

KLAUS KONRAD SCHEUERMANN

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS
NA INTERAÇÃO TOMATEIRO – *Alternaria solani***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

S328i
2006

Scheuermann, Klaus Konrad, 1977-

Identificação de genes diferencialmente expressos na
interação tomateiro - *Alternaria solani* / Klaus Konrad
Scheuermann. – Viçosa : UFV, 2006.
xii, 86f. : il. Algumas col. ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 54-68.

1. Tomate - Resistência à *Alternaria solani*.
 2. Pinta-preta. 3. Relação planta-patógeno. 4. Regulação de expressão gênica. 5. Biologia molecular.
- I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 635.642945

KLAUS KONRAD SCHEUERMANN

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA
INTERAÇÃO TOMATEIRO – *Alternaria solani***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 24 de abril de 2006.

Prof^o. Francisco Murilo Zerbini Jr.
(Conselheiro)

Prof^a. Marisa Vieira de Queiroz

Prof^o Fabrício Ávila Rodrigues

Dr. Ailton Reis

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Orientador)

Dedico

Aos meus pais Ademir e Norma,

A minha irmã Karina

A minha namorada Darlene

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Ademir Ari Scheuermann e Norma Moreira Scheuermann pelo incentivo e esforço para me manter estudando o que permitiu esta conquista.

Ao professor Sérgio H. Brommonschenkel pela oportunidade e orientação na execução deste trabalho.

A minha namorada Darlene Pena que esteve sempre ao meu lado auxiliando-me a manter o equilíbrio necessário para concluir este curso.

Aos amigos de república José Luciano, André Torres, André Viana, Cláudio Nolasco, Júlio Lima, Valdir Lourenço, Alejandro Pabon e Evandro Novaes pela amizade e compreensão.

Aos meus conselheiros Eduardo S. G. Mizubuti e Francisco M. Zerbini pelas sugestões ao longo da condução deste trabalho.

Aos funcionários Luís Carlos e Tadeu pelo auxílio técnico.

Aos amigos do laboratório, em especial a Elene Yamazaki Lau e Stefânia Magalhães pelo auxílio técnico-científico e amizade.

Ao professor Acelino Couto Alfenas por ter gentilmente cedido seu laboratório para condução de parte deste trabalho.

A Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realizar este curso.

A FAPEMIG pela bolsa concedida.

A todos os demais que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho o meu muito obrigado.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Produção das mudas e inoculação	18
3.2. Construção das bibliotecas	19
3.2.1. Sequenciamento e análise das bibliotecas	19
3.3. Análise de expressão gênica por PCR em tempo real (RT-qPCR)..	21
4. RESULTADOS	24
4.1. Construção das bibliotecas subtrativas	24
4.1.1. Análise da biblioteca subtrativa 24 h e classificação dos ESTs identificados	25
4.1.2. Análise da biblioteca subtrativa 36 h e classificação dos ESTs identificados	28
4.2. Análise de expressão gênica por PCR em tempo real (RT-qPCR)..	36
5. DISCUSSÃO	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
7. ANEXOS	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para seleção de controles endógenos utilizados na análise de expressão gênica por RT-qPCR.....	22
Tabela 2 - ESTs identificados na biblioteca subtrativa da interação tomateiro - <i>A. solani</i> construída a partir de mRNA isolado de folhas coletadas 24 hai.....	26
Tabela 3 - ESTs identificados na biblioteca subtrativa da interação tomateiro - <i>A. solani</i> construída a partir de mRNA isolado de folhas coletadas 36 hai.....	30
Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados para análise de expressão de 16 genes previamente identificados em duas bibliotecas de cDNA que tiveram indução em resposta a <i>Alternaria solani</i> confirmada por RT-qPCR.....	38
Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados para análise de expressão de 24 genes previamente identificados em duas bibliotecas subtrativas que não tiveram indução em resposta a <i>A. solani</i> confirmada por RT-qPCR.....	70
Tabela 6 - Lista complementar dos ESTs identificados na biblioteca subtrativa da interação tomateiro - <i>A. solani</i> construída a partir de mRNA isolado de folhas de tomateiro coletadas 24 hai.....	71
Tabela 7 - Lista complementar dos ESTs identificados na biblioteca subtrativa da interação tomateiro - <i>A. solani</i> construída a partir de mRNA isolado de folhas de tomateiro coletadas 36 hai.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática dos principais eventos que compõem as respostas de defesa reguladas pelo ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET).....	12
Figura 2- Classificação funcional dos ESTs encontrados em duas bibliotecas subtrativas da interação tomateiro – <i>A. solani</i> construídas 24 e 36 hai.....	29
Figura 3- Especificidade de amplificação dos oligonucleotídeos utilizados para análise de expressão gênica por RT-qPCR.....	37
Figura 4- Regiões de duas isoformas do gene <i>pSTH2</i> utilizadas como alvo para análise de expressão gênica por RT-qPCR.....	39
Figura 5- Padrão de expressão temporal de alguns genes de defesa identificados em duas bibliotecas subtrativas da interação tomateiro – <i>A. solani</i> analisado por RT-qPCR.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AJ	Ácido jasmônico
AS	Ácido salicílico
ChtC1	(‘Chitinase Class I’) - gene de batata que codifica uma quitinase básica da classe I
COI1	(‘Coronatine insensitive 1’) - gene de <i>A. thaliana</i> que regula a expressão de genes induzidos por AJ
EDS1	(‘Enhanced disease susceptibility 1’) - gene de <i>A. thaliana</i> que confere resistência a <i>Peronospora parasitica</i>
EIN3	(‘Ethylene insensitive 3’) - fator transcricional que responde a etileno e regula a expressão de ERF-1
ERF-1	(‘Ethylene response factor 1’) - fator transcricional que regula a expressão de genes induzidos por etileno
EST	(‘Expressed sequence tags’) - etiqueta de seqüência expressa
ET	Etileno
hai	Horas após a inoculação
HR	(‘Hypersensitive response’) - resposta de hipersensibilidade
JAR1	(‘Jasmonic acid resistant 1’) - gene de <i>A. thaliana</i> que codifica uma ácido jasmônico-amino sintetase
JIN1	(‘Jasmonate-insensitive1’) - gene de <i>A. thaliana</i> que regula negativamente a expressão de genes dependentes de ERF-1
LeMir	(‘ <i>L. esculentum</i> miraculin’) - gene de tomateiro que codifica uma miraculina
LRR	(‘Leucine-rich repeat’) - repetições ricas em leucina

LOX2	(‘lipoxygenase-2’) - gene de <i>A. thaliana</i> que codifica uma lipoxigenase 2
LSD1	(‘Lesion simulating disease 1’) – gene de <i>A. thaliana</i> que limita a explosão oxidativa
MPK4	(Mitogen-activated protein kinase4) - Map cinase 4
NPR1	(‘Non-expressor of PR1’) - gene que regula a expressão de genes induzidos por AS
NtEIG-A1	(‘ <i>N. tabacum</i> elicitor-inducible Gene-A1’) - gene de <i>N. tabacum</i> induzido por elicitor químico
PAD4	(‘Phytoalexin deficient 4’) - gene de <i>A. thaliana</i> que regula a produção da fitoalexina camalexina
PDF1.2	(‘Plant defensin 1.2’) – gene de <i>A. thaliana</i> que codifica a defensina 1.2
POTLX-3	(‘Potato lipoxygenase-3’) - gene de batata que codifica uma lipoxigenase 3
ROS	(‘Reactive oxygen species’) - espécies de oxigênio reativo
RT-qPCR	(‘Real-time quantitative polymerase chain reaction’) - PCR quantitativa analisada em tempo real
SAR	(‘Systemic acquired resistance’) - resistência sistêmica adquirida
SCF	(‘Skp1-cullin-F-box protein’) - complexo ubiquitina ligase
SSH	(‘Suppression subtractive hybridization’) - hibridização subtrativa por supressão
TGA	Fatores de transcrição contendo zíperes de leucina que se ligam ao elemento <i>as-1</i>
THT1-3	(‘Hydroxycinnamoyl-CoA tyramine <i>N</i> -hydroxycinnamoyl transferase’) - gene de <i>A. thaliana</i> que codifica uma hidroxicinamoil-CoA tiramina <i>N</i> -hidroxicinamoil transferase
Win	(‘wound induced’) - gene induzido por ferimentos
WRKY	Fatores de transcrição que se ligam aos box-w

RESUMO

SCHEUERMANN, Klaus Konrad. D.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2006. **Identificação de genes diferencialmente expressos na interação tomateiro - *Alternaria solani***. Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Conselheiros: Francisco Murilo Zerbini Júnior e Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

A pinta preta, causada pelo fungo *Alternaria solani* Sor. é considerada uma das mais importantes doenças da cultura do tomateiro provocando perdas que podem chegar a 80%. O desenvolvimento de cultivares resistentes a esta doença é dificultado pela natureza poligênica da resistência e ausência de fontes com altos níveis de resistência. Com o objetivo de identificar genes envolvidos na resposta de defesa do tomateiro à *A. solani*, foram construídas duas bibliotecas de cDNA a partir de mRNA isolado de folhas da linhagem NC EBR-2 coletadas 24 e 36 horas após a inoculação (hai), utilizando-se a técnica de hibridização subtrativa por supressão (SSH). Análise de 1303 ESTs revelou que 31% apresentam similaridade a genes relacionados com defesa da planta, regulação da expressão gênica e transdução de sinais. Entre os possíveis genes relacionados com a defesa, houve um predomínio de ESTs com similaridade a genes cuja resposta é regulada pelo etileno e ácido jasmônico, e em menor frequência ESTs com similaridade a genes regulados pelo ácido salicílico. A análise de expressão gênica de 40 genes candidatos por PCR em tempo real (RT-qPCR) revelou que 16 deles (40%) são induzidos em resposta a *A. solani*. A indução da maioria desses genes tem início entre 6 e 12 hai atingindo uma máxima expressão entre 24 e 36 hai. Devido à resistência a

pinta preta estar relacionada à idade fisiológica dos tecidos, comparou-se o nível de expressão dos genes induzidos em resposta ao fungo no dossel inferior (1ª e 2ª folhas) e superior (4ª e 5ª folhas) de plantas aos 45 dias após a semeadura. Verificou-se que os genes que codificam proteínas com similaridade a PR-1 básica P1-p14, β -1,3-endoglucanase básica, NtEIG-A1 (*Nicotiana tabacum* proteína A1), THT1-3 (hidroxicinamoil-CoA tiramina N-hidroxicinamoil transferase), POTLX-3 (lipoxigenase-3) e pSTH-2 (proteína PR STH-2) apresentaram maior nível de expressão no dossel superior onde se observa uma menor severidade da doença. Verificou-se ainda, que alguns desses genes como *NtEIG-A1*, apresentam também uma maior velocidade de resposta no dossel superior. O maior nível de expressão dos genes de defesa associado a uma maior velocidade de resposta, pode ser um dos fatores responsáveis pela menor severidade da pinta preta observada no dossel superior das plantas de tomateiro.

ABSTRACT

SCHEUERMANN, Klaus Konrad. D.S., Universidade Federal de Viçosa, April 2006. **Identification of genes differentially expressed in the tomato – *Alternaria solani* interaction.** Advisor: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Committee members: Francisco Murilo Zerbini Júnior and Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

The tomato early blight, caused by the fungus *Alternaria solani* Sor., is considered one of the most important diseases of this crop causing yield losses that can reach about 80%. The development of resistant cultivars has been difficult because the resistance is polygenic and germoplasm with adequate levels of resistance to the pathogen is not available. In order to identify genes involved with tomato defense responses against *A. solani*, two cDNA libraries were constructed from mRNA isolated from leaf samples of the lineage NC EBR2 collected at 24 and 36 hours after inoculation (hai) by using the suppressive subtractive hybridization (SSH) technique. Sequence analysis of 1303 ESTs revealed that 31% of them showed similarities with plant defense genes, regulation of gene expression and transduction signals. Among the putative genes related with defense mechanisms, there was predominance of genes regulated by ethylene and jasmonic acid and a lower frequency of ESTs with similarities to genes regulated by salicylic acid. Real time PCR analysis (RT-qPCR) of 40 genes showed that 16 of them (40%) were induced in response to fungus infection. The induction of the majority of these genes began between 6 and 12 hai, reaching a maximum between 24 and 36 hai. Considering that host resistance to early blight is associated with tissue age, the

level of gene expression in older (1st and 2nd) and younger (4th and 5th) leaves were compared from 45 days old plants. Genes coding for PR-1 basic p1-p14, basic β -1,3-endoglucanase, NtEIG-A1 (*Nicotiana tabacum* protein A1), THT1-3 (N-hydroxycinnamoyl-CoA tyramine N-hydroxycinnamoyl transferase) , POTLX-3 (Lipoxygenase-3) and pSTH-2 (PR STH2 protein) had a higher level of expression in younger leaves. Moreover, it was observed that genes like *NtEIG-A1* had a faster response in younger leaves. High level of defense genes expression associated with a faster response can be one of the mechanisms responsible for the reduced level of disease severity in the younger tomato leaves.

1. INTRODUÇÃO

A pinta preta, causada pelo fungo *Alternaria solani* Sor., é considerada uma das mais importantes doenças da cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) por afetar toda a parte aérea da planta, e provocar perdas que podem chegar a 80% em épocas quentes e chuvosas (Mathur e Skekavat, 1986). Na folha, a doença caracteriza-se pela presença de lesões pardo-escuras com anéis concêntricos. O ataque severo provoca intensa desfolha e expõe o fruto à queima pelo sol. Também é comum o aparecimento de cancro no colo e nas hastes. Nos frutos, verifica-se uma podridão deprimida, circular, próxima ao pedúnculo, coberta pela esporulação negra do fungo (Barksdale, 1969; Lopes e Santos, 1994; Vloutoglou e Kalogerakis, 2000).

O controle da pinta preta é baseado na aplicação de fungicidas protetores e sistêmicos, o que eleva os custos de produção, além de ser pouco efetivo em períodos de alta umidade (Dillard et al., 1997; Holm 2003). Uma alternativa para o controle desta doença seria o emprego de cultivares resistentes, entretanto não existe cultivares comerciais resistentes a *A. solani* (Foolad et al., 2000). Fontes de resistência tem sido identificadas em espécies silvestres de tomateiro, em particular nas espécies *Lycopersicon pimpinelliifolium* e *L. hirsutum*.(Barksdale e Stoner, 1973; Maiero, 1989; Maiero et al., 1990). A partir dessas fontes de resistência, várias linhagens de tomateiro com níveis moderados de resistência a pinta preta tem sido desenvolvidas (Gardner et al., 1988; Gardner, 1999; Foolad et al., 2000). Por exemplo, a linhagem NC EBR-2 apresenta alta resistência à podridão basal no caule, e sofre menor desfolha quando comparada a genótipos suscetíveis (Gardner et al., 1988).

O desenvolvimento de cultivares com alto nível de resistência é dificultado pela complexidade da resistência à pinta preta. A resistência é negativamente correlacionada com a maturidade fisiológica e produtividade da planta: folhas velhas e senescentes são mais suscetíveis que folhas jovens e imaturas; plantas jovens são mais resistentes que plantas adultas e pesada carga de frutos aumenta a severidade da doença. Como consequência, plantas estéreis ou com florescimento tardio e pouco produtivas são resistentes à pinta preta, sem que esta resistência seja geneticamente determinada. Além disso, a resistência a *Alternaria* têm sido relatada como quantitativa e recessiva em algumas linhagens (Maiero et al., 1990) e quantitativa e parcialmente dominante, com ocorrência de epistasia, em outros cruzamentos (Nash & Gardner, 1988).

O entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência do tomateiro à pinta preta pode facilitar a obtenção de cultivares com níveis adequados de resistência. Lawrence et al. (1996) avaliando a expressão de possíveis genes relacionados com a resistência à pinta preta observaram que genótipos resistentes como NC EBR-2 apresentaram maior expressão constitutiva de genes que codificam proteínas PRs como quitinases, β -1,3-endoglucanases e osmotinas comparado a genótipos suscetíveis. Além disso, foi observado também que nos genótipos resistentes o nível de indução de quitinases e osmotinas em resposta à infecção por *A. solani* é maior (Lawrence et al., 1996; Lawrence et al., 2000). Quitinases básicas quando aplicadas em conídios de *A. solani* em germinação promoveram a degradação da parede celular e liberação de oligômeros de quitosana, que foram capazes de atuar como elicitores inespecíficos de HR (Lawrence et al., 2000). Spletzer et al. (1999) demonstraram que a aplicação de AS ao sistema radicular de plantas de tomateiro promoveu uma redução significativa na severidade da pinta preta associado a um aumento na expressão de proteínas PRs. O papel de proteínas PRs na resistência a *A. solani* foi demonstrado pela expressão heteróloga de uma β -1,3-glucanase de milho em plantas de tomateiro, resultando em uma redução significativa na severidade da pinta preta (Schaefer et al., 2005). Todavia, considerando a natureza quantitativa da resistência a essa doença, a manipulação de um número maior de genes será necessário para a obtenção de níveis adequados de resistência.

Em arábida, trabalhos envolvendo análise em larga escala de genes diferencialmente expressos em resposta a *A. brassicicola* possibilitaram a identificação de genes relacionados a diferentes processos de defesa da planta (Shenk et al., 2000; Shenk et al., 2003; Oh et al., 2005; McGrath, 2005). Shenk et al. (2000) identificaram por meio de microarranjos de cDNA 168 genes induzidos em resposta a *A. brassicicola*, incluindo genes que codificam proteínas relacionadas com morte programada de células, sinalização celular e genes envolvidos na produção de compostos com ação antimicrobiana como defensinas e fitoalexinas. A utilização de técnicas moleculares como microarranjos de cDNA tem possibilitado uma análise global dos genes expressos pela planta durante os processos de infecção permitindo a identificação de todo o conjunto de genes que compõe uma determinada resposta de resistência.

Além dos microarranjos de cDNA, a técnica de hibridização subtrativa por supressão ('Suppressive Subtractive Hybridization' - SSH) tem sido muito utilizada para identificar genes da planta e do patógeno expressos durante os processos de infecção (Diatchenko et al., 1996; Diatchenko et al., 1999). Esta técnica possibilita a construção de bibliotecas de cDNAs enriquecidas para genes diferencialmente expressos, mesmo aqueles com baixo nível de expressão (Diatchenko et al., 1996.). A técnica de SSH tem sido utilizada com sucesso para a identificação de possíveis genes relacionados com resistência a fitopatógenos em diversas espécies de plantas (Xiong et al., 2001; Zhen-Dong et al., 2003; Fernandez et al., 2004, Shi et al., 2005).

Assim, este trabalho teve como objetivos: 1) identificar genes diferencialmente expressos em folhas do dossel inferior da linhagem NC EBR-2 em resposta à infecção por *A. solani*, 2) verificar se a expressão desses genes nos dosséis inferior e superior de plantas da linhagem NC EBR-2 se correlaciona com a idade dos tecidos foliares.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em condições naturais, as plantas são constantemente desafiadas por fitopatógenos potenciais. Entretanto, a ocorrência de doenças é exceção e resistência a regra (Hammond-Kosack e Jones 2000). Isto pode ser devido a presença de barreiras naturais, como parede celular e camadas de cera, e compostos químicos pré-formados que conferem resistência de amplo espectro às plantas em resposta ao ataque inicial de uma grande gama de patógenos. Em adição a esta primeira linha de defesa constitutiva, cada célula vegetal possui mecanismos de defesa induzíveis e, em caso de suplantação das barreiras pré-formadas, há uma reorganização metabólica na planta visando conter o organismo invasor no sítio de infecção. Esta reorganização metabólica é desencadeada por proteínas codificadas por genes de resistência (genes R) que reconhecem proteínas de avirulência (AVR) produzidas pelos fitopatógenos ativando as respostas de defesa (Flor, 1971; Takken & Joosten, 2000; Hammond-Kosack & Jones, 2000; Hammond-Kosack e Parker, 2003; Martin et al., 2003; Belkhadir et al., 2004).

Atualmente são conhecidos mais de 40 genes de resistência organizados basicamente em 5 classes. A grande maioria codifica proteínas contendo domínios de ligação a nucleotídeos ('Nucleotide binding', NB) e repetições ricas em leucina ('Leucine-rich repeat', LRR) (Dangl e Jones, 2001; Rathjen e Moffett, 2003; Hammond-Kosack e Parker 2003). Dentre estes, foi demonstrado que somente os genes *Pi-ta* e *Pto* (*P. syriangae* pv. *tomato*) codificam proteínas que interagem diretamente com proteínas elicitoras produzidas pelo patógeno como proposto pelo modelo gene a gene (Flor 1971; Jia et al., 2000; Tang et al., 1996). Em função disso, tem sido proposto que

esta interação envolve uma proteína chamada 'guardiã' capaz de reconhecer mais de uma proteína AVR, e ao fazê-lo sofre uma mudança conformacional ativando a proteína R que, por sua vez, desencadeia a resposta de resistência (Van der Biezen e Jones, 1998).

Uma vez ocorrido o reconhecimento do patógeno invasor, ocorre a ativação de uma complexa rede de sinais mediada por três moléculas sinalizadoras, ácido salicílico (AS), etileno (ET) e ácido jasmônico (AJ) (Clarke et al., 2000; Ton et al., 2002; Nimchuk et al., 2003;). A rota de resistência mediada pelo AS envolve a ativação de respostas de defesa no local da infecção e sistêmicas ('Systemic acquired resistance', SAR) (Ryals et al., 1996). Este processo tem início pela alteração no fluxo de íons através da membrana plasmática seguido por um acúmulo de espécies de oxigênio reativo ('reactive oxygen species', ROS) tal como radicais superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estas espécies de oxigênio reativo interagem com o óxido nítrico podendo provocar a morte de células no sítio de infecção (reação de hipersensibilidade, HR) (McDowell e Dangl, 2000).

A ocorrência de HR e o acúmulo de ROS induzem a produção de AS, o qual por sua vez promove o acúmulo de ROS resultando em um 'feedback positivo' que desencadeia uma explosão oxidativa no sítio de infecção (Shirasu et al., 1997; Resende et al., 2003). Em arábido, foi demonstrado que esta amplificação na resposta de defesa envolve a participação dos genes *EDS1* ('Enhanced disease susceptibility 1') e *PAD4* ('Phytoalexin Deficient 4') relacionados com a formação de HR e acúmulo de AS (Feys et al., 2001; Rustérucchi et al., 2001). Neste caso a explosão oxidativa é controlada pelo gene *LSD1* ('Lesion simulating disease 1') que atua como um modulador de ROS, assegurando a atividade normal de catalases que são inibidas pelo AS, restringindo a explosão oxidativa e morte celular desencadeada por *EDS1* e *PAD4* (Mateo et al., 2004). A MAP cinase 4 (MPK4) também regula de forma negativa o acúmulo de AS bem como as respostas sistêmicas de defesa mediadas por *EDS1* e *PAD4* (Wiermer et al., 2005). A perda de função de *MPK4* resulta em aumento nos níveis de AS associado a expressão constitutiva dos genes *PR-1* e *PR-5* marcadores de SAR (Petersen, 2000).

O AS pode ser produzido por duas rotas distintas. A primeira delas envolve a rota dos fenilpropanóides em que o AS é sintetizado a partir da

fenilalanina (Leon et al., 1995). A segunda, responsável por grande parte do AS produzido envolve a rota do chiquimato, em um processo em que participa a enzima isocorismato sintetase 1 (ICS1) codificada pelo gene *SID2* ('Salicylic acid induction deficient 2') (Wildermuth et al., 2001). O acúmulo do AS desencadeia a expressão de genes de duas vias de resposta de defesa. A primeira delas é constituída por genes expressos precocemente, cerca de 2-3h após a indução. Desta resposta participam genes que codificam enzimas como glutationa-S-transferase e glicosiltransferases que protegem as células do estresse oxidativo (Horvath e Chua, 1996; Uquillas et al., 2004). A segunda via de resposta envolve genes expressos cerca de 12-16h após a indução que são regulados pelo gene *NPR1* ('Non-expressor of PR1'), também conhecido como *NIM1* (Dong, 2004). Há evidências que a ativação de *NPR1* pelo AS envolve a participação da proteína SABP2 ('Salicylic acid-binding protein 2') que tem alta afinidade pelo AS, possivelmente atuando como uma proteína receptora (Kumar e Klessig, 2003; Dong, 2004). Em condições de baixa concentração de AS, proteínas NPR1 permanecem no citoplasma unidas por pontes bissulfídricas formando oligômeros. O aumento na concentração de AS altera o potencial redox da célula promovendo a redução das pontes bissulfídricas liberando monômeros de NPR1 (Mou et al., 2003). Estes monômeros migram para o núcleo da célula onde interagem com os fatores de transcrição do tipo TGAs (Després et al., 2000; Johnson et al., 2003). TGAs têm afinidade pelo *cis* elemento 'TGACG' encontrado na região regulatória de genes relacionados com a defesa da planta, como *PR-1*. Després et al. (2000) demonstraram que o fator TGA2 é capaz de se ligar aos elementos LS5 e LS7 presentes na região promotora de *PR-1 in vitro*. Esta ligação foi confirmada também *in vivo*, em um processo dependente de AS, demonstrando a participação de NPR1 e TGA2 na regulação de *PR-1* (Subramaniam et al., 2001). A regulação da expressão de proteínas PRs por NPR1/TGA possivelmente envolve ainda a proteína NIMIN1 ('NIM1-Interacting1') que é capaz de interagir com NPR1/TGA no sistema triplo-híbrido (Weigel et al., 2005). Neste caso, a superexpressão de *NIMIN1* em plantas de arábidoresulta em redução na expressão de *PR-1*, *PR-2* e *PR-5* e aumento na suscetibilidade a *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. Do mesmo modo, o silenciamento ou nocaute de *NIMIN1* resulta na hiperativação de *PR-1* após o tratamento com AS, demonstrando que *NIMIN1* é

um regulador negativo da expressão dos genes *PR* (Weigel et al., 2005). A regulação de respostas de defesa mediada por *NPR1* envolve ainda os fatores de transcrição do tipo WRKY, que regulam a expressão de genes que apresentam em sua região promotora os motivos 'W-boxes' (Beckers e Spoel, 2006). Yu et al. (2001) identificaram 'W-boxes' na região promotora de *NPR1* e demonstraram que mutações nesses *cis*-elementos promovem redução na expressão *NPR1* e de genes por ele regulados. Alguns membros da família WRKY por sua vez, como WRKY70, tem sua expressão dependente de *NPR1* (Li et al., 2004). WRKY70 regula mais de 40 genes relacionados com defesa em *Arabidopsis*, incluindo não só genes cuja expressão é dependente do AS, como também genes cuja expressão é regulada pelo AJ (Li et al., 2004).

Algumas respostas de defesa mediadas pelo AS são independentes de *NPR1* (Clarke et al., 2000). A expressão do fator de transcrição AtWHy1, envolvido na regulação de *PR-1*, não é alterada em plantas com o gene *NPR1* mutado (Desveaux et al., 2004). Por outro lado, a expressão de *PR-1* nessas plantas é reduzida, assim como em plantas com o gene *AtWHy1* mutado. Isto sugere que a interação de *NPR1* e *AtWHy1* é necessária para expressão de *PR-1*, apesar de fazerem parte de duas vias independentes de sinalização mediadas pelo AS (Desveaux et al., 2004).

O ácido jasmônico (AJ) é outra molécula que regula as respostas de defesa das plantas incluindo respostas a ferimentos, estresses ambientais, ataque por insetos e infecção por fitopatógenos (McConn et al., 1997; Staswick et al., 1998; Overmyer et al., 2000). Algumas dessas respostas também envolvem a participação sinérgica do etileno (ET) (Guo e Eckler, 2004). O AJ é sintetizado a partir do ácido linolênico, o qual é liberado dos lipídeos da membrana plasmática via rota dos octadienóides (Taiz e Zeiger, 2004). Após a sua síntese, o AJ é possivelmente reconhecido e transduzido por receptores específicos ainda não identificados (Beckers e Spoel, 2006). Entretanto, a análise de mutantes insensíveis ao AJ ou a coronatina (um análogo do AJ) permitiu a identificação do gene *COI1* ('Coronatine insensitive 1') (Feys et al., 1994; Xie et al., 1998). Plantas com mutações neste gene não expressam genes que respondem ao AJ e são altamente suscetíveis ao ataque de insetos e à infecção por fitopatógenos, indicando que *COI1* exerce uma função central na sinalização mediada pelo AJ (Feys et al., 1994; Li et al. 2004). O gene *COI1*

codifica uma proteína com motivos 'F-box' encontrados em proteínas que compõem o complexo ubiquitina ligase envolvido na degradação de proteínas (Xie et al., 1998). Xu et al. (2002) demonstraram que COI1 interage com as proteínas AtCUL1, AtRbx, ASK1 e ASK2 para constituir o complexo ubiquitina ligase SCF^{COI1} ('Skp1-Cullin-F-box protein'), essencial para expressão de genes dependentes de AJ. Possivelmente o complexo SCF^{COI1} está envolvido na degradação de proteínas que atuam como repressores da expressão de genes regulados pelo AJ, de modo que a eliminação destes repressores seja responsável pela expressão de genes regulados pelo AJ (Xu et al., 2002). Devoto et al. (2002) demonstraram que SCF^{COI1} interage com histonas desacetilases sugerindo que estas enzimas sejam alvos de SCF^{COI1}. A acetilação de histonas reduz a acessibilidade de fatores de transcrição à cromatina, de tal modo que estas enzimas podem estar envolvidas na regulação de respostas mediadas pelo AJ (Devoto et al., 2002).

O gene *JAR1* ('Jasmonic acid resistant 1') também participa da regulação de genes expressos em resposta ao AJ (Staswick et al., 1992). Plantas que apresentam mutações neste gene tem reduzida expressão de genes responsivos ao AJ associado a um aumento na suscetibilidade à infecção por fitopatógenos como *Pythium irregulare* (Staswick et al., 1998). Staswick e Tiryaki (2004) demonstraram que *JAR1* codifica uma ácido jasmônico-amino sintetase que forma conjugados entre o AJ e diversos aminoácidos. Conjugados formados entre AJ e isoleucina estão envolvidos na regulação do crescimento de raízes (Staswick e Tiryaki 2004). Embora a participação destes conjugados na defesa da planta contra fitopatógenos não tenha sido demonstrado, é provável que estas moléculas exerçam importante papel nos processos de sinalização regulados pelo AJ (Beckers e Spoel, 2006). A regulação de genes envolvidos na rota do AJ envolve ainda a participação de MAP cinases como *MPK4*. Plantas com mutações em *MPK4* apresentam reduzida expressão de genes *PDF1.2* (defensina) que é um gene marcador da resposta ao AJ, o que sugere que *MPK4* atua como um regulador positivo da expressão de genes responsivos ao AJ (Petersen et al., 2000).

Os genes responsivos ao AJ são também regulados pelo fator de transcrição ERF-1 (Lorenzo e Solano, 2005). Este fator de transcrição pode ser induzido tanto em resposta ao AJ quanto em resposta ao etileno, sendo que

neste segundo caso sua indução é mediada pelo fator de transcrição EIN3 ('ethylene insensitive 3') (Solano et al., 1998; Lorenzo et al., 2003). Apesar de ERF-1 ser induzido por qualquer uma destas rotas, mutações que bloqueiam uma delas limita a expressão de *ERF-1*. Além disso, a indução simultânea destas rotas potencializa a expressão de *ERF-1*, o que sugere que este fator de transcrição é um integrador das rotas do etileno e AJ (Lorenzo et al., 2003). Entre os genes relacionados com defesa que são induzidos em plantas superexpressando *ERF-1* estão genes que codificam PR-1, glucanases, quitinases, fatores de transcrição da família WRKY, peroxidases e lipoxigenases como LOX-1 (Lorenzo et al., 2003). A superexpressão de *ERF-1* em plantas de *Arabidopsis* confere resistência a patógenos necrotróficos como *Botrytis cinerea* e *Plectosphaerella cucumerina* (Berrocal-Lobo et al., 2002).

O fator de transcrição AtMyC2 codificado pelo gene *JIN1* ('Jasmonate-insensitive1') regula negativamente a expressão de genes cuja expressão é dependente de *ERF-1* (Lorenzo et al., 2004). Plantas mutantes para o gene *JIN1* apresentam reduzida sensibilidade ao AJ, associado a um aumento na expressão de genes como *PDF1.2* e *PR-4*. Isto sugere que apesar de *JIN1* ser responsivo ao AJ sua expressão resulta na supressão de genes regulados positivamente por *ERF-1*. Por outro lado, AtMyC2 regula positivamente a expressão de genes expressos em resposta a ferimentos como *VSP2* ('vegetative storage protein'), cuja expressão é suprimida por *ERF-1*. Esta interação antagonista entre *ERF-1* e *JIN1*, permite a planta modular a expressão de um conjunto específico de genes em resposta a ferimentos e/ou a fitopatógenos a partir de uma mesma molécula sinalizadora (Lorenzo et al., 2004).

As rotas de sinalização mediadas pelo AS, ET e AJ interagem de diferentes formas entre si quando induzidas simultaneamente. A interação entre as rotas do AS e AJ talvez seja um dos casos mais bem estudados (Reymond e Farmer, 1998; Lorenzo e Solano, 2005; Beckers e Spoel, 2006). Aplicações exógenas de AJ promovem a supressão de genes regulados pelo AS, do mesmo modo que aplicação de AS ou de seus análogos suprime a expressão de genes regulados pelo AJ, o que demonstra uma relação antagônica entre estas duas rotas (Niki et al., 1998; Thaler et al., 2002). Parte deste antagonismo se deve ao fato que o aumento nos níveis de AS na célula

reduz a expressão do gene *LOX2* que codifica para a enzima lipoxigenase 2 (LOX-2) que é uma enzima chave na rota dos octadienóides responsável pela produção de AJ (Spoel et al., 2003). A supressão de genes como *LOX2* pelo aumento nos níveis de AS pode envolver a participação da proteína NPR1 citoplasmática. NPR1 pode atuar inibindo reguladores positivos de genes responsivos ao AJ ou facilitar o acesso de reguladores negativos destes genes ao núcleo da célula (Spoel et al., 2003).

A MAPK4 também está relacionada com a intercomunicação entre as rotas do AS e AJ. Plantas contendo mutações em *MAPK4* apresentam reduzida expressão de *PDF1.2*. Por outro lado estes mutantes apresentam maior acúmulo de AS e expressam constitutivamente genes como *PR-1* e *PR-2* o que sugere que MAPK4 seja um regulador negativo de genes relacionados com a rota do AS (Petersen et al., 2000). O fator de transcrição WRKY70 também está envolvido na interação entre as rotas do AS e AJ. Li et al. (2004) demonstraram que o silenciamento deste gene resulta em um aumento da expressão de *AtVSP* que é regulado pelo AJ, assim como a sua superexpressão suprime a expressão de *PDF1.2*, o que sugere que WRKY70 seja um repressor de genes induzidos pelo AJ. Recentemente, Kariola et al. (2005) demonstraram que o silenciamento do gene *AtCLH1*, que codifica para clorofilase 1, resulta em um aumento nos níveis de AS acompanhado pela redução nos níveis de AJ. É possível que *AtCLH1* esteja relacionado com regulação do balanço entre estas duas rotas de defesa (Kariola et al., 2005).

Esta segregação de respostas de defesa se correlaciona com os grupos de fitopatógenos que cada uma controla. Plantas expressando o gene *NahG* que codifica a enzima salicilato hidroxilase, a qual degrada o AS em catecol, assim como plantas contendo mutações no gene *NPR1* apresentam aumento na suscetibilidade a patógenos biotróficos como *Peronospora parasitica* e *Erysiphe cichoracearum*. Entretanto, a resistência a patógenos necrotróficos como *Alternaria brassicicola* e *B. cinerea* não é alterada (Thomma et al., 1998, Liu et al., 2005). Por outro lado, mutações em genes expressos em resposta ao etileno como *EIN2*, resultam em aumento na suscetibilidade aos patógenos necrotróficos supracitados (Thomma et al., 1998; Thomma et al., 1999). A partir destes e de outros trabalhos envolvendo a resistência a patógenos necrotróficos e biotróficos, tem sido postulado que genes de defesa regulados

pelo AS estão relacionados principalmente com a resistência a patógenos biotróficos, enquanto que os genes responsivos ao etileno e AJ estão mais relacionados à resistência a patógenos necrotróficos (Staswick et al., 1998; Thomma et al., 1999; Lu et al., 2001; Liu et al., 2005). Apesar deste antagonismo de vias de respostas de defesa, a resistência a alguns fitopatógenos como *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* em arábido, envolve a participação de genes regulados pelo AS, AJ e ET (Kariola et al., 2003), o que demonstra a possibilidade de interação positiva entre estas vias de respostas de resistência contra um mesmo fitopatógeno. Na Figura 1 estão sumarizados os principais eventos das vias de respostas de defesa reguladas pelo AJ, AS e ET.

Apesar do progresso obtido no entendimento dos mecanismos relacionados à defesa contra fitopatógenos, principalmente biotróficos, pouco ainda é conhecido acerca dos mecanismos relacionados a defesa contra necrotróficos. Isto em parte, é devido ao fato que este grupo de fitopatógenos promove a morte das células do hospedeiro antes da colonização (Glazebrook, 2005). Esta característica faz com que a resistência contra patógenos desta natureza envolva múltiplos mecanismos de defesa (Thomma, 2003; Rotem, 1994). Entre os patógenos necrotróficos que causam danos a espécies cultivadas estão espécies do gênero *Alternaria*. Membros deste gênero se caracterizam pela produção de toxinas, algumas das quais atuam como fatores de patogenicidade, envolvidas na morte de células do hospedeiro durante os processos de infecção (Akamatsu et al., 1997; Ichihara e Oikawa, 1997). A resistência de algumas espécies de plantas a *Alternaria* está associada a capacidade de metabolização destas toxinas (Pedras et al., 2001). Além disso, o metabolismo de toxinas como a destruxina B induz a produção de fitoalexinas que têm efeito direto sobre o fitopatógeno (Pedras et al. 2001). A contribuição de fitoalexinas na resistência a *Alternaria* foi demonstrada em arábido em que mutantes incapazes de produzir a fitoalexina camalexina apresentam aumento na suscetibilidade a *A. brassicicola* (Thomma et al., 1999).

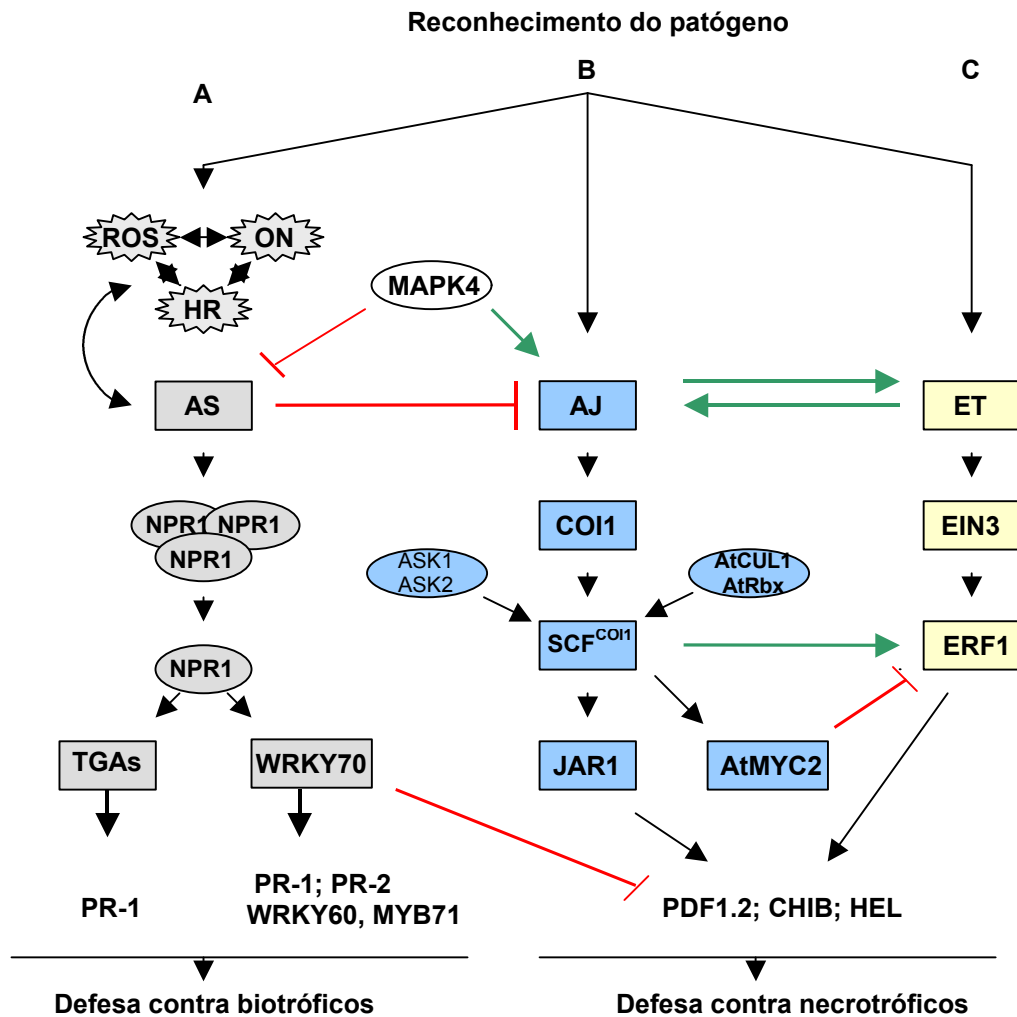


Figura 1- Representação esquemática dos principais eventos que compõem as respostas de defesa reguladas pelo ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET). A – O reconhecimento do microorganismo invasor desencadeia a formação de espécies de oxigênio reativo ROS, que interagem com o óxido nítrico (ON) e induzem a reação de hipersensibilidade (HR). Isto induz a produção de AS que por sua vez contribui para uma maior produção de ROS havendo um “feedback positivo”. O ácido salicílico altera o potencial redox no citoplasma provocando a dissociação dos monômeros de NPR1 que migram para o núcleo da célula e interagem com os fatores de transcrição TGAs ativando a transcrição de genes relacionados a defesa como *PR-1*. NPR1 participa também da regulação do fator de transcrição WRKY70 que regula positivamente a expressão de genes relacionados a rota do AS e suprime a expressão de genes regulados pelo AJ e ET. B – a expressão de genes regulados pelo AJ é dependente da MAPK4 que por sua vez regula negativamente a expressão de genes regulados pelo AS. O componente central desta rota é COI1 que interage com quatro outras proteínas (AtCUL1, AtRbx, ASK1 e ASK2) formando o complexo SCF^{COI1} envolvido na degradação de proteínas repressoras de genes induzidos pelo AJ. COI1 induz a expressão de *JAR1* envolvido na regulação de genes expressos em resposta a patógenos necrotróficos. C- O etileno induz a expressão do fator de transcrição EIN3 que por sua vez regula a expressão do fator de transcrição ERF-1 que integra as vias de defesa mediadas pelo AJ e ET. Genes induzidos por ERF-1 são regulados negativamente pelo fator de transcrição AtMYC2. Modelo adaptado de Hammond-Kosack e Parker, 2003; Lorenzo et al., 2004; Guo e Ecker, 2004; Lorenzo e Solano, 2005; Beckers e Spoel, 2006.

A morte celular desencadeada por toxinas liberadas pelo fungo envolve a participação da planta hospedeira que na presença destes compostos promove a morte programada de células no sítio de infecção (Wang et al., 1996). Plantas de tomate expressando o gene viral *p35* que suprime o processo de morte celular apresentaram aumento na resistência a *A. alternata* f.sp. *lycopersici*, mostrando que a indução de morte celular é importante para esta interação (Lincoln et al., 2002). A indução da morte celular programada é uma estratégia geral adotada por patógenos necrotróficos (Dickman et al., 2001; Lincoln et al., 2002). Em alguns casos, verifica-se que a morte celular é acompanhada pelo acúmulo de ROS. Entretanto, observa-se que patógenos como *A. alternata* produzem manitol que atua como um potente supressor de ROS, suplantando esta resposta de defesa (Jennings et al., 1998). Por outro lado, plantas como tabaco produzem a manitol desidrogenase que promove a inativação do manitol (Jennings et al., 1998).

A resistência a *Alternaria* envolve também a participação do AJ. Mutações no gene *COI1* causam um aumento na suscetibilidade de arábida a *A. brassicicola* (Thomma et al., 1998). Por outro lado, mutações em genes que regulam respostas de defesa mediadas por AS e ET não resultam em aumento na suscetibilidade a este patógeno, sugerindo que a resistência a *A. brassicicola* em arábida é regulada basicamente pelo AJ (Thomma et al., 1998; Thomma et al., 1999). A resposta de defesa a *A. brassicicola* envolve também a proteína G. Mutantes para a subunidade G β apresentam reduzida expressão de *PDF1.2*, associado ao aumento na suscetibilidade a *A. brassicicola* (Trusov et al., 2006). Isto sugere que a proteína G atua como um regulador positivo da cascata de sinalização mediada pelo AJ (Trusov et al., 2006). Kariola et al. (2005) propõe ainda o envolvimento do gene *AtCLH1* (que codifica a clorofilase 1) na resposta de defesa a *A. brassicicola*, tendo em vista que o silenciamento deste gene resulta em uma redução nos níveis de AJ associado a um aumento na suscetibilidade a este patógeno.

A análise de 2375 genes de arábida utilizando microarranjos de cDNA, identificou 168 genes induzidos em resposta a *A. brassicicola*, sendo que 21 deles foram também induzidos pelo AJ (Shenk et al., 2000). Apesar da resistência a *A. brassicicola* em arábida não envolver a participação do AS

(Thomma et al., 1998), Shenck et al. (2000) identificaram 21 genes induzidos em resposta a *A. brassicicola* que também são induzidos em resposta ao AS. Todavia, a contribuição destes genes no processo de defesa da planta ainda não foi comprovada.

Entre as espécies do gênero *Alternaria* para qual se está buscando identificar possíveis genes relacionados com defesa da planta está *A. solani*. Este patógeno infecta vinte e cinco espécies vegetais, incluindo espécies cultivadas e não cultivadas, sendo a grande maioria Solanáceas (Pscheidt e Stevenson, 1986). No tomateiro, o fungo causa a 'pinta preta' que é considerada uma das mais importantes doenças da cultura (Mathur e Skekavat, 1986). Esta doença ocorre em toda a parte aérea da planta. Os sintomas mais comuns são lesões pardo-escuras com anéis concêntricos observados principalmente nas folhas mais velhas da planta. Em ataques severos, ocorre a coalescência das lesões provocando a desfolha da planta. Quando a infecção ocorre na fase inicial de desenvolvimento da cultura, a partir de inóculo existente no solo ou vindo de sementes contaminadas, ocorre a formação de uma podridão na região basal do caule que pode levar a morte da planta. Nos frutos, ocorre a formação de uma podridão na região do pedúnculo (Barksdale, 1969; Vloutoglou e Kalogerakis, 2000; Lopes e Ávila, 2005). A partir das lesões provocadas pelo fungo, ocorre a produção de conídios que podem ser dispersos pelo vento, pela água da chuva ou da irrigação (Rotem, 1994). Esses propágulos, ao atingirem plantas sadias iniciam um novo ciclo de infecção em um processo policíclico (Pscheidt e Stevenson, 1986). Em condições controladas, o período de incubação em tomateiro é de 24 h (Rotem, 1994). No final do ciclo da cultura, a produção de clamidósporos pode possibilitar a sobrevivência de *A. solani* no período de entressafra (Patterson, 1991). A sobrevivência do patógeno também ocorre por meio de hifas, que podem permanecer viáveis nos restos de cultura (Rotem, 1968). O controle da pinta preta é realizado principalmente pelo uso de fungicidas como o clorotalonil, mancozeb, iprodione, produtos a base de cobre, hidróxido de trifetil estanho e azoxystrobin (Dillard et al., 1997; Holm, 2003). Entretanto, o controle químico é pouco efetivo em períodos de alta umidade, além de elevar os custos de produção (Dillard et al., 1997; Holm, 2003). Uma alternativa seria o emprego de cultivares resistentes. Entretanto não se dispõe de cultivares comerciais com

altos níveis de resistência a pinta preta. O desenvolvimento de cultivares resistentes é dificultado pela complexidade da resistência a qual está correlacionada com a maturidade fisiológica e produtividade da planta. Plantas jovens são mais resistentes que plantas adultas e, em uma mesma planta, as folhas velhas são mais suscetíveis que folhas jovens. Plantas com baixa produtividade que apresentam maturação tardia são mais resistentes que cultivares precoces com alta produtividade (Pscheidt e Stevenson, 1986). Além disso, a resistência a *A. solani* é do tipo quantitativa e recessiva em cruzamentos derivados de *L. esculentum* e quantitativa e parcialmente dominante em cruzamentos derivados de *L. hirsutum* (Nash e Gardner, 1988; Maiero et al., 1990).

Espécies de tomateiro selvagens como *L. hirsutum* e *L. pimpinelliifolium* tem sido utilizadas como fontes de resistência a pinta preta (Barksdale e Stoner, 1973, Maiero, 1989). A partir dessas fontes de resistência, foram desenvolvidas várias linhagens de tomateiro com níveis moderados de resistência (Gardner et al., 1988; Gardner, 1999; Foolad et al., 2000). Um exemplo é a linhagem NC EBR-2, que apresenta alta resistência à podridão basal no caule e sofre menor desfolha (Gardner et al., 1988). Lawrence et al. (1996, 2000) verificaram que genótipos resistentes como NC EBR-2 quando inoculados com *A. solani*, apresentam maior nível de indução de glucanases, quitinases e osmotinas comparado a genótipos suscetíveis como Piedmont. Essas quitinases quando em contato com conídios de *Alternaria*, promovem a liberação de oligômeros de quitosana que atuam como elicitores de HR, o que sugere sua participação na defesa da planta (Lawrence et al., 2000). Trabalhos desta natureza, têm possibilitado a identificação de alguns dos genes relacionados com a resistência do tomateiro a pinta preta. Todavia, tendo em vista que a resistência a esta doença é do tipo poligênica, possivelmente muitos dos genes relacionados com a resistência ainda não foram identificados. Trabalhos de identificação em larga escala de genes diferencialmente expressos em resposta a *A. solani* possibilitariam a identificação de todo o conjunto de genes relacionados com a resistência a esta doença.

Entre as técnicas disponíveis para identificação de genes diferencialmente expressos está o 'differential display' (DD) (Liang e Pardee,

1992). Por esta técnica, a análise de expressão diferencial é realizada amplificando-se por PCR cDNAs provenientes de amostras sob diferentes tratamentos utilizando-se oligonucleotídeos arbitrários contendo 10-12 pb. (Stein e Liang 2002). Entretanto, a utilização de oligonucleotídeos inespecíficos resulta na obtenção de um grande número de falsos positivos. Além disso, a competição entre transcritos com diferentes abundâncias resulta em elevada redundância na população de clones obtidos. Esses fatores têm contribuído para a substituição do DD por outras metodologias (Crawford et al., 2002; Liang, 2002).

O cDNA-AFLP, a exemplo do DD, é uma técnica que baseia-se em PCR (Bachem et al., 1996). Porém, neste caso, os cDNAs são digeridos com enzimas de restrição permitindo a ligação de adaptadores de seqüência conhecida. Isto torna possível a utilização de oligonucleotídeos específicos, eliminando os problemas de amplificação inespecífica observados no DD. Com isso, a competição entre transcritos com diferentes abundâncias é reduzida, tornando possível a identificação de genes que apresentam baixo nível de expressão (Bachem et al., 1996; Donson et al., 2002). Por meio da utilização do cDNA-AFLP, tem sido possível a identificação de genes relacionados a defesa em diversas espécies vegetais (Eckey et al., 2004; Bruggmann et al., 2005). Em cana-de-açúcar, por exemplo, Borrás-Hidalgo et al. (2005) utilizando cDNA-AFLP identificaram 62 genes diferencialmente expressos em resposta a *Ustilago scitaminea* Syd., agente causal do carvão da cana-de-açúcar.

Apesar da maior confiabilidade oferecida pelo cDNA-AFLP, comparado ao DD, o número de genes possíveis de serem analisados por esta técnica é muito reduzido comparado ao que pode ser analisado por técnicas como os microarranjos de cDNA. Por meio da técnica de microarranjos, é possível avaliar a expressão de cerca de 10.000 genes em uma lâmina de 3,24 cm² (Shena et al., 1995). Neste caso, fragmentos de cDNA de seqüência conhecida são depositados nas lâminas e hibridizados com cDNAs provenientes dos tratamentos em estudo. O conhecimento da seqüência de nucleotídeos dos clones depositados nas lâminas, permite uma rápida identificação dos genes cujos transcritos sofreram hibridização. Além disso, é possível se determinar o nível de expressão dos genes identificados (Murphy, 2002). A técnica de microarranjos tem sido utilizada para a identificação de genes diferencialmente

expressos em diversos patossistemas, incluindo interações envolvendo espécies do gênero *Alternaria* (Shenk et al., 2000; Shenk et al., 2003; Narusaka et al., 2004).

A utilização da técnica de microarranjos apresenta algumas restrições. As lâminas contendo cDNAs não estão disponíveis para todas as espécies vegetais. Além disso, em muitos casos, as lâminas são produzidas a partir de plantas mantidas sob condições normais, de modo que os cDNAs provenientes de genes expressos em resposta ao tratamento de interesse estão sub-representados. Por ser uma técnica que baseia-se em hibridização, é comum a ocorrência de hibridização cruzada entre membros de uma mesma família, o que dificulta a quantificação da expressão de um membro individual. Por fim, uma das maiores limitações desta técnica é o elevado custo de implantação (Richmond et al., 1999; Liang, 2002; Murphy, 2002).

Uma das técnicas que vem sendo amplamente utilizadas para a identificação de genes diferencialmente expressos é a hibridização subtrativa seguida de supressão por PCR ('Suppressive subtractive hybridization' - SSH) (Diatchenko et al., 1996). Nesta técnica, realiza-se a hibridização de cDNAs provenientes de amostras que receberam o tratamento, com cDNAs de amostras não tratadas. Com isso, elimina-se grande parte dos cDNAs correspondentes a genes expressos constitutivamente em ambos os tratamentos. Nesta etapa, ocorre também a equalização na população de cDNAs provenientes de genes com diferentes níveis de expressão. Desta forma, obtêm-se bibliotecas enriquecidas para genes diferencialmente expressos com reduzido número de clones redundantes. Além disso, é possível a identificação de genes que apresentam baixo nível de expressão (Diatchenko, 1996, Diatchenko, 1999). A SSH tem possibilitado a identificação de genes relacionados à defesa da planta em diversos patossistemas (Xiong et al., 2001; Zhen-Dong et al., 2003; Fernandez et al., 2004; Shi et al., 2005). Em batata, por exemplo, Birch et al. (1999) identificaram um conjunto de genes envolvidos em morte programada de células que são diferencialmente expressos em resposta a *P. infestans*. A utilização da SSH até então não foi relatada no patossistema tomateiro - *A. solani*. O emprego dessa metodologia poderia permitir a identificação de genes diferencialmente expressos em resposta a *A. solani* que até então não foram descritos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Produção das mudas e inoculação

Sementes da linhagem de tomateiro NC EBR-2 foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato Plantmax Nt Horta (Eucatex). Quinze dias após a semeadura (DAS) as mudas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade para 2 L contendo solo misturado com areia e esterco na proporção de 3:1:1, previamente tratado com brometo de metila. Cerca de 35 DAS em casa de vegetação, as plantas foram transferidas para câmara de crescimento com temperatura de 26°C e fotoperíodo de 12-14 h onde permaneceram por 7-10 dias.

Plantas com 42-45 DAS foram inoculadas por atomização com uma suspensão de 10^4 conídios.mL⁻¹ de *A. solani* (isolado ASA 62, cedido pelo laboratório de Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia/UFV) sendo o tratamento testemunha atomizado somente com água. As plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro, a 25°C com fotoperíodo de 12 h durante 24 h e após este período transferidas para câmara de crescimento e mantidas nas mesmas condições supracitadas. Amostras de tecido foliar foram coletadas no dossel inferior (1ª e 2ª folha) e superior (4ª e 5ª folha) de 6 plantas/coleta de cada tratamento, nos tempos 0, 6, 12, 24, 36, 48 e 60 horas após a inoculação (hai), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

3.2. Construção das bibliotecas

A extração de RNA total foi realizada por meio de maceração das amostras na presença de nitrogênio líquido utilizando o tampão Concert™ (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha). A purificação do RNA mensageiro (RNAm) foi realizada a partir de 500 µg de RNA total utilizando o kit nucleotrap® Nucleic Acid Purification (Clontech, Palo Alto, CA, EUA). O RNAm foi liofilizado e ressuspenso em Tris-HCl 5mM, pH 7,5. A qualidade e quantidade das amostras de RNA purificadas foram analisadas por meio de eletroforese em gel desnaturante de agarose 1,2% e em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm respectivamente. As bibliotecas foram construídas de acordo com o protocolo do kit PCR-Select™ cDNA Subtraction (Clontech), utilizando-se 4 µg de mRNA de cada amostra. O tratamento inoculado com *A. solani* foi empregado como 'tester' e o tratamento não inoculado como 'driver'.

Os cDNAs resultantes da subtração foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) e transformados em *Escherichia coli* estirpe EC-100 (Epicentre, Madison, WI, EUA) por eletroporação. Os clones recombinantes foram selecionados em meio LB contendo ampicilina (150 µg.mL⁻¹), IPTG (100 µg.mL⁻¹) e X-GAL (20 µg.mL⁻¹) após incubação a 37°C por 16 h. Os clones foram então transferidos para placas de 96 cavidades contendo meio Freeze media (Budimann, 2000) e ampicilina (100 µg.mL⁻¹), incubadas a 37°C por 16 h e estocados a -80°C. A análise do tamanho e diversidade dos insertos clonados foi efetuada por meio da amplificação dos insertos de 48 clones de cada biblioteca por PCR utilizando os oligonucleotídeos M13F e M13R e analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.

3.2.1. Sequenciamento e análise das bibliotecas

A extração do DNA plasmidial foi realizada repicando-se as colônias para placas de microcultura contendo 1 mL de meio Circle Grow acrescido de 150 µg.mL⁻¹ de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C por 16 h a 280 rpm. Após esse período, as mesmas foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 min e descartado o sobrenadante. As células foram ressuspenso em 240 µL

de solução G.E.T pH 7,4 (EDTA pH 8,0 0,5 M, Tris-HCl 1 M, Glicose 20%) e centrifugadas a 3000 rpm por 7 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 80 μ L de solução G.E.T contendo RNase (150 μ g.mL⁻¹) e agitadas por 2 min. Uma alíquota de 60 μ L da suspensão de células foi transferida para placas de polipropileno e adicionado a cada poço 80 μ L de NaOH 0,2 N e SDS 1% (1:1), homogeneizadas por inversão e incubadas a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, centrifugou-se as placas a 3700 rpm por 2 min, fez-se a adição de 80 μ L de KOAc 3 M pH 4,8, homogeneizou-se por inversão e incubou-se no gelo por 10 min. As placas foram então incubadas em estufa a 90°C por 30 min, novamente no gelo por 10 min e centrifugadas a 3700 rpm por 9 min. Uma alíquota de 100 μ L do sobrenadante foi filtrado em uma placa Millipore (MAGV N22) por meio de centrifugação (3000 rpm por 6 min). Por fim, foi adicionado 100 μ L de isopropanol, homogeneizado por inversão e centrifugado a 3700 rpm por 45 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA lavado com etanol 70% e ressuspendido em água milli-Q. A quantidade e qualidade do DNA extraído foram analisados em gel de agarose 1%.

As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit DYEnamic™ ET Dye Terminators (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Foram utilizados nestas reações 100 a 150 ng de DNA, 0,5 μ M do oligonucleotídeo M13F ou M13R, 2,0 μ L de DYEnamic™ ET Terminator Sequencing Pré-mix em volume final de 5 μ L. As condições da PCR foram 95°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 2 minutos repetidas 35 vezes. Em seguida, o DNA foi precipitado adicionando-se 27,5 μ L de etanol absoluto e acetato de amônio para uma concentração final de 0,75 M. Após 10 minutos a temperatura ambiente, as reações foram centrifugadas por 45 minutos a 3700 rpm. O DNA foi então lavado com 100 μ L de etanol 70%, centrifugado a 3700 rpm por 10 minutos e deixado secar por 10 minutos. Após a precipitação, o DNA foi ressuspendido em 5 μ L de Loading Buffer (GE Healthcare). A leitura das amostras foi realizada em sequenciador automático MegaBACE™ 500 de 48 capilares (GE Healthcare).

As seqüências obtidas foram alinhadas pelo programa CAP3, que agrupou-as em contigs quando representadas mais de uma vez. Estas foram

então comparadas com seqüências depositadas nos bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando o algoritmo BLASTx e *Solanaceae Genomics Network* (SGN) (<http://www.sgn.cornell.edu/>) utilizando o algoritmo BLASTn. Para definir as categorias funcionais dos possíveis genes encontrados, foram utilizados as ferramentas disponíveis nos bancos de dados *Expert Protein Analysis System* (Expasy) (<http://bo.expasy.org/>) e InterPRO (<http://www2.ebi.ac.uk/interpro/>).

3.3. Análise de expressão gênica por PCR em tempo real (RT-qPCR)

As extrações de RNA para análise de expressão gênica por RT-qPCR foram realizadas de acordo com Logemann (1987). A integridade do RNA foi analisada em gel desnaturante de agarose 1,2% e a quantidade determinada por meio de leituras em espectrofotômetro. Cem microgramas de RNA total foram tratados com DNase I (*Rnase-Free Dnase set* – QIAGEN, Valencia, CA, EUA) e purificadas utilizando o kit *RNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN). A confirmação da eliminação completa do DNA genômico contaminante foi realizada por PCR utilizando os oligonucleotídeos 1958B (5'-GGT GAA CTT CCC GGG AGA AAA TGG CTG-3') e FP12 (5'-AGG ATT TGT AGT ACG TCT CAA CTT G -3') que amplificam um fragmento de DNA de 1,1 kb do gene *Sw-5*. A síntese dos cDNAs foi realizada utilizando-se o kit *Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR* a partir de 5 µg de RNA total utilizando oligo-dT. A confirmação da síntese foi realizada por PCR utilizando os oligonucleotídeos Actina-F e R (Tabela 1) os quais amplificam um fragmento de DNA de 62 pb do gene que codifica a Actina 2.

Os oligonucleotídeos para análise por RT-qPCR foram desenhados no programa Primer Express 2.0 (Applied Biosystems). Os controles endógenos testados foram Adenosil-fosforribosil transferase 1 (APT1), Actina 2, Fator de alongação 1 α (EF1), Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (G3PDH), β -6-Tubulina e Ubiquitina 10 (Tabela 1). Estes genes foram comparados quanto a cinética de expressão utilizando-se como calibrador o cDNA da amostra 0h e cada um dos genes controles pré-selecionados foram utilizados como controle

endógeno alternadamente a fim de verificar possíveis variações no nível de expressão dos demais.

Todos os pares de oligonucleotídeos testados tiveram sua especificidade de amplificação analisados por eletroforese em gel de agarose 3,5%. Para isso, os cDNAs sintetizados a partir de 5 µg de RNA total foram diluídos em 50 µL, utilizando-se desta 0,25 µL em cada reação de PCR contendo 200 nM de cada oligonucleotídeo, 1 mM de MgCl₂, 0,6U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 60 µM de dNTP em volume final de 25 µL.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para seleção de controles endógenos utilizados na análise de expressão gênica por RT-qPCR.

Oligo	Seqüência (5' → 3')	Acesso	Possível proteína/ amplicon
Actina-F	CGGTGACCACTTTCCGATCT	TC116117	Actina 2 (62pb)
Actina-R	TCCTCACCGTCAGCCATTTT		
TUB6-F	TTGGTTTTGCACCACTGACTTC	TC123940	□-6-tubulina (65pb)
TUB6-R	AAGCTCTGGCACTGTCAAAGC		
EF1-F	GATTGACAGACGTTCTGGTAAGGA	SGN U143399	Fator de alongação 1□ (67pb)
EF1-R	ACCGGCATCACCATTCTTCA		
G3PDH-F	GCCAGGGTGGCTCTACAAAG	SGN U218153	G3PDH (64pb)
G3PDH-R	CGGTGATGAAGGGATCGTTAA		
UBQ10-F	GGTTTTTAAGTTGTGGTTGTCTGGTT	SGN U212679	Ubiquitina 10 (112bp)
UBQ10-R	AAAAGCGAAAACACATTGATGATC		
APT1-F	GAACAGACAAGATTGAGATGCATGTA	TC115870	Adenosil-fosforibosil transferase 1 (60bp)
APT1-R	CCACGAGGGCACGTTCA		

Em função da possibilidade de existência de diferenças na eficiência de amplificação (E) entre os oligonucleotídeos utilizados como controle endógeno e aqueles destinados aos genes em estudo, determinou-se a eficiência de amplificação de cada um dos pares de oligonucleotídeos utilizados. Foi estabelecida uma curva de diluição de cDNA com 3 pontos (0,25, 0,5 e 1,0 µL de amostras de cDNA sintetizadas a partir de 5 µg de RNA total diluídas em 50 µL). Todas as reações foram realizadas em triplicata contendo 200 nM de cada oligonucleotídeo, 10 µL de 2x SYBR[®] Green PCR-Master Mix (Applied Biosystems) em volume final de 20 µL. As leituras foram realizadas no equipamento ABI 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), utilizando a opção 'quantificação absoluta'. As condições de termociclagem foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Com isso foi possível obter o valor 'slope' o qual é utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação (1+E) =

$10^{(-1/\text{slope})}$. Nesta etapa analisou-se também a presença de amplificação inespecífica por meio da curva de dissociação. Esta curva representa a relação entre temperatura e quantidade de emissão de fluorescência, sendo os dados coletados no intervalo entre 60 e 95°C. A existência de amplificação inespecífica na reação de PCR é identificada na curva pela presença de mais de um pico de dissociação.

A quantificação relativa do nível de expressão dos genes em estudo foi realizada seguindo as mesmas condições empregadas na quantificação absoluta, todavia utilizando 0,5 µL de cDNA de amostras sintetizadas a partir de 5 µg de RNA total diluídas em 50 µL. Os dados foram analisados conforme o método comparativo do ciclo limiar (Ct), de acordo com a equação $(1+E_E)^{Ct_{Eam} - Ct_{Ecal}} \times (1+E_A)^{Ct_{Acal} - Ct_{Aam}}$, onde: E_E , eficiência de amplificação do gene endógeno; E_A , eficiência de amplificação do gene alvo; Ct_{Eam} , valor de Ct do gene endógeno na amostra; Ct_{Ecal} , valor de Ct do gene endógeno no calibrador; Ct_{Acal} , valor de Ct do gene alvo no calibrador; Ct_{Aam} , valor de Ct do gene alvo na amostra. Essa equação é derivada da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Relative Quantification getting started guide for the 7300/7500 System e User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems) considerando diferenças na eficiência de amplificação entre o gene alvo e o calibrador (Lau, 2005).

4.RESULTADOS

4.1.Construção das bibliotecas subtrativas

A construção das bibliotecas foi realizada baseando-se no padrão sintomatológico das plantas inoculadas com *A. solani*. Os primeiros sintomas da doença foram observados 36 hai como pequenas pontuações necróticas que evoluíram para lesões necróticas de maior tamanho verificadas 48 hai, culminando com intensa necrose dos tecidos observada 60 hai. No dossel inferior das plantas (1ª e 2ª folhas) foram observadas lesões necróticas de maior tamanho que frequentemente coalesceram provocando em alguns casos a necrose completa da folha. No dossel superior (4ª e 5ª folhas) observou-se a formação lesões de menor tamanho, muitas das quais não evoluíram. Além disso, neste segmento da planta, observou-se um número reduzido de folhas completamente necrosadas.

A partir destas observações foram construídas duas bibliotecas subtrativas. A primeira delas foi construída utilizando amostras coletadas 24 hai, período que antecedeu o aparecimento dos primeiros sintomas da doença e que de acordo com Araújo e Matsuoka (2004), é o período onde ocorre a maior formação de apressórios de *A. solani*. A segunda biblioteca foi construída utilizando amostras coletadas 36 hai. Ambas as bibliotecas foram construídas a partir de amostras de folhas coletadas no dossel inferior das plantas.

4.1.1. Análise da biblioteca subtrativa 24h e classificação dos ESTs identificados

Foram seqüenciados 576 clones, e obtidas 471 seqüências de qualidade (phred>20), com tamanho médio de 360 pb. O alinhamento das seqüências pelo programa CAP3 e comparação com seqüências depositadas no NCBI e SGN utilizando os algoritmos BLASTx e BLASTn permitiu a identificação de 95 genes potenciais únicos, dentre os quais quinze apresentaram similaridade a genes relacionados a defesa da planta (Tabela 2).

Entre os contigs representando genes relacionados a defesa com maior número de ESTs estão aqueles com similaridade a catalase isozima 1 (39 ESTs), β -1,3-endoglucanase básica (25 ESTs) e pSTH2, a qual foi identificada em dois contigs distintos. O contig CLEEBA2-3 contendo 17 ESTs apresentou maior similaridade a pSTH2 descrita em tomate (Tsugane et al., 2005) enquanto o contig CLEEBA2-8 contendo 5 ESTs apresentou maior similaridade a pSTH2 descrita em batata (Matton e Brisson, 1989). Entre os contigs com maior representação está ainda o contig CLEEBA2-4 correspondente a uma possível ACC oxidase envolvida na biossíntese de etileno e os contigs CLEEBA2-5 e CLEEBA2-6 que correspondem a duas quitinases básicas da classe I que são induzidas por etileno tal como o gene *ERF4* (CLEEBA2-16). O clone LEEBA213D11 corresponde a uma lipoxigenase 3 envolvida em respostas de defesa mediadas por etileno e ácido jasmônico (Kolomiets et al., 1996). O contig CLEEBA2-10 apresenta similaridade ao gene *THT1-3* que codifica a enzima hidroxicinamoil-CoA tiramina N-hidroxicinamoil transferase (THT1-3), que faz parte de uma família de proteínas envolvidas no metabolismo do ácido hidroxicinâmico, envolvendo a rota dos fenilpropanóides (Von Roepenack-Lahaye et al., 2003). Foi identificado ainda o contig CLEEBA2-17 com similaridade ao gene que codifica a 'proteína G' SGP1 que pertence a uma família de proteínas de ligação a GTP.

Tabela 2 – ESTs identificados na biblioteca subtrativa da interação tomateiro - *A. solani* construída a partir de mRNA isolado de folhas coletadas 24 hai.

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº. ESTs
I. Defesa/resposta a patógeno							
CLEEBA2-1	Catalase isozima 1 (<i>L. esculentum</i>)	Metabolismo de H ₂ O ₂ , transdução de sinais mediada pelo ácido salicílico e resposta a estresse oxidativo	SGN-U212687	1e-137	P30264	1e-27	39
CLEEBA2-2	Precursor de uma β-1,3-endoglucanase básica (<i>L. esculentum</i>)	Metabolismo de carboidratos. Expressa em resposta a <i>Cladosporium fulvum</i> e <i>A. solani</i>	SGN-U212827	0	Q01413	9e-63	25
CLEEBA2-3	pSTH-2 (<i>L. esculentum</i>)	Membro da família de proteínas alergênicas Bet v I	SGN-U212990	1e-152	BAD95797	1e-15	17
CLEEBA2-4	1-Aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (ACC oxidase) (<i>S. tuberosum</i>)	Biossíntese de etileno, expresso em resposta a estresse térmico, fermento e respostas de defesa	SGN-U214919	0	AAK68076	7e-111	10
CLEEBA2-5	Proteína induzida por fermento (WIN) (<i>L. esculentum</i>)	Expresso em resposta a etileno. Alta similaridade a <i>Win1</i> e <i>Wi2</i> .	SGN-U214651	0	AAB49688	4e-74	10
CLEEBA2-6	Quitinase básica da classe I (ChtC1)	Alta similaridade a ChtB; expressa em resposta a <i>P. infestans</i> e etileno. Não é induzida por ácido salicílico.	SGN-U212884	0	AAF25602	2e-81	9
CLEEBA2-7	Proteína homóloga a miraculina (<i>L. esculentum</i>)	Inibidor de proteinase da família dos inibidores de tripsina, induzido pelo nematóide das galhas	SGN-U214150	0	AAC63057	9e-68	6
CLEEBA2-8	pSTH2 (<i>S. tuberosum</i>)	Membro da família de proteínas alergênicas Bet v I; induzida em resposta ao ácido araquidônico	SGN-U214460	1e-63	AAA03019	6e-43	5
CLEEBA2-9	LescPth3 (<i>L. esculentum</i>)	Proteína cinase membro da família do gene de resistência <i>Pto</i>	SGN-U268184	3e-23	-	-	4
CLEEBA2-10	N-hidroxicinamoil-CoA:tiramina transferase THT1-3 (<i>L. esculentum</i>)	Biossíntese de ácido hidroxicinâmico amidas; Expresso em resposta a fitopatógenos	SGN-U213201	0	AAL99189	1e-70	4
CLEEBA2-11	Precursor de uma PR-1 básica (<i>Capsicum annuum</i>)	Expressa em respostas de defesa mediadas por etileno e jasmonato	SGN-U213451	0	AAC06244	3e-66	4
CLEEBA2-12	Precursor de um inibidor de proteinase tipo II CEVI57 (<i>L. esculentum</i>)	Expresso em resposta a virídeos	SGN-U212877	2e-73	CAA64416	8e-22	3
CLEEBA2-13	Precursor de uma endoquitinase básica da classe I (<i>L. esculentum</i>)	Induzida por <i>Cladosporium fulvum</i>	SGN-U212881	0	CAA78845	5e-64	2
CLEEBA2-14	Proteína PR-5 (Osmotina) (<i>L. esculentum</i>)	Resposta a estresse osmótico e bactérias fitopatogênicas	SGN-U213935	1e-159	AAP43673	2e-17	2
LEEBA213D11	Lipoxygenase POTLX-3 (<i>S. tuberosum</i>)	Expressa em resposta a etileno, metil jasmonato e <i>Phytophthora infestans</i>	SGN-U212785	0	AAB67865	1e-70	1
II. Regulação da transcrição							
CLEEBA2-15	Fator de transcrição RMA1 (<i>Capsicum annuum</i>)	Induzida em resposta a estresse hídrico	SGN-U217504	0	AAR99376	8e-55	11
CLEEBA2-16	Fator responsivo a etileno 4 (ERF-4) (<i>L. esculentum</i>)	Sinalização mediada por etileno; Fator de transcrição relacionado com patogênese	SGN-U221152	5e-44	-	-	2

Tabela 2- Continuação

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº. ESTs
LEEBA214E08	Proteína pcp1(<i>S. tuberosum</i>)	Membro da família de proteínas que contém dedos de zinco do tipo C2H2	SGN-U237253	1e-117	-	-	1
LEEBA215H09	Provável fator de transcrição MADS16 (<i>S. tuberosum</i>)	Envolvido na regulação do desenvolvimento floral	SGN-U217966	1e-161	AAV65507	9e-45	1
III. Transdução de sinais							
CLEEBA2-17	Proteína-G monomérica SGP1 (<i>A. thaliana</i>)	Membro da família de proteínas de ligação a GTP. envolvida em transdução de sinais e transporte de proteínas	SGN-U279033	1e-144	BAB08763	2.4e-43	9
CLEEBA2-18	Proteína serina/treonina cinase (<i>A. thaliana</i>)	Atividade serina/treonina cinase; similar ao receptor cinase SFR2	SGN-U241798	0	-	-	4
CLEEBA2-19	Sensor cálcio similar a calcineurina B (<i>L. esculentum</i>)	Interage com serina/treonina cinase	SGN-U291204	1e-105	CAG30525	9e-14	2
LEEBA212C09	Proteína de ligação ao cálcio (<i>A. thaliana</i>)	Possivelmente participa na estocagem de Ca no retículo endoplasmático e sarcoplásmico; transdução de sinais	SGN-U214876	0	NP200987	6e-52	1
LEEBA214F11	At1g05000 (<i>A. thaliana</i>)	Juntamente com proteínas cinases controlam o estado de fosforilação de proteínas na célula	SGN-U273303	1e-73	-	-	1
IV. Resposta a estresse							
CLEEBA2-20	Proteína 'heat shock' 70 (<i>Oryza sativa</i>)	Resposta a calor e choque térmico	SGN-U213202	1e-180	-	-	15
CLEEBA2-21	Proteína expressa tardiamente na embriogênese (Lea5) (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Resposta a frio e espécies de oxigênio reativo	SGN-U213707	2e-75	-	-	9
CLEEBA2-22	Proteína rica em glicina (<i>Nicotiana glauca</i>)	Expresso em células guarda, induzidas sob condições de seca	SGN-U217302	1e-138	-	-	2

4.1.2. Análise da biblioteca subtrativa 36h e classificação dos ESTs identificados

Foram seqüenciados 960 clones, sendo obtidas 832 seqüências de qualidade (phred > 20) e tamanho médio de 470 pb. A análise de similaridade das seqüências encontradas com seqüências depositadas em bases de dados seguiu o mesmo procedimento adotado para a biblioteca 24h. Com isso, foi possível a identificação de 542 genes potenciais únicos (Tabela 3). Entre os contigs relacionados com genes de defesa da planta representados pelo maior número de ESTs está o contig CLEEBA3-1 contendo 15 ESTs, o qual apresenta 99% de identidade ao gene que codifica a PR-1 p1-p14 expressa em resposta a etileno (Tornerio et al., 1993). Tal como na biblioteca 24h apresentam maior número de ESTs, contigs com similaridade a β -1,3-endoglucanase básica, quitinase básica da classe I (ChtC1), pSTH2 e catalase isozima 1.

Relacionados com regulação da transcrição foi identificado o contig CLEEBA3-31 com 100% de identidade com o gene que codifica o fator de transcrição ERF-1 envolvido em respostas de defesa a patógenos necrotróficos (Lorenzo, et al., 2003). Em menor freqüência foram encontrados ESTs correspondentes a 3 possíveis genes que codificam fatores de transcrição da família WRKY, além de diversos ESTs com similaridade a membros da família Myb. Envolvidos em transdução de sinais foram identificados ESTs com similaridade a calmodulinas, transducinas, proteínas relacionadas a Ras-GTP, além de diversas cinases como caseína cinase e RLK1. Foram identificados ainda ESTs representando genes que codificam inibidores de proteinases como *LeMir*, expresso em resposta a nematóides formadores de galhas (Brenner et al., 1998) além de uma série de ESTs correspondentes a genes envolvidos em respostas a estresse como 'heat shock' e aldolase. Tal como na biblioteca 24h, observa-se nesta biblioteca a presença de ESTs representando genes regulados pelo etileno e AJ e também genes regulados pelo AS, todavia com o predomínio de genes regulados pelo ET e AJ. Comparando-se os possíveis genes relacionados com defesa encontrados nas duas bibliotecas, verificou-se que somente 7 genes encontrados na biblioteca 24h não foram encontrados na biblioteca 36. Foram identificadas ainda nas duas bibliotecas

analisadas 15 seqüências únicas que não apresentaram similaridade a seqüências depositadas nas bases de dados consultadas.

A classificação dos ESTs encontrados nas bibliotecas 24h e 36h revela que 23% deles representam genes relacionados com a defesa da planta (Figura 2). Observa-se ainda que ESTs representando genes não caracterizados e não depositados somam 16% do total, o que representa uma importante possibilidade de identificação de novos genes possivelmente relacionados com resistência a *A. solani*.

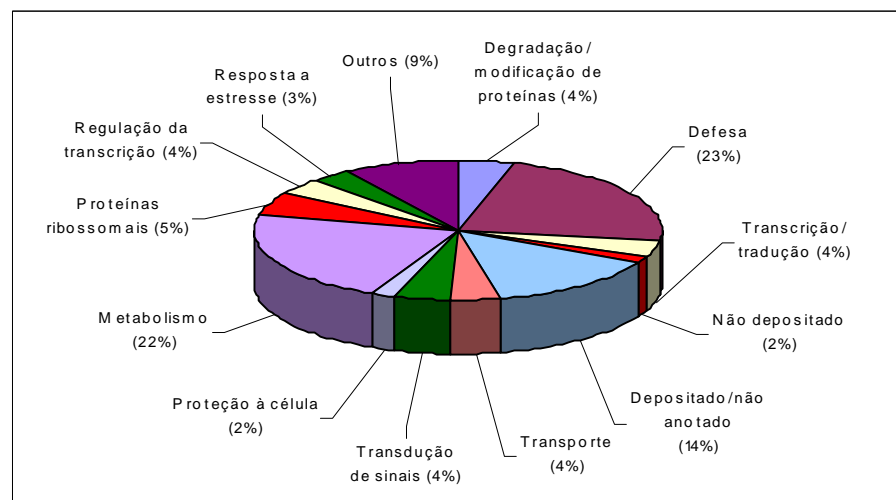


Figura 2- Classificação funcional dos ESTs encontrados em duas bibliotecas subtrativas da interação tomateiro – *Alternaria solani* construídas 24 e 36 hai. A classificação foi realizada com base na similaridade com seqüências depositadas nos bancos de dados NCBI e SGN utilizando os algoritmos Blastn e Blastx.

Tabela 3 - ESTs identificados na biblioteca subtrativa da interação tomateiro - *A. solani* construída a partir de mRNA isolado de folhas coletadas 36 hai.

Contig/ Clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº ESTs
I. Defesa/resposta a patógeno							
CLEEBA3-1	PR-1 básica (p1-p14) (<i>L. esculentum</i>)	Expressa em respostas de defesa mediadas por etileno	SGN-U212922	0	CAA48672	0	15
CLEEBA3-2	Precursor de uma β -1,3-endoglucanase básica (<i>L. esculentum</i>)	Atividade hidrolase, metabolismo de carboidratos. Expressa em resposta a <i>C. fulvum</i> e <i>A. solani</i>	SGN-U212827	0	Q01413	2e-63	13
CLEEBA3-3	Quitinase básica classe I (ChtC1) (<i>S. tuberosum</i>)	Alta similaridade a ChtB; expressa em resposta a <i>P. infestans</i> e etileno. Não é induzida por ácido salicílico.	SGN-U212884	0	AAF25602	1e-81	11
CLEEBA3-4	pSTH-2 (<i>S. tuberosum</i>)	Membro da família de proteínas alergênicas Bet v I; Induzida em resposta ao ácido araquidônico	SGN-U214460	1e-163	AAA03019	4e-47	9
CLEEBA3-5	pSTH-2 (<i>L. esculentum</i>)	Membro da família de proteínas alergênicas Bet v I	SGN-U212990	1e-151	BAD95797	1e-15	6
CLEEBA3-6	Proteína induzida por ferimento (WIN) (<i>L. esculentum</i>)	Expresso em resposta a etileno. Alta similaridade a Win1 e Win2.	SGN-U214651	1e-159	AAB49688	2e-30	5
CLEEBA3-7	Catalase isozima 1 (<i>L. esculentum</i>)	Metabolismo de H ₂ O ₂ , transdução de sinais mediada pelo ácido salicílico e resposta a estresse oxidativo	SGN-U212687	0	P30264	6e-27	4
CLEEBA3-8	Possível Acil-CoA sintetase (<i>Capsicum annuum</i>)	Metabolismo de ácidos graxos e acetil-CoA. Expressa em resposta a <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Vesicatoria</i>	SGN-U212621	0	AAL29212	2e-80	4
CLEEBA3-9	Peroxidase CEVI-1 (<i>L. esculentum</i>)	Expresso em resposta a vírus, ferimento e estresse oxidativo	SGN-U269460	0	CAB67121	4e-72	4
CLEEBA3-10	Precursor de uma PR-1 básica (<i>Capsicum annuum</i>)	Expressa em respostas de defesa mediadas por etileno e jasmonato	SGN-U213451	1e-117	AAC06244	9e-16	4
CLEEBA3-11	Precursor de uma proteinase aspártica induzida por ferimento (<i>L. esculentum</i>)	Proteína induzida por ferimento e pela aplicação de metil jasmonato, também envolvida na biossíntese de lipídeos	SGN-U215988	1e-105	-	-	4
CLEEBA3-12	Aminotransferase 2 (<i>Cucumis melo</i>)	Apresenta atividade alanina-glioxiato transaminase; Relacionada à resistência a <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	SGN-U213530	0	AAQ56195	2e-62	3
CLEEBA3-13	Lipoxygenase POTLX-3 (<i>S. tuberosum</i>)	Expressa em resposta a etileno, metil jasmonato e <i>Phytophthora infestans</i>	SGN-U212785	0	AAB67865	1e-73	3
CLEEBA3-14	Proteína homóloga a miraculina (<i>L. esculentum</i>)	Inibidor de proteinase da família dos inibidores de tripsina, induzido pelo nematóide das galhas	SGN-U214150	0	AAC63057	2e-87	3
CLEEBA3-15	PR-4- Quitinase (P2) (<i>L. esculentum</i>)	Similar a proteína antifúngica de ligação a quitina heveína. Expressa em resposta a fungos e etileno	SGN-U214985	0	CAA41439	3e-57	3
CLEEBA3-16	Precursor de uma β -1,3-endoglucanase básica (<i>L. esculentum</i>)	Atividade hidrolase, metabolismo de carboidratos e resposta a patógenos	SGN-U232145	0	Q01413	1.6e-71	3
CLEEBA3-17	Lipoxygenase loxC (<i>L. esculentum</i>)	Biossíntese de lipídeos, ácidos graxos e ácido jasmônico	SGN-U214851	0	CAA05280	3e-112	3
CLEEBA3-18	Aminociclopropano carboxilato oxidase 1 (ACC oxidase 1) (<i>L. esculentum</i>)	Biossíntese de etileno. Expressa durante o amadurecimento e em resposta a ferimento	SGN-U212786	1e-177	CAA41212	1e-16	3
CLEEBA3-19	Gene induzido por ferimento Win (<i>N. tabacum</i>)	Proteína de ligação à quitina, induzida por ferimento e apresenta atividade antifúngica <i>in vitro</i>	SGN-U217170	0	BAA95791	8e-05	3

Tabela 3 - Continuação

Contig/ Clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI		Nº. ESTs
CLEEBA3-20	Precursor de uma endoquitinase ácida de 26 kDa (<i>L. esculentum</i>)	Envolvida em respostas de resistência dependente de ácido jasmônico e etileno	SGN-U213790	0	Q05539	2e-149	2
CLEEBA3-21	β -1,3 glucanase básica (<i>L. esculentum</i>)	Degradação de glucanas na parede celular de fungos; expresso em resposta a viróide	SGN-U214527	0	CAA52872	9e-68	2
CLEEBA3-22	Ácido cinâmico 4-hidrolase (<i>Capsicum annuum</i>)	Biossíntese de fenilpropanóides, resposta a ferimento; transporte de elétrons	SGN-U213270	0	AAG43824	2e-92	2
CLEEBA3-23	Fenilalanina amônia-liase (PAL) (<i>L. esculentum</i>)	Síntese de flavonóides, fitoalexinas e compostos de parede celular	SGN-U212958	0	P26600	2e-131	2
CLEEBA3-24	Proteína similar catepsina cisteína proteinase (<i>Nicotiana rustica</i>)	Atividade peptidase, expressa em resposta a ferimento	SGN-U213144	0	CAA57522	1e-47	2
CLEEBA3-25	Catalase isozima 2 (<i>L. esculentum</i>)	Metabolismo de H ₂ O ₂	SGN-U213634	0	Q9XHH3	7e-84	2
CLEEBA3-26	Proteína de ligação ao Cálcio associada a reações de HR (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Expresso em resposta <i>P. syringae</i> pv. tabaci e pv. phaseolicola e ao vírus da necrose do tabaco	SGN-U220721	1e-136	AAD47213	3e-09	2
LEEBA307E03	Fosfolipídeo hidroperóxido glutadione peroxidase (<i>L. esculentum</i>)	Catalisa a redução de hidroperóxidos	SGN-U216797	1e-143	AAP59427	5e-18	1
LEEBA307E05	Proteína de ligação a calmodulina TCB60 (<i>N. tabacum</i>)	Envolvida em resposta de defesa a fitopatógenos	SGN-U217407	0	AAB37246	2e-39	1
LEEBA307F01	Possível proteína de resistência a doenças (<i>A. thaliana</i>)	Envolvida em resposta a doenças e transdução de sinais	SGN-U214430	1e-122	AAM60932	7e-05	1
LEEBA307C01	NtEIG-A1 (<i>N. tabacum</i>)	Apresenta similaridade a uma estelacianina	SGN-U215639	1e-153	BAB16429	9.6e-49	1
LEEBA307H08	Semelhante a proteína que causa mancha foliar letal (<i>L. esculentum</i>)	Apresenta atividade oxirredutase, relacionada com a formação de HR	SGN-U216273	1e-179	AAL32300	4e-58	1
LEEBA308H07	Proteína 14-3-3 (<i>L. esculentum</i>)	Liga-se a proteínas contendo motivos fosfotreonina ou fosfoserina e também a fusicoccina (FC)	SGN-U213762	0	-	-	1
LEEBA309B01	Proteína desconhecida (<i>A. thaliana</i>)	Resposta a estresse oxidativo e a bactérias fitopatogênicas mediada pelo ácido jasmônico e etileno	SGN-U233192	0	NP849739	1.8e-08	1
LEEBA309B02	Proteína SRE1a (<i>S. tuberosum</i>)	Relacionada com Resistência Sistêmica Adquirida	SGN-U212951	1e-171	7489276	9.5e-14	1
LEEBA311A12	Acil-dessaturase (<i>Ricinus communis</i>)	Biossíntese de lipídeos, ácidos graxos e ácido jasmônico	SGN-U196870	0	CAA39859	4e-64	1
LEEBA311C09	Proteína induzida por mosca branca gp91-phox (<i>L. esculentum</i>)	Induzida em resposta a insetos e ataque de patógenos, envolvida no acúmulo de espécies de oxigênio reativo	SGN-U214217	0	AAF73124	8e-72	1
LEEBA311D10	Ascorbato peroxidase (<i>S. tuberosum</i>)	Expresso em resposta a ROS	SGN-U213036	0	BAC22953	1.5e-83	1
LEEBA322B08	Proteína WIN2 (<i>S. tuberosum</i>)	Similar a proteína de ligação a quitina antifúngica, expressa em resposta a etileno	SGN-U271959	3e-75	CAA31852	4e-63	1
LEEBA322G06	Precursor de um inibidor de proteinase tipo II CEVI57 (<i>L. esculentum</i>)	Expresso em resposta a viróide	SGN-U212876	1e-42	CAA64416	5e-11	1
LEEBA322H02	1-Aminocicloprapano-1-carboxilato oxidase (<i>S. tuberosum</i>)	Biossíntese de etileno, expresso em resposta a estresse térmico, ferimento e respostas de defesa	SGN-U214919	0	AAK68076	4e-85	1
LEEBA322H04	Proteína 14-3-3 (<i>L. esculentum</i>)	Liga-se a proteínas contendo motivos fosfotreonina	SGN-U213930	0	AAL04425	3e-81	1
LEEBA323B05	Proteína 2 de ligação ao ácido salicílico (<i>N. tabacum</i>)	Lipase estimulada por AS que produz sinais derivados de lipídeos	SGN-U216161	0	AAR87711	6e-31	1

Tabela 3 - Continuação

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI		Nº. ESTs
LEEBA324F09	Possível aminotransferase AGD2 (<i>O. sativa</i>)	Sintetiza uma molécula derivada de aminoácidos que promove o desenvolvimento e suprime respostas de defesa	SGN-U292600	6e-49	AAR01225	7e-44	1
LEEBA324F11	Proteína rica em P NtEIG-C29 (<i>N. tabacum</i>)	Envolvida em resposta a estresse e a fitopatógenos	SGN-U213037	1e-156	BAB16431	3e-18	1
LEEBA324H09	Possível inibidor de xiloglucanase (<i>S. tuberosum</i>)	Envolvido com resistência contra <i>P. infestans</i> em batata	SGN-U213868	1e-174	AAP84703	7e-29	1
LEEBA325B09	Vacuolar enzima-3 (<i>N. tabacum</i>)	Envolvida em HR e resposta a Vírus	SGN-U214499	0	BAC54830	2e-83	1
LEEBA325F08	Possível proteína da família Mob1/foceina (<i>Solanum bulbocastanum</i>)	Envolvido em resistência à <i>P. infestans</i>	SGN-U214897	0	AAP45162	2e-59	1
LEEBA325G11	Ascorbato peroxidase (<i>Capsicum annuum</i>)	Resposta de HR a <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Vesicatoria</i>	SGN-U214077	0	AAL35365	6e-57	1
II. Regulação da transcrição							
CLEEBA3-27	Proteína relacionada 'speckle-type' POZ (<i>A. thaliana</i>)	Pode se ligar a regiões promotoras ou a 'enhancers'	SGN-U217190	0	NP201121	1e-101	4
CLEEBA3-28	Similar a proteína regulatória "Scarecrow" (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Possível fator de transcrição	SGN-U240024	0	-	-	2
CLEEBA3-29	Possível fator de transcrição da família bHLH (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de ligação ao DNA contendo um domínio hélice-loop-hélice	SGN-U215326	0	AAM64276	5e-55	2
CLEEBA3-30	Membro da família de fatores de transcrição ERF/AP2 (<i>A. thaliana</i>)	Alguns membros desta família como DREB2A e DREB2B estão envolvidos em resposta a seca	SGN-U218297	1e-108	NP177681	3e-07	2
CLEEBA3-31	Fator de resposta a etileno 1 (ERF-1) (<i>L. esculentum</i>)	Fator de transcrição envolvido na rota de sinalização mediada pelo jasmonato e etileno	SGN-U219135	0	AAK95688	5e-42	2
CLEEBA3-32	Membro da família de proteínas contendo dedos de Zn tipo DNL (<i>A. thaliana</i>)	-	SGN-U218529	0	NP198080	7e-45	2
CLEEBA3-33	Fator de transcrição Myb1 (<i>Malus xiaojinensis</i>)	-	SGN-U212597	1e-104	-	-	2
CLEEBA3-34	Proteína contendo domínio de ligação metil-CpG (<i>A. thaliana</i>)	Correlacionada com metilação do DNA	SGN-U214069	0	-	-	2
CLEEBA3-35	Proteína contendo domínio de ligação ao DNA ARID/BRIGHT (<i>A. thaliana</i>)	Atividade de fator de transcrição	SGN-U225875	1e-156	-	-	2
LEEBA306A04	Membro da família Myb de proteínas de ligação ao DNA (<i>L. esculentum</i>)	Fator de transcrição que pertence a família contendo domínio SANT que reconhece especificamente a seqüência YAAC(G/T)G	SGN-U219745	1e-125	-	-	1
LEEBA306E03	Proteína específica de frutos (<i>L. esculentum</i>)	Pertence a família de proteínas contendo dedos de zinco do tipo C3HC4	SGN-U212581	0	-	-	1
LEEBA306H03	Proteína contendo dedos de zinco tipo C2H2 (<i>A. thaliana</i>)	Fator de transcrição	SGN-U240816	0	NP174697	1e-18	1
LEEBA307A08	Constans 1 (<i>L. esculentum</i>)	Possível fator de transcrição	SGN-U217089	0	AAS67377	1e-22	1
LEEBA308B04	Proteína 'Heat shock' fator HSF24 (<i>L. peruvianum</i>) -	Regula a expressão de proteínas 'Heat shok', expressa em resposta a choque por calor	SGN-U222126	0	P22335	7.2e-69	1
LEEBA308D03	Proteína de ligação ao DNA NtWRKY3 (<i>N. tabacum</i>)	Fator de transcrição	SGN-U215729	0	BAA77358	5e-09	1

Tabela 3 - Continuação

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI		Nº. ESTs
LEEBA308E08	Fator de transcrição BTF3 (<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>)	Fator de transcrição	SGN-U213317	2e-95	CAA70323	1e-24	1
LEEBA308H12	Proteína 15 contendo domínio MADS (Petúnia híbrida)	Fator de transcrição	SGN-U215264	0	AAQ72500	7e-06	1
LEEBA309E03	Proteína de ligação ao DNA WRKY4 (<i>N. tabacum</i>)	Envolvida na regulação de programas fisiológicos, incluindo defesa a patógenos e senescência	SGN-U213637	1e-168	AAF61864	4e-10	1
LEEBA309F10	Fator transcricional Myb1 (<i>Malus xiaojinensis</i>)	Fator transcricional	SGN-U212596	1e-171	AAO45179	1e-04	1
LEEBA310B04	Proteína homeótica VAHOX1 (<i>L. esculentum</i>)	Ativador transcricional envolvido no desenvolvimento da folha	SGN-U213417	0	CAA64417	9e-34	1
LEEBA310H03	Proteína da família BRH1 contendo dedos de Zn do tipo C3HC (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de ligação ao DNA que responde a brassinosteróides	SGN-U228968	1e-160	NP191705	4e-32	1
LEEBA311B09	Proteína contendo domínio NAC2 (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Fator de transcrição expresso nos primórdios florais	SGN-U213218	0	AAK84884	9e-52	1
LEEBA311G07	Possível proteína contendo zíper de leucina (<i>Gossypium hirsutum</i>)	Proteína de ligação ao DNA e ao íon cobre	SGN-U213473	0	AAR20445	2e-38	1
LEEBA322D04	Proteína de ligação a DNA (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de ligação a Zn envolvida em sinalização intracelular	SGN-U282344	6e-52	-	-	1
LEEBA322E10	Proteína hipotética SENU5 (<i>L. esculentum</i>)	Proteína associado à senescência; atividade de fator de transcrição	SGN-U214846	0	CAA99760	3e-91	1
LEEBA322F12	Fator transcricional KNAT3 (<i>A. thaliana</i>)	Resposta à luz	SGN-U224750	1e-109	-	-	1
LEEBA323D08	Fator de transcrição da família myb tubérculo específico (<i>S. tuberosum</i>)	Responde a sacarose	SGN-U217060	0	AAG08959	1e-39	1
LEEBA324C01	Proteína contendo dedos de Zn similar a AN1 (<i>O. sativa</i>)	Proteína de ligação ao DNA	SGN-U216216	0	AAQ84334	2e-28	1
LEEBA325A10	Possível fator de transcrição WRKY fator 30 (<i>Vitis aestivalis</i>)	Membro dos fatores de transcrição WRKY, grupo III. Identificado em uma cultivar nativa de uva resistente a doenças	SGN-U212725	0	AAR92477	3e-14	1
LEEBA325B03	Proteína relacionada a myb TMH27 (<i>L. esculentum</i>)	Reprime a expressão de genes como o que codifica uma cinamato 4-hidroxilase	SGN-U215971	0	CAA64614	2e-22	1
LEEBA325D12	Proteína relacionada a tropomiosina (<i>A. thaliana</i>)	Regulação da transcrição	SGN-U215617	0	NP199627	1e-35	1
LEEBA325G01	Similar a proteína de ligação ao DNA Myb1 (<i>Petroselinum crispum</i>)	Atividade fator de transcrição	SGN-U286245	7e-92	AAL73438	1e-30	1
III. Transdução de sinais							
CLEEBA3-36	Possível caseína cinase I (<i>A. thaliana</i>)	Tem atividade serina/treonina cinase, envolvida em metabolismo e diferenciação	SGN-U217559	0	AAV24543	3e-04	2
CLEEBA3-37	Proteína relacionada a Ras-GTP Rab11D (<i>N. Tabacum</i>)	Possui domínios de ligação e hidrólise de GTP Envolvida em transdução de sinais mediada por GTPase	SGN-U217122	0	Q40522	8e-72	2
CLEEBA3-38	Proteína contendo domínio C2 (<i>A. thaliana</i>)	Contém domínio C2, possivelmente envolvida na ligação a fosfolípidos dependente de Ca	SGN-U221231	1e-169	NP177499	3e-33	2

Tabela 3 - Continuação

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº. ESTs
CLEEBA3-39	Proteína relacionada a cinase Ntk-1 (<i>N. tabacum</i>)	Atividade serina/treonina cinase envolvido na organização do meristema	SGN-U213449	1e-150	CAA54803	5e-46	2
LEEBA306D12	Proteína 1 relacionada a p27KIP1 (<i>L. esculentum</i>)	Regulação negativa de ciclina depende de atividade cinase	SGN-U219425	4e-94	-	-	1
LEEBA306A11	Fator 3 de ADP-ribosilação (ARF3) (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de ligação a GTP	SGN-U218886	0	NP850057	3e-34	1
LEEBA306B02	Membro da família das proteínas cinases (<i>A. thaliana</i>)	Atividade serina/treonina cinase; fosforilação de aminoácidos em proteínas	SGN-U241723	0	NP173910	9e-59	1
LEEBA306C02	Possível Proteína cinase (<i>Oryza sativa</i>)	Similar a cinase 6 de soja, atividade serina/treonina e tirosina cinase	SGN-U242722	0	NP916100	4e-24	1
LEEBA306E07	Proteína expressa (<i>A. thaliana</i>)	Apresenta atividade serina/treonina cinase	SGN-U221604	0	AAK44094	2e-36	1
LEEBA306H08	Cálcio/Calmodulina dependente de proteína cinase CaMK3 (<i>N. tabacum</i>)	Atividade fosfotransferase	SGN-U223966	0	AAL30820	8e-61	1
LEEBA307G11	Adenilato cinase, (ATP-AMP transfosforilase) (<i>S. tuberosum</i>)	Proteína de ligação a ATP envolvida na biossíntese de aminoácidos e de nucleotídeos possui atividade fosfotransferase	SGN-U214214	0	AAN76661	3e-100	1
LEEBA307A04	Possível proteína de ligação a esteróides (<i>A. thaliana</i>)	Envolvida em transdução de sinais - receptor	SGN-U216910	1e-160	1J03A	2e-23	1
LEEBA307D08	Proteína expressa (<i>A. thaliana</i>)	Possível proteína cinase transmembrana contendo repetições ricas em leucina	-	-	NP172169	2e-24	1
LEEBA307G01	Proteína da família fosfatase 2C (<i>Medicago sativa</i>)	Específica para serina/treonina	SGN-U228640	1e-112	AAV73837	2e-05	1
LEEBA307G05	Fosfatase (<i>Fagus sylvatica</i>)	Atividade serina/treonina fosfatase	SGN-U225194	1e-136	CAC11128	4e-42	1
LEEBA308A03	Similar a proteína de ativação de GTPase (<i>Malus domestica</i>)	Contem domínio C2 encontrado em proteínas envolvidas em transdução de sinais e tráfego de membrana	SGN-U271745	3e-57	AAQ54568	5e-17	1
LEEBA308B09	Possível calmodulina (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de ligação ao Cálcio	SGN-U216339	0	NP187630	9e-20	1
LEEBA308C12	Proteína similar à caseína cinase (<i>A. thaliana</i>)	Envolvida em metabolismo e diferenciação	SGN-U234305	6e-67	-	-	1
LEEBA308D06	Possível serina/treonina cinase (<i>A. thaliana</i>)	-	SGN-U218754	0	NP564955	1e-51	1
LEEBA308G06	Possível calmodulina (<i>O. sativa</i>)	Proteína de ligação ao cálcio, envolvida em sinalização celular	SGN-U212854	1e-146	XP475464	8e-34	1
LEEBA310C09	Proteína relaciona a Ras RAB8-1 (<i>N. tabacum</i>)	Proteína de ligação a GTP envolvida no sistema de transdução de sinais de 2 componentes	SGN-U213620	1e-177	BAB84322	4.9e-96	1
LEEBA310D12	Proteína da família MATE (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de fosfolípidos, atividade diacilglicerol cinase e transporte de moléculas através da membrana	SGN-U215961	0	NP849854	2e-17	1
LEEBA310E08	Possível receptor-S-cinase (<i>O. sativa</i>)	Membro da família lecitina cinase, possui atividade serina/treonina cinase	SGN-U275773	2e-08	XP478672	1e-53	1
LEEBA311B07	Diacil glicerol cinase (<i>A. thaliana</i>)	Inibidora de metaloendopeptidase	SGN-U273302	1e-117	AAD08942	2e-28	1
LEEBA322C11	Proteína da família cinase (<i>A. thaliana</i>)	Atividade serina/treonina cinase	SGN-U217215	0	NP194928	3e-34	1
LEEBA322D02	Possível proteína de ligação a oligouridilato (<i>A. thaliana</i>)	Receptor	SGN-U214377	1e-92	-	-	1
LEEBA323D10	Regulador tipo B (<i>Catharanthus roseus</i>)	Sinalização mediada por citoquinina (CK)	SGN-U216660	1e-103	-	-	1

Tabela 3 - Continuação

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI		Nº. ESTs
LEEBA323E02	Caseína cinase II subunidade α (<i>N. tabacum</i>)	Atividade serina/treonina cinase	SGN-U213918	1e-155	CAD26882	6e-39	1
LEEBA323E09	Proteína cinase dependente de Ca - CDPK (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de ligação ao Ca, com atividade serina treonina cinase	SGN-U212665	1e-116	-	-	1
LEEBA324B04	Possível proteína cinase (<i>O. sativa</i>)	Atividade serina/treonina cinase e tirosina cinase	SGN-U215637	0	NP186798	4e-51	1
LEEBA324B08	Serina/treonina proteína cinase (<i>O. sativa</i>)	Expressa em resposta a <i>M. grisea</i> e fermento	SGN-U222051	0	AAO48744	2e-38	1
LEEBA324D12	Possível proteína 3 de ligação ao receptor cinase Xa21 (<i>O. sativa</i>)	Atividade ubiquitina ligase e de ligação ao Zn	SGN-U227717	0	XP468209	8e-06	1
LEEBA324F01	Proteína da família transducina/WD-40 (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de ligação a nucleotídeos, transporte de proteínas	SGN-U220898	1e-132	-	-	1
LEEBA324F05	GTP ciclodrolase II (<i>L. esculentum</i>)	Biossíntese de riboflavina e sinalização celular	SGN-U217376	0	CAA05308	2e-55	1
LEEBA324G12	Possível proteína cinase (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de ligação a ATP com atividade serina/treonina cinase	SGN-U220154	0	NP199586	4e-47	1
LEEBA325A03	Proteína expressa (<i>A. thaliana</i>)	Similar ao fator de alcalinização RALF – envolvido em sinalização célula-célula	SGN-U217526	1e-106	-	-	1
IV. Resposta a estresse							
CLEEBA3-40	Proteína 'heat shock' (<i>L. esculentum</i>)	Resposta a choque térmico e algumas evidências de atuar na desagregação de cadeias de clatrina	SGN-U274639	1e-141	AAA86424	3e-35	4
CLEEBA3-41	Homólogo a proteínas expressas tardiamente na embriogênese (Lea 5) (<i>L. esculentum</i>)	São induzidas por calor, auxinas, etileno e fermentos; apresenta homologia com proteínas heat shok	SGN-U212930	0	AAA86424	9e-30	3
CLEEBA3-42	Proteína rica em glicina (<i>Nicotiana glauca</i>)	Expresso em células guarda, induzidas sob condições de seca	SGN-U217302	1e-174	-	-	3
CLEEBA3-43	Protein 'heat shock' 70 (<i>Oryza sativa</i>)	Resposta a calor e choque térmico	SGN-U213202	1e-175	-	-	3
LEEBA306B10	Proteína expressa tardiamente na embriogênese (Lea5) (<i>N. tabacum</i>)	Resposta a frio e espécies de oxigênio reativo	SGN-U213706	1e-118	-	-	1
LEEBA307H12	Proteína 'Heat shock' 80 (<i>L. esculentum</i>)	Induzida por IAA e NaCl, não induzida por calor	SGN-U212641	0	P36181	1.2e-59	1
LEEBA308F08	Arginina descarboxilase (<i>N. tabacum</i>)	Envolvida na rota biossintética da poliamina em resposta a estresse osmótico	SGN-U213123	1e-151	BAD06581	5e-09	1
LEEBA310A09	Proteína 3 de tolerância a sal (<i>Beta vulgaris</i>)	-	SGN-U221208	0	CAC85244	2.8e-18	1
LEEBA323A11	Aldolase plastídica NPALDP1 (<i>N. paniculata</i>)	Expresso em resposta a estresse salino	SGN-U212700	0	BAA77604	8e-92	1
LEEBA324H12	Possível proteína contendo repetições ricas em leucina (<i>Populus deltoids</i>)	Expresso em resposta a Ozônio	SGN-U221775	0	CAG27615	2e-25	1
LEEBA325D08	Precursor da proteína LTP 2 (<i>L. esculentum</i>) -	Transporte de lipídeos, expressa durante a germinação, após tratamento com NaCl e choque térmico	SGN-U232089	3e-91	-	-	1
V. Parede celular							
CLEEBA3-51	Proteína hipotética (<i>Glycine max</i>)	Provável constituinte estrutural de parede celular	SGN-U217209	0	BAB41197	2e-14	2
LEEBA306D02	Pectina metilesterase (<i>L. esculentum</i>)	Exerce importante função no metabolismo da parede celular	SGN-U213794	0	AAL02367	9e-61	1
LEEBA307E02	Cafeoil-CoA O-metiltransferase (<i>S. tuberosum</i>)	Biossíntese de lignina	SGN-U232762	1e-138	-	-	1
LEEBA308H03	Proteína expressa (<i>A. thaliana</i>)	Possível constituinte estrutural de parede celular	SGN-U212830	0	NP187955	1e-29	1
LEEBA325E09	Antranilato sintase subunidade α (<i>Ruta graveolens</i>)	Biossíntese e metabolismo de aminoácidos, biossíntese de lignina	SGN-U225275	0	AAA74900	7e-77	1

4.2. Análise de expressão gênica por PCR em tempo real (RT-qPCR)

Foram testados seis genes frequentemente utilizados como controles endógenos em análises de expressão por RT-qPCR (Tabela 1). Verificou-se que os genes APT1 e Actina 2 apresentaram menor alteração no nível de expressão entre tratamentos além de satisfatória eficiência de amplificação (E = 87 e 89% respectivamente). Assim, estes genes foram os controles selecionados para análise de expressão gênica.

A partir das bibliotecas subtrativas supracitadas foram selecionados quarenta genes candidatos para análise de expressão. Adotou-se como critério, a escolha de genes relacionados com resistência descritos em outros patossistemas, a maioria dos quais representados mais de uma vez nas bibliotecas. Foram selecionados também genes não caracterizados que estiveram representados mais de uma vez nas bibliotecas. Os oligonucleotídeos correspondentes a estes genes tiveram sua especificidade de amplificação avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose e por meio da curva de dissociação (Figura 3). Aqueles que geraram amplicons inespecíficos não foram utilizados. Todos os oligonucleotídeos utilizados na análise de expressão apresentaram eficiência de amplificação acima de 80%, gerando um amplicon com tamanho entre 55-76pb.

A análise de expressão dos 40 genes selecionados foi realizada nos dosséis inferior e superior das plantas. Deste total, observou-se que 16 genes (40%) foram diferencialmente expressos em resposta a inoculação por *A. solani* (Tabela 4; Figura 5). Entre estes, genes que codificam para proteínas PRs compõe o maior grupo, sendo representado por 6 membros. Sendo eles uma possível PR-1 básica, com maior similaridade a proteína PR-1 P1-P14 induzida por etileno (Tornero et al., 1993); β -1,3-endoglucanase básica (van Kan et al., 1992); quitinase básica da classe I (Ancillo et al., 1999); um possível membro da família *win* ('wound induced') que codifica para uma proteína contendo um domínio rico em cisteína encontrado em quitinases da classe I (Harris et al., 1997); e dois genes que codificam duas possíveis isoformas do gene *pSTH-2*. O posicionamento dos oligonucleotídeos em regiões únicas de cada isoforma de *pSTH2* assegura que o padrão de expressão observado é específico (Figura 4).

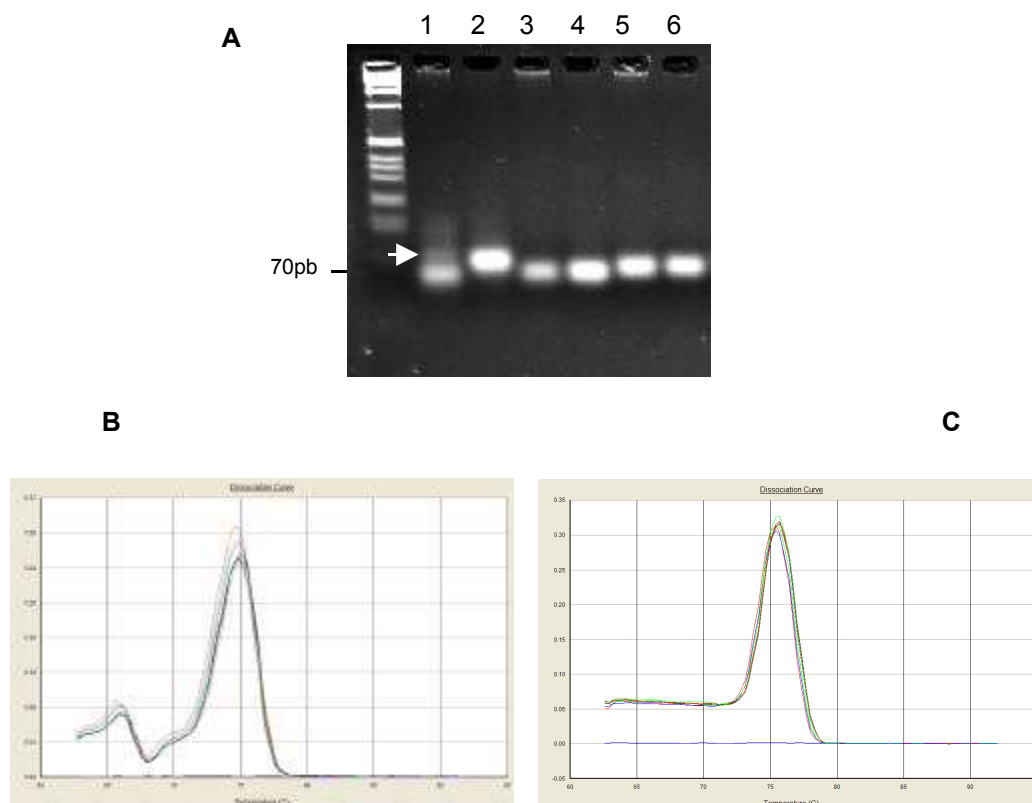


Figura 3 – Especificidade de amplificação dos oligonucleotídeos utilizados na análise de expressão gênica por RT-qPCR. A – Eletroforese em gel de agarose 3,5% dos produtos da PCR. Na canaleta 1 os oligonucleotídeos utilizados para analisar a expressão do gene *pSTH2* amplificaram mais de um amplicon. Nas canaletas 2-6 observa-se que os oligonucleotídeos utilizados amplificaram apenas um amplicon. B – Curva de dissociação contendo 2 picos, indicando a ocorrência de amplificação de mais de um amplicon. C - Presença de um único pico de dissociação na curva indicando a amplificação de um único amplicon.

Foi observado também, a indução de um gene com similaridade ao gene *LeMir* (*L. esculentum* miraculina), o qual é um inibidor de proteinases com homologia a miraculinas (Brenner et al., 1998); *NtEIG-A1* (*N. tabacum* elicitor-inducible gene), que codifica uma fitocianina, possivelmente envolvida com formação de parede celular (Takemoto et al., 2003); *POTLX-3* (lipoxigenase-3) descrita como sendo expresso especificamente em resposta a fitopatógenos (Kolomiets et al., 1996; Kolomiets et al., 2000) e *THT1-3* (hidroxicinamoil-CoA tiramina N-hidroxicinamoil transferase) envolvida na biossíntese do composto fenólico *p*-coumaroilnoradrenalina, que apresenta atividade antimicrobiana contra *P. syringae* pv. *tomato in vitro* (Von Roepenack-Lahaye et al., 2003).

Tabela 4 – Oligonucleotídeos utilizados para análise de expressão de 16 genes previamente identificados em duas bibliotecas de cDNA que tiveram indução em resposta a *Alternaria solani* confirmada por RT-qPCR.

Contig/clone (possível gene)	Acesso NCBI	Ident. na região de comparação	Oligonucleotídeo (5' → 3')	Referência
CLEEBA3-1 (<i>PR-1 p1-p14</i>)	CAA48672	99% (711pb)	08-F04-F GGC GCAACTCAGTCCGACTA 08-F04-R ACCACCATCCGTTGTTGCA	Tornero et al., 1993
CLEEBA2-2 (β -1,3-endoglucanase básica)	Q01413	99% (577pb)	13-G07-F ACCAAATGCACCAGCAGATG 13-G07-R GAACAGGAGGAGGATCTGTAGGAA	Van Kan et al., 1992
CLEEBA2-6 (Quitinase básica classe 1 - ChtC1)	AAF25602	92% (552pb)	14-D12-F TGCCATCTTCCGGTGATGA 14-D12-R GATGACCCCTCAATCACCAAA	Ancilo et al., 1999
CLEEBA3-6 (quitinase básica classe 1- Win)	AAB49688	99% (283pb)	10-E12-F TCAACCGCCGCAATCAG 10-E12-R GCCATGCATTGAAACAAAGGA	Harris et al., 1997
CLEEBA3-4 (pSTH2 <i>S. tuberosum</i>)	AAA03019	96% (302pb)	09-F08-F AAGCATACCTCCTCGAGAATCCT 09-F08-R CACGTGTGGACCTGATTCTTATTT	Matton e Brisson, 1989
CLEEBA3-5 (pSTH2 - <i>L. esculentum</i>)	BAD95797	99% (405pb)	08-A11-F AACATGCCATGGAATTTTCAAG 08-A11-R ATTTAAGCGTAGATGGAAGGATTAGC	Tsugane et al., 2005
LEEBA307C01 (NIEIG-A1)	BAB16429	72% (267pb)	07-C01-F GAGCAGAAAATGGCCAATAGG 07-C01-R GTTCCCGGTGGTATTGTTCCCT	Takemoto et al., 2003
CLEEBA2-7 (<i>LeMir</i>)	AAC63057	100% (498pb)	15-A10-F ACACCAGGGTTTCCTTGATCTC 15-A10-R TGACTTTGATGAAACAACAGGACAA	Brenner et al., 1998
CLEEBA3-13 (POTLX-3)	AAB67865	95% (504pb)	06-C04-F AGCTCTTGCCGAATTTGCAT 06-C04-R AGAAGAAGGACATGGTGACAAGAAA	Kolomiets et al., 1996
CLEEBA2-10 (<i>THT1-3</i>)	AAL99189	92% (405pb)	12-D08-F CCATACTGCGATTATTCCTCAA 12-D08-R TGGGACAGTTGCATCTATTGCT	Von Roepenack-Lahaye et al., 2003
CLEEBA3-31 (<i>ERF-1</i>)	AAK95688	100% (465pb)	07-F10-F GGATTCAACGCGTAATGGA 07-F10-R TAAAGCAGCTTCTTCAGCAGTATCA	Huang, 2004
LEEBA308D03 (<i>NtWRKY3</i>)	BAA77358	62% (466pb)	08-D03-F CAGCGCCGGTGACGTT 08-D03-R ACGGCGGAGAGCATCGT	-
LEEBA325A10 (<i>WRKY30</i>)	AAR92477	46% (532pb)	25-A10-F CCAAACCATAACGCTGAAAACCTTTA 25-A10-R AATGGGAACGCCGTGAAAA	-
LEEBA307F01 (Possível LRR)	AAM60932	63% (220pb)	07-F01-F CAACTTCCACCAACAAAGTTTAAGG 07-F01-R GCAACGGTGAACCACAAAGTC	Hass et al., 2002
CLEEBA2-56 SGN-U222892	NP197316	62% (215pb)	12-A10-F CCCGATGATGAAACAACGAA 12-A10-R TCACCTCACCAGAATCAGATTCTC	-
CLEEBA2-55 SGN U226036	-	-	15-B10-F AGATAAGGTTTTGTCTTTGGTTTGA 15-B10-R AGAAAATCTACATCTCCCCACACAT	-

Foi observada ainda a indução do fator de transcrição *ERF-1* e dois possíveis membros da família *WRKY*, com maior similaridade a *NtWRKY3* e *WRKY30*. Verificou-se também a indução de três genes de função desconhecida, sendo que um deles codifica uma proteína contendo repetições ricas em leucina (LRR).

09-F08F	0
09-F08R	0
pSTH2 batata	CATAATGAAGCAAAAACAAGCCATGGAACCTTTTCAAGA	240
pSTH2 tomate	CACAATGAAGGAAAAAACAATGCCATGGAACCTTTTCAAGG	78
08-A11FAACATGCCATGGAACCTTTTCAAG	23
08-A11R	0
09-F08FAAGCATACCTCCTCGAGAATCCT	23
09-F08R	0
pSTH2 batata	TTGTTGAAGCATACCTCCTCGAGAATCCTTCTGTCTACGC	280
pSTH2 tomate	CTGTGGAAGATTACCTCCTCGCTAATCCTTCCATCTACGC	118
08-A11F		
08-A11RGCTAATCCTTCCATCTACGC	20
09-F08F		
09-F08RAAATAAGAATCAGGTCCACACGTG	24
pSTH2 batata	TTAAGTGATGAAATAAGAATCAGGTCCACACGTGTTATAT	320
pSTH2 tomate	TTAAATGATGAAAAAAGAATCAGACTTGCACGTATC....	154
08-A11F		
08-A11R	TTAAAT	26

Figura 4 – Regiões de duas isoformas do gene *pSTH2* utilizadas como alvo para análise de expressão gênica por RT-qPCR. O par de oligonucleotídeos 09-F08 e 08-A11 anelam em regiões únicas de cada isoforma permitindo a distinção de transcritos do gene *pSTH2* com maior similaridade ao gene *pSTH2* descrito em batata e tomate respectivamente (Matton e Brisson, 1989; Tsugane et al., 2005)

Analisando-se o padrão de expressão dos genes diferencialmente expressos em resposta a *A. solani*, observa-se que de maneira geral a indução tem início entre 6 e 12 hai, chegando ao máximo entre 24 e 36 hai, sendo observada uma tendência de queda a partir de 48 hai. Há casos como o gene com similaridade a *NtWRKY3* onde se observa indução já no tempo 0 h. Este resultado é consistente tendo em vista que foi observado em 2 experimentos independentes.

Para a maioria dos 16 genes induzidos em resposta ao fungo verificou-se uma mesma tendência na cinética de expressão no dossel inferior e superior. Entretanto, em termos quantitativos pode-se verificar que 7 destes

genes [*PR-1*, β -1,3-endoglucanase, *NtEIG-A1*, *pSTH-2* (tomate e batata), *THT1-3* e *POTLX-3*] apresentaram maior nível de expressão no dossel superior (Figura 5). Além de quantitativamente estes genes apresentarem uma maior expressão no dossel superior, pode-se observar que para alguns deles como o gene que codifica β -1,3-endoglucanase há uma maior velocidade de resposta no dossel superior comparado ao dossel inferior, sendo observado níveis elevados de expressão já a partir de 12 hai.

Nove dos 16 genes testados não apresentaram uma clara diferença de expressão entre os segmentos da planta analisados. Entretanto, verificou-se que os genes *LeMir*, *ChtC1*, *Win*, um membro da família WRKY com maior similaridade a WRKY30 e um gene desconhecido correspondente ao clone LEEBA307F01, apresentaram maior nível de expressão no dossel superior nas primeiras 12 hai, demonstrando uma maior velocidade de resposta a *A. solani* neste segmento da planta.

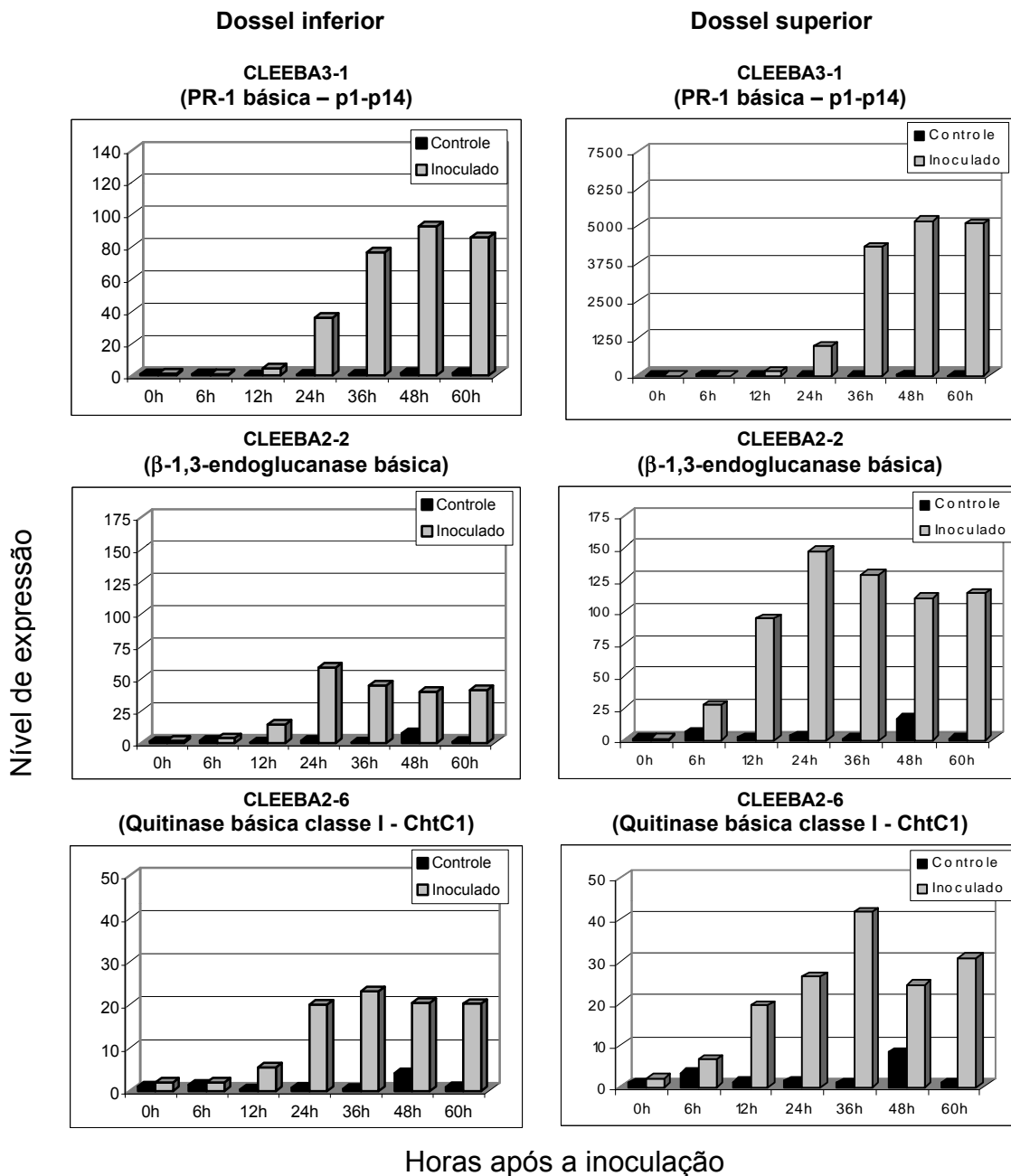


Figura 5 – Padrão de expressão temporal de alguns genes de defesa identificados em duas bibliotecas subtrativas da interação tomateiro – *A. solani* analisado por RT-qPCR. No tratamento inoculado, plantas com 45 dias após a semeadura foram atomizadas com uma suspensão contendo 10^4 conídios.mL⁻¹ de *A. solani*, enquanto no tratamento controle as plantas foram atomizadas somente com água. O calibrador utilizado corresponde à amostra coletada no tempo 0 h do tratamento não inoculado. O nível de expressão gênica apresentado no eixo y corresponde ao aumento de expressão em relação ao calibrador, normalizado pelo controle endógeno Actina 2. Na coluna à esquerda está apresentada a análise de expressão no dossel inferior da planta (1^a e 2^a folhas) e na coluna à direita a análise de expressão no dossel superior (4^a e 5^a folhas).

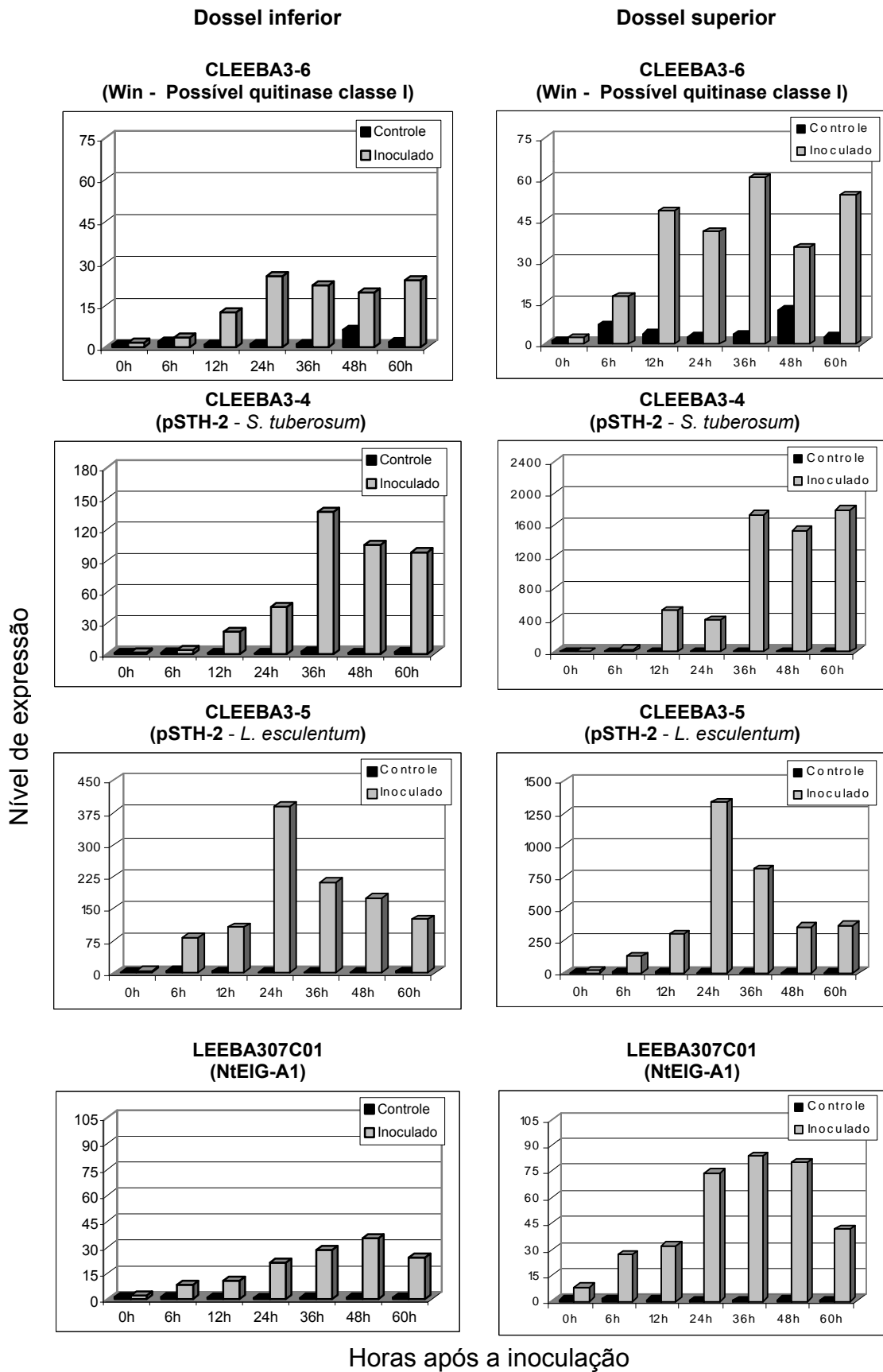


Figura 5 - Continuação

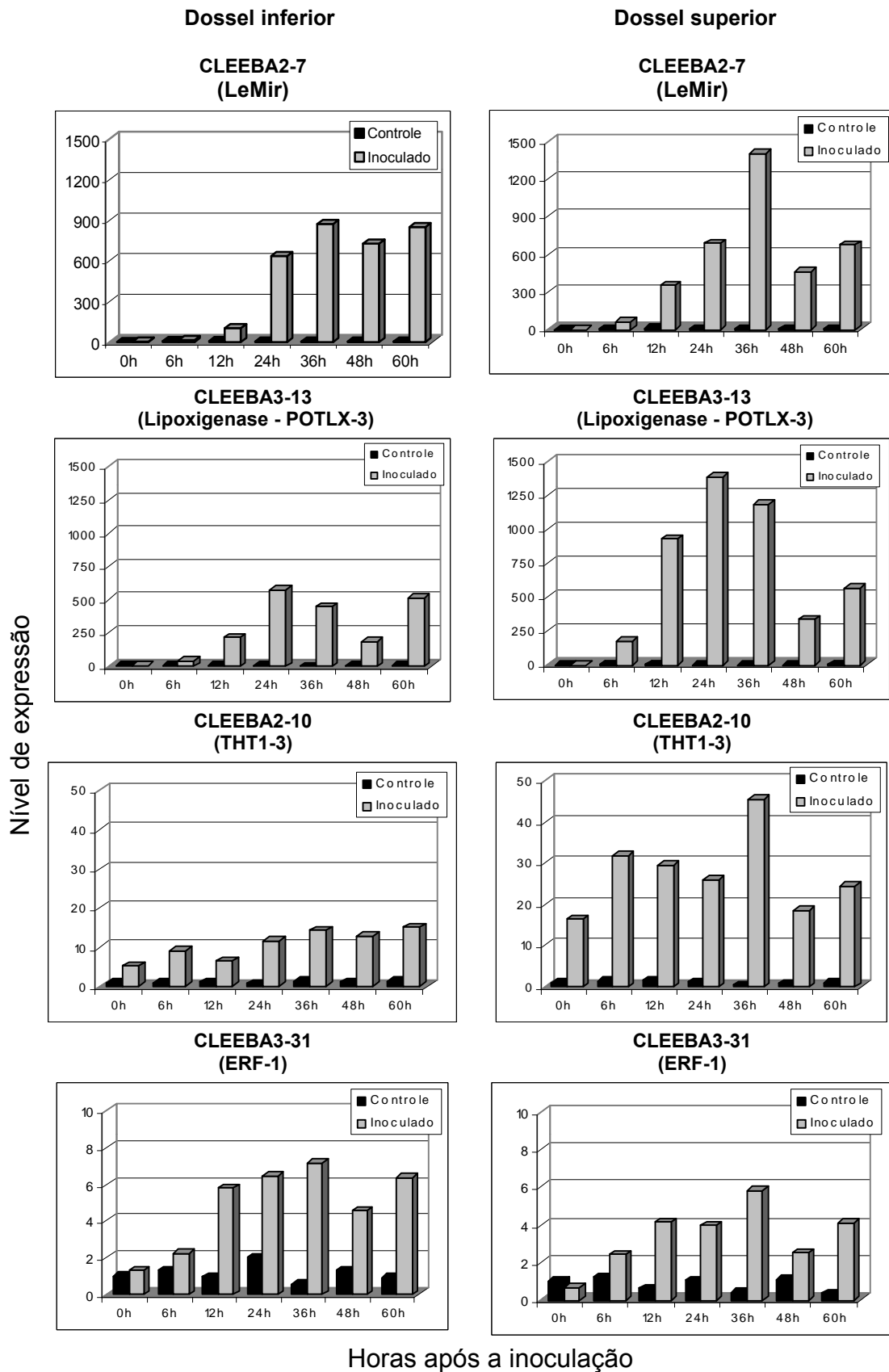


Figura 5 - Continuação

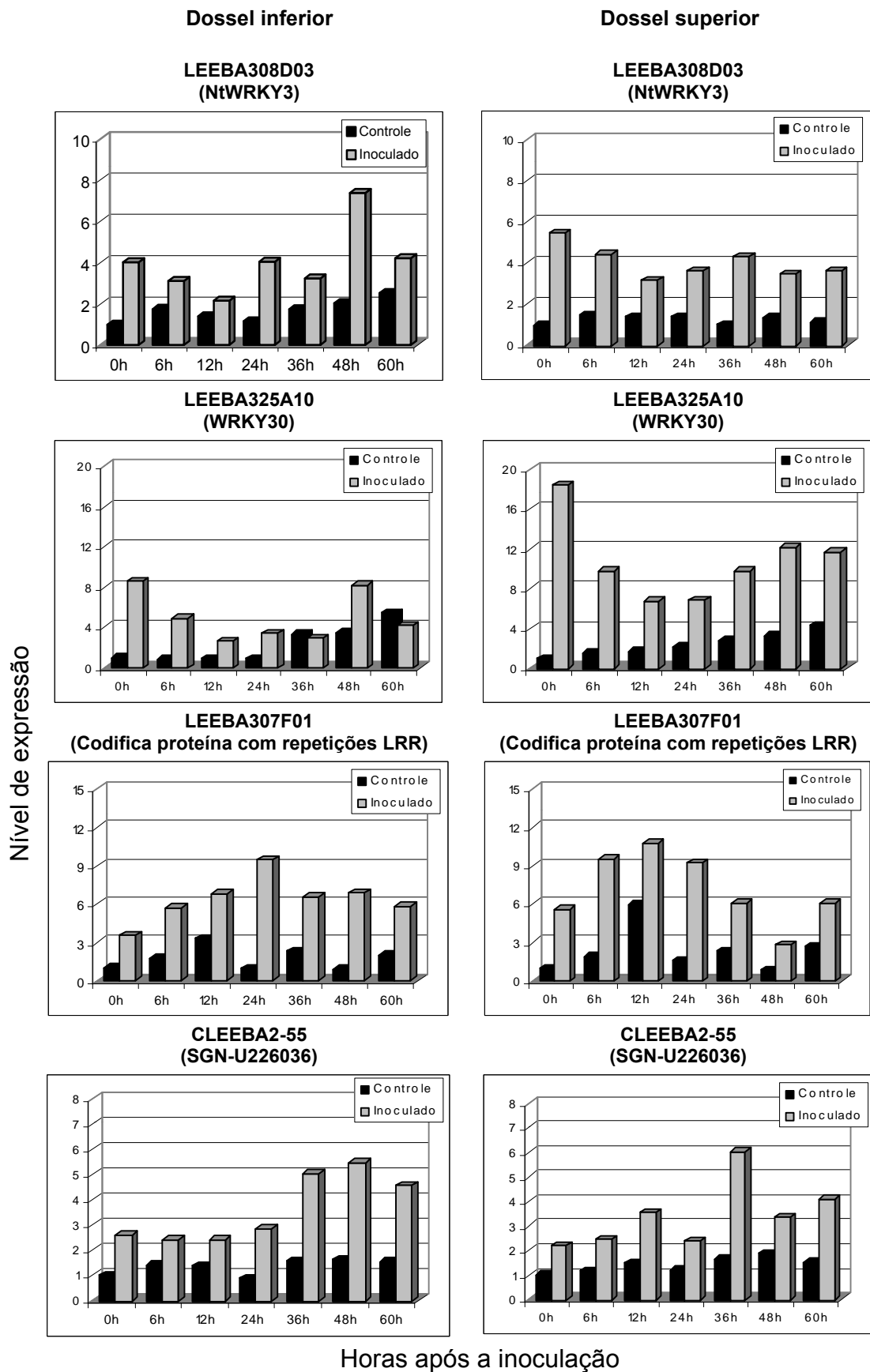


Figura 5 - Continuação

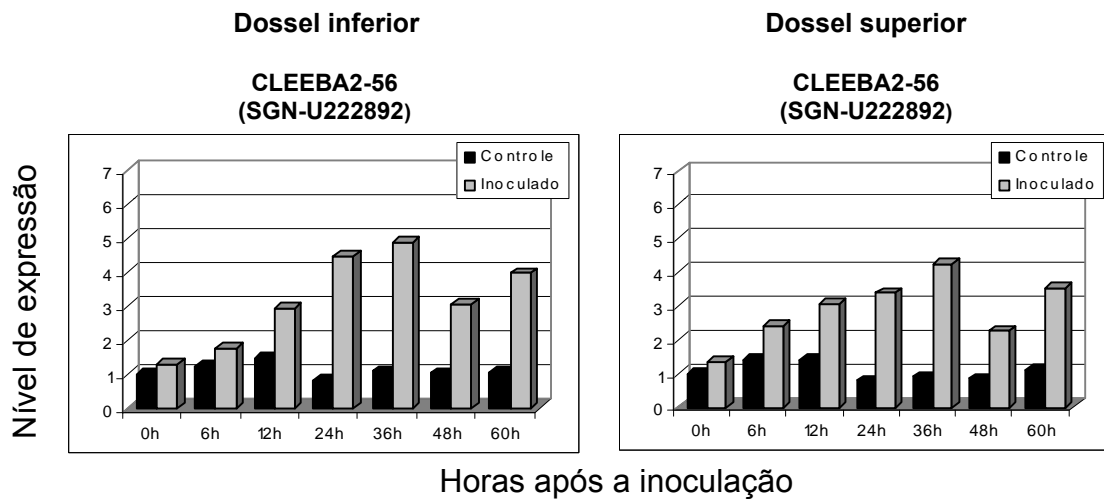


Figura 5 – Continuação

5. DISCUSSÃO

Em resposta à infecção por fitopatógenos, as plantas alteram o seu padrão de expressão gênica (Hammond-Kosack e Jones 2000). Assim, para caracterizar o transcriptoma de tomateiro expresso em resposta à infecção por *Alternaria solani*, foram construídas duas bibliotecas enriquecidas para genes expressos 24 e 36 hai, utilizando a técnica de SSH (Diatchenko et al., 1996). Esta técnica apresenta uma etapa de hibridização que normaliza a população de transcritos de genes com diferentes níveis de expressão, permitindo que sejam amplificados por PCR principalmente cDNAs correspondentes a genes diferencialmente expressos, tornando possível a identificação de genes que apresentam baixo nível de expressão (Diatchenko et al., 1996; Diatchenko et al., 1999).

Verificou-se que 23% dos ESTs identificados nas bibliotecas apresentaram similaridade a genes relacionados com a defesa da planta. Além disso, 4% dos ESTs apresentam similaridade com genes que codificam fatores de transcrição, demonstrando que a técnica utilizada foi eficiente no enriquecimento de genes diferencialmente expressos e de genes que apresentam baixo nível de expressão, como é o caso de fatores de transcrição.

Como na construção destas bibliotecas foram hibridizados cDNAs provenientes de plantas inoculadas com cDNAs provenientes de plantas não inoculadas, era também esperada a identificação de genes expressos pelo fungo durante o processo de infecção. Entretanto, 98% dos ESTs apresentaram similaridade significativa com seqüências de solanáceas depositadas no banco de dados do 'SGN', indicando que estas seqüências correspondem a genes do tomateiro. Entretanto, quinze ESTs não

apresentaram similaridade com seqüências depositadas, as quais podem corresponder a genes do fungo ou mesmo genes do tomateiro ainda não descritos.

Verificou-se nas bibliotecas, a presença de genes relacionados a diferentes processos de defesa da planta. Entre estes, estão genes relacionados com formação de HR. A ocorrência de HR é comumente observada em interações envolvendo patógenos biotróficos, os quais na ausência de tecidos vivos ficam restritos ao sítio de infecção (Hammond-Kosack e Jones, 2000). Por outro lado, patógenos necrotróficos que obtêm seus nutrientes de tecido morto, são em muitos casos favorecidos pela ocorrência de HR (Govrin e Levine, 2000). Trabalhos conduzidos com batata (*S. tuberosum*), demonstraram que genótipos resistentes quando desafiados por *A. solani*, apresentam um maior número de sítios de penetração associados com HR comparado a genótipos suscetíveis, o que sugere a participação desta resposta de defesa na resistência a *A. solani* (Rodríguez, 2003). Entretanto, a resposta de HR frequentemente ocorre associada a produção de compostos como fitoalexinas e compostos fenólicos, que atuam diretamente sobre o patógeno. Nas bibliotecas, foram identificados alguns membros da família de genes que codificam para Citocromo P450 monoxigenase. Em arábida, esta enzima está envolvida na biossíntese da fitoalexina camalexina, relacionada com a resistência a *A. brassicicola* (Zhou et al., 1999). Foram identificados também, genes como *THT1-3*, envolvido na biossíntese do composto fenólico *p*-coumaroilnoradrenalina, que apresenta atividade antimicrobiana contra *P. syriangae* pv. *tomato* (Von Roepenack-Lahaye et al., 2003).

Espécies de oxigênio reativo (ROS) também são produzidas em respostas de defesa contra fitopatógenos. Estes compostos além de apresentar efeito direto sobre o microorganismo invasor, participam do processo de HR promovendo uma explosão oxidativa no sítio de infecção (Hammond-Kosack e Jones, 1996; Resende et al., 2003). Able (2003) demonstrou que cultivares de cevada resistentes aos fungos necrotróficos *Rhynchosporium secalis* e *Pyrenophora teres*, apresentam menor acúmulo de ROS comparado a genótipos suscetíveis. Neste caso, a morte celular desencadeada por ROS possivelmente está associada a suscetibilidade destas cultivares (Able, 2003).

Nas bibliotecas da interação tomateiro - *A. solani*, foram identificados diversos genes que codificam enzimas envolvidas na degradação de ROS, como catalases, ascorbato peroxidases e glutaciona-s-transferases. É possível que a supressão da morte celular desencadeada por ROS seja uma resposta de defesa contra *A. solani*.

Além de genes que codificam proteínas com ação direta sobre o patógeno, foram identificados também genes que codificam proteínas relacionadas com reforçamento de parede celular. Entre elas estão as proteínas ricas em hidroxiprolinas que participam da polimerização da lignina (Bolwell et al., 1995). O papel da lignificação na resistência contra fitopatógenos foi demonstrado por Moerschbacher et al. (1990), em que a aplicação de inibidores da biossíntese de lignina em plantas de trigo resultou em um aumento na colonização dos tecidos por *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Para patógenos necrotróficos, que promovem a hidrólise da parede celular do hospedeiro, o reforçamento da parede celular poderia dificultar a difusão de toxinas e enzimas hidrolíticas por eles produzidas. Além disso, compostos gerados durante as reações de polimerização da parede celular do hospedeiro, podem alterar a plasticidade da membrana plasmática do patógeno, podendo até mesmo resultar na lignificação de hifas (Mauch-Mani e Slusarenko, 1996).

Entre os genes relacionados com a defesa da planta identificados nas bibliotecas, verificou-se haver um predomínio de genes cuja regulação é mediada pelo ET e AJ, e em menor número genes regulados pelo AS. Em arabidopsis, trabalhos envolvendo análise de mutantes e estudos de expressão gênica demonstraram que a resistência a patógenos necrotróficos, é na maioria dos casos, mediada por genes regulados pelo ET e AJ, enquanto a resistência a patógenos biotróficos é determinada por genes regulados pelo AS (Thomma et al., 1998; Lu et al., 2001; Liu et al., 2005). *A. solani* apresenta modo de infecção do tipo necrotrófico, sendo que a identificação de um maior número de genes regulados pelo ET e AJ corrobora com o modelo proposto para arabidopsis.

A análise de expressão por RT-qPCR demonstrou que dos 16 genes cuja indução em resposta a *A. solani* foi confirmada, três deles são responsivos ao AS. É possível que a indução de genes por *Alternaria* spp. regulados pelo AS tenha como finalidade a supressão de genes regulados pelo AJ, tendo em

vista o antagonismo entre as vias de defesa reguladas por esses dois hormônios (Kunkel e Brooks, 2002). Entretanto, o fato da severidade da pinta preta ser reduzida pela aplicação de AS (Spletzer et al. 1999) sugere um papel desses genes na resistência do tomateiro a *A. solani*.

A resistência a *A. solani*, assim como a outras espécies do gênero *Alternaria* está correlacionada à idade fisiológica dos tecidos. Trabalhos conduzidos com girassol (*Helianthus annuus* L.), algodão (*Gossypium barbadense* L.), cebola (*Allium cepa* L.) batata (*S. tuberosum* L.) e tomate, demonstraram que plantas mais velhas apresentam maior suscetibilidade à infecção por *Alternaria* spp. Além disso, em uma mesma planta há uma menor severidade da doença nas folhas próximas ao ápice, o que indica uma menor suscetibilidade de tecidos jovens à doença (Miller, 1983; Godoy e Fernandez, 1985; Pelletier e Fry, 1990; Vloutoglou e Kalogerakis, 2000). Ao compararmos a expressão entre os dosséis inferior e superior das plantas, para os genes cuja indução em resposta a *A. solani* havia sido confirmada, verificou-se que sete deles apresentaram maior nível de expressão no dossel superior. O gene correspondente a *PR-1 P1-p14* foi o que apresentou maior diferença de expressão entre estes dois segmentos da planta, apresentando no dossel superior o maior nível de expressão entre os genes analisados (5000x). Este resultado corrobora com trabalhos que demonstram que proteínas da família PR-1 se acumulam em grande quantidade no tecido foliar infectado, podendo atingir 1-2% do total de proteínas encontradas nestes tecidos (Alexander et al., 1993; Guzzo et al., 2003). O papel de proteínas desta família nos processos de defesa da planta não é conhecido. Entretanto, Hoegen et al. (2002) demonstraram haver o acúmulo de PR-1b em células que compõe o complexo estomatal em resposta a *P. infestans*. Aplicações de PR-1 básica em discos de folhas de tomateiro reduziram o crescimento de *P. infestans*, o que sugere a participação de PR-1 básica na defesa da planta (Niderman et al., 1995).

O gene que codifica uma β -1,3-endoglucanase básica, além de apresentar um maior nível de expressão no dossel superior, apresentou ainda uma maior velocidade de resposta neste segmento da planta. A máxima expressão deste gene 24 hai, coincide com o período onde há maior número de apressórios formados e conseqüente maior penetração nos tecidos (Araújo e Matsuoka, 2004). A participação de β -1,3-endoglucanases na resistência a *A.*

solani é sugerida por Lawrence et al. (1996) que verificaram que genótipos resistentes de tomateiro como NC EBR-2 apresentam uma maior expressão constitutiva de β -1,3-endoglucanases comparado a genótipos suscetíveis. Além disso, a expressão heteróloga de uma β -1,3-endoglucanase de milho em tomateiro resultou em uma redução significativa na severidade da pinta preta (Schaefer et al., 2005). Lawrence et al. (1996), demonstraram também que genes que codificam para quitinases básicas da classe I apresentam maior nível de expressão e maior rapidez de resposta em genótipos resistentes, comparado a genótipos suscetíveis. No presente trabalho, foi demonstrado a indução de dois genes que possivelmente codificam para quitinases da classe I. Apesar de não ter havido uma nítida diferença no nível de indução destes genes entre os dosséis inferior e superior, verificou-se no dossel superior um incremento significativo no nível de expressão destes genes 12 hai, ao passo que no dossel inferior isto ocorreu somente 24 hai. Quitinases da classe I tem a capacidade de degradar a parede celular de conídios de *A. solani* em germinação, liberando oligômeros de quitosana que atuam como elicitores de HR (Lawrence et al., 2000). Ponstein et al. (1994) relatam a ocorrência de interações sinérgicas entre quitinases da classe I e β -1,3-endoglucanases promovendo a redução no crescimento de *A. radicina*.

De modo similar ao gene que codifica β -1,3-endoglucanase, o gene *NtEIG-A1* apresentou um maior nível de expressão e maior velocidade de resposta no dossel superior. *NtEIG-A1* apresenta elevada similaridade ao gene *CASPL1* que codifica uma estelacianina, possivelmente envolvida na formação de parede celular (Takemoto et al., 2003). A expressão de *CASPL1* é também dependente da idade fisiológica dos tecidos (Kong et al. 2002). Plantas de pimentão inoculadas com *Colletotrichum cocodes* no estágio de 8 folhas, apresentaram um maior nível na expressão de *CASPL1* 72 hai, enquanto que em plantas inoculadas no estágio de 4 folhas o maior nível de expressão foi observado 36 hai (Kong et al. 2002). Isto demonstra que a expressão de *NtEIG-A1* em resposta a fitopatógenos tende a ser maior em tecidos jovens. Tendo em vista que *NtEIG-A1* é induzido em resposta ao ácido jasmônico e a patógenos necrotróficos e hemibiotróficos, além de ter apresentado um maior nível de expressão nas folhas jovens de plantas de tomateiro, onde a

suscetibilidade a pinta preta é menor, é possível que este gene esteja de alguma forma contribuindo com a resistência a *A. solani*.

Diferenças no nível de expressão entre os dosséis inferior e superior também foram observadas para o gene que codifica uma lipoxigenase, com similaridade a *POTLX-3* de batata (Kolomiets et al., 1996). Genes que codificam lipoxigenases são induzidos em resposta a ferimentos, insetos, fitopatógenos e necrose dos tecidos (Siedow et al., 1991; Royo et al., 1999). No presente trabalho, o aparecimento de lesões necróticas nas plantas de tomateiro decorrentes da inoculação ocorreram a partir de 48 hai, enquanto a máxima expressão deste gene ocorreu entre 12 e 36 hai. Desta forma, não houve uma associação entre a ocorrência de necrose dos tecidos e indução de *POTLX-3*. É possível que o pico de expressão no dossel inferior 60 hai esteja associado à necrose dos tecidos observada nesta avaliação. Apesar da inespecificidade de resposta de alguns membros da família das lipoxigenases, *POTLX-3* é induzido especificamente em resposta a fitopatógenos. Genótipos de batata resistentes a *P. infestans* apresentaram maior nível de expressão deste gene comparativamente a genótipos suscetíveis, o que sugere a participação de *POTLX-3* na defesa da planta (Kolomiets et al., 2000).

O gene *THT1-3* apresentou também um maior nível de expressão e uma maior velocidade de resposta no dossel superior. *THT1-3* é membro de uma família de genes que codificam enzimas que atuam na rota dos fenilpropanóides, envolvidas em processos como a lignificação da parede de células vizinhas ao sítio de infecção (Clarke, et al., 1982; Negrel e Jeandet, 1987; Negrel et al., 1996). Enzimas codificadas por esta família gênica participam da síntese de amidas a partir do ácido hidroxicinâmico. Algumas destas amidas como feruloil-tiramina promovem a redução no crescimento de hifas de fungos micorrízicos (Grandmaison et al., 1993).

Duas possíveis isoformas do gene *pSTH2* também apresentaram maior indução no dossel superior. A cinética de expressão destes genes revelou dois padrões de expressão diferentes, o que corrobora com a hipótese de duas isoformas. Além disso, o fato de uma isoforma (*pSTH2* – *L. esculentum*) apresentar máxima expressão 24 hai e outra (*pSTH2* – *S. tuberosum*) apresentar maior expressão 36 hai, sugere que estes dois genes estão relacionados a eventos diferentes desencadeados em resposta a infecção por

A. solani. O papel de *pSTH2* na resistência a fitopatógenos é desconhecido. Entretanto, em batata verificou-se que genótipos resistentes a *P. infestans* apresentaram maior acúmulo de *pSTH2* comparado a genótipos suscetíveis, o que sugere a participação de *pSTH2* na resistência da planta (Constabel et al., 1992).

Entre os 16 genes cuja indução em resposta a *A. solani* foi comprovada por RT-qPCR, nove deles não apresentaram uma nítida diferença de expressão nos segmentos da planta analisados. Entretanto, os genes *LeMir*, *ChtC1*, *Win*, um membro da família WRKY com maior similaridade a *WRKY30* e um gene desconhecido (clone LEEBA307F01) apresentaram maior nível de expressão no dossel superior nas primeiras 12 hai, demonstrando maior rapidez de resposta neste segmento da planta. O gene com similaridade a *WRKY30* é o que apresenta maior rapidez de resposta, sendo observado níveis elevados de indução já na primeira coleta (correspondente ao tempo 0 h) a qual foi realizada após o término da inoculação que teve duração de cerca de uma hora. Padrão de expressão similar foi observado em *Arabidopsis* em resposta a *P. syringae* pv. *tomato* em que os genes *WRKY28* e *WRKY48* apresentaram aumento de expressão 2 horas após a inoculação seguido por redução no nível de expressão a partir de 8 hai (Dong et al., 2003). Apesar do processo de formação de apressórios por *A. solani* e conseqüente penetração dos tecidos ocorrer a partir de 12 hai (Araújo e Matsuoka, 2004), é sabido que espécies do gênero *Alternaria* produzem uma série de toxinas (Ichihara e Oikawa, 1997). É possível, que estas toxinas ou outro composto com atividade elicitora esteja sendo produzido de forma constitutiva e conseqüentemente induzindo uma rápida resposta de defesa.

O maior nível de expressão de genes induzidos por *A. solani* em tecidos jovens, onde a severidade da doença é menor, contrasta em parte com o que é frequentemente observado em outros patossistemas. Para a maioria das espécies de plantas, o que se verifica é uma redução na suscetibilidade a doenças à medida que a planta atinge a maturidade fisiológica, chamada resistência de planta adulta (Whalen, 2005). Esta menor suscetibilidade é frequentemente associada ao aumento na expressão de genes relacionados à defesa da planta (Wyatt et al., 1991; Hugot et al., 2004). Hugot et al., 1999, demonstraram que a resistência de planta adulta observada em plantas de

tabaco em resposta a *P. parasitica* está associada ao aumento da expressão de genes como *PR-2* e *LFP* ('lignin-forming peroxidase'). Entretanto, o que se observa em patossistemas envolvendo *Alternaria* spp. é a chamada resistência juvenil, que se caracteriza por uma menor severidade da doença em tecidos jovens (Mills, 1940). Entre os mecanismos relacionados a esta característica está a camada cerosa, a qual é drasticamente reduzida com a maturidade dos tecidos (Tewari e Skoropad, 1976). Entretanto, trabalhos realizados em batata demonstraram que o número de penetrações independe da posição da folha na planta, o que sugere a participação de eventos pós-penetração (Rodríguez, 2003). A ocorrência de HR em resposta a *A. solani* parece ser um evento pós-penetração relacionado com a resistência a este patógeno. Rodríguez (2003) verificou que em plantas de batata, o número de sítios de penetração associados com HR é maior no dossel superior. No presente trabalho, foi observado que entre os genes que apresentaram maior nível de expressão no dossel superior estão genes que codificam proteínas PRs, algumas das quais atuam diretamente na parede celular do patógeno, liberando indutores inespecíficos de HR (Lawrence et al., 2000). Estudos citológicos são necessários, para verificar se em tomateiro tal como em batata, ocorre a formação de um maior número de sítios de penetração associados com HR no dossel superior. Todavia, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram a indução em resposta a *A. solani* de genes relacionados a diferentes processos de defesa da planta. Possivelmente, o maior nível de resistência observado no dossel superior envolva a participação de múltiplos mecanismos de resistência que apresentam um maior nível e velocidade de resposta neste segmento da planta. Estudos funcionais envolvendo superexpressão ou silenciamento gênico permitirão confirmar se alterações nos níveis de expressão dos genes aqui identificados interferem com a resistência do tomateiro a *A. solani*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLE, A.J. Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens. **Protoplasma**, v.221, p.137-143, 2003.

AKAMATSU, H., ITOH, Y., KODAMA, M., OTANI, H., KOHMOTO, K. AAL-toxin-deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. **Phytopathology**, v.87, p.967-972, 1997.

ALEXANDER, D., GOODMAN, R.M., GUT-RELLA, M., GLASCOCK, C., WEYMANN, K., FRIEDRICH, L., MADDOX, D., AHL-GOY, P., LUNTZ, T., WARD, E., RYALS, J. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.90, p.7327-7331, 1993.

ANCILLO, G., WITTE, B., SCHMELZER, E., KOMBRINK, E., A distinct member of basic (class I) chitinase family in potato is specifically expressed in epidermal cells. **Plant Molecular Biology**, v.39, p.1137-1151, 1999.

ARAÚJO, J.C.A., MATSUOKA, K. Histopatologia da interação *Alternaria solani* e tomateiros resistente e suscetível. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.268-275, 2004.

BACHEM, C.W.B., VAN DER HOEVEN, R.S., BRUIJN, S.M., VREUGDENHIL, D., ZABEAU, M., VISSER., R.G. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. **The Plant Journal**, v.9, p.745-753, 1996.

BARKSDALE, T.H., Resistance to tomato seedling to early blight. **Phytopathology**, v.59, p.443-446, 1969.

BARKSDALE, T.H.; STONER, A. K. Segregation for horizontal resistance to tomato early blight. **Plant Disease Reporter**, v.57, p.964-965, 1973.

BECKERS, G.J.M., SPOEL, S. Fine-tuning plant defense signaling: salicylate versus jasmonate. **Plant Biology**, v.8, p.1-10, 2006.

BELKHADIR, Y., SUBRAMANIAM, R., DANGL, J.L. Plant disease resistance protein signaling: NBS–LRR proteins and their partners. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.391-399, 2004.

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

BIRCH, P.R.J., AVROVA, A.O., DUNCAN, J.M., LYON, G.D., TOTH, R.L. Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, p.356-361, 1999.

BORRAS-HIDALGO, O., THOMMA, B.P., CARMONA, E., BORROTO, C.J., PUJOL, M., ARENCIBIA, A., LOPEZ, J. Identification of sugarcane genes induced in disease-resistant somaclones upon inoculation with *Ustilago scitaminea* or *Bipolaris sacchari*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, p.1115-1121, 2005.

BOLWELL, G.P., BUTT, V.S., DAVIES, D.R., ZIMMERLIN, A. The origin of the oxidative burst in plants. **Free radical research communications**, v.23, p.517-532, 1995.

BRENNER, E.D., LAMBERT, K.N., KALOSHIAN, I., WILLIAMSON, V.M. Characterization of *LeMir*, a root-knot nematode-induced gene in tomato with an encoded product secreted from the root. **Plant Physiology**, v.118, p.237-247, 1998.

BRUGGMANN, R., ABDERHALDEN, O., REYMOND, P., DUDLER, R. Analysis of epidermis and mesophyll specific transcript accumulation in powdery mildew-inoculated wheat leaves. **Plant Molecular Biology**, v.58, p.247-267, 2005.

CLARKE, D.D. The accumulation of cinnamic acid amides in the cell walls of potato tissue and early response to fungal attack. In: WOOD, R.K.S. (ed.). **Active defense mechanisms in plants**. Plenum Press, New York. 1982. p.321-322.

CLARKE, J.D., VOLKO, S.M., LEDFORD, H., AUSUBEL, F.M., DONG, X. Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in *cpr*-induced resistance in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v.12, p.2175-2190, 2000.

CONSTABEL, C.P., BRISSON, N. The defense-related *STH-2* gene product of potato shows race-specific accumulation after inoculation with low concentrations of *Phytophthora infestans* zoospores. **Planta**, v.188, p.289-295, 1992.

CRAWFORD, D.R., KOCHHEISER, J.C., SCHOOLS, G.P., SALMON, S.L., DAVIES, K.J. Differential display: a critical analysis. **Gene expression**, v.10, p.101-107, 2002.

DANGL, J.L., JONES, J.D.G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v.411, p.826-833, 2001.

DESPRES, C., DELONG, C., GLAZE, S., LIU, E., FOBERT P.R. The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. **The Plant Cell**, v.12, p.279-290, 2000.

DESVEAUX, D., SUBRAMANIAM, R., DESPRÉS, C., MESS, J-N., LÉVESQUE, C., FOBERT, P.R., DANGL, J.L., BRISSON, N. A whirly transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in Arabidopsis. **Developmental Cell**, v.6, p.229-240, 2004.

DEVOTO, A., NIETO-ROSTRO, M., XIE, D., ELLIS, C., HARMSTON, R., PATRICK, E., DAVIS, J., SHERRATT, L., COLEMAN, M., TURNER, J.G. COI1 links jasmonate signaling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v.32, p.457-466, 2002.

DIATCHENKO, L., LAU, Y.F.C., CAMPBELL, A.P., CHENCHIK, A., MOQADAM, F., HUANG, B., LUKYANOV, S., LUKYANOV, K., GURSKAYA, N., SVERDLOV, ED., SIEBERT, PD. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A**, v.93, p.6025-6030, 1996.

DIATCHENKO, L., LUKYANOV, S., LAU, Y.F. SIEBERT, P.D. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. **Methods in Enzymology**, v.303, p.349-380, 1999.

DICKMAN, M.B., PARK, Y.K., OLTERS DORF, T., LI, W., CLEMENTE, T., FRENCH, R. Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A**, v.98, p.6957-6962, 2001.

DILLARD, H.R., JOHNSTON, S.A., COBB, A.C. & HAMILTON, G.H. An assessment of fungicide benefits for the control of fungal diseases of processing tomatoes in New York and New Jersey. **Plant Disease**, v.81, p.677-681, 1997.

DONG, J., CHEN, C., CHEN, Z. Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. **Plant Molecular Biology**, v.51, p.21-37, 2003.

DONG, X. NPR1, all things considered. **Current Opinion in Plant Biology**. v.7, p.547-552, 2004.

DONSON, J., FANG, Y., ESPIRITU-SANTO, G., XING, W., SALAZAR, A., MIYAMOTO, S., ARMENDAREZ, V., VOLKMUTH, W. Comprehensive gene

expression analysis by transcript profiling. **Plant Molecular Biology**, v.48, p.75-97, 2002.

ECKEY, C., KORELL, M., LEIB, K., BIEDENKOPF, D., JANSEN, C., LANGEN, G., KOGEL, K.H. Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. **Plant Molecular Biology**, v.55, p.1-15, 2004.

FERNANDEZ, D., SANTOS, P., AGOSTIN, C., BON, M-C., PETITOT, A-S., SILVA, M.C., GUERRA-GUIMARÃES, L., RIBEIRO, A., ARGOUT, X., NICOLE, M. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology**, v.5, p.527-536, 2004.

FEYS, B.J., BENEDETTI, C.E., PENFOLD, C.N., TURNER, J.G. Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. **The Plant Cell**, v.6, p.751-759, 1994.

FEYS, B.J., MOISAN, L.J., NEWMAN, M.A., PARKER, J.E. Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. **EMBO Journal**, v.20, p.5400-5411, 2001.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, v.9, p.275-296, 1971.

FOOLAD, M.R., NTAHIMPERA, N. Comparison of field, greenhouse, and detached-leaflet evaluations of tomato germ plasm for early blight resistance. **Plant Disease**, v.84, p.967-972, 2000.

GARDNER, R.G. NC EBR-1 and EBR-2 early blight resistant tomato breeding lines. **HortScience**, v.23, p.779-781, 1988.

GARDNER, R.G., SHOEMAKER, P.B. 'Mountain supreme' early blight resistant hybrid tomato and its parents, NC EBR-3 and NC EBR-4. **HortScience**, v.34, p.745-746, 1999.

GLAZEBROOK, J. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.280-286, 1999.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.43, p.205-227, 2005.

GODOY, J.R., FERNANDES, N.G. *Alternaria helianthi* (Hansf.) Tubaki & Nishihara em girassol (*Helianthus annuus* L.): Influência da idade da planta na suscetibilidade e na infecção das sementes. **Summa Phytopathologica**, v.11, p.186-197, 1985.

GOVRIN, E.M., LEVINE, A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. **Current biology**, v.10, p.751–757, 2000.

GRANDMAISON, J., OLAH, G.M., Van CARLSTEREN, M.R., FURLAN V. Characterization and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. **Mycorrhiza**, v.3, p.155-164, 1993.

GUO, H., ECKER, J.R. The ethylene signaling pathway: new insights. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.40-49, 2004.

GUZZO, S.D. Proteínas relacionadas à patogênese. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.11, p.283-332, 2003.

HAMMOND-KOSACK, K., JONES, J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant Cell**, v.8, p.1773-1791, 1996.

HAMMOND-KOSACK, K., JONES, J.D.G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B., GRUISSEM W., JONES, R. (Eds). **Biochemistry & molecular biology of plants**. MD, Rockville. 2000.p.1102-1156.

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

HARRIS, N., TAYLOR, J.E., ROBERTS, J.A. Characterization and expression of a mRNA encoding a wound-induced (Win) protein from ethylene-treated tomato leaf abscission zone tissue. **Journal of experimental Botany**, v.48, p.1223-1227, 1997.

HOEGEN, E., STROMBERG, A., PIHLGREN, U., KOMBRINK, E. Primary structure and tissue-specific expression of the pathogenesis-related protein PR-1b in potato. **Molecular Plant Pathology**, v.3, p.329-345, 2002.

HOLM, A.L., RIVERA, V.V., SECOR, G.A., GUDMESTAD, N.C. Temporal sensitivity of *Alternaria solani* to foliar fungicides. **American Journal of Potato Research**, p.1-12, 2003.

HORVATH, D.M., CHUA, N-H.: Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. **Plant Molecular Biology**, v.31, p.1061-1072, 1996.

HUGOT, K., AIME, S., CONROD, S., POUPET, A., GALIANA, E. Developmental regulated mechanisms affect the ability of a fungal pathogen to infect and colonize tobacco leaves. **The Plant Journal**, v.20, p.163-170, 1999.

HUGOT, K., RIVIERE, M.P., MOREILHON, C., DAYEM, M.A., COZZITORTO, J., ARBIOL, G., BARBY, P., WEISS, C., GALIANA, E. Coordinated regulation of genes for genes for secretion in tobacco at late developmental stages:

association with resistance against oomycetes. **Plant Physiology**, v.134, p.858-870, 2004.

ICHIHARA, A., OIKAWA, H. Biosynthesis of phytotoxins from *Alternaria solani*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.61, p.12-18, 1997.

JENNINGS, D.B., EHRENSHAFT, M., PHARR, D.M., WILLIAMSON, J.D. Roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in active oxygen-mediated plant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.95, p.15129-15133, 1998.

JOHNSON, C., BODEN, E., ARIAS, J. Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v.15, p.1846-1858, 2003.

JIA, Y., McADAMS, S.A., BRYAN, G.T., HERSHEY, H.P. VALENT B. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. **The EMBO Journal**, v.19, p.4004-4014, 2000.

KARIOLA, T., PALOMÄKI, T.A., BRADER, G., PALVA, E.T. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia*-derived elicitors HrpN and PehA trigger distinct but interacting defense responses and cell death in Arabidopsis. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.16, p.179-187, 2003.

KARIOLA, T., BRADER, G., LI, J., PALVA, E.T. Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants. **The Plant Cell**, v.17, p.282-294, 2005.

KOLOMIETS, M.V., HANNAPEL, D.J., GLADON, R.J. Nucleotide sequence of a cDNA clone for a lipoxygenase from abscisic acid-treated potato leaves (accession n°. U60202) (PGR 96-069). **Plant Physiology**, v.112, p.445, 1996.

KOLOMIETS, M.V., CHEN, H., GLADON, R.J., BRAUN, E.J., HANNAPEL, D.J. A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection. **Plant Physiology**, v.124, p.1121-1130, 2000.

KONG, H., Y., JUNG, H.W., LEE, S.C., CHOI, D., HWANG, B.K. A gene encoding stellacyanin is induced in *Capsicum annuum* by pathogens, methyl jasmonate, abscisic acid, wounding, drought and salt stress. **Physiologia Plantarum**, v.115, p.550-562, 2002.

KUNKEL, B., BROOKS, D. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.325-331, 2002.

KUMAR, D., KLESSIG, D.F. High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.100, p.16101-16106, 2003.

LAMB, C., DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v.48, p.251–275, 1997.

LAU, E.Y. **Identificação e caracterização parcial de genes diferencialmente expressos na interação tomateiro – *Meloidogyne incognita***. 2005. 77p. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

LAWRENCE, C.B.; JOOSTEN, M.H.A.J.; TUZUN, S. Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.48, p.361-377, 1996.

LAWRENCE, C.B., SINGH, N.P., QIU, J., GARDNER, R.G., TUZUN, S. Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* and may function as an elicitor release mechanism. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.57, p.211-220, 2000.

LEON, J., SHULAEV, V., YALPANI, N., LAWTON, M.A., RASKIN, I. Benzoic acid 2-hydroxylase, a soluble oxygenase from tobacco, catalyzes salicylic acid biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.92, p.10413-10417, 1995.

LI, J., BRADER, G., PALVA, E.T. The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. **The Plant Cell**, v.16, p.319-331, 2004.

LIANG, P. A decade of differential display. **BioTechniques**, v.33, p.338-346, 2002.

LIANG, P., PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, v.257, p.967-971, 1992.

LINCOLN, J.E., RICHAEAL, C., OVERDUIN, B., SMITH, K., BOSTOCK, R., GILCHIST, D.G. Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.99, p.15217-15221, 2002.

LIU, G.S., HOLUB, E.B., ALONSO, J.M., ECKER, J.R., FOBERT, P.R. An Arabidopsis NPR1-like gene, NPR4, is required for disease resistance. **The Plant Journal**, v.41, p.304-318, 2005.

LOGEMANN, J., SCHELL, J., WILLMITZER, L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. **Analytical Biochemistry**, v.163, p.16-20, 1987.

LOPES, C.A., SANTOS, J.R.M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA/CNPQ.1994, 67p.

LOPES, C.A., ÁVILA, A.C. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA/CNPQ. 2005, 151p.

LORENZO, O., PIQUERAS, R., SÁNCHEZ-SERRANO, J.J., SOLANO, R. Ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **The Plant Cell**, v.15, p.165-178, 2003.

LORENZO, O., CHICO, J.M., SÁNCHEZ-SERRANO, J.J., SOLANO, R. Jasmonate-insensitive1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v.16, p.1938-1950, 2004.

LORENZO, O., SOLANO, R. Molecular players regulating the jasmonate signalling network. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p.532-540, 2005.

LU, M., TANG, X., ZHOU, J-M. Arabidopsis NHO1 is required for general resistance against *Pseudomonas* bacteria. **Plant Cell**, v.13, p.437-447, 2001.

MAIERO, M. Genetic analysis of early blight resistance in tomatoes. **HortScience**, v.24, p.221-226, 1989.

MAIERO, M., Inheritance of collar rot resistance in the tomato breeding lines c1943 and NC EBR-2. **Phytopathology**, v.80, p.1365-1368, 1990.

MARTIN, G.B., BOGDANOVA, A.J., SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annual Review of Plant Biology**, v.54, p.23-61, 2003.

MAUCH-MANI, B., SLUSARENKO, A.J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of Arabidopsis to *Pemnospora parasitica*. **Plant Cell**, v.8, p.203-212, 1996.

MATEO, A., MUHLENBOCK, P., RUSTÉRUCCI, C., CHANG, C.C., MISZALSKI, Z., KARPINSKA, B., PARKER, J.E., MULLINEAUX, P.M., KARPINSKI, S. Lesion simulating disease 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. **Plant Physiology**, v.136, p.2818-2830, 2004.

MATHUR, N.; SHEKAWAT, R. Chemical control of early blight in kharif sown tomato. **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology**, v.16, p.235-240, 1986.

MATTON, D.P., BRISSON, N. Cloning, expression, and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts of potato. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.2, p.325-331, 1989.

McCONN, M., CREELMAN, R.A., BELL, E., MULLET, J.E., BROWSE, J. Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.94, p.5473-5477, 1997.

McDOWELL, J.M., DANGL, J.L. Signal transduction in the plant immune response. **Trends in Biochemical Sciences**, v.25, p.79-82, 2000.

McGRATH, K.C., DOMBRECHT, B., MANNERS, J.M., SCHENK, P.M., EDGAR, C.I., MACLEAN, D.J., SCHEIBLE, W.R., UDVARDI, M.K., KAZAN, K. Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of Arabidopsis transcription factor gene expression. **Plant Physiology**, v.139, p.949-959, 2005.

MAHALINGAM, R., WANG, G., KNAP, H.T. Polygalacturonase and polygalacturonase inhibitor protein: gene isolation and transcription in *Glycine max-Heterodera glycines* interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, p.490-498, 1999.

MILLER, M.E. Relationships between onion leaf age and susceptibility to *Alternaria porri*. **Plant Disease**, v.67, p.284-286, 1983.

MILLS, W.R. *Phytophthora infestans* on tomato. **Phytopathology**, v.30, p.830-839, 1940.

MOERSCHBACHER, B.M., NOLL, U., GORRLCHON, L., REISENER, H.J. Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust. **Plant Physiology**, v.93, p.465-470, 1990.

MOU, Z., FAN, W., DONG, X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. **Cell**, v.113, p.935-944, 2003.

MURPHY, D. Gene expression studies using microarrays: principles, problems, and prospects, **Advances in Physiology Education**, v.26, p. 256-270, 2002.

NARUSAKA, Y., NARUSAKA, M., SEKI, M., UMEZAWA, T., ISHIDA, J., NAKAJIMA, M. ENJU, A. Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stress In cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. **Plant Molecular Biology**, v.55, p.327-342, 2004.

NASH, A.F., GARDNER, R.G. Heritability of tomato early blight resistance derived from *Lycopersicon hirsutum* P.I. 126445. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. v.113, p.264-268, 1988.

NEGREL, J., JEANDET, P. Metabolism of tyramine and feruloyl-tyramine in TMV inoculated leaves of *Nicotiana tabacum*. **Phytochemistry**, v.26, p.2185-2190, 1987.

NEGREL, J., POLLET, B., LAPIERRE, C. Ether-linked ferulic acid amides in natural and wound periderms of potato tuber. **Phytochemistry**, v.43, p.1195-1199, 1996.

NIDERMAN, T., GENETET, I., BRUYÈRE, T., GEES, R., STINTZI, A., LEGRAND, M., FRITIG, B., MOSINGER, E. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. **Plant Physiology**, v.108, p.17-27, 1995.

NIKI, T., MITSUHARA, I., SEO, S., OHTSUBO, N., OHASHI, Y. Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. **Plant and Cell Physiology**, v.39, p.500-507, 1998.

NIMCHUK, Z., EULGEM, T., HOLT III, B.F., DANGL, J.L. Recognition and response in the plant immune system. **Annual Review of Genetics**, v.37, 579-609, 2003.

OH, I.S., PARK, A.R., BAE, M.S. KWON, S.J., KIM, Y.S., LEE, J.E., KANG, N.Y., LEE, S., CHEONG, H., PARK, O.K. Secretome analysis reveals an Arabidopsis lipase involved in defense against *Alternaria brassicola*. **The Plant Cell**, v.17, p.2832-2847, 2005.

OVERMYER, K., TUOMINEN, H., KETTUNEN, R., BETZ, C., LANGEBARTELS, C., SANDERMANN, H.Jr., KANGASJARVI, J. Ozone-sensitive Arabidopsis *rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. **The Plant Cell**, v.12, p.1849-1862, 2000.

PATTERSON, C.L. Importance of chlamydospores as primary inoculum for *Alternaria solani*, incitant of collar rot and early blight on tomato. **Plant Disease**, v.75, p.274-278, 1991.

PEDRAS, M.S.C., ZAHARIA, I.L., GAI, Y., ZHOU, Y., WARD, D.E. *In planta* sequential hydroxylation and glycosylation of a fungal phytotoxin: avoiding cell death and overcoming the fungal invader. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.98, p.747-752, 2001.

PELLETIER, J.R., FRY, W.E. Characterization of resistance to early blight in three potato cultivars: receptivity. **Phytopathology**, v.80, 361-366, 1990.

PETERSEN, M., BRODERSEN, P., NAESTED, H., ANDREASSON, E., LINDHART, U., JOHANSEN, B., NIESEN, H.B., LACY, M., AUSTIN, M.J., PARKER, J.E., SHARMA, S.B., KLESSIG, D.F., MARTIENSSEN, R., MATTSSON, O., JENSEN, A.B., MUNDY, J. Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. **Cell**, v.103, p.1111-1120, 2000.

PONSTEIN, A.S., BRES-VLOEMANS, S.A., SELA-BUURLAGE, M.B., Van Den ELZEN, P.J.M. MELCHERS, L.S., CORNELISSEN, B.J.C. A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. **Plant Physiology**, v.104, p.109-118, 1994.

PSCHEIDT, J.W. & STEVENSON, W.R. **Early blight of potato and tomato: A literature review**. Winsconsin, USA. College of Agricultural & Life Sciences. p.1-17, 1986.

RATHJEN, J.P., MOFFETT, P. Early signal transduction events in specific plant disease resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.300-306, 2003.

RESENDE, M.L.V., SALGADO, S.M.L., CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.123-130, 2003.

REYMOND, P., FARMER, E.E. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. **Current Opinion in Plant Biology**, v.1, p.404-411, 1998.

RICHMOND, C.S., GLASNER, J.D., MAU, R., JIN, H., BLATTNER, F.R. Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. **Nucleic Acids Research**, v.27, p.3821-3835, 1999.

RODRÍGUEZ, M.A.D. **Componentes da resistência de batata a *Alternaria solani***. 2003. 59p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

ROTEM, J. Thermoxerophytic properties of *Alternaria porri* f. sp. *solani*. **Phytopathology**, v.58, p.1284-1287, 1968.

ROTEM, J. **The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity**. St. Paul: APS Press, 1994. 326p.

ROYO, J., LEON, J., VANCANNEYT, G., ALBAR, J.P., ROSAHL, S., ORTEGO, F., CASTANERA, P., SANCHEZ-SERRANO, J.J. Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.96, p.1146-1151, 1999.

RUSTÉRUCCI, C., AVIV, D.H., HOLT, B.F., DANGL, J.L., PARKER, J.E. The disease resistance signaling components *EDS1* and *PAD4* are essential regulators of the cell death pathway controlled by *LSD1* in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v.13, p.2211-2224, 2001.

RYALS, J.A., NEUENSCHWANDER, U.H., WILLITS, M.G., MOLINA, A., STEINER, H-Y., HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, v.8, p.1809-1819, 1996.

SCHAEFER, S.C., GASIC, K.G., CAMMUE, B., BROEKAERT, W., Van DAMME, E.J.M., PEUMANS, W.J., KORBAN, S.S. Enhanced resistance to early blight in transgenic tomato lines expressing heterologous plant defense genes. **Planta**, v.222, p.858-866, 2005.

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

SHENK, P.M., KAZAN, K., WILSON, I.W., ANDERSON, J.P., RICHMOND, T., SOMERVILLE, S.C., MANNERS, J.M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.97, p.11655-11660, 2000.

SHENK, P.M., KAZAN, K., MANNERS, J.M., ANDERSON, J.P., SIMPSON, R.S., WILSON, I.W., SOMERVILLE, S.C., MACLEAN, D.J. Systemic gene expression in *Arabidopsis* during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. **Plant Physiology**, v.132, p.999-1010, 2003.

SHI, C., INGVARSDEN, C., THÜMMLER, F., MELCHINGER, A., E., WENZEL, G., LÜBBERSTEDT, T. Identification by suppression subtractive hybridization of genes that are differentially expressed between near-isogenic maize lines in association with sugarcane mosaic virus resistance. **Molecular Genetics and Genomics**, v.273, p.450-461, 2005.

SHIRASU, K. NAKAJIMA, H. RAJASEKHAR, V .K., DIXON, R.A., LAMB, C.J. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. **The Plant Cell**, v.9, p.261-270, 1997.

SIEDOW, J.N. Plant lipoxygenase: structure and function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42, p.145-188, 1991.

SOLANO, R., STEPANOVA, A., CHAO, Q.M., ECKER, J.R. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLEN-SENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. **Genes Development**, v.12, p.3703-3714, 1998.

SPLETZER, M.E.; ENYEDI, A.J. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. **Phytopathology**, v.89, p.722-727, 1999.

SPOEL, S.H., KOORNNEEF, A., CLAESSENS, S.M.C., KORZELIUS, J.P., Van PELT, J.A., MUELLER, M.J., BUCHALA, A.J., MÉTRAUX, J-P., BROWN, R., KAZAN, K., Van LOON, L.C., DONG, X., PIETERSE, C.M.J. NPR1 modulates cross-Talk between salicylate and Jasmonate dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. **The Plant Cell**, v.15, p.760-770, 2003.

STASWICK, P.E., SU, W., HOWELL, S.H. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.89, p.6837-6840, 1992.

STASWICK, P.E., YUEN, G.Y., LEHMAN, C.C. Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. **The Plant Journal**, v.15, p.747-754, 1998.

STASWICK, P.E., TIRYAKI, I. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v.16, p.2117-2127, 2004.

STEIN, J., LIANG, P. Differential display technology: a general guide. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.59, p.1235-1240, 2002.

SUBRAMANIAM, R., DESVEAUX, D., SPICKLER, C., MICHNICK, S.W., BRISSON, N. Direct visualization of protein interaction in plant cells. **Nature Biotechnology**, v.19, p.769-772, 2001.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed.- Porto Alegre: Artmed.2004. 719p.

TAKEMOTO, D., YOSHIOKA, H., DOKE, N., KAWAKITA, K. Disease stress-inducible genes of tobacco: expression profile of elicitor-responsive genes isolated by subtractive hybridization. **Physiologia Plantarum**, v.118, p.545-553, 2003.

TAKKEN, F.L.W., JOOSTEN, M.H.A.J. Plant resistance genes: their structure, function and evolution. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p.699-713, 2000.

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

TEWARI, J.P., SKOROPAD, W.P. Relationship between epicuticular wax and blackspot caused by *Alternaria brassicae* in three lines of rapeseed. **Canadian Journal of Plant Science**, v.56, p.781-785, 1976.

THALER, J.S., FIDANTSEF, A.L., BOSTOCK, R.M. Antagonism between jasmonate and salicylate-mediated induced plant resistance: Effects of concentration and timing of elicitation on defense-related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato. **Journal of Chemical Ecology**, v.28, p.1131-1159, 2002.

THOMMA, B.P.H.J., EGGERMONT, K., PENNINGCKX, I.A.M.A., MAUCH-MANI, B., VOGELSANG, R., CAMMUE, B.P.A., BROEKAERT, W.F. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.95, p.15107-15111, 1998.

THOMMA, B.P.H.J., EGGERMONT, K., TIERENS, F.M.-J., BROEKAERT, W.F. Requirement of functional *EIN2* (ethylene insensitive 2) gene for efficient resistance of *Arabidopsis thaliana* to infection by *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology**, v.121, p.1093-1101, 1999.

THOMMA, B.P.H.J. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. **Molecular Plant Pathology**, v.4, p.225-236, 2003.

TON, J., Van PELT, J.A., Van LOON, L.C. PIETERSE, C.M. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in Arabidopsis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.15, p.27-34, 2002.

TORNERO, P., RODRIGO, I., CONEJERO, V., VERA, P. Nucleotide sequence of a cDNA encoding a pathogenesis-related protein, p1-p14, from tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Physiology**, v.102, p.325, 1993.

TRUSOV, Y., ROOKES, J.E., CHAKRAVORTY, D., ARMOUR, D., SCHENK, P.M., BOTELLA, J.R. Heterotrimeric G proteins facilitate Arabidopsis resistance to necrotrophic pathogens and are involved in jasmonate signaling. **Plant Physiology**, v.140, p.210-220, 2006.

TSUGANE, T., WATANABE, M., YANO, K., SAKURAI, N., SUZUKI, H., SHIBATA, D. Expressed sequence tags of full-length cDNA clones from the miniature tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Micro-Tom. **Plant Biotechnology**, v.22, p.161-165, 2005.

UQUILAS, C., LETELIER, I., BLANCO, F., JORDANA, X., HOLUIGUE, L. NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in Arabidopsis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, p.34-42, 2004.

VAN DER BIEZEN, E.A., JONES, J.D.G. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. **Trends in biochemical sciences**, v.12, p.454-456, 1998.

Van KAN, J.A.L., JOOSTEN, M.H.A.J.; WAGEMAKERS, C.A.M., Van Den BERG-VELTHUIS, G.C.M., De WIT, P.J.G.M. Differential accumulation of mRNAs encoding extracellular and intracellular PR proteins in tomato induced by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. **Plant Molecular Biology**, v.20, p.513-527, 1992.

VLOUTOGLOU, I. KALOGERAKIS, S.N. Effects of inoculum concentration, wetness duration and plant age development of early blight (*Alternaria solani*), and on shedding of leaves in tomato plants. **Plant Pathology**, v.49, p.339-345, 2000.

Von ROEPENACK-LAHAYE, E., NEWMAN, M.A., SCHORNACK, S., HAMMOND-KOSACK, K.E., LAHAYE, T., JONES, J.D.G., DANIELS, M.J., DOW, J.M. *p*-Coumaroylnoradrenaline, a novel plant metabolite implicated in tomato defense against pathogens. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.43373-43383, 2003.

WANG, H., LI, J., BOSTOCK, R.M., GILCHRIST, D.G. Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. **Plant Cell**, v.8, p.375-391, 1996.

WEIGEL, R.R., PFITZNER, U.M., GATZ, C. Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates *PR* gene expression in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v.17, p.1279-1291, 2005.

WHALEN, M.C. Host defense in a developmental context. **Molecular Plant Pathology**, v.6, p.347-360, 2005.

WIERMER, M., FEYS, B.J., PARKER, J.E. Plant immunity: the EDS1 regulatory node. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p.383-389, 2005.

WILDERMUTH, M.C., DEWDNEY, J., WU, G., AUSUBEI, F.M. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense. **Nature**, v.414, p.562-565, 2001.

WYATT, S.E., PAN, S.Q., KUC, J. β -1,3-glucanase, chitinase and peroxidase activities in tobacco tissues resistant and susceptible to blue mould as related to flowering, age and sucker development. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.39, p.433-440, 1991.

YI, S.Y., KIM, J.H., JOUNG, Y.H., LEE, S., KIM, W.T., YU, S.H., CHOI, D. The pepper transcription factor CaPF1 confers pathogen and freezing tolerance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 136, p.2862-2874, 2004.

YU, D., CHEN, C., CHEN, Z. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. **The Plant Cell**, v.13, p.1527-1540, 2001.

XIE, D.X., FEYS, B.F., JAMES, S., NIETO-ROSTRO, M., TURNER, J.G. COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. **Science**, v.280, p.1091-1094, 1998.

XIONG, L., LEE, M-W., QI, M., YANG, Y. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, p.685-692, 2001.

XU, L., LIU, F., LECHNER, E., GENSHIK, P., CROSBY, W.L., MA, H., PENG, W., HUANG, D., XIE, D. The SCF^{COI1} ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. **Plant Cell**, v.14, p.1919-1935, 2002.

ZHEN-DONG, T., JUN, L., CONG-HUA, X. Isolation of resistance related-genes to *Phytophthora infestans* with suppression subtractive hybridization in the R-gene-free potato. **Acta Genetica Sinica**, v.30, p.597-605, 2003.

ZHOU, N., TOOTLE, T.L., GLAZEBROOK, J. Arabidopsis *PAD3*, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. **The Plant Cell**, v.11, p.2419-2428, 1999.

ANEXOS

Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados para análise de expressão de 24 genes previamente identificados em duas bibliotecas subtrativas que não tiveram indução em resposta a *A. solani* confirmada por RT-qPCR.

Possível Proteína	Acesso NCBI	Oligonucleotídeo (5' → 3')
Aminotransferase 2	AAQ56195	06-A09-F GAACAACAACGGCTGTGACTGT 06-A09-R GGCTTGAAGAACTGCACTCAGA
Precursor do inibidor de proteinase CEVI57	CAA64416	22-G06-F GTGTTAAGGCGTGTTCGTTCCA 22-G06-R TTTGTCAGGAAATGGCCAGAA
LescPth3	AAF76310	12-A06-F GCTGCACGGGTTCTTCAAAA 12-A06-R AAGCCAACGGATGCATGTC
ACC oxidase	CAA41212	12-C03-F TCATCAACCTCGGTGACCAA 12-C03-R CCTGTGCTCCACACTCTTGTATTT
Possível Acil-CoA sintetase	AAL29212	06-B08-F GCATCAGGGAAAATTCAACGA 06-B08-R TGGCAGTTGAAATCTGAGCAA
Relacionado a Formação de HR	AAL32300	07-H08-F GGCATTCCGAAATTGGCTTA 07-H08-R TGTGCTACCAAACCATTGAGTT
Proteína 14-3-3	P93214	08-H07-F GCTGCGGAGGCGGAAT 08-H07-R TTAAAGCCAGTCCCAGACGAA
FT relacionado a 'POZ'	NP201121	09-G12-F AGGAGCCCTGCACAAAGAAG 09-G12-R GCTGGACGCCTTGACATGT
Enzima conjugada a ubiquitina E2-17	P35135	21-G12-F TCCCCCACATCATGCA 21-G12-R GCTTGCCAATGGAACATATCC
FT Myb1	AAO45179	09-F10-F AATGCCTAATCCATCAAATCGAT 09-F10-R ACGATGGCTCGATTGTTGAAT
Serina/treonina cinase	NP194459	13-C11-F CATCTGAGAAATCACTCCACATTC 13-C11-R.. CCAAGTTCTATAAATGAAGTTACCATCACA
Induzida por fermento - Win	BAA95791	10-E12-F TCAACCGCCGCAATCAG 10-E12-R GCCATGCATTGAAACAAAGGA
WRKY4	AAF61864	09-E03-F GATCAAATTCATCATCAAGCTCTGA 09-E03-R TGTTGCTGGAGTGAGATGATCAT
FT da família bHLH	NP200279	11-D11-F GGAGGCATGAATTGCCACAT 11-D11-R AGCAAGCTGGTGCCAATCA
Proteína contendo zíper leucina	AAR20445	11-G07-F TTTCCCTGCTGTCCCTTGATGT 11-G07-R TCCACCATCCTGTCCAACCTC
FT RMA1	AAR99376	14-F12-F TTCACTTCCATCGCAACAATT 14-F12-R GCCGTGTAGCTCCCTGAATG
'Heat shok' 70	CAA47948	14-B07-F GACGAAACCAAAAACATGAGGAT 14-B07-R CCTAAGATCGAGGAGGTGCGACTAA
Proteína-G (SGP1)	BAB08763	20-D08-F GCTTTCATTGCCTTTGCATATG 20-D08-R TCCGCCAGACATTCAATGGT
Relacionada à Ras-GTP	Q40522	07-H11-F CCCCCTTGGCTGGAAGA 07-H11-R CGATCAGAATGATCACGATATTCCT
Proteína de ligação a calmodulina TCB60	AAN65367	07-E05-F CCCACCTCATTGCAGCCTTA 07-E05-R GCACACGGCCAGGAAAAG
Proteína L23	CAA60370	20-A02-F AAGCATTGGGTGCAACTCTTCT 20-A02-R TCCCGGAAGTCGATGACTATTC
Proteína hipotética PhapfoPp091	YP358637	14-A03-F TGAGTGCTCTCCTATTCCGACTT 14-A03-R CGCTGTCTCGGCTGTGCTA
Desconhecida	NP565383	12-B05-F GGGATGTTATCACGATTTTTGTTAGTG 12-B05-R ATTCAGAACAATGGCAACTCCTAT
Desconhecida	-	07-B11-F GGTGGAATGAAGAGTTGGAGAA 07-B11-R AACGGCCATACCTCGAGAAA

Tabela 6 - Lista complementar dos ESTs identificados na biblioteca subtrativa da interação tomateiro - *A. solani* construída a partir de mRNA isolado de folhas de tomateiro coletadas 24 hai.

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº. ESTs
V. Transporte							
CLEEBA2-23	Proteína de ligação a íons metálicos (<i>A. thaliana</i>)	Similar a proteínas expressas em resposta a deficiência de ferro	SGN-U213810	0	NP567441	3e-90	4
VI. Metabolismo							
CLEEBA2-24	NADH-Glutamato desidrogenase (<i>L. esculentum</i>)	Metabolismo de aminoácidos; biossíntese de glutamato; atividade oxirredutase	SGN-U225530	0	AAL36888	8e-144	30
CLEEBA2-25	S-adenosilmetionina decarboxilase proenzima (AdoMetDC) (<i>S. tuberosum</i>)	Biossíntese de espermidina, espermina, etileno e lignina	SGN-U212634	0	Q04694	0	20
CLEEBA2-26	Glutamato descarboxilase isozima I (<i>N. tabacum</i>)	Proteína rica em glicina, cataliza a alfa-descarboxilação do glutamato	SGN-U212549	0	-	-	14
CLEEBA2-27	Beta-galactosidase (<i>L. esculentum</i>)	Expressa durante o desenvolvimento do fruto	SGN-U225886	1e-153	AAF70822	6e-60	12
CLEEBA2-28	ATP sintase CF1 subunidade alfa (<i>L. esculentum</i>)	-	SGN-U303155	2e-11	YP635624	6e-17	7
CLEEBA2-29	5,10-metilenotetraidrofolato desidrogenase (<i>Pisum sativum</i>)	Biossíntese de ácido fólico e derivados; atividade catalítica	SGN-U217431	0	CAB56756	5e-82	6
CLEEBA2-30	Proteína embrião-abundante EMB (<i>Pisum sativum</i>)	Atividade metiltransferase dependente de S-adenosilmetionina	SGN-U213285	0	AAM19356	2e-33	4
CLEEBA2-31	Glutamato descarboxilase (<i>N. tabacum</i>)	Biossíntese de glutamato; descarboxilação do glutamato para succinato;	SGN-U212561	0	AAM48129	1e-52	4
CLEEBA2-32	Possível desidratase/desaminase (<i>O. sativa</i>)	Metabolismo de aminoácidos, biossíntese de isoleucina	SGN-U215899	0	AAL58211	4e-47	3
CLEEBA2-33	UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthase (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	Atividade UDP-glucoronato descarboxilase	SGN-U213087	0	AAQ91380	2e-37	3
CLEEBA2-34	Asparagina sintetase (<i>Helianthus annuus</i>)	Catabolismo de aminoácidos, biossíntese de asparagina	SGN-U215486	2e-97	-	-	2
CLEEBA2-35	Possível mio-inositol oxigenase (<i>Oryza sativa</i>)	Metabolismo do mio-inositol	SGN-U214186	0	7487428	7e-46	2
CLEEBA2-36	Bifuncional lisina-ketoglutarato reductase/sacaropina desidrogenase (<i>Gossypium hirsutum</i>)	Catabolismo de lisina; biossíntese de glutamato	SGN-U213373	1e-167	AAN14410	6e-20	3
CLEEBA2-37	Preferato desidrogenase (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de tirosina	SGN-U216071	0	NP173023	4e-48	2
LEEBA212C04	Acil-CoA oxidase 4 (<i>A. thaliana</i>)	Metabolismo de lipídeos e biossíntese de ácidos graxos	SGN-U223228	0	NP190752	4e-65	1
LEEBA212D10	Ntdin (<i>N. tabacum</i>)	Possivelmente envolvida no metabolismo do enxofre e nitrogênio	SGN-U215783	1e-174	BAA88985	2e-37	1
LEEBA214D03	2-isopropilmalato sintase B (<i>Lycopersicon pennellii</i>)	Biossíntese de leucina	SGN-U227848	1e-106	O04974	-	1

Tabela 6 - Continuação.

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº. ESTs
LEEBA215F02	Cistationina beta-liase (<i>S. tuberosum</i>)	Biossíntese de aminoácidos, lipídeos e etileno	SGN-U219945	1e-167	AAF74980	3e-04	1
VII. Fotossíntese							
LEEBA221D12	Precursor de um polipeptídeo de 10 kDa do fotossistema II (<i>L. esculentum</i>)	Síntese de ATP e NADPH	SGN-U212660	4e-66	-	-	1
LEEBA213F10	Possível ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (<i>A. thaliana</i>)	Ciclo de Calvin;fixação de carbono	SGN-U219236	0	AAM61650	3e-10	1
VIII. Resposta a hormônios							
CLEEBA2-38	Precursor do inibidor de proteinase I responsivo a etileno (<i>L. esculentum</i>)	Expresso durante o amadurecimento dos frutos	SGN-U217278	1e-99	P20076	4e-27	9
IX. Proteínas estruturais							
CLEEBA2-39	Proteína da membrana plasmática (<i>N. tabacum</i>)	Membro da família de proteínas de membrana DREPP	SGN-U213704	0	CAA69900	2e-51	9
CLEEBA2-40	Possível proteína de ligação a proteína (<i>Solanum demissum</i>)	Similar a família de proteínas contendo repetições kelch,	SGN-U222346	1e-102	AAT40540	1e-68	3
LEEBA212H06	Alfa-tubulina (<i>N. tabacum</i>)	Constituinte estrutural do citoesqueleto	SGN-U212647	5e-81	CAD13178	-	1
X. Transcrição/tradução							
CLEEBA2-41	Fator de início da tradução eIF-5A1 [<i>L. esculentum</i>]	Envolvido na formação do complexo entre o ribossomo e o mRNA	SGN-U225500	0	AAG53647	8e-58	4
CLEEBA2-42	RNA helicase DB10 (<i>N. sylvestris</i>)	Splicing de RNA	SGN-U214867	0	P46942	9e-35	3
CLEEBA2-43	Fator de início da tradução (<i>A. thaliana</i>)	Proteína contendo domínio eIF4-gamma/eIF5/eIF2-epsilon	SGN-U215289	0	NP568534	1e-24	2
CLEEBA2-44	Proteína de ligação ao cap (<i>A. thaliana</i>)	Liga-se especificamente a 7-metil guanosina	SGN-U216381	0	NP197312	3e-70	2
LEEBA221A01	RNA polimerase (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de RNA	SGN-U216802	0	NP188871	7e-34	1
XI- Degradação/modificação de proteínas							
CLEEBA2-45	Enzima conjugada a ubiquitina E2-17 kDa (<i>L. esculentum</i>)	Cataliza a ligação covalente da ubiquitina a resíduos lisina na proteína alvo	SGN-U213089	0	P35135	6.8e-84	3
CLEEBA2-46	Proteína da família de enzimas que conjugam com ubiquitina E2 (<i>A. thaliana</i>)	Catalisa a ligação da ubiquitina com resíduos lisina na proteína alvo	SGN-U212836	0	AAZ20287	5e-46	2
CLEEBA2-47	Proteína desconhecida (<i>O. sativa</i>)	Possivelmente envolvido na ligação de um miristoil ao N-terminal de uma proteína	SGN-U213689	0	XP470153	7e-15	2
LEEBA214E02	Precursor de uma Clp protease dependente de ATP	Atividade peptidase dependente de ATP	SGN-U213178	0	-	-	1
LEEBA214A01	Treonina endopeptidase (<i>A. thaliana</i>)	Catabolismo de proteínas dependente de ubiquitina	SGN-U216307	0	NP566818	2e-11	1
LEEBA220G12	Proteína J8 (<i>A. thaliana</i>)	Atividade chaperona	SGN-U219348	0	NP178207	4e-14	1
LEEBA221B02	Possível proteína DnaJ (<i>Malus domestica</i>)	Envolvida no dobramento de proteínas incluindo proteínas expressas em resposta a choque térmico	SGN-U220274	0	AAQ54533	5e-42	1
LEEBA221A07	Dissulfito isomerase (<i>I. batatas</i>)	Rearranjo de pontes dissulfito em proteínas	SGN-U212983	0	AAT39459	1e-08	1

Tabela 7 - Lista complementar dos ESTs identificados na biblioteca subtrativa da interação tomateiro - *A. solani* construída a partir de mRNA isolado de folhas de tomateiro coletadas 36 hai

Contig/ Clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº ESTs
VI. Proteção à célula							
CLEEBA3-44	Possível RNA helicase (<i>A. thaliana</i>)	Envolvida em reparo e recombinação de DNA	SGN-U219774	0	NP188872	1e-22	3
CLEEBA3-45	Proteína rica em prolina (<i>L. esculentum</i>)	Expressa em resposta ao dano provocado por Ultra Violeta	SGN-U213687	0	-	-	3
CLEEBA3-46	Proteína 1 de ligação ao DNA danificado por UV (<i>L. esculentum</i>)	Reparo de DNA	SGN-U217293	0	AAR20885	1e-125	2
CLEEBA3-47	Provável glutadione-S-transferase (<i>S. tuberosum</i>)	Envolvida no catabolismo de toxinas, complexando-as ao glutadione	SGN-U212753	0	P32111	1e-51	2
CLEEBA3-48	Proteína similar a glutathione-S-transferase (<i>L. esculentum</i>)	Catabolismo de toxinas	SGN-U213822	0	AAL92873	7e-108	2
CLEEBA3-49	Proteína contendo domínio similar a rodanese (<i>A. thaliana</i>)	Sulfurtransferase envolvida na detoxificação de cianida	SGN-U219334	0	NP566766	4e-39	2
CLEEBA3-50	Proteína hipotética (<i>O. sativa</i>)	Similar a UMUC, possivelmente envolvida em reparo de DNA	SGN-U293671	6e-92	NP920925	7e-39	2
LEEBA323C06	Glutathione-S-transferase (<i>Capsicum annuum</i>)	Catabolismo de toxinas	SGN-U213563	0	AAN39918	8e-45	1
LEEBA306D01	Proteína similar metalotioneína (<i>L. esculentum</i>)	Envolvida em detoxificação, liga-se a cobre e outros metais que se encontram em excesso	SGN-U212973	0	CAA92243	1e-14	1
LEEBA307F02	Proteína RAD23 (<i>L. esculentum</i>)	Reparo de DNA	SGN-U218382	0	CAB51544	2e-67	1
LEEBA308C01	Glutathione-S-transferase (<i>Solanum commersonii</i>)	Catabolismo de toxinas	SGN-U215144	0	AAB65163	1e-18	1
LEEBA309C10	Glutathione-S-transferase GST 23 (<i>Glycine max</i>)	Catabolismo de toxinas	SGN-U216884	1e-129	-	-	1
LEEBA309D10	Proteína rica em prolina (<i>L. esculentum</i>)	Possivelmente envolvida em reparo de DNA	SGN-U230855	0	-	-	1
LEEBA311E06	Provável Glutathione transferase (<i>Glycine max</i>)	Catabolismo de toxinas conjugando-as ao glutathione	SGN-U221531	8e-69	-	-	1
LEEBA324C10	Glutathione-S-Transferase (<i>Euphorbia esula</i>)	Detoxificação da célula	SGN-U215586	0	AAF64449	1e-45	1
LEEBA324E12	Similar a uma glicoproteína rica em hidroxiprolina (<i>O. sativa</i>)	Homologia com rodanese que apresenta atividade sulfurtransferase (detoxificação)	SGN-U275845	8e-80	BAD27963	1e-07	1
VII. Transporte							
CLEEBA3-52	Similar a proteína endossomal (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de membrana envolvida em transporte e biossíntese de cisteína	SGN-U221899	1e-137	BAB09103	1e-17	3
CLEEBA3-53	Oxoglutarato/malato translocador (<i>S. tuberosum</i>)	Proteína da membrana mitocondrial envolvida em transporte e fosforilação oxidativa	SGN-U213605	0	CAA68164	3e-56	2
CLEEBA3-54	ATGCN5 (<i>A. thaliana</i>)	Proteína da família de transportadores ABC	SGN-U217051	1e-174	NP201289	NP201289	2

Tabela 7 – Continuação.

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº. ESTs
CLEEBA3-55	Possível ABC transportador 2 inibido por Fe (<i>O. sativa</i>)	Envolvida no transporte de nitrato, aminoácidos e proteínas	SGN-U213231	0	BAD54675	2e-07	2
CLEEBA3-56	Proteína contendo domínio de associação a metais pesados (<i>A. thaliana</i>)	Envolvida no transporte de íons metálicos	SGN-U215387	1e-49	-	-	2
CLEEBA3-57	Possível proteína de ligação a ATP subfamília B (<i>O. sativa</i>)	Similar a proteínas da família de transportadores ABC	SGN-U281973	0	BAD31127	3e-70	2
LEEBA306A07	Proteína de adesão NSF (Alfa-SNAP) (<i>S. tuberosum</i>)	Transporte vesicular de proteínas do RE para o aparato de golgi	SGN-U213871	0	AAF37280	6e-43	1
LEEBA306B01	Proteína relaciona a autofagocitose (<i>A. thaliana</i>)	Transporte de proteínas do citoplasma para o vacúolo	SGN-U216274	0	NP568934	1e-42	1
LEEBA306F02	Possível proteína de resposta ao amadurecimento (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de membrana envolvida em transporte	SGN-U219674	0	NP201341	1e-61	1
LEEBA306F07	Glutamato permease (<i>L. esculentum</i>)	Proteína de membrana envolvida no transporte de glutamato	SGN-U231703	0	-	-	1
LEEBA306G12	Proteína da família VAMP (<i>A. thaliana</i>)	Proteína associada à membrana da vesícula	SGN-U223189	0	NP567627	8e-19	1
LEEBA307E04	Transportador de sulfato (<i>A. thaliana</i>)	Possibilita o movimento de íons sulfato dentro da célula e entre células	SGN-U285654	0	-	-	1
LEEBA308A12	Similar a proteínas da família de transportadores de Mg CorA (<i>A. thaliana</i>)	Transporte intra e extracelular do íon Mg	SGN-U216026	0	-	-	1
LEEBA308C06	Amino ácido permease 2 (AAP2) (<i>L. esculentum</i>)	Proteína de membrana com atividade aminoácido permease	SGN-U223264	1e-86	-	-	1
LEEBA308G08	Provável aquaporina tipo PIP pTOM75 (<i>L. esculentum</i>)	Proteína de membrana envolvida na formação de canais de água	SGN-U212565	0	CAA52067	1e-69	1
LEEBA308H04	AT3g62770/F26K9-200 (<i>A. thaliana</i>)	Relacionada com transporte	SGN-U216325	0	AAK62600	2e-34	1
LEEBA308H10	Fosfato/fosfoenolpiruvato translocador TABPPT10 (<i>N. tabacum</i>)	Transporte de fosfoenolpiruvato e fosfato através da membrana do cloroplasto	SGN-U214131	0	AAB40648	1e-87	1
LEEBA309D04	Proteína de transferência de lipídeos (LTP) (<i>A. thaliana</i>)	Transporte de lipídeos	SGN-U223001	0	-	-	1
LEEBA309G08	Possível proteína de transporte de peptídeos (<i>O. Sativa</i>)	Transporte intra e extracelular de oligopeptídeos	SGN-U228653	4e-57	-	-	1
LEEBA310A11	Triose fosfato translocador (<i>S. tuberosum</i>)	Proteína de membrana mitocondrial envolvida no transporte de fosfato	SGN-U213108	0	CAA47430	-	1
LEEBA310H11	Glutamato permease (<i>Gossypium hirsutum</i>)	Proteína de membrana envolvida no transporte de glutamato	SGN-U221305	1e-112	-	-	1
LEEBA311E10	Proteína da família Tic 20 (<i>A. thaliana</i>)	Transporte intracelular	SGN-U216047	1e-118	BAC41843	4e-29	1

Tabela 7 – Continuação.

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº. ESTs
LEEBA311G10	Aquaporina PIP1-2 (<i>Vitis berlandieri</i>)	Proteína de membrana envolvida no transporte de água	SGN-U219310	0	AAF71818	1e-33	1
LEEBA322B05	Sintaxina (<i>Glycine max</i>)	Transporte vesicular do Golgi para outras partes da célula	SGN-U214226	2e-83	AAN03474	2e-19	1
LEEBA322B09	Proteína similar a TED4 (<i>Zinnia elegans</i>)	Proteína de ligação e transporte de lipídeos	SGN-U214087	1e-171	BAA06462	2e-18	1
LEEBA322E08	Proteína da família dos carreadores mitocondriais (<i>A. thaliana</i>)	Transporte mitocondrial	SGN-U219357	6e-97	NP567790	2e-13	1
LEEBA322G04	Possível proteína da membrana mitocondrial (<i>O.sativa</i>)	Transporte de proteínas	SGN-U224027	1e-134	NP912438	9e-26	1
LEEBA322H07	ADP/ATP translocador (<i>L. esculentum</i>)	Transporte de nucleotídeos púricos	SGN-U212911	1e-170	AAB49700	3e-15	1
LEEBA323B08	Proteína da família dos transportadores de aminoácidos (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de membrana envolvida no transporte de aminoácidos	SGN-U222480	1e-170	NP850312	1e-14	1
LEEBA323C04	Transportador de carboidratos (<i>A. thaliana</i>)	Possivelmente envolvida no transporte de carboidratos	SGN-U238337	1e-24	NP196581	6e-38	1
LEEBA324A05	VAMP7C (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de membrana envolvida em transporte vesicular	SGN-U216770	0	NP194942	5e-70	1
LEEBA325F01	Proteína de reconhecimento de sinal (SRP) (<i>L. esculentum</i>)	Ribonucleoproteína de ligação e transporte de proteínas para o RE	SGN-U297624	1e-48	-	-	1
LEEBA325H02	Aminoácido transporter (<i>L. esculentum</i>)	Proteína de membrana com atividade aminoácido permease	SGN-U276046	0	AAO13689	2e-74	1
LEEBA325H11	LeOPT1 (<i>L. esculentum</i>)	Proteína da membrana do RE envolvida no transporte de peptídeos	SGN-U284169	0	AAD01600	5e-66	1
VIII. Metabolismo							
CLEEBA3-58	Glutamato descarboxilase isozima I (<i>N. tabacum</i>)	Proteína rica em glicina, cataliza alfa-descarboxilação do glutamato	SGN-U212549	0	-	-	15
CLEEBA3-59	NADH-Glutamato desidrogenase (<i>L. esculentum</i>)	Biossíntese de aminoácidos; biossíntese de glutamato; atividade oxirredutase	SGN-U225530	0	AAL36888	4e-128	6
CLEEBA3-60	Proteína da família N-acetyltransferase (GNAT) (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de arginina; atividade acetiltransferase	SGN-U217862	7e-79	NP179875	2e-21	5
CLEEBA3-61	Proteína da família stritosidina sintase (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de alcalóides	SGN-U217102	0	NP190712	2e-75	4
CLEEBA3-62	Proteína expressa (<i>A. thaliana</i>)	Possivelmente envolvida na biossíntese de arcorbato	SGN-U213001	0	AAL07213	1e-97	4
CLEEBA3-63	Álcool desidrogenase (<i>S. Tuberosum</i>)	Biossíntese de tetraidrobiopterina	SGN-U214301	1e-142	AAN32641	3e-09	3
CLEEBA3-64	IAA-Alaidrolase 3 (IAR3) (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de Lisina e arginina e no metabolismo de Auxina	SGN-U214626	0	NP175587	9e-15	3

Tabela 7 – Continuação.

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº. ESTs
CLEEBA3-65	ketol-ácida reductoisomerase (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de prolina, valina e isoleucina; Catalisa a conversão de NADP em NADPH	SGN-U213246	0	NP191420	2e-27	3
CLEEBA3-66	Omega 6 dessaturase (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Síntese de ácidos graxos	SGN-U288399	1e-160	AAT72296	8e-60	3
CLEEBA3-67	Possível citocromo P450 (<i>O. Sativa</i>)	Envolvido na cadeia de transporte de elétrons, ligando-se especificamente com O ₂	SGN-U224709	0	BAD61160	9e-37	3
CLEEBA3-68	Glicolato oxidase (<i>L. esculentum</i>)	Atividade oxiredutase; transporte de elétrons	SGN-U213050	0	NP188060	2e-109	3
CLEEBA3-69	Glioxissomal malato desidrogenase (<i>L. esculentum</i>)	Metabolismo intermediário do ácido tricarbóxico	SGN-U268509	0	AAU29200	8e-142	3
CLEEBA3-70	Proteína da família oxirredutase desidrogenase de ligação a Zn (<i>A. thaliana</i>)	Catabolismo de treonina	SGN-U214816	0	NP191205	2e-33	3
CLEEBA3-71	Asparagina sintase (<i>Helianthus annuus</i>)	Biossíntese de asparagina	SGN-U215486	1e-98	-	-	3
CLEEBA3-72	Possível proteína relacionada com amadurecimento (<i>Vitis vinifera</i>)	Envolvida na maturação; compõe a estrutura da parede celular	SGN-U213072	0	CAB85628	1e-67	2
CLEEBA3-73	Proteína ATAPRL7 (<i>A. thaliana</i>)	Transporte de elétrons	SGN-U220928	0	NP568360	5e-39	2
CLEEBA3-74	NADH desidrogenase ubiquinone oxirredutase (<i>S. tuberosum</i>)	Transporte de elétrons e síntese de ATP	SGN-U225510	0	CAA59062	3e-69	2
CLEEBA3-75	Alanina aminotransferase (<i>Capsicum annuum</i>)	Metabolismo de alanina, atividade transaminase	SGN-U213569	0	AAR05449	3e-103	2
CLEEBA3-76	Mio-inositol oxigenase (<i>A. thaliana</i>)	Atividade inositol oxigenase	SGN-U214186	0	NP172904	4e-54	2
CLEEBA3-77	Asparagina sintase (<i>Triphysaria versicolor</i>)	Biossíntese de asparagina e transporte de nitrogênio	SGN-U215487	0	O24661	0	2
CLEEBA3-78	β-amilase (<i>Prunus armeniaca</i>)	Metabolismo de carboidratos, catabolismo de polissacarídeos	SGN-U213712	0	AAD38148	1e-55	2
CLEEBA3-79	Glicose-1-fosfato adenililtransferase (<i>S. tuberosum</i>)	Envolvida na biossíntese de amido	SGN-U225539	1e-139	1071859		2
CLEEBA3-80	Citocromo P450 76A2 (<i>Solanum melongena</i>)	Transporte de elétrons	SGN-U213748	0	-	-	2
CLEEBA3-81	Citocromo P450 monooxigenase (<i>A. thaliana</i>)	Transporte de elétrons	SGN-U213879	0	NP188087	2e-38	2
CLEEBA3-82	Proteína similar a glutaredoxina (<i>A. thaliana</i>)	Transporte de elétrons, metabolismo antioxidante	SGN-U216293	0	AAM67134	2e-29	2
CLEEBA3-83	Acil-CoA sintase (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de lipídeos, ácidos graxos e ácido teitóico	SGN-U214750	0	BAB40450	4e-42	2
CLEEBA3-84	Glutamina sintase (<i>L. esculentum</i>)	Biossíntese de glutamina	SGN-U213591	0	AAA50249	3e-57	2
CLEEBA3-85	Malato desidrogenase (<i>L. esculentum</i>)	Metabolismo do malato	SGN-U214051	0	CAH60894	4e-64	2
LEEBA306A06	Monodeidroascorbato redutase (<i>L. esculentum</i>)	Metabolismo antioxidante, atividade oxirredutase	SGN-U215267	1e-172	Q43497	6e-31	1

Tabela 7 – Continuação.

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº. ESTs
LEEBA306A08	Possível beta glicosidase (<i>L. esculentum</i>)	Realiza hidrólise de ligações glicosídicas	SGN-U240042	0	CAJ87637	1e-11	1
LEEBA306B04	Proteína da família das desidrogenases/reduases (SDR) (<i>A. thaliana</i>)	Atividade oxirredutase	SGN-U219216	0	NP192713	4e-20	1
LEEBA306B05	Possível tiredoxina THF1 (<i>A. thaliana</i>)	Transporte de elétrons no Cloroplasto	SGN-U220632	0	NP186922	7e-40	1
LEEBA306C03	Nicotinamina sintase (<i>L. esculentum</i>)	Envolvida na biossíntese de nicotinamina	SGN-U221288	1e-95	-	-	1
LEEBA306D07	Possível proteína de ligação a oxisterol (<i>O. sativa</i>)	Participa da biossíntese de ergosterol	SGN-U284588	1e-179	XP469455	5e-62	1
LEEBA306D11	Possível tioredoxina m2 (<i>Pisum sativum</i>)	Apresenta atividade dissulfito oxidoreductase, envolvida no transporte de elétrons no Cloroplasto	SGN-U216458	0	CAC69854	9e-30	1
LEEBA306E02	Epóxido hidrolase (<i>S. tuberosum</i>)	Promove a formação de um diol pela adição de água a um epóxido	SGN-U214200	0	AAA81891	6e-60	1
LEEBA306G07	Proteína desconhecida contendo domínios XH/XS (<i>A. thaliana</i>)	Associada a hidrólise de nucleotídeos trifosfatados	SGN-U215656	1e-160	CAB62356	4e-12	1
LEEBA306H10	Possível 6-fosfogliconolactonase (<i>O. sativa</i>)	Metabolismo de carboidratos	SGN-U216952	1e-112	XP479082	3e-19	1
LEEBA307A12	Provável glicosiltransferase twi1 (<i>L. esculentum</i>)	Catalisa a transferência de um grupo glicosil de um açúcar UDP para uma molécula hidrofóbica	SGN-U214429	1e-156	CAA59450	5e-46	1
LEEBA307B05	Proteína desconhecida (<i>A. thaliana</i>)	Possível ciclase	SGN-U218719	0	NP175091	7e-20	1
LEEBA307F03	Possível enzima de ativação de ubiquitina (<i>O. sativa</i>)	Atividade oxirredutase	SGN-U220877	0	BAD23175	2e-76	1
LEEBA307H06	Proteína da família PspA/IM30 (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de cloroplasto envolvida em transferência de lipídeos	SGN-U216012	0	NP564846	2e-10	1
LEEBA308A06	Frutocinase (<i>L. esculentum</i>)	Metabolismo de carboidratos	SGN-U213784	0	AAB51108	1e-87	1
LEEBA308A08	Proteína B12D (<i>Ipomoea batatas</i>)	Possivelmente associada com senescência	SGN-U213662	1e-158	AAD22104	7e-15	1
LEEBA308A09	Possível Xantina desidrogenase (<i>A. thaliana</i>)	Transporte de elétrons	SGN-U214062	0	NP195215	2e-72	1
LEEBA308B05	Proteína CAPIP1 (<i>C. annuum</i>)	Apresenta atividade carbamato cinase, envolvida no metabolismo de arginina	SGN-U275192	4e-16	-	-	1
LEEBA308B07	Proteína da família aldose 1-epimerase (<i>A. thaliana</i>)	Metabolismo de carboidratos	SGN-U217630	0	NP194104	3e-42	1
LEEBA308B11	Possível lecitina diacilglicerol colesterol aciltransferase (<i>O. sativa</i>)	Envolvida no metabolismo de lipídeos	SGN-U284414	0	BAD38311	2e-55	1
LEEBA308D09	Possível deidrodolil difosfato sintase (<i>A. thaliana</i>)	Envolvido na formação de deidrodolil difosfato	SGN-U221726	0	NP200685	4e-19	1
LEEBA308E01	Homólogo a aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (Proteína E8) (<i>L. esculentum</i>)	Proteína regulatória da síntese de etileno	SGN-U212804	0	CAA31789	4e-89	1

Tabela 7 – Continuação.

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº. ESTs
LEEBA308F06	Proteína de membrana – ATPase (<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>)	Compõe a bomba de prótons	SGN-U232995	0	AAA34096	3e-25	1
LEEBA308F11	Malato desidrogenase (<i>L. esculentum</i>)	Metabolismo do malato, atua no metabolismo intermediário no ciclo ácido tricarboxílico	SGN-U213052	0	7431232	2e-13	1
LEEBA308G02	Hidrolase catalítica (<i>A. thaliana</i>)	Proteína da família alfa/beta hidrolase	SGN-U221513	0	NP175660	1e-23	1
LEEBA309A10	Proteína expressa (<i>A. thaliana</i>)	Atividade transaminase, catalisa a transferência de um grupo amino para um aceptor	SGN-U220665	0	NP199794	4e-05	1
LEEBA309B03	NDPH Citocromo P450 redutase (<i>Glycine max</i>)	Possivelmente envolvida no metabolismo de fenilpropanóides	SGN-U214355	0	AAN85869	3e-11	1
LEEBA309D02	Fosforibosilformilglicinamidina sintase (<i>Glycine max</i>)	Biossíntese de bases púricas e apresenta atividade cinase	SGN-U217750	0	AAO23951	2e-08	1
LEEBA309E10	Precursor da proteína PAR-1c (<i>N. tabacum</i>)	Proteína que responde a fotoassimilados	SGN-U218442	0	CAA58732	2e-61	1
LEEBA309G01	Serina acetiltransferase (<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>)	Assimilação do enxofre e biossíntese de cisteína	SGN-U214945	0	AAR18403	2e-08	1
LEEBA309G06	Proteína expressa (<i>A. Thaliana</i>)	Possível metiltransferase	SGN-U279207	0	CAB78121	2e-43	1
LEEBA309H01	Precursor de uma glicoproteína secretada na epiderme EP1 (<i>Daucus carota</i>)	Interage com carboidratos mono, di ou trissacarídeos	SGN-U213319	1e-151	Q39688	1e-18	1
LEEBA310A02	Proteína relacionada a NADH-ubiquinona oxidoreductase (<i>A. thaliana</i>)	Transporte de elétrons na mitocôndria ligando-se ao íon Fe	SGN-U216253	1e-167	-	-	1
LEEBA310B05	Malato desidrogenase (<i>N. tabacum</i>)	Metabolismo do malato; transporte de elétrons	SGN-U212714	0	-	-	1
LEEBA310B06	Beta-amilase PCT-BMYI (<i>S. tuberosum</i>)	Degradação do amido e amilopectina	SGN-U229479	1e-160	-	-	1
LEEBA310C07	Proteína similar beta-cianoalanina sintase (<i>S. tuberosum</i>)	Biossíntese de cisteína, isoleucina e treonina	SGN-U214084	1e-154	BAB20032	8e-36	1
LEEBA310G06	Possível subunidade E de uma próton ATPase vacuolar (<i>Citrus limon</i>)	Compõe a bomba de prótons necessária para biossíntese de ATP	SGN-U213765	1e-137	AAD49706	2e-21	1
LEEBA310G12	Beta-ketoacil-ACP sintase III A (<i>Perilla frutescens</i>)	Biossíntese de ácidos graxos e metabolismo de acetil-CoA	SGN-U218414	0	AAC04693	8e-59	1
LEEBA310H07	Proteína da membrana plasmática H ⁺ -ATPase (<i>L. esculentum</i>) –	Bombeamento de prótons	SGN-U215042	1e-163	AAB17186	2e-19	1
LEEBA311A02	Provável isocitrato desidrogenase (NAD) (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de leucina e envolvida no ciclo do ácido tricarboxílico	SGN-U214718	0	NP568113	1e-46	1
LEEBA311B05	UDP-Glc-4-epimerase (<i>S. tuberosum</i>)	Envolvida na biossíntese de galactose	SGN-U214352	1e-135	AAP97493	3e-39	1
LEEBA311C04	Frutose 1,6 bifosfato aldolase (<i>Salicornia herbacea</i>)	Atua na glicólise	SGN-U223506	4e-94	-	-	1

Tabela 7 – Continuação.

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº. ESTs
LEEBA311C05	Cisteína plastídica sintase 1 (<i>S. tuberosum</i>)	Biossíntese de cisteína	SGN-U216996	0	BAB20862	4e-17	1
LEEBA311C11	Precursor de uma proteína similar a LYTB (<i>S. tuberosum</i>)	Biossíntese de isopentenil difosfato	SGN-U213466	0	ABB55395	1e-68	1
LEEBA311D07	Proteína relacionada com maturação de semente PM23 (<i>Glycine max</i>)	Proteína de ligação e transporte de lipídeos	SGN-U214424	0	-	-	1
LEEBA311E11	Glutamina sintetase (<i>Nicotiana glumbaginifolia</i>)	Biossíntese de glutamina	SGN-U215085	0	P12424	2e-75	1
LEEBA311G09	Proteína contendo repetições pentatricopeptídeo (PPR) (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de ligação ao cálcio, envolvida no catabolismo de lipídeos	SGN-U286037	1e-78	-	-	1
LEEBA311H05	3(2),5-bifosfato nucleotidase (<i>A. thaliana</i>)	Catalisa a remoção de um grupo fosfato de um mio-inositol fosforilado; metabolismo do enxofre	SGN-U277468	5e-34	NP192418	5e-40	1
LEEBA322A09	Fosfoenolpiruvato carboxilase 1 (<i>L. esculentum</i>)	Envolvida no ciclo do ácido tricarbóxico	SGN-U214322	0	CAB65170	3e-41	1
LEEBA322B02	Ferroquelatase II (<i>Cucumis sativus</i>)	Complexa ferro a uma protoporfirina	SGN-U215924	0	P42044	3e-73	1
LEEBA322B12	Proteína da família oxidoredutase de ligação a Zn (<i>A. thaliana</i>)	Catabolismo de treonina	SGN-U212905	0	NP193037	1e-16	1
LEEBA322D06	ATP sintase vacuolar (<i>N. tabacum</i>)	Síntese de ATP associada ao transporte de prótons	SGN-U214637	1e-173	NP564098	3e-11	1
LEEBA322E11	Precursor da subunidade E1 α da piruvato desidrogenase (<i>S. tuberosum</i>)	Atividade oxirredutase	SGN-U274931	0	CAA81558	2e-74	1
LEEBA322G08	Precursor da cadeia delta da ATP sintase (<i>N. tabacum</i>)	Síntese de ATP associada ao transporte de prótons	SGN-U215141	6e-93	CAA45153	4e-10	1
LEEBA322H01	Espermidina sintase (<i>L. esculentum</i>)	Biossíntese de espermidina	SGN-U213715	1e-131	CAA07020	1e-38	1
LEEBA323A09	S-adenosilmetionina descarboxilase proenzima (AdoMetDC) (<i>S. tuberosum</i>)	Biossíntese de espermidina, espermina, etileno e lignina	SGN-U212634	0	CAA77742	1e-28	1
LEEBA323B01	Provável cinamil-alcool desidrogenase (<i>Malus domestica</i>)	Biossíntese de esteróides e fenil propanóides	SGN-U214591	0	AAC06319	2e-55	1
LEEBA323D12	Peroxiredoxina (<i>Ipomoea batatas</i>)	Atividade antioxidante	SGN-U217220	1e-139	AAP42502	3e-30	1
LEEBA323F09	Possível glutatona redutase (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de glutamato, remoção de radicais superóxidos	SGN-U213865	1e-144	NP189059	7e-05	1
LEEBA323F10	Trealose fosfatase (<i>A. thaliana</i>)	Possivelmente envolvida na biossíntese de trealose	SGN-U222429	0	NP564918	5e-72	1
LEEBA323G03	Aspartocinase-homoserina desidrogenase (<i>Glycine max</i>)	Biossíntese de aspartato, lisina, metionina e treonina.	SGN-U270805	0	AAC05981	2e-67	1
LEEBA323G05	Alanina transaminase (<i>A. Thaliana</i>)	Atividade glicina transaminase envolvida em fotorrespiração	SGN-U214160	0	NP177215	1e-70	1

Tabela 7- Continuação.

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº. ESTs
LEEBA323H04	Possível nicotinamida-nucleotídeo adenililtransferase NAD(+) pirofosforilase (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de NAD+.	SGN-U274812	0	NP200392	1e-57	1
LEEBA323H12	Aldeído oxidase (<i>L. esculentum</i>)	Envolvida na biossíntese de ácido abscísico	SGN-U213963	0	AAG22605	1e-64	1
LEEBA324E05	Precursor de um inibidor de invertase (<i>L. esculentum</i>)	Metabolismo de carboidratos, degradação de sacarose	SGN-U216715	0	CAA09420	1e-60	1
LEEBA324E09	Possível lipase (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de glicerol	SGN-U276513	1e-101	-	-	1
LEEBA324F06	Precursor de uma aminometiltransferase mitocondrial (<i>S. tuberosum</i>)	Catabolismo de glicina	SGN-U213912	0	CAA81081	3e-87	1
LEEBA324G07	Proteína expressa (<i>A. thaliana</i>)	Envolvida na biossíntese de NAD	SGN-U225742	0	NP849920	9e-13	1
LEEBA324H02	Possível aldeído desidrogenase (<i>A. thaliana</i>)	Metabolismo do etanol	SGN-U214066	0	AAM61211	5e-179	1
LEEBA324H06	Possível invertase (<i>A. thaliana</i>)	Metabolismo de carboidratos, degradação da sacarose	SGN-U214570	0	NP177345	1e-88	1
LEEBA325A06	ATPase tipo AAA (<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>)	Induzida por sal, envolvida no metabolismo de carboidratos	SGN-U214326	1e-30	-	-	1
LEEBA325A11	Hidroxipiruvato redutase (<i>Bruguiera gymnorhiza</i>)	Envolvido na fotorrespiração	SGN-U215881	0	BAB44155	5e-163	1
LEEBA325B11	Glicosamina-frutose-6-fosfato aminotransferase (<i>A. thaliana</i>)	Primeira enzima da rota biossintética da hexosamina cujo produto final é UDP-N-acetil glicosamina	-	-	NP189051	7e-70	1
LEEBA325C05	Fosfo-2-deidro-3-deoxieptonato aldolase 2 (<i>S. tuberosum</i>)	Biossíntese de aminoácidos aromáticos	SGN-U225512	1e-162	-	-	1
LEEBA325C08	Proteína cinase 5'-AMP ativada (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de ligação a ATP responsável pela associação da fenilalanina a fenilalanil-tRNA	SGN-U224751	1e-124	-	-	1
LEEBA325F07	Precursor de uma isovaleril-CoA desidrogenase 2 (<i>S. tuberosum</i>)	Catabolismo de leucina e valina	SGN-U221033	0	CAC08234	9e-77	1
LEEBA325F09	Hidrolase catalítica (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de biotina e metabolismo de lipídeos	SGN-U214462	4e-94	NP181474	2e-14	1
LEEBA325F10	Glicina hidroximetiltransferase (<i>A. thaliana</i>)	Metabolismo de glicina e L-serina	SGN-U234762	1e-172	CAB79969	6e-76	1
LEEBA325F12	Relacionada a uma proteína abundante no embrião (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de ubiquinona	SGN-U213285	0	NP181669	2e-52	1
LEEBA325G06	UDP-glicose pirofosforilase (<i>S. tuberosum</i>)	Metabolismo de carboidratos; biossíntese e degradação de sacarose	SGN-U213088	0	AAB71613	2e-59	1
LEEBA325H01	Proteína similar a aloacida dealogenase hidrolase (<i>O. sativa</i>)	Atividade fosfoglicolato fosfatase	SGN-U283750	1e-151	XP480281	2e-25	1
LEEBA325H03	Precursor de uma fosforibulocinase (<i>O. sativa</i>)	Regulação do fluxo de açúcar no ciclo de Calvin	SGN-U213054	0	XP467296	3e-65	1
LEEBA325H12	Proteína expressa (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de fosfolipídeos sódio	SGN-U223976	0	NP565468	8e-30	1

Tabela 7 - Continuação

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº. ESTs
IX. Fotossíntese							
CLEEBA3-86	Ribulose bisfosfato carboxilase/oxigenase ativase (<i>L. pennellii</i>)	Necessária para ativação da rubisco	SGN-U212939	0	AAC15236	5e-43	4
CLEEBA3-87	Ribulose bifosfato carboxilase (<i>L. esculentum</i>)	Envolvida na produção de 3-fosfoglicerato	SGN-U225500	0	-	-	3
CLEEBA3-88	Precursor da proteína 3C de ligação a clorofila a-b (LHCII tipo I CAB-3C) (<i>L. esculentum</i>)	Absorve luz e transfere energia para o centro de reação fotossintético	SGN-U218921	0	P07369	5e-110	3
CLEEBA3-89	Precursor da proteína 13 de ligação a clorofila a-b (LHCII tipo III) (<i>L. esculentum</i>)	Absorção e transferência de energia para os centros de reação	SGN-U212937	0	P27489	4e-94	3
CLEEBA3-90	Proteína relacionada ao centro de reação W no fotossistema II (<i>A. thaliana</i>)	Síntese de ATP e NADPH	SGN-U213395	0	NP180615	3e-15	2
LEEBA306G11	Precursor de um polipeptídeo encontrado no fotossistema II (<i>L. esculentum</i>)	Proteína do cloroplasto envolvida na fotossíntese	SGN-U212660	2e-94	-	-	1
LEEBA307D05	Citocromo 1 (<i>L. esculentum</i>)	Responde a radiação eletromagnética com comprimento de onda de 400-470nm	SGN-U279590	1e-168	AAF72555	3e-64	1
LEEBA307H04	Subunidade X psaK do centro de reação do fotossistema I (<i>N. tabacum</i>)	Síntese de ATP e NADPH	SGN-U213381	0	AAP03873	2e-47	1
LEEBA310B12	Proteína de ligação a clorofila a-b (<i>S. tuberosum</i>)	Absorção e transferência de energia para os centros de reação	SGN-U213041	0	CAK24966	2e-63	1
LEEBA311A06	Criptocromo 2 (<i>L. esculentum</i>)	Fotorreceptores de luz azul	-	-	AAF72557	4e-43	1
LEEBA311F11	Proteína da membrana do tilacóide 1 (<i>L. esculentum</i>)	Participa da regulação da evolução do oxigênio	SGN-U212915	1e-146	CAA44736	5e-18	1
LEEBA322G05	Sedoheptulose-1,7-bisfosfatase (<i>Spinacia oleracea</i>)	Enzima regulada pela luz envolvida na fixação de carbono	SGN-U215599	0	AAB81104	5e-14	1
LEEBA324G03	Precursor de uma proteína de ligação a clorofila a-b (LHCI) (<i>L. esculentum</i>)	Compõe o complexo antena no fotossistema I	SGN-U213223	0	CAA32197	4e-43	1
LEEBA324H01	Proteína ultravioleta-B-represível (<i>Gossypium hirsutum</i>)	Proteína da membrana do cloroplasto envolvida no fotossistema II	SGN-U214156	0	AAS58469	4e-11	1
LEEBA325E06	Proteína localizada no cloroplasto regulada pela luz (<i>S. tuberosum</i>)	Compõe a membrana do tilacóide	SGN-U214912	0	AAQ19850	1e-51	1
LEEBA325F02	Possível precursor da subunidade III do fotossistema I (<i>N. tabacum</i>)	Envolvida no centro de reação do fotossistema I	SGN-U212805	0	AAP03872	2e-49	1
LEEBA325G08	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (<i>Capsicum annuum</i>)	Glicólise; biossíntese de metionina, prolina e treonina	SGN-U225514	0	CAC80373	4e-64	1

Tabela 7 – Continuação.

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº. ESTs
X. Resposta a hormônios							
LEEBA306C06	Proteína desconhecida (<i>A. thaliana</i>)	Membro da família de proteínas que respondem a auxinas	SGN-U225066	0	NP182192	7e-21	1
LEEBA306D05	Provável Glutathione-S-transferase induzido por auxinas (<i>N. Tabacum</i>)	Cataliza a transferência do glutadione a um substrato (R-X)	SGN-U212751	0	CAA39709	3e-38	1
LEEBA306D09	Precursor de um inibidor de proteinase I que responde a etileno (<i>L. esculentum</i>)	Contem repetições tetratricopeptídeos (TPR)	SGN-U217278	5e-71	-	-	1
LEEBA307C05	Proteína reprimida por auxina (ARP1) (<i>N. tabacum</i>)	Proteína associada à dormência	SGN-U281234	1e-131	AAS76635	5e-23	1
XI. Proteínas estruturais							
CLEEBA3-91	S-adenosilmetionina descarboxilase (AdoMetDC) (<i>Ipomoea nil</i>)	Envolvida na biossíntese de espermina	SGN-U213084	0	-	-	2
CLEEBA3-92	Proteína da membrana plasmática (<i>N. tabacum</i>)	Membro da família de proteínas de membrana DREPP	SGN-U213704	0	-	-	2
LEEBA306G10	Actina (<i>Malva pusilla</i>)	Constituinte estrutural do citoesqueleto	SGN-U213130	0	-	-	1
LEEBA307E07	Proteína da família kelch (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de ligação a actina	SGN-U214257	1e-179	-	-	1
LEEBA307H01	Similar a proteína de heterocromatina 1 (<i>L. esculentum</i>)	Liga-se a cromatina interagindo com a histona metilada H3	-	-	AAL25116	4e-20	1
LEEBA322G02	Proteína 1 constituinte da matriz nuclear (<i>D. carota</i>)	-	SGN-U278673	1e-169	BAA20407	2e-08	1
LEEBA325H07	Fibrilina CDSP34 (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de ligação ao Ca de natureza estrutural	SGN-U213598	0	CAA75558	7e-60	1
XII. Divisão celular							
CLEEBA3-93	Centrina (<i>N. tabacum</i>)	Proteína de ligação ao Ca relacionada com a organização dos microtúbulos	SGN-U218275	0	AAF07221	2e-74	2
LEEBA323G04	Piruvato desidrogenase subunidade β -E1 (<i>Zea mays</i>)	Atividade DNA helicase envolvida em replicação do DNA	SGN-U213307	0	AAC72192	7e-24	1
LEEBA306F11	Proteína associada aos microtúbulos (<i>Cicer arietinum</i>)	Interage seletivamente com os microtúbulos	SGN-U215227	0	CAD33929	1e-19	1
LEEBA310G01	Catanina (<i>Gossypium hirsutum</i>)	Biogênese o organização dos microtúbulos	SGN-U283948	0	AAP83637	1e-42	1
LEEBA310G10	Proteína GlsA (<i>Lilium longiflorum</i>)	Possível fator de morfogênese de células gaméticas	SGN-U213709	0	BAC77346	2e-19	1
LEEBA322G10	Possível fator de ribosilação ADP (<i>Populus tremuloides</i>)	Envolvido em divisão celular e produção de celulose	SGN-U298641	1e-117	AAO63780	4e-44	1
LEEBA323H08	Homólogo a proteína 48 do ciclo celular (<i>Capsicum annuum</i>)	Atividade helicase na junção de Holliday	SGN-U215037	0	CAA70565	8e-31	1
XIII. Transcrição/tradução							
CLEEBA3-94	Proteína similar a DnaJ (J3) (<i>L. esculentum</i>)	Evita que as proteínas se agreguem de forma irreversível durante a síntese	SGN-U212653	0	AAF28382	6e-56	4

Tabela 7 – Continuação.

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº. ESTs
CLEEBA3-95	Possível fator de início de tradução eIF-3 (<i>A. thaliana</i>)	Interage com a subunidade menor do ribossomo atuando no início da tradução	SGN-U213846	0	XP463924	1e-23	3
CLEEBA3-96	Fator de alongação α -EF-1 (<i>L. esculentum</i>)	Atua na alongação da cadeia polipeptídica no ribossomo	SGN-U212838	0	CAA37212	5e-58	3
CLEEBA3-97	Proteína regulada no amadurecimento DDTFR10 (<i>L. esculentum</i>)	Envolvida na biossíntese de proteína, atuando como um fator de alongação	SGN-U214943	0	AAG49034	9e-34	2
CLEEBA3-98	Asparaginil-tRNA sintetase 1 (<i>A. thaliana</i>)	Síntese de aminoacil tRNA	SGN-U215530	1e-179	-	-	2
LEEBA308G11	U1 snRNP 70 (<i>S. tuberosum</i>)	Envolvida em splicing de mRNA via spliceosome	SGN-U273317	1e-127	-	-	1
LEEBA310B09	Proteína de ligação ao RNA 45 (RBP 45) (<i>N. plumbaginifolia</i>)	Processamento do mRNA	SGN-U213456	0	CAC01237	2e-30	1
LEEBA311A04	Proteína contendo domínio de reconhecimento de RNA (<i>A. thaliana</i>)	Constituem as proteínas snRNPs envolvidas em splicing alternativo	SGN-U215805	0	-	-	1
LEEBA311C01	Subunidade do fator auxiliar U2 snRNP (<i>O. sativa</i>)	Fator de splicing	SGN-U214830	0	-	-	1
LEEBA311D04	Fator CPSF relacionado com clivagem e poliadenilação (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de ligação do DNA similar ao fator de splicing 3B	SGN-U230075	0	-	-	1
LEEBA311G02	Membro da família de proteínas de ligação a RNA (<i>A. thaliana</i>)	Membros desta família participam de Splicing	SGN-U218459	0	NP201329	3e-40	1
LEEBA322H05	Possível snRNP (<i>A. thaliana</i>)	Processamento de mRNA	SGN-U214641	0	NP564119	4e-46	1
LEEBA324F02	Possível RNA helicase (<i>O. sativa</i>)	Abertura da dupla hélice de DNA	SGN-U275212	0	XP477619	2e-58	1
LEEBA324G08	Possível RNA polimerase (<i>A. thaliana</i>)	Síntese de RNA	SGN-U277026	1e-130	NP172164	5e-24	1
LEEBA325A08	Precursor de uma proteína de ligação a RNA contendo domínio RNP-1 (<i>N. tabacum</i>)	Encontrado em proteínas envolvidas com splicing alternativo (hnRNPs)	SGN-U214988	0	-	-	1
LEEBA325C12	Proteína DB10 similar a RNA helicase (<i>Nicotiana sylvestris</i>)	Splicing de RNA	SGN-U214867	0	P46942	3e-09	1
LEEBA325D05	Possível RNA polimerase (<i>A. thaliana</i>)	Síntese de RNA	SGN-U217854	0	NP198917	2e-19	1
LEEBA306G05	Possível fator eucariótico de início da tradução 6 (<i>O. sativa</i>)	Fator de tradução	SGN-U214703	1e-156	XP479285	1e-36	1
LEEBA307B12	Fator de início de tradução EIF2 (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Faz parte do complexo de início de tradução	SGN-U276993	9e-36	AAK09431	1e-14	1
LEEBA307D07	Peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPIase) (<i>L. esculentum</i>)	Biossíntese, processamento e dobramento de proteínas	SGN-U212746	0	P21568	3e-16	1
LEEBA307H07	Proteína da família eIF-2B (<i>N. tabacum</i>)	Fator de tradução	SGN-U215536	0	BAB63262	2e-40	1

Tabela 7 – Continuação.

Contig/ Clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº. ESTs
LEEBA308G01	Possível fator de início da tradução 2 (IF-2) (<i>O. sativa</i>)	Atua na formação do complexo entre o mRNA e o ribossomo e na adição do primeiro tRNA	SGN-U275780	1e-180	BAD33814	6e-42	1
LEEBA309C07	Proteína SUI1 (<i>Coffea arabica</i>)	Fator de início de tradução	SGN-U213447	0	CAD58628	1e-31	1
LEEBA322D01	Homólogo a proteína de ligação a GTP LepA (<i>A. thaliana</i>)	Fator de alongação	SGN-U221847	1e-114	BAD68406	8e-37	1
LEEBA323H10	tRNA sintetase classe I (<i>O. sativa</i>)	Síntese de aminoacil tRNA	SGN-U223754	0	XP450769	6e-72	1
LEEBA324C04	Proteína da família tRNA sintetase classe II (<i>A. thaliana</i>)	Catalisa a formação de aminoacil-tRNA	SGN-U228432	0	NP200065	3e-34	1
LEEBA324F07	Possível fator de alongação (<i>S. demissum</i>)	Elongação da cadeia polipeptídica durante a tradução	SGN-U213258	0	AAT40505	1e-49	1
LEEBA324G06	Fator de início da tradução eIF-5 (<i>Zea mays</i>)	Envolvido na ligação dos dois primeiros aminoácidos da proteína	SGN-U229516	1e-147	CAA10616	1e-26	1
LEEBA325G09	Proteína da família riboforina I (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese e modificação de proteínas	SGN-U215837	0	NP177766	3e-67	1
XIV Degradação/modificação de proteínas							
CLEEBA3-99	Precursor de uma proteína similar a Fts-H (<i>N. tabacum</i>)	Metaloprotease que atua na biogênese da membrana do tilacóide	SGN-U215190	0	AAD17230	5e-82	3
CLEEBA3-100	Precursor de uma cisteína proteinase (<i>L. esculentum</i>)	Catalisa a hidrólise de ligações peptídicas não terminais em oligopeptídeos ou polipeptídeos	SGN-U213081	0	CAA78403	2e-53	3
CLEEBA3-101	Possível proteína DnaJ (<i>Camellia sinensis</i>)	Envolvida no dobramento de proteínas	SGN-U220274	0	ABC69274	9e-51	2
CLEEBA3-102	Proteína desidratase contendo domínio similar a maoc (<i>A. thaliana</i>)	Cisteína endopeptidase, catalisa a hidrólise de ligações peptídicas não terminais	SGN-U218660	0	NP177742	2e-33	2
CLEEBA3-103	Ubiquitina (<i>L. esculentum</i>)	Liga-se a proteínas após a tradução promovendo modificações ou mesmo degradação da proteína	SGN-U212670	0	CAA51679	4e-40	2
CLEEBA3-104	Possível membro da família de proteínas romboide (<i>A. thaliana</i>)	Possível proteína intramembrana serine protease que cliva o fator de crescimento similar a TGF-alfa ancorado a membrana	SGN-U199819	1e-132	NP198667	4e-56	2
CLEEBA3-105	Metaloenopeptidase (<i>A. thaliana</i>)	Catalisa a hidrólise de ligações peptídicas não terminais em polipeptídeos	SGN-U216806	0	NP850640	5e-23	2
CLEEBA3-106	Enzima conjugada a ubiquitina E2 (<i>S. tuberosum</i>)	Catalisa a ligação da ubiquitina a resíduos lisina na proteína alvo	SGN-U213091	0	ABC01894	3e-65	2
CLEEBA3-107	DNAJ 'heat shock' (<i>A. thaliana</i>)	Dobramento de proteínas envolvidas em resposta a choque por calor	SGN-U219348	4e-99	-	-	2
LEEBA307C03	Proteína da família metalopeptidase M24 (<i>A. thaliana</i>)	Catalisa a liberação de aminoácidos terminais, preferencialmente metionina de peptídeos	SGN-U218679	0	NP568014	2e-62	1
LEEBA306C12	Possível peptidase M16 (<i>A. thaliana</i>)	Proteína citoplasmática envolvida no processamento de polipeptídeos	SGN-U215324	0	NP188548	3e-04	1
LEEBA308C11	Proteína do complexo T (<i>Cucumis sativus</i>)	Membro da subfamília chaperonina, envolvida no dobramento de proteínas	SGN-U217552	0	2206327A	3e-25	1

Tabela 7 – Continuação.

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº. ESTs
LEEBA308D02	Proteína da família de enzimas que conjugam com ubiquitina E2 (<i>A. thaliana</i>)	Catalisa a ligação da ubiquitina com resíduos lisina na proteína alvo	SGN-U212836	0	NP564994	4e-32	1
LEEBA308H01	Possível ubiquitina ligase 1 (<i>O. sativa</i>) -	Envolvida na degradação de proteínas	SGN-U217856	0	XP450304	9e-39	1
LEEBA309C02	Proteinase similar a subtilisina (<i>L. esculentum</i>)	Contem similaridade a cucumisina serina protease	SGN-U218271	0	CAA07001	1e-47	1
LEEBA309E12	Possível peptidase sinal I (<i>A. thaliana</i>)	Catalisa a hidrólise de ligações peptídicas tendo a serina ou histidina com centro ativo	SGN-U270118	7e-73	-	-	1
LEEBA309F03	Proteína desconhecida (<i>O. sativa</i>)	Possível treonina endopeptidase	SGN-U216146	0	XP467905	1e-17	1
LEEBA310F07	Protease P27 (<i>L. esculentum</i>)	Degradação de proteínas e detoxificação celular pelo transporte de íons metálicos	SGN-U215735	1e-142	ABA40464	2e-13	1
LEEBA311D01	Fator relacionado com proteínas da família das chaperonas (<i>A. thaliana</i>)	Transporte e dobramento de proteínas	SGN-U218519	5e-173	NP200333	3e-21	1
LEEBA311H03	Precursor de um homólogo uma Lon protease mitocondrial (<i>Spinacia oleracea</i>)	Protease dependente de ATP, apresenta atividade helicase na junção de Holliday	SGN-U277076	0	O04979	2e-44	1
LEEBA322C02	Pré-pró-cisteína proteinase (<i>L. esculentum</i>)	Hidrólise de ligações peptídicas não terminais tendo um resíduo cisteína como centro ativo	SGN-U216580	0	CAA88629	5e-71	1
LEEBA323C08	Chalcone redutase (<i>Sesbania rostrata</i>)	Atividade endopeptidase	SGN-U225897	0	CAA11226	1e-26	1
LEEBA324A10	Proteinase similar a subtilisina (<i>L. esculentum</i>)	Catalisa a hidrólise de ligações peptídicas não terminais envolvendo um resíduo serina	SGN-U214664	0	CAA06413	9e-52	1
LEEBA324E08	Proteína contendo domínio DNAJ 'heat shock' N-terminal (<i>A. thaliana</i>)	Envolvido no dobramento de proteínas induzidas por choque térmico	SGN-U216624	0	NP176370	3e-17	1
LEEBA325B01	Arginina-tRNA transferase 1 (<i>A. thaliana</i>)	Necessária para degradação de proteínas via a rota da ubiquitina	SGN-U218252	1e-172	-	-	1
LEEBA325E02	Precursor de uma Protease Clp dependente de ATP (<i>L. esculentum</i>) -	Chaperonina envolvida em importação de proteínas para o cloroplasto	SGN-U213179	0	P31541	1e-53	1
LEEBA325E04	Proteína fosfatase 2C (<i>A. thaliana</i>)	Atividade serina/treonina fosfatase, envolvida em defosforilação de proteínas	SGN-U274159	0	NP180079	2e-76	1
LEEBA325E08	Enzima 8 conjugada a ubiquitina (<i>Capsicum annuum</i>)	Catalisa a ligação da ubiquitina com resíduos lisina na proteína alvo	SGN-U213334	0	AAR83891	3e-70	1
LEEBA325G12	Enzima que conjuga com RUB1 (<i>L. esculentum</i>)	Catalisa a ligação de ubiquitinas com resíduos lisina na proteína alvo	SGN-U212816	1e-130	AAG23847	2e-15	1
XV. Outros							
CLEEBA3-108	Proteína T6J4.7 (<i>A. thaliana</i>)	-	SGN-U217444	0	AAG09559	1e-19	4
CLEEBA3-109	Possível nodulina MtN19 (<i>O. sativa</i>)	-	SGN-U215088	0	BAD01246	2e-135	4
CLEEBA3-110	Metil transferase (<i>A. thaliana</i>)	Atividade metiltransferase	SGN-U221997	5e-45	NP186815	1e-08	2

Tabela 7 – Continuação.

Contig/ clone	Possível proteína	Descrição	Acesso SGN	Valor e SGN	Acesso NCBI	Valor e NCBI	Nº. ESTs
CLEEBA3-111	Esterase (<i>Capsicum annuum</i>)	Atividade catalítica	SGN-U213590	0	AAF77578	2e-20	2
CLEEBA3-112	Proteína desconhecida (<i>A. thaliana</i>)	Membro de uma família de proteínas ricas em hidroxiprolina	SGN-U217252	0	ABB02626	5e-20	2
CLEEBA3-113	Proteína desconhecida (<i>L. esculentum</i>)	Possível fator 11 de biogênese peroxissomal	SGN-U213828	0	AAF75750	6e-20	2
LEEBA308F01	Proteína PM 23 (<i>Glycine max</i>)	Relacionada com maturação de semente	SGN-U214424	0	-	-	1
LEEBA310A07	Similar a proteína MtN3 (<i>A. thaliana</i>)	Pertence a família das nodulinas	SGN-U269004	1e-175	AAM61234	6e-28	1
LEEBA311D09	Membro da família de proteínas de ligação ao Zn (<i>A. thaliana</i>)	-	SGN-U216099	1e-25	-	-	1
LEEBA310D06	Proteína similar a nam-1 (<i>Petunia hybrida</i>)	-	SGN-U224952	0	AAM47025	5e-10	1
LEEBA310F10	TOM1 homólogo 3 (<i>L. esculentum</i>)	TOM1 é um gene cujo produto é necessário para a replicação de Tobamovírus	SGN-U275991	0	BAE43840	2e-53	1
LEEBA311H06	PnFL-2 (<i>Ipomoea nil</i>)	-	SGN-U213942	1e-170	AAG49896	7e-08	1
LEEBA322C09	Possível proteína UPF0183 (<i>A. thaliana</i>)	-	SGN-U216791	0	AAM63377	4e-70	1
LEEBA324G10	Semelhante a proteína TSJT1 (<i>S. tuberosum</i>)	-	SGN-U217786	0	P24805	1e-82	1
LEEBA325D10	Proteína relacionada a Rho-GTPase (<i>A. thaliana</i>)	-	SGN-U215819	0	NP195300	7e-61	1