

Relatorio final CNPq nº19/2004 - Universal

Processo : 475378/2004-0

Estudo da interação molecular entre *Hevea brasiliensis* e *Microcyclus ulei*

2008

Responsável : Dr. Júlio César de Mattos Cascardo

Equipe de execução do projeto na UESC:

Biologia molecular: Dr. Dominique GARCIA (Pesq. Vis. CIRAD, coordenador da pesquisa)
Dr. Abelson da Silva Gesteira (pesquisador visitante)
Bioinformática: Dr. Nicolas Carel (pesquisador visitante)
Alunos : Leandro Araújo de Sousa (IC Fapesb)
Lara Freitas Matias (IC Fapesb)
Sizenando José de Andrade Junior (Mestrado Fapesb)
Técnico: Antonio Carlos de Souza Rodrigues (Apoio técnico CNPq)

Grupo de apoio na Plantação Michelin da Bahia (departamento de P&D):

Chefe Carlos Raimundo Reis de Mattos
Técnico Saulo Cardoso

Grupo de apoio no CIRAD (Montpellier, França):

Biologia molecular: Dra. Valérie Pujade-Renaud
Bioinformática: Xavier Argout

Grupo de discussão na UESC :

Biologia molecular: Dr. Júlio César de Mattos Cascardo
Dra. Fabienne Micheli (Pesq. Vis., CIRAD)

RESUMO

- *Contexto e objetivos* O Mal-das-folhas (South American leaf blight) é causado por um ascomycota, *Microcyclus ulei* (P. Henn.) c. Arx., e é para a seringueira a praga mais importante na América Latina e a maior ameaça para as plantações da Ásia e da África que produzem 95% da borracha mundial com cultivares suscetíveis. Até hoje poucas informações eram disponíveis para entender os processos biológicos do desenvolvimento da doença. Por isso, bibliotecas de ESTs usando a técnica SSH (suppression subtractive hybridization) foram criadas para identificar genes diferencialmente expressos em diferentes etapas da interação patogênica com *Microcyclus ulei*.
- *Methodologia* Para identificar genes candidatos e ganhar uma melhor compreensão da interação hospedeiro-parasito no patossistema *Hevea brasiliensis* – *Microcyclus ulei*, bibliotecas SSH foram comparadas. Folíolos do cultivar parcialmente resistente, MDF180, e do cultivar suscetível PB314 foram inoculados. Utilizando as folhas infectadas entre 6 e 72 horas p.i. e entre 4 e 28 dias p.i. (vs. folhas saudáveis coletadas nas mesmas condições), duas bibliotecas para cada cultivar enriquecidas em genes altamente expressos foram preparadas.
- *Resultados* A partir de 6667 clones ESTs aleatoriamente catados entre todas as bibliotecas e sequenciados, foram obtidos 1379 singletons e 440 contigs seja um total de 1819 sequências não redundantes. A redundância de cada bibliotecas foi variável entre 87% em PB314 4-28 d.p.i. até 23 % em MDF180 4-28 d.p.i. Das sequências geradas, 49% foram anotadas com uma função provável, 21% corresponderam a função desconhecidas e 30% não mostraram similaridades com outras sequências presentes em GenBank NR, pfam e GEO. As sequências de cada bibliotecas mostraram-se altamente específica do cultivar e do tempo após infecção. Uma comparação com as sequências de *Hevea* disponíveis em Genbank mostra que em média para cada biblioteca, mais de 77% das sequências são originais. A comparação das seqüências isoladas e anotadas em cada cultivar permite emitir hipóteses sobre os mecanismos levando a resistência ou susceptibilidade dos cultivares.

Vias de sinalização e genes candidatos envolvidos na resistência são propostos e deveram ser confirmados por estudos complementares.

Foram identificados varios fragmentos microsatelites que são de grande importancia para desenvolver novos marcadores moleculares e podem possibilitar o posicionamento de alguns deles no mapa genético da seringueira e eventualmente colocalizar com QTLs envolvidos na resistência ao Mal-das-folhas.

Os primeiros genes expressos isolados do micélio do *Microcyclus ulei* e sequenciados permitiram detectar que os ESTs desse fungo estavam mais ricos em GC em comparação as ESTs da hévea possibilitando a detecção da origem dos ESTs nas bibliotecas SSH de interação.

- **Conclusão** Esse trabalho representa as primeiros recursos moleculares (ESTs) obtidos a partir de folhas de seringueira e mais especificamente a partir de uma interação entre *Hevea* e *M. ulei*. Esses novos recursos são importante para entender melhor os mecanismo molecular da resistência da seringueira ao *M. ulei* tanto como para desenvolver macadores a partir de genes candidatos para uma seleção assistida por marcadores moleculares. Com a aprovação pela Agence Nationale de la Recherche do projeto GENESALB (cord. CIRAD, parceria CIRAD, Michelin, UESC), enfoque será dado a validação de genes candidatos identificado nesse e envolvido na resistência durável.

INTRODUÇÃO

A seringueira, *Hevea brasiliensis*, é nativa do bacia amazônica e pertence ao gênero *Hevea* que abrange onze espécies, das quais *H. brasiliensis* é a única cultivada comercialmente por ter melhor rendimento e qualidade de látex (GONÇALVES et al., 2004; GONÇALVES et al., 2005a; GONÇALVES et al., 2005b; OMOKHAFE, 2004). A sua dispersão natural está circunscrita aos limites da região amazônica, porém essa cultura mostra grande adaptabilidade aos mais variados ambientes que possuam clima tropical úmido (LIBEREI et al., 2007).

As grandes áreas de produção de borracha mundiais concentram-se no sudeste asiático e é baseada principalmente em cultivares susceptíveis ao Mal-das-folhas, provocado pelo fungo ascomiceto, *Microcyclus ulei*, tornando essa doença uma ameaça para a heveicultura nesses países (RAO, 1973; CHEE, 1985). O Brasil já foi o maior produtor mundial de borracha natural, mas devido à alta ocorrência de surtos do Mal-das-folhas a cultura da seringueira entrou em crise e hoje o país não produz o suficiente para suprir suas necessidades internas, sendo necessária a importação de borracha natural (GASPAROTTO et al., 1997; COSTA et al., 2001). Na Bahia, a heveicultura foi introduzida por volta de 1906 e atualmente o estado é o terceiro maior produtor de borracha natural do país após os estados de São Paulo e Mato Grosso (MACEDO et al., 2002; CASTRO FILHO et al. 2003). No sudeste da Bahia, a seringueira representa uma alternativa para os cultivos em sistema agroflorestal incluindo banana e cacau, tendo como principal vantagem a diversificação da renda dos pequenos produtores. Além de que, esta planta pode ser cultivada para recuperação de solos, e tem sido discutido o seu potencial uso no mercado de créditos de carbono (FURTADO, 2007).

Um maior desenvolvimento da heveicultura no Brasil depende, sobretudo do combate ao Mal-das-folhas, que pode envolver diferentes métodos, porém dentre estes métodos o melhoramento genético da planta aparece como a solução mais viável em longo prazo. No intuito de desenvolver cultivares resistentes a doença, programas consecutivos de melhoramento genético foram desenvolvidos na América Latina. De 1928 até 1945 a Ford Motor Company fez plantios industriais com materiais de prospecções. Essa iniciativa deixou cultivares que serviram para o

programa de melhoramento da Firestone de 1947 até 1983. A Firestone em colaboração com institutos de pesquisas como o Instituto Agrônomo do Norte, desenvolveu o segundo grande projeto de melhoramento da seringueira e gerou o intercâmbio de material vegetal entre diferentes regiões do mundo. Desses dois programas de melhoramento poucos cultivares foram selecionados e recomendados para plantio em grande escala, provavelmente por causa da baixa produção das plantas resistentes, quando comparado com os cultivares asiáticos. Em 1991, a partir dos acessos deixados pela Firestone, a Michelin e o CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) iniciou um programa de melhoramento ao Mal-das-folhas baseados nos avanços dos conhecimentos sobre interações planta-patógeno.

O programa de melhoramento CMB (Cirad – Michelin – Brasil) utiliza genótipos meio-domesticados e resistentes ao Mal-das-folhas nos planos de cruzamento (Leguen et al., 2002 ; Garcia et al., 2002 a, b ; Garcia et al., 2004). Porém, para cultivos perenes, uma das dificuldades do melhorista é identificar e selecionar resistências duráveis, frente a patógenos com poder patogênico altamente variável (Mattos et al., 2003). Entre os diferentes métodos para validar a sustentabilidade das resistências, as ferramentas moleculares foram escolhidas por fornecer um melhor conhecimento (identificação, caracterização funcionamento) dos genes de resistência e um uso racional desses no processo de criação de novas variedades. Desde 2002, dentro da Unidade Mista de Pesquisa – Polimorfismo de Interesse Agronomico (UMR-PIA, França), as atividades sobre seringueira desenvolvidas pelo CIRAD (Montpellier) foram centradas nas análises dos fatores genéticos de resistência a doenças e principalmente o Mal-da-folhas. Os trabalhos apoiam-se num dispositivo incluindo a estação CIRAD na Guiana Francesa (Kourou) e os laboratórios da UMR-PIA (Montpellier). Os resultados maiores foram obtidos a traves o mapeamento de genes de resistência.

As análises do determinismo genético e o mapeamento de QTLs de resistência ao *M. ulei*, realizados na descendência PB260xRO38 em condições controladas (inoculação com isolados do fungo) permitiram identificar 8 QTLs de resistência cujo 1 QTL com tem efeito maior, é localizado no grupo de ligação g13, é comum a todas as cepas e, por isso, pode ser responsável por até 30% da variabilidade fenotípica (Lespinasse et al., 2000). Na mesma descendência, avaliada para a resistência no campo (i.e. condições de infecção natural), o determinismo da

resistência parece ser monogênico (Le Guen et al., 2003). A totalidade dos alelos resistentes identificados nesse cruzamento provem do genótipo F4542 (*H. Benthamiana*) parente do clone resistente RO38. Os resultados mostram que nenhum fator de resistência é detectado no parente susceptível oriundo de uma seleção asiática (clone cultivado PB260).

Para verificar quais QTLs de resistência apresentam mais estabilidade, cepas de *M. ulei* com agressividades diferentes sobre RO 38 foram testadas em condições controladas na descendência PB260xRO38. Resultados originais com essas cepas mostram que no genótipo RO38 (Le Guen et al., 2006): 1) resistências parciais média podem corresponder a presença de um QTL de maior efeito ou ao acúmulo de vários QTLs com efeito variável, enquanto as resistências completas correspondem a determinismos complexos; 3) cepas isoladas podem quebrar a maioria (resistência parcial baixa) ou a totalidade (susceptibilidade) dos QTLs identificados. Todos esses resultados confirmam a complexidade do determinismo da resistência a *M. ulei* em seringueira. Para entender melhor a base genética da resistência ao Mal-das-folhas, a base genética de outro tipo de resistência estão sendo mapeado na cv. FX2784 quais segrega como sendo monogênica e na cv. MDF180 quais resistência estável permite limitar a disseminação do fungo pela limitação da conidiogênese e ausência da ascogênese (Leguen et al., 2008).

Nesse contexto, na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), foi iniciado em 2005, o estudo genômico das interações moleculares nesse patossistema numa parceria entre o CIRAD, a UESC e as Plantações Michelin da Bahia com o apoio financeiro do CNPq (Edital Universal nº19/2004).

MATERIAL E METODOLOGIA

1. ISOLAMENTO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS PELA TÉCNICA SSH - SUPPRESSION SUBTRATIVE HYBRIDISATION

1.1. Material vegetal

Plantas enxertadas de seringueira com os genótipos MDF180 (parcialmente resistente) e PB314 (susceptível) foram cultivadas em viveiro telado, em pote de 20 L na Plantações Michelin da Bahia (Ituberá, BA, Brasil). As plantas foram adubadas com NPK (20:20:20) mensalmente.

1.2. Fungo

Três raças do *Microcltus ulei* (FTP13, FTP19, e FTP22) isoladas nas Plantações Michelin (Sudeste da Bahia) foram cultivados *in vitro* no meio de cultivo PDA no Laboratório de Fitopatologia das Plantações Michelin da Bahia (Ituberá, BA).

1.3. Inoculação

Três raças de *Microcyclus ulei* com virulências complementares, foram usadas para infectar as plantas. Utilizou-se uma suspensão de 2×10^5 conídios/ml, acrescida de Tween 80 a 0,05%, provenientes de lesões recém esporuladas, obtidas de clones sensíveis inoculados com isolados esporulados em meio de cultura segundo Mattos (1999). As inoculações foram realizadas com ajuda de um atomizador (Paasche airbrush set, modelo H), na face inferior do folíolo jovens e de coloração violeta, correspondentes ao estágio B₂, em câmara úmida com temperatura variando entre 23 a 26°C e umidade superior a 95% (Figura 1). Após as inoculações as plantas permaneceram 24 h no escuro, e a partir daí, até 12 dias, sob um regime de 12 h de escuro e 12 h de luz a 2000 lux. As folhas de plantas controles foram também molhadas com água destilada acrescida de Tween 80 a 0,05%. As plantas permaneceram 12 dias em câmara úmida. Depois de 12 dias, as plantas são mantidas em viveiro telado.

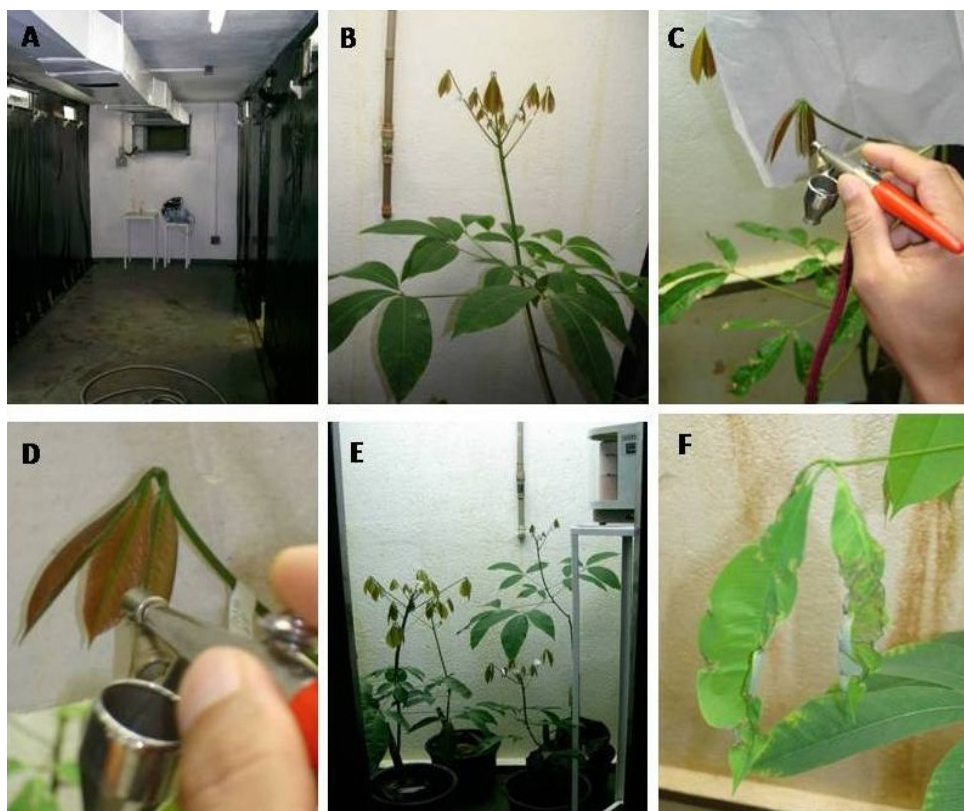


Figura 1. Inoculação de conídios de *M.ulei* em folíolos jovens de seringueira: a) Câmara úmida onde foram realizadas as inoculações; b) Seleção de plantas dos cultivares MDF 180 e PB 314, que apresentavam folíolos jovens (até 10 dias após lançamento); c) Seleção dos folíolos a serem inoculados e separação de outros folíolos a serem usados como testemunhas (inoculados apenas com água); d) Inoculação da face inferior dos folíolos; e) Etiquetagem e início da incubação com fotoperíodos; f) Folíolo de MDF 180 10 dias após inoculação.

1.4. Coleta das folhas

Para cobrir todas as fases da infecção, o material vegetal foi coletado após 6, 12, 24, 48 e 72, 96 horas de inoculação e em seguida, a cada 6 dias por um período de 58 dias, período necessário para o aparecimento e desenvolvimento dos estromas. A nervura central das folhas foi retirada. As amostras foram congeladas com nitrogênio líquido e conservadas a -80°C .

1.5. Extração do RNA

O RNA total foi extraído usando o kit Concert® plant RNA extraction (Invitrogen, France). O RNA foi precipitado com $250\mu\text{l}$ de uma solução de Citrato de

Sódio 1.2M, NaCl 0.8M e de 250µl de álcool isopropílico. A qualidade do RNA foi verificada em gel de 1% agarose/Brometo de Etídio/ tampão TAE 1X.

Para as bibliotecas, MDF 180 '6-72 horas' e PB 314 '6-72 horas', 1 µg de RNA total foi obtido misturando 200 ng do RNA total oriundos das folhas infectadas coletadas 6, 12, 24, 48 e 72 horas a.i. O mesmo processo foi realizado para as folhas sadias dos dois clones.

Para as bibliotecas, MDF 180 '4-28 dias' e PB 314 '4-28 dias', 1 µg de RNA total foi obtido misturando 200 ng do RNA total oriundos das folhas infectadas coletadas 4, 10, 16, 22 e 28 dias a.i. O mesmo processo foi realizado para as folhas sadias dos dois clones.

Essas novas amostras foram tratadas com DNase.

1.5. Bibliotecas SSH

Para cada extrato de RNA foi obtido SMART-cDNA usando o SMART-PCR cDNA synthesis kit (Clontech, Palo Alto, CA). O kit PCR-Select cDNA Subtraction (Clontech) foi utilizado para obter as seqüências diferencialmente expressas. O cDNA 'tester' (folhas infectadas) foi subtraído duas vezes do cDNA 'driver' (folhas sadias) seguindo as recomendações do fabricante (forward subtraction).

Todas as reações de PCR foram realizadas com o kit Advantage DNA PCR (Clontech). O segundo produto de PCR (forward subtraction) foi purificado usando o kit Nucleo Trap (Clontech). As seqüências subtraídas de cDNA foram ligadas diretamente no vector pGEM-T easy (Promega, Madison) e os plasmídios recombinantes foram usados para transformar células competentes de *Escherichia coli* ((ElectroMAX DH10B, Invitrogen, França).

1.6. Miniprep

As extrações dos plasmídios bacterianos são feitas através da lise alcalina, e envolve o uso de três soluções PI, PII e PIII (anexo I) subsequente precipitação com 100µL de isopropanol. A lavagem do precipitado é feita com 1mL de etanol 70% e o DNA purificado é ressuspensionado em 80µL de água mili-Q autoclavada. A integridade do DNA é verificada em gel de agarose 1%, revelado com Brometo de Etídio sob luz UV.

1.7. Sequenciamento

O sequenciamento do DNA foi realizado no laboratório da UESC (BA, Brasil). Os plasmídeos dos clones de cDNA foram extraídos e sequenciados numa reação de 5 µl utilizando 2 µl do premix de sequenciamento DYEnamic™ ET terminator, 0,3 ml do primer reverse M13 (3,2 pmole) e 2,7 µl do plasmídeo de DNA. O ciclo de sequenciamento foi o seguinte : 40 ciclos (95°C por 10s; 50°C por 15s; 60°C por 1,33 min) num Eppendorf thermocycler. As amostras em placas Well de 96 poços foram analisadas com o sequenciador MegaBACE™ 1000 (Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA).

1.8. Análise dos dados por bioinformática

Análises *in silico* permitem eliminar as seqüências de baixa qualidade e, para cada cDNA, o vector, os adaptadores, os primers, a cadeia pA/pT. Contigs são montados para reduzir a redundância entre as seqüências. Os cDNA resultantes são comparados por análises de similaridade contra as seqüências do banco de dados GenBank, utilizando o programa BLASTX e BLASTN.

2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA VIA MACROARRANJOS

2.1. Confeção dos macroarranjos

2.1.1. Escolha dos fragmentos de interesse

Entre as seqüências únicas identificadas nas bibliotecas subtrativas foram selecionadas 353 ESTs das variedades susceptível e resistente de *H. Brasiliensis* relacionadas com proteínas envolvidas nas vias de sinalização, hormônios, transporte e defesa. As bactérias recombinantes correspondentes foram manualmente separadas em capela de fluxo laminar e inoculadas em microplacas de 96 poços contendo 1,2 mL de meio LB. Foram crescidas em incubadora/agitadora a 37°C e 260 rpm, *overnight*.

2.1.2. Extração de DNA plasmidial

As colônias crescidas em placas de inóculo foram centrifugadas a 4.000 rpm, 20°C por 10 minutos. O sobrenadante (SN) foi descartado, e as placas foram colocadas para secar invertidas sobre papel absorvente por aproximadamente 2 minutos. Adicionou-se 200 µL de solução PI (EDTA pH 8,0 10 mM; Tris-HCl pH 7,4 26 mM e 0,92% de glicose). Em seguida, as placas foram seladas e agitadas por 2 minutos em vórtex na velocidade máxima, centrifugando-as em seguida a 4.000 rpm, 20°C, por 10 minutos. Novamente dispensou-se o SN e as placas foram colocadas para secar novamente invertidas sobre papel absorvente. Colocou-se 60 µL da solução PI, selou-se e agitou-se por 2 minutos em vórtex na velocidade máxima. Transferiu-se 60 µL da placa de inóculo para placas de fundo U com 3 µL de RNase (10 mg/ml) e acrescentou-se 60 µL da solução PII (NaOH 0,5 M e SDS 1%). Misturou-se por inversão 40 vezes. Deixou-se 5 minutos descansando. Acrescentou-se 60 µL da solução PIII (acetato de potássio 3 M pH 5,2 e ácido acético glacial 11,5%), misturou-se invertendo 40 vezes e deixou-se 30 minutos em estufa a 90°C seguidos de 10 minutos em gelo. Centrifugou-se a 4.000 rpm, 20°C, 10 minutos e transferiu-se 70 µL do SN para uma microplaca de fundo V. Adicionou-se 70 µL de isopropanol e centrifugou-se por 45 minutos a 4.000 rpm e lavou-se o *pellet* com 200 µL de etanol 70% por três vezes. Descartou-se todo o SN, secando sobre papel absorvente e deixou-se secar as placas em temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuscitado em 60 µL de água Milli-Q. As amostras foram visualizadas em eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

2.1.3. Amplificação dos fragmentos selecionados

Os DNAs plasmídiais foram diluídos na proporção de 1:100 com água Milli-Q. Para cada reação de PCR de 50 µL utilizou-se: 6 µL da diluição, 1X de tampão para PCR, 0,4 mM de dNTPs, 1 mM de MgCl₂, 0,2 µM de *primers* SP6 (5'- ATT TAG GTG ACA CTA TAG - 3') e T7 (5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC - 3'), 2 unidades de Taq DNA Polimerase (Fermentas). A reação foi realizada no termociclador AmpPCR 9700 (Applied biosystems) utilizando para amplificação a temperatura inicial de 94°C por 4 minutos, seguida por 30 ciclos de 94°C por 40 segundos, 54°C para anelamento dos *primers* por 40 segundos e 72°C para extensão dos fragmentos por 1 minuto e 20 segundos. Após os ciclos, as reações permaneceram

a 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

2.1.4. Preparo das membranas de náilon para os macroarranjos

Os produtos PCR foram fixados em membranas de náilon Hybond N+ (Amershan Biosciences), da seguinte forma: 15 µL do DNA foi desnaturado usando 5 µL de NaOH 0,8 M (ficando a concentração final de NaOH na solução 0,2 M); foi feita leve agitação por 2 minutos e em seguida incubou-se a 37°C em estufa de incubação (EB-60, LabTrade) por 15 minutos; enquanto isso lavou-se e flambou-se o replicador com isopropanol (procedimento repetido a cada mudança de amostra); foi transferido para recortes da membrana de 8,0 x 12,5 cm, com o replicador aproximadamente 7 µL da solução contendo DNA-0,2M de NaOH, ao término das transferências secou-se as membranas com auxílio do secador; realizou-se então a fixação da solução na membrana utilizando o *optimal Cross-linker* (Spectro Linker, Spectronics Corporation) por duas vezes. Então as membranas foram armazenadas a temperatura ambiente.

A organização das seqüências nas membranas obedeceu aos seguintes critérios: Na membrana 1 foram colocadas as seqüências referentes a estresse-defesa e transportadores (Figura 2); na membrana 2 foram fixadas seqüências referentes a estresse-defesa (as que não couberam na membrana 1), as vias de sinalização e hormônios. Cada seqüência foi fixada em duplicata, e foi utilizado como controle positivo o gene ribossomal 18S e como controle negativo DNA genômico do fago lambda.

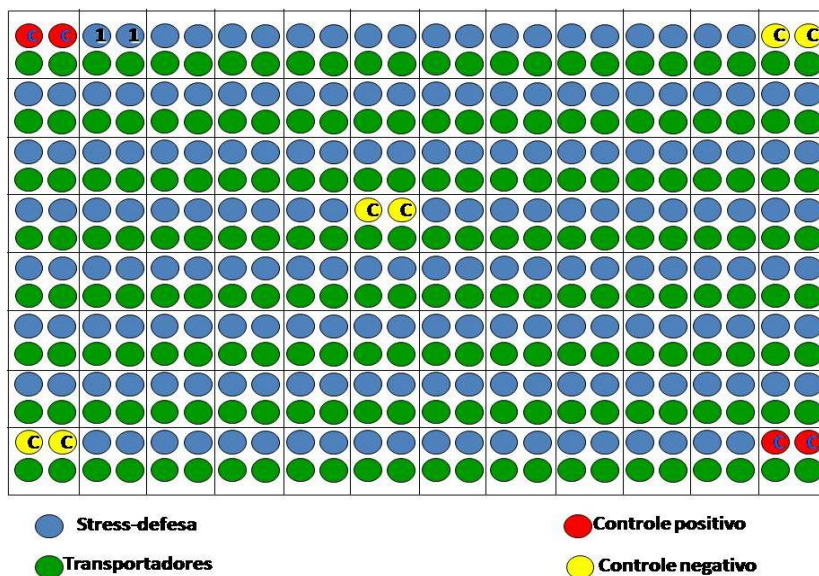


Figura 2. Organização das seqüências na membrana1. Como controle positivo foi utilizado o produto de PCR do gene do 18s e como controle negativo foram utilizados fragmentos do fago Lambda (100 ng/uL) nas extremidades e o plasmídeo não transformado, utilizado na construção das bibliotecas subtrativas.

2.2. Obtenção e marcação de cDNAs alvos para hibridação

2.2.1. Inoculação de *M. ulei* em folíolos jovens de seringueira

Plantas de seringueira das cultivares MDF 180 e PB 314 criadas em casa teladas na plantação Michelin da Bahia (Itubera, BA), no estágio foliar B2 (Hallé et al., 1978) foram inoculadas com uma suspensão de 2×10^5 conídios/ml do isolado FTP 28 do fungo *M.ulei* acrescida de Tween 50 (0,05%) na face inferior dos folíolos. As plantas foram mantidas em câmara úmida 24 horas no escuro (temperatura mínima de 23°C no escuro e 25°C no claro, com umidade superior a 95%) seguidas por 10 dias com fotoperíodo de 12 horas. Para plantas testemunhas, a face inferior das folhas foi pulverizada com água. As folhas foram coletadas 10 d.p.i. As nervuras centrais foram retiradas e os tecidos congelados no nitrogênio líquido para transporte seguido por conservação a -80°C .

2.2.2. Extração de RNA total

De 50 a 100 mg do material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e homogeneizado com 500 µL do tampão de extração *Concert Plant RNA reagent (Invitrogen)*. Posteriormente, foi feita agitação com uso do vórtex até a completa homogeneização do material vegetal, que foi em seguida mantido por 5 minutos no gelo. Ao término do tempo de incubação a amostra foi centrifugada a 13.500 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Foi adicionado 100 µL de NaCl 5M e 300 µL de clorofórmio, agitando-os por inversão por 2 minutos. As amostras foram centrifugadas a 13.500 rpm por 10 minutos e o topo da fase aquosa foi transferido para um novo microtubo, neste foi adicionado 500 µL de isopropanol gelado, foi feita leve agitação e incubados no gelo por 10 minutos, após isso centrifugou-se as amostras a 13.500 rpm por 30 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1.000 µL de álcool etílico 70%, agitou-se levemente e foi feita centrifugação a 13.500 rpm por 5 minutos. Em seguida o álcool foi totalmente retirado e adiciona-se 50 µL de H₂O DEPC. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

2.2.3. Tratamento com DNase I

As amostras de RNA total extraídos (45µl) foram tratados com 1 un. de DNase (Fermentas). A reação foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Em seguida adicionou-se 2 µL de EDTA (10mM, pH 8,0) e incubou-se a 65°C por 10 minutos, para inativação da DNase.

2.2.4. Síntese de cDNA

A síntese do cDNA (fita simple) foi realizada utilizando 10 a 5 µg de RNA total, 0,5 µg de oligo(dT) e 11 µl de H₂O DEPC, 5 min. a 70°C seguido por 4°C no gelo. Parar a reação da reverse transcriptase, foi utilizado 4 µL de 5X de *reaction buffer*, 2 µL de mix dNTPs a 10mM; 20U de inibidor de ribonuclease; e 2 µL de H₂O DEPC. Esse mix foi incubado a 37 °C por 5 minutos e foi adicionado 200U de *RevertAid Minus M-MuLV reverse transcriptase* e foi incubado por 60 minutos a 42 °C. Posteriormente a reação foi aquecida a 72 °C por 10 minutos e colocada em seguida no gelo.

2.2.5. Marcação dos cDNAs alvos (Fixação da fosfatase alcalina)

Os cDNAs alvos foram marcados utilizando o kit AlkPhos Direct™ Labelling (GE Healthcare). A concentração determinada para os procedimentos de hibridação foi 200 ng/μL. Foram testadas concentrações inferiores de cDNA para o procedimento de hibridação, porém essas mostraram-se insuficientes para o procedimento. Para marcação do cDNA denaturou-se XX μl por 5 minutos a 99°C em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) seguido por incubação no gelo por 5 minutos. Para cada reação de marcação foi adicionado 10 μL de *reaction buffer*, 2 μL de *labelling reagent* e 10 μL de solução *cross-linker*. A reação foi mantida à 37°C por 30 minutos.

2.3. Hibridação dos macroarranjos

2.3.1. Pré-hibridação e hibridação das membranas de macroarranjo

As pré-hibridações, hibridações e lavagens das membranas foram realizadas de acordo com o protocolo proposto pelo kit AlkPhos Direct™ Detection System (GE Healthcare). As membranas de macroarranjos foram inicialmente tratadas com uma solução fervente de SDS 0,1% para diminuir o possível *background* pré-existente.

As pré-hibridações foram realizadas em garrafas de vidro a 55°C por 40 min, utilizando 12 mL por membrana de solução AlkPhos Direct™ *hybridization buffer* contendo NaCl 0,5 M e 4% de reagente de bloqueio. A hibridação foi realizada adicionando o cDNA alvo marcado na mesma solução utilizada na pré-hibridação. As membranas de macroarranjo foram hibridadas por um período de 16 horas, a 55°C, em forno de hibridação digital (*Fischer Scientific*). Após esse período, as membranas foram lavadas.

2.3.2. Lavagem das membranas

Após a hibridação, procedeu-se à lavagem das membranas para a retirada do excesso de cDNA alvo e das hibridações inespecíficas que possivelmente tenham ocorrido. As membranas foram lavadas duas vezes, por períodos de 20 minutos, a 55°C com 100 mL de tampão de lavagem primário (2 M de uréia, 0,1% de SDS, 50

mM de fosfato de sódio pH 7,0, 150 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂ e 0,2% de reagente de bloqueio). Em seguida, foram feitas duas lavagens de 10 minutos cada, a temperatura ambiente com 100 mL de tampão secundário (50 mM de Tris base, 100 mM de NaCl e 2 mM de MgCl₂). Em seguida, as membranas foram incubadas com CDP-STAR™ *detection reagent* (com cerca de 40 µL/cm²) por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a retirada do excesso do reagente de detecção as membranas foram seladas em sacos plásticos para exposição em Hypercassette™ (Amersham), contendo uma folha de filme de autoradiografia Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) por um período de 1 hora e 30 minutos. A revelação do filme procedeu-se imergindo-o por 1 minuto, sob agitação, em solução reveladora, seguida de imersão em H₂O por 30 segundos, imersão em solução fixadora por 1 minuto sob agitação, e depois os filmes foram lavados em água corrente e expostos ao ar para secagem. As imagens foram digitalizadas através do ImageScanner (Amersham). A qualidade tridimensional dos spots foram verificadas utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare).

2.3.3. Recuperação das membranas após a hibridação

As membranas hibridizadas tiveram os cDNAs alvo removidos por duas lavagens de 15 min, com solução pré-aquecida a 65°C contendo 0,4 N de NaOH e 0,1% de SDS. Em seguida procedeu-se nova lavagem por duas vezes, a temperatura ambiente, com solução contendo 0,1% de SDS, 0,1% de SSC e 0,2 M de Tris-HCl pH 8,0.

Após a recuperação das membranas, elas foram novamente lavadas com o CDP-STAR™ *detection reagent* (com cerca de 40 µL/cm²), seladas em sacos plásticos e expostas em Hypercassette™ (Amersham), contendo uma folha de filme de autoradiografia Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) por um período de 1 h 30 min. Foi verificado a ausência de sinal comprovando a deshibridação completa da membrana.

2.4. Análise estatística das hibridações dos macroarranjos

A quantificação da intensidade do sinal relacionada com o número de transcritos no cDNA alvo foi feito utilizando o programa BZScan (LOPEZ et al., 2004)

que utiliza algoritmos próprios para quantificação de imagens de arranjos em membranas de náilon. Cada *spot* foi determinado pelo posicionamento de um *grid* automático com ajustes manuais sobre a imagem do arranjo. O valor da intensidade foi determinado pelo algoritmo *Quant Fit Calculated* que: i) determina a subtração do *background* local sobre a intensidade de cada *spot*; ii) determina qualitativamente os spots não confiáveis (qualidade métrica). Os dados obtidos foram transferidos para a Microsoft Excel 2007 para a conversão dos dados em base logarítmica, normalização e análise estatística. Os gráficos foram construídos utilizando os softwares *GraphPad Prism 3.0* e Microsoft Excel 2007.

Os dados foram normalizados utilizando o método de normalização global baseado na subtração de um fator *c*, que é computado separadamente utilizando a média de cada ponto analisado em comparação à média do controle como descrito por YANG et al. (2002), estabelecendo comparação entre a cultivar resistente e a suscetível. Os dados normalizados foram visualizados em gráficos MA plot. Os gráficos MA representam a mudança na taxa de expressão $[M = \log_2(\text{inoculado} \div \text{controle})]$ dependentes da intensidade $[A = \log_2 \sqrt{(\text{inoculado} \times \text{controle})}]$. Os cálculos foram feitos confrontando os valores obtidos entre as distintas cultivares e não entre inoculado e o controle. Foi atribuída uma “linha de corte” no valor M de 2 normalmente recomendado na literatura.

Nos gráficos MA plot, o eixo M demonstra a quantidade de vezes que uma seqüência esta mais expressa em uma das cultivares em relação a outra cultivar. Nesses gráficos os valores positivos representam as seqüências diferencialmente expressas na cultivar resistente, e os valores negativos as seqüências mais expressa no cultivar susceptível. O eixo A do gráfico representa valores obtidos para comprimir as informações e tornar possível a visualização destas, não sendo relevantes em questão das diferenças de expressão.

3. ISOLAMENTO, SEQÜENCIAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE GENES EXPRESSOS DE MICÉLIO DE *MICROCYCLUS ULEI*

3.1. O fungo

O isolado de *Microclavus ulei* (PMB20) coletado na Plantação Michelin da Bahia (Ituberá, BA) e conservado na micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Plantação foi cultivado *in vitro* num meio PDA proposto por Junqueira *et al.* (1984) e modificados por Mattos (1999). O Micélio para extração de DNA foi conservado a -80°C.

3.2. Extração do RNA do fungo *Microcycclus ulei* e construção da biblioteca

O RNA total do micélio foi extraído com o kit RiboPure™ Kit (Ambion) e tratado com DNase. O cDNA foi obtido utilizando os primers do kit Creator SMART cDNA library Construction (Clontech). O extrato foi enriquecido em fragmentos maiores por cromatografia sobre uma coluna ChromaSpin 1000-TE. Após concentração das frações com fragmentos acima de 250pb, os cDNA foram ligados no vector pGEM-T easy (Promega, Madison) e células competentes de *Escherichia coli* foram usadas para transformação com os plasmídios recombinantes.

3.3. Sequenciamento dos ESTs

2000 ESTs foram obtidos utilizando o seqüenciador capilar MegaBACE 1000.

3.4. Análise bioinformática

As análises bioinformáticas seguiram as seguintes etapas:

- Tratamento dos dados para obtenção da seqüência de cada ESTs por submissão e análise no pacote PHRED (Ewing et al., 1998)
- Comparação dos ESTs com os bancos de dados públicos (Genbank nr) com objetivo de identificar a possível função de cada ESTs.
- Genes não identificados via homologia em bancos de dados, foram analisados com outro pacote de análises de dados de seqüências (PFAM) visando atribuir uma possível função aos mesmos.

Mise en forme : Puces et numéros

Mise en forme : Puces et numéros

RESULTADOS

1. RECURSOS MOLECULARES OBTIDOS

Cinco bibliotecas SSH enriquecidas em genes diferencialmente expressos durante a interação *Hevea* – *Microcyclus ulei* foram produzidas para as cultivares MDF180 e PB314. No objetivo de maximizar a detecção de genes diferencialmente expressos de forma transitória na fase precoce da infecção (quando poucas células estão em contato com o fungo), nos decidimos de separar as etapas precoces da interação (da germinação dos conídios até o desenvolvimento do fungo nos tecidos foliares) das etapas intermediárias (da formação dos conidióforos até os ascostromatas), e das etapas finais no cultivar mais susceptível (maturação dos ascostromatas). Por outro lado, utilizando a cultivar primária de origem peruiana, MDF180, e a cultivar PB314 resultado de back-crosses, emitimos a hipótese que a expressão basal dos genes poderia ser muito diferente entre os dois cultivares e poderia resultar no isolamento de muitos ESTs falsos positivos no caso do uso da técnica SSH com hibridização “cultivar resistente” vs. “cultivar susceptível”. Em consequência, nos preferimos utilizar a técnica SSH no sentido forward para “folhas infectadas” vs. “folhas saudáveis”, a comparação dos dois cultivares sendo feita posteriormente *in silico*.

Com o apoio da unidade de bioinformática do CIRAD (Montpellier), marcadores ESTs-SSR foram identificados utilizando o *pipeline* ESTtik (CIRAD).

Para tentar separar os ESTs oriundos da planta dos ESTs do fungo, foi produzida uma biblioteca de expressão a partir do micélio do fungo cultivado *in vitro*.

Todos esses recursos moleculares são descritos nesse parágrafo.

1.1. ESTs da interação *Hevea* – *Microcyclus ulei*

Um total de 8123 clones foram produzidos, sendo 6299 analisados até hoje (Tabela 1). Após a limpeza das seqüências para eliminar as seqüências de baixa qualidade, as mais curtas (<90pb), as contaminações com o plasmídeo pGEM-T não recombinante, um total de 1890 e 1791 seqüências foram obtidos respectivamente para as cultivares MDF180 e PB314 (Tabela 1). O número de seqüências válidas

varia entre 45 e 80% dependente da biblioteca. O tamanho das seqüências de boa qualidade tem um comprimento medio de 348 pb e uma variação entre 90 e 1223 pb.

Para as bibliotecas SSH construídas com folhas infectadas vs. sadias entre 6 e 72 h.a.i., o número de seqüências inicial de 1081 e 1076 seqüências para MDF180 e PB314 foi reduzido para 352 e 751 seqüências consensus (unigenes). O unigen de MDF180 inclui 146 contigs (875 seqüências) e 206 singletons, enquanto o unigen de PB314 esta contituido por 125 contigs (450 seqüências) e 626 singletons (tabela 1). O número de ESTs formando cada contig varia entre 2 (50 casos) e 44 (um caso) para MDF180 e 2 (76 casos) e 51 (um caso) para PB314. O valor da redundância esta estimado em 67% para MDF180 e 30% para PB314 indicando para PB314 a possibilidade de revelar novas seqüências produzindo e analisando mais seqüências. A porcentagem da especificidade de cada unigene que representa a originalidade de cada biblioteca, é alta : 70% e 75 para MDF180 e PB314, respectivamente.

Para as bibliotecas 4 até 28 d.p.i., as 809 e 715 seqüências foram clusterizadas em 111 contigs (301 seqüências) para MDF180 e 58 contigs (676 seqüências) para PB314, deixando respectivamente 619 e 97 singletons. O número de ESTs formando cada contig variou entre dois (76 casos) e 12 (1 caso) para MDF180, e entre dois (11 casos) e 85 (um caso) para PB314. A redundância foi baixa para MDF180 (23%) e alta para PB314 (87%). A alta redundância encontrada na biblioteca do PB314 associada com um número de seqüências reduzido pode ser uma primeira indicação de uma forte inibição na expressão dos genes na cultivar susceptível. A alta porcentagem da especificidade de cada unigen para MDF180 (73%) e um pouco inferior para PB314 (43) indica que a opção de separar as folhas recém infectadas das folhas num processo mais avançado de infecção foi eficiente para isolar novos genes.

Tabela 1. Resumo da bibliotecas SSH de cDNA (fóliolo infectado vs. fóliolo sadio) dos cultivares MDF180 e PB314 construídas com amostra de fólios infectados ou sadios coletados de 6 até 72 hora depois infecção, 4 até 28 dias depois infecção e 34 até 58 dias depois infecção.

Biblioteca	Nº de seqüências produzidas	Nº de seqüências analisadas ¹	Singleton (%) ²	Contigs ³	Tamanho do unigene (%) ⁴	Tamanho medio das seqüências (pb) ⁵	Redundância (%) ⁶	Especificidade da biblioteca unigene (%) ⁷
MDF180 – 6 até 72 h.p.i.	1776	1081 (61)	206 (19)	146	352 (33)	401	67%	246 (70)
PB314 – 6 até 72 h.p.i.	1849	1076 (58)	626 (58)	125	751 (70)	339	30%	567 (75)
MDF180 – 4 até 28 d.p.i.	1790	809 (45)	508 (63)	111	619 (77)	302	23%	452 (73)
PB314 – 4 até 28 d.p.i.	884	715 (80)	39 (5)	58	97 (14)	352	87%	42 (43)
PB314 – 34 até 58 d.p.i.	1824	Sendo	analisado					
Total	8123	3681	1379	440	1819	348.5	52%	1307

¹ Seqüências do vector e seqüências de baixa qualidade ou inferior a 90pb foram eliminadas.

² Os singletons presentes em cada biblioteca independentes das outras bibliotecas. A percentagem foi calculada como o número de singleton/número de seqüências analisadas na biblioteca.

³ Os contigs presentes em cada biblioteca independentemente das outras bibliotecas.

⁴ O set unigene de cada biblioteca representa a soma dos singleton e dos contigs da biblioteca.

⁵ O tamanho medio das seqüências do set unigen.

⁶ A redundância de cada biblioteca é calculada da forma seguinte : 1 - (nº de seqüências no set unigen/nº de seqüências analisadas)

⁷ O set unigen (singletons + contigs) específico de cada biblioteca. A percentagem foi calculada da forma seguinte (nº de seqüências específicas da biblioteca / nº total de seqüência do set unigen da biblioteca).

1.2. ESTs-SSR da interação *Hevea* – *Microcyclus ulei*

Utilizando a interface ESTtik (CIRAD), seqüências ESTs com motivos nucleotídico repetido (ESTs-SSR) s foram identificadas:

- 13 ESTs-SSR na biblioteca MDF180 – 6 até 72 h.p.i. (anexo : Dom_SSH1 summary, result);
- 21 ESTs-SSR na biblioteca PB314 - 6 até 72 h.p.i. (anexo : Dom_SSH2 summary, result);
- 23 ESTs-SSR na biblioteca MDF180 – 4 até 28 d.p.i. (anexo : Dom_SSH3 summary, result);
- 10 ESTs-SSR na biblioteca PB314 - 4 até 28 h.p.i. (anexo : Dom_SSH4 summary, result).

1.3. Comparação *in silico* do genes expressos em folha e latex da seringueira

Para se comparar os recursos moleculares obtidos nas bibliotecas de interações com os genes já isolados da seringueira (principalmente oriundos dos tecidos láticíferos), foi recuperado no GeneBank 10.933 seqüências de *Hevea*. O contigagem dessas permitiu obter 1.305 contigs e 2.038 seqüências únicas seja um unigen de 3.343 seqüências. A comparação por BLAST N com os unigens de cada biblioteca da interação (Tabela 2) revela que a maioria da seqüências obtidas nesse trabalho são especificamente expressas nas folhas.

Tabela 2. Comparação das bibliotecas de interação *Hevea* - *Microcyclus ulei* com 3.343 seqüências únicas de latex (Genbank nr).

Biblioteca	No. de seqüências específicas das folhas (%)	No. de seqüências com similaridades com as do látex
MDF180 - 6 até 72 h.p.i.	273 (77,5)	79
PB314 - 6 até 72 h.p.i.	584 (77,7)	167
MDF180 – 4 até 28 d.p.i.	487 (78,6)	132
PB314 – 4 até 28 d.p.i.	85 (87,6)	12

1.4. ESTs do fungo *M. ulei*

No objetivo de separar a travês de um escript, os ESTs da seringueira dos ESTs do fungo presente nas bibliotecas de interação, uma biblioteca de ESTs “full length” foi realizada a partir do RNA extraído do micélio do fungo cultivado *in vitro*. Como outros fungos obrigatórios, o crescimento do *M. ulei* fica lento em meio de cultura a pesar desse ter sido bastante estudado. Esse fato dificultou a extração do RNA pela pouca quantidade recuperada e a qualidade dele. O melhor resultado foi obtido usando a kit Ribopure® (Ambion) permitindo uma purificação e concentração sobre filtro (Figure 3). A reverse transcrição foi realizada com o primer CDSIII/3' e o SMART IV oligonucleotide (Clontech) nos quais se encontra respectivamente os sites de restrição Sfi IA e Sfi IB, permitindo a orientação da seqüência quando o cDNA esta sendo clonado no plamidio pGEM-T.

Nessa biblioteca, 1824 colonias recombinantes foram sequenciadas (Tabela 3). A baixa qualidade do sequenciamento resultou na recuperação 205 seqüências, repartidas em 71 singletons e 22 contigs constituindo no final um set unigen de 93 seqüências únicas de tamanho médio de 265 pb.

Das 93 seqüências comparadas por BLAST X em GenBank nr, Whitehead Institute base (mais específico para genomas de fungos) e PFAM, foi encontrado homologia para 19 seqüências sendo 3 delas sem função definida (Tabela 4).

Figure 3. Visualização do RNA do micélio do *Microcyclus ulei* usando o kit Ribopure, após o tratamento DNA.

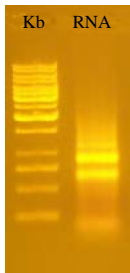


Tabela 3. Descrição da biblioteca de ESTs obtida a partir do micélio do fungo *Microcyclus ulei*.

Biblioteca	Nº de seqüências produzidas	Nº de seqüências analisadas 1(%)	Singleton (%) ²	Contigs ³	Tamanho do unigene (%) ⁴	Tamanho médio das seqüências (pb) ⁵
<i>Microcyclus ulei</i> (micélio)	1824	205 (11)	71 (19)	22	93 (45)	265

Tabela 4. Seqüências da biblioteca *M. ulei* apresentando homologias com seqüências encontradas nos bancos de dados do Whitehead Institute e PFAM

Referência	Organismo	Proteína	E-value
CIMG_05678	<i>Coccidioides immitis</i>	RS conserved hypothetical protein (translation)	2.00E-48
SCRG_05135	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RM11-1a protein TAR1 (translation)	
SS1G_02870.1	<i>sclerotinia sclerotiorum</i>	hypothetical protein (translation)	1.00E-12
SJAG_00107	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	protein mmf1, mitochondrial precursor (translation)	1.00E-08
UREG_07863.1	<i>Uncinocarpus reesii</i>	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (translation)	2.00E-16
CIMG_05466	<i>Coccidioides immitis</i>	RS hypothetical protein similar to malate dehydrogenase (translation)	9.00E-24
AFL2G_07085	<i>Aspergillus flavus</i>	hypothetical protein similar to ATP transporter (translation)	4.00E-27
AFL2G_03473	<i>Aspergillus flavus</i>	ATP-dependent helicase NAM7 (translation)	7.00E-53
AN11237	<i>Aspergillus nidulans</i>	hypothetical protein (translation)	2.00E-10
BC1G_08716	<i>Botrytis cinerea</i>	hypothetical protein	2.00E-06
CIMG_05678	<i>Coccidioides immitis</i>	RS conserved hypothetical protein (translation)	2.00E-48
A0ZSZ0	GAMM	Transposase 11	2.00E-41
Q8LSQ5	ORYZA	Transposase 27	3.00E-62
Q2VWA6	GOSHI	Metallothioneine 2	9.00E-08
Q01J39	ORYZA	Cupin 3	8.00E-11
Q56ZF2	ARATH	Glycolitic	2.00E-11
Q2HV44	MEDTR	MIP	9.00E-05
Q9ZPY9	ARATH	Ubiquitin	3.00E-09
Q6JX04	GOSHI	Glyco hydro 19	3.00E-51

2. COMPARAÇÃO DOS GENES EXPRESSOS ENTRE MDF180 (RESISTÊNCIA PARCIAL) E PB314 (SUSCEPTÍVEL)

2.1. Comparação das bibliotecas nos tempos curtos após infecção : de 6 até 72 horas a.i.

A comparação da biblioteca MDF180 6-72 h.p.i. com a biblioteca do PB314 6-72 h.p.i. (Figura 4-A), como escrito anteriormente, revela pouca seqüências idênticas, indicando uma alta especificidade nas reações de cada cultivar a infecção. A biblioteca MDF180 compartilha 56 seqüências com a PB314 o que representa aproximadamente 6% do unigen constituído pelas duas bibliotecas.

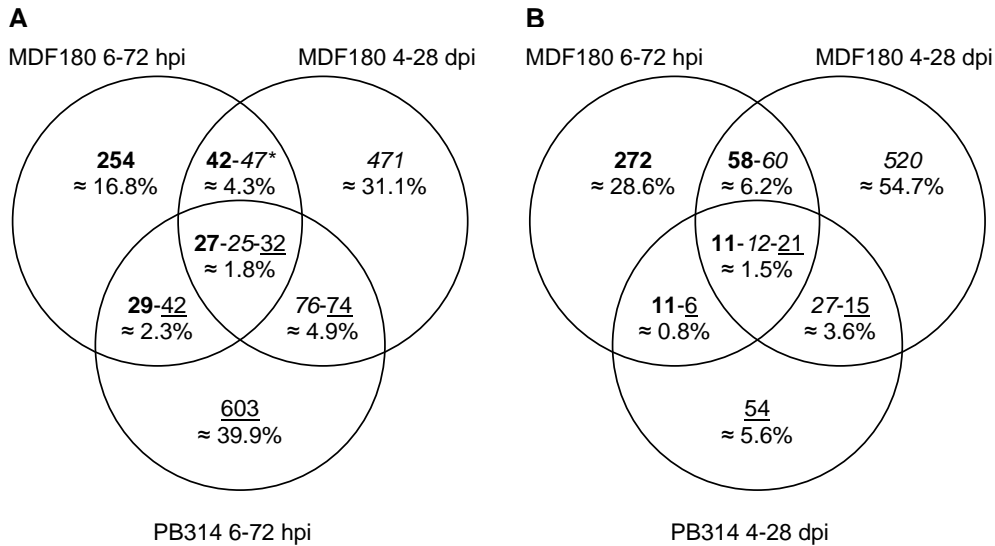
A anotação das seqüências permitiu encontrar funções putativas para 352 e 751 seqüências das bibliotecas respeitivas MDF180 e PB314, deixando 87 e 203 sem anotação (no hit) e 75 e 177 matched ESTs com gene da GenBank nr sem função conhecida (Figura 5-A). Globalmente, a proporção de cada grupo funcional é bastante parecida entre PB314 e MDF180 (Figura 5-A) a pesar de ter um número de seqüências diferente em cada grupo.

Nesse parágrafo, daremos mais enfoque aos genes relacionados com estresse e defesa da planta. Das 50 seqüências obtidas nesse grupo funcional na biblioteca PB314 6-72hpi (Figura 5-A), 43 são específicas dessa biblioteca (Tabela 5) em quanto, das 19 obtidas na biblioteca MDF180 6-72hpi, 15 foram detectadas somente na cultivar resistente MDF180. A pesar de super expressar um número superior de genes relacionados com resposta aos estresses e a defesa da planta, a cultivar PB314 não consegue freinar o desenvolvimento do fungo, em quanto se observa menos genes específicos na cultivar MDF180, porém eles podem ser mais

eficientes para freinar o desenvolvimento miceliano do *M. ulei*. Nesse sentido, pode notar-se que na cultivar MDF180 vários genes de glucanases (PR2) foram detectados enquanto nenhum foi identificado na cultivar PB314.

No mesmo sentido, são indicados na tabela 5, os genes anotados pertencendo aos grupos funcionais relacionados com hormônios (metabolismo e receptores), sinalização e transportes presentes em uma única das duas bibliotecas. No grupo funcional relacionado com hormônio, notase a presença somente na bibliotecas MDF180 de 2 genes envolvidos na via da síntese do etileno (SAM e ACC-oxydase) conhecido como um induzido no case de estresse abiótico e biótico, e capaz de induzir mecanismo de defesa. No grupo funcional relacionado com as proteínas de sinalização, um número maior de seqüências relacionadas com diversas quinase (MAP kinase, serine/threonin kinase, casein kinase) e GTPase foi encontrado na cultivar susceptível. Na maioria das interações planta-parasita as quinases são implicadas com a regulação positiva das reações de resistência, porém a MPK4, presente na biblioteca da cultivar susceptível, é indicada na literatura (*Frye et al., 2001, Proc Natl Acad Sci USA, 98:373-378*) como atuando no início da cascata das MAP kinases e regulando de forma negativa as reações de defesa.

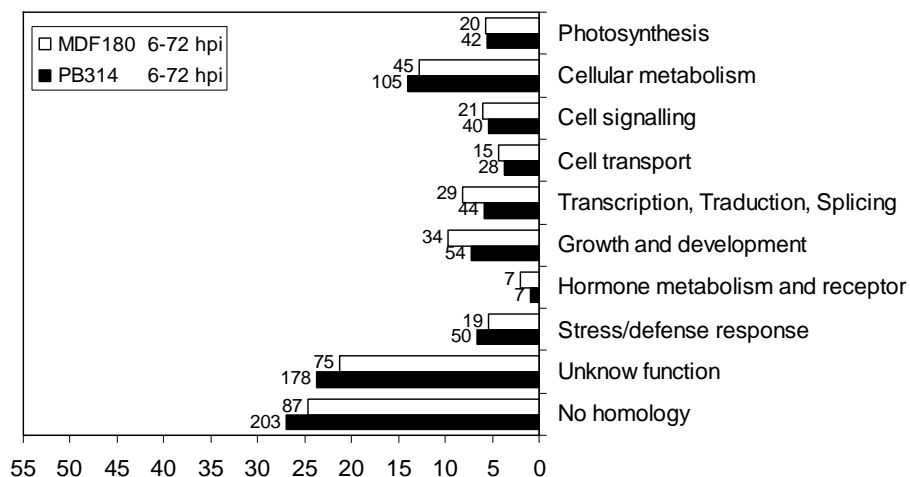
Figura 4. Diagrama de Venn apresentando a repartição das seqüências em função das bibliotecas. As percentagens são baseada numa aproximação do numero total de seqüências unicas incluindo a média dos números sequencias obtido nas interseção dos circulos : (A) ≈ 1511 ; (B) ≈ 950 . Números em **negrito**, **italico** ou **sublinhado** identificam seqüências da mesma biblioteca.



* O kit Clontech PCR-select cDNA subtraction pode produzir diferentes fragmentos de cDNA de um mesmo gene. Em função das bibliotecas, um gene pode ser representado por uns fragmentos distantes (não clusterizable) ou por uma seqüência maior, explicando as pequenas diferenças obtidas por comparação *in silico* nos sentidos *forward* ou *reverse*.

Figura 5. Distribuição em classes funcionais das seqüências unigen identificadas nas bibliotecas SSH de interações *Hevea – Microcyclus ulei*: (A) Bibliotecas SSH das cultivares PB314 (susceptível) e MDF180 (resistente), 6 até 72 h.p.i. (B) Bibliotecas SSH das cultivares PB314 (susceptível) e MDF180 (resistente), 4 até 28 d.p.i. Somente uma classe foi assinado a cada seqüência.

A



B

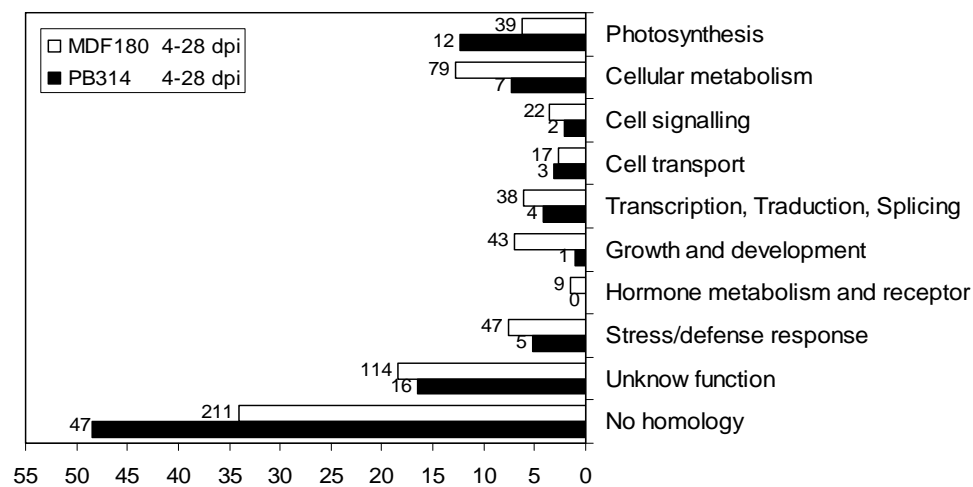


Tabela 5. Genes ou fragmentos de genes encontrados especificamente na biblioteca PB314 6-72hpi e na biblioteca MDF180 6-72hpi para os grupos funcionais Estresse e Defesa, Hormônio (metabolismo e receptor), Transportadores e Sinalização.

ESTRESSE E DEFESA

Subgrupo funcional	Biblioteca PB314 - 6 até 72 hpi	Biblioteca MDF180 - 6 até 72 hpi				
	Proteína	Proteína				
	E-value	E-value				
	Referência	Referência				
Genes R	leucine rich repeat protein [<i>Cicer arietinum</i>]	3E-37	emb CAE76632.1	Putative leucine-rich repeat disease resistance protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	5E-12	Q8LDD9.
	leucine-rich repeat receptor-like protein kinase [<i>Pyrus pyrifolia</i>]	4E-68	gb AAT28308.1			
Estresse oxidativo	ascorbate peroxidase [<i>Capsicum annuum</i>]	2E-57	gb AAL35365.1	MnSOD [<i>Hevea brasiliensis</i>]	1E-11	emb CAB
	Ascorbate peroxidase [<i>Hevea brasiliensis</i>]	4.E-05	Q8GZP1.1			
	thioredoxin peroxidase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	8E-29	emb CAC84143.2			
	glutathione S-transferase [<i>Cichorium intybus</i> x <i>Cichorium endivia</i>]	8.E-05	emb CAC24549.1			
	Glutathione S-transferase [EUPES]	4.E-06	Q9M557.1			
	Manganese superoxide dismutase [APHY]	1.E-05	Q7Z8K5.1			
	Cu/Zn superoxide dismutase precursor [HELAN]	3E-15	Q6A1A0.1			
	putative CuZn-superoxide dismutase [<i>Populus tremula</i> x <i>Populus tremuloides</i>]	3E-40	emb CAC33844.1			
SODC Superoxide dismutase [Cu-Zn] [CAPAN]	2.E-06	O22373.1	catalase [<i>Prunus persica</i>]	2E-64	emb CAB	
Catalase [PHAAU]	2E-60	P32290.1				
Protease e inibidores de protease	Germin-like protein [<i>Pisum sativum</i>]	8E-13	emb CAC34417.1	ftsH protease homolog [Gracilaria tenuistipitata var. liui]	2E-27	ref YP_06
	oligopeptidase b; serine peptidase, family S9A-like protein [<i>Leishmania major</i>]	8E-37	emb CAJ02700.1	putative protease inhibitor [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	1E-27	ref XP_46
	protease inhibitor protein 1 [<i>Hevea brasiliensis</i>]	6E-27	gb AAP46156.1	putative papain-like cysteine proteinase [<i>Gossypium hirsutum</i>]	5E-36	emb CAE
	putative precysteine proteinase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	1E-31	emb CAB44983.1			
PRP	pathogenesis related protein 10 [<i>Vitis vinifera</i>]	6E-35	emb CAC16166.1	Concanavalin A-like lectin/glucanase [<i>Medicago truncatula</i>]	9.E-05	Q1S678.
	putative elicitor inducible chitinase [<i>Solanum demissum</i>]	5E-34	gb AAK91891.1	beta-1,3-glucanase [<i>Prunus persica</i>]	7E-35	gb AAL3C
	resistance protein RPP8-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	2.E-08	gb AAP82792.1	Putative beta-1,3-glucanase [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	9E-24	gb AAN06
Metabolismo de fenilpropanoides	4-coumarate CoA ligase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	4E-12	ref NP_564115.1	4-coumarate-CoA ligase-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	6E-10	gb AAP06
	cationic peroxidase [<i>Cicer arietinum</i>]	5E-77	emb CAB71128.2			
	Chalcone isomerase putative [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	3E-23	Q9C8L2.1			
	cinammate 4-hydroxylase [<i>Allium cepa</i>]	7E-51	gb AAS48416.1			
	peroxidase [<i>Spinacia oleracea</i>]	6E-26	emb CAA71488.1			
peroxidase [<i>Spinacia oleracea</i>]	7E-35	emb CAA71492.1				

	Peroxidase precursor [EUPCH]	5E-10	Q6PQF2.2			
	Putative cinnamyl alcohol dehydrogenase [MALDO]	5.E-06	O65152.1	cinnamyl alcohol dehydrogenase [<i>Fragaria x ananassa</i>]	4E-07	gb AAK28
Outras proteínas envolvidas em diferentes estresses	alpha-hydroxynitrile lyase [<i>Manihot esculenta</i>]	3E-10	emb CAA11428.1	nematode resistance-like protein [<i>Solanum tuberosum</i>]	3E-22	gb AAP44
	Bet v I allergen [<i>Medicago trunculata</i>]	1.E-09	Q1T055.1	pru p 1 [<i>Prunus persica</i>]	9E-06	emb CAB
	Bet v I allergen [<i>Zea mays</i>]	7E-34	gb AAV28626.1			
	beta-VPE [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	2E-42	dbj BAD94396.1			
	dehydration responsive element binding protein [<i>Gossypium hirsutum</i>]	4E-11	gb AAO43165.1			
	dehydration-induced protein RD22-like protein 2 [<i>Gossypium arboreum</i>]	3E-45	gb AAT66913.1			
	heat shock protein [<i>Hevea brasiliensis</i>]	2E-30	gb AAQ08597.1	Putative heat shock protein	1E-18	Q9C911.1
	OSJNBb0071D01.4 protein [<i>Oryza sativa</i>]	5.E-05	Q7X5X8.2			
	putative APG protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	1E-21	emb CAB79534.1		8E-21	gb AAL02
	putative coat protein [<i>Pear black necrotic leaf spot virus</i>]	7.E-06	gb AAT01926.1			
salt tolerance protein [<i>Sesuvium portulacastrum</i>]	1E-67	gb AAV71142.1				
symbiosis-related like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	3E-48	emb CAB79153.1				

HORMÔNIO (RECEPTORES, METABOLISMO)

Subgrupo funcional	Biblioteca PB314 - 6 até 72 h.p.i			Biblioteca MDF180 - 6 até 72 h.p.i		
	Proteína	E-value	Referência	Proteína	E-value	Refer
Auxina /Etileno	AER [<i>Nicotiana tabacum</i>]	3E-15	gb AAM73656.1	auxin resistance protein [<i>Plantago major</i>]	1E-19	emb CAF
	Probable indole-3-acetic acid-amido synthetase [ORYSA]	1.E-05	Q6I581.1	auxin-responsive protein IAA1 [<i>Mirabilis jalapa</i>]	6E-24	gb AAM9
	Auxin-regulated protein.	2.E-07	Q8LSK7.1			
	At1g29420 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	3E-15	gb AAS47643.1			
Etileno	Putative ethylene responsive element [ARATH]	3.E-05	Q8LDZ0.1	ethylene receptor [<i>Fragaria x ananassa</i>]	2E-51	emb CAC
	Putative response regulator 10 [<i>Oryza sativa</i>]	7E-21	ref NP_912485.1	putative S-adenosylmethionine synthetase [<i>Brassica oleracea</i> var]	7E-26	gb AAP8
	Ethylene response factor [MANES]	6E-21	Q52QY1.1	S-adenosylmethionine synthase [<i>Carica papaya</i>]	4E-71	gb AAN0
Citoquinina				1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase [<i>Carica papaya</i>]	3E-44	emb CAF
				thaumatin-like cytokinin-binding protein [<i>Brassica oleracea</i>]	2E-34	gb AAO1

SINALIZAÇÃO

Subgrupo funcional	Biblioteca PB314 - 6 até 72 h.p.i			Biblioteca MDF180 - 6 até 72 h.p.i		
	Proteína	E-value	Referência	Proteína	E-value	Referêr
Quinase	shaggy-like kinase [<i>Ricinus communis</i>]	9E-46	emb CAA72330.1	Ki1 protein [<i>Beta vulgaris</i>]	2E-50	gb AAO923
	protein (Putative receptor protein kinase) [ARATH]	1.E-06	O64794.1			
	putative receptor-protein kinase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	3E-27	gb AAK59558.1			
	receptor protein kinase [<i>Pinus sylvestris</i>]	2E-13	emb CAC20842.1	calcium dependent calmodulin independent protein kinase [<i>Cucumis</i>]	7E-61	emb CAC8:
	receptor-kinase isolog [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	4E-25	dbj BAD94850.1			
	kinase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	3E-23	ref NP_199777.1			
	MAP kinase phosphatase 1 [SOLTU]	1E-10	Q3V655.1			
	BnMAP4K alpha1 [<i>Brassica napus</i>]	4E-25	emb CAA08757.1			
	YRK1 [<i>Triticum aestivum</i>]	2E-33	gb AAQ82627.1			
	phosphoglycerate kinase like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	2.E-06	dbj BAD94190.1			
	Putative serine/threonin protein kinase	6.E-05	32186_GOSeqDB	ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine	9E-14	ref NP_567:
	NPH3 family protein [<i>Oryza sativa</i>]	8E-44	gb AAT85278.1	ATP binding / protein binding / protein kinase/ protein	3E-65	ref NP_194:
	putative casein kinase [<i>Oryza sativa</i>]	1E-40	gb AAV59374.1			
	Casein kinase I (Casein kinase 1-like protein 7) [ARATH]	1.E-05	Q9FFH8.1			
cyclin-dependent protein kinase regulator [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	1E-40	ref NP_173010.1				
Regulador de quinase	Histidine triad (HIT) protein [<i>Chloroflexus aurantiacus</i>]	1E-12	ref ZP_00768006.1			
Fosfatase	catalytic/protein phosphatase type 2C [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	5E-23	ref NP_178081.2	Inorganic H+ pyrophosphatase [<i>Chloroflexus aurantiacus</i>]	1E-29	ref ZP_007:
	alkaline phosphatase activity	5.E-05	3414_GOSeqDB	purple acid phosphatase [<i>Ipomoea batatas</i>]	2E-71	emb CAA0:
	Survival protein SurE [MEDTR]	2E-20	Q1SDD1.1	protein phosphatase [<i>Cicer arietinum</i>]	4E-46	emb CAA1:
	protein phosphatase 2C (PP2C) [<i>Fagus sylvatica</i>]	3.E-05	emb CAC09577.1	protein phosphatase 2C [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	9E-50	emb CAA0:
			protein phosphatase type 2A [<i>Nicotiana tabacum</i>]	1.E-06	emb CAB0:	
Calcium biding protein	Calcium-binding EF-hand [MEDTR]	8.E-07	Q1SKH2.1	calcium ion binding [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	2.E-05	ref NP_191:
	calmodulin [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	3E-40	emb CAA78058.1	calmodulin-binding protein 60-C [<i>Phaseolus vulgaris</i>]	6E-15	gb AAN653
Fosfatase calcio dependente	cyclophilin [<i>Triticum aestivum</i>]	6E-39	gb AAP80861.1			
GTP binding protein	GTP-binding protein SAR1A [ARATH]	7E-25	O04834.1	GTP-binding protein SAR1A [ARATH]	9E-13	O04834.1
	GTP-binding protein [<i>Triticum aestivum</i>]	5E-42	gb AAP43929.1	GTP binding [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	3E-64	ref NP_172:
	Rac-like small GTP binding protein [BRACM]	1.E-05	O49180.1	RAB7A [<i>Lotus corniculatus</i>]	2E-22	emb CAA9:
	small GTP-binding protein [<i>Pisum sativum</i>]	1.E-08	emb CAA90080.1			
	putative GTP-binding protein [<i>Cucumis sativus</i>]	7E-33	gb AAQ72787.1			

	putative GTP-binding protein [<i>Oryza sativa</i>]	6E-45	ref XP_470373.1			
	Rop subfamily GTPase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	1E-33	emb CAA10815.2			
	G-protein alpha subunit, putative [ORYSA]	1E-20	Q2R941.1			
	RAB1C [<i>Lotus corniculatus</i>]	1E-67	emb CAA98160.1			
Outros	Tudor [MEDTR]	1E-11	Q1SXB1.1	putative receptor associated protein [<i>Capsicum chinense</i>]	2E-29	emb CAI53i
	Allatotropin neuropeptide precursor [SPOFR]	5.E-06	Q6KEQ0.1	AMP-dependent synthetase and ligase [<i>Azotobacter vinelandii</i>]	5E-11	ref ZP_004
	Signal recognition particle 9 kDa protein (SRP9) [ARATH]	6E-35	Q9SMU7.1	protein binding [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	8.E-07	ref NP_196

TRANSPORTE

Subgrupo funcional	Biblioteca PB314 - 6 até 72 h.p.i			Biblioteca MDF180 - 6 até 72 h.p.i		
	Proteína	E-value	Referência	Proteína	E-value	Referêr
ATPase	ATPase [<i>Capsicum chinense</i>]	1E-35	emb CAI48069.1	ATPase alpha subunit [<i>Lactuca sativa</i>]	1.E-129	gb AAx581
	ATPase subunit IV [<i>Chenopodium rubrum</i>]	3E-24	gb AAP55716.1	plasma membrane-type calcium ATPase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	8.E-09	dbj BAD94:
	ATP synthase beta subunit [<i>Triticum aestivum</i>]	8E-75	emb CAA52636.1	vacuolar ATPase subunit E-like protein [<i>Thellungiella halophila</i>]	5E-18	gb AAM197
	vacuolar-type H ⁺ -ATPase subunit B2 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	3E-37	dbj BAD95251.1	Putative calcium ATPase [ORYSA]	5.E-06	Q8H8W1.1
	26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT4a [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	4E-39	dbj BAD93877.1			
	V-ATPase subunit c' proteolipid [<i>Xerophyta viscosa</i>]	9E-14	gb AAR26002.1	V-ATPase subunit c'' proteolipid [<i>Xerophyta viscosa</i>]	1E-39	gb AAR26C
Transportadores membranares diversos	putative gamma tonoplast intrinsic protein (TIP) [<i>Sporobolus stapfianus</i>]	3.E-05	emb CAB61841.1	MGC85306 protein [<i>Xenopus laevis</i>]	1.E-08	gb AAH78E
	putative potassium channel regulatory factor [<i>Oryza sativa</i>]	1E-32	ref XP_469417.1	pom30 [<i>Solanum tuberosum</i>]	1E-43	emb CAA6:
	putative permease 1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	1E-26	gb AAK59508.2	copper ion binding / metal ion binding [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	3E-12	ref NP_186
	antiporter/ drug transporter/ transporter [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	0.0001	ref NP_174584.2	bile acid:sodium symporter/transporter [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	6E-44	ref NP_850
	PPase [<i>Hevea brasiliensis</i>]	6E-39	gb AAS66771.1	Putative sugar transporter protein	6.E-06	32722_GO
	ABC transporter-like protein [<i>Oryza sativa</i>]	1.E-08	gb AAx95832.1			
	mitochondrial uncoupling protein 4 [<i>Saccharum officinarum</i>]	9E-14	gb AAU11465.1			
	Mitochondrial import receptor subunit TOM5 homolog [ARATH]	2.E-08	Q9SD80.2			
Formação de vesículas (membrane trafficking)	putative vacuolar assembling protein [<i>Ipomoea trifida</i>]	4E-11	gb AAS79596.1	clathrin binding [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	2E-58	ref NP_194
	coatamer epsilon subunit [<i>Medicago truncatula</i>]	5E-36	emb CAI29264.1	vacuolar sorting protein 35 homolog [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	2E-65	emb CAB6:
	coatamer zeta2 subunit [<i>Medicago truncatula</i>]	9E-55	emb CAI29267.1	Vti1a protein [<i>Mus musculus</i>]	6E-18	gb AAH89E
	Coatamer protein complex; beta'-COP protein [ARATH]	2.E-08	Q9LW87.1			
Aquaporina	NIP2 [<i>Medicago truncatula</i>]	2E-14	gb AAS48064.1			
	major intrinsic protein PIPC [<i>Craterostigma plantagineum</i>]	4E-23	emb CAA04654.1			
Vacuolar Glutathion Pump	Ycf1 protein [PANGI]	3E-46	Q68RU8.1	glutathione transporter [<i>Oryza sativa</i>]	1E-40	gb AAO17E
Transportadores citoplasmáticos	Enoyl-[acyl carrier-protein] reductase precursor [BRANA]	1E-30	Q93X63.1	high mobility group protein [<i>Solanum tuberosum</i>]	1E-33	emb CAA0:
	lipid transfer protein precursor [<i>Gossypium barbadense</i>]	4E-38	gb AAR90329.1			
	Hly-III related proteins [MEDTR]	3E-10	Q1SF60.1			
	protein carrier [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	1E-36	ref NP_172429.1			
	ATFP3; metal ion binding [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	2E-22	ref NP_568974.1			
	nucleoside transporter [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	1E-20	ref NP_171763.1			

2.2. Comparação das bibliotecas nos tempos medios após infecção : de 4 até 28 dias a.i.

2.2.1. Comparação *in silico*

A comparação da biblioteca MDF180 4-28 d.p.i. com a biblioteca PB314 4-28 d.p.i. (Figura 4-B), revela um baixo número de seqüências comuns : 37 seqüências de um total de 677 o que representa 5,5% do set unigen constituindo pela seqüências diferencialmente expressas de 4 até 28 dpi na cultivar resistente e susceptível.

Após anotação (Figura 5-B), dos sets unigen representados por 619 e 97 seqüências, respectivamente nas cv. MDF180 e PB314, 294 (47%) e 34 (37%) foram anotadas com funções conhecidas; 114 (18%) e 16 (16%) tiveram homologia com genes com funções desconhecidas. Para 211 (34%) e 47 (48%) seqüências não foi encontrado homologia. O fato de ter isolado poucas seqüências na cultivar PB314, dificulta a comparação da importância relativa de cada grupo funcional.

Na classe funcional que envolve seqüências relacionadas a estresse e defesa, foram identificados dos 47 genes da biblioteca da cultivar resistente, 31 específicos (Tabela 6). Esses genes são envolvidos na limitação do estresse oxidativo (eliminação de ROS, *reactive oxygen species*) e da morte celular programada, na degradação de proteínas, na limitação do desenvolvimento do fungo (PRP), no metabolismo de fenilpropanoides (via de síntese das ligninas). Na biblioteca da cultivar susceptível apenas 2 seqüências foram identificadas, sendo que a primeira um gene de tolerância a metais e a segunda um R-gene, Cf-5.

Sete seqüências relacionadas às vias de hormônios foram encontradas somente na biblioteca da cultivar MDF180 (Tabela 6). Para a biblioteca da cultivar PB314, não foi identificado seqüências específicas.

Na classe funcional que envolve seqüências relacionadas as vias de sinalização celular foram identificadas 19 seqüências diferencialmente expressas na cultivar MDF 180. As funções envolvidas incluem sinalização mediada por quinases (8 *reads*), proteínas relacionadas com influxo/efluxo de cálcio (3 *reads*). Na biblioteca da cultivar susceptível foi identificada apenas uma seqüência relacionada com o

processo de sinalização, que apresentou homologia a uma proteína que contém um domínio ML, cujo papel nos mecanismos de transmissão de sinais não está claro.

Para proteínas de transporte, foram identificados na cultivar resistente 12 seqüências específicas e apenas um precursor mitocondrial de uma cadeia beta de uma ATP sintase foi identificada na cultivar suscetível.

TABELA 6. Seqüências específicas da biblioteca 4-28 d.a.i. da cultivar MDF 180 comparando com a biblioteca PB314 4-28 d.a.i.

ESTRESSE E DEFESA

Subgrupo funcional	Proteína	E-value	Referência
Estresse oxidativo	catalase 2 [Capsicum_annuum]	4,00E-11	gb AAM97541.1
	Glutathione S-transferase	9E-08	Q9FQF3.1
	monodehydroascorbate reductase [Pisum_sativum]	1,00E-65	gb AAU11490.1
	putative peroxidase [Zinnia_elegans]	6,00E-10	emb CAH69536.1
	thioredoxin-dependent peroxidase [Plantago_major]	4,00E-47	emb CAH58634.1
	Manganese + C5 : C12 SOD(Fragment).	0,000005	Q7Z8K5.1
	monodehydroascorbate reductase I [Pisum_sativum]	0,00002	gb AAU11490.1
Proteases e/ou inibidores de proteases	Cysteine protease 1 [Plantago_major]	1,00E-59	emb CAH59426.1
	Cystatin [Castanea sativa]	2E-08	emb CAA11899.1
	cysteine protease inhibitor [Populus_tremula]	3,00E-48	emb CAH57572.1
	pectinesterase inhibitor	0,00003	ref NP_190322.1
	hevamine [Hevea_brasiliensis]	9,00E-17	emb CAC19408.1
	serpin [Cucumis_sativus]	2,00E-41	emb CAI43280.1
	Subtilase [Arabidopsis_thaliana]	2,00E-16	ref NP_567972.1
PRs ou Genes R	putative PRP [Cucumis_sativus]	2,00E-12	emb CAF33484.1
	PR1a precursor [Glycine_max]	3,00E-15	gb AAD33696.1
	similar to disease resistance proteins [A. thaliana]	2,00E-14	gb AAD25626.1
	disease resistance-like protein [A. thaliana]	5,00E-16	emb CAB64227.1
	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase1.	1,00E-12	Q75WU3.1
Tolerancia a diferentes estresses	heat shock factor binding protein 2 [Zea_mays]	4,00E-21	gb AAR18070.1
	17.5 kDa class I heat shock protein [Carica papaya]	1,00E-15	gb AAR25848.1
	heat shock protein 70 [Nicotiana tabacum]	1,00E-09	emb CAA44820.1
	Putative heat shock protein	0,000004	Q9C911.1
Combate a morte celular programada	Bax inhibitor [Lycopersicon_esculentum]	6,00E-31	gb AAR28754.1
	defender against cell death [Suberites domuncula]	1,00E-12	emb CAF74918.1
Metabolismo de fenilpropanoides	Cinnamyl alcohol dehydrogenase	4,00E-10	O64969.1
	putative cinnamoyl-CoA reductase [Solanum demissum]	2,00E-57	gb AAT39306.1
Outras proteínas	hypersensitive-induced reaction protein 2	3,00E-18	gb AAN17463.1
	hydroxycinnamoyltransferase (Fragment).	0,000003	Q70Q37.1
	submergence induced protein 2-like [Vitis vinifera]	1,00E-19	gb AAO12871.1
	BURP domain-containing protein [G. hirsutum]	1,00E-24	gb AAQ22345.1

HORMÔNIO (RECEPTORES, METABOLISMO)

Grupo funcional	Proteína	E-value	Referência
Hormônios	auxin-induced CP12 domain-containing protein	6,00E-23	gb AAV63570.1
	putative polyprotein [Oryza sativa]	2,00E-66	ref NP_921503.1
	type-B response regulator [Catharanthus roseus]	1,00E-15	gb AAQ10678.1
	Putative response regulator 10 [Oryza sativa]	2,00E-11	ref NP_912485.1
	auxin-regulated protein [Phaseolus vulgaris]	0,000003	gb AAN65371.1
	S-adenosyl methionine synthase [Solanum brevidens]	8,00E-34	gb AAT47716.1
	NICSY Gibberellin 20-oxidase 1	0,00003	Q8RVP1.1

SINALIZAÇÃO

Subgrupo funcional	Proteína	E-value	Referência
Sinalização mediada por kinases	nucleoside diphosphate kinase [Hyacinthus orientalis]	4,00E-38	gb AAT08712.1
	kinase [Arabidopsis thaliana]	2,00E-21	ref NP_191667.2
	putative kinase interacting protein [Solanum demissum]	6,00E-29	gb AAU90326.1
	cyclin dependent kinase (cdc2b) [Chenopodium rubrum]	1,00E-28	emb CAC17703.1
	B1-type cyclin dependent kinase [Lycopersicon esculentum]	3,00E-19	emb CAC15503.1
	SOYBN Putative receptor-like protein kinase 3.	0,00003	Q49N13.1
	HEVBR Phosphomevalonate kinase.	1E-08	Q944G1.1
	MEDTR Prefoldin; Protein kinase PKN/PRK1, effector.	9,00E-34	Q1T3X4.1
Proteínas relacionadas com influxo/efluxo de cálcio	MEDTR IQ calmodulin-binding region.	0,00001	Q1T2K4.1
	calcium ion binding [Arabidopsis thaliana]	6,00E-36	ref NP_194377.1
	DAUCA Calmodulin cam-201.	0,000002	Q6DN35.1
Outras proteínas de sinalização	FSGTP1 [Fagus sylvatica]	0,0000001	emb CAA67153.1
	putative FK506-binding protein [Oryza sativa]	1,00E-28	ref XP_469487.1
	Rho GDP dissociation inhibitor 2 [Medicago truncatula]	0,00001	emb CAF02296.1
	MEDTR AMP-dependent synthetase and ligase.	3,00E-31	Q1S4D1.1
	reversibly glycosylated polypeptide [Gossypium hirsutum]	3,00E-42	emb CAC83750.1
	cyclophilin [Digitalis lanata]	3,00E-46	emb CAA69598.1
	PLAYO Putative yir4 protein.	0.0	Q7R9F5.1
AKIN beta3 [Medicago truncatula]	2,00E-28	gb AAO61678.1	

TRANSPORTE

Grupo funcional	Proteína	E-value	Referência
Transportadores	Importin alpha-like protein [A. thaliana]	7.00E-35	emb CAA74966.1
	Ycf10 [Castanea sativa]	4.00E-09	gb AAT12418.1
	ARATH Bet1-like protein	3.00E-09	Q8L9S0.1
	amino acid permease [A. thaliana]	1.00E-48	ref NP_172472.1
	plasma intrinsic protein 2,1 [Juglans regia]	1.00E-57	gb AAO39007.1
	SEC14-like protein [A. thaliana]	2.00E-26	emb CAB80580.1
	putative phosphate translocator [Oryza sativa]	1E-08	gb AAV24764.1
	probable transport protein Sec61 alpha subunit	5.00E-46	gb AAU84942.1
	CAX [Suaeda maritima]	6.00E-38	gb AAR99078.1
	putative inward rectifying potassium channel [Solanum tuberosum]	5.00E-47	emb CAA70947.1
	ABCF-type protein [Zea_mays]	1.00E-26	gb AAT51734.1
CTV.3 [Poncirus trifoliata]	2.00E-09	gb AAN62337.1	

2.2.2. Comparação *via* macroarranjos

A extração do DNA plasmidial (Figura 6a) e a amplificação dos fragmentos de interesse *via* reação em cadeia da polimerase (Figura 6b) é seguido pela fixação em membranas de náilon, para estudo expressão gênica *via* macroarranjos, das seqüências únicas (*set unigen*) que tiveram função atribuída aos mecanismos de sinalização (89 ESTs), transporte (65 ESTs), hormônios (23 ESTs) e estresse e defesa (121 ESTs).

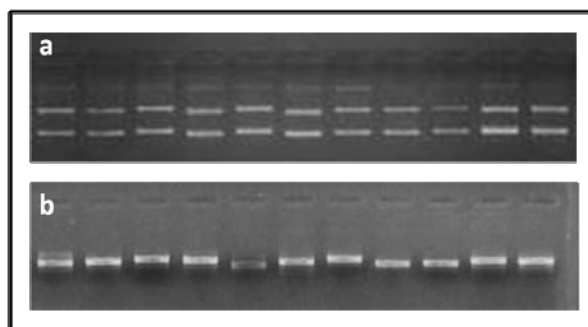


Figura 6. Extração do DNA plasmidial (a) e amplificação dos fragmentos de interesse *via* reação em cadeia da polimerase (b) em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Na figura 7 são visualizados em gel de agarose (1% brometo de etídeo) os extratos de RNA total antes do tratamento com DNase I (Figura 7.1a e 7.1b) e depois (Figura 7.2a e 7.2b) das folhas infectadas 10 d.p.i. das cultivares MDF180

(Figura 7.1 a e b) e PB314 (Figura 7.1 b e c). O extratos são utilizados para a transcrição reverse e produção das sondas (cDNA fita simple) a serem hibridadas com as membranas de náilon.

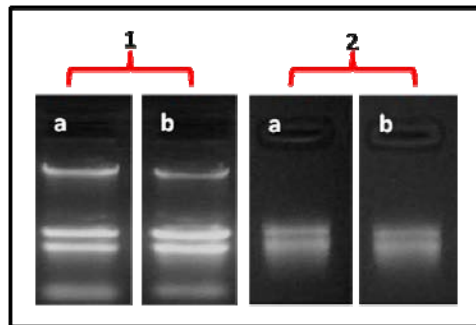


Figura 7. Extração do RNA total e tratamento com DNase I, visualizadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, das amostras obtidas para confecção das sondas. 6.1a) Extração realizada a partir de folhas inoculadas da cultivar MDF 180; 6.1b) Extração realizada a partir de folhas inoculadas da cultivar PB 314; 6.2a) Tratamento com DNase do RNA total obtido de folhas da cultivar MDF 180; 6.2b) Tratamento com DNase do RNA total obtido de folhas da cultivar PB 314.

2.2.2.1 Análise da expressão diferencial dos genes associados a defesa e estresses

Neste grupo funcional foram fixadas 123 seqüências. Dentre as seqüências analisadas, 40 foram mais expressas na planta resistente e 21 na suscetível (Figura 8), as 62 restantes apresentaram o mesmo perfil transcricional nas duas cultivares.

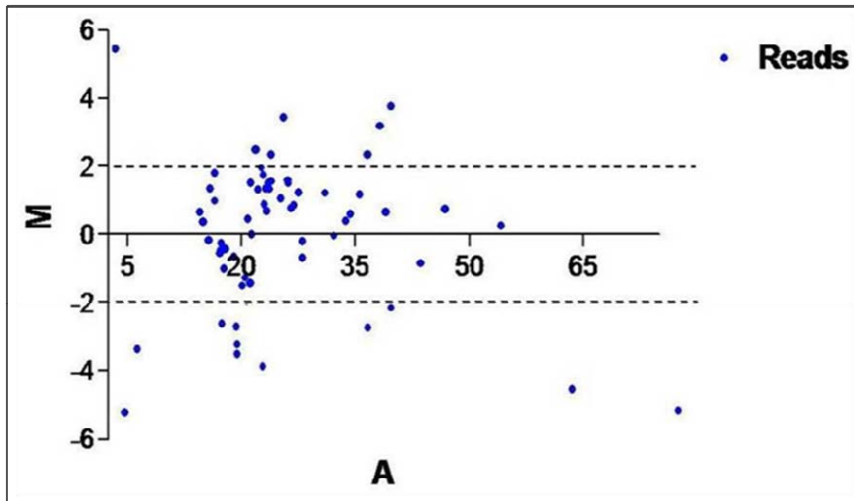


Figura 8. Gráfico MA-plot da análise da expressão diferencial dos genes relacionados a defesa. Os valores positivos correspondem a genes diferencialmente expressos na cultivar MDF 180 e os valores negativos na cultivar PB314.

Dentre as seqüências diferentemente expressas, 7 ficaram acima da linha de corte na cultivar resistente (Tabela 7). Na cultivar suscetível foi observado que 11 seqüências foram significativamente mais expressas em relação à planta resistente (Tabela 8).

Tabela 7. Seqüências das respostas de defesa com diferenças significativas de expressão na cultivar resistente, quando comparada a suscetível.

--

Tabela 8. Seqüências das respostas de defesa com diferenças significativas de expressão na cultivar suscetível, quando comparada a resistente.



2.2.2.2 Análise da expressão diferencial dos genes associados as vias de sinalização

A expressão diferencial das 89 seqüências com função diretamente relacionada com as vias de sinalização foi avaliada por macroarranjos e pode-se constatar que 26 são mais expressas na cultivar resistente e que 17 apresentavam maior expressão na cultivar suscetível (Figura 9). As outras 46 seqüências não apresentaram diferença no padrão de expressão nas distintas cultivares.

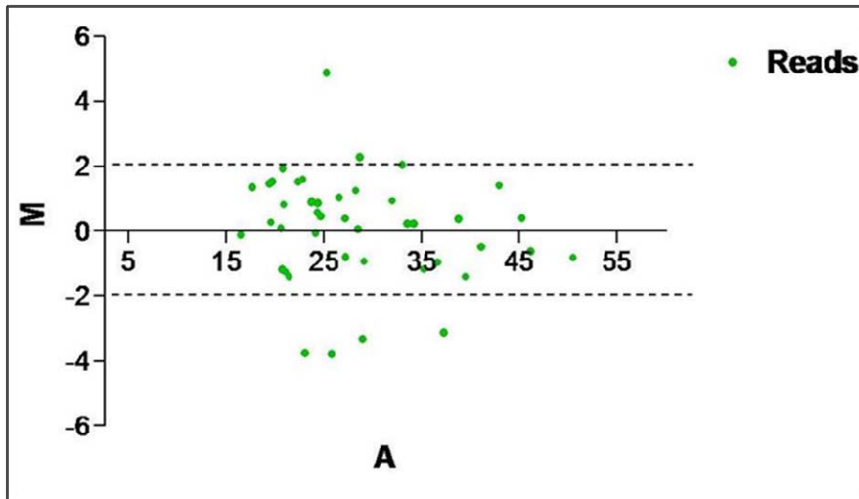


Figura 9. Análise da expressão diferencial dos genes relacionados às vias de sinalização. Os valores positivos correspondem a genes diferencialmente expressos na cultivar MDF e os valores negativos.

Destas seqüências diferentemente expressas, 7 apresentaram modificações significativas no perfil de expressão, sendo que 3 foram identificadas na cultivar resistente e 4 na suscetível (Tabela 9).

Tabela 9. Seqüências das vias de sinalização diferentemente expressas entre as cultivares

[Redacted Table Content]

2.2.2.3. Análise da expressão diferencial dos genes associados as vias dos hormônios

Dos 23 genes que tem função relacionada com as vias de sinalização mediadas por hormônios, 7 apresentaram expressão diferencial entre as cultivares,

sendo que 6 estavam mais expressos na cultivar resistente, e 1 foi mais expresso na cultivar suscetível (Figura 10).

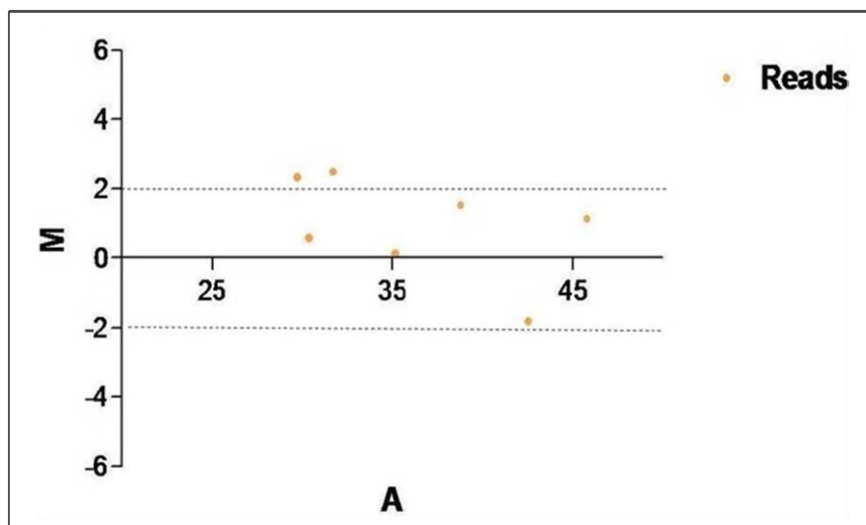


Figura 10. Análise da expressão diferencial dos genes relacionados às vias de hormônios. Os valores positivos correspondem a genes diferencialmente expressos na cultivar MDF180 e os valores negativos a genes diferencialmente expressos na cultivar PB314.

Quando a expressão diferencial é analisada considerando a linha de corte estabelecida, pode-se visualizar que apenas duas seqüências estão significativamente mais expressas na cultivar resistente em relação a outra cultivar (Tabela 10).

Tabela 10. Seqüências das respostas de defesa com diferenças significativas de expressão na cultivar resistente em relação a cultivar suscetível.

	Proteína	Diferença de expressão
> 2 vezes expressos em MDF 180	Auxin induced putative protein	2.34
	Thaumatococcus-like cytokinin-binding protein	2.53

2.2.2.4. Análise da expressão diferencial dos genes associados as proteínas de transporte

Foram analisadas por macroarranjos 65 seqüências associados ao transporte celular. Dessas, 40 apresentaram perfil de expressão diferencial entre os cultivares, sendo que 25 seqüências demonstraram ser mais expressas na cultivar resistente e 15 na cultivar suscetível (Figura 11).

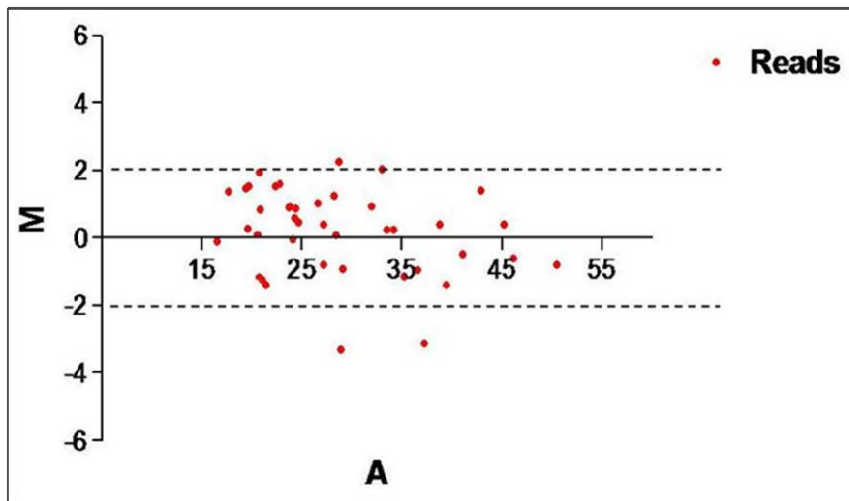


Figura 11. Análise da expressão diferencial dos genes relacionados à proteínas de transporte. Os valores positivos correspondem a genes diferencialmente expressos na cultivar MDF180 e os valores negativos a genes diferencialmente expressos na cultivar na cultivar PB314.

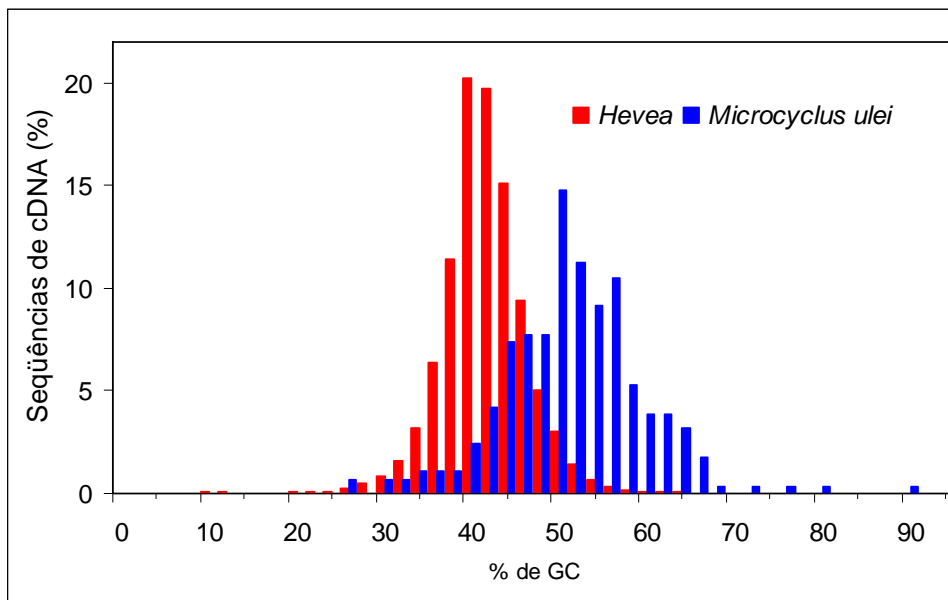
Quando é considerada a linha de corte atribuída visualiza-se que, dentre as 40 seqüências diferencialmente expressas, apenas 4 apresentam modificações significativas no perfil de expressão, 2 sendo mais expressas na cultivar resistente e 2 na suscetível (Tabela 11).

Tabela 11. Seqüências relacionadas à proteínas de transporte diferencialmente expressas entre as cultivares.

4. DIFERENCIAÇÃO SOBRE % DE G E C ENTRE GENES DA SERINGUEIRA E DE *M. ULEI*

Uma forma para distinguir genes expressos oriundos de plantas, de genes expressos por microrganismos pode ser feito pela comparação da frequência dos nucleodios G e C nos genes expressos. No caso da seringueira e *Microcyclus ulei*, foi analisada a porcentagem em GC do set unigen constituído 3.343 seqüências de seringueira (ESTs disponíveis no GenBank nr, isolados principalmente dos vasos laticíferos da seringueira) e o set unigen de *Microcyclus ulei* (cf. & 1.4) representado por 93 seqüências. A distribuição dos ESTse em relação em GC (Figura 12) mostra que a media de GC em seqüências de seringueira é tipicamente em torno de 42% em quanto para *Microcyclus ulei* a media é de 51%.

Figura 12. Distribuição na composição dos ESTs para a seringueira e o *Microcyclus ulei*.



OBJETIVOS DO PROJETO E REALIZAÇÕES

Objetivo 1	Realização
Obter quatro bibliotecas de cDNA à partir de um clone resistente (MDF180) e susceptível (PB260) ao Mal-das-folha, inoculados e não inoculados (plantas controles)	Objetivo atingido
<u>Observação :</u> * Inicialmente o projeto erá para criar biblioteca full-length, porém nos achamos que seria mais eficaz trabalhar com biblioteca SSH, o que os resultados apresentados nesse relatório confirmam. * A cultivar susceptível PB260 foir trocada por outra cultivar susceptível PB314 para ter mais disponibilidade em plantas na Plantação Michelin da Bahia.	

Objetivo 2	Realização
Obter uma biblioteca de cDNA a partir de esporos e micélio do fungo e à partir dos estromas	Objetivo atingido parcialmente
<u>Observação:</u> * Uma biblioteca de cDNA foi realizada a partir de micélio cultivado <i>in vitro</i> , porém a baixa qualidade das seqüência isoladas, podendo ser causado por problemas na elaboração da biblioteca como no seqüenciamento. Isso nos incentivou a criar uma nova biblioteca a partir de esporos germinandos sendo um material mais reativo em comparação ao micélio quais particularidade é um crescimento muito lento.	

Objetivo 3	Realização
Sequenciamento dos ESTs correspondentes a cada biblioteca de cDNA	Objetivo atingido
<u>Observações :</u> nenhuma.	

Objetivo 4	Realização

Criação de um banco comparativo de expressão gênica	Objetivo atingido
<u>Observação:</u> * Este trabalho sendo desenvolvido em parceria com o CIRAD (França), as seqüências de propriedade comuna CIRAD-UESC foram depositadas no banco de dados ESTtik com acesso restrito aos membros do projeto até publicação do trabalho.	

Objetivo 5	Realização
Obtenção de genes candidatos para novos estudos	Objetivo atingido
<u>Observação:</u> * Various genes candidatos foram obtidos tanto pela técnica SSH como pela comparação <i>in silico</i> . Porém frente a grande quantidade de genes candidatos isolados precisamos agora validar a expressão diferencial deles <i>via</i> macroarranjos (primeiros resultados nesse trabalho precisando ser confirmados), <i>via</i> comparação <i>in silico</i> de bibliotecas de interação envolvendo outros tipos de resistência da seringueira ao Mal-das-flohas (trabalho desenvolvido pelo CIRAD-França), e finalmente <i>via</i> RT-qPCR para um grupo limitado de genes candidatos.	

Objetivo 6	Realização
Co-localização de genes candidatos nos mapas genéticos e físicos (BACs) em cooperação com a pesquisadora Valérie PUJADE-RENAUD, do CIRAD.	Objetivo não atingido
<u>Observação:</u> * Para realizar esse trabalho, o mapa genético da cultivar MDF180 foi iniciado em 2008 dentro do projeto GENESALB (Agence Nationale de la Recherche, coordenação: CIRAD - França). QTLs de resistência estão sendo identificados. Um dos objetivos será a partir de <u>um número restrito</u> de genes candidatos (cf. obs. objetivo 5), co-localizar eles no mapa genético e físico.	

Objetivo 7	Realização
Identificar, via genômica comparativa, com bibliotecas de interação <i>cacau/C. perniciosa</i>, possíveis vias de expressão gênica conservadas	Objetivo não realizado
<u>Observação:</u>	

PRODUTOS

- 3 artigos em preparação
- 5 participações em congresso nacional
- Formação de 1 Mestrado, 2 Iniciação Científica
- Participação ao projeto GENESALB (2008-2010), com apoio financeiro da

Agence Nationale de La Recherche. Coordinação : Cirad, Michelin.

ANEXOS

Anexo 1 : Extração do plasmídeo

Solução PI :

23 ml glicose 20% (p/v) preparada na hora

10 ml EDTA 0.5M pH 8.8

13 ml Tris-HCl 1M pH 7.4

Acrescentar água mili-Q autoclavada até completar 500 ml. Manter a 4°C.

Solução PII:

1 ml Na OH 10 M

5 ml SDS 10%

Acrescentar água mili-Q autoclavada até completar 50 ml.

Observação : Primeiro colocar 20 ml de água, depois o volume total de NaOH seguido de mais 20 ml de água; acrescentar o SDS e completar com o restante de água. Fazer esa solução na hora do uso.

Solução PIII:

147,2 g de acetato de potássio

60 ml de ácido acético glacial

Ajustar o pH para 5,2 com ácido acético glacial.

Acrescentar água mili-Q autoclavada até completar 500 ml. Manter a 4°C.

Procedimento :

- Centrifugar a placa Well contendo o inoculo a 4000 rpm, 4°C por 10 minutos;
- Desprezar o sobrenadante e secar a placa invertida sobre papel absorvente por aproximadamente 2 minutos;
- Adicionar 200 µl de solução PI a cada poço. Selar e agitar por cerca de 2 minutos em vortex na velocidade máxima.
- Centrifugar a 4000 rpm 4°C por 10 minutos;
- Despreza o sobrenadante e secar a place invertida sobre papel absorvente por aproximadamente 2 minutos;
- Colocar 80 µl da solução PI selar e agitar por 2 minutos em vortex na velocidade máxima;
- Em uma placa de ELISA de fundo U de 96 poços, colocar 2 µl de RNase (5 mg/ml) em cada poço;
- Transferir 75 µl da placa de inóculo para a de fundo U;
- Acrescentar 75 µl da solução PII. Selar a placa e misturar invertendo 40 vezes;
- Deixar descansando por 5 minutos;
- Dar um spin na placa;
- Acrescentar 75 µl da solução PIII. Selar a placa e misturar invertendo 40 vezes;
- Deixar descansando por 5 minutos;
- Dar um spin na placa;
- Tirar o adesivo e colocar a placa na etufa a 90°C por 30 minutos;
- Selar a placa;
- Colocar a placa na gelo por 10 minutos

- Centrifugar a 4000 rpm 4°C por 10 minutos
- Montar em um placa de ELISA fundo V o filtro Milipore MABV n°22.
- Transferir 100 μ l da placa fundo U pra o filtro/placa fundo V sem tocar no sedimento;
- Centrifugar a 4000 rpm 4°C por 10 minutos.
- O DNA e precipitado e lavado conforme descrito no M&M.

100 μ l da placa fundo U pra o filtro/placa fundo V sem tocar no sedimento;

- Centrifugar a 4000 rpm 4°C por 10 minutos.
- O DNA e precipitado e lavado conforme descrito no M&M.

Anexo 2: Participações em Congresso, palestras.



53º Congresso Brasileiro de Genética
Águas de Lindóia - SP - 2 a 5 de setembro de 2007

SBC
Sociedade Brasileira de Genética

Certificado

A Sociedade Brasileira de Genética declara que o trabalho intitulado "**ANÁLISES BIOINFORMÁTICAS DE ESTS ORIUNDOS DE UMA INTERAÇÃO COMPATÍVEL ENTRE Hevea brasiliensis e Microcyclus ulei**", autoria de ANDRADE JUNIOR, SJ; CARELS, N; SOUSA, LA; CARDOSO, S; RODRIGUES, ACS; DIAS, RJC; GESTEIRA, AS; MICHELI, F; CASCARDO, JCM; GARCIA, D, foi apresentado no 53º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, em ÁGUAS DE LINDÓIA - SP, no período de 02 a 05 de setembro de 2007

GP229


Horácio Schneider
Presidente da SBC


Nilce Maria Martinez Rossi
1ª Secretária da SBC



52º Congresso Brasileiro de Genética
12º Congreso de la Asociación Latinoamericana de Genética

SBC

Certificado

A Sociedade Brasileira de Genética declara que o trabalho intitulado "**GENES PROVAVEIS DE RESISTÊNCIA ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO Hevea - Microcyclus ulei**" autoria de Andrade Junior, SJ, Sousa, LA, Vidal, R, Gesteira, AS, Micheli, F, Cascardo, JCM, Garcia, D, foi apresentado no 52º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, realizado em Foz do Iguaçu - PR, período de 03 a 06 de setembro de 2006

GP290


Francisco Mauro Salzano
Presidente da SBC


José Baldin Pinheiro
1ª Secretário da SBC

EST_{TM}

[home](#)

[sign out](#)

Overview

[Project summary](#)

[Blast annotations](#)

Queries

[Quick search](#)

[Query form](#)

[TGICL assembly](#)

[Search for SSR](#)

Download

[Download](#)

Tools

[Blast server](#)

[Virtual Macroarray](#)

[Amigo](#)

Links

[Blast2GO](#)

[Genoscope](#)

Contact us

A semi-automatic DNA sequence analysis and annotation pipeline for cDNA generation

ESTtik News



New Web interface

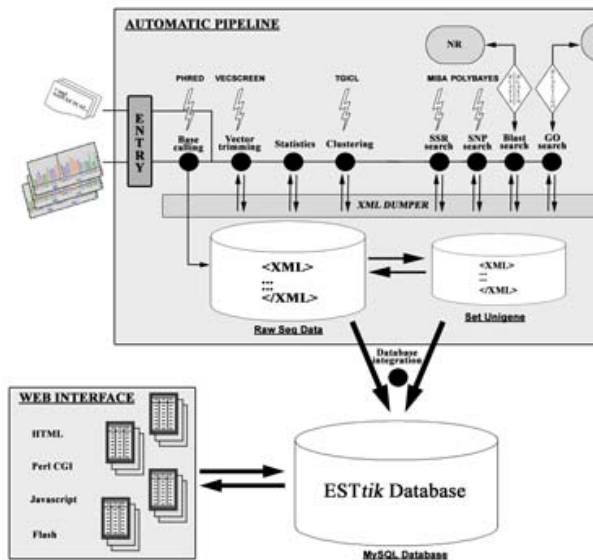
To allow the download of large dataset and to speed up the queries, the database and the Web interface had to be modified.

Sign in v

ES
Acc

login

password





welcome garcia

[home](#)

[sign out](#)

Overview

[Project summary](#)
[Blast annotations](#)

Queries

[Quick search](#)
[Query form](#)
[TGICL assembly](#)
[Search for SSR](#)

Download

[Download](#)

Tools

[Blast server](#)
[Virtual Microarray](#)
[Amigo](#)

Links

[Blast2GO](#)
[Genoscope](#)

[Contact us](#)

Dom_SSH1 summary

1778 sequences in input

Trash : 587 (33%)

Good : **1191 (67%)**

small size : 40
(7%)

sequences with polyA
tail : 388

low quality :
547 (93%)

max length : 553 bp
min length : 102 bp
avg length : 357 bp

Clustering results

clusters number : 159
contigs number : 160
contigs max length : 1161
contigs min length : 106
contigs avg length : 459

singletons number : 242 (20% of input)
redundants cDNA number : 949 (80% of input)



welcome garcia

[home](#)

[sign out](#)

Overview

[Project summary](#)
[Blast annotations](#)

Queries

[Quick search](#)
[Query form](#)
[TGICL assembly](#)
[Search for SSR](#)

Download

[Download](#)

Tools

[Blast server](#)
[Virtual Microarray](#)
[Amigo](#)

Links

[Blast2GO](#)
[Genoscope](#)

[Contact us](#)

Dom_SSH2 summary

1858 sequences in input

Trash : 667 (36%)

Good : **1191 (64%)**

small size : 65
(10%)

sequences with polyA
tail : 487

low quality :
602 (90%)

max length : 578 bp
min length : 102 bp
avg length : 357 bp

Clustering results

clusters number : 128
contigs number : 132
contigs max length : 1241
contigs min length : 144
contigs avg length : 500

singletons number : 706 (59% of input)
redundants cDNA number : 485 (41% of input)



welcome garcia

[home](#)

[sign out](#)

Overview

[Project summary](#)
[Blast annotations](#)

Queries

[Quick search](#)
[Query form](#)
[TGICL assembly](#)
[Search for SSR](#)

Download

[Download](#)

Tools

[Blast server](#)
[Virtual Microarray](#)
[Amigo](#)

Links

[Blast2GO](#)
[Genoscope](#)

[Contact us](#)

Dom_SSH3 summary

1788 sequences in input

Trash : 946 (53%)

Good : **842 (47%)**

small size : 107
(11%)

sequences with polyA
tail : 261

low quality :
839 (89%)

max length : 587 bp
min length : 101 bp
avg length : 308 bp

Clustering results

clusters number : 102
contigs number : 104
contigs max length : 817
contigs min length : 122
contigs avg length : 408

singletons number : 548 (65% of input)
redundants cDNA number : 294 (35% of input)



welcome garcia

[home](#)

[sign out](#)

Overview

[Project summary](#)
[Blast annotations](#)

Queries

[Quick search](#)
[Query form](#)
[TGICL assembly](#)
[Search for SSR](#)

Download

[Download](#)

Tools

[Blast server](#)
[Virtual Microarray](#)
[Amigo](#)

Links

[Blast2GO](#)
[Genoscope](#)

[Contact us](#)

Dom_SSH4 summary

1535 sequences in input

Trash : 693 (45%)

Good : **842 (55%)**

small size : 145
(21%)

sequences with polyA
tail : 283

low quality :
548 (79%)

max length : 544 bp
min length : 101 bp
avg length : 312 bp

Clustering results

clusters number : 61
contigs number : 63
contigs max length : 775
contigs min length : 133
contigs avg length : 444

singletons number : 49 (6% of input)
redundants cDNA number : 793 (94% of input)



*A semi-automatic DNA sequence analysis
and annotation pipeline for cDNA generation*

welcome garcia

[home](#)

[sign out](#)

Overview

[Project summary](#)
[Blast annotations](#)

Queries

[Quick search](#)
[Query form](#)
[TGICL assembly](#)
[Search for SSR](#)

Download

[Download](#)

Tools

[Blast server](#)
[Virtual Microarray](#)
[Amigo](#)

Links

[Blast2GO](#)
[Genoscope](#)

[Contact us](#)

Blast_annotation

What is your project?

Dom_SSH Dom_SSH1 Dom_SSH2 Dom_SS

Choose your options

Type : Singleton Contig



A semi-automatic DNA sequence analysis and annotation pipeline for cDNA generation

welcome garcia

[home](#)

[sign out](#)

Overview

[Project summary](#)
[Blast annotations](#)

Queries

[Quick search](#)
[Query form](#)
[TGICL assembly](#)
[Search for SSR](#)

Download

[Download](#)

Results for "Dom-SSH1-PL01-D09"

(488 letters) - 21/3/2008

[- Blast annotation](#)

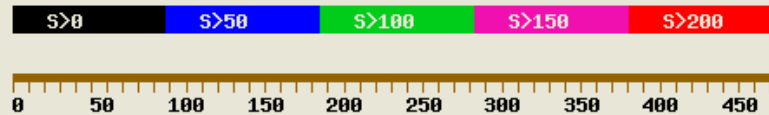
[- Sequence](#)

Blast annotation

blastx 2.2.14 [May-07-2006]

Database : /usr1/banques/nr 5884546 sequences; 2028361679 letters

Color key for alignment scores(S)



Dom-SSH1-PL01-D09

gb|ABK96386.1|
 enb|CAN69194.1|
 enb|CA064283.1|
 ref|NP_199826.1|
 enb|CAN78442.1|
 enb|CA042646.1|
 gb|AA042874.1|
 ref|NP_974121.1|
 ref|NP_177212.2|
 gb|AAK84952.2|



Tools

[Blast server](#)
[Virtual](#)
[Macroarray](#)
[Amigo](#)

Links

[Blast2GO](#)
[Genoscope](#)

[Contact us](#)

<u>Id</u>	<u>Sequences producing significant alignments:</u>		
gb ABK96386.1 	unknown [Populus trichocarpa x Populus deltoides]		
emb CAN69194.1 	hypothetical protein [Vitis vinifera]		
emb CAO64283.1 	unnamed protein product [Vitis vinifera]		
ref NP_199826.1 	gi 15529145 gb AAK97667.1 AT5g50150/MPF21_17 [Arabidopsis thaliana]		
emb CAN78442.1 	hypothetical protein [Vitis vinifera]		
emb CAO42646.1 	unnamed protein product [Vitis vinifera]		
gb AAO42874.1 	At1g70550 [Arabidopsis thaliana]		
ref NP_974121.1 	gi 12325047 gb AAG52474.1 AC010796_13 unknown protein; 47588-49801 [Arabidopsis		
ref NP_177212.2 	unknown protein [Arabidopsis thaliana]		
gb AAK84952.2 	putative carboxyl-terminal proteinase [Gossypium hirsutum]		

[>back](#)

HSP 1

[gi|118489159|gb|ABK96386.1|](#) unknown [Populus trichocarpa x Populus deltoides]

Length= 219

Score= 132.88 (333) Evaluate= 5.81385e-30

Identical: 59 (81 %) Conserved: 63 (86 %)

Gaps Query: 0 Gaps Substr: 0

```
Query : 486 TQMVSGHFAEEGFGKASYFRNLQVVDWDNSXXXXXXXXXXLADHPNCYDIRQGRNNVWGTY 307
          TQM SGHFA+EGFGKASYFRNLQVVDWDN+ LADHPNCY+IRQGRNNVWGTY
Sbjct : 406 TQMGSGHFADEGFGKASYFRNLQVVDWDNLLPLTNLHLLADHPNCYNIRQGRNNVWGTY 465
```

```
Query : 306 FYHGGPGRNVRCP 268
          FY+GGPGRNVRCP
Sbjct : 466 FYYGGPGRNVRCP 478
```

[>back](#)

HSP 1

[gi|147804838|emb|CAN69194.1](#) hypothetical protein [Vitis vinifera]

Length= 219

Score= 130.568 (327) Evaluate= 2.88539e-29

Identical: 58 (79 %) Conserved: 62 (85 %)

Gaps Query: 0 Gaps Substr: 0

```
Query : 486 TQMVSGHFAEEGFGKASYFRNLQVVDWDNSXXXXXXXXXXLADHPNCYDIRQGRNNVWGTY 307
          TQM SGHFAEEGFGKASYFRNLQVVDWDNS LADH NCYDI+QG+NNVWGTY
Sbjct : 303 TQMGSGHFAEEGFGKASYFRNLQVVDWDNSLLPLQNLHLLADHSNCYDIKQGKNNVWGTY 362
```

```
Query : 306 FYHGGPGRNVRCP 268
          FY+GGPGRNV+CP
Sbjct : 363 FYYGGPGRNVKCP 375
```

[>back](#)

HSP 1

[gi|157342170|emb|CAO64283.1](#) unnamed protein product [Vitis vinifera]

Length= 219

Score= 130.568 (327) Evaluate= 2.88539e-29

Identical: 58 (79 %) Conserved: 62 (85 %)

Gaps Query: 0 Gaps Substr: 0

```
Query : 486 TQMVSGHFAEEGFGKASYFRNLQVVDWDNSXXXXXXXXXXLADHPNCYDIRQGRNNVWGTY 307
          TQM SGHFAEEGFGKASYFRNLQVVDWDNS LADH NCYDI+QG+NNVWGTY
Sbjct : 316 TQMGSGHFAEEGFGKASYFRNLQVVDWDNSLLPLQNLHLLADHSNCYDIKQGKNNVWGTY 375
```

```
Query : 306 FYHGGPGRNVRCP 268
          FY+GGPGRNV+CP
Sbjct : 376 FYYGGPGRNVKCP 388
```

[>back](#)

HSP 1

[gi|15240622|ref|NP_199826.1](#) gi|15529145|gb|AAK97667.1| AT5g50150/MPF21_17 [Arabidopsis thaliana]

Length= 219

Score= 124.02 (310) Evaluate= 2.70064e-27

Identical: 55 (75 %) Conserved: 60 (82 %)

Gaps Query: 0 Gaps Substr: 0

```
Query : 486 TQMVSGHFAEEGFGKASYFRNLQVVDWDNSXXXXXXXXXXLADHPNCYDIRQGRNNVWGTY 307
          TQM SGHFA+EGF KA+YFRNLQVVDWDN+ LADHP CYDIRQG+NNVWGTY
Sbjct : 348 TQMGSGHFADEGFEKAAYFRNLQVVDWDNLLPLKLNHLVLADHPACYDIRQGKNNVWGTY 407
```

```
Query : 306 FYHGGPGRNVRCP 268
          FY+GGPGRN RCP
Sbjct : 408 FYYGGPGRNPRCP 420
```

[>back](#)

HSP 1

[gi|147843236|emb|CAN78442.1](#) hypothetical protein [Vitis vinifera]

Length= 219

Score= 123.25 (308) Evaluate= 4.60659e-27

Identical: 56 (77 %) Conserved: 59 (81 %)

Gaps Query: 0 Gaps Substr: 0

```
Query : 486 TQMVSGHFAEEGFGKASYFRNLQVVDWDNSXXXXXXXXXXLADHPNCYDIRQGRNNVWGTY 307
          TQM SGHFA EGFGKASYFRNLQVVDWDNS LADHP+CYDI+ G NNVWG Y
Sbjct : 371 TQMGSGHFAGEGFGKASYFRNLQVVDWDNSLIPLSNLRVLADHPSCYDIQGGINNVWGN Y 430
```

```
Query : 306 FYHGGPGRNVRCP 268
          FY+GGPGRNVRCP
Sbjct : 431 FYYGGPGRNVRCP 443
```

[>back](#)

HSP 1

[gi|157329817|emb|CAO42646.1|](#) unnamed protein product [Vitis vinifera]

Length= 219

Score= 123.25 (308) Evaluate= 4.60659e-27

Identical: 56 (77 %) Conserved: 59 (81 %)

Gaps Query: 0 Gaps Substr: 0

Query : 486 TQMVSGHFAEEGFGKASYFRNLQVVDWDNSXXXXXXXXXXLADHPNCYDIRQGRNNVWGTY 307
TQM SGHFA EGFGKASYFRNLQVVDWDNS LADHP+CYDI+ G NNVWG Y
Sbjct : 53 TQMGSGHFAGEGFGKASYFRNLQVVDWDNSLIPLSNLRLVADHPSCYDIQGGINNVWGN Y 112

Query : 306 FYHGGPGRNVRCP 268
FY+GGPGRNVRCP
Sbjct : 113 FYYGGPGRNVRCP 125

[>back](#)

HSP 1

[gi|28416687|gb|AAO42874.1|](#) At1g70550 [Arabidopsis thaliana]

Length= 219

Score= 120.168 (300) Evaluate= 3.89971e-26

Identical: 53 (73 %) Conserved: 57 (78 %)

Gaps Query: 0 Gaps Substr: 0

Query : 486 TQMVSGHFAEEGFGKASYFRNLQVVDWDNSXXXXXXXXXXLADHPNCYDIRQGRNNVWGTY 307
TQM SGHFA EGFGKASYFRNLQ+VDWDN+ LADHPNCYDIR G N VWG Y
Sbjct : 338 TQMGSGHFAGEGFGKASYFRNLQIVDWDNTLIPASNKILADHPNCYDIRGGTNRVWGN Y 397

Query : 306 FYHGGPGRNVRCP 268
FY+GGPG+N RCP
Sbjct : 398 FYYGGPGKNPRCP 410

[>back](#)

HSP 1

[gi|42572061|ref|NP_974121.1](#) gi|12325047|gb|AAG52474.1|AC010796_13 unknown protein; 47588-49801 [A

Length= 219

Score= 120.168 (300) Eval= 3.89971e-26

Identical: 53 (73 %) Conserved: 57 (78 %)

Gaps Query: 0 Gaps Substr: 0

```
Query : 486 TQMVSGHFAEEGFGKASYFRNLQVVDWDNSXXXXXXXXXXLADHPNCYDIRQGRNNVWGTY 307
          TQM SGHFA EGFGKASYFRNLQ+VDWDN+ LADHPNCYDIR G N VWG Y
Sbjct : 338 TQMGSGHFAGEGFGKASYFRNLQIVDWDNTLIPASNLKILADHPNCYDIRGGTNRVWGN Y 397
```

```
Query : 306 FYHGGPGRNVRCP 268
          FY+GGPG+N RCP
Sbjct : 398 FYYGGPGKNPRCP 410
```

[>back](#)

HSP 1

[gi|30698726|ref|NP_177212.2](#) unknown protein [Arabidopsis thaliana]

Length= 219

Score= 120.168 (300) Eval= 3.89971e-26

Identical: 53 (73 %) Conserved: 57 (78 %)

Gaps Query: 0 Gaps Substr: 0

```
Query : 486 TQMVSGHFAEEGFGKASYFRNLQVVDWDNSXXXXXXXXXXLADHPNCYDIRQGRNNVWGTY 307
          TQM SGHFA EGFGKASYFRNLQ+VDWDN+ LADHPNCYDIR G N VWG Y
Sbjct : 393 TQMGSGHFAGEGFGKASYFRNLQIVDWDNTLIPASNLKILADHPNCYDIRGGTNRVWGN Y 452
```

```
Query : 306 FYHGGPGRNVRCP 268
          FY+GGPG+N RCP
Sbjct : 453 FYYGGPGKNPRCP 465
```

[>back](#)

HSP 1

[gi|21389708|qb|AAK84952.2](#) putative carboxyl-terminal proteinase [Gossypium hirsutum]

Length= 219

Score= 118.242 (295) Eval= 1.48189e-25

Identical: 52 (71 %) Conserved: 58 (79 %)

Gaps Query: 0 Gaps Substr: 0

```
Query : 486 TQMVSGHFAEEGFGKASYFRNLQVVDWDNSXXXXXXXXXXLADHPNCYDIRQGRNNVWGTY 307
          T+M SGHFA +GFGKASYFRNLQVVDWDN+ LADHPNCYDI+ G N VWG Y
Sbjct : 401 TEMGSGHFAGQGFGKASYFRNLQVVDWDNLIPLSNLRVLADHPNCYDIQGGINRVWGNV 460
```

```
Query : 306 FYHGGPGRNVRCV 268
          FY+GGPGRNV+CP
Sbjct : 461 FYYGGPGRNVKCP 473
```

Sequence

```
>Dom-SSH1-PL01-D09
TTTTTTTTTTTTTTGGACACTTTAGATTCAATTGTTA TTAACAA TCTC
ATTTACATGATCTCATGAGTGGAAAGATTTA CCTGTTAGTGGGGT/
AGAAAAAAAAAGTGGGCA TATTA TAAAAAAAAA TAAAAA TAGC
CTATATAGAAAAA CTAATA GCTCAAAAAA TGAAAAA AAAAA TG
GCTTTCTATGCTA TACCAA TATCTTCA TGGACA TCTCACA TTTCTC
ATAAAAA TAAGTTCCCAA ACA TTGTTTCTCCCTTGCCCTA TGTC
ATCCGCCAAGAGGTGAAGA TTTGTTAAGGGCAGCAA ACTA TTGT
TAAATTCCTGAAGTAGGATGCTTTTCCAAA TCCTTCTCTGCAAAA
TTGGGTAG
```

Quality

>Dom-SSH1-PL01-D09
53 53 53 56 53 53 53 53 53 53 53 50 50 44 44 44 43 50 53 50 50 38 38 38 38 38
50 50 50 50 59 50 50 53 50 53 53 53 38 38 59 59 53 53 53 59 53 53 53 53 53 56 59 59 59
59 59 53 50 50 50 59 59 59 59 56 56 56 56 59 59 59 59 56 50 50 50 50 59 59 59 56 56 56
59 59 50 50 50 50 59 50 50 50 56 56 56 59 50 51 51 51 50 50 56 56 50 50 50 59 50 50
53 53 53 53 53 53 56 56 56 50 50 50 50 50 59 59 56 56 56 50 50 50 50 50 56 56 56 56
56 59 59 59 51 43 59 59 59 59 44 44 44 59 59 59 51 51 51 53 50 50 50 43 44 44 53 53 53
53 53 53 53 53 50 50 50 50 50 50 50 50 45 45 41 41 41 36 36 36 36 36 36 36 43 43
43 43 43 41 43 47 43 43 43 43 53 53 53 44 51 51 51 44 44 44 52 52 52 53 53 52 52 52
52 59 52 53 53 59 53 50 50 44 44 50 44 53 53 53 50 59 59 51 51 50 53 53 53 53 44 44 50
50 44 44 53 53 53 43 43 47 47 47 43 43 43 50 41 41 41 36 30 30 26 26 26 38 38 36 34 34 32
34 34 36 41 41 41 41 45 50 50 50 50 51 51 51 51 51 50 50 52 52 53 53 53 53 52 52 52
52 52 33 22 22 20 20 22 44 31 52 43 43 36 52 52 59 59 59 59 56 56 56 56 56 59 56 56
56 56 43 43 36 36 50 50 50 50 50 50 53 53 53 53 53 53 53 44 43 43 50 50 59
44 43 43 50 44 50 44 59 59 44 44 53 53 53 53 59 53 50 50 59 59 51 50 50 50 25 24 24 24

