.P. Avaliação das dimensões da região danificada pelo complexo broca-podridões em seis cultivares de cana-de-açúcar. Separata de **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.18, p.105-118, 1989.
- VETTORE, A.L.; SILVA, F.R.; KEMPER, E.L. et al. The libraries that made **SUCEST**. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, p.1-7, 2001.
- VETTORE, A.L.; SILVA, F.R.; KEMPER, E.L. et al. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, v.13, p.2725-2735, 2003.
- VICK, B.A.; ZIMMERMANN, D.C. Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. **Plant Physiology**, v.75, p.458-461, 1984.
- VLIEGHE, K.; VUYLSTEKE, M.; FLORQUIN, K. et al. Microarray analysis of *E2Fa-DPa*-overexpressing plants uncovers a cross-talking genetic network between DNA replication and nitrogen assimilation. **Journal of Cell Science**, v.116, p.4249-4259, 2003.
- WAN, J.S.; SHARP, S.J.; POIRIER, G.M.C. et al. Cloning differentially expressed mRNAs. **Nature Biotechnology**, v.14, p.1685-1691, 1996.
- WANG, J.; SHEEHAN, M.; BROOKMAN, H. et al. Characterization of cDNAs differentially expressed in roots of tobacco (*Nicotiana tabacum* cv Burley 21) during the early stages of alkaloid biosynthesis. **Plant Science**, v.158, p.19-32, 2000.

- WANG, R.; GUEGLER, K.; LaBRIE, S.T. et al. Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. **The Plant Cell**, v.12, p.1491-1509, 2000.
- WANG, X.R.; DING, X.F.; GOPALAKRISHNAN, B. et al. Characterization of a 46 kDa insect chitinase from transgenic tobacco. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.26, p.1055-1064, 1996.
- WANG, Y.H.; GARVIN, D.F.; KOCHIAN, L.V. Nitrate-induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. **Plant Physiology**, v.127, p.345-359, 2001.
- WASTERNAK, C.; ATZORN, R.; PEÑA-CORTÉS, H. et al. Alteration of gene expression by jasmonate and ABA in tobacco and tomato. **Journal of Plant Physiology**, v.147, p.503-510, 1996.
- WASTERNAK, C.; PARTHIER, B. Jasmonate-signaled plant gene expression. **Trends in Plant Science**, v.2, p.302-307, 1997.
- WATAKABE, A.; SUGAI, T.; NAKAYA, N. et al. Similarity and variation in gene expression among human cerebral cortical subregions revealed by DNA macroarrays: technical consideration of RNA expression profiling from postmortem samples. **Molecular Brain Research**, v.88, p.74-82, 2001.
- WHITE, K.P.; RIFKIN, S.A.; HURBAN, P. et al. Microarray analysis of *Drosophila* development during metamorphosis. **Science**, v.286, p.2179-2184, 1999.
- WHITE, W.H. Movement and establishment of sugarcane borer (Lepidoptera: Pyralidae) larvae on resistant and susceptible sugarcane. **Florida Entomologist**, v.76, n.3, p.465-473, 1993.
- WITTENBACH, V.A. Purification and characterization of a soybean leaf storage glycoprotein. **Plant Physiology**, v.73, p.125-129, 1983.
- XIONG, L.; LEE, M.; QI, M. et al. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, p.685-692, 2001.

- YANG, K.Y.; LIU, Y.; ZHANG, S. Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.98, p.741-746, 2001.
- YENCHO, G.C.; COHEN, M.B.; BYRNE, P.F. Applications of tagging and mapping insect resistance loci in plants. **Annual Review of Entomology**, v.45, p.393-422, 2000.
- YOO, J.H.; CHEONG, M.S.; PARK, C.Y. et al. Regulation of the dual specificity protein phosphatase, *DsPTP1*, through interactions with calmodulin. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.848-858, 2004.
- ZANGERL, A.R. Furanocoumarin induction in wild parsnip: evidence for an induced defense against herbivores. **Ecology**, v.71, n.5, p.1926-1932, 1990.
- ZHANG, S.; AND KLESSIG, D.F. Resistance gene N-mediated de novo synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.95, p.7433-7438, 1998.
- ZHAO, N.; HASHIDA, H.; TAKAHASHI, N. et al. High-density cDNA filter analysis: a novel approach for large-scale, quantitative analysis of gene expression. **Gene**, v.156, p.207-213, 1995.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Solução OLB

*Solução OLB = Solução A + Solução B + Solução C = 1 : 2,5 : 1,5

- Solução A

1 ml de Solução O

1,8% (v/v) de 2-mercaptoetanol

1,5% (v/v) de mix d(ATG)TP (100mM)

- Solução B

2M HEPES-NaOH pH 6,6

- Solução C

3mM Tris-HCl pH 7,4

0,2mM EDTA

- Solução O

1.25M Tris-HCl pH 8,0

125mM MgCl₂

APÊNDICE 2 – Programação para Análise da Otimização da Técnica

```

data carla ;
do clone = 1 to 4608 ;
do memb = 1 to 2 ;
do spot = 1 to 2 ;
input leitura @@ ;
output ;
end ;
end ;
end ;
cards ;
... ;
run ;
proc sort ; by clone leitura ; run ;
proc print ; run ;
data dados2 ; set carla ; retain cl ; by clone ;
if first.clone and leitura = 0. then cl = clone ;
put cl clone ; if clone = cl then delete ;
run ;
proc print data = dados2 ; run ;
data analise ; set dados2 ;
log_leitura = log (leitura + 1) ; run ;
proc print data= analise ;
title 'Dados para verificação' ; run ;
proc anova data= analise ;
title 'Análise Conjunta' ;
class clone memb spot ;
model log_leitura = memb spot(memb) clone clone*memb ; run ;

```

APÊNDICE 3 – Programação para Normalização com a Sonda Overgo

```

data carla ;
do clone=1 to 3840 ;
do memb=1 to 6 ;
do spot=1 to 2 ;
input leitura @@ ;
output ;
end ;
end ;
end ;
cards ;
... ;
run ;

proc sort ; by clone leitura ; run ;
proc print ; run ;

data dados2 ; set carla ; retain cl ; by clone ;
if first.clone and leitura = 0. then cl = clone ;
put cl clone ; if clone = cl then delete ; run ;
proc print data = dados2 ; run ;

data analise ; set dados2 ; log_leitura = log (leitura + 1) ; run ;
proc print data = analise ; title 'Dados para verificação'; run ;
proc sort ; by clone ; run ;

proc means noprint mean ; by clone ; var log_leitura ;
output out=var var=variância ; run ;

proc sort data = var ; by variância ; run ; proc print ; run ;
proc univariate data = var normal plot ;
var variância ;
run ;

```

APÊNDICE 4 – Programação para Normalização com a Sonda de cDNA

```
data carla ;
do clone=1 to 3840 ;
do spot=1 to 2 ;
input leitura @@ ;
output ;
end ;
end ;
cards ;
... ;
run ;

data normalizacao ; set carla ;
if clone =          then delete ;
... ;
run ;

proc sort ; by clone leitura ; run ;
proc print ; run ;

data analise ; set normalizacao ;
log_leitura = log (leitura + 1) ; run ;
proc print data = analise ; title 'Dados para verificação'; run ;
proc sort ; by clone ; run ;
proc means noprint mean ; by clone ;
var log_leitura ;
output out=var var=variância ; run ;
proc sort data = var ; by variância ; run ; proc print ; run ;
proc univariate data = var normal plot ;
var variância ; run ;
```

**APÊNDICE 5 – Clones Selecionados da Variedade Susceptível (SP80-3280)
com Indução em Apenas um Tempo**

30 minutos CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACAD1038A11	AtB'gamma - like protein
SCACLR1126G09	ND
SCACLR1128C10	ND
SCACLR1129F12	F1N21.12
SCACLR1132A07	ND
SCACLR2007E11	ND
SCACLR2022A12	receptor-like protein kinase 1
SCAGLR2018H08	ND
SCAGLR2026G02	ND
SCBGLR1095H05	ND
SCBGLR1097H10	ND
SCBGLR1100D12	ND
SCBGLR1119B11	THA4
SCBGRT1053H02	lipoxygenase
SCBGST3103A02	ND
SCBGST3107G04	shoot meristemless
SCBGST3111B08	ND
SCCCCL4015B02	putative glutathione S-transferase OsGSTU4
SCCCFL3001G02	jacalin homolog
SCCCLR1C09D05	ND
SCCCLR2001G10	ND
SCCCLR2004C05	ND
SCCCLR2C01B10	ND
SCCCST1C06D01	S-receptor kinase
SCCCST3083H05	ND
SCEPRZ1011G10	putative cinnamyl-alcohol dehydrogenase
SCEQLR1091G01	cotton fiber expressed protein 1
SCEQLR1092A01	auxin-binding protein 4 precursor
SCEZHR1086B06	whitefly-induced gp91-phox
SCEZLR1031F04	G-box binding factor 1
SCEZLR1031G08	lipid-transfer protein precursor
SCEZRT2020A03	chaperonin; similar to GroEL protein
SCJFAD1010F07	Myb factor protein [Oryza sativa]"
SCJFAD1012A08	auxin responsive transcription factor
SCJFST1047C06	probable carboxyl-terminal proteinase
SCJFST1047D08	D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase

SCJFST1047H12	wound-induced GSK-3-like protein
SCJFST1048H08	flavonol 3-O-glucosyltransferase-like protein
SCJLLR1103G06	ND
SCJLLR1106E04	ND
SCJLLR1107G06	ND
SCJLLR1108A10	ND
SCJLLR1108C11	putative U2 snRNP auxiliary factor
SCJLLR2006G06	ND
SCJLLR2006G12	Ykl160wp
SCJLRT1015B03	chitinase III C10150
SCJLRT1020E06	dihydrokaempferol 4-reductase A
SCMCLR1123B02	ND
SCMCLR1125H05	similar to wak1 gene (AJ009696)
SCMCST1049C07	ND
SCMCST1053D08	putative protein
SCMCST1058D11	similar to acyl-CoA dehydrogenases
SCQGSB1083E01	phenylalanine ammonia-lyase
SCQGST3124G07	ND
SCQGST3125C08	amidase
SCQSFL3034B10	isoflavone reductase homolog irl
SCQSRT2033F06	putative flavonoid 3'-hydroxylase
SCQSST3114B03	ND
SCQSST3115B02	protein kinase-like protein
SCQSST3115B12	ND
SCQSST3116B02	ND T24P15.19
SCRFST1041C03	ND F15J5.30
SCRFST1044B09	Contains similarity to MLL protein
SCRFST1045B03	ND
SCRLAM1007D07	F23N19.10
SCRLLR1111H07	ND
SCSBST3095E05	ND
SCSBST3098E09	C2H2-type zinc finger protein, putative
SCSBST3100G06	chlorophyll a-b binding protein m9 precursor
SCSFST1064G07	ND
SCSFST1064H01	ND
SCSFST1065B06	similar to putative reverse transcriptase
SCSFST1066F08	putative ubiquitin protein
SCSFST3076C11	dihydrolipoamide dehydrogenase precursor
SCSFST3078B04	ND
SCSGAD1009F02	cyclophylin-like protein
SCSGLV1005D02	ND
SCSGLV1007H04	ferredoxin I precursor
SCSGLV1009D03	ND
SCSGLV1009D06	ND
SCSGLV1013A05	endochitinase A2 precursor

SCSGRZ3063E01	arginine decarboxylase
SCSGST1072H02	probable serine/threonine-specific protein kinase
SCUTLR1037C05	putative oxalate oxidase (germin protein)
SCUTLR2008F03	ND
SCUTST3086D02	ND
SCUTST3086E08	ND
SCUTST3091G03	ND
SCUTST3127A02	ND
SCUTST3127E12	ND
SCUTST3128F07	ND F16J13.30
SCUTST3129E03	calcium-dependent protein kinase 9
SCUTST3130D10	disease resistance protein RPM1 homolog
SCUTST3131G03	lipid transfer protein
SCVPLR2012B05	ND
SCVPLR2012E12	cotton fiber expressed protein 1
SCVPLR2027C11	ND
SCVPRT2081C04	lactoylglutathione lyase
SCVPRZ3025F04	uncoupling protein mitochondrial
SCVPST1059F07	ND F3A4.70
SCVPST1060B02	ND
SCVPST1061F10	putative WD40-repeat protein
SCVPST1063H10	ND

6 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACLR1132D05	histone H3
SCACLR1132F08	ND
SCAGLR2011B04	60S ribosomal protein L18
SCAGLR2011C02	fructokinase
SCBFSD2035E07	thaumatin-like protein
SCBGLR1095H08	ND
SCBGLR1097G08	chloroplast thylakoidal processing peptidase
SCBGLR1100A04	ND
SCBGLR1100F12	ND
SCBGLR1112H05	ND
SCBGLR1113A07	ND
SCBGLR1119D12	ND
SCBGLR1120C03	ND
SCBGST3104C11	ND
SCBGST3105A03	ND
SCBGST3108B10	MtN3
SCBGST3108E12	myb-related transcription factor
SCBGST3111B04	ND
SCCCAD1004H02	catalase (EC 1.11.1.6) 3

SCCCLR1C01B12	ND
SCCCLR1C01G12	PPR-repeat protein, putative
SCCCLR1C04A01	putative homeodomain protein
SCCCLR1C09C11	ND
SCCCLR2001C02	Regulator of condensation-like protein
SCCCLR2002E03	ND
SCCCLR2004C09	ND
SCCCLR2C01E07	ND
SCCCLR2C02A01	putative wound-induced protein
SCCCLR2C02D06	ND
SCCCLV1001F07	putative Tub family protein
SCCCLV1001G08	ND
SCCCST1C02D08	putative receptor ser/thr protein kinase
SCCCST3002D02	MLA6 protein
SCCCST3002G01	ND
SCCCST3006B02	dnaJ protein homolog T9A4.1
SCEPCL6025G08	alpha-amylase/subtilisin inhibitor
SCEQLR1092D01	ND
SCEQLR1094C08	high mobility group I/Y-2
SCJFAD1012F11	LRK1 protein [Oryza sativa]"
SCJFAD1013H07	transport inhibitor response 1 (TIR1)
SCJFLR2035E12	Similar to Transposon MAGGY gag
SCJFLR2036C03	ND
SCJFST1047C03	protein phosphatase 2A regulatory subunit B'
SCJLLB2076C12	endochitinase A2 precursor
SCJLLR1102A03	ND
SCJLLR1102G03	ND
SCJLLR1104C09	ND
SCJLLR1105A01	histone H2A.4
SCJLLR1106A11	ND
SCJLLR2013C01	ND
SCMCLR1124C06	ND
SCMCLR1125A03	ND
SCMCLR1125A10	mitochondrial solute carrier protein homolog
SCMCST1050F09	late embryogenesis-like protein
SCMCST1051A10	ND
SCMCST1052H11	ND
SCMCST1058D07	palate associated transmembrane protein-like
SCMCST1058H08	ND
SCQGHR1012F03	polygalacturonase inhibitor
SCQGLR2010D05	ND
SCQGRT1041A06	pathogenesis-related protein
SCQGST3124E04	DnaJ protein-like
SCQGST3126E09	ND
SCQSLR1089F10	ND

SCQSRT3054H12	probable germin protein 4
SCQSST1040F12	ND
SCQSST3113D04	ND
SCRFLR2021A07	ND T23J7.160
SCRFLR2038A02	HOMODA hydrolase
SCRFLR2038C11	lysophospholipase-like protein
SCRFST1041A02	ND
SCRFST1041G03	ND
SCRFST1045F01	axi 1-like protein
SCRFST1046B08	eukaryotic initiation factor f subunit p82-34
SCRLLR1111A01	ND
SCRLLR1111C05	ND T8P19.40
SCSBRT3039E08	chitinase III C10501
SCSBST3093A05	ND
SCSBST3098C11	Oxalyl-CoA decarboxylase
SCSFRL2009E05	GDSL-motif lipase/hydrolase-like protein
SCSFST1066C11	ND
SCSFST1066G03	ND
SCSFST3074C01	peroxidase
SCSFST3075A09	probable omega-3 fatty acid desaturase
SCSFST3077C10	putative chromosome associated protein
SCSFST3078G01	ND
SCSFST3080G06	ND
SCSFST3081F05	ND
SCSFST3082E05	ND
SCSGAD1009A05	putative receptor-like protein kinase
SCSGHR1072F02	peroxidase 4 precursor
SCSGLV1006H02	ND
SCSGLV1007D05	ND
SCSGLV1008A09	ND
SCSGLV1009F07	ND
SCSGLV1011H11	ND
SCSGST1069H12	ND
SCSGST1072C04	ND
SCSGST3117C09	knotted class 1 homeodomain protein liguleless3
SCSGST3118E11	P-glycoprotein
SCSGST3119F06	ND
SCSGST3121A01	ND
SCUTAD1031C08	heat shock protein 90
SCUTST3087C04	ND
SCUTST3091F02	ND
SCUTST3127F11	ND
SCVPLR2012H01	ND
SCVPST1062F03	ND

12 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACLR1128A03	ND
SCACLR1132A02	ND
SCACLR2007B03	beta-galactosidase
SCAGLR2018G12	ND
SCAGLR2033C10	ND
SCBGLR1096A06	weak similarity to a farnesylated protein
SCBGLR1100A08	ND
SCBGLR1113E08	ND
SCBGLR1113G08	bZIP protein
SCBGLR1117A09	ND
SCBGLR1118F03	ND
SCBGRT1049B06	Barwin, Basic Barley Seed Protein
SCBGST3103A03	ND
SCBGST3108F09	ND
SCBGST3111C07	ND
SCBGST3112A09	ND
SCCCLR1C06B11	ND
SCCCLR2001B05	ND
SCCCLR2002A06	ND
SCCCLR2003G05	ND
SCCCLR2C02F09	ND
SCCCLR2C03D02	ND
SCCCST1C06E09	ND
SCCCST3003E01	ND
SCEPAM1053E12	ferritin 1 precursor
SCEPSD2070C10	aldose reductase
SCEQLR1092E10	ND
SCEQLR1093E02	ND
SCEZAD1078B05	abrin-a
SCJFLR2036F11	ND
SCJFST1047C11	peptide chain release factor 1
SCJLLR1102G08	ND
SCJLLR1103E11	ND
SCJLLR1108C05	ATPase
SCJLLR2006G03	ND
SCJLLR2028B07	ND
SCJLLR2028F08	ND
SCMCLR1122B12	ND
SCMCLR1124B01	ND
SCMCST1049A08	ND
SCMCST1052E12	ND
SCMCST1052G03	ND

SCMCST1056G12	CYCLIN DELTA-1
SCMCST1058B02	ND
SCMCST1058H11	ND
SCQGFL8014C11	beta-1,3-glucanase precursor
SCQGLR1088H10	superoxide dismutase
SCQGLR2017B04	ND
SCQGST3123C08	ND
SCQGST3124A10	vesicle-associated membrane protein 7B
SCQGST3126H11	wound inducive gene
SCQSST3113A12	ND
SCQSST3114H09	ND
SCRFLR2034A07	ND
SCRFLR2037G02	ND
SCRFST1044G05	ND
SCRFST1046F05	ND
SCRLAD1100A11	transcription factor OBF3.2
SCRLLR1109F03	ND
SCRLLR1109F09	ND
SCSBAD1126C01	calcium-dependent protein kinase 7
SCSBRZ3125A10	putative regulatory protein NPR1
SCSBST3095B06	inorganic phosphate transporter
SCSBST3095G06	Contains similarity to aminoacylase
SCSBST3099D05	phosphoinositide-specific phospholipase C
SCSBST3100F06	Similar to bZIP transcriptional activator RF2a
SCSBST3101E06	ND
SCSBST3101F03	cellulose synthase-5
SCSFST1066E05	ND
SCSFST3076B12	ND
SCSFST3080G05	ND
SCSFST3082E10	similar to putative reverse transcriptase
SCSFST3082F05	ND
SCSGLV1004A12	putative anthocyanin 5-O-glucosyltransferase
SCSGST1069D02	ND
SCSGST1070B11	putative protein kinase Xa21
SCSGST1070D11	ND
SCSGST1071B11	ND
SCSGST3119E03	ND
SCSGST3120D09	protein kinase REK
SCUTLR2023E01	ND
SCUTLR2030A07	ARE1-like protein; 78992-73047
SCUTLR2030C12	ND
SCUTLR2030E04	beta 2 subunit of 20S proteasome
SCUTST3085F01	ND
SCUTST3091A01	Similar to chloroplast ribosomal protein L12
SCUTST3091C09	ND

SCVPLR2019F01	Similar to 60S ribosomal protein L11A
SCVPST1059A06	ND
SCVPST1060H02	ND
SCVPST1063E05	ND
SCVPST1063F02	ND
<hr/>	
24 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACLR1128C02	ND
SCACLR1129D02	ND
SCACLR1132D07	ND
SCACLR1132H04	ND
SCACLR2007A07	ND
SCACLR2029D02	ND
SCAGLR2018F12	peptide methionine sulfoxide reductase
SCBFST3132A08	SINA1 protein
SCBGLR1113D01	ND
SCBGLR1118C02	ND
SCBGST3105A02	ND
SCCCLR1121D03	ND
SCCCLR2002D11	ND
SCCCST3001F05	ND
SCCCST3006H06	acyl-coa-binding protein homolog
SCCCST3083A12	ND
SCEQLR1093E12	Similar to arabinogalactan-like protein (U09556)
SCEQLR1094F02	40S ribosomal protein S12
SCJFRZ3C05G02	allene oxide synthase
SCJFST1047D01	ND
SCJFST1047G12	shaggy-related protein kinase theta
SCJFST1048H01	ND
SCJLLR1105G05	alpha-expansin OsEXP7
SCJLLR1106E05	ND
SCJLLR1107E12	nucleoid DNA-binding protein cnd41-like protein
SCJLLR1107F04	ND
SCJLLR2006C07	ND
SCJLLR2013G07	ND
SCMCST1050E10	putative gag/pol polyprotein
SCMCST1051F11	ND
SCMCST1055B01	ND
SCMCST1056F08	glycyl-trna synthetase
SCQGLB2042B04	SP8 binding protein homolog
SCQGLR1087G09	putative chloroplast prephenate dehydratase
SCQGLR2032D03	ND
SCQSST3116C10	ND

SCQSST3116H05	Putative pirin
SCRFLR2038B09	ND
SCRFST1041D04	ND
SCRFST1042A04	thiamine biosynthetic enzyme 1-2 precursor
SCRFST1042E04	ND
SCRLLR1109A11	putative cytochrome P450
SCRLLR1131G09	translation initiation factor IF-2 homolog F2P3.9
SCSBST3102D02	nodulin-like protein
SCSFLR2009B01	ND
SCSFLR2024E10	ND
SCSFST1066F12	ND
SCSFST1066G01	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like
SCSFST3076A03	TEL1S.2
SCSGLV1008F06	ND
SCSGST3120C09	ND
SCSGST3120D12	Similar to NAM like protein (AC005310)
SCUTLR2015E02	ND
SCUTLR2023B01	ND
SCVPLR2019D12	ND
SCVPST1059D04	ND
SCVPST1059F03	ND
SCVPST1060B12	ND
SCVPST1061D07	ND
SCVPST1061D11	ND
SCVPST1062G02	putative nucleotide sugar epimerase
SCVPST1063C04	putative retroelement pol polyprotein

**APÊNDICE 6 – Clones Selecionados da Variedade Susceptível (SP80-3280)
com Indução em Dois Tempos do Experimento**

6 e 24 horas CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACAD1038F12	Strong similarity to M4 protein
SCACLR1130D06	glutathione S-transferase GST 17
SCACLR1132B05	eukaryotic cap-binding protein
SCACLR2007E07	ND
SCACLR2007F07	ND
SCACLR2014G02	IN2-2 protein
SCAGLR2026B05	ND
SCAGLR2033D09	ND
SCBGLR1114F05	ND
SCBGST3103A07	metallothionein-like protein type 2
SCBGST3110G10	phosphoserine aminotransferase
SCBGST3111D03	ND F1C12.190
SCCCLR1C11A10	temperature and salt responsive protein
SCCCLR2C03A08	ND
SCCCST1C04E01	ND
SCEQLR1094H08	ND
SCJLST1021G01	serine carboxypeptidase i precursor
SCMCLR1125B03	RNA polymerase subunit beta
SCQGLR1088B08	metallothionein-I gene transcription
SCQGLR2032G06	ND
SCQSST1040G01	patatin homolog T9J22.23
SCQSST3116B04	P-rich protein Nt-SubC29
SCRFLR2037H03	ND
SCRFST1045D11	ND
SCRLLR1109F10	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase-like
SCRLLR1131C02	ND; 33791-31527
SCSBST3095D11	cytochrome P450
SCSFLR2016D02	alpha-xylosidase precursor
SCSFST1064C07	cyclin D2.1 protein
SCSFST1064D10	ND
SCSGLV1004A02	ND
SCSGLV1011C09	ND
SCSGST1068G03	RNA-binding protein-like
SCSGST3118G07	ND
SCUTST3085B04	ND
SCUTST3086B04	calcium-dependent protein kinase

SCUTST3086F11	ubiquitin-specific protease 25
SCVPST1060G05	ND
SCVPST1062G03	serine/threonine specific protein kinase-like

30 minutos e 12 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACLR1127G10	ribosomal protein S7
SCBGLR1114C09	ND; 10133-7338
SCBGST3106D04	ND
SCBGST3111B03	F10O3.1
SCCCLB2003F07	ND; 79476-81015
SCCCLR2001C12	ND
SCCCST3005C02	ND
SCMCLR1122D04	ND
SCMCST1054G04	ND
SCMCST1055B08	ND
SCMCST1058C01	ND
SCQSLR1089B07	ND
SCQSLR1090E05	transport inhibitor response-like protein
SCRFLR2021A10	ND
SCRFST1041B06	ND
SCRFST1042D06	ND
SCRFST1045A11	ND
SCRUFL3068B02	GF14-c protein
SCSBST3094H08	ND
SCSBST3098E12	HMG-CoA synthase
SCSBST3102C05	ND
SCSFHR1045B07	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
SCSFST1067F10	Similar to Spinacia oleracea protein kinase
SCSGLV1009G12	aspartate aminotransferase, cytoplasmic
SCSGST1068A11	protein kinase-like protein; 82138-86594
SCSGST1071A08	ND
SCSGST3120E04	ND
SCUTST3092D07	MutT domain protein-like
SCUTST3092F01	ND
SCVPST1060D07	pectinesterase-like protein

6 e 12 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCBGST3103E12	aspartate transaminase
SCQSLR1089H04	putative translation initiation factor IF-2
SCMCLR1122H07	NADH dehydrogenase chain
SCRLAD1140C02	receptor protein kinase
SCUTST3084F04	ribosomal protein 30S subunit

SCJFLR2036B10	F12M16.22
SCVPST1063F01	F14D16.10
SCQGST3123F12	galactokinase GAL1
SCCCST2004G01	ND
SCVPST1062B04	ND
SCVPST1063A12	ND
SCMCST1052F10	ND
SCUTST3089C09	ND
SCMCST1051A11	ND
SCSGLV1005E05	ND
SCSGLV1005C06	proline-rich protein F26K10.180
SCRFLR2021H11	protein kinase (PK)
SCMCST1055D01	putative alpha-L-arabinofuranosidase
SCUTLR2023E12	Putative UDP-glucose glucosyltransferase
SCMCST1050C12	similarity to centromere
SCACLR2029D05	ND
SCJLLR2006A02	transcription factor MYC7E
SCBGLR1114A02	transport protein subunit-like
SCAGLR2033C02	ND
SCBGLR1114A09	ND
SCMCLR1122F09	ND
SCMCLR1124A06	ND
SCMCST1056G08	ND
SCQSLR1089F11	ND
SCRLLR1109D12	ND
SCSFST1067B01	ND
SCUTLR2008D04	ND
SCUTST3091G07	ND
SCVPST1059G01	ND
SCSFST1065B10	zhb0018.1

30 minutos e 6 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCAGLR2026E05	ND
SCAGLR2033A08	ND
SCBGLR1098A11	ND
SCBGLR1099A10	ND
SCBGLR1113D03	ND
SCBGLR1114G07	ND
SCBGST3104D04	putative protein kinase
SCCCLR1C04A07	ND
SCCCLR1C11G01	ND
SCCCLR2C02B09	pirin
SCCCST3004H06	ND

SCJLLR1106G11	ND
SCMCST1049D12	ND
SCMCST1056D08	ND
SCQGST3126E03	ND
SCQSST3115C01	putative reverse transcriptase
SCRFFL8037C01	probable integral membrane protein
SCSBST3093D08	ND
SCSFLR2009F10	ND
SCSGST1068C11	similarity to transcription factor
SCSGST1071C07	glutathione peroxidase
SCSGST1071F03	ND
SCSGST3120A07	ND
SCUTLR2015G05	ND
SCUTST3086B02	transcription factor TINY homolog T13E15.5
SCVPLR2012B03	Similar to translation initiation factor IF2
SCVPLR2019C01	cell wall invertase; beta-fructosidase; Incw4

12 e 24 horas CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCQGLR1087H04	protein translation factor sui1 homolog
SCRLLR1109B07	ND T28J14.6ND
SCVPST1061G07	cullin-like protein T1NDP11.14.1
SCBGST3112H12	transcription factor EREBP1
SCACLR1126F06	MLA6 protein
SCACLR2029H09	nonspecific lipid-transfer protein precursor
SCCCST3004H05	ND
SCSFST3079E08	F1N21.22
SCSFST3082A04	vesicle soluble NSF attachment protein receptor
SCUTST3091C04	ND
SCJLLR1107B12	ND
SCMCST1049F03	ND
SCUTST3086A08	ND
SCBGLR1100A10	homeodomain transcription factor KNAT6
SCSBST3094H07	pyrophosphate-dep. phosphofructo-1-kinase-like
SCVPST1060E09	ND
SCBGLR1115D07	ring-box 1
SCSFST3073C11	putative protein kinase
SCEQLR1094G05	myb-related protein 1
SCCCLV1001A04	ND
SCMCLR1123E07	ADP-ribosylation factor-like protein
SCACLR1128A01	ND
SCACLR1130H05	ND
SCBGLR1120A10	ND
SCBGST3109C07	ND

SCBGST3112B11	ND
SCCCLR2001C11	ND
SCCCLV1002G12	ND
SCJFLR2035E10	ND
SCJFST1048G08	ND
SCJLLR1104G01	ND
SCJLLR1106B10	RING zinc-finger protein, putative
SCMCST1049F12	ND
SCQSST3113F05	ND
SCSFST3079E04	ND
SCSGST1071B01	ND
SCSGST1071H06	ND
SCVPLR2027H01	ND

30 minutos e 24 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACLR1126B11	ND
SCACLR2007A09	ND
SCAGLR2026C07	gene_id:MNB8.4~ND
SCBGST3105E03	mitochondrial energy transfer protein
SCBGST3108C02	adenylylsulfate kinase 1, chloroplast precursor
SCBGST3109F11	ND
SCCCLR1121H02	ND
SCCCLR1C08F09	ND
SCCCST1C04A12	ribosomal RNA apurinic site specific lyase
SCCCST1C04D02	St12p protein
SCCCST3006G04	ND
SCEQLR1091C06	ND
SCJFLR2036C01	ND
SCJFST1047A05	ND
SCJLLR1101A02	histone H2A.F/Z
SCMCLR1123B11	ND
SCMCLR1124B11	ND
SCQSLR1089F09	cim1 protein homolog F26K10.130
SCQSST3114G02	ND
SCRFST1046A04	receptor kinase-like protein
SCRLLR1111F07	ND; 50315-51862
SCSBST3097E03	embryogenesis transmembrane protein
SCSFLR2016D09	ND
SCSFST1067G11	ND
SCSFST3073D12	ND
SCSFST3074G07	ND
SCSGLV1009E12	ND
SCSGST1068C10	ND

SCUTST3087E08	DsPTP1 protein
SCUTST3090C07	ND
SCUTST3131H12	ND
SCVPLR2005H12	ND
SCVPLR2027C08	ND
SCVPST1059H08	ND
SCVPST1063C07	putative receptor-like protein kinase
SCVPST1063G11	adenosine kinase-like protein

**APÊNDICE 7 – Clones Selecionados da Variedade Susceptível (SP80-3280)
com Indução em Três Tempos do Experimento**

30 minutos, 6 e 12 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACLR1127D01	F27J15.7
SCACLR1130D02	putative protein kinase
SCJFLR2035H01	UDP-glucuronyltransferase-I
SCJFRT2055F06	ND
SCJLLR2020F11	ND
SCMCLR1123E05	ND
SCMCLR1124G01	ND
SCMCST1049B01	ND
SCMCST1056F10	ND
SCQGST3125C01	ND
SCSBST3102C02	ND
SCSGLV1011C06	ND
SCSGST1071F05	ND
SCSGST1071G01	CYTOCHROME P450 71C4

30 minutos, 6 e 24 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCCCLR2002D06	acyltransferase homolog
SCCCST1C03E09	ND
SCCCST3001B03	ND
SCJFLR2035A07	tonoplast intrinsic protein; ZmTIP1
SCJFLR2036G07	putative pollen allergen
SCJLLR1105F12	DnaJ-like protein
SCMCLR1122B09	ND
SCMCST1052G07	ND
SCQGLR2025H11	ND
SCRFLR2034B05	ND
SCRFST1046H11	ND
SCSBRT3040B04	subtilisin/chymotrypsin inhibitor
SCSFLR2009H03	ND
SCSGLV1008B08	F12K11.18
SCUTLR2015G12	putative auxin-induced protein
SCUTST3092D12	ND
SCVPST1062H12	ND

30 minutos, 12 e 24 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACLR1126D09	ND
SCACLR1130A07	ND
SCBGLR1114A03	ND
SCBGLR1114E09	ND
SCBGLR1118A11	CRS1
SCBGST3106C01	peroxidase 4 precursor
SCBGST3108C09	SSRP1 protein
SCCCLR1C04A06	ND
SCCCLR2004B05	lipase-like protein
SCEQLR1091C05	ND
SCMCST1051C10	similarity to nephropathic cystinosis
SCQSST1039E12	receptor-like protein kinase
SCQSST3115A03	ND
SCSFST3081H12	iron sulfur subunit of succinate dehydrogenase
SCSFST3082D06	ND
SCSGST1069D04	putative transcription factor
SCSGST3119C04	ND
SCUTST3130D05	ND
6, 12 e 24 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCBGLR1100B04	ND
SCCCLR1C06A09	putative aphid transmission factor
SCCCST3001H10	RNA-binding protein
SCCCST3005H10	ND
SCJFLR2036A02	ND
SCJLLR1101E10	ND
SCJLLR1103B01	ND
SCJLLR2006E12	ND
SCMCST1049A07	ND
SCQGST3124D03	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase
SCQGST3124H11	RING-H2 finger protein RHA3a
SCRFLR2038H11	ND
SCSFST1066A11	ND
SCSFST3077F12	EC 5.3.1.16
SCSFST3079B04	putative senescence-associated protein 5
SCUTST3131H03	ND
SCVPST1063F10	AMP-binding protein

**APÊNDICE 8 – Clones Selecionados da Variedade Susceptível (SP80-3280)
com Indução nos Quatro Tempos do Experimento**

CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCBGLR1114G12	ARF2
SCCCLR1C11A11	probable heat shock protein EMB1
SCCCLV1001A06	non-LTR retroelement reverse transcriptase
SCCCLV1003E11	ND
SCCCST2003D03	ND
SCCCST3006B09	ND
SCMCST1049B12	ND
SCMCST1049E02	ND
SCMCST1055F12	ND
SCSBST3096H07	isoflavone reductase homolog IRL
SCSGLV1006A10	ND
SCSGLV1007E05	ND
SCVPST1062A07	ND

**APÊNDICE 9 – Clones Selecionados da Variedade Tolerante (SP81-3250)
com Indução em Apenas um Tempo**

30 minutos CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACLR1126C11	ND
SCACLR1126D01	ND
SCACLR1126F06	MLA6 protein
SCACLR1128C10	ND
SCACLR1130A09	ND
SCACLR1132B05	eukaryotic cap-binding protein
SCAGLR2011B01	CGI-129 protein
SCAGLR2026F12	ND
SCAGLR2033H01	ND
SCBFAD1096D10	peroxidase 1
SCBFLR1039C08	beta-1,3-glucanase precursor
SCBGRL1097G12	putative helicase
SCBGRL1116D02	ND
SCBGRL1117B12	ND
SCBGST3108C09	SSRP1 protein
SCBGST3110B01	MYB-like DNA-binding domain protein
SCCCLR1C08F09	ND
SCCCLR2002F12	ND
SCCCST1C01B10	ND
SCCCST1C04H05	putative trehalose-6-phosphate synthase
SCCCST3006C02	ND
SCEPRT2045F01	glutathione S-transferase GST 22
SCEQLR1093A05	ND
SCEZRT2020A03	chaperonin; similar to GroEL protein
SCJFAD1013H07	transport inhibitor response-like protein
SCJFLR2035E10	ND
SCJFLR2036D05	ND
SCJFST1048D12	ND
SCJLFL4100D06	putative ferulate-5-hydroxylase; 62457-61828
SCJLLR1101E03	ND
SCJLLR1101F04	ND
SCJLLR1104G07	ND
SCJLLR1107D12	ND
SCJLLR1107E12	nucleoid DNA-binding protein cnd41-like protein
SCJLLR2013F01	ND
SCJLRT1015D05	alcohol dehydrogenase 1

SCMCLR1122G02	calcium-dependent protein kinase
SCMCLR1125A07	ND
SCMCSD1059D07	chitinase III C10701
SCMCST1055D09	ND
SCMCST1058B08	ND
SCQGST3126E03	ND
SCQGST3126E09	ND
SCQSST1040F02	ND
SCQSST3113D06	ND
SCQSST3115A12	ND
SCRFAM2127F03	allyl alcohol dehydrogenase
SCRFLR2037C03	ND
SCRFSD1023G05	pathogenesis related protein-1
SCRFST1042E09	ND
SCRFST1043G03	cell division protein FtsH
SCRFST1045D01	transport protein homolog YUP8H12R.2
SCRFST1045E10	ND
SCRLLR1131F07	ND
SCSBRT3038F01	protein phosphatase 2C
SCSBST3093E04	leucoanthocyanidin dioxygenase-like protein
SCSBST3098F02	fructose-bisphosphate aldolase
SCSFST1065H03	lectin-like protein kinase-like
SCSFST1066F08	putative ubiquitin protein
SCSFST3076D07	ND
SCSFST3077D09	probable protein kinase
SCSFST3078H05	VIP2 protein
SCSFST3081A09	ND
SCSFST3082E05	ND
SCSGAD1009F02	cyclophylin-like protein
SCSGLV1007G11	polygalacturonase inhibitor
SCSGLV1008C08	ND
SCSGLV1008F06	ND
SCSGLV1010C07	ND
SCSGSB1005A06	peroxidase
SCSGST1069D04	putative transcription factor
SCSGST1071G03	ND
SCSGST1072H12	ND
SCSGST3118E05	cinnamoyl-CoA reductase
SCSGST3119A07	ND
SCSGST3121C08	ND
SCSGST3121H10	ND
SCUTLR2015D07	ND
SCUTLR2023H07	ornithine carbamoyltransferase; OCTase
SCUTST3088E11	ND F1N13_40
SCUTST3090H08	probable ferroxidase

SCVPLB2086E09	CYTOCHROME P450 71A9
SCVPLR2012B03	Similar to translation initiation factor IF2
SCVPST1059H11	GMP synthase; 61700-64653
SCVPST1061A01	ND
SCVPST1062H11	myosin heavy chain-like protein

6 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACLR1128A03	ND
SCACLR1128F07	putative Na ⁺ /H ⁺ antiporter
SCACLR1130C08	ND
SCACLR1130G01	ND
SCACLR1132D05	histone H3
SCACLR2022B11	ND
SCACLR2022F07	ND
SCACLR2029B07	ND
SCACLR2029D05	T4O12.23
SCAGLR2018G12	ND
SCAGLR2033B01	carnitine racemase like protein
SCBFST3132A02	histidyl-tRNA synthetase
SCBFST3132G09	ND
SCBFST3133B05	xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase
SCBGLR1095H08	ND
SCBGLR1099D01	ND
SCBGLR1099E10	ND
SCBGLR1100A06	ND
SCBGLR1100D12	ND
SCBGLR1114E09	ND
SCBGLR1115B08	protein kinase PK1 receptor-like
SCBGLR1115C11	Similar to ATP-citrate-lyase
SCBGLR1118F05	ND
SCBGLR1119E11	ND
SCBGST3104C03	ND
SCBGST3104C11	ND
SCBGST3105C03	ND
SCBGST3106E02	putative gag-pol polyprotein; 99986-95160
SCBGST3106G11	putative cytosolic chaperonin, delta-subunit;
SCBGST3107A01	ND
SCBGST3108C02	adenylylsulfate kinase 1, chloroplast precursor
SCCCLR1C01C11	AMP-activated protein kinase beta
SCCCLR1C07A03	ND
SCCCLR2001G05	ND
SCCCLR2003D03	ND
SCCCLR2003H12	ND

SCCCLR2004A03	ND
SCCCLR2004B11	ND
SCCCLR2C02C02	ethylene-responsive transcriptional coactivator-like
SCCCLR2C03A08	ND
SCCCLV1001G09	ND
SCCCLV1003H07	ND
SCCCST1C01B03	ND
SCCCST1C04A12	ribosomal RNA apurinic site specific lyase
SCCCST1C05C08	disease resistance protein RPM1 homolog
SCCCST1C06C01	lectin-like protein kinase-like
SCCCST1C06H10	sucrose synthase-1
SCCCST2002A02	ND
SCCCST3001C08	ferredoxin iii precursor
SCCCST3002D06	ND
SCCCST3003D12	zinc finger protein, putative
SCCCST3004A06	ND
SCCCST3083E07	O-succinylhomoserine lyase
SCEQLR1094F02	40S ribosomal protein S12
SCEQLR1094G05	myb-related protein 1
SCEZFL5085C06	GRAB1 protein
SCJFST1047E11	IAA13 protein
SCJLLR1101A02	histone H2A.F/Z
SCJLLR1101A04	ND
SCJLLR1105C12	ND
SCJLLR1106C06	contains similarity to nodulin
SCJLLR1106F01	ND
SCJLLR1107F04	ND
SCJLLR2006A02	transcription factor MYC7E
SCJLLR2028F07	ND
SCMCLR1122B12	ND
SCMCLR1125E04	contains similarity to protein kinase domains;
SCMCST1049D01	similarity to receptor protein kinase
SCMCST1050F06	ND
SCMCST1053D07	ND
SCMCST1055F01	ND
SCQGLR1088F07	wound-induced protein
SCQGLR2010H04	ND
SCQGLR2025A09	ND
SCQGLR2025C06	ND
SCQGLR2025E02	ND
SCQGLR2025H11	ND
SCQGLR2032D03	ND
SCQGST3124F04	ribosomal protein L18a, cytosolic
SCQSST1039G08	fatty acid elongase 1
SCRFLR2021A10	ND

SCRFLR2021B04	ND
SCRFLR2021E07	ND
SCRFST1041A02	ND
SCRFST1043A08	cytochrome P-450-like protein
SCRFST1045C11	putative myosin
SCRFST1045F11	ND
SCRFST1046E04	ND
SCRLLR1111E06	ND
SCRUFL3068B02	GF14-c protein
SCSBST3093E12	ND
SCSBST3095G12	ND
SCSBST3096H07	isoflavone reductase homolog IRL
SCSBST3099F02	ND
SCSBST3101D08	ND
SCSFLR2016D03	ND
SCSFST1066G08	ND
SCSFST1067B01	ND
SCSFST1067B12	cytosolic monodehydroascorbate reductase
SCSFST3073D09	ND
SCSFST3073H03	ND
SCSFST3074E02	ND
SCSFST3074E12	ND
SCSFST3077C10	putative chromosome associated protein
SCSFST3077G07	myb-related protein ZM1
SCSFST3078E06	ND
SCSFST3079A10	ND
SCSFST3079E04	ND
SCSFST3082E10	similar to putative reverse transcriptase
SCSGLV1005E05	ND
SCSGLV1007D10	ND
SCSGLV1007E05	ND
SCSGLV1007G11	Polygalacturonase inhibitor
SCSGLV1008C01	Putative protein kinase-like
SCSGLV1008G05	ND
SCSGLV1008H05	integral membrane protein-like
SCSGST1068B10	ND
SCSGST1068F10	ND
SCSGST1069E06	ND
SCSGST1069F03	ND
SCSGST1070G05	ND
SCSGST1072A05	ND
SCSGST1072F10	ND
SCSGST1072G05	ND
SCSGST3119D05	auxin-induced protein TGSAUR12
SCSGST3121D06	ND

SCUTLR2008A12	ND
SCUTLR2015G05	ND
SCUTST3084G11	ND
SCUTST3085B04	ND
SCUTST3085B11	ND
SCUTST3085E06	putative annexin
SCUTST3086H01	Cks1 protein
SCUTST3087E08	DsPTP1 protein
SCUTST3089H10	ND
SCUTST3130C10	ND
SCUTST3131B08	ND
SCUTST3131E02	ND
SCVPLR2012A05	ND
SCVPLR2019A05	ND
SCVPLR2019C01	cell wall invertase; beta-fructosidase
SCVPLR2019F01	Similar to 60S ribosomal protein
SCVPLR2027A10	ND
SCVPLR2027D12	histone H3.2, MINOR
SCVPST1060B06	ND
SCVPST1060D09	ND
SCVPST1061C06	sucrose synthase, putative
SCVPST1061D07	putative protein
SCVPST1061D09	ND
SCVPST1061G03	ND

12 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACLR1132B04	dihydroxy-acid dehydratase
SCACLR2022G09	DnaJ protein, putative
SCAGLR2033A08	ND
SCBGLR1100E01	ND
SCBGLR1112C12	ND
SCBGLR1115C02	ND
SCBGLR1115G03	HISTONE H1
SCBGST3110C04	acyl-CoA oxidase
SCBGST3110H10	ND
SCBGST3111C12	chlorophyll a/b-binding protein precursor
SCBGST3111D03	ND F1C12.190
SCCCLR1C01A11	probable tyrosine--tRNA ligase
SCCCLR1C02H03	ND
SCCCLR1C11A11	probable heat shock protein EMB1
SCCCLR2001D04	ND
SCCCLR2001D05	Putative fucosyltransferase
SCCCLR2003H08	ND

SCCCLR2C01E07	ND
SCCCLV1001D01	ATP dependent transmembrane transporter
SCCCLV1003H08	F15O4.40
SCCCST1C03G07	ND
SCCCST3083H05	ND
SCEQLR1093E12	ND
SCJFHR1030B02	choline monooxygenase precursor
SCJFLR2036F02	ND
SCJFST1048H03	ND
SCJLLR2028F08	ND
SCMCST1052A03	ND
SCMCST1053D03	Rab geranylgeranyl transferase like protein
SCMCST1053F08	ND
SCMCST1054B02	ND
SCMCST1057G05	ND
SCMCST1058B09	ND
SCMCST1058C01	ND
SCMCST1058H11	ND
SCQGLR1088H10	superoxide dismutase
SCQGLR2017A12	ND
SCQGST3123E11	ND
SCQSST3113C09	ND
SCRFST1042C02	ND
SCRLLR1109A11	putative cytochrome P450
SCRLLR1109B09	ND
SCSFST1066E05	ND
SCSFST1067A09	ND
SCSFST1067E03	ND
SCSFST3075A09	probable omega-3 fatty acid desaturase
SCSGLV1005C06	proline-rich protein F26K10.180
SCSGST1068C10	ND
SCSGST1071E08	ND
SCSGST1071H05	ND
SCSGST3117C10	ND
SCUTLR2008D11	vesicle transport v-SNARE protein
SCUTLR2030C12	ND
SCUTLR2030E07	contains similarity to ribonucleoprotein
SCUTLR2030H01	ND
SCUTST3085F01	ND
SCUTST3091G08	putative AAA-type ATPase
SCUTST3092D07	MutT domain protein-like
SCUTST3127B11	putative chloroplast RNA helicase VDL isoform 1
SCUTST3129H10	ND
SCVPAM2069B10	allene oxide synthase
SCVPLR2012E06	MADS box protein 1

SCVPST1059A10	T19E23.13
SCVPST1062F02	ferredoxin VI precursor
SCVPST1063A12	ND
SCVPST1063G10	ND
SCVPST1063H10	ND

24 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACLR1127A06	ND
SCACLR1130C06	cellulose synthase-8
SCACLR1132G02	ND
SCACLR2007A09	ND
SCACLR2007D05	putative phloem-specific lectin
SCAGAM2123E05	probable ethylene-response protein
SCAGLR2033H10	ND
SCBFST3132A03	ND
SCBGAD1028G08	ND
SCBGLR1100A04	ND
SCBGLR1100A10	homeodomain transcription factor KNAT6
SCBGLR1114B01	small nuclear ribonucleoprotein T30B22.5
SCBGLR1115H09	Putative histone H3
SCBGST3104F06	carbonate dehydratase
SCBGST3105E03	mitochondrial energy transfer protein
SCBGST3106E07	ND
SCBGST3107G04	shoot meristemless
SCBGST3108D07	ND
SCBGST3111B03	ND
SCCCFL5057C01	chitinase, class V
SCCCLR2001C11	ND
SCCCLR2002A10	ND
SCCCLR2002F06	ND
SCCCLR2003H06	trehalose-6-phosphate phosphatase
SCCCLR2C02D04	germin-like protein 5
SCCCLV1002D06	ND
SCCCLV1002H05	ND
SCCCST1C03B10	60S acidic ribosomal protein
SCCCST1C05B12	ND
SCCCST1C05C01	ND
SCCCST1C06B03	putative glucosyltransferase
SCCCST3003E01	ND
SCCCST3006H09	ND
SCCCST3083E03	Contains PF 00561 alpha/beta hydrolase fold.
SCCCST3083G12	sesquiterpene cyclase 1
SCJFAD1014B07	ND

SCJFST1047A05	ND
SCJFST1048A01	Putative ubiquitin-conjugating enzyme E2
SCJFST1048H07	ND
SCJLLR1101F10	ND
SCJLLR1102F10	MtN3
SCJLLR1105F01	putative D-amino acid dehydrogenase
SCJLLR1107H12	contains similarity to ankyrin like protein
SCJLLR2013G04	ND
SCMCFL5007C04	Contains similarity to a basic endochitinase
SCMCLR1122D11	wound-induced protein
SCMCLR1124A06	ND
SCMCLR1124C06	ND
SCMCST1049A02	contains similarity to ribonucleoprotein
SCMCST1049B11	ND
SCMCST1053H04	ND
SCMCST1054F06	ND
SCMCST1055H12	ND
SCMCST1056F10	ND
SCQGHR1013D01	chitinase
SCQGLR2032E04	protein-l-isoaspartate o-methyltransferase
SCQGST3123H12	ND
SCQSFL1129A07	Sgt1
SCQSLR1089B09	MADS box-like protein
SCQSST1040B01	cell cycle control crn (crooked neck) protein-like
SCQSST3113H01	calcium/calmodulin-dependent protein kinase
SCQSST3114C11	ND
SCQSST3114H08	ubiquitin-activating enzyme
SCRFAM2074G07	ND
SCRFLR2021H11	protein kinase (PK)
SCRFST1044C10	ND
SCRFST1045D05	ND
SCRFST1046F05	ND
SCRLLR1109C08	ND
SCRLLR1109H11	ND
SCRLLR1110A03	ND
SCRLLR1111F05	signal peptidase
SCRLLR1111H07	ND
SCRURZ3082B02	vegetative storage protein
SCSBST3102B07	cytochrome p450 90A1
SCSBST3102E01	ND
SCSFHR1045B07	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
SCSFLR2024C07	ND
SCSFLR2024G05	ND
SCSFLR2031A07	ND
SCSFLR2031C04	ND

SCSFST1065E04	ND
SCSFST1066E06	ND
SCSFST3073A11	ND
SCSFST3074D11	nucleoside diphosphate kinase I
SCSFST3076H12	ND
SCSFST3077B12	ND
SCSFST3078A07	ND
SCSFST3078F06	ND
SCSFST3079E08	ND
SCSFST3080G05	ND
SCSGLV1009F07	ND
SCSGLV1009G06	ND
SCSGST1072B08	leucyl aminopeptidase - parsley
SCSGST3119G10	ND
SCSGST3120B03	ND
SCSGST3120C07	ND
SCSGST3121A10	mitochondrial processing peptidase alpha-II chain
SCSGST3121E03	ND
SCUTFL1059C04	pathogenesis-related protein
SCUTLR2015A02	ND
SCUTLR2015B09	nucleic acid binding protein
SCUTST3091D02	ND
SCUTST3092G01	ND
SCUTST3128E01	contains similarity to RING zinc finger protein
SCUTST3128E09	70 KD PEPTIDYLPROLYL ISOMERASE
SCUTST3128F05	ND
SCVPHR1090F01	serine-threonine protein
SCVPLR2027D05	putative cytoskeleton-associated protein
SCVPST1061H08	probable plasma membrane intrinsic protein
SCVPST1062F10	ND
SCVPST1063B02	ND

**APÊNDICE 10 – Clones Seleccionados da Variedade Tolerante (SP81-3250)
com Indução em Dois Tempos do Experimento**

6 e 24 horas CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACLR1130D02	putative protein kinase
SCACLR1132B03	ND
SCAGLR2011F11	ND
SCBFRT1068F03	ND
SCBGLR1095B01	ND
SCBGLR1100F03	acyl carrier protein F13M23.190
SCBGLR1120B07	one helix protein
SCBGST3103A07	metallothionein-like protein type 2
SCBGST3106F01	fimbrin
SCBGST3109D05	pectinacetylesterase homolog F14M4.24
SCCCLR1C06A09	putative aphid transmission factor
SCCCLR1C06C03	ND
SCCCLR2004C05	ND
SCCCLR2C02F08	ND
SCCCLR2C03D06	putative receptor-like protein kinase
SCCCLV1001H05	ND
SCCCST1C02D04	ND
SCCCST1C02D11	ND
SCCCST3001D10	ND
SCCCST3002E02	ND
SCJFLR2035E02	ND
SCJLLR1107B07	putative mutator transposable element
SCMCLR1122E06	ND
SCMCST1051C04	ND
SCQGLR2032G12	ND
SCQSST3113D04	ND
SCRFLR2034B05	ND
SCRFLR2034E07	ND
SCRFLR2037E08	cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase
SCRFST1042E04	ND
SCSBRT3039E08	chitinase III C10501
SCSBST3095A07	ND
SCSBST3095B06	inorganic phosphate transporter
SCSBST3098H04	putative gag-pol polyprotein
SCSBST3100G06	chlorophyll a-b binding protein m9 precursor
SCSFLR2009H03	ND

SCSFLR2016E06	similarity to mismatch repair protein
SCSFLR2016G11	Contains similarity to proline-rich protein
SCSFST1064B07	transposon protein, putative
SCSFST1066H04	FKBP-like
SCSGST1068A02	extensin homolog T9E8.80
SCSGST1069F12	ND
SCSGST1069G11	ACTIN 2
SCSGST1072F06	ND
SCSGST3120A03	sugar transporter protein
SCSGST3120C12	ND
SCUTST3084C11	laccase
SCUTST3130D10	disease resistance protein RPM1 homolog
SCUTST3130F09	ND
SCVPLR2005D03	ND
SCVPLR2027F01	CONSTANS-like protein 2
SCVPST1060G09	putative pre-mRNA splicing factor atp-dependent
SCVPST1062H04	ND
SCVPST1063C04	putative retroelement pol polyprotein
SCVPST1063F10	AMP-binding protein

30 minutos e 12 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACCL6010A10	nuclear cap-binding protein CBP80
SCAGLR2018A12	ND
SCAGLR2026B05	ND
SCBGLR1099B07	ND
SCBGLR1112D10	ND
SCBGLR1113H02	ubiquinol-cytochrome c reductase complex
SCBGLR1118F08	ND
SCBGRT3075E02	putative 60S ribosomal protein L22
SCCCFL5065C01	probable transcription factor
SCCCLR2002B12	ND
SCCCLR2C02A01	putative wound-induced protein
SCCCST1C03H09	putative cytochrome P450
SCCCST2004E05	similarity to a dimethylaniline monooxygenase
SCEQLR1093D03	ND
SCEQLR1094F04	ND
SCJFLR2036B10	ND
SCJLFL1051A09	vegetative storage protein
SCJLLR1105G12	elongation factor Ts
SCJLLR2020E01	ND
SCMCST1053A06	protein kinase-like protein
SCMCST1054F10	ND
SCQGST3125E10	zinc finger protein

SCRFLR2021E03	ND
SCRFST1042A08	ND
SCRFST1045H03	ND
SCSBST3100A09	ND
SCSFBSB1102B07	2,3-bisphosphoglycerate mutase
SCSFBSB1102C09	Similar to glucan endo-1,3-beta-glucosidase
SCSFST1066A05	coatomer complex subunit
SCSFST3075H02	ND
SCSFST3076A03	TEL1S.2
SCSFST3079A05	ND
SCSFST3081A11	ND
SCSGAD1009A05	putative receptor-like protein kinase
SCSGAM2103C03	calcium sensor protein, calcineurin-like
SCSGLV1004D10	ND
SCSGRZ3063E01	ARGININE DECARBOXYLASE
SCSGST1068A01	Nt-iaa2.3 deduced protein
SCSGST1069H03	ND
SCSGST3119B03	ent-kaurene oxidase
SCUTLR2008D09	ND
SCUTST3087E10	non-LTR retroelement reverse transcriptase
SCVPRZ3025F04	uncoupling protein mitochondrial
SCVPST1059H08	ND

6 e 12 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACLR1130F05	ND
SCACLR2007F07	ND
SCACLR2022G06	ND
SCBGLR1115D07	ring-box 1
SCBGLR1117D09	ND
SCBGLR1120G07	ND
SCBGST3104B12	transposase DOPA
SCBGST3109F11	ND
SCBGST3111B08	ND
SCCCLR1C03G05	ND
SCCCLR2002D11	ND
SCCCLV1001E06	ND
SCCCST1C02E11	ND
SCCCST3001E01	ND
SCEQLR1094G07	serine carboxypeptidase ii-3 precursor
SCJFST1048E06	ND
SCJLLR1102G08	ND
SCJLLR1105H10	ND
SCJLLR1106D03	ND

SCJLLR2006C07	ND
SCMCLR1125B03	RNA polymerase subunit beta
SCMCST1049B01	ND
SCMCST1050A07	ND
SCMCST1051A11	ND
SCMCST1053D08	ND
SCMCST1054B12	ND
SCMCST1056A11	ND
SCQGLR2025E01	ND
SCQGLR2032G07	ND
SCQGST3125C05	metallothionein
SCQGST3126F06	ND
SCQSRT3054H12	probable germin protein 4
SCQSST1040E04	ND
SCRFLR2021D11	ND
SCRFSB1021F11	abscisic acid-induced protein HVA22
SCRFSST1041C03	ND
SCRFSST1042D06	ND
SCRFSST1042D08	serine/threonine-specific receptor protein kinase
SCRFSST1044D02	omega-6 fatty acid desaturase
SCSBST3100B06	putative clathrin heavy chain
SCSFLR2024D09	50S ribosomal protein L24
SCSFST1064C10	dnaK-type molecular chaperone hsp70
SCSFST3073C11	putative protein kinase
SCSFST3074D01	flavonoid 3',5'-hydroxylase
SCSFST3075D07	ND
SCSFST3082E09	ND
SCSGST1068F12	RNA helicase, putative; 27866-23496
SCSGST3118F01	ND
SCSGST3120D12	Similar to NAM like protein (AC005310)
SCSGST3121E07	UMP/CMP kinase a
SCUTST3091A01	Similar to Secale chloroplast ribosomal protein
SCUTST3128B07	ND
SCUTST3130A02	ND
SCVPLR2027F07	ND
SCVPST1059D05	ND
SCVPST1063C05	retroelement pol polyprotein-like

30 minutos e 6 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACLR1126E04	ND
SCACLR1127D05	putative nucleosome assembly protein
SCACLR2007E07	ND
SCAGLR2033G11	ND

SCAGRT2039D08	SPF1 protein
SCBFST3132H01	ND
SCBFST3132H10	ND
SCBFST3133A01	ND
SCBGST3105A02	ND
SCBGST3106H06	ripening regulated protein DDTFR8
SCBGST3111C04	alanine--tRNA ligase (EC 6.1.1.7)
SCCCLR1C11G11	ribosomal protein L17
SCCCLR2004E05	ND
SCCCLV1001C05	ND
SCCCLV1003D07	probable ATP-dependent clp proteinase precursor
SCCCST2004G03	ND
SCCCST3002C10	ND
SCCCST3083A12	ND
SCEZLR1009E06	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
SCJFAD1012A08	auxin responsive transcription factor
SCJFLR2035E01	ND
SCJLLR2006G03	ND
SCMCST1051B03	ND
SCMCST1054G04	ND
SCMCST1057G10	ND
SCQGLR2025A10	ND
SCQSLR1089F09	cim1 protein homolog F26K10.130
SCQSRT2033F06	putative flavonoid 3'-hydroxylase
SCQSST1040H10	ND
SCQSST3114C05	ND
SCRFLR2038F10	cemA
SCRLLR1109F10	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase-like protein
SCSBST3098C11	Oxalyl-CoA decarboxylase
SCSBST3101A12	ND
SCSBST3102C02	ND
SCSFAD1125E10	glucanase; glucan endo-1,3-beta-glucosidase
SCSFST1064G02	trichohyalin like protein
SCSFST1065G11	ND
SCSGLV1006H09	ND
SCSGLV1010E01	ND
SCSGST1068F05	ND
SCSGST1069H11	ND
SCUTLR2015E02	ND
SCUTST3084D09	lectin-like protein kinase
SCUTST3091C09	ND
SCUTST3091D07	utp--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
SCVPLR2005B02	ND
SCVPST1061G12	ND
SCVPST1063E10	Avr9 elicitor response protein

12 e 24 horas CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACLR2022G07	ND
SCACLR2029H09	putative nonspecific lipid-transfer protein
SCBGLB2015H05	AP2 domain transcription factor-like protein
SCBGLR1097H10	ND
SCBGLR1113H06	ND
SCBGLR1117F05	ND
SCBGST3103F08	ND
SCBGST3104D04	putative protein kinase
SCBGST3111G05	ND
SCCCLR1C01G12	PPR-repeat protein, putative
SCEPAM1023F09	xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase XTR-2
SCEQRT1024F02	peroxidase R15
SCEZLR1031G08	nonspecific lipid-transfer protein precursor
SCJFLR2035H04	calmodulin
SCJFST1048F09	ND
SCJFST1048G05	Similar to nodulins and lipase
SCJLLR1102G03	ND
SCJLLR1103G12	ND
SCJLLR1104B07	ND
SCJLLR1108C11	putative U2 snRNP auxiliary factor; 19096-22891
SCMCLR1122F09	ND
SCMCST1052E09	disease resistance gene homolog 9N
SCMCST1057D06	ND
SCMCST1058H03	ND
SCQGLR2010G04	ABC transporter-like protein
SCQGLR2025E03	zinc finger transcription factor WRKY1
SCQGLR2025H10	probable myb factor
SCQGST3124F05	ND
SCQGST3125F05	small heat shock protein Hsp23.6
SCRFST1043C03	ND
SCRLLR1131C09	ND
SCRURT3061H09	protein kinase
SCSFST1067E08	ND
SCSFST3077B02	beta-expansin
SCSFST3081H12	iron sulfur subunit of succinate dehydrogenase
SCSGLV1004A12	putative anthocyanin 5-O-glucosyltransferase
SCSGST1071E07	pectin acetylesterase
SCUTRZ3070E07	hydroperoxide lyase
SCUTST3127E12	ND
SCUTST3127H10	ND
SCUTST3129E06	ND
SCVPST1060H12	plasma membrane Ca ²⁺ -ATPase

SCVPST1061D11	ND
SCVPST1062C07	long chain acyl-CoA synthetase
<hr/>	
30 minutos e 24 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACLR1126D05	ND
SCBGLR1097A04	ND
SCBGLR1100H06	ND
SCBGST3105E08	ND
SCCCLR1C01A04	ND
SCCCLR2001H11	ND
SCCCST1C05F01	ND
SCEQLB2016C06	ND
SCEQLR1093D07	ND
SCEZFL5086F01	calcium-binding protein
SCEZST3149F10	phenylalanine ammonia-lyase
SCJFLR2035A07	tonoplast intrinsic protein; ZmTIP1
SCJFST1047C06	probable carboxyl-terminal proteinase
SCJLLR1104H11	ND
SCJLLR1106E04	ND
SCJLLR2013C09	ND
SCJLLR2020E05	ND
SCMCLR1122D05	transcription initiation factor IIA gamma chain
SCMCLR1124B11	ND
SCQGRT1042E04	1,3-beta-glucanase PRm 6b
SCQGST3124D03	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 1
SCQGST3125C08	amidase
SCRFAD1021H07	ND
SCRFLR2034B04	ND
SCRFLR2038A11	ND
SCRFLR2038H12	ND
SCRFST1045D11	ND
SCRLLR1131F03	plastocyanin precursor
SCSFST3075E04	protein kinase C inhibitor (PKCI)
SCSGLV1009F02	ND
SCSGST3120E07	ND
SCSGST3120G11	receptor-like protein kinase 1
SCSGST3121B02	nucleoid DNA-binding protein cnd41-like protein
SCUTST3085G03	ND
SCUTST3086B02	transcription factor TINY homolog T13E15.5
SCUTST3131H06	ND

**APÊNDICE 11 – Clones Selecionados da Variedade Tolerante (SP81-3250)
com Indução em Três Tempos do Experimento**

30 minutos, 6 e 12 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCAGLR2011C02	fructokinase
SCBGLR1113G03	ND
SCBGST3108H05	homeobox protein rough sheath 1
SCBGST3111B04	ND
SCBGST3111D06	ND
SCJLLR1101E10	ND
SCMCLR1125A03	ND
SCMCST1057G07	secreted glycoprotein 2
SCRFST1044D08	ND
SCRFST1045C12	ND
SCSBST3095H05	ND
SCSFLR2031A12	mitochondrial energy transfer protein
SCSFST3073H10	ND
SCSGLV1010D10	ND
SCSGST1068E08	glucose-6-phosphate isomerase precursor
SCSGST1071B11	ND
SCUTST3092C08	putative phosphoserine aminotransferase
SCVPST1063E06	GTL1
30 minutos, 6 e 24 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCBGLR1095H05	ND
SCBGLR1118B05	heat shock-related protein precursor
SCBGST3103H10	ND
SCBGST3105H07	ND
SCCCLR1C09D05	ND
SCCCLV1001C09	ND
SCCCRT3002H12	chitinase
SCCCST2002H08	ND
SCMCLR1125H02	contains similarity to cytochrome C oxidase
SCRFST1043A02	ND
SCSFST1064B08	ND
SCSGLV1006C10	ND
SCSGRT2061C02	putative gag/pol polyprotein
SCUTLR2008H11	probable wound-induced protein T9A4.6
SCUTLR2015A07	ND
SCVPST1060G07	ND

30 minutos, 12 e 24 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACLR1126F10	ND
SCCCFL3003E06	cysteine proteinase inhibitor
SCEPAM1051D07	polyphenol oxidase
SCEQLR1091C03	ND
SCJLLR1105A01	histone H2A.4
SCMCST1050B09	putative extensin-like protein
SCRFR3058D04	Barwin, Basic Barley Seed Protein
SCRFS1041E06	heat shock protein 70
SCSBST3099H08	ND
SCSFST3079E11	uncharacterized hematopoietic stem
SCVPCL6064B05	oleosin ZM-I
6, 12 e 24 horas	
CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACLR1130H05	ND
SCACLR1132A05	copper homeostasis factor
SCACLR2014F07	ND
SCBGLR1114G12	ARF2
SCBGLR1120D03	ND
SCBGST3111E01	ND
SCCCST2003D03	ND
SCCCST3002D02	MLA6 protein
SCJLLR1103E06	ND
SCMCST1057B07	initiation factor 5a
SCQGSB1141F03	ND
SCQSST1040G01	patatin homolog T9J22.23
SCQSST3114C01	tubulin beta-7 chain
SCQSST3115B12	ND
SCRLLR1109F09	ND
SCSBST3094B10	ND
SCSBST3098E03	ND
SCSBST3100A01	fructose-bisphosphatase-like protein
SCSBST3101E06	ND
SCSGFL4189F01	drought-induced protein Di19
SCSGLV1011H06	ubiquitin conjugating protein
SCSGST3121C03	cysteine proteinase inhibitor
SCUTLR2023D03	ND
SCUTST3127F05	ND
SCVPST1062G02	putative nucleotide sugar epimerase

**APÊNDICE 12 – Clones Selecionados da Variedade Tolerante (SP81-3250)
com Indução nos Quatro Tempos do Experimento**

CLONES SELECIONADOS	DESCRIÇÃO
SCACLR2022D07	ND
SCBGLR1097E10	ND
SCBGLR1120G12	histone H1
SCBGST3105H05	phosphoenolpyruvate translocator
SCCCST1C06D01	S-receptor kinase M4I22.110 precursor
SCEQLR1092A01	auxin-binding protein 4 precursor
SCJFST1047G04	retroelement reverse transcriptase
SCQGLR1088D01	ND
SCQGST3124A07	ND
SCQGST3125F02	pathogenesis-related protein F20M13.220
SCQSLR1090D08	ND
SCQSST3113A12	ND
SCRFLR2038B09	ND
SCRFST1044F07	ND
SCRFST1046B03	ND
SCSBST3093C10	myb-related protein ZM1
SCSBST3093G10	ND
SCSBST3102G10	ND
SCSFST1064C03	ND
SCSFST3073C12	vesicle-associated membrane protein
SCSFST3077H03	ND

APÊNDICE 13 – Clones Induzidos nas Duas Variedades: Susceptível (SP80-3280) e Tolerante (SP81-3250)

CLONE	DESCRIÇÃO
SCACLR1126F06	MLA6 protein
SCACLR1128A03	ND
SCACLR1128C10	ND
SCACLR1130D02	putative protein kinase
SCACLR1130H05	ND
SCACLR1132B05	eukaryotic cap-binding protein
SCACLR1132D05	HISTONE H3
SCACLR2007A09	ND
SCACLR2007E07	ND
SCACLR2007F07	ND
SCACLR2029D05	ND
SCACLR2029H09	putative nonspecific lipid-transfer protein
SCAGLR2011C02	fructokinase
SCAGLR2018G12	ND
SCAGLR2026B05	ND
SCAGLR2033A08	ND
SCBGLR1095H05	ND
SCBGLR1095H08	ND
SCBGLR1097H10	ND
SCBGLR1100A04	ND
SCBGLR1100A10	homeodomain transcription factor KNAT6
SCBGLR1100D12	ND
SCBGLR1114E09	ND
SCBGLR1114G12	ARF2
SCBGLR1115D07	ring-box 1
SCBGST3103A07	metallothionein-like protein type 2
SCBGST3104C11	ND
SCBGST3104D04	putative protein kinase
SCBGST3105A02	ND
SCBGST3105E03	mitochondrial energy transfer protein
SCBGST3106C01	peroxidase 4 precursor
SCBGST3107G04	shoot meristemless
SCBGST3108C02	adenylylsulfate kinase 1, chloroplast precursor
SCBGST3108C09	SSRP1 protein
SCBGST3109F11	ND
SCBGST3111B03	F10O3.1
SCBGST3111B04	ND
SCBGST3111B08	ND

SCBGST3111D03	ND
SCCCLR1C01G12	PPR-repeat protein, putative
SCCCLR1C06A09	putative aphid transmission factor
SCCCLR1C08F09	ND
SCCCLR1C09D05	ND
SCCCLR1C11A11	probable heat shock protein EMB1
SCCCLR2001C11	ND
SCCCLR2002D11	ND
SCCCLR2004C05	ND
SCCCLR2C01E07	ND
SCCCLR2C02A01	putative wound-induced protein
SCCCLR2C02B09	pirin
SCCCLR2C03A08	ND
SCCCST1C04A12	ribosomal RNA apurinic site specific lyase
SCCCST1C06D01	S-receptor kinase M4I22.110 precursor
SCCCST2003D03	ND
SCCCST3002D02	MLA6 protein
SCCCST3003E01	ND
SCCCST3083A12	ND
SCCCST3083H05	ND
SCEQLR1092A01	auxin-binding protein 4 precursor
SCEQLR1093E12	arabinogalactan-like protein (U09556)
SCEQLR1094F02	40S ribosomal protein S12
SCEQLR1094G05	myb-related protein 1
SCEZLR1031G08	nonspecific lipid-transfer protein precursor
SCEZRT2020A03	chaperonin; similar to GroEL protein
SCJFAD1012A08	auxin responsive transcription factor
SCJFAD1013H07	transport inhibitor response-like protein
SCJFLR2035A07	tonoplast intrinsic protein; ZmTIP1
SCJFLR2035E10	ND
SCJFLR2036B10	ND
SCJFST1047A05	ND
SCJFST1047C06	probable carboxyl-terminal proteinase
SCJLLR1101A02	histone H2A.F/Z
SCJLLR1101E10	ND
SCJLLR1102G03	ND
SCJLLR1102G08	ND
SCJLLR1105A01	histone H2A.4
SCJLLR1106E04	ND
SCJLLR1107E12	nucleoid DNA-binding protein cnd41-like protein
SCJLLR1107F04	ND
SCJLLR1108C11	putative U2 snRNP auxiliary factor
SCJLLR2006A02	transcription factor MYC7E
SCJLLR2006C07	ND
SCJLLR2006G03	ND

SCJLLR2028F08	ND
SCJLRT1015B03	chitinase III C10150
SCMCLR1122B12	ND
SCMCLR1122F09	ND
SCMCLR1124A06	ND
SCMCLR1124B11	ND
SCMCLR1124C06	ND
SCMCLR1125A03	ND
SCMCLR1125B03	RNA polymerase subunit beta
SCMCST1049B01	ND
SCMCST1051A11	ND
SCMCST1053D08	ND
SCMCST1054G04	ND
SCMCST1056F10	ND
SCMCST1058C01	ND
SCMCST1058H11	ND
SCQGLB2042B04	SP8 binding protein homolog
SCQGLR1088H10	superoxide dismutase
SCQGLR2025H11	ND
SCQGLR2032D03	ND
SCQGST3124D03	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 1
SCQGST3125C08	amidase
SCQGST3126E03	ND
SCQGST3126E09	ND
SCQSLR1089F09	cim1 protein homolog
SCQSRT2033F06	putative flavonoid 3'-hydroxylase
SCQSRT3054H12	probable germin protein 4
SCQSST1040G01	patatin homolog
SCQSST3113A12	ND
SCQSST3113D04	ND
SCQSST3115B12	ND
SCRFLR2021A10	ND
SCRFLR2021H11	protein kinase (PK)
SCRFLR2034B05	ND
SCRFLR2038B09	ND
SCRFST1041A02	ND
SCRFST1041C03	ND
SCRFST1042D06	ND
SCRFST1042E04	ND
SCRFST1045D11	ND
SCRFST1046A04	receptor kinase-like protein
SCRFST1046F05	ND
SCRLLR1109A11	putative cytochrome P450
SCRLLR1109F09	ND
SCRLLR1109F10	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase-like protein

SCRLLR1111C05	ND
SCRLLR1111F07	ND
SCRLLR1111H07	ND
SCRUFL3068B02	GF14-c protein
SCSBRT3039E08	chitinase III C10501
SCSBST3095B06	inorganic phosphate transporter
SCSBST3096H07	isoflavone reductase homolog irl
SCSBST3098C11	Oxalyl-CoA decarboxylase
SCSBST3100G06	chlorophyll a-b binding protein m9 precursor
SCSBST3101E06	ND
SCSBST3102C02	ND
SCSFHR1045B07	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
SCSFRL2009H03	ND
SCSFST1066E05	ND
SCSFST1066F08	putative ubiquitin protein
SCSFST1067B01	ND
SCSFST3073C11	putative protein kinase
SCSFST3075A09	omega-3 fatty acid desaturase
SCSFST3076A03	TEL1S.2
SCSFST3077C10	putative chromosome associated protein
SCSFST3079E04	ND
SCSFST3079E08	F1N21.22
SCSFST3080G05	ND
SCSFST3081H12	iron sulfur subunit of succinate dehydrogenase
SCSFST3082E05	ND
SCSFST3082E10	similar to putative reverse transcriptase
SCSGAD1009A05	putative receptor-like protein kinase
SCSGAD1009F02	cyclophilin-like protein
SCSGLV1004A12	putative anthocyanin 5-O-glucosyltransferase
SCSGLV1005C06	proline-rich protein F26K10.180
SCSGLV1005E05	ND
SCSGLV1007E05	ND
SCSGLV1008F06	ND
SCSGLV1009E12	ND
SCSGLV1009F07	ND
SCSGRZ3063E01	arginine decarboxylase
SCSGST1068C10	ND
SCSGST1069D04	putative transcription factor
SCSGST1071B11	ND
SCSGST3120D12	Similar to NAM like protein (AC005310)
SCUTLR2015E02	ND
SCUTLR2015G05	ND
SCUTLR2030C12	ND
SCUTST3085B04	ND
SCUTST3085F01	ND

SCUTST3086B02	transcription factor TINY homolog T13E15.5
SCUTST3087E08	DsPTP1 protein
SCUTST3091A01	chloroplast ribosomal protein L12
SCUTST3091C09	ND
SCUTST3092D07	MutT domain protein-like
SCUTST3127E12	ND
SCUTST3130D10	disease resistance protein RPM1 homolog
SCVPLR2012B03	Similar to translation initiation factor IF2
SCVPLR2019C01	cell wall invertase; beta-fructosidase
SCVPLR2019F01	60S ribosomal protein L11A
SCVPRZ3025F04	uncoupling protein mitochondrial
SCVPST1059H08	ND
SCVPST1061D07	ND
SCVPST1061D11	ND
SCVPST1062G02	putative nucleotide sugar epimerase
SCVPST1063A12	ND
SCVPST1063C04	putative retroelement pol polyprotein
SCVPST1063F10	AMP-binding protein
SCVPST1063H10	ND