



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA  
MOLECULAR**

**Seleção e avaliação funcional de fatores potencialmente  
envolvidos com interações entre plantas e nematóides parasitas**

Doutorando: Djair dos Santos de Lima e Souza.

Orientador: Prof. Dr. Cezar Martins de Sá.

Co-orientador: Dra Maria Fátima Grossi de sa

**Novembro 2008 - Brasília**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA  
MOLECULAR**

**Seleção e avaliação funcional de fatores potencialmente envolvidos  
com interações entre plantas e nematóides parasitas**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular da UnB, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.**

Doutorando: Djair dos Santos de Lima e Souza.

Orientador: Prof. Dr. Cezar Martins de Sá.

Co-orientador: Dra Maria Fátima Grossi de sa

**Novembro 2008 - Brasília**

## **BANCA EXAMINADORA**

**Dra. Ildinete Silva Pereira**

Departamento de Biologia Celular  
Universidade de Brasília – UnB

**Dr. Juvenil Enrique Cares**

Departamento de Fitopatologia  
Universidade de Brasília – UnB

**Dra. Ilka Maria Vasconcelos**

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular  
Universidade Federal do Ceará – UFC

**Dr. Ricardo Henrique Kruger**

Departamento de Biologia Celular  
Universidade de Brasília – UnB

**Dr. Cezar Martins de Sá (Orientador)**

Departamento de Biologia Celular  
Universidade de Brasília – UnB

**Novembro 2008 - Brasília**

*“A todos os colegas  
que contribuíram  
para a realização  
desse trabalho”*



Massas de ovos de *M. incognita* (por: Ruben Gapasin, PhD  
Leyte State University)

## **Agradecimentos**

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular da UnB pelo curso de qualidade, indispensável para a minha formação.

A orientadora, Doutora Maria Fátima Grossi de Sá, pelo apoio e incentivo, amizade e exemplo. Resumo essa experiência profissional como a mais proveitosa e que me levou ao maior crescimento pessoal e profissional até agora.

Ao orientador Doutor Cezar Martins de Sá, pela orientação, pelas conversas críticas e esclarecedoras e, principalmente, pela paciência durante o meu doutorado.

Gostaria de agradecer em especial a todas as pessoas que torceram por mim desde o começo dessa verdadeira jornada, uma história individual, mas que não seria possível se não fosse pelo apoio desses amigos. Em todos os momentos que passei e que me queixei, tive apoio, palavras e atitudes de incentivo, que me fizeram continuar apesar das frustrações, dificuldades e muitas limitações. Então, gostaria de agradecer com igualdade ao Gustavo Ramos, Eduardo Romano, Brenner Marra, Thales Rocha, Charles Dayler, Cláudio Picanço, Rodrigo Osório, Aulus Barbosa, José Cesarmildo, Norma Santos, Adão, Erick,IVALDO Muchagata, Felipe Bodens, José Edilson, Octávio Franco, Vandr e, Fátima Grossi e a muitos outros. Peço desculpas se esqueci de alguém, mas podem ter certeza, a gratidão existe.

Gostaria de agradecer também a toda equipe do LIMMP, cujo trabalho beneficia a todos os membros.

Ao CNPq pelo apoio financeiro que me foi dado durante a realiza o do trabalho.

A alegria pode prescindir da razão, mas reflexão sem compreensão   vazia. Existe satisfa o em meramente observar o mundo, mas essa satisfa o pode ser aprofundada quando a visão da mente consegue penetrar na superfície das coisas para enxergar as conexões existentes.

P.W. Atkins.

## **BIOGRAFIA.**

Djair dos Santos de Lima e Souza, filho de Luiz Damasceno de Lima e Souza e Ivonilde dos Santos de Lima e Souza, nasceu em 07 de abril de 1977, na cidade de Natal no Rio Grande do Norte.

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN: 1997 - 2001). Durante todo esse período, participou de atividades de pesquisa como estagiário do Laboratório de Ecofisiologia de Peixes do Departamento de Fisiologia (UFRN), concluindo bacharelado no Laboratório de Biologia pesqueira do Departamento de Oceanografia e Limnologia da UFRN, com publicações acadêmicas em revistas e congressos.

No ano de 2003, concluiu o Mestrado em Bioquímica pelo Departamento de Bioquímica da UFRN, com ênfase em química e função glicosidases de invertebrados marinhos.

Atualmente cursa Doutorado em Biologia Molecular pelo Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, desenvolvendo trabalhos nas áreas de química de proteínas, química de metabólitos secundários em bebidas destiladas e plantas e genômica funcional aplicada ao entendimento das interações entre plantas e patógenos.

As atividades acadêmicas estão sendo desenvolvidas no Laboratório de Interações Moleculares de Plantas e Pragas (LIMMP) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob a coordenação da Doutora Maria Fátima Grossi de Sá.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b>	<i>ii</i>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS</b>	<i>vi</i>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	1
Nematóides – biologia, origem, evolução, filogenia	1
Nematóides: desenvolvimento como parasitas de plantas	3
Ciclo de vida dos fitonematóides endoparasitas sedentários obrigatórios	6
Nematóides de cisto ( <i>Heterodera</i> , <i>Globodera</i> )	7
Nematóides formadores de galhas ( <i>Meloidogyne</i> )	9
Aspectos particulares e econômicos do gênero <i>Meloidogyne</i>	10
Alternativas para o controle de <i>M. incognita</i>	13
O uso de plantas transgênicas no mundo – perspectivas para a aplicação de plantas GMs para o controle de fitonematóides.	16
<b>OBJETIVO GERAL</b>	18
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	18
<b>CAPÍTULO 1.</b> Análise dos produtos de expressão de plantas infectadas com fitonematóides, visando à seleção de genes de resistência ao nematóide de galhas <i>M. incognita</i>	19
<b>RESUMO</b>	19
<b>ABSTRACT</b>	24
<b>INTRODUÇÃO</b>	25
Resistência natural de plantas a nematóides	25

Mecanismos de defesa vegetal, considerações gerais	25
Prospecção de genes de resistência naturais (NEM-R) expressos em plantas infectadas com nematóides	30
O papel da proteômica no entendimento das interações entre nematóides e plantas	31
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> – esse tópico foi dividido em 3 artigos acompanhantes	33
<b>ARTIGO 1.</b> Identification of genes in cotton potentially involved in resistance to <i>Meloidogyne incognita</i> )	33
<b>ARTIGO 2.</b> “Plant–pathogen interactions: what is proteomics telling us?”	53
<b>ARTIGO 3.</b> Rooteomics: The Challenge of Discovering Plant Defense-Related Proteins in Roots	69
<b>CAPÍTULO 2</b> – Validação funcional de genes potencialmente envolvidos com o parasitismo de <i>Meloidogyne incognita</i>	
<b>RESUMO</b>	78
<b>ABSTRACT</b>	79
<b>INTRODUÇÃO</b>	80
Potenciais genes de parasitismo de <i>Meloidogyne incognita</i> e outros endoparasitas sedentários	80
A genômica funcional como ferramenta para o estudo das interações entre plantas e fitonematóides	86
Genômica estrutural e funcional : considerações gerais	86
RNA de interferência (histórico)	88
Os microRNAs	90
Os siRNAs	94
Os piRNAs	96
O sistema de interferência por RNA em procariotos	98



Técnica de RNA de interferência aplicada ao controle de fitonematóides	100
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	102
Manutenção de populações de <i>Meloidogyne incognita</i> em tomateiros	102
Extração de <i>Meloidogyne incognita</i> de raízes de tomateiros infectadas	103
Extração de RNA total de fêmeas e síntese do cDNA	104
Subclonagem dos genes 2E07, 7E12 e 17H02 em pGEM-T easy	104
Hibridização “ <i>in situ</i> whole mounth”	105
Clonagem dos genes 2E07, 7E12 e 17H02 em vetores para expressão de dsRNA e superexpressão de proteínas em fusão com GFP em plantas	106
Transformação de plantas de fumo	108
Desafio das plantas transgênicas expressando dsRNA	109
Avaliação da expressão das proteínas de secreção 2E07 e 7E12 em fusão com GFP	109
Inóculo e avaliação do perfil da infecção das plantas por <i>Meloidogyne incognita</i>	109
Preparação das raízes para a microscopia	110
Imunodeteccção da GFP nas plantas transgênicas	110
<b>RESULTADOS</b>	111
Clonagem dos potenciais genes de parasitismo de <i>Meloidogyne incognita</i>	111
Hibridização <i>in situ</i>	114
Transformação de plantas de fumo	115
Expressão ectópica dos genes de parasitismo 2E07, 7E12	116
Inóculo e avaliação do perfil da infecção das plantas por <i>Meloidogine incognita</i>	116
Avaliação microscópica das células gigantes	119
Expressão ectópica de dsRNA em plantas de fumo	122
<b>DISCUSSÃO</b>	124

**CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DO TRABALHO** 132

**REFERÊNCIAS** 134

**ANEXO**

Trabalhos publicados durante o Doutorado 144

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**INTRODUÇÃO GERAL**

**Figura 1.** As três possíveis relações entre vertebrados, artrópodes e nematóides 2

**Figura 2.** Ciclo de vida dos fitonematóides endoparasitas sedentários 11

**CAPÍTULO 1**

**INTRODUÇÃO**

**Figura 1.** Desenho esquemático demonstrando os dois principais modelos de reconhecimento na interação planta patógeno 28

**CAPÍTULO 2**

**INTRODUÇÃO**

**Figura 1.** Desenho esquemático mostrando a estratificação de um nematóide parasita de planta típico 84

**Figura 2.** Modelo de interação planta-nematóides para a formação do sítio de alimentação dos fitonematóides 85

86

**Figura 3.** Esquema do mecanismo de silenciamento gênico via micro-RNAs em animais 92

**Figura 4.** Sistema geral de microRNAs em plantas 93

**Figura 5.** Sistemas de silenciamento baseados em siRNAs 95

<b>Figure 6.</b> Modelo Ping-pong para a produção de piRNAs	97
<b>Figura 7.</b> Sistema de silenciamento análogo ao RNAi de eucariotos, proposto para procariotos	99
<b>Figura 8.</b> Desenho esquemático da passagem dos siRNAs da planta hospedeira para o nematóide parasita	101

## MATERIAL E MÉTODOS

<b>Figura 1.</b> Desenho esquemático das construções para expressão de dsRNA e das proteínas de secreção de <i>Meloidogyne incognita</i> , codificadas pelos genes <i>2E07</i> , <i>7E12</i> e <i>17H02</i> (construções pk72E07, pk77E12 e pk717H02 em tabaco)	108
---	-----

## RESULTADOS

<b>Figura 1.</b> Alinhamentos das sequencias AF531160 (2E07), AF531166 (7E12), AY134437 (17H02) com os genes subclonados	113
<b>Figura 2.</b> Localização da expressão do gene <i>2E07</i> exclusivamente na glândula esofagiana dorsal de <i>Meloidogyne incognita</i> , por hibridização <i>in situ</i> “Whole mount”	114
<b>Figura 3.</b> Obtenção de plantas de fumo ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) por transformação de discos foliares	115
<b>Figura 4.</b> Dot blot utilizando 400 µg dos extratos protéicos de raízes das plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> não transformadas	116
<b>Figura 5.</b> Plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> inoculadas com J2 de <i>Meloidogyne incognita</i> e coletadas em diferentes pontos da curva de tempo exibindo galhas de tamanhos diferentes	117
<b>Figura 6.</b> Avaliação do numero de galhas de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> carreando os genes, <i>2E07</i> e <i>7E12</i> coletadas 08, 16 e 28 dias após a inoculação com J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>	118
<b>Figura 7.</b> Teste de avaliação da eclosão de juvenis de <i>Meloidogyne incognita</i> de plantas transformadas e controle após 45 dias da inoculação com o nematóide	119
<b>Figura 8.</b> Análise histopatológica das raízes de <i>Nicotiana tabacum</i> 08 dias	

após a inoculação com <i>Meloidogyne incognita</i>	120
<b>Figura 9.</b> Análise histopatológica das raízes de <i>Nicotiana tabacum</i> 08 dias após a inoculação com <i>Meloidogyne incognita</i>	121
<b>Figura 10.</b> Análise da resistência de plantas transgênicas expressando dsRNA contra os transcritos dos genes <i>2E07</i> , <i>7E12</i> e <i>17H02</i> de <i>Meloidogyne incognita</i>	123

## ÍNDICE DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1.</b> Lista de primers utilizados para a amplificação dos genes <i>2E07</i> , <i>7E12</i> e <i>17H02</i> a partir de cDNAs extraídos de fêmeas de <i>Meloidogyne incognita</i>	107
---	-----

### ABREVIATURAS

ADP – “adenosine diphosphate”, difosfato de adenosina

ATP – “adenosine triphosphate”, trifosfato de adenosina

Avr - “avirulence factor”, fator de avirulência

cDNA - DNA complementar

DNA - “deoxyribonucleic acid”, ácido desoxirribonucléico

2DE - “two-dimensional gel electrophoresis”, eletroforese bidimensional

dsRNA - “double strand RNA” RNA fita dupla

ESTs - “expressed sequence tags”, etiquetas de transcritos

GMs - geneticamente modificados

ISR – “induced systemic resistance” resistência sistêmica induzida

J2 - juvenil de segundo estágio

J1 - juvenil de primeiro estágio

miRNAs – “microRNAs”, microRNAs

MS - “mass spectrometry”, *espectrometria de massa*

PAMPs/MAMPs - “pathogen-associated molecular patterns/microbe-associated molecular patterns padrões moleculares associados à patógenos/padrões moleculares associados a micróbios

PCR – “polymerase chain reaction” - reação em cadeia pela polimerase

piRNAs - “Piwi-associated RNAs” RNAs associados a proteínas Piwi

PRs - “pathogenesis-related proteins”, proteínas relacionadas a patogênese

PRRs - “Pattern recognition receptors” ,receptores de reconhecimento padrão

RNA - “ribonucleic acid “, ácido ribonucleico

RNAi - “RNA interference” RNA de interferência

siRNA - “small interfering RNA” pequeno RNA interferente

*RKN – “root-knot nematodes”, nematóides de galhas nas raízes*

ROS – “reactive oxygen species”, espécies reativas de oxigênio

rRNA - “ribosomal RNA ” RNA ribossomal

NEM-R - “Nematode Resistance Gene” Gene de Resistência a Nematóides

LRR - “Leucine Rich Region” região rica em leucina

NBS - “Nucleotide Binding Site” Sítio de Ligação a Nucleotídeos

GFP - “green fluorescent protein” Proteína Verde Fluorescente

HR - “hypersensitive response” resposta de hipersensibilidade

SAR - “systemic acquired resistance” resistência sistêmica adquirida

## INTRODUÇÃO GERAL

### **Nematóides – biologia, origem, evolução, filogenia.**

Nematóides são os animais multicelulares mais abundantes no planeta terra considerando o número de indivíduos. São encontrados em fontes termais, no solo, água doce, água salgada, no gelo polar e em relações parasitárias (Coghlan 2005). São caracterizados como animais triblásticos, protostômios, pseudocelomados. Possuem corpo cilíndrico, alongado e não segmentado, exibindo simetria bilateral. O sistema digestivo é completo e os sistemas respiratório e circulatório são ausentes. O sistema excretor dos nematóides é composto por dois canais longitudinais (renetes-formato de H) e o sistema nervoso é parcialmente centralizado em forma de anel nervoso ao redor da faringe. Muitas espécies são microscópicas, embora uma espécie parasita da baleia cachalote possa atingir 13 metros de comprimento (Wikipédia). Com relação aos parasitas de plantas, estes podem variar de 0,25 mm a 12 mm, sendo que a maioria possui entre 1 e 2 mm (Maggenti 1981).

Estes fantásticos helmintos possuem uma longa história evolutiva originada em meados do cambriano a cerca de 550 milhões de anos atrás, o que resultou na grande diversidade atual que inclui microbívoros terrestres e marinhos, predadores da meiofauna, herbívoros e parasitas de animais e plantas (Mitreva, Blaxter et al. 2005). Durante o processo evolutivo, a adaptação destes organismos intersticiais aos mais diversos habitats gerou uma profusão de formas, atingindo um número astronômico de espécies estimado entre 100 000 a 100 000 000. Atualmente, o nosso conhecimento fica limitado a cerca de 25 000 espécies descritas, sendo que a maioria das formas ainda não descobertas são, provavelmente, representantes da meiofauna bentônica marinha. Adicionalmente, devido às grandes lacunas no registro fóssil, torna-se pouco provável acessar a ancestralidade dos

nematóides (Blaxter 2003; Meldal, Debenham et al. 2007). Atualmente, este problema de ancestralidade gera longas discussões e as análises filogenéticas de organismos modelo, baseadas em seqüências ortólogas e de RNA ribossomal 18S (rRNA), alinhadas por ferramentas bioinformáticas, têm agrupado os nematóides de formas diferentes no reino animal, levando ao surgimento de três hipóteses: a primeira afasta estes vermes pseudocelomados dos vertebrados e artrópodes (hipótese celomada); a segunda agrupa os nematóides com outros organismos que também sofrem mudas, os artrópodes (hipótese ecdizoa) e finalmente a terceira que relaciona os nematóides mais proximamente dos vertebrados (hipótese III Figura 1) (Aguinaldo, Turbeville et al. 1997; Blair, Ikeo et al. 2002; Dopazo and Dopazo 2005).



Figura 1. As três possíveis relações entre vertebrados, artrópodes e nematóides (Adaptado de Blair, Ikeo et al. 2002).

À ciência, portanto, resta a tarefa de analisar e compreender os diferentes grupos taxonômicos hoje existentes, tendo em vista que a falha no registro fóssil já mencionada e a relativa confusão gerada pelas diferentes perspectivas das análises computacionais (*in silico*), não permitem que voltemos a fita da evolução para contar a história dos nematóides na terra.

A filogenia molecular divide os nematóides em três classes maiores, as quais são posteriormente separadas em cinco clados: Dorylaimia (clado I); Enoplia (clado II); Chromadorea (clado III); Tylenchina (clado IV) e Rabditina (clado V). É importante

salientar que, as irradiações de nematóides de vida livre para parasitas de animais ou plantas foram, provavelmente, eventos evolutivos separados e todos os maiores clados definidos pela análise molecular possuem representantes parasitas de animais ou plantas (Blaxter 2003; Parkinson, Mitreva et al. 2004; Mitreva, Blaxter et al. 2005).

### **Nematóides: desenvolvimento como parasitas de plantas.**

O parasitismo geralmente indica uma associação onde o explorador danifica o hospedeiro, mas não o mata, quando a morte do hospedeiro ocorre, o parasito é considerado fracamente adaptado (Blaxter 2003). Na realidade, este tipo de relação, obviamente afeta em grande ou em menor escala os processos fisiológicos normais do hospedeiro e isso pode acarretar na diminuição da expectativa de vida do mesmo. Das cerca de 25.000 espécies de nematóides já classificadas, grande parte é parasita (Blaxter 2003). Isso se deve ao fato de que muito provavelmente, a humanidade prioriza o estudo das espécies que ameaçam a sua existência, ou de suas fontes de alimento como plantas e animais.

Apesar disso, uma considerável parte dos estudos envolvendo nematóides é concentrada no organismo modelo *Caenorhabditis elegans* Maupas, 1900, e estes trabalhos têm contribuído para os avanços em pesquisas biomédicas relacionadas com o mal de Alzheimer, diabetes, obesidade, dentre outras (Bird, Blaxter et al. 2005). Estima-se que membros do filo Nematoda habitam a terra a cerca de 1 bilhão de anos e este grupo gerou a grande diversidade de formas atuais (Wang, Meyers et al. 1999). O parasitismo de plantas por nematóides tornou-se em parte possível, após a origem das plantas terrestres em um período entre 425 e 490 milhões de anos atrás. Baseado no registro fóssil pode-se afirmar com certo grau de segurança que o parasitismo das plantas superiores pelos nematóides teve o seu início a cerca de 150 milhões de anos atrás (Maggenti 1981).



Este fato indica que plantas e nematóides terrestres coexistem e co-evoluem há um grande período de tempo. Apesar disso, o conhecimento sobre a origem e a distribuição das especializações morfológicas, bioquímicas, genéticas e comportamentais, que transformaram organismos de vida livre em parasitas altamente adaptadas a diversos tecidos e espécies vegetais ainda é bastante limitado (Baldwin, Nadler et al. 2004). Como já mencionado antes, os principais clados do filo nematoda possuem parasitas, mas vamos enfatizar aqui apenas os grupos de parasitas de plantas. No clado I Dorylaimia, os parasitas de plantas são representados pelas famílias Longidoridae e Trichodoridae. O parasitismo de plantas nestas famílias é limitado a espécies ectoparasitas migratórias (Maggenti 1981).

Os membros da família Trichodoridae são importantes parasitas de muitas culturas incluindo plantas ornamentais e muitas espécies dessa família são vetores de vírus de plantas do gênero *Tobravirus* (Zheng, Jiang et al. 2004). Os trichodorídeos se concentram nos ápices radiculares, onde se alimentam das células superficiais. Esta característica do parasitismo inibe o crescimento das raízes por afetar as células meristemáticas, tornando as raízes curtas e grossas também conhecidas como raízes anãs (Almeida and Decraemer 2005).

A família Longidoridae, representada principalmente pelos gêneros *Longidorus* e *Xiphinema*, também são vetores de vírus de plantas. Durante o parasitismo, estes nematóides inibem a alongação radicular, entretanto estimulam a proliferação celular (Maggenti 1981). O clado Dorylamia contém microbívoros como *Trichodorus* (Blaxter 2003). No clado IV Tylenchina, estão os gêneros de nematóides endoparasitas sedentários obrigatórios (*Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*), estes são os mais danosos à economia agrícola mundial (Blaxter 2003). A este clado também pertencem os nematóides

de lesões (*Pratylenchus*), que são endoparasitas migradores que seguem se alimentando no córtex das raízes criando túneis que favorecem a entrada de patógenos secundários.

O surgimento, entretanto das diferentes espécies de nematóides de plantas nos referidos clados, constituíram eventos isolados e geraram uma diversidade de formas parasitas que se alimentam de todos os tecidos da planta hospedeira incluindo raiz, caule, folhas, flores e sementes. Portanto, com ênfase no tipo da estratégia alimentar, podemos classificar os nematóides em ectoparasitas migradores e sedentários, semi-endoparasitas migradores e sedentários e endoparasitas migradores e sedentários (Lambert and Bekal 2002).

Os nematóides ectoparasitas como *Xiphinema* e *Longidorus* vivem na superfície externa das plantas usando o estilete para se alimentar das células das raízes. Estes parasitas podem possuir longos estiletos para alcançar as células mais profundas, sendo que algumas espécies podem formar sítios de alimentação. O próximo grupo, de acordo com o modo alimentar, consiste dos semi-endoparasitas. Este grupo inclui nematóides que penetram parcialmente na raiz da planta hospedeira e formam um sítio de alimentação permanente, onde se alimentam de forma sedentária. Um exemplo típico deste grupo é o nematóide *Rotylenchulus reniformis* Linford and Oliveira, 1940, um importante patógeno do algodão (Lambert and Bekal 2002; Agudelo, Robbins et al. 2005). Outros nematóides da família Haploaimidae são semi-endoparasitas migradores que não formam sítios de alimentação. Finalmente, os endoparasitas sedentários constituem o grupo considerado mais bem adaptado ao parasitismo de plantas e de difícil controle, por passar a maior parte do ciclo de vida no interior das raízes onde induzem estruturas de alimentação especializadas, originadas às vezes a partir de uma única célula (*Meloidogyne*) ou a partir

da fusão de mais de 200 células (*Heterodera*, *Globodera*) (Williamson and Gleason 2003). A este grupo em especial será dado maior ênfase no tópico abaixo.

### **Ciclo de vida dos fitonematóides endoparasitas sedentários.**

No presente tópico, vamos nos referir as principais características do ciclo de vida dos fitonematóides dos gêneros *Heterodera*, *Globodera* e *Meloidogyne*. Com base em aspectos comuns aos gêneros, o desenvolvimento destes fitoparasitas altamente especializados se inicia no ovo, onde a embriogênese é seguida de uma primeira muda, quando o juvenil J1 se transforma em J2, que eclode do ovo e segue o gradiente de exsudados da raiz hospedeira (Hirsch, Bauer et al. 2003). A interação destes exsudatos com as moléculas presentes nas secreções e estruturas sensoriais dos nematóides ainda é pouco conhecida, entretanto, sabe-se que a sinalização é recíproca e alguns fatores que já foram identificados em plantas e nematóides confirmam esta afirmação. Dentre estes fatores podemos destacar a proteína anfídial gp32, de *Meloidogyne* que é muito importante durante o processo de orientação do nematóide no solo. Essa glicoproteína (Perry 1996).

Adicionalmente, muitos metabólitos secundários como o terpenoide glicinoeclepina A, exsudados de raízes de plantas estão envolvidos na indução da eclosão em nematóides de cisto (Masamune, Anetai et al. 1982). Quando encontra a raiz, o juvenil infectivo J2 inicia o processo de penetração na zona meristemática, logo abaixo da coifa, onde por meio de choques mecânicos promovidos pelo estilete (órgão em forma de lança localizado na cavidade oral e que é a interface do trato digestivo do nematóide com o meio, aliados à ação de enzimas digestivas lançadas na saliva do parasita (glucanases, pectato liases, poligalacturonases), o nematóide consegue penetrar a raiz e iniciar a sua busca pela célula no cilindro vascular que darão origem ao sítio de alimentação, passando, então, mais três

mudas até se tornar um parasita adulto. Após formado o sítio de alimentação, o nematóide se alimenta de forma sedentária e reproduz, aumentando assim a infecção na planta hospedeira (Niebel, Gheysen et al. 1994).

Uma vez formado o sítio de alimentação, o nematóide vai depender desta estrutura para terminar o seu desenvolvimento e reprodução. Se o sítio se torna não funcional, o nematóide morre, se o nematóide morre o sítio também se desfaz, indicando que este último necessita de estímulos contínuos do nematóide para permanecer ativo (Goverse, de Engler et al. 2000). Apesar dos aspectos comuns acima citados, os nematóides de cisto (*Globodera*, *Heterodera*) e os formadores de galhas nas raízes (*Meloidogyne*) possuem diferenças marcantes nos seus ciclos de vida e, por isso, serão detalhados separadamente neste tópico.

#### **Nematóides de cisto (*Heterodera*, *Globodera*).**

Os nematóides de cisto possuem este nome uma vez que após a fecundação e a produção de ovos, a fêmea morre e pode permanecer por vários anos no solo como um cisto repleto de ovos. Quando o solo apresentar condições favoráveis, como o desenvolvimento de plantas hospedeiras, os J2s dos nematóides de cisto, irão eclodir. Do ovo emerge o juvenil infectivo J2 (ou, juvenil de segundo estágio), que penetra numa ponta de raiz e o ciclo se repete. Quando penetram as raízes hospedeiras, os nematóides de cisto iniciam a migração em direção ao cilindro vascular. O J2 migra inter e intracelularmente, separando ou rompendo as células em seu caminho com o auxílio do estilete. Em seguida, o nematóide seleciona uma célula que será o ponto de partida para a formação do sítio de alimentação (Williamson and Gleason 2003).

Dependendo da espécie, os nematóides de cisto podem formar suas estruturas de alimentação em diversos tecidos. As espécies *Heterodera avenae* Wollenweber, 1924, nematóide da aveia e *Heterodera schachtii* Schmidt, 1871, parasita da beterraba, selecionam como célula sincicial inicial, uma célula do periciclo ou procâmbio. Adicionalmente, *Globodera Rostochiensis* Wollenweber, 1923, o nematóide dourado da batata escolhe uma célula totalmente diferenciada do córtex para iniciar a formação do sincício. *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952, pode desenvolver um sítio a partir de células do córtex, endoderme, periciclo ou floema. A partir destes dados pode-se concluir que o sítio de alimentação de nematóides de cisto pode ser formado a partir de células já diferenciadas e indiferenciadas (Goverse, de Engler et al. 2000). Quando o J2 seleciona uma célula sincicial inicial, esta responde alargando plasmodesmas existentes com células adjacentes. A seguir, os protoplastos das células vizinhas se unem após o surgimento de aberturas na parede celular. Isso continua durante o desenvolvimento do sincício que acaba incorporando centenas de células.

Durante este processo também é observada atividade mitótica. Uma vez que o J2 inicia a formação do sincício, o nematóide então se desenvolve e após três mudas se torna adulto. Os nematóides de cisto geralmente se reproduzem de forma sexuada e o macho adulto abandona o interior da raiz para fecundar a fêmea que está parcialmente inserida na raiz mas com a porção posterior voltada para o meio externo. Os juvenis que eclodem dos ovos, migram no solo para infectar novas raízes (Niebel, Gheysen et al. 1994; Williamson and Gleason 2003) (Figura 2A).

### **Nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne*).**

Ao contrário dos nematóides de cisto que não possuem um ponto preferencial para a penetração, os J2s dos nematóides de galhas penetram na região adjacente a ponta da raiz e migram até o ápice radicular onde a ausência de endoderme diferenciada permite que eles entrem no cilindro vascular. Em seguida, os J2s migram intercelularmente atravessando a lamela media com o auxílio do estilete e de enzimas digestivas da saliva (Niebel, Gheysen et al. 1994). Assim como os nematóides de cisto, os nematóides de galhas também escolhem uma célula em especial para iniciar o sítio de alimentação. Mais precisamente, escolhem de 2-12 células do parênquima do xilema na zona de diferenciação da raiz. Acredita-se que a escolha desta célula pelo nematóide possa estar relacionada com o estatus de diferenciação ou por sinais químicos emitidos pela célula e captados pelo parasita (Goverse, de Engler et al. 2000).

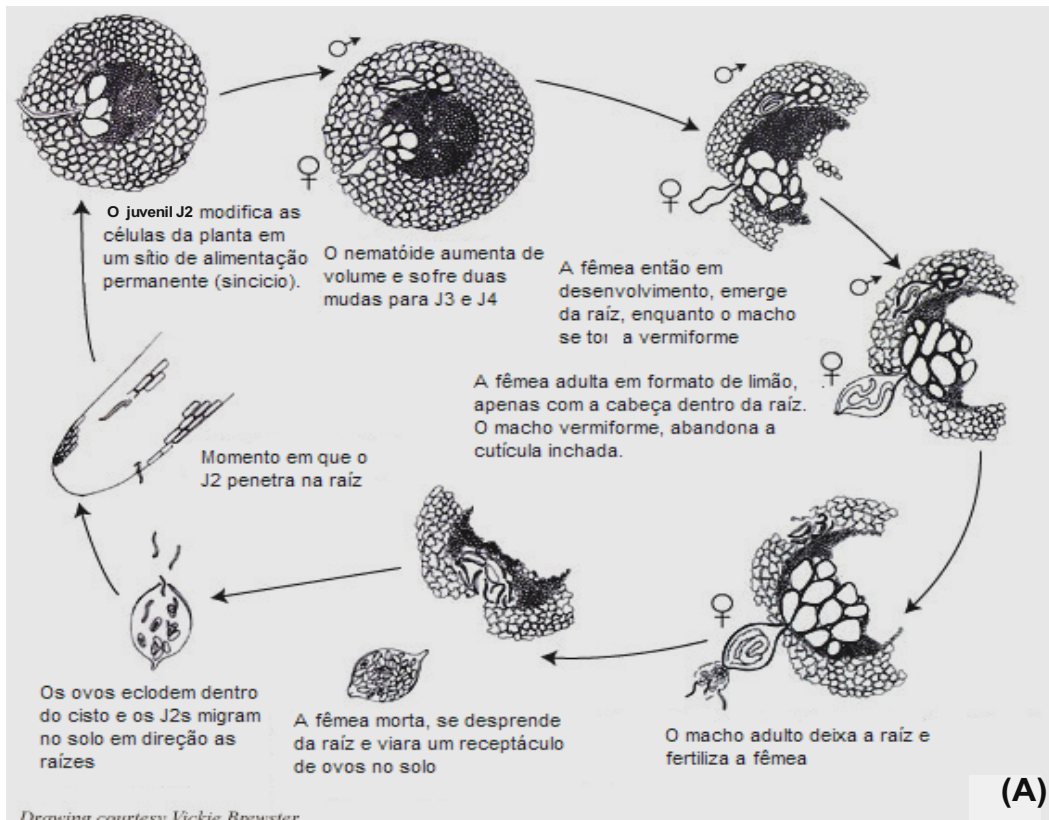
Ao contrário dos nematóides de cisto, os nematóides de galhas induzem e se alimentam de vários sítios de alimentação e cada sítio é formado por uma única célula (a célula gigante). O primeiro sinal da gênese das células gigantes em volta da cabeça do parasito é o aparecimento de várias células binucleadas. Mitoses adicionais sem citocinese geram células multinucleadas, enquanto as células circunvizinhas do córtex e periciclo se dividem dando origem a galha na raiz. Outras modificações que ocorrem para a formação das células de alimentação incluem invaginação na membrana plasmática. Os nematóides ingerem o citoplasma destes sítios de alimentação e após três mudas se transformam em fêmeas produtoras de ovos. Estas por sua vez, permanecem no interior das raízes e depositam os ovos envoltos por uma matriz gelatinosa o que resulta em uma massa de ovos na superfície externa da raiz. Quando os J2s eclodem no solo, eles se movimentam em

direção ao ponto de entrada novamente e o ciclo se repete (Figura 2B) (Niebel, Gheysen et al. 1994; Govere, de Engler et al. 2000; Davis and Mitchum 2005).

Como discutido acima, os sítios de alimentação das principais espécies de fitonematóides são iniciados a partir de células específicas em condições naturais. Por outro lado, em condições experimentais tanto os nematóides de cisto quanto os formadores de galhas podem formar sítios em hipocótilos e folhas (Govere, de Engler et al. 2000). Este fato indica que existem outros fatores, talvez comportamentais, envolvidos na escolha da célula que dará início os sincícios e as células gigantes.

#### **Aspectos particulares e econômicos do gênero *Meloidogyne*.**

Os nematóides do gênero *Meloidogyne* são os fitonematóides mais importantes para a agricultura mundial. Estes patógenos radiculares estão adaptados ao parasitismo de quase todas as culturas produtoras de alimentos e fibras no mundo, infectando mais de 1700 hospedeiros. O hábito endoparasita sedentário aliado a partenogênese (apomixia) da maioria das espécies resulta em uma maior adaptação em relação a outros fitonematóides, considerando que estes organismos estão protegidos no interior das raízes durante a maior parte do ciclo de vida e, adicionalmente, a partenogênese permite que a população de parasitas em uma raiz aumente consideravelmente em um curto intervalo de tempo (Lilley, Devlin et al. 1999; Trudgill and Blok 2001; Huang, Dong et al. 2006).



Drawing courtesy Vickie Brewster

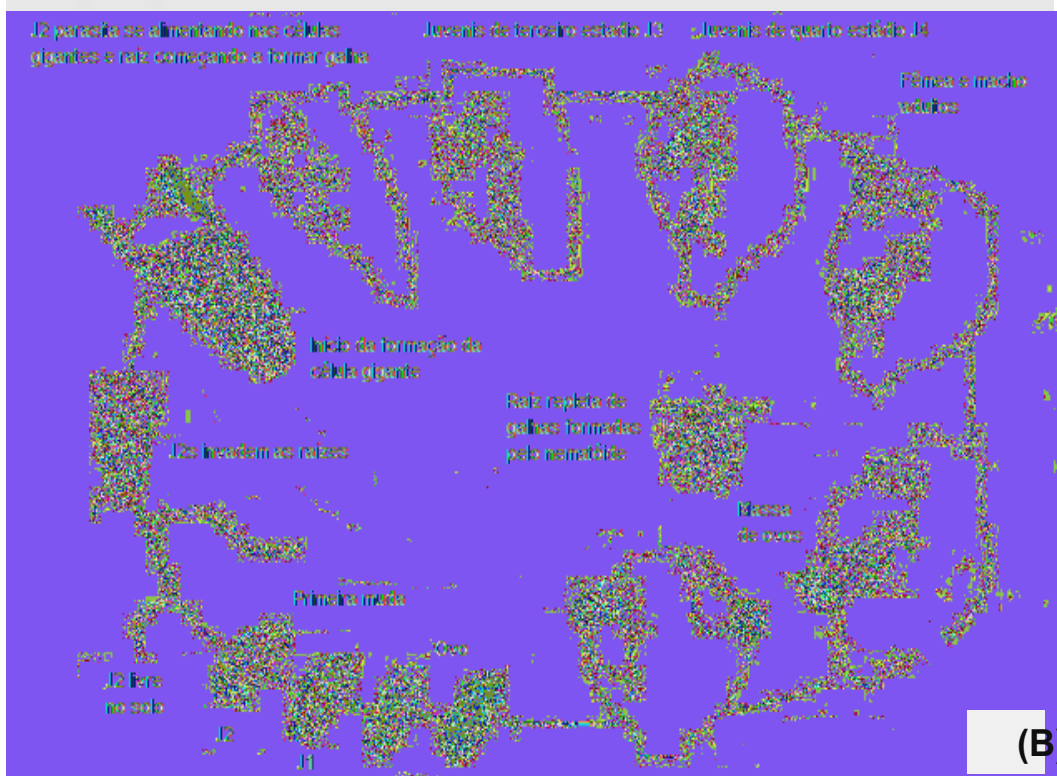


Figura 2. Ciclo de vida dos nematóides endoparasitas sedentários (A) ciclo de vida dos nematóides de cisto. (B) ciclo de vida dos nematóides de galhas. [www.apsnet.org/.../SoyCystNema/discycle.htm](http://www.apsnet.org/.../SoyCystNema/discycle.htm).



Cerca de 92 espécies de *Meloidogyne* são atualmente válidas no mundo, sendo que metade destas espécies foi descoberta nas duas últimas décadas (De Waele and Elsen 2007). Em uma perspectiva mundial, os fitonematóides em geral são responsáveis por perdas agrícolas que chegam a 12,3% (Sasser and Freckman 1986), o que numa estimativa mais recente pode ultrapassar 125 bilhões de dólares anuais (Chitwood 2002).

A maioria destes danos é atribuída aos nematóides de galhas, sendo que as espécies *M. incognita*, *Meloidogyne javanica* Treub, 1885, *Meloidogyne arenaria* Neal, 1889 e *Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949, recebem maior destaque pois contribuem para 95% das perdas causadas por todos os nematóides formadores de galhas e *M. incognita*, por ser o mais importante destes patógenos, atualmente merece um grande destaque (Huang, Allen et al. 2006). Esta espécie é a de mais ampla distribuição, sendo encontrada em todas as áreas temperadas e tropicais, até o limite mínimo de temperatura  $> 3^{\circ}$  C. Só no México, *M. incognita* é responsável por mais de 20% das perdas horticólicas (Trudgill and Blok 2001).

Atualmente mais de 100.000 ESTs de fitonematóides já estão disponíveis para estudos no Genome Sequence Center (<http://www.nematode.net>), incluindo *H. glycines*, *Pratylenchus penetrans*, *Globodera rostochiensis*, *M. arenaria*, *M. hapla* e *M. javanica*. A espécie que possui o maior número de ESTs seqüenciadas é *M. incognita* (19,000), fato que abre amplas possibilidades para o controle deste nematóide, com base no bloqueio da expressão destes genes ou das proteínas por eles codificadas. Apesar deste grande número de seqüências, maior ênfase tem sido dada aos potenciais genes de parasitismo, expressos nas glândulas esofágicas e que codificam para proteínas de secreção que constituem o parasitoma, ou seja, o conjunto de proteínas produzidas pelos fitonematóides e lançadas nos tecidos das plantas a partir da saliva dos parasitas durante a penetração, migração,

estabelecimento e manutenção das células gigantes (Davis, Hussey et al. 2004; Vanholme, De Meutter et al. 2004).

### **Alternativas para o controle de *M. incognita*.**

Atualmente, *M. incognita* é o nematóide patogênico mais importante para agricultura mundial. A preocupação com o controle destes organismos é refletida inclusive nos artigos publicados para esta espécie, que são consideravelmente mais numerosos do que os publicados para outras espécies de fitonematóides, exemplificando o nematóide de cisto da soja *H. glycines* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). O crescimento das pesquisas para o controle de fitonematóides é compreensível, tendo em vista que a população humana mais que dobrou nos últimos 40 anos, e o aumento na produção de alimentos aliada à necessidade da diminuição das perdas agrícolas causadas por pragas e patógenos são tarefas urgentes para garantir o alimento para as gerações futuras (De Waele and Elsen 2007).

Hoje em dia o controle de fitonematóides no mundo é feito por métodos tradicionais como a rotação de culturas, o uso de variedades resistentes e o uso de nematicidas sintéticos. A rotação de culturas significa alternar culturas naturalmente hospedeiras dos fitonematóides com plantas não hospedeiras. Este método é importante para evitar que as populações de fitonematóides atinjam níveis econômicos severos. Um exemplo consiste no uso da *Crotalaria* no lugar de plantas hospedeiras de espécies de *Meloidogyne* (Wang, Mitchum et al. 2005).

A maior limitação desta técnica reside no fato de que as espécies de *Meloidogyne*, principalmente o *M. incognita*, são polífagas, tendo como hospedeiros um grande número de culturas (Trudgill and Blok 2001; Huang, Dong et al. 2006). O uso de variedades

resistentes, também é uma alternativa bastante utilizada no controle de fitonematóides, entretanto esta estratégia também possui limitações que incluem a resistência restrita a algumas espécies ou raças de fitonematóides. Por serem fontes de resistência naturais, o estudo desses genótipos e de seus genes de resistência (genes R ou Nem-R) é bastante atual (Williamson and Kumar 2006). Como exemplos, podemos citar o gene *Mil* de tomate, que confere resistência específica aos nematóides *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (Milligan, Bodeau et al. 1998; Vos, Simons et al. 1998; Seah, Yaghoobi et al. 2004); *Gpa2*, que confere resistência específica a populações de *G. pallida* em batata (Van der Vossen, Van der Voort et al. 2000) e o gene *Hspro-1* que confere resistência a *H. schachtii* (Cai, Kleine et al. 1997; Thureau, Kifle et al. 2003).

O uso de nematicidas sintéticos, por sua vez, constitui uma das estratégias mais utilizadas no mundo atualmente. Por definição, nematicidas são compostos químicos que matam nematóides. Existem duas categorias de nematicidas geralmente utilizados, os fumigantes como brometo de metila, cloropicrina e 1,3 dicloropenos. Estes compostos são produzidos como líquidos que vaporizam rapidamente e se movem nos espaços de ar no interior do solo.

Os nematicidas não fumigantes são classificados como nematicidas de contato que atingem os nematóides no solo e os nematicidas sistêmicos que são absorvidos pelas plantas e passam para os nematóides durante a sua alimentação. A limitação ao uso de nematicidas vem crescendo cada vez mais devido aos efeitos tóxicos causados pelos mesmos ao ambiente e aos seres humanos (McBride, Mikkelsen et al. 2000). Para substituir futuramente estes compostos, alternativas como o uso de nematicidas naturais, o controle biológico e a introdução de resistência em plantas por transgenia estão sendo estudados. Os nematicidas naturais ou fitocompostos são metabólitos secundários

produzidos naturalmente pelas plantas e incluem grandes grupos de terpenóides, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Estas moléculas muitas vezes presentes em plantas antagonistas constituem uma excelente alternativa ao uso de nematicidas sintéticos (Chitwood 2002). Uma alternativa para o combate aos fitonematóides é o uso de formulados de microrganismos (controle biológico) como bactérias ou fungos nematófagos (Tian, Yang et al. 2007).

Finalmente, uma estratégia também promissora para o controle de fitonematóides consiste na introdução de resistência em plantas agronomicamente importantes via transgenia. Este método permite uma seleção mais específica de alvos no nematóide levando ao controle eficiente desses parasitos, pela interferência em seus sistemas: digestivo, nervoso ou reprodutor através do uso de inibidores de enzimas digestivas, anticorpos, toxinas e outras biomoléculas que atuem em alguma etapa do ciclo de vida do parasito. Embora as plantas transgênicas resistentes a nematóides ainda não tenham chegado ao mercado, muitos trabalhos já foram desenvolvidos e mostram a eficiência do método. Neste caso, a expressão do inibidor de proteinase cisteínica, a orizocistatina conferiu a plantas de *Arabidopsis* resistência contra *M. incognita*. Por outro lado a expressão de um inibidor de proteinase serínica, a esporamina, levou a resistência a *H. schachtii* em beterraba (Urwin, Lilley et al. 1997; Cai, Thureau et al. 2003). A produção de um neurodepressor, o ácido gama aminobutílico (GABA), em plantas de tabaco conferiu resistência ao nematóide das galhas *M. incognita* (McLean, Yevtushenko et al. 2003). Adicionalmente, (Li, Wei et al. 2007) demonstraram, pela primeira vez, utilizando plantas transgênicas de tomate, que a toxina Cry6A de Bt conferiu resistência a *M. incognita*. Apesar do efeito de toxinas Cry ter sido relacionado na maioria das vezes a insetos, estudos

prévios já demonstraram a ação tóxica de proteínas da família Cry5 e Cry6 contra nematóides (Wei, Hale et al. 2003).

### **O uso de plantas transgênicas no mundo – perspectivas para a aplicação de plantas GMs para o controle de fitonematóides.**

Apesar das restrições ao seu uso em muitos lugares do mundo, as lavouras GMs são uma realidade, e, após 13 anos de cultivo comercial, são cada vez mais adotadas por muitos países. Essa adoção se deve, principalmente, ao retorno financeiro e ao ganho ambiental que resulta desse plantio. O aumento na renda dos agricultores pobres, também reflete a importância das lavouras GMs para aliviar a situação dos que sofrem com fome no mundo (James, 2007). Entre os anos de 1970 e 2006, a população mundial aumentou, de, 3 bilhões para 6,5 bilhões de habitantes, o que significa, um considerável aumento no número de famintos (De Waele and Elsen, 2007).

A biotecnologia agrícola é uma importante ferramenta para aumentar a disponibilidade de alimentos em regiões, onde o aumento crescente da população humana torna o alimento um fator limitante. Além disso, o aumento na produção de vegetais produtores de fibras, como o algodão e dos usados para a extração de biocombustíveis (cana de açúcar, milho) é bastante importante para nações emergentes como o Brasil. O Brasil hoje é o terceiro país em área plantada de lavouras GMs (15 milhões de hectares), perdendo apenas para os Estados Unidos e Argentina, respectivamente. Podemos citar vários exemplos dos benefícios da utilização de lavouras GMs. O primeiro ponto consiste na possibilidade de se aumentar a produtividade e a produção de certas cultivares de plantas (James, 2007). Em segundo lugar, a criação de plantas resistentes a estresses abióticos como a seca, o estresse salino e o estresse de congelamento (Gao, Zhang et al,

2008; Xue, Peng et al, 2009), pode ser muito importante em regiões com condições climáticas, ou de solo, inadequadas para a agricultura.

Adicionalmente, o ganho ambiental pela diminuição com o uso de pesticidas nas lavouras GMs pode ser representado pelo Coeficiente de Impacto Ambiental (EIQ), uma medida composta baseada nos diversos fatores que contribuem ao impacto ambiental líquido de um ingrediente ativo individual. Esse coeficiente indicou uma redução de 15,5% no impacto ambiental, que correspondeu a uma diminuição de 289.000 toneladas métricas de ingrediente ativo, de 1996 a 2006, devido ao plantio de plantas transgênicas (James, 2007).

Atualmente, a maioria das áreas plantadas com plantas GMs no mundo, são ocupadas por plantas que carregam genes codantes para toxinas cry, de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Quando ingeridas pelo inseto alvo, as toxinas cry se inserem na membrana das células epiteliais do intestino, criando poros, e provocando um desbalanço eletrolítico que leva o inseto a morte (Carlini and Grossi de Sá, 2002; Roh, Choi et al. 2007). Dos US\$6,9 bilhões gerados com o mercado global de produtos GM, em 2007, US\$3,2 bilhões foram oriundos do milho Bt, US\$2,6 bilhões de soja Bt, US\$0,9 bilhões de algodão Bt e US\$0,2 bilhões de canola Bt (James, 2007). Os lucros gerados com as plantas Bt reforçam o potencial de mercado das plantas GMs para o presente e futuro. Nesse sentido, muitos trabalhos foram desenvolvidos até o momento, com o objetivo de criar plantas transgênicas com potencial agrícola. E, em adição as plantas Bt resistentes a insetos e a outras comercializadas atualmente, como as resistentes a herbicidas, já foram criadas plantas que exibem tolerância a estresses abióticos (Gao, Zhang et al, 2008) e outras resistentes a diferentes patógenos como bactérias (Huang, Liu et al. 2007), fungos (Shah, Raghupathy et al, 2009) e nematóides (Huang, Dong et al. 2006). Além dessas, outras

pesquisas estão sendo desenvolvidas em vários laboratórios do mundo, com o intuito de gerar plantas GMs candidatas ao uso comercial. Para o controle de fitonematóides, que são o foco desse estudo, já foram criadas plantas transgênicas por meio de diferentes estratégias. Seja para a expressão de inibidores de proteinases de nematóides (Urwin, Lilley et al. 1997; Cai, Thureau et al. 2003), toxinas de Bt (Li, Wei et al. 2007) e RNA interferente (Huang, Dong et al. 2006). O ataque ao patógeno, utilizando essas diferentes estratégias demonstra um grande potencial para o desenvolvimento da agricultura pelo uso de plantas transgênicas.

#### **OBJETIVO GERAL.**

- Gerar conhecimento científico para o combate ao nematóide das galhas *M. incognita*.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Avaliar o perfil da expressão gênica em raízes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) IAC 98/708 susceptível e IAC 96/414 resistente ao nematóide de galhas, infectadas *M. incognita* raça 3, visando identificar genes potencialmente envolvidos com a resistência a esse patógeno.
- Avaliar a importância de três novos genes expressos exclusivamente em glândula dorsal de *M. incognita* (AY134437 – 17H02 ; AF531166 – 7E12 ; AF531160 – 2E07) e codantes de proteínas com estruturas primárias desconhecidas, mas potencialmente envolvidas com o parasitismo desse a partir da expressão ectópica dos referidos genes e de seus dsRNAs correspondentes em plantas de tabaco.

## **CAPÍTULO 1**

**A minha participação nesse trabalho consistiu na ajuda na extração de material RNA, análise das seqüências da biblioteca e redação do artigo.**

**Análise dos produtos de expressão de plantas infectadas com fitonematóides, visando à seleção de genes de resistência ao nematóide de galhas *M. incognita*.**

### **RESUMO**

A cultura do algodão (*Gossypium hirsutum*) sofre perdas significativas na sua produção, devido ao ataque de fitonematóides, especialmente o nematóide de galhas *M. incognita*. Visando estudar os mecanismos envolvidos na resistência, foram construídas bibliotecas de ESTs de raiz de algodão resistente e susceptível a esse nematóide. As variedades de algodão resistente (IAC 96/414) e susceptível (IAC 98/708), cedidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas em São Paulo, foram desafiadas com o nematóide de galhas com o objetivo de identificar genes expressos diferencialmente nas plantas resistente e susceptível, durante a presença do nematóide. Cada planta foi inoculada com 1.200 J2s de *M. incognita*, depositados homogêneamente com a pipeta ao redor da base da raiz. As raízes das plantas de cada variedade foram coletadas após 2, 4 e 18 dias após a inoculação. Essas raízes foram acondicionadas imediatamente em nitrogênio líquido e mantidas em freezer a -80 °C até o momento da extração dos RNAs. Para a construção das bibliotecas, foi determinada a reunião dos RNAs extraídos das plantas coletadas com 2, 4, 18 dias. Ambas as bibliotecas foram desenvolvidas com o kit "Superscript Plasmid System with Gateway Technology for cDNAs synthesis and Cloning". Os cDNAs foram então



seqüenciados, e a montagem das seqüências das duas bibliotecas foi realizada em conjunto, de forma a se buscar genes que estivessem sendo diferencialmente expressos. Os dados gerados resultaram em 2.262 seqüências para as bibliotecas de raiz de algodão resistente e susceptível. A montagem resultou em 1.827 grupos, sendo 234 contigs e 1.593 singlets. No presente estudo, foram identificados vários genes que podem estar associados com defesa a nematóides, outros patógenos, além de proteínas envolvidas com resposta a estresse abiótico. Esse efeito pode ser produzido pela ação do nematóide que ativa rotas de defesa no hospedeiro que levam à expressão de diversos genes de resistência (Giebel 1976; Potenza, Thomas et al. 2001; Johnk, Hietala et al. 2005). A ativação de rotas que levam à resistência do algodão ao nematóide de galhas pode ser sinalizada pela expressão de genes relacionados à resposta de hipersensibilidade (HR) no hospedeiro. Dentre esses genes, destacaram-se a chaperona Hsp90 (FL684416), superóxido dismutase (FL684415), proteína indutora de resposta de hipersensibilidade (FL684432), proteína com domínio LRR (FL684418). Esses genes já foram relacionados com o mecanismo de resistência a patógenos, que leva a ativação da resposta de hipersensibilidade nas plantas atacadas. As respectivas atividades das proteínas codificadas por esses genes serão comentadas a seguir. No início, quando a célula vegetal entra em contato com moléculas elicitoras (Avr) produzidas pelo patógeno ou pela ação do mesmo, ocorre a ativação de enzimas como NADPH-oxidases que promovem a transformação do oxigênio ( $O_2$ ) em íons superóxido ( $O^-$ ) uma espécie reativa de oxigênio, em seguida ocorre a formação e o acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) por dismutação espontânea do  $O^-$  a  $H_2O_2$  ou quando essa dismutação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). Essa enzima promove a produção do  $H_2O_2$  numa velocidade  $10^{10}$  vezes maior que na reação espontânea. Na presença de certos íons, o  $H_2O_2$  pode ser convertido em espécies de oxigênio ainda mais

reativas (ROS), que se ligam a proteínas, inibem a ação de enzimas e causam danos ao DNA. Exemplo disso é a conversão do  $H_2O_2$ , na presença de  $Fe^{2+}$ , para  $OH\cdot$ , altamente tóxico. Apesar da morte celular que ocorre nas imediações das injúrias, o peróxido de hidrogênio tem um importante papel na ativação de genes de resistência vegetal que inibem a propagação na planta, da necrose provocada pela resposta de hipersensibilidade. Em seguida, à ativação dos genes de resistência ocorre a resposta sistêmica adquirida (SAR), onde várias outras microexplosões oxidativas ocorrem longe do sítio de infecção pelo patógeno, levando à propagação da expressão dos genes de resistência (Resende, Salgado et al., 2003). Relatos também indicam que a morte celular não depende apenas do peróxido de hidrogênio, mas sim da sua interação sinérgica com o óxido nítrico (Iakimova, Michalczuk et al., 2005). Sendo assim, a enzima superóxido dismutase, identificada no presente estudo, pode estar relacionada tanto com a produção da HR em combate ao patógeno, quanto à ativação de outros genes que podem ou não estar associados à resistência a *M. incognita* no algodão. A quinase dependente de cálcio (FL684434) é também relatada como proteína de defesa de plantas contra patógenos, pois quando ocorre um influxo de cálcio na célula vegetal, provocado por um stress, as quinases dependentes de cálcio podem iniciar uma cascata de transdução de sinal que levam a resposta de hipersensibilidade (Romeis, Piedras et al. 2000). A chaperona Hsp90 participa no dobramento de proteínas R, que atuam na defesa em resposta ao ataque de patógenos (De la Fuente van Bentem, Vossen et al. 2005). Como exemplo, a Hsp90 é essencial na resistência do tomate a *M. incognita*, por interação com a proteína codificada pelo gene *Mi-1* (Bhattarai, Li et al. 2007). Já é sabido que os domínios LRR são freqüentes em proteínas de sinalização que atuam em mecanismos de defesa de plantas (Diévar and Clark 2004). É comum para muitos genes de resistência a nematóides o aparecimento de

domínios LRR que são associados com a interação proteína proteína para o reconhecimento de moléculas Avr ou de membros da cascata de transdução de sinal que leva à resistência (Williamson and Kumar, 2006; Mehta, Magalhães et al., 2008; Fuller, Lilley et al., 2008). A proteína indutora de resposta de hipersensibilidade atua no reconhecimento do patógeno que, por fim, irá disparar o mecanismo da resposta de hipersensibilidade na planta (Rostoks, Schmierer et al. 2003). Outros genes que foram expressos na biblioteca de algodão resistente podem estar ligados à resistência a outros stresses bióticos ou abióticos, e não necessariamente estão relacionados com a resistência à nematóides. Como exemplo, podemos citar os polipeptídios reversivelmente glicosilados (FL684417) cuja função não é bem conhecida. Entretanto, um peptídeo dessa família, chamado de S1UPRG1 encontrado em plantas de tomate, interage com a proteína V1 do capsídio do geminivirus TLCV, podendo estar relacionada com uma nova via onde o polipeptídeo do hospedeiro interage com a proteína V1, levando a uma interação compatível entre a planta e o patógeno (Selth, Dogra et al. 2006). As proteínas com domínios de dedos de zinco, como a seqüência encontrada na biblioteca do algodão resistente (FL684423), são fatores de transcrição que atuam na via de resposta a patógenos em diversas plantas (Park, Kim et al. 2007). A expressão do gene para a isoflavona redutase (FL684412), pode estar relacionada com a síntese de metabólitos secundários em resposta ao patógeno. Resultados similares de expressão foram obtidos para uma cultivar resistente de alfafa (Potenza, Thomas et al. 2001). Com relação à peroxidase (FL684425) esta já é uma proteína conhecida, que atua na defesa contra patógenos (Rouhier, Gelhaye et al. 2004). A proteína de resistência Brassinazole (FL684426) participa da síntese do hormônio brassinolídeo, que participa na indução da resistência em plantas (Nakashita, Yasuda et al. 2003). A proteína Skp1 (FL684427) é um componente

do sistema de ubiquitina ligases que mediam a degradação de proteínas pela unidade 26S do proteossomo. A participação dessa proteína em processos de resistência de plantas já foi documentada (Kottapalli, Sarla et al. 2006).

A proteína conhecida como ciclofilina (FL684428) participa no processo de sinalização para a ativação das defesas de *Arabidopsis* contra *Pseudomonas syringae* (Coaker, Falick et al. 2005). Além disso, uma ciclofilina isolada de repolho chinês *Brassica campestris* demonstrou efeito anti-fúngico contra diversos patógenos, mas principalmente na inibição do crescimento de *Botrytis cinerea* (Lee, Park et al. 2007). As proteínas V-SNARE (FL684429) são proteínas de membranas que participam no processo de liberação extracelular por exocitose, de proteínas relacionadas com a resistência das plantas (Robatzek 2007). Quitinases são enzimas que atuam na hidrólise da quitina e podem estar relacionadas em processos de resistência a patógenos quitinosos, em uma série de organismos, ou no metabolismo da quitina no próprio organismo. A biblioteca do algodão resistente apresentou uma quitinase de classe IV (FL684430). Essas enzimas pertencem ao grupo das PR3, que são proteínas relacionadas à patogênese em plantas (Kasprzewska 2003). O fator despolimerizante de actina (FL684431) pode estar relacionado com o mecanismo de defesa do hospedeiro contra fungos fitopatogênicos. Esse efeito foi observado para o fator despolimerizante de actina encontrado em cevada (Miklis, Consonni et al. 2007). As enzimas do tipo endo-1,3-D-glucosidases já foram relatadas como proteínas de defesa vegetal no controle de fungos (Okinaka, Mimori et al. 1995) e de fitonematóides (Giebel 1976). A proteína dirigente de expressão já foi relacionada com mecanismos de defesa vegetal em resposta a injúrias (Ralph, Park et al. 2006). Cinnamoyl-CoA redutase (FL684435) foi apontada como uma proteína de defesa via sinalização em arroz (Kawasaki, Koita et al. 2006). Em duas recentes revisões, nos indentificamos

diversas proteínas produzidas diferencialmente em plantas infectadas por nematóides (Mehta, Brasileiro et al., 2008; Mehta, Magalhães et al., 2008). As seqüências correspondentes a genes com potencial de expressão diferencial estão sendo analisadas e serão amplificadas para utilização em experimentos de Northern blotting, a fim de confirmar seus níveis de expressão experimentalmente. Posteriormente, essas seqüências poderão ser utilizadas na transformação de plantas com o intuito de produzir variedades de interesse agrônômico resistentes ao nematóide.

## **ABSTRACT**

*Meloidogyne incognita* is a destructive nematode responsible for heavy damage to economically important plants, including cotton (*Gossypium hirsutum*) the most important fiber crop worldwide. The control of this pathogen is heavily centered on chemical nematicides, which are toxic to humans and the environment, harmful to non-target organisms and expensive. Alternatively, resistant varieties of cotton obtained from conventional breeding programs represent an attractive strategy for the control of *M. incognita*. In this context, the aim of the work reported here was to analyze the gene expression profile of cotton plants infected with *M. incognita* in order to understand the mechanisms involved with resistance. EST libraries of cotton genotypes resistant to or susceptible to infection by *M. incognita* were constructed and sequenced, generating 2,262 sequences that were assembled into 1,827 groups (234 contigs and 1,593 singlets). The results showed genes differentially expressed in both resistant and susceptible cotton. After manual annotation, 20 genes were found to be expressed exclusively in the resistant cotton genotype, with functions related to pathogen recognition (1), signal transduction (7), defense mechanisms (10) and protein transport and activation (2). The functions of these genes acting coordinately could indicate the existence of a cotton defense pathway against

nematode attack. These data show the complexity in plant defense responses, and indicate some candidate genes for validation and use through transformation in other agronomically important plants.

## **INTRODUÇÃO**

### **Resistência natural de plantas a nematóides.**

#### **Mecanismos de defesa vegetal, considerações gerais.**

Para se protegerem da ação de pragas e patógenos as plantas possuem uma série de mecanismos de defesa, que incluem desde barreiras físicas e químicas pré-formadas como a parede celular e os metabólitos secundários tóxicos e a expressão de proteínas de defesa em resposta a pragas e patógenos. Adicionalmente, as plantas também podem responder ao ataque de patógenos com um tipo de morte celular programada chamada de resposta de hipersensibilidade (HR). Comparadas aos animais, as plantas possuem a desvantagem de não produzirem anticorpos circulantes ou linhagens de células imunes dedicadas, por isso cada célula vegetal deve conhecer autonomamente os diversos patógenos e lançar as respostas de defesa adequadas (McDowell and Simon, 2008).

Os mecanismos moleculares de defesa vegetal são divididos em dois tipos: a imunidade inata ou resistência de não hospedeiro e a resistência de hospedeiro. A imunidade inata permite que as plantas se defendam contra diversas espécies de patógenos ou contra todos os isolados de uma espécie de patógeno (Iriti and Faoro, 2007). Nesse caso, o mecanismo de reconhecimento do patógeno pela planta envolve receptores que reconhecem padrões moleculares comuns a diversos microorganismos, chamados de padrões moleculares associados à patógenos/padrões moleculares associados a micróbios (PAMPs/MAMPs) (He, Shan et al., 2007).

Esses padrões incluem flagelina bacteriana, fragmentos de quitina da parede celular de fungos, lipopolissacarídeos, peptidoglicanos além de uma série de proteínas comuns a diversos microorganismos patogênicos ou não patogênicos (Nurnberger and Lipka, 2005). Os PAMPs são geralmente reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão expressos na superfície das células da planta (PRRs), que na realidade são similares aos produtos dos genes *R* das plantas. A interação entre PAMPs e PRRs dispara as vias de sinalização para os mecanismos de defesa vegetal impedindo o progresso do patógeno (Jones and Dangl, 2006; He, Shan et al., 2007).

Quando os patógenos conseguem superar a resistência de não hospedeiro, a planta se torna susceptível, se torna hospedeira. Entretanto, com o tempo, a planta hospedeira pode co-evoluir com o patógeno passando a produzir receptores que reconhecem moléculas efetoras liberadas pelos patógenos (produtos dos genes *Avr*), ou então, o patógeno pode passar a produzir moléculas que serão então reconhecidas por receptores já existentes nas plantas (produtos dos genes *R*) (Dangl and McDowell, 2006). Sendo assim, a planta se torna resistente a um determinado isolado ou a vários isolados da espécie do patógeno. Essa hipótese ficou conhecida como a hipótese da interação gene a gene, proposta por Flor (1971) sugerindo que o sucesso da resistência hospedeira depende da interação de dois fatores, um do patógeno, que é o produto do gene de avirulência (*Avr*) e outro da planta, o produto do gene de resistência (*R*).

O mecanismo de interação gene a gene foi demonstrado em um trabalho realizado com genótipos de arroz resistentes ao fungo *Magnaporthe grisea*. O gene *Pi-ta* do arroz codifica para uma proteína de resistência R com domínios NBS-LRR, chamada LDR. No referido trabalho, foi demonstrado que a proteína de avirulência AVR-Pita do fungo *M. grisea*, quando expressada em sua forma ativa dentro das células vegetais, induz a

resistência na planta ao fungo. No mesmo trabalho foi demonstrado, por experimentos in vitro que a proteína LDR, se liga especificamente a proteína AVR-Pita. Adicionalmente deleções aminoacídicas tanto na proteína LDR, quando na AVR-Pita, resultaram na perda de resistência na planta, indicando que a resistência do arroz, ao fungo *M. grisea* é dependente da ligação direta entre a proteína de resistência LDR e a proteína de avirulência AVR-Pita, fatos que suportam a hipótese da interação gene a gene (Jia, McAdams et al, 2000). Por outro lado, os produtos dos genes de avirulência dos patógenos (Avr) nem sempre interagem diretamente com a proteína R, mas sim com outro receptor da planta, sensibilizando assim a proteína R indiretamente e ativando os mecanismos de resistência. Essa hipótese ficou conhecida como a hipótese guarda. Os elementos desse mecanismo incluem uma proteína endógena da planta hospedeira, denominada de “guardiee”, que interage ou é modificada pelo efector produzido pelo patógeno (Avr). Essa interação é percebida quimicamente pela proteína de resistência R, nesse caso chamada de proteída guarda, a qual ativa a resistência do hospedeiro (Dangl and McDowell, 2006).

O exemplo mais bem estudado que demonstra a hipótese guarda, diz respeito à interação entre os efetores AvrRpm1 e AvrB de *Pseudomonas syringae* com as proteínas RIN4 e RPM1 de *Arabidopsis thaliana*. Quando liberadas nas células da planta, AvrRpm1 e AvrB fosforilam a proteína RIN4 e em uma planta susceptível, que não produz a proteína de resistência RPM1, essa fosforilação provoca a inibição das defesas basais da planta, potencializando assim o crescimento do patógeno. Por outro lado, em uma planta resistente, a fosforilação de RIN4 que estará associada a RPM1, ativa a resistência mediada por essa última proteína, diminuindo assim o progresso do patógeno. No referido exemplo, RIN4 é a proteína endógena denominada “guardiee” e RPM1 é a proteína R, também



chamada de guarda no modelo da hipótese guarda (Mackey, Holt III et al, 2002). A figura 1 descreve a hipótese da interação gene a gene e a hipótese guarda.

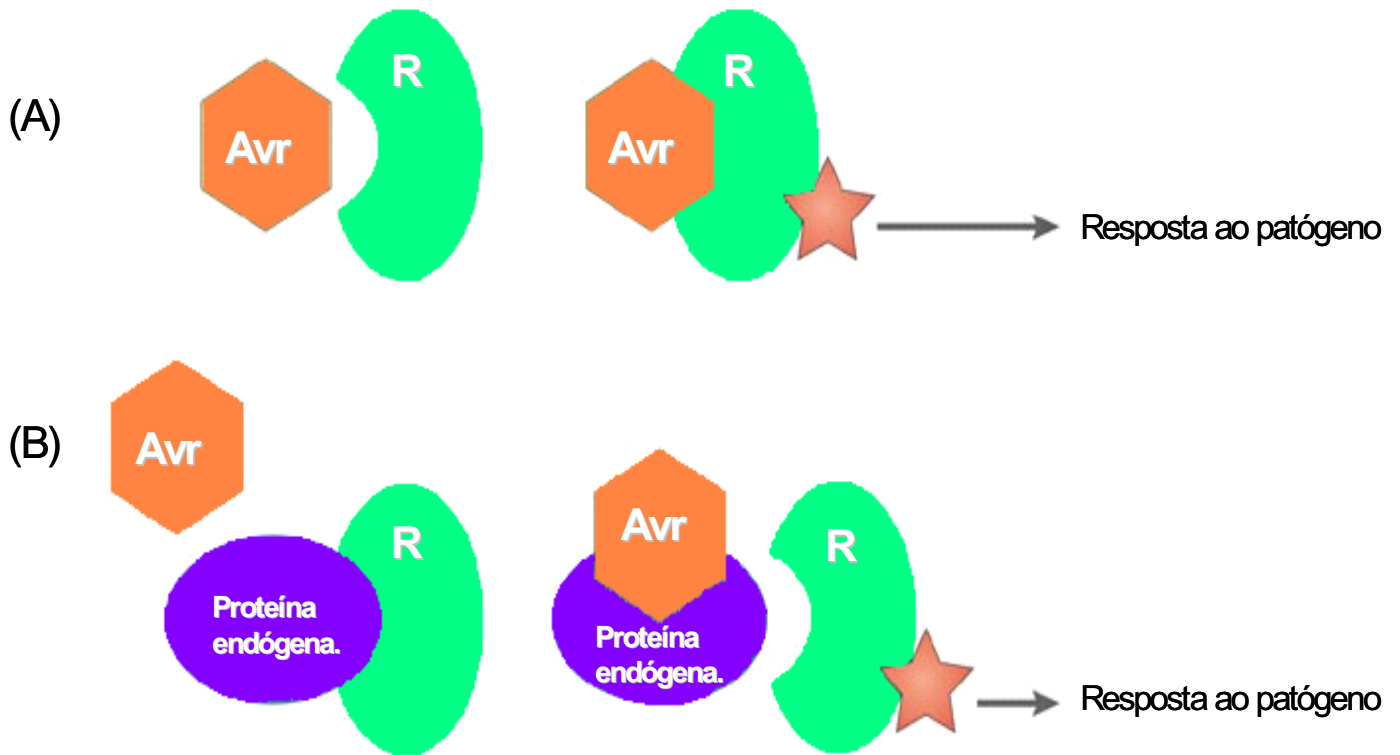


Figura 1. Desenho esquemático demonstrando os dois principais modelos de reconhecimento na interação planta patógeno. (A) hipótese da interação gene a gene: explica que o sucesso da resistência de hospedeiro depende da interação de dois fatores, o produto de um gene de avirulência do patógeno (Avr) e o produto de um gene de resistência da planta (R). (B) hipótese guarda: explica que o reconhecimento do efector (Avr) do patógeno pela planta não necessariamente ocorre por interação direta entre esse Avr e a proteína de resistência (R) do hospedeiro, a qual pode reconhecer a ligação entre Avr e uma proteína endógena do hospedeiro, denominada “guarda” e assim ativando a resistência da planta.

Como observado nos modelos acima citados, as plantas dispõem de uma série de genes de resistência (genes R) que irão reconhecer direta ou indiretamente o patógeno e ativar em seguida as defesas das plantas. A maioria dos genes R codificam para proteínas que possuem um sítio de ligação a nucleotídeos (NBS) e um domínio chamado de região

rica em leucina (LRR) (Dangle and Jones, 2001). O domínio LRR é conhecido pela função de ligação e reconhecimento da proteína efetora do patógeno (Avr), por outro lado o domínio NBS tem o papel de ligação a nucleotídeos e promove a troca de ADP por ATP, resultando na iniciação da transdução de sinal que vai levar a ativação dos mecanismos de resistência na célula vegetal (DeYoung and Innes, 2006). Essa ativação desencadeia frequentemente um tipo de morte celular no sítio da infecção, que é conhecida como resposta de hipersensibilidade (HR). A resposta de hipersensibilidade resulta em um acúmulo de tecido morto em volta da região onde o patógeno se encontra, impedindo assim o seu avanço (Moffett, Franham et al., 2002). Concomitantemente com a indução local da HR, ocorre em partes distantes da planta, longe do sítio da infecção, a ativação da expressão de genes de defesa que codificam para proteínas relacionadas à patogênese (PRs), como as quitinases, defensinas, osmotinas, inibidores de proteinases dentre outras. Adicionalmente, ocorrem mudanças na composição da parede celular e a síntese de fitoalexinas relacionadas à defesa vegetal. Esse tipo de resistência não localizada é denominada resistência sistêmica adquirida (SAR) e contribui para o bloqueio do avanço do patógeno. Esse tipo de resistência é mediada pelo ácido salicílico (Durrant and Dong, 2004). Adicionalmente a SAR, pode ocorrer um outro tipo de resistência sistêmica, induzida por rizobactérias não patogênicas, a resistência sistêmica induzida (ISR), essa é mediada pelas rotas do ácido jasmônico e etileno, não resultando em produção de PRs (Pieterse, Van der Ent. et al, 2007).

As rotas que determinam a resistência das plantas aos patógenos são bastante complexas e não inteiramente compreendidas, entretanto a busca e aplicação dos genes *R* em programas de melhoramento vegetal são de grande importância para a obtenção de plantas resistentes a vírus, bactérias, fungos e nematóides.

## **Prospecção de genes de resistência naturais (NEM-R) expressos em plantas infectadas com nematóides.**

Atualmente, pesquisas direcionadas a obtenção de plantas transgênicas resistentes a fitonematóides, apontam o uso eficiente de metabólitos secundários vegetais como fitoalexinas, a aplicação de organismos para o controle biológico e a obtenção de plantas transgênicas expressando inibidores de enzimas digestivas, toxinas cry, RNA de interferência e os genes de resistência natural a nematóides (*Nem-R*) (Williamson and Kumar, 2006; Gao, Starr et al. 2008).

Esses genes *Nem-R*, pertencem ao grupo de genes de defesa das plantas chamados de genes *R*, anteriormente referidos nesse trabalho. Uma série desses genes já foram clonados e caracterizados, de acordo com as espécies e raças de nematóides as quais eles conferem resistência (Fuller, Lilley et al, 2008). Dentre eles podemos citar os genes: *Mi1.2* de *Solanum peruvianum* que confere resistência a *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*; *HsI<sup>pro-1</sup>* de *Beta procumbens*, que confere resistência a *Heterodera schachtii* (Cai, Kleine et al, 1997), o gene *Gpa2* de *Solanum tuberosum* que confere resistência a *Globodera pallida* (Van der Vossen, Van der Voort et al, 2000), *Gro1-4* de *Solanum tuberosum* que confere resistência a *Globodera rostochiensis* (Paal, Henselewski et al, 2004) e o gene *Hero A* que promove resistência contra raças de *G. pallida* e *G. rostochiensis* (Ernst, Kumar et al, 2002; Sobczak, Avrova et al, 2005). Adicionalmente, a busca de novos genes NEM-R continua, pela aplicação de estratégias genômicas para a seleção de genes portadores de domínios LRR e NBS, expressos diferencialmente em plantas infectadas com nematóides. Essas seqüências com função desconhecida, porém codificadores de domínios conservados do tipo NBS ou LRR têm sido definidas como análogos de genes de resistência (RGAs) (Yaish, Saenz et al., 2004).

Diversos trabalhos relatam essa resposta após a infecção pelo nematóide (Williamson 1998; Jung and Wyss 1999; Seah, Miller et al. 2000; Sobczak, Avrova et al. 2005). A resistência mediada pelos genes NEM-R é limitada a algumas espécies ou raças de nematóides. Entretanto, a busca por genes análogos aos NEM-R conhecidos em plantas como algodão, café, cana de açúcar e soja, por exemplo, pode ser uma alternativa para a ampliação desse espectro de resistência conhecido até agora. A habilidade dos genes *R* em conferir resistência as maiores classes de patógenos de plantas incluindo bactérias, vírus, fungos e nematóides é bem conhecida em muitas espécies de plantas (Lehmann, 2002; Mehta, Brasileiro et al., 2008).

### **O papel da proteômica no entendimento das interações entre nematóides e plantas.**

A proteômica pode ser denominada como a tecnologia que complementa os estudos genômicos. Ou seja, é a análise, identificação e caracterização das proteínas que são realmente expressas em um tecido, ou organismo. Enquanto a genômica fornece informações de seqüências que serão potencialmente expressas (Malloy and Witzmann, 2002). Atualmente a proteômica atingiu um estado avançado com a associação das técnicas de gel bidimensional (2DE), que permite a separação de proteínas em larga escala e a espectrometria de massa (MS), utilizada para identificar as proteínas individualmente de acordo com suas massas moleculares.

Além disso, os espectrômetros de massa, aliados à ferramentas computacionais e a protocolos de digestão de proteínas, permitem o sequenciamento dessas proteínas isoladas pela eletroforese bidimensional, gerando assim informação de seqüência e gerando dados para os estudos de genômica funcional (Mehta, Magalhães et al, 2008). A exemplo das

bibliotecas de ESTs, os estudos proteômicos também estão sendo aplicados para avaliar a expressão de potenciais proteínas de resistência em plantas, sob condições diversas de stress abiótico (Jellouli, Ben Joira et al, 2008), ou sob ataque de vários patógenos como vírus (Brizard, Carapito et al, 2006; Casado-Vela, Selles et al 2006), bactérias (Jones, Thomas et al, 2004), fungos (Kim, Kim et al, 2004; Lee, Bricker et al, 2006) e nematóides (Bellafiore, Shen et al, 2008). Os estudos de proteômica envolvendo nematóides parasitas de plantas, ainda são bastante escassos (Jaubert, Ledger, et al, 2002; Bellafiore, Shen et al, 2008), entretanto o campo de estudo está aberto para a descoberta de novas proteínas de resistência vegetal, produzidas sob o estímulo dos fitonematóides. Esses estudos, juntamente com os estudos genômicos geram perspectivas para a aplicação de estratégias moleculares para o controle desses parasitas em plantas transgênicas de interesse econômico (Mehta, Magalhães et al, 2008).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO.

### ARTIGO1.

Identification of genes in cotton potentially involved in resistance to *Meloidogyne incognita*

A. E. A. D. Barbosa<sup>1,2</sup>, R. R. Frazão<sup>3</sup>, B. S. L. Souza<sup>1,2</sup>, O. B. Oliveira-Neto<sup>4</sup>, A. A. B. Viana<sup>5</sup>, E. V. S. Albuquerque<sup>6</sup>, B. C. Tognawa<sup>7</sup>, L. M. Guionães<sup>8</sup>, L. Lins<sup>9</sup>, N. F. Martins<sup>9</sup>, H. Cix<sup>9</sup>, D. Fernandez<sup>7</sup> and M. F. Grossi-de-Sa<sup>1,2,5</sup>.

<sup>1</sup>Empresa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqIEB - Parque Estação Biológica, WS Norte Final, Brasília - DF - Brazil, 70770-900, <sup>2</sup>Departamento de Biologia Celular- UnB- Brasília-DF, <sup>3</sup>Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia, UCB, Brasília-DF, <sup>4</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF; <sup>5</sup>USC, Campinas-SP, <sup>6</sup>IRD-Montpellier, France.

<sup>8</sup>Address correspondence to: <sup>1</sup>Empresa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqIEB - Parque Estação Biológica, WS Norte Final, Brasília - DF - Brazil, 70770-900. E-mail: fabiosa@emrgen.embrapa.br

#### Abstract

*Meloidogyne incognita* is a nematode responsible for heavy damage to economically important plants, including cotton (*Gossypium hirsutum*) the most important fiber crop worldwide. The control of this pathogen is heavily centered on chemical nematicides, which are toxic to humans and the environment, harmful to non-target organisms and expensive. Alternatively, resistant varieties of cotton obtained from conventional breeding programs represent an attractive strategy for the control of *M. incognita*. In this context, the aim of the work reported here was to analyze the gene expression profile of cotton plants infected with *M. incognita* in order to understand the

mechanisms involved with resistance. EST libraries of cotton genotypes resistant to or susceptible to infection by *M. incognita* were constructed and sequenced, generating 2,262 sequences that were assembled into 1,827 groups (234 contigs and 1,593 singlets). The results showed genes differentially expressed in both resistant and susceptible cotton. After manual annotation, 20 genes were found to be expressed exclusively in the resistant cotton genotypes, with functions related to pathogen recognition (3), signal transduction (5), defense mechanisms (10) and protein synthesis transport and activation (3). The functions of these genes acting coordinately could indicate the existence of a cotton defense pathway against nematode attack. These data show the complexity in plant defense responses, and indicate some candidate genes for validation and use through transformation in other agronomically important plants.

**Keywords:** root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, resistance genes, *Gossypium hirsutum*, cotton.

**Abbreviations:** RKN, root knot nematode; ROS, reactive oxygen species; HR, hypersensitive response.

## Introduction

The worldwide crop losses caused by plant-parasitic nematodes has reached over US\$ 157 billion annually (Abad *et al.*, 2008). The most economically important group comprises the root-knot nematodes (RKN), of the genus *Meloidogyne*. Around 95% of all root-knot nematode infestations are caused by a small number of species, which include *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* and *M. hapla*, they attack more than 1,700 plants species. *M. incognita* is considered the most severe phytopathogen of this

group (Huang *et al.*, 2006), and recently, the protein profile of its infective form was described, highlighting the mode of action of this pathogen (Bellafiore *et al.*, 2008).

Traditionally nematode control has been driven by using resistant varieties, crop rotation, cultural practices and chemical nematicides. However, these chemicals are toxic or volatile, non specific, and are known to pose risks to human health and the environment. Furthermore, the majority of plant parasitic nematodes live in soil or within plant roots, hindering the action of chemical nematicides. In addition, the cuticle and other surface structures of the nematodes are impermeable to many organic molecules (Chitwood, 2002).

During millions of years of evolution plants have developed, through natural selection, a complex response system to protect themselves from nematodes, including physical and chemical barriers, as well as particular resistance genes that allow recognition of specific pathogens. Part of this defense reaction is released by specialized groups of gene products known as resistance proteins (R) (Hinchliffe *et al.*, 2005, Williamson and Kumar, 2006). The greater part of R proteins are characterized by several domains including nucleotide-binding site (NBS), leucine-rich repeat (LRR) regions, coiled coil (CC) domain and a domain that has homology to the Toll/Interleukin-1 Receptor (TIR). The NBS domain may be related to downstream signaling, and the LRR domain is involved in pathogen recognition (Takken *et al.*, 2006). The ability of R genes to confer resistance against the major classes of plant pathogens, including bacteria, virus, fungi and nematodes is already reported for a huge number of plant species (Lehmann, 2002), and the characterization of new genes involved in resistance to phytonematodes is of great interest in crop improvement.

RKN resistance markers have already been characterized for many plants like *Prunus cerasifera* (Claverie *et al.*, 2004), *Arachis* (Garcia *et al.*, 1996), rice (Shrestha *et*



*al.*, 2007) and cotton (Wang *et al.*, 2006). They are important tools for understanding the host-pathogen relationship and for incorporating RKN resistance into elite cotton cultures (Wang *et al.*, 2006). Secondary metabolites can also be responsible for plant resistance to root-knot nematodes (Potenza *et al.*, 2001).

Cotton is one of the most economically important crops worldwide. However, its production is highly affected by diverse pests, including nematodes, that lead to a decrease in quality and fiber length (Lopez-Lavalle *et al.*, 2007, Medrano *et al.*, 2007, Showler, 2008, Smith *et al.*, 1991). In this context, EST libraries from resistant and susceptible cotton genotypes infected with *Meloidogyne incognita* race 3 were sequenced and analyzed. The putative genes related to nematode resistance analyzed here are available for validation and introgression into other economically important crops.

#### Materials and Methods

**Plant materials** - Two cotton varieties (*Gossypium hirsutum* L.), susceptible (IAC 98/708) and resistant (IAC 96/414), generated by the Agronomic Institute, São Paulo, Brazil, using classic genetic breeding, were grown in a greenhouse. On the thirtieth day the plant roots were inoculated with 1,200 second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* race 3 per plant, and maintained in a greenhouse. The roots were collected 2, 4 and 18 days after the inoculation and immediately frozen in liquid nitrogen, forming a collection of roots infected at different times. Frozen tissues were stored at -80 °C until use.

RNA preparation and construction of cDNA library — Total RNA was extracted from frozen test tissues using QIAGEN RNeasy Lysis Beads, RNA Isolation (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Poly A<sup>+</sup> mRNA was isolated using an oligo(dT) mRNA Bath Protocol kit according to the manufacturer's protocol (QIAGEN). A cDNA library was constructed from 4 micrograms of poly A<sup>+</sup> mRNA, measured by absorbance at 260 nm, in the pSPCRIPT 1 vector amplifying the *Pvu*I and *Not*I restriction sites at the 3' and 5' ends respectively. The Superscript Plasmid System with Gateway Technology was used for cDNA synthesis and cloning, (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Plasmid isolation and sequencing — The library was amplified in *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  (Invitrogen), plated on LB agar and grown overnight at 37 °C. Plasmid preparations of the individual transformants were performed in 96 well plates according to the protocol described at the web site <http://www.merckmillipore.com/pt/pt/ind.html> cDNA inserts were sequenced using SP6 and T7 primers by DNA Automatic Sequencer (Applied Biosystem model 3700, Hitachi Genetic Resources and Biotechnology, Brazil).

EST processing and sequence analysis — Trace files were submitted to the QIAGEN system at Hitachi Genetic Resources and Biotechnology Information Laboratory ([www.genome.merck.com](http://www.genome.merck.com)). Base calling and quality assignment of each base of the EST sequences were performed using the program PHRED (Hewitt *et al.*, 1998). The resulting sets of cleaned sequences were assembled into clusters using the TIGER program of the TIGER (Institute for Genome Research). The criteria applied were a minimum of 30 bases of similarity between sequences and 90% identity. The stud-

automatic annotation was performed by BLASTX 2.2.3 (Altschul *et al.*, 1990) using the following databases in GenBank: complete and non-redundant database (with 2,452,561 sequences), all protein sequences from *Arabidopsis thaliana* (MIPS with 25,458 sequences), K001.s.1.0 (with 4825 sequences), Swissprot (with 170,940 sequences) (Tatusov *et al.*, 2003) and Pfam.s.11.0 (with 7255 sequences) (Finn *et al.*, 2006). These results were displayed on a web page: <http://www.genoma.eurhpa.bridgesaustralia.net>. For all sequences the results were analyzed by annotators to decide the final annotation.

**Electronic subtraction** - To identify specific transcripts from susceptible and resistant cotton varieties, each sequence was sorted by reads composition with a PERL script. Sequences exclusively from susceptible or resistant plants were placed into two databases, and the clusters containing both resistant and susceptible ESTs were sorted into a third database by the same script. Each contig could then be described by its percentage of R (resistant) and S (susceptible) sequences, which defined specific, preferential and common transcripts. These percentages were used to identify putative differentially expressed genes in cotton resistant plants, and thereby to identify which could be related to pathogen resistance.

## Results and Discussion

Analysis of sequenced cDNA libraries is one of the most efficient methodologies to identify the expression profile in specific biological situations (Deng *et al.*, 2005). Here this approach was used to detect the genes involved with the response in cotton to *M. incognita*.

After sequencing and assembly, 1,827 cDNA sequences were obtained, comprising 234 contigs and 1,593 singlets. From these, 789 singlets came from resistant plants and 804 singlets from susceptible plants. The majority of the sequences formed contigs containing reads from resistant and susceptible cotton plants (83%). Surprisingly, a larger number of contigs were formed with ESTs from susceptible plants (32%), rather than from resistant plants (15%) (Figure 1). These data suggest that susceptible cotton plants expressed more genes than resistant ones. A similar proportion was also observed in the composition of singlets, suggesting that it is probably not the quantitative levels of expression, but instead, the types of genes expressed that might interfere with nematode survival. Comparable data were observed in tomato plants (Schaff *et al.*, 2007).

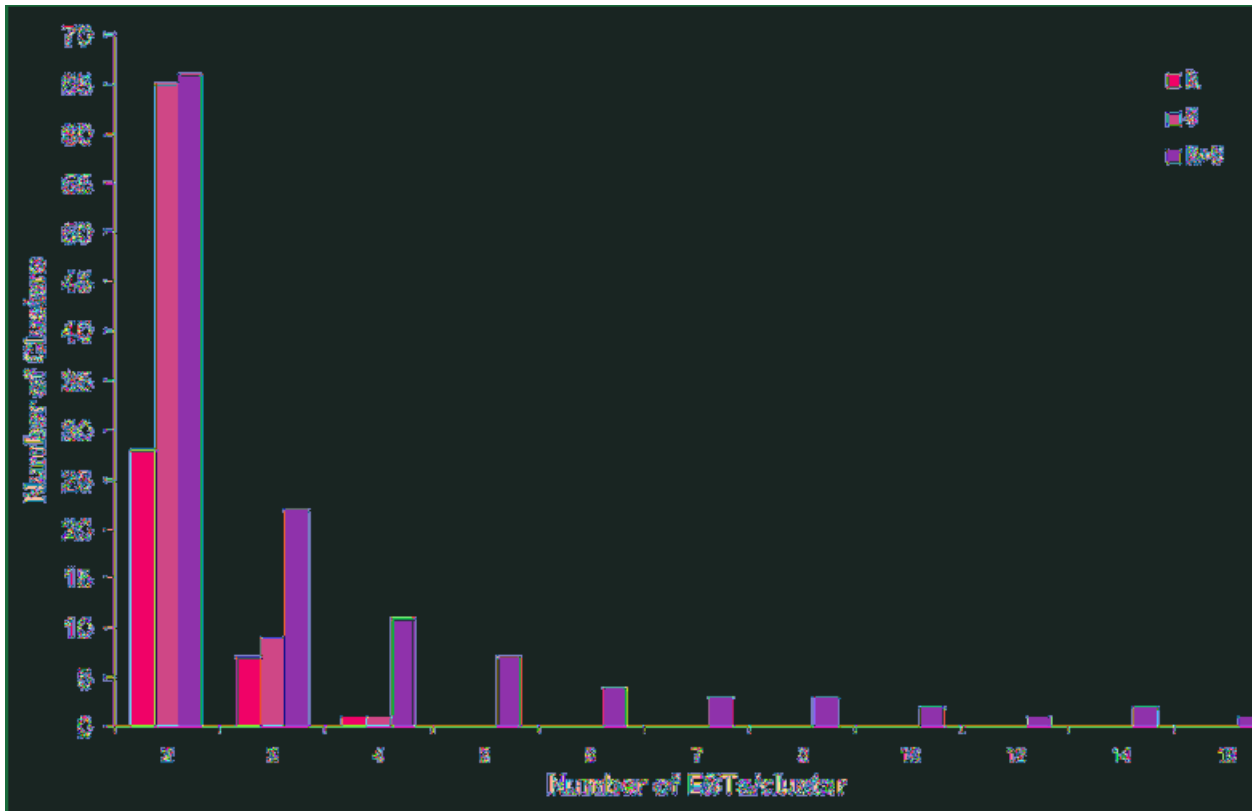
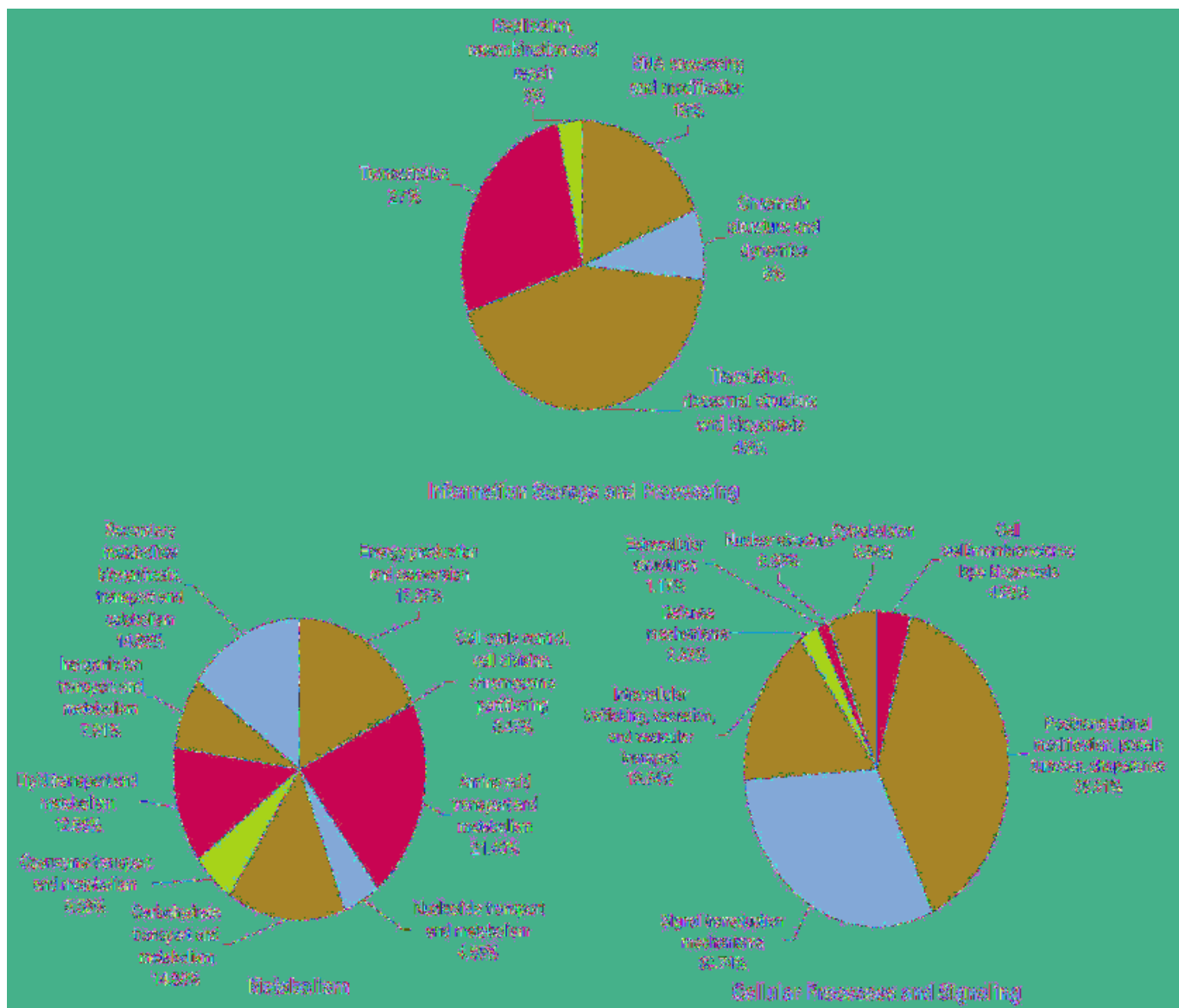


Figure 1. Number of generated clusters, classified by composition and number of reads in each cluster. R, clusters formed only with reads that came from resistant plants; S, clusters formed only with reads that came from susceptible plants; R + S, clusters formed with reads that came from both plants.

KOCC classification allowed the identification of 768 pathways, as well as 180 genes with an incomplete classification. 583 of the classified clusters were divided into three categories, designated Cellular Processes and Signaling (23 sequences), Metabolism (213 sequences) and Information Storage and Processing (116 sequences) (Figure 2). In relation to the category of cellular processes and signaling, the KOCC annotation (Figure 2) identified 2.33% genes with defense mechanisms and 35.74% with signal transduction mechanisms. Another category that could be related to pathway defense is the biosynthesis, transport and catabolism of secondary metabolites (Figure 2), that reached 14.88% of the genes in KOCC's annotation.



**Figure 2.** Graphic representation of the functional annotation using the KOG database. Cotton ESTs were classified into three categories, as follows: (1) information storage and processing, (2) metabolism and (3) cellular processes and signaling.

Functional characterization of the sequenced contigs and singlets revealed several genes related to biotic and abiotic stresses that were differentially expressed in resistant and susceptible cotton plants. In this work the analyses were concentrated on genes related to biotic stress, which may be involved in pathogen defense and signalling. At the end of annotation several genes expressed exclusively in resistant

plants, were identified as being related to pathogen resistance (Table 1). They were functionally grouped by (i) defense signal transduction, (ii) protein activation and transport, (iii) pathogen recognition, as well as, (iv) action against the pathogen, and they are all described below. However, six contigs, with reads found only in resistant plants, did not have hits in any data bank used in this work.

**Table 1.** BLASTX results of the clusters and singlets expressed only in resistant cotton plants.

GenBank Accession	N° of Reads	Putative Gene	Related Taxon	E-value
FL634413	4	Pyruvate decarboxylase	<i>Lotus corniculatus</i>	0.0
FL634414	3	Translation initiation factor 5A	<i>Hevea brasiliensis</i>	4e-84
FL634415	2	Superoxide dismutase	<i>Fagus sylvatica</i>	8e-80
FL634416	2	Molecular chaperone Hsp90	<i>Nicotiana glauca</i>	e-108
FL634417	2	Reversibly glycosylated polypeptide	<i>Gossypium hirsutum</i>	e-110
FL634418	2	Lectin-rich repeat protein	<i>Citragomphella nitida</i>	6e-81
FL634419	2	Cold-acclimation specific protein 15	<i>Medicago truncatula</i>	8e-52
FL634420	2	TOC33	<i>Brassica napus</i>	2e-101
FL634421	2	MATE efflux family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1e-94
FL634422	2	Glycerophosphodiester phosphodiesterase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3e-70
FL634423	2	ZF-HD homeobox protein	<i>Flavaria bifida</i>	9e-57
FL634412	1	Ischaemum reductase	<i>Legumin alba</i>	3e-55
FL634424	1	Endo-1,5-β-D-glucosidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3e-82
FL634425	1	Pectinesterase	<i>Populus tremula x P. tremuloides</i>	9e-52
FL634426	1	Benzenazole-resistant 1 protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9e-78
FL634427	1	Shyl	<i>Medicago sativa</i>	1e-57
FL634428	1	Cyclophilin	<i>Gryza setosa</i>	7e-81
FL634429	1	Vesicle transport v-SNARE 15	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7e-78
FL634430	1	Class IV chitinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3e-28
FL634451	1	Actin depolymerizing factor 1 (ADF1)	<i>Populus x hybrida</i>	2e-66
FL634452	1	Hypersensitive-induced response protein	<i>Chenopodium</i>	2e-78
FL634453	1	Dirigent protein	<i>Gossypium hirsutum</i>	8e-81
FL634454	1	Calcium-dependent protein kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9e-57
FL634455	1	Circumaryl-CoA reductase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1e-58

For defense signal transduction function (i), the most expressed gene in resistant cotton plants was pyruvate decarboxylase (FL684413). This enzyme is mainly related to alcohol metabolism in response to oxygen absence (Kotapalli *et al.*, 2008), and its expression has already been observed in stress signal transduction and in disease-resistance response (Tudoge *et al.*, 1999). Additionally, changes in sugar metabolism during disease response has also been documented in some plants (Tudoge *et al.*, 1999). In several plants, like soybean (Park *et al.*, 2007) proteins with Zinc-finger domains are transcriptional factors responsible for activating genes in pathogen response pathways. Remarkably, a gene with this domain (FL684423) was observed in cotton resistant plants. Furthermore, calcium-dependent protein kinase (FL684424) acts in plant defense response (Francis *et al.*, 2008), as well as, nicotinoyl-CoA reductase (FL684433) which participates in defense signaling in rice (Kawasaki *et al.*, 2009). In addition, brassinole resistant protein (FL684426) is involved in the synthesis of brassinolide, and this hormone is responsible for inducing disease resistance in plants (Bekashtiz *et al.*, 2003).

Another three genes, with functions associated with the activation, synthesis and transport of proteins (ii) were found. First is the molecular chaperone Hsp90 (FL684416), that participates in folding of R proteins, which act to protect the plant against pathogen attack (Bennett *et al.*, 2005). Another essential role of Hsp90 is the activation of *Sal-I* protein, a *Sal* bacterial resistance gene found in tomato plants (Bhattarai *et al.*, 2007a). A translation initiation factor SA (FL684414), the second most expressed gene in resistant plants, has also had its expression observed in response to bacterial attack in a resistant variety of rice (Hua *et al.*, 2004). The last is the vesicle



transport V-SNARE (FL684429) protein, associated with plant immune responses (Robatzek, 2007).

In relation to pathogen recognition (iii), the gene (FL684432) coding for a hypersensitive-induced response protein was found. This protein can act, after pathogen recognition, by the induction of rapid cell death, and activation of other pathogen related genes (Rostoks *et al.*, 2003). In the same way, the expressed gene FL684418, possessed the LRR domain within its sequence, related too with pathogen recognition (Diévert and Clark, 2004).

Other genes could be grouped by their action against pathogens (iv). The enzyme superoxide dismutase (FL684415) usually participates in defense against reactive O<sub>2</sub> species (ROS) (Alscher *et al.*, 2002), and can also be expressed in plants like tomato (Kuzniak and Skłodowska, 2005), barley (Able, 2003) and in yellow lupine (Morkunas *et al.*, 2004) infected with pathogens. Recently, research involving *Vigna unguiculata* showed the importance of production and degradation of ROS in the resistance against RKN (Das *et al.*, 2008). Equally, the peroxiredoxin (FL684425) acts in pathogen defense response in poplar and also against oxidant stress (Roubier *et al.*, 2004). On the other hand, the function of the reversibly glycosylated polypeptide (FL684417) remains unclear, but the interaction of this polypeptide with tomato leaf curl virus has already been observed, suggesting a possible defense function (Selth *et al.*, 2006). Regarding the enzyme isoflavone reductase (FL684412), high expression levels in an alfalfa cultivar resistant to *M. incognita* have been observed (Potanza *et al.*, 2001). Additionally, the enzyme endo-1,3-D-glucosidase (FL684424) may be involved in resistance to fungi (Okinaka *et al.*, 1995) and to *Heterodera rostochiensis* (Giebel, 1976), a plant nematode. In parallel, the protein Skp1 (FL684427) was expressed in rice resistant to bacterial leaf blight and gall midge (Kottapalli *et al.*, 2006). Chitinases are

generally expressed in several plant-pathogen interactions, as has been observed for a spruce plant resistant to *Ceratobasidium bicorne*, a root pathogen (Johnk *et al.*, 2005). In our work, the chitinase (FL684430) was found only in resistant cotton plants challenged with *M. incognita*. The expression of a dirigent protein (FL684433) is noted in wounding (Ralph *et al.*, 2006). A cyclophilin with antifungal activity was found in *Brassica campestris* (Lee *et al.*, 2007), and in our analysis a cyclophilin (FL684428) was expressed only in resistant cotton plants. Another gene that was characterized with antifungal defense is the actin depolymerizing factor (FL684431) (Miklis *et al.*, 2007).

The contigs showing similarity to cold acclimation specific protein (FL684419), TOC33 (FL684420), MATE efflux protein (FL684421) and glycerophosphodiester phosphodiesterase (FL684422) have not apparently been associated with any pathogen resistance mechanism. Interestingly, these genes were expressed only in cotton resistant plants (Table 1).

The resistance mechanisms against nematodes attack in plants could be explained due to a several complex responses, which are well described in recent papers (Bhattarai *et al.*, 2007a, Gao *et al.*, 2008, Schaff *et al.*, 2007). This work identified some putative genes expressed only in the resistant cotton variety, which are related to pathogen recognition, signaling and defense (Table 1). According to their functions it was possible to infer a putative response pathway against nematodes (Figure 3). In this scenario, LRR protein might be interacting with Avr detecting the parasite presence, triggering the plant Hypersensitive response (HR) (Dievart and Clark, 2004). In parallel, Hsp90 possibly binds to LRR protein enhancing its activity (Bhattarai *et al.*, 2007). Furthermore, the hypersensitive response (HR) could be induced by hypersensitive-induced response protein (HIR) (Rostoks *et al.*, 2003) as well as by Ca-dependent protein kinase (Romeis *et al.*, 2000) (Figure 3). Additionally, the enzyme superoxide

dismutase promotes the synthesis of the  $H_2O_2$  contributing to the HR-mediated cell death with the accumulation of reactive oxygen species in the cells (Iakimova *et al.*, 2005).

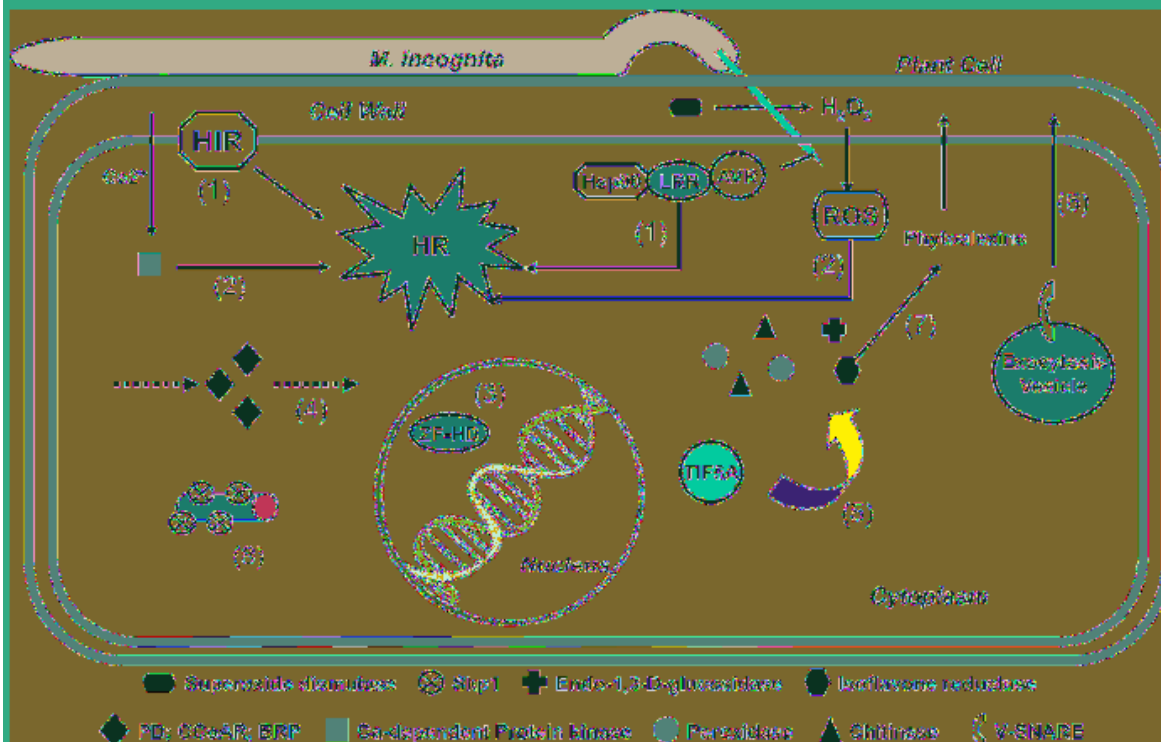
On the other hand, the ZF-HD homeobox protein could be activating the defense PR genes transcription (Park *et al.*, 2007), for instance, the class IV chitinase (Kasprzewska, 2003). Subsequently, the PR proteins might be transported for the extra cellular medium with the participation of V-SNAREs, that promotes the anchor of the vesicles in the cellular membrane to release the PRs in the extracellular medium (Róbatzek, 2007). Besides PRs synthesis, the cotton resistant plants also expressed isoflavone reductase, which is related to the production of phytoalexins toxic to *M. incognita* (Potenza *et al.*, 2001), and endo-1,3-D-glucosidase that showed activity against *H. rasilochiensis* (Giebel, 1976).

During the plant pathogen interaction, Skp1 protein could be responsible to select target proteins for degradation. These target proteins could be produced by nematode during the infection process, or even by the plant cell that might be inhibiting the defense response (Kottapalli *et al.*, 2006).

Additionally, protein pyruvate decarboxylase, cinnamoyl-CoA reductase and brassinazole resistant protein could make the signal transduction to activate the transcription of resistance genes (Kawasaki *et al.*, 2006, Kottapalli *et al.*, 2006, Lee *et al.*, 2007, Nakashita *et al.*, 2003). Subsequently, the translation initiation factor 5A could act in synthesis of resistance proteins (Han *et al.*, 2004).

This work has identified several genes that could be involved with nematode resistance, and that seem to be differentially expressed in other nematode-resistant plants. Future experiments will be necessary to validate the genes responsible for nematode resistance in cotton plants. Subsequently, a better understanding of the

molecular mechanisms of resistance will allow the development of nematode resistance in commercially important crops worldwide.



**Figure 3.** Putative signaling and defense response pathway against *M. incognita* in cotton. In this model, the presence of nematode can be detected by LRR or HIR, with possible LRR activation by Hsp90 (1). This detection triggers the HR response that can be also activated by Ca-dependent protein kinase and ROS (2). After HR induction, ZF-HD initiates the transcription of PR and defense genes (3), with possible action of TIF5A in translation of them (4). Furthermore, PD, CCoAR and BRP could also make the signal transduction activating the transcription of resistance genes (5). Some defense proteins (PR) can be transported to extra cellular medium by V-SNARE (6) and others, like isoflavone reductase, can produce toxic compounds to nematode (7). Finally, Skp1 might be responsible to select target proteins for degradation (8).

### Acknowledgments

This work was supported by Brazilian grants from EMBRAPA, UCB, CNPq, CAPES and FINEP.

## REFERENCES

- Abad P, Gouzy Jm, Anry J-M, Castagnone-Sereno P, Danchin EGJ, Deleury E, Perfus-Barbeoch L, Anthouard Vr, Artiguenave Fe, Blok VC, Caillaud M-Cc, Coutinho PM, Dazilva C, Luca FD, Dean F, Esquibet M, Flutre T, Goldstone JV, Hamarouch N, Hewezi T, Jaillon O, Jubin C, Leonetti P, Magliano M, Maier TR, Markov GV, McVeigh P, Pesole G, Poulain J, Robinson-Rechavi M, Sallet E, Se'guens Ba, Steinbach D, Tytgat T, Ugarte E, Ghelder Cv, Veronico P, Baum TJ, Blaxter M, Bleve-Zacheo T, Davis EL, Ewbank JJ, Favery B, Grenier E, Henciszat B, Jones JT, Laudet V, Maule AG, Quesneville H, Rosso M-Nl, Schie T, Smit G, Weissenbach J, Wincker P (2008) Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology* 26:909-915
- Able AJ (2003) Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens. *Protoplasma* 221:137-143
- Alscher R, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53:1331-1341
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 403-410
- Bellafiore Sp, Shen Z, Rosso M-N, Abad P, Shihl P, Briggs SP (2008) Direct Identification of the *Meloidogyne incognita* Secretome Reveals Proteins with Host Cell Reprogramming Potential. *PLoS Pathogens* 4:1-12
- Bentem SF, Vossen JH, Vries KJ, Wees S, Tarneling WIL, Dekker HL, Kester CG, Haring MA, Takken FLW, Cornelissen BJC (2005) Heat shock protein 90 and its co-chaperone protein phosphatase 5 interact with distinct regions of the tomato I-2 disease resistance protein. *The Plant Journal* 43:284-298
- Bhattachai KK, Li Q, Liu Y, Dinesh-Kumar SP, Kaloshian I (2007) The Mi-1-mediated pest resistance requires Hsp90 and Sgt1. *Plant Physiology* 144:312-323
- Bhattachai KK, Li Q, Liu Y, Dinesh-Kumar SP, Kaloshian I (2007) The Mi-1-Mediated Pest Resistance Requires Hsp90 and Sgt1 [OA]. *Plant Physiology* 144:312-323
- Chitwood DJ (2002) Phytochemical Based Strategies for Nematode Control. *Annual Review of Phytopathology* 221-249
- Clavierie M, Dirlwanger E, Cesson P, Bosselut N, Leonals AC, R. V, Kleinhenz M, Lafargue B, Caboche M, Chalhoub B, Estuénjand D (2004) High-resolution mapping and chromosome landing at the root-knot nematode resistance locus *Mufron Myrobalan plum* using a large-insert BAC DNA library. *Theoretical and Applied Genetics* 1318-1327

- Das S, DeMason DA, Ehlers JD, Close TJ, Roberts PA (2008) Histological characterization of root-knot nematoderesistance in cowpea and its relation to reactive oxygen species modulation. *Journal of Experimental Botany* [Epub ahead of print]:1-9
- Diévari A, Clark SB (2004) LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development* 131:251-261
- Diévari A, Clark SB (2004) LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development* 131:251-261
- Deng Q, Krauss L, Oakley FD, Wang BB, Brendel V (2005) Comparative EST analyses in plant systems. *Methods in Enzymology* 395:400-418
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 8:175-185
- Finn R, Mistry J, Schuster-Bockler B, Griffiths-Jones S, Hollich V, Lassmann T, Moxon S, Marshall M, Khanna A, Durbin R, Eddy S, Steinhilber E, Bateman A (2006) Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Research* 34:D247-D251
- Gao X, Starr J, Göbel C, Engelberth J, Feussner I, Tumlinson J, Koloniets M (2008) Maize 9-lipoxygenase ZmLOX3 controls development, root-specific expression of defense genes, and resistance to root-knot nematodes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21:98-109
- García GM, Stalker HT, Shroeder E, Kochert G (1996) Identification of RAPD, SCAR, and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis caryocarpus* into *Arachis hypogaea*. *Genome* 39:836-845
- Giebel J (1976) Beta-glucosidase activity in potato roots and its possible role in plant tissue response to *Heterodera rostochiensis*. *Bulletin de l'Académie polonaise des sciences Série des sciences biologiques* 24:37-42
- Han CU, Lee CH, Jang KS, Choi GI, Lim HK, Kim JC, Ahn SN, Choi JE, Cha JS, Kim HT, Cho KY, Lee SW (2004) Identification of rice genes induced in a rice blast-resistant mutant. *Molecules and Cells* 17:462-468
- Hinchliffe DJ, Liu Y, Petenza C, Segupta-Gopalan C, Cartrell RG, Zhang J (2005) Resistance gene analogue markers are mapped to homologous chromosomes in cultivated tetraploid cotton. *Theoretical and Applied Genetics* 1074-1085
- Huang G, Allen R, Davis EL, Baum TJ, Hussey RS (2006) Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:14302-14306
- Iakimova ET, Michalczyk L, Woltering EJ (2005) Hypersensitive cell death in plants – its mechanisms and role in plant defence against pathogens. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 13:135-158

- Jalnik B, Hietala AM, Fossdal CG, Collinge DB, Newman MA (2005) Defense-related genes expressed in Norway spruce roots after infection with the root rot pathogen *Coniophora borealis* (anamorph: *Rhizoctonia* sp.). *Tree Physiology* 25:1533-1543
- Kasprowaska A (2003) Plant chitinases - Regulation and function. *Cellular & Molecular Biology Letters* 8:209-224
- Kawasaki T, Kato H, Nakatsubo T, Hasegawa K, Wakabayashi K, Takahashi H, Umemura K, Umesawa T, Shimamoto K (2006) Chitinase1-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:230-235
- Kottapalli KB, Serla H, Kiluchi S (2006) In silico insight into two rice chromosomal regions associated with submergence tolerance and resistance to bacterial leaf blight and gall midge. *Biotechnology Advances* 24:561-588
- Kutcolak E, Shtedrovska M (2005) Fungal pathogen-induced changes in the cuticular systems of leaf periderms from infected tomato plants. *Planta* 222:192-208
- Lee JR, Park SC, Kim JY, Lee SS, Park Y, Cheong GW, Hahn KS, Lee SY (2007) Molecular and functional characterization of a cyclophilin with antifungal activity from Chinese cabbage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 353:672-678
- Lefmann P (2002) Structure and evolution of plant disease resistance genes. *J Appl Genet* 43:403-414
- Lupas-Lavalle LMB, McFadden H, Buhaker CL (2007) The eVent of Gossypium C-genome chromosomes on resistance to fusarium wilt in allotetraploid cotton. *Theoretical and applied genetics* 113:477-488
- Madano EG, Espinosa JF, Bell AA (2007) Transmission of cotton seed and boll rotting bacteria by the southern green stink bug (*Nesara viridula* L.). *Journal of Applied Microbiology* 103:436-444
- Miklis M, Casanova C, Lipka V, Schulze-Lefert P, Panstruga B (2007) Barley MLO modulates actin-dependent and actin-independent antifungal defense pathways at the cell periphery. *Plant Physiology Preview*
- Machmas I, Bednarski W, Koskowska M (2004) Response of embryo axes of germinating seeds of yellow lupine to *Fusarium oxysporum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:453-459
- Nakashita H, Yasuda M, Nitta T, Asami T, Fujitaka S, Arai Y, Sakimata K, Takatsuto S, Yamaguchi I, Yoshida S (2003) Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant Journal* 33:887-898
- Okunaka Y, Minori K, Takeo K, Nishimura S, Takenaki Y, Yamashita N, Yoshikawa M (1995) A Structural Model for the Mechanism of Helicase Release from Fungal Cell Walls by Plant Beta-L,3-Endoglucanase. *Plant Physiology* 109:839-845

Park HC, Kim ML, Lee SM, Bobk JD, Yoo D-J, Liro CG, Heng JC, Lee SY, Cho MJ, Chung WS (2007) Pathogen-induced binding of the soybean zinc finger homeodomain proteins GmZF-HD1 and GmZF-HD2 to two repeats of ATTA homeodomain binding site in the estradiol isoforn 4 (GmCaM4) promoter. *Nucleic Acids Research* 35:3612–3623

Potenza C, Thomas SH, Sengupta-Gopalan C (2001) Genes Induced during early response to *Meloidogyne incognita* in roots of resistance and susceptible alfalfa cultivars. *Plant Science* 289-299

Ralph S, Park JY, Bohlmann J, Mausfield SD (2006) Dirigent proteins in conifer defense: gene discovery, phylogeny, and differential wound- and insect-induced expression of a family of DGR and DGR-like genes in spruce (*Picea* spp.). *Plant Molecular Biology* 60:21-40

Rebatzek S (2007) Vesicle trafficking in plant immune responses. *Cellular Microbiology* 9:1-8

Ramosis T, Piedras P, Jones JDG (2000) Resistance Gene-Dependent Activation of a Calcium-Dependent Protein Kinase in the Plant Defense Response. *The Plant Cell* 12:803–815

Ramosis T, Piedras P, Jones JDG (2000) Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell* 12:803-815

Restakis N, Schumierer D, Kadra D, Kleinhofs A (2003) Barley putative hypersensitive induced reaction genes: genetic mapping, sequence analysis and differential expression in disease lesion mimic mutants. *Theoretical and applied genetics* 107:1094-1101

Roubier N, Gelbaya E, Gualberto JM, Jorfy MN, Fay E, Hirasawa M, Duplessis S, Lemaire SD, Frey P, Martin F, Marier W, Knaff DB, Jacquet JP (2004) Poplar Peroxidase Q: A Thioredoxin-Linked Chloroplast Antioxidant Functional in Pathogen Defense. *Plant Physiology* 134:1027–1038

Schaff JE, Nielsen DM, Strub CP, Schell EH, Bird DM (2007) Comprehensive Transcriptome Profiling in Tomato Reveals a Role for Glycosyltransferase in Mi-Mediated Nematode Resistance. *Plant Physiology* 144:1079–1092

Selth LA, Dogra SC, Rasheed MS, Randles JW, Rezaian MA (2006) Identification and characterization of a host reversibly glycosylated peptide that interacts with the Tomato leaf curl virus V1 protein. *Plant Molecular Biology* 61:297–310

Showler AT (2008) Relationships of abscised cotton fruit to boll weevil (*Coleoptera: Curculionidae*) feeding, oviposition, and development. *Journal of Economic Entomology* 101:68-73

Shrestha R, Uzzo F, Wilson MI, Price AH (2007) Physiological and genetic mapping study of tolerance to root-knot nematode in rice. *New Phytologist* 176:665–672



Smith GR, Veach JA, Combsay JR (1981) The effects of *Aphis* species on cotton development and fiber quality on the Texas high plains. . In: Proc Beltwide Cotton Conf. Natl. Cotton Comm. Ass., San Antonio, TX, pp 177-178

Talbot M, Dupuis L, Kuhlmeier C (1999) Ethanolic fermentation: new functions for an old pathway. *Trends in Plant Science* 4:523-525

Talbot M, Albrecht M, Tanseling WL (2006) Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* 9:383-390

Tateno Y, Federova BA, Jackson JD, Jacobs AB, Kleyutin S, Kozmin SV, Kozlov DM, Macomber E, Melchior SL, Nikolskaya AM, Rao BB, Srinivas S, Sverdrup AV, Vasudevan S, Wolf YI, Yin JJ, Blais DA (2009) The OGG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* 4:

Wang C, Ullow M, Roberts PA (2006) Identification and mapping of microsatellite markers linked to a root-knot nematode resistance gene (*ren1*) in *Acacia* *leucophloea* cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 770-777

Williamson VM, Kramer A (2006) Nematode resistance in plants: the battle underground. *Trends in Genetics* 22:396-403

## REVIEW ARTICLE

## Plant–pathogen interactions: what is proteomics telling us?

Angela Mehta<sup>1</sup>, Ana C. M. Brasileiro<sup>1</sup>, Djaír S. L. Souza<sup>1,2,\*</sup>, Eduardo Romano<sup>1,3\*</sup>, Magnólia A. Campos<sup>4,5\*</sup>, Maria F. Grossi-de-Sá<sup>1,6\*</sup>, Marília S. Silva<sup>3,6\*</sup>, Octávio L. Franco<sup>2,6,7\*</sup>, Rodrigo B. Fraga<sup>1,6\*</sup>, Rosângela Bevilotti<sup>7,8\*</sup> and Thales L. Rocha<sup>1,6\*</sup>

<sup>1</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brazil

<sup>3</sup> Universidade Federal do Piauí, Brazil

<sup>4</sup> Empresa Brasileira, Planaltina, Brazil

<sup>5</sup> Centro de Análise Proteômica e Espectrometria de Massa em Ciências Biológicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brazil

<sup>6</sup> Departamento de Biologia, Universidade Federal do Juiz de Fora, Brazil

<sup>7</sup> Empresa Arroz e Feijão, Goiânia, Brazil

### Keywords

bacteria; defense proteins; functional genomics; fungi; mass spectrometry; nematode; pathogenity proteins; proteomics; two-dimensional electrophoresis; virus

### Correspondence

A. Mehta, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, PqEF 04, W 5 Norte Final, CEP 70770-900 Brasília, DF, Brazil  
 Fax: +55 61 3346 3829  
 Tel: +55 61 3446 4931  
 E-mail: amehta@embrapa.br

\*These authors contributed equally to this work

Received 27 Mar 2008; revised 22 May 2008; accepted 23 May 2008

doi:10.1111/j.1745-4653.2008.02622.x

## Introduction

Plant–pathogen interactions have been studied extensively over the years from both the plant and pathogen

viewpoints. Over the years, several studies have been performed to analyse plant–pathogen interactions. Recently, functional genomic strategies, including proteomics and transcriptomics, have contributed to the effort of defining gene and protein function and expression profiles. Using these ‘omic’ approaches, pathogenity- and defense-related genes and proteins expressed during phytopathogen infections have been identified and numerous datasets have been accumulated. However, the understanding of molecular plant–pathogen interactions is still an intriguing area of investigation. Proteomics has dramatically evolved in the pursuit of large-scale functional assignment of candidate proteins and, by using this approach, several proteins expressed during phytopathogenic interactions have been identified. In this review, we highlight the proteins expressed during plant–virus, plant–bacterium, plant–fungus and plant–nematode interactions reported in proteomic studies, and discuss these findings considering the advantages and limitations of current proteomic tools.

viewpoints. An understanding of how plants and pathogens recognize each other and differentiate to establish either a successful or an unsuccessful relationship is crucial in this field of investigation. Lacking at

### Abbreviations

1DE/2DE, one/two-dimensional electrophoresis; AHL, *N*-acyl homoserine lactone; As, asialosyl; CWPDE, cell wall-degrading enzyme; EST, expressed sequence tag; GST, glutathione *S*-transferase; MDL, mandelic acid lyase; PPS, down-regulated serpin-like protein; PPR-10, rice pathogenesis-related protein class 10; PR-1, pathogenesis-related protein; PtlA10.6, pepper mild mottle tobamovirus Spanish strain 6; PPV, plum pox potyvirus; PR, pathogenesis-related; Pst, pseudomonas; ELK, receptor-like protein kinase; FYM, the yellow mottle tobamovirus; SCD, sucrose diesterase; TLP, thaumatin-like protein; TMV, tobacco mosaic tobamovirus; TSS, type III secretion system.

the defence mechanisms in plants, the recognition and signalling events that occur in plant cells in response to microorganism challenge need to be extremely rapid, reliable and specific, and are part of the strategy evolved by plants to survive attacks. The intracellular sensitive perception of pathogens and the recognition of pathogen-associated molecular patterns, such as lipopolysaccharides and flagellin, lead to the activation of the plant basal defence (or resistance), which is the first defence response, and trigger a generic mechanism consisting of plant cell wall thickening, papilla deposition, apoplast acidification and signal transduction and transcription of defence genes [1]. This generic basal defence mechanism has been observed in several incompatible plant-microorganism interactions, and is believed to corroborate the observation that most plants are resistant to invasion by the majority of pathogens. Therefore, successful pathogens must evolve mechanisms to interfere with or suppress basal defence to colonize the host and develop disease.

Superimposed on the basal defence, some plant varieties express resistance proteins that guard against this interference and trigger a specific, genetically defined hypersensitive response and subsequent programmed cell death. The function of the hypersensitive response is to contain the pathogen, and it is typified by various biochemical perturbations, known as generic plant responses, including changes in ion fluxes, lipid hyperoxidation, protein phosphorylation, nitric oxide generation and a burst of reactive oxygen species and antimicrobial compounds. This rapid incompatibility response effectively puts an end to pathogen invasion and prevents further disease development [1].

With regard to plant pathogens, the capacity to overcome plant defence, by protecting themselves from the oxidative stress activated by the plant in response to pathogen perception, is of extreme importance. Therefore, pathogens induce several genes, such as catalases and superoxide dismutase (SOD), which are responsible for the inactivation of  $H_2O_2$  and  $O_2^-$ . The importance of secretion pathways for pathogenicity has also been well established. Effector proteins expressed by the pathogen are predicted to collaborate in the suppression of basal resistance through the modification of specific host proteins. The secretion of extracellular enzymes, such as pectin esterases, polygalacturonases, xylanases, pectate lyases and cellulases, is another essential process for colonization and pathogenicity [2].

With the increase in genomic and postgenomic studies, a large amount of information is available, and advances have been achieved in the understanding of defence mechanisms in plants, as well as the pathogenicity strategies employed by microbial pathogens.

At present, the functional assignment of given proteins is considered to be the main challenge in postgenomic studies. Transcriptional changes do not reflect the complete cellular regulatory mechanism, as post-transcriptional processes which alter the amount of active protein, such as synthesis, degradation, processing and post-translational modification, are not taken into account. Thus, complementary approaches, such as proteome-based expression profiling, are needed to obtain a full picture of the regulatory elements. Moreover, several studies have revealed that the levels of mRNA do not necessarily predict the levels of the corresponding proteins in the cell [3]. The different stabilities of mRNAs and different efficiencies in translation can affect the generation of new proteins. Once formed, proteins also differ significantly in their stability and turnover rate, which makes proteomic investigation even more important.

Proteomics, or the analysis of the protein complement of the genome, provides experimental continuity between genome sequence information and the protein profile in a specific tissue, cell or cellular compartment during standard growth or different treatment conditions. Although the genome defines potential contributions to cellular function, the expressed proteome represents actual contributions. Moreover, by using proteomic approaches, differences in the abundance of proteins actually present at the time of sampling can be distinguished and different forms of the same protein can be resolved. The analysis of proteomes from organisms has been performed extensively by exploring the high resolution of two-dimensional electrophoresis (2DE) coupled with MS. These data, when complemented by *de novo* sequencing, allow the unequivocal identification of proteins involved in different biological functions. The proteomic approach is a fundamental method by which we can obtain an understanding and identification of the functions of proteins expressed in a given condition.

In this review, we highlight the proteins expressed during plant-virus, plant-bacterium, plant-fungus and plant-nematode interactions reported in proteomic studies, and discuss these findings considering the advantages and limitations of current proteomic tools.

### Plant-virus interactions

For the success of plant infection, viruses must first be transmitted either mechanically or by a vector (transmission), replicate in plant cells (replication), subsequently move through plasmodesmata to neighbouring cells (cell-to-cell movement) and, finally, attain the vascular tissue to circulate systemically through the phloem to

the sink tissues of the host (vascular movement). After being unloading from the phloem, viruses establish systemic infection through new cycles of replication and cell-to-cell/vascular movement. In both compatible (susceptible host) and incompatible (resistant host) interactions, viruses use plant host proteins to complete the steps of the infection process and suffer the influences of plant host proteins as a counteraction against the infection. The genes that encode these proteins have been studied extensively in numerous host-virus systems, mainly using transcriptional analysis [9].

Recently, 2DE and subsequent MALDI-TOF MS have been performed to analyse the induced expression of nuclear proteins in *Capsicum annuum* cv. Bugarig (hot pepper) infected by tobacco mosaic tobamovirus (TMV) [5]. *C. annuum* cv. Bugarig is hypersensitive response resistant against TMV-P<sub>3</sub> and susceptible to TMV-P<sub>1,2</sub> strains. A hypothetical protein and five annotated nuclear proteins (Table 1) were identified in hot pepper infected by TMV-P<sub>3</sub>, including four defence-related proteins [14-3-3 protein (regulator of proteins involved in response to biotic stresses), 26S proteasome subunit (RPN7) (postulated to be involved in programmed cell death), mRNA-binding protein (may interact with viral RNA or interferes with plant RNA metabolism) and Rab11 GTPase (responsible for membrane trafficking/recycling and endocytosis/exocytosis)] and a ubiquitin extension protein.

Diaz-Vivasanay *et al.* [6] used proteomic approaches to study the changes in enzymatic activity and protein expression in the antioxidant system within the leaf apoplast of *Prunus persica* cv. G8305 (peach) on plum pox polyomavirus (PPV) infection. PPV infection provoked oxidative stress in peach leaf apoplast by increasing the antioxidant enzymatic activities and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents. 2DE of apoplastic fluids from peach leaves infected with PPV, and subsequent MALDI-TOF MS analyses, revealed the identification of four proteins of the 22 analysed: one thaumatin-like and three mannosyl-mannose lyases (MDLs) (Table 1). Thaumatin and proteins involved in the plant response against fungal infection, and may equally be expressed in peach as a response to PPV infection [6]. MDLs are flavoproteins involved in the catabolism of (*R*)-aragylalines; however, to define their role in the peach plant-PPV interaction, further investigations must be performed.

Another study on plant-virus interaction was performed by Rahouti *et al.* [7,8]. These authors demonstrated that the pepper mild mottle tobamovirus Spanish strain 8 (PMMoV-8) inhibits photosystem II electron transport, disturbing the oxygen-evolving complex, composed of the three proteins PshP, PshQ and PshQ, present within plant thylakoid membranes. PMMoV-8 infection results in a lower expression of PshP and PshQ in the susceptible host *Nicotiana glauca* Dougl. (tobacco) relative to that in healthy

Table 1. Proteins expressed in plant-virus interactions and identified in plants using proteomic approaches.

Protein	Studied organism	Pathogen	Accession no. <sup>†</sup>	Reference
26S proteasome subunit RPN7	<i>C. annuum</i>	TMV-P <sub>3</sub>	DQ970469	[5]
mRNA-binding protein	<i>C. annuum</i>	TMV-P <sub>3</sub>	DQ970447	[5]
Rab11 GTPase	<i>C. annuum</i>	TMV-P <sub>3</sub>	DQ970467	[5]
Ubiquitin extension protein	<i>C. annuum</i>	TMV-P <sub>3</sub>	DQ970488	[5]
14-3-3 protein	<i>C. annuum</i>	TMV-P <sub>3</sub>	DQ970446	[5]
Thaumatin-like protein	<i>Prunus persica</i>	PPV	44179215	[6]
R-mannosylmannose lyase (isoform MDL6 precursor)	<i>Prunus persica</i>	PPV	44201582	[6]
R-mannosylmannose lyase (isoform MDL4 precursor)	<i>Pr. persica</i>	PPV	44192200	[6]
Mannosylmannose lyase	<i>Pr. persica</i>	PPV	64461134	[6]
PshQ (C. berberidensis isoform I)	<i>Prunus persica</i>	PMMoV-8	F14229	[8]
PshQ (C. berberidensis isoform II)	<i>N. glauca</i>	PMMoV-8	640468	[8]
PshQ (C. berberidensis isoforms III, IV)	<i>Quercus agrifolia</i>	PMMoV-8	F25522	[8]
PshP (C. berberidensis isoforms A, B, C)	<i>N. glauca</i>	PMMoV-8	6446805	[8]
PshP (C. berberidensis isoform D)	<i>N. glauca</i>	PMMoV-8	6444452	[8]
Phenylalanine ammonia-lyase	<i>C. annua</i>	PMMoV	F14717	[10]
Mitochondrial chaperonin-60	<i>C. annua</i>	PMMoV	69-828	[10]
Aldehyde C-1	<i>C. annua</i>	PMMoV	642470	[10]

<sup>†</sup> Accession number from the organism of origin.

control plants. In *N. benthamiana* Dornier PMMoV-*N* interaction analysis, Perez-Bueno *et al.* [9] revealed, by 2DE immunoblotting and N-terminal sequencing of proteins from the thylakoid membranes, that there are four isoforms of PsbO and four isoforms of PsbP in *N. benthamiana* Dornier (Table 1). These authors also showed that the expression of the four isoforms of PsbP decreases considerably in relation to PsbO proteins as the infection progresses. The fact that damage to the activity of the oxygen-evolving complex in virus-infected plants results in higher viral accumulation in the host may indicate the participation of PsbO in a basal resistance mechanism against viruses and in plant counteraction against the deleterious effects of viruses on photosynthetic activity [10].

Proteomic analysis was also performed to study the compatible interaction between *Oryza sativa* (rice) and rice yellow mosaic tobamovirus (RYMV) [11]. This analysis led to the identification of a phenylalanine ammonia-lyase, a mitochondrial chaperonin-60 and an alkalase C (Table 1), but the role of these proteins during RYMV infection of rice remains to be determined. In another analysis of the same interaction, Edward *et al.* [12] investigated RYMV-rice (susceptible *O. sativa* ssp. *IR54*) protein complexes (formed *in vivo* or *in vitro*) to identify plant proteins putatively involved in the virus-host interactions. SDS-PAGE analysis, followed by nano-LC-MS/MS, revealed the presence of 223 different proteins that fitted into three functional categories. In the metabolism category, a large number of enzymes involved in glycolysis, malate and citrate cycles were found, probably recruited by RYMV for the production of energy to support viral replication [12]. In the defence category, proteins involved in the generation and detoxification of reactive oxygen species were identified, presumably to maintain an oxidoreduction environment compatible with viral replication [12]. In the protein synthesis category, proteins involved in translation, elongation factors, chaperones, protein-disulfide isomerases and proteins involved in protein turnover with the 20S proteasome were observed [12]. Again these proteins may be recruited by RYMV to optimise the efficiency of viral infectivity [12]. Finally, in a recent proteomic study, the interaction of tomato fruits (*Lycopersicon esculentum*) with TMV was analysed. Of the 14 proteins identified, there were several pathogenesis-related (PR) proteins and antioxidant enzymes found to be expressed as a probable part of the plant resistance mechanism against viral infection [13].

Although proteomic approaches have shown the participation of several plant proteins (mentioned above) in virus replication, the involvement of plant

factors in viral movement has never been demonstrated through proteomics. As viral movement in plants is tissue specific and involves various cell types which are difficult to isolate, such as leaf parenchyma (where cell-to-cell movement occurs) and phloem (where vascular movement occurs), the performance of proteomic assays of such separate tissue is hampered.

## Plant-bacterium interactions

Bacteria rely on diverse secretion pathways in order to overcome plant defences and to establish successful colonisation of the host plant. Five secretion systems (types I-V) have been reported in bacteria, which are distinguished by their constituent proteins [14]. The main secretion system used by pathogenic bacteria during infection is the type III secretion system (TTSS), which is involved in some of the most devastating diseases in animals and plants (for a review, see [15]). This system enables bacteria to directly inject proteins, called effectors or virulence factors, into the host cell and subvert cellular processes. TTSS is essential for pathogenicity and is conserved amongst Gram-negative bacteria; however, the proteins exported by this system are more variable [14,15]. The best-studied TTSS effectors are designated avirulence (Avr) proteins, which have been reported in several plant pathogens [16-21]. Other effectors have also been identified in different phytopathogenic bacterial species, including *Xanthomonas* outer protein (Xop) in *Xanthomonas* [22], Hrp outer protein (Hrp) in *Pseudomonas* [23] and *Flavobacterium* outer protein (Fop) (based on a previous genus designation) in *Aclatosis* [24].

Another important system for bacterial pathogenicity is the type II secretion system, which is involved in the secretion of extracellular enzymes, toxins and virulence factors. Striking differences in the number and combinations of these enzymes in different pathogens are expected to be found.

Most of the data currently available on pathogenicity mechanisms in bacteria have been obtained by genomic studies. Few studies have employed the proteomic approach, which aims to identify the bacterial proteins putatively involved in pathogenicity. Mehra and Rowat [25] reported the analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryz* cultivated in the presence of the host *Oryza sativa* leaf extract, and identified differentially expressed proteins, including a sulfite-binding protein, by NH<sub>2</sub> terminal sequencing (Table 2). The authors suggested that the induction of this enzyme may have been caused by the amino acids or different sugars present in the leaf extract. Tshara *et al.* [26] analysed the expressed proteins of *X. oryzae* pv. *oryz*

**Table 2.** Proteins identified in phytopathogenic bacteria using proteomic approaches.

Protein	Studied organism	Plant/condition	Accession no. <sup>a</sup>	Reference
Sulfate-binding protein	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	<i>Citrus sinensis</i> (leaf extract)	PO2906	[25]
Inorganic pyrophosphatase	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	<i>Passiflorae edulis</i> (leaf extract)	AAM38285.1	[26]
Outer membrane protein	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	<i>Pa. edulis</i> (leaf extract)	AAM38389.1	[26]
Outer membrane protein A (OmpA)	<i>Dickeya dadantii</i> (syn. <i>E. chrysanthemi</i> )	<i>Saintpaulia ionantha</i> (leaf extract)	18822	[27]
Type III secretory pathway, porin component (HrcC)	<i>D. dadantii</i> (syn. <i>E. chrysanthemi</i> )	<i>Sa. ionantha</i> (leaf extract)	20864	[27]
Oligogalacturonate-specific porin (KdgN)	<i>D. dadantii</i> (syn. <i>E. chrysanthemi</i> )	<i>Sa. ionantha</i> (leaf extract)	15523	[27]
Oligogalacturonate-specific porin (KdgM)	<i>D. dadantii</i> (syn. <i>E. chrysanthemi</i> )	<i>Sa. ionantha</i> (leaf extract)	19629	[27]
Polygalacturonase X (pehX)	<i>E. chrysanthemi</i>	<i>Chrysanthemum</i> leaves (leaf extract)	14958	[31]
Avr-like protein	<i>E. chrysanthemi</i>	<i>Chrysanthemum</i> leaves (leaf extract)	19143	[31]
Metalloprotease A	<i>E. chrysanthemi</i>	<i>Chrysanthemum</i> leaves (leaf extract)	20373	[31]
Cellulase	<i>E. chrysanthemi</i>	<i>Chrysanthemum</i> leaves (leaf extract)	18772	[31]
OmpA-related protein	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Culture media	AAM42288	[32]
Cellulase	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Culture media	AAM42791	[32]
Superoxide dismutase	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Culture media	AAM41557	[32]
Arabinogalactan endo-1,4- $\beta$ -galactosidase	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Culture media	AAM42894	[32]
GroEL (60 kDa chaperonin)	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Culture media	AAM39839	[32]

<sup>a</sup> Accession number from the organism of origin.

during the interaction with the host *Passiflorae edulis* leaf extract, and identified an inorganic pyrophosphatase and an outer membrane protein upregulated in the presence of leaf extract, also by NH<sub>2</sub> terminal sequencing. It was proposed that the outer membrane protein identified may have an important role in pathogenicity [26].

Plant extracts have also been used as a stress condition in the analysis of outer membrane proteins of the soft rot pathogen *Dickeya dadantii* (syn. *Erwinia chrysanthemi*) by 2DE and MALDI-TOF MS analyses [27]. Several proteins were identified, such as the porin OmpA, involved in binding to specific host cell receptor molecules [27], HrcC, a member of the PulD/pIV superfamily of proteins that function in outer membrane translocation of type II and type III secretion pathways [28], and the oligogalacturonate-0 specific porins KdgM and KdgN [27].

The *E. chrysanthemi* proteome was further analysed by comparing *E. chrysanthemi* wild-type and osmoregulated periplasmic glucan (OPG)-defective mutant cells, which show a loss of virulence, by 2DE. Several proteins differentially expressed in the mutant cells, essential for cellular processes such as protein folding and degradation and carbohydrate metabolism, were

identified [29]. The authors concluded that *E. chrysanthemi* responds to OPG deficiency by activating cellular processes that protect the cell against environmental stresses, which suggests that the *opgG* strain is impaired in the perception of its environment [29].

In a 2DE-mediated proteomic study of *Xylella fastidiosa*, the causal agent of citrus variegated chlorosis, it was observed that *X. fastidiosa* did not produce significant changes in heat shock protein expression when compared with *X. axonopodis* pv. *citri* [30]. However, it was found that *X. fastidiosa* constitutively expressed several stress-inducible proteins, such as HspA and GroES, which were induced in *X. citri* under stress conditions. The authors suggested that the constitutive expression of these proteins may help *X. fastidiosa* cope with sudden environmental changes and stresses.

Secretome analysis is a primary field of study of bacterial pathogenicity, which may reveal new virulence proteins. As a result of the high importance of secreted proteins in the bacterial infection process, the *E. chrysanthemi* secretome was analysed and revealed an upregulation of several pectate lyases expressed in the presence of leaf extract of *Chrysanthemum* [31]. These enzymes play a crucial role in *E. chrysanthemi* infection, and the occurrence of several isoforms may

percut pathogenicity in a variety of different conditions and hosts [31]. A polygalacturonase X, which is another cell wall-degrading enzyme (CWDE), was also identified using MALDI-TOF analysis [31]. Similarly, several secreted proteins involved in various functions were identified in the *Xanthomonas campestris* [32], including outer membrane proteins, proteins involved in trace element acquisition, degrading enzymes, metabolic enzymes, proteins involved in maintenance and folding, and proteins with other functions (Table 2).

Other proteomic studies have reported global protein expression and reference maps of important bacterial plant pathogens, including *X. fastidiosus* [33] and *Agrobacterium tumefaciens* [34]; however, proteomic studies of the direct interaction of these pathogens with the plant or plant extracts are still at an initial stage.

With regard to plant defence responses, direct evidence of the involvement of target proteins has also been provided by proteomic studies. Although few, the

reports outlined below clearly show the importance of proteomic approaches, which can aid significantly in the understanding of plant-bacterium interactions. Jones et al. [5], in the same study, analysed the proteomic and transcriptomic profiles of *Arabidopsis thaliana* leaves during early responses (0–6 h postinoculation) to the challenge by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. They compared the proteomic changes in *A. thaliana* in response to the *P. syringae* pv. *tomato* highly virulent strain DC3000, which results in successful parasitism, a DC3000 *hcr* mutant, which induces basal resistance, and a transconjugant of DC3000 expressing *avrBs2*, which triggers a gene-for-gene-based resistance. Two subsets of proteins, which consistently showed clear differences in abundance after various challenges and time intervals, were glutathione *S*-transferase (GSTs) and peroxidase (Pox). Both of these groups of antioxidant enzymes were considered to have probable significant roles in the regulation

Table 3. Proteins expressed in plant-bacterium interactions and identified in plants using proteomic approaches.

Protein	Studied organism	Pathogen	Accession no. <sup>†</sup>	Reference
Muclifone O-transferase	<i>A. thaliana</i>	<i>P. syringae</i>	AF547180 AF539583 AF539584 AF539585	[5, 35]
Proteinase	<i>A. thaliana</i>	<i>P. syringae</i>	AF539573 AF539580 AF539582	[5, 35]
Proteinase inhibitor	<i>S. arbor</i>	<i>X. campe</i> pv. <i>campe</i>	AF535553	[33]
Glucanase 6-ase	<i>S. arbor</i>	<i>X. campe</i> pv. <i>campe</i>	336572	[33]
Transketolase isozyme, cytosolic (TK6A1/2)	<i>S. arbor</i>	<i>X. campe</i> pv. <i>campe</i>	336593	[33]
Thaumatin-like protein	<i>S. arbor</i>	<i>X. campe</i> pv. <i>campe</i>	337113	[33]
Glucanase debranchase	<i>S. arbor</i>	<i>X. campe</i> pv. <i>campe</i>	337145	[33]
Alcohol dehydrogenase 7	<i>S. arbor</i>	<i>X. campe</i> pv. <i>campe</i>	CA464888	[37]
Glucose oxidase	<i>S. arbor</i>	<i>X. campe</i> pv. <i>campe</i>	NP_718477	[37]
Pish100	<i>S. arbor</i>	<i>X. campe</i> pv. <i>campe</i>	NP_718527	[37]
Hexoseamine-induced response	<i>S. arbor</i>	<i>X. campe</i> pv. <i>campe</i>	AA054870	[37]
Ascorbate peroxidase	<i>S. arbor</i>	<i>X. campe</i> pv. <i>campe</i>	NP_470862	[37]
Sim 1-like and G2 domain protein-like	<i>S. arbor</i>	<i>X. campe</i> pv. <i>campe</i>	NP_470246	[37]
Low molecular weight heat shock protein	<i>S. arbor</i>	<i>X. campe</i> pv. <i>campe</i>	NP_712664	[37]
Universal Stress Protein	<i>S. arbor</i>	<i>X. campe</i> pv. <i>campe</i>	AA055347	[37]
Peroxidase 1	<i>Synedrella nodiflora</i>	<i>Erwinia mitchelliana</i> ssp. <i>mitchelliana</i>	336755	[36]
Phenylalanine hydroxylase	<i>S. tuberosum</i>	<i>Er. mitchelliana</i> ssp. <i>mitchelliana</i>	336755	[36]
Glutathione peroxidase	<i>S. tuberosum</i>	<i>Er. mitchelliana</i> ssp. <i>mitchelliana</i>	336640	[36]
Pathogenesis-related 5-aminobutyrate aminase	<i>S. tuberosum</i>	<i>Er. mitchelliana</i> ssp. <i>mitchelliana</i>	TC175364	[36]
Muclifone O-transferase	<i>S. tuberosum</i>	<i>Er. mitchelliana</i> ssp. <i>mitchelliana</i>	336643	[36]
Ascorbate peroxidase	<i>S. tuberosum</i>	<i>Er. mitchelliana</i> ssp. <i>mitchelliana</i>	336643	[36]

<sup>†</sup> Accession number from the organism of origin.

of redox conditions within infected tissue (Table 3). These results were further related to changes in the expression profiles for the corresponding GST and Prx genes, identified by Affymetrix GeneChip analysis. In general, a good correlation was observed between changes obtained at the transcript and protein levels for the Prx family, but not for the GST family. Only for the PrxB protein was the decrease observed in the spot intensity following pathogen challenge clearly related to transcriptional suppression. These observations were used to highlight the complexity of comparative proteomics and transcriptomics, even when derived from the same inoculation system.

As a follow-up study, the same group [35] examined the global proteomic profile in three subcellular fractions (soluble protein, chloroplast- and mitochondria-enriched) of *A. thaliana* responding to the same three *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 strains. This was the first report to associate post-translational events (1–6 h postinoculation) occurring before significant transcriptional reprogramming. In total, 73 differential spots representing 52 unique proteins were successfully identified, and were representative of two major functional groups: defence-related antioxidants and metabolic enzymes. The results show that several chloroplast systems are modified during all aspects of the defence response. Components of the Calvin–Benson cycle are rapidly altered during basal defence, and some of these changes are reversed by type III effectors. Photosystem II has emerged as a target of resistance signalling. Mitochondrial porins appear to be modified early in basal defence, with specific alterations to other components in response to AvrRpm1. Finally, the interplay between redox status and glycolysis, with probable links to lipid signalling [through glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, some GSTs, lipase and NADH:quinone oxidoreductase (NQR)], may coordinate communication between organelles. Significant changes to photosystem II and to mitochondrial porins seem to occur early in basal defence. Rapid communication between organelles and the regulation of primary metabolism through redox-mediated signalling are supported by these results.

To investigate the role of defence-responsive proteins in the rice–*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* interaction, Mahmood *et al.* [36] applied a proteomic approach. Cytosolic and membrane proteins were fractionated from the rice leaf blades 3 days postinoculation with incompatible and compatible *X. oryzae* pv. *oryzae* races. From 366 proteins analysed by 2DE, 20 were differentially expressed in response to bacterial inoculation (Table 3). Analyses clearly revealed that four defence-related proteins [PR-5, probenazole-inducible protein (PBZ1), SOD and Prx] were induced for both

compatible and incompatible *X. oryzae* pv. *oryzae* races, wherein PR-5 and PBZ1 were more rapid and showed higher induction in incompatible interactions and in the presence of jasmonic acid.

Studying the same rice–*X. oryzae* pv. *oryzae* interaction, Chen *et al.* [37] analysed proteins from rice plasma membrane to study the early defence responses involved in XA21-mediated resistance. XA21 is a rice receptor kinase, predicted to perceive the *X. oryzae* pv. *oryzae* signal at the cell surface, leading to the 'gene-for-gene' resistance response. They observed a total of 20 proteins differentially regulated by pathogen challenge at 12 and 24 h postinoculation, and identified at least eight putative plasma membrane-associated and two non-plasma membrane-associated proteins (Table 2) with potential functions in rice defence.

Proteins from the wild tomato species *Lycopersicon hirsutum* that are regulated in response to the causal agent of bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*) were identified by comparing two partially resistant lines and a susceptible control line in a time course (72 and 144 h postinoculation) experiment [38]. Using 2DE and ESI-MS/MS, 26 differentially regulated tomato proteins were identified, 12 of which were directly related to defence and stress responses (Table 3).

Proteomic analysis was also used to detect the responses of the model legume *Medicago truncatula* to the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of known bacterial quorum-sensing signals, such as *N*-acyl homoserine lactone (AHL) [39]. The fast and reliable detection of bacterial AHL signals by plant hosts is essential to make appropriate responses to the pathogen. Therefore, *M. truncatula* is able to detect very low concentrations of AHL from *P. aeruginosa*, and responds in a global manner by significant changes in the accumulation of 154 proteins, 21 of which are related to defence and stress responses.

As phosphorylation plays a central role in the initiation of the plant response to bacterial signals, phosphoproteomics (large-scale analysis of phosphoproteins) is a powerful strategy to better understand the events that occur rapidly in the host after bacterial perception [40]. Although it has been shown that the phosphorylation pathway of proteins changes rapidly after signal perception, relatively few of these phosphoproteins have been identified in plant species. By using a phosphoproteomic approach, early changes in proteins potentially phosphorylated during the bacterial defence response have been described, and include dehydrin, chaperone, heat shock protein and glucanase [41,42]. The phosphorylation of these proteins is probably part of the early basal plant defence response.



## Plant-fungus interactions

Considerable advances have been achieved in the last 10 years in the identification of the determinants of plant-fungus interactions. Currently, more than 25 fungal genomes have been elucidated, including human and plant pathogens, such as *Aspergillus fumigatus* and *Magnaporthe oryzae*, respectively (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fgi/>). A key challenge in modern fungal biology is to analyse the expression, function and regulation of the entire set of proteins encoded by the revealed fungal genomes.

When pathogenic fungi start the infection process, secreted and intracellular proteins are up- or downregulated, improving the predation ability of fungi [43,44]. In this field, several proteomic studies have been carried out in order to understand fungal pathogenicity. These include pioneering studies, aimed at an understanding of the dimorphic transition from budding to filamentous growth [45] as well as appressorium construction [46]. Appressorium formation is believed to be an important event in the establishment of a successful interaction between the pathogen *Phytophthora infestans* and its host plant potato [46]. Although most spots were not identified, some proteins involved in amino acid biosynthesis, including methionine and threonine synthases, were obtained (Table 4).

Proteomic analyses have also been used to study wheat leaf rust, caused by the fungus *Puccinia striiformis* [47]. Rust diseases cause a significant annual decrease in the yield of cereal crops worldwide [48]. In order to better understand this problem at the molecular level, the proteomes of both host and pathogen were evaluated during disease development. A susceptible line of wheat infected with a virulent race of leaf rust was compared with mock-inoculated wheat using 2DE (with isoelectric focusing, pH 4–8) and MS analysis [47]. The fungus differentially expressed 22 different proteins during pathogen infection, including proteins with known and hypothetical functions.

Another approach, which has been frequently employed for the study of fungal proteins, involves the analysis of the exoproteome, also known as the secretome [49]. In this context, *Fusarium graminearum*, a devastating pathogen of wheat, maize and other cereals, was grown on hop (*Humulus lupulus*) cell walls. Using 1DE and 2DE, followed by MS analyses, 34 fungal secreted proteins were identified [49]. Amongst the identified proteins were cellulases, glucanotransferases, endoglucanases, phospholipases, proteinases and chitinases (Table 4). It was observed that 45% of the proteins observed in *F. graminearum*

grown in the presence of hop cells were strictly involved in cell wall degradation and indirectly related to carbon and nitrogen absorption. When this same fungus was grown in a medium containing glucose, however, the enzyme patterns were totally different, showing that fungi are capable of regulating their secretion according to the presence of substrate [49].

A cell wall proteome was also proposed for *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death [50]. This study showed an inventory of cell wall-associated proteins based on MS sequence analysis. Seventeen proteins were identified, all of which were authentic secretory proteins. Functional classification based on homology searches revealed six putative mucins, five putative glycoside hydrolases, two transglutaminases, one annexin-like protein and one Kazal-type protease inhibitor [50], clearly suggesting that cell wall proteins are also important for fungal pathogenicity (Table 4).

Another fungal exoproteome was analysed in order to gain a more thorough understanding of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* [51]. Extracted secreted proteins collected from liquid culture were separated using 2DE and annotated following ESI-Q-TOF MS/MS. Fifty-two secreted proteins were identified by MALDI-MS/MS peptide sequencing, and many of the annotated secreted proteins were cell wall-degrading enzymes that had been identified previously as pathogenicity or virulence factors of *S. sclerotiorum*. However, one of the identified proteins,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, which is involved in the virulence process of *S. sclerotiorum*, was not detected by EST studies, clearly demonstrating the merit of performing proteome-level research [51].

With regard to plant responses, although only a few proteomic studies have focused on plant-pathogen interactions, the plant-fungus association has been the most studied using this approach. In such studies, several proteins involved in diverse biological processes, including defence and stress responses, signal transduction, photosynthesis, electron transport and metabolism, have been found. Some examples reporting these proteins are mentioned below.

The *Mfa oryzae*-rice interaction is a model system for understanding plant disease because of its great economic importance, and also because of the genetic and molecular genetic tractability of the fungus [52]. What makes this an important system is that both genomes have been sequenced and a rice proteome database is available (<http://gene64.dna.affrc.go.jp/RPD/main.html>). A pioneering study on rice proteomics was performed to analyse the protein profile after

Table 4. Proteins identified in phytopathogenic fungi using proteomic approaches.

Protein	Studied organism	Plant/condition	Accession no. <sup>a</sup>	Reference
Methionine synthase (PP2C) <sup>b</sup> gene	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	NP_060331	[48]
Threonine synthase	<i>Ph. infestans</i>	<i>Sol. tuberosum</i>	0493548	[48]
Chitinase	<i>F. graminearum</i>	<i>Humulus lupulus</i>	—	[49]
Serine proteinase	<i>F. graminearum</i>	<i>Hu. lupulus</i>	—	[49]
Leucine aminopeptidase	<i>F. graminearum</i>	<i>Hu. lupulus</i>	—	[49]
Lipases	<i>F. graminearum</i>	<i>Hu. lupulus</i>	—	[49]
Pectate lyase	<i>F. graminearum</i>	<i>Hu. lupulus</i>	—	[49]
$\alpha$ -Asabinofuranidase	<i>F. graminearum</i>	<i>Hu. lupulus</i>	—	[49]
Ceramidase	<i>F. graminearum</i>	<i>Hu. lupulus</i>	—	[49]
Chitin deacetylase	<i>F. graminearum</i>	<i>Hu. lupulus</i>	—	[49]
$\beta$ -Glucosidase	<i>F. graminearum</i>	<i>Hu. lupulus</i>	—	[49]
Polygalacturonidase	<i>F. graminearum</i>	<i>Hu. lupulus</i>	—	[49]
Trypsin	<i>F. graminearum</i>	<i>Hu. lupulus</i>	—	[49]
Aspartyl proteinase	<i>F. graminearum</i>	<i>Hu. lupulus</i>	—	[49]
Xyloglucanase	<i>F. graminearum</i>	<i>Hu. lupulus</i>	—	[49]
Carboxypeptidase	<i>F. graminearum</i>	<i>Hu. lupulus</i>	—	[49]
$\alpha$ -Amylase	<i>F. graminearum</i>	<i>Hu. lupulus</i>	y	[49]
Mucin	<i>Ph. ramorum</i>	Oak	73547	[50]
Glucanase	<i>Ph. ramorum</i>	Oak	74257a 74257b 72513 65860	[50]
Transglutaminase	<i>Ph. ramorum</i>	Oak	83744 83169	[50]
Exopolysaccharinase	<i>S. sclerotiorum</i>	Culture media	g82454455 g1465221 g2166968	[51]
Cellulohydrolyase 1 catalytic domain	<i>S. sclerotiorum</i>	Culture media	g20668705	[51]
Acid protease	<i>S. sclerotiorum</i>	Culture media	g8694107	[51]
Aspartic proteinase precursor: aspartyl proteinase	<i>S. sclerotiorum</i>	Culture media	g12032205	[51]

<sup>a</sup> Accession number from the organism of origin.

*M. grisea* infection, and was conducted using infected leaf blades fertilized with various levels of nitrogen [53]. Rice plants grown with high levels of nitrogen nutrient are more susceptible to infection by the blast fungus [54]. Although this study failed to establish any correlation between nitrogen application and disease resistance, leaf proteins revealed some minor changes when plants grown under different levels of nitrogen were compared [55]. Twelve proteins, including the rice thaumastin-like protein (TLF) (PR-5), were identified with accumulation changes at different levels of nitrogen.

Another study of the same interaction was performed by Kim *et al.* [56] using rice suspension-cultured cells. Twelve proteins from six different genes were identified, including the rice pathogenesis-related protein class 10 (OsPR-10), isoflavone reductase-like protein (IRL1), glucosidase and putative receptor-like

protein kinase (RLK), which had not been reported previously in suspension-cultured rice cells (Table 5). The authors followed with another proteome study using rice leaves, where they identified eight proteins newly induced or with increased expression [57]. The identified proteins belonged to several groups of PR proteins, and included two RLKs, two  $\beta$ -1,3-glucanases (Glu1, Glu2), TLF, peroxidase (POX 22.3), PR21 and OsPR-10 (Table 5). Although the proteins identified by Kim *et al.* [56,57] are most probably involved in the plant response to fungal attack and plant resistance/susceptibility, the purpose and function of each was not investigated in these preliminary and exploratory studies.

Another rice-fungus interaction study reported recently was that of sheath blight, caused by the fungus *Rhizoctonia solani*. Lee *et al.* [58] investigated rice sheath leaves after infection with this fungus, and the

Table 5. Proteins expressed in plant-fungus interactions and identified in plants using proteomics approaches.

Protein	Studied organism	Pathogen	Accession no. <sup>6</sup>	Reference
Peroxidases (PF5)	<i>O. sativa</i>	<i>Ms. grisea</i>	AAC49816	[57]
	<i>O. sativa</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	g02878781	[58]
	<i>Brassica oleracea</i>	<i>F. graminearum</i>	A4108486	[59]
	Tomato	<i>F. oxysporum</i>	-	[62]
β-1,3 Glucanases (PF2)	<i>A. thaliana</i>	Fungal elicitor	A11g0789X	[75]
	<i>O. sativa</i>	<i>Ms. grisea</i>	B3A77783	[57]
	<i>O. sativa</i>	<i>R. solani</i>	g1684530	[58]
	<i>F. eschlerianum</i>	<i>F. graminearum</i>	A4D28734	[59]
Thaumatin like protein (PF5)	<i>Zea mays</i>	<i>F. verticillioidea</i>	-	[61]
	Tomato	<i>F. oxysporum</i>	A4403617	[62]
	<i>O. sativa</i>	<i>Ms. grisea</i>	-	[57]
Chitinase (PF3)	<i>O. sativa</i>	<i>Ms. grisea</i>	TC4165	[57]
	<i>F. eschlerianum</i>	<i>F. graminearum</i>	CA4A4278	[59]
	Tomato	<i>F. oxysporum</i>	A4M23272	[62]
Glutathione S transferase	<i>O. sativa</i>	<i>R. solani</i>	g155168113	[58]
	<i>F. eschlerianum</i>	<i>F. graminearum</i>	B4382472	[59]
	Tomato	<i>F. oxysporum</i>	CA478845	[62]
Glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>F. eschlerianum</i>	<i>F. graminearum</i>	CA4C4X35	[59]
	<i>Z. mays</i>	<i>F. verticillioidea</i>	Z288668	[61]
	<i>A. thaliana</i>	Fungal elicitor	A11g2293X	[75]
Pathogenesis related class 10	<i>O. sativa</i>	<i>R. solani</i>	g168782	[58]
	<i>F. eschlerianum</i>	<i>F. graminearum</i>	X17463811	[59]
	<i>Z. mays</i>	<i>F. verticillioidea</i>	G08054	[61]
Fructose biphosphate aldolase	<i>O. sativa</i>	<i>Ms. grisea</i>	T19817	[56]
	<i>O. sativa</i>	<i>Ms. grisea</i>	AF418804	[57]
	<i>M. truncatula</i>	<i>Aphanizomenon foveolatum</i>	F87003	[63]
Probenazole induced protein	<i>Z. mays</i>	<i>F. verticillioidea</i>	P08440	[61]
	<i>A. thaliana</i>	Fungal elicitor	A10g2833X	[75]
Adenosine kinase	<i>O. sativa</i>	<i>Ms. grisea</i>	T28879	[56]
	<i>O. sativa</i>	<i>Ms. grisea</i>	T28879	[57]
Superoxide dismutase (Cu-Zn)	<i>Z. mays</i>	<i>F. verticillioidea</i>	A3012281	[61]
	<i>Z. mays</i>	<i>F. verticillioidea</i>	P23046	[61]
Glutamate dehydrogenase	<i>F. eschlerianum</i>	<i>F. graminearum</i>	A4351588	[59]
	<i>F. eschlerianum</i>	<i>F. graminearum</i>	CA4A6795	[59]
Disease resistance response protein pi 48	<i>M. truncatula</i>	<i>Aphanizomenon foveolatum</i>	F14716	[63]
	<i>O. sativa</i>	<i>R. solani</i>	g155370086	[58]
Chaperonin 60 β precursor	<i>O. sativa</i>	<i>R. solani</i>	g09867824	[58]
	<i>O. sativa</i>	<i>Ms. grisea</i>	-	[57]
Receptor like protein kinase	<i>O. sativa</i>	<i>Ms. grisea</i>	A4187165	[57]
	<i>O. sativa</i>	<i>R. solani</i>	g17271253	[58]

<sup>6</sup> Accession number from the organism of origin.

results revealed six proteins whose relative abundance varied significantly in the resistant and susceptible lines, and 11 additional proteins which were identified in abundance in the response of the resistant line only. These proteins have been reported previously to be involved in antifungal activity, signal transduction, energy metabolism, photosynthesis, protein folding and degradation, and antioxidation (Table 5), indicating a common pathway for both stress and non-stress plant functions.

Many other efforts have focused on the plant response to fungal attack. *Ascochyta* head blight, caused mainly by *F. graminearum*, is one of the most destructive diseases of wheat, and the interaction between them has been investigated [59]. Zhou *et al.* [59] found 33 plant proteins which were expressed in response to *F. graminearum* in wheat spikes (Table 5). These proteins were divided into two groups, each related to defence response or metabolism. The authors suggested that several of these proteins were

Table 6. Proteins expressed in plant-parasitic nematode species identified by proteomic approaches.

Protein	Studied organism	Accession no. <sup>†</sup>	Reference
β-1,4-endoglucanase 2 precursor	<i>H. bolivschii</i>	AJ299367	[68]
βa-karrasin homologue	<i>H. bolivschii</i>	–	[68]
Calreticulin precursor	<i>MS. incognita</i>	–	[70]
Tropomyosin	<i>MS. incognita</i>	–	[70]
Myosin regulatory light chain 2	<i>MS. incognita</i>	–	[70]
ATP synthase β chain	<i>MS. incognita</i>	–	[70]
Chaperonin protein HSP60	<i>MS. arenaria</i> – <i>MS. javanica</i> – <i>Meloidogyne</i> sp.	AA224077	[71]
Actin protein 4, isoform α	<i>MS. arenaria</i> – <i>MS. javanica</i> – <i>Meloidogyne</i> sp.	Q34940	[71]
Translation initiation factor eIF4A	<i>MS. incognita</i>	S26281	[71]
Enolase	<i>MS. incognita</i>	Q344159	[71]

<sup>†</sup> Accession number from the organism of origin.

directly involved in mounting the plant defence against infection by protecting against the oxidative burst inside the plant cell. Such a burst can be caused in plant cells by invading fungus.

Although most reports have focused on the leaf proteome, some studies have also analysed other tissues and organs. Using 2DGE, the root protein profiles of *MS. javanica* were analysed after *Aphanomyces euteiches* pathogen infection during a time course experiment [60]. The majority of the induced proteins belonged to the PR-10 family, whereas others corresponded to putative cell wall proteins and enzymes of the phenylpropanoid–salicylanoid pathway (Table 5). Another study focused on *Zea mays* embryos in response to the fungus *Fusarium verticillioides* [61]. The proteins identified included PR proteins, antioxidant enzymes and proteins involved in protein synthesis, folding and stabilisation.

Another interesting study was performed to investigate the molecular details of the interaction between the xylem-colonising plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* and tomato [62]. The composition of the xylem sap proteome of infested tomato plants was investigated and compared with that of healthy plants. Two-dimensional gel separation and MS identified 33 different proteins. Sixteen tomato proteins were found in the xylem sap for the first time. Amongst these proteins were peroxidases, chitinases, polygalacturonase and a subtilisin-like protease. It should be noted that these induced proteins are involved in cell wall, cell structure and antioxidant protection.

## Plant–nematode interactions

Plants are continuously attacked by phytoneematodes, which cause severe damage in susceptible agricultural

crops, resulting in extensive economic losses worldwide [63]. Some of the most harmful plant-parasitic nematodes include the obligate sedentary endoparasites *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp. and *Globodera* spp. [63]. These organisms invade plant roots as juvenile larvae (J2) and, after three moult, develop into adult forms that reproduce in repeated cycles. This leads to severe modifications in the root system, which cause significant reductions in nutrient and water uptake and plant death [64].

In recent years, several nematode expressed sequence tag (EST) libraries have been constructed, mainly to identify parasitic nematode-specific genes, and approximately 100 000 ESTs have been sequenced from *Meloidogyne*, *Globodera* and *Heterodera* species (<http://www.nematode.net>). Despite the large number of ESTs, only a few of these genes are known to be involved in parasitism, although many of the transcripts are differentially expressed during parasitic stages [65–68]. Proteomic approaches have also contributed to the identification of candidates for the phytoneematode parasitism, although to a lesser extent [69–71]. Some of these identified nematode proteins are highlighted in Table 6, and are involved in feeding site and cell wall degradation.

Despite the few proteomic studies, 2DGE allied to MS is a powerful and rapid strategy to generate peptide sequence tags that can be linked to ESTs *in silico*. These peptides can be further used to design primers in order to obtain full-length gene sequences, contributing to parasitic genome projects [32]. In spite of the large amount of experimental and *in silico* evidence, few studies have aimed to determine the real importance of these sequences in plant–nematode interactions. In addition, EST libraries obtained by the micro-aspiration of cytoplasmic material from the oesophageal glands of

*Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines* reveal that the majority of the genes expressed in these salivary glands encode proteins with unknown function (*M. incognita*, 89%; *H. glycines*, 72%) [66,67].

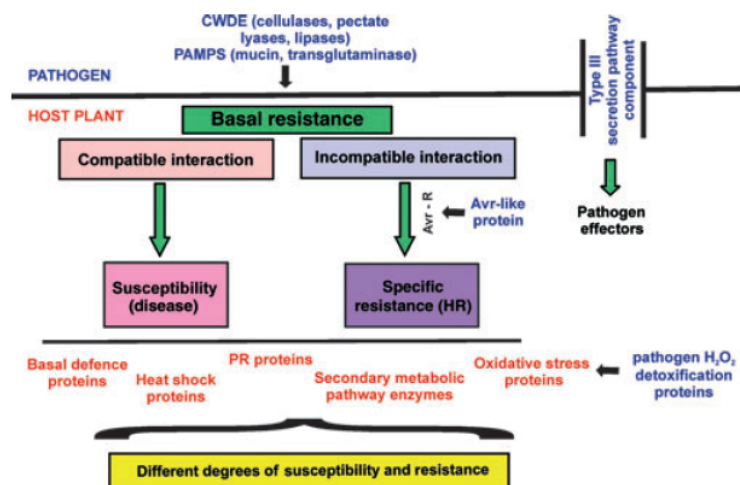
Considering the other side of the plant–nematode interaction, some plants have evolved protective mechanisms to prevent nematode attraction, penetration, migration, feeding site formation, nourishment by digestion, reproduction and survival. Several resistance genes have been isolated in various plants [73]; however, studies on the proteome of the plant–nematode interaction are at an early stage. In a recent study, three proteins expressed in response to nematode infection have been reported using the proteomic approach, including a chitinase and a PR protein in *Coffea canephora* and a quinone reductase 2 in *Gossypium hirsutum* [74].

### Understanding plant–pathogen interactions in the light of proteomic studies

In this review, we have presented the recent proteomic studies performed to better understand plant–virus, plant–bacterium, plant–fungus and plant–nematode interactions. Taken together, the data available reveal that several proteins are commonly expressed in diverse pathosystems (Fig. 1).

In the case of pathogens, several of the proteins involved in pathogenicity are secretion proteins, which were observed in bacteria, fungi and nematodes, and were mainly identified by secretomic studies. These proteins include proteases, cellulases and pectate lyases, which are important CWDEs, crucial for host plant colonization (Fig. 1). These results clearly show the importance of secretomic studies when searching for pathogenicity proteins. In addition to these well-known enzymes, other proteins, such as SODs and oxidases, have also been reported in the different pathogens, and are associated with protection against the oxidative stress response by the plant on infection.

A similar scenario was observed with regard to defence-related proteins in plants. The most reported defence-related proteins are PR proteins, including thaumatin, glucanases, peroxidases and chitinases, observed in several pathosystems described here (Fig. 1). The involvement of these proteins in plant defence has been well established; however, their direct role in resistance enhancement still needs to be demonstrated. The general biotic stress response represents another class of regulated proteins, which include GST, SOD and heat shock proteins, also commonly identified in several plant–pathogen proteomic studies described in this review (Fig. 1).



**Fig. 1.** Overview of plant–pathogen interactions and insights into proteomic studies of the proteins involved in these processes. Plants possess receptors that can activate basal resistance, mediated by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or cell wall-degrading enzymes (CWDEs), which may result in a compatible or incompatible interaction. In both interactions, several defence-related and biotic stress-responsive proteins are induced. Suppression of plant defences by pathogen effectors leads to susceptibility in host plants. Some host plants express resistance (R) proteins, which guard against this interference and trigger a specific resistance, referred to as the hypersensitive response (HR). Proteomic studies of plant–pathogen interactions have revealed several pathogen and plant proteins expressed in different pathosystems. These proteins, identified using proteomic tools, are highlighted in blue (pathogen) and red (plant) in the different stages of the interaction.

Although several proteins expressed during plant–pathogen interactions have been highlighted, most are well known and are mainly involved in the conflict between the pathogen and the plant to suppress or induce, respectively, the basal plant defence mechanism. The results that emerge from most proteomic analyses are of extreme importance for the validation of the expression of the genes identified by genomic or transcriptomic studies. However, a small amount of novel information has been obtained, and can be explained by the fact that key proteins are expressed in low abundance, and are therefore not detected by current proteomic tools. Indeed, only the most abundant proteins are detected in two-dimensional gels and successfully identified by MS. Another major problem faced in proteomic analyses is protein identification by peptide mass fingerprinting. Unequivocal identification is usually obtained only when the genome sequence or a large amount of sequence data are available in public databases. When analysing poorly studied organisms, identification must be performed by *de novo* sequencing, which requires more sophisticated equipment, not readily available, especially in developing countries. Therefore, a gap appears to exist in the bioinformatics pipeline for the proteomics of organisms with incomplete sequenced genomes. These technical limitations in proteomic studies need to be overcome in order to advance our knowledge on protein expression during plant–pathogen interactions. Nevertheless, proteomic tools are rapidly improving and new methods and equipment are being developed. We believe that future proteomic studies, coupled with functional validation analysis, may provide new insights into disease resistance and pathogenicity.

Another important aspect to be considered when performing proteomic analyses is the follow-up study of the identified proteins, which should be performed in order to correctly assign protein function. The multiple roles of proteins are a significant barrier to progress in the unambiguous identification of proteins involved in processes such as plant–pathogen interactions. Moreover, a frequent result found in proteomic studies is the large amount of proteins obtained with unknown function. It is important to further investigate these proteins, which may present new biological functions and may play important roles in the processes under investigation.

The examples reviewed here demonstrate the complex cellular network that exists in different plant–pathogen interactions. Overall, the use of proteomic studies, allied to functional validation analyses, can provide fascinating contributions to the understanding of complex mechanisms, such as

plant–pathogen interactions. The first step in the understanding of disease resistance is currently being met with the identification of the proteins expressed during plant–pathogen interactions. The next step will be to determine which proteins confer pathogenicity and disease resistance, and the mechanisms by which they do so.

### Acknowledgements

We wish to thank Dr Gilbert Engler for critical evaluation of the manuscript and English revision.

### References

- 1 Alfano JR & Collmer A (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defence. *Annu Rev Phytol* **42**, 385–414.
- 2 Van Sluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LBA, Menck CPM, Da Silva ACR, Ferro JA, Oliveira MC, Setubal JC, Kitajima JP & Simpson AJ (2002) Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytol* **40**, 169–189.
- 3 Jones A.M.E., Thomas V., Truman B., Lilley K., Mansfield J & Grant M (2004) Specific changes in the Arabidopsis proteome in response to bacterial challenge: differentiating basal and R-gene mediated resistance. *Phytochemistry* **65**, 1805–1816.
- 4 Whitham SA, Yang C & Goodin MM (2006) Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 1207–1215.
- 5 Lee BJ, Kwon SJ, Kim SK, Kim KJ, Park CJ, Kim YJ, Park OK & Paek KH (2006) Functional study of hot pepper 26S proteasome subunit RPN7 induced by tobacco mosaic virus from nuclear proteome analysis. *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 405–411.
- 6 Díaz-Vivancos P, Rubio M, Mesonero V, Perigo PM, Barcelo AR, Martínez-Gómez P & Hernández JA (2006) The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term plum pox virus infection. *J Exp Bot* **57**, 3813–3824.
- 7 Rahoutei J, Barón M, García-Luque I, Droppa M, Neményi A & Horvath G (1999) Effect of tobamovirus infection on the thermoluminescence characteristics of chloroplast from infected plants. *Z Naturforsch Teil C* **54**, 634–639.
- 8 Rahoutei J, García-Luque I & Barón M (2000) Inhibition of photosynthesis by viral infection: effect on PSII structure and function. *Physiol Plant* **110**, 286–292.
- 9 Perez-Bueno ML, Rahoutei J, Sajjani C, García-Luque I & Barón M (2004) Proteomic analysis of the oxygen-evolving complex of photosystem II under biotic stress: studies on *Nicotiana benthamiana* infected with tobamoviruses. *Proteomics* **4**, 418–425.

- 10 Abbiak TH, Peart JR, Mea TN, Bruckembe DC, Bell TP & Linther BI (2002) Silencing of a gene encoding a protein component of the oxygen-evolving complex of photosystem II enhances virus replication in plants. *Phytopathology* **92**, 307–315.
- 11 Delclède F, Campito C, Brisard JP, Brugidou C & Van Donckelzer A (2005) Multigenic families and proteomics: extended protein characterization as a tool for paralog gene identification. *Proteomics* **5**, 450–460.
- 12 Brisard JP, Campito C, Delclède F, Van Donckelzer A & Brugidou C (2006) Proteome analysis of plant-virus interactions: comprehensive data for virus multiplication inside their hosts. *Mol Cell Proteomics* **5**, 2275–2287.
- 13 Grande-Vela I, Velasco S & Martínez RB (2006) Proteomic analysis of tobacco mosaic virus-infected tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruits and detection of viral coat protein. *Proteomics* **6**(Suppl. 1), S195–S205.
- 14 Lee YU & Schneewind G (2001) Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Dev* **15**, 1725–1752.
- 15 Pühler A, Arlet M, Becker A, Göttert M, Morinsey TP & O'Gara F (2004) What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions? *Curr Opin Plant Biol* **7**, 137–147.
- 16 Galan JE & Collmer A (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**, 1322–1328.
- 17 Cornella GR & Van Gijsegem F (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* **54**, 735–774.
- 18 Kean NT (1990) Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu Rev Genet* **24**, 447–463.
- 19 Staskawicz BJ, Dahlbeck D & Kean NT (1984) Cloned virulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycolys* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L.) Merr. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 6024–6028.
- 20 Lechys T & Bours U (2001) Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends Plant Sci* **6**, 475–485.
- 21 Schechter LM, Roberts KA, Izmir Y, Allinae JR & Collmer A (2004) *Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a Cyo translocation reporter. *J Bacteriol* **186**, 543–555.
- 22 Neel I, Thieme F, Renaud D & Bours U (2001) cDNA-AFLP analysis uncovers a genome-wide hrpG-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol* **41**, 1271–1281.
- 23 Allinae JR & Collmer A (1997) The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol* **179**, 5655–5662.
- 24 Arlet M, Van Gijsegem F, Ruet JC, Perollet JC & Boucher CA (1994) PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Pisum* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas savasonnesis*. *Mol Biol J* **13**, 545–553.
- 25 Mehta A & Reate YB (2001) Differentially expressed proteins in the interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesi* with leaf extract of the host plant. *Proteomics* **1**, 1111–1113.
- 26 Tahara ST, Mehta A & Reate YB (2003) Proteins induced by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with leaf extract of the host plant (*Sesquiflorae eschii*). *Proteomics* **3**, 95–102.
- 27 Babujee L, Venkatesh R, Yarramzaki A & Tanyuru S (2007) Proteomic analysis of the carbonate insoluble outer membrane fraction of the soft rot pathogen *Dieterleia dendroii* (syn. *Brevibacillus chrysanthemii*) strain 3937. *J Proteome Res* **6**, 82–89.
- 28 Kuzel M (1994) Mutants at conserved positions in gene IV, a gene required for assembly and secretion of filamentous phage. *Mol Microbiol* **14**, 357–369.
- 29 Beuchart P, Delange A, Lemaire J, Behin JP & Lacroix JM (2007) Proteomic analysis of a non-virulent mutant of the phytopathogenic bacterium *Brevibacillus chrysanthemii* deficient in core-regulated periplasmic glucan: change in protein expression is not restricted to the envelope, but affects general metabolism. *Microbiology* **153**, 760–767.
- 30 Martins D, Anton-Menge G, Coletta-Filho HD, Wink PV, Bulhões PA, de Oliveira RM, Marzagoni S, Machado MA, Novelle JC & Sreelka MR (2007) Absence of classical host shock response in the citrus pathogen *Xylella fastidiosa*. *Curr Microbiol* **54**, 115–123.
- 31 Kazemi-Pour N, Condorine G & Hugueney-Cotte-Pittot N (2004) The secretome of the plant pathogenic bacterium *Brevibacillus chrysanthemii*. *Proteomics* **4**, 3177–3186.
- 32 Watt SA, Wille A, Ptaschkowski T & Nielsen K (2005) Comprehensive analysis of the extracellular proteome from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100. *Proteomics* **5**, 153–167.
- 33 Sreelka MR, Martins D, Wink PV, Scatena CH, Costillat ER, Ferraz F, Braun H, Galenbeck R, Della Coletta Filho H, Machado MA *et al.* (2005) Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. *Proteomics* **5**, 224–237.
- 34 Kozan R, Sreber A, Schechter N, Hecker D, Ruttner K, Birn D, Hecker M & Ron EZ (2004) Two-dimensional reference map of *Agrobacterium tumefaciens* proteins. *Proteomics* **4**, 1061–1073.
- 35 Jones AMH, Thieme F, Bennett MH, Mansfield J & Grant M (2006) Modifications to the *Arabidopsis* defence proteome occur prior to significant transcriptional change in response to inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol* **142**, 1603–1620.

- 36 Mahmood T, Jan A, Kakishima M & Komatsu S (2006) Proteomic analysis of bacterial-blight defence-responsive proteins in rice leaf blades. *Proteomics* 6, 6053–6065.
- 37 Chen F, Yuan Y, Li Q & He Z (2007) Proteomic analysis of rice plasma membrane reveals proteins involved in early defence response to bacterial blight. *Proteomics* 7, 1529–1539.
- 38 Coaker GL, Willard B, Kinter M, Stöckinger EJ & Francis DM (2004) Proteomic analysis of resistance mediated by *Rem 2.0* and *Rem 5.1*, two loci controlling resistance to bacterial canker of tomato. *Mol Plant-Microbe Interact* 17, 1019–1028.
- 39 Mathesius U, Mulders S, Gao M, Teplüski M, Caetano-Anolles G, Rolfe BG & Bauer WD (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum sensing signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 1444–1449.
- 40 Xing T, Quellet TR & Miki BI (2002) Towards genomic and proteomic studies of protein phosphorylation in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 7, 224–230.
- 41 Peck SC, Nölise TS, Hess D, Iglesias A, Meins F & Boller T (2001) Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. *Plant Cell* 13, 1467–1475.
- 42 Jones AME, Bennett MH, Mansfield JW & Gram M (2006) Analysis of the defence phosphoproteome of *Arabidopsis thaliana* using differential mass tagging. *Proteomics* 6, 4155–4165.
- 43 Murad AM, Laumann RA, Lima Tde A, Sarmiento RB, Noronha EF, Rocha TL, Valadares-Ingles MC & Franco OL (2006) Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 142, 365–370.
- 44 Murad AM, Laumann RA, Mehra A, Noronha EF & Franco OL (2007) Screening and secretomic analysis of entomopathogenic *Beauveria bassiana* isolates in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 145, 333–338.
- 45 Bohmer M, Colby T, Bohmer C, Brautigam A, Schmidt J & Bolker M (2007) Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proteomics* 7, 675–685.
- 46 Grenville-Briggs LJ, Avrova AO, Bruce CR, Williams A, Whisson SC, Birch PR & van West P (2005) Elevated amino acid biosynthesis in *Phytophthora infestans* during appressorium formation and potato infection. *Fungal Genet Biol* 42, 244–256.
- 47 Rampitsch C, Bykova NV, McCallum B, Bernáik E & Ems W (2006) Analysis of the wheat and *Puccinia triticum* (leaf rust) proteomes during a susceptible host-pathogen interaction. *Proteomics* 6, 1897–1907.
- 48 Webb CA & Fellers JP (2006) Cereal rust fungi genomes and the pursuit of virulence and avirulence factors. *FEMS Microbiol Lett* 264, 1–7.
- 49 Phalip V, Delalande F, Carapito C, Goubet F, Hausch D, Leize-Wagner E, Dupree P, Dorsselaer AV & Jeltsch JM (2005) Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. *Curr Genet* 48, 366–379.
- 50 Meijer HJ, van de Vondervoort PJ, Yin QY, de Koster CG, Kijis FM, Govers F & de Groot PW (2006) Identification of cell wall-associated proteins from *Phytophthora ramorum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 19, 1348–1358.
- 51 Yajima W & Kay NN (2006) The proteome of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Proteomics* 6, 5995–6007.
- 52 Talbot NJ (2003) On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe oryzae*. *Annu Rev Microbiol* 57, 177–202.
- 53 Komishi H, Ishiguro K & Komatsu S (2001) A proteomics approach towards understanding blast fungus infection of rice grown under different levels of nitrogen fertilization. *Proteomics* 1, 1162–1171.
- 54 Long DH, Lee FN & TeBeest DG (2000) Effect of nitrogen fertilization on disease progress of rice blast on susceptible and resistant cultivars. *Plant Dis* 84, 403–409.
- 55 Rakwal R & Agrawal GK (2003) Rice proteomics: current status and future perspectives. *Electrophoresis* 24, 3378–3389.
- 56 Kim ST, Cho KS, Yu S, Kim SG, Hong JC, Han CD, Bae DW, Nam MH & Kang KY (2003) Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by rice blast fungus and elicitor in suspension-cultured rice cells. *Proteomics* 3, 2368–2378.
- 57 Kim ST, Kim SG, Hwang DH, Kang SY, Kim HJ, Lee BH, Lee JJ & Kang KY (2004) Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Proteomics* 4, 3569–3578.
- 58 Lee J, Brueker TM, Lefevre M, Pinson SRM & Oard JH (2006) Proteomic and genetic approaches to identify defence-related proteins in rice challenged with the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Mol Plant Pathol* 7, 405–416.
- 59 Zhou W, Eudes F & Laroche A (2006) Identification of differentially regulated proteins in response to a compatible interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Triticum aestivum*. *Proteomics* 6, 4599–4609.
- 60 Colditz F, Nyamsuren O, Niehaus K, Eubel H, Braun HP & Krajinsek F (2004) Proteomic approach: identification of *Medicago truncatula* proteins induced in roots



- after infection with the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Plant Mol Biol* **55**, 109–120.
- 61 Campo S, Carrascal M, Coca M, Abian J & San Segundo B (2004) The defence response of germinating maize embryos against fungal infection: a proteomics approach. *Proteomics* **4**, 383–396.
- 62 Houterman PM, Späjer D, Dekker HL, De Koster CG, Cornelissen BIC & Rep M (2007) The mixed xylem sap proteome of *Bisariaum oxysporum*-infected tomato plants. *Mol Plant Pathol* **8**, 215–221.
- 63 Chitwood DJ (2003) Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service. *Pest Manag Sci* **59**, 748–753.
- 64 Curtis RH (2007) Plant parasitic nematode proteins and the host-parasite interaction. *Brief Funct Genomic Proteomic* **6**, 50–58.
- 65 Smant G, Stokkermans JP, Yan Y, de Boer JM, Baum TJ, Wang X, Hussey RS, Gommers FI, Henrissat B, Davis EL et al. (1998) Endogenous cellulases in animals: isolation of beta-1,4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 4906–4911.
- 66 Gao B, Allen R, Maier T, Davis EL, Baum TJ & Hussey RS (2003) The parasitome of the phytonematode *Heterodera glycines*. *Mol Plant-Microbe Interact* **16**, 720–726.
- 67 Huang G, Gao B, Maier T, Allen R, Davis EL, Baum TJ & Hussey RS (2003) A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Mol Plant-Microbe Interact* **16**, 376–381.
- 68 Tytgat T, Verscauteren I, Vanholms B, De Meutter J, Vanhoute I, Gheysen G, Borgonie G, Coomans A & Gheysen G (2005) An SXP/RAL-2 protein produced by the subventral pharyngeal glands in the plant parasitic root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Parasitol Res* **95**, 50–54.
- 69 De Meutter J, Vanholms B, Bauw G, Tytgat T, Gheysen G & Gheysen G (2001) Preparation and sequencing of secreted proteins from the pharyngeal glands of the plant parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Mol Plant Pathol* **2**, 297–301.
- 70 Jaubert S, Ledger TN, Laffairs JB, Piotts C, Abad P & Rosso MN (2002) Direct identification of stylet secreted proteins from root-knot nematodes by a proteomic approach. *Mol Biochem Parasitol* **121**, 205–211.
- 71 Calvo E, Flores-Romero P, Lopez IA & Navas A (2005) Identification of proteins expressing differences among isolates of *Meloidogyne* spp. (Nematoda: Meloidogynidae) by nano-liquid chromatography coupled to ion-trap mass spectrometry. *J Proteome Res* **4**, 1017–1021.
- 72 Ashton PD, Curwen RS & Wilson RA (2001) Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins. *Trends Parasitol* **17**, 198–202.
- 73 Williamson VM & Kumar A (2006) Nematode resistance in plants: the battle underground. *Trends Genet* **22**, 396–403.
- 74 Mehta A, Magalhães BS, Souza DSL, Vasconcelos EAR, Silva LP, Grossi-de-Sá MF, Franco OL, da Costa PHA & Rocha TL (2008) Rootomics: the challenge of discovering plant defence-related proteins in roots. *Curr Prot Prot Sci* **9**, 108–116.
- 75 Chivasa S, Hamilton JM, Pringle RS, Ndimba BK, Simon WJ, Lindsey K & Slabas AR (2006) Proteomic analysis of differentially expressed proteins in fungal elicitor-treated *Arabidopsis* cell cultures. *J Exp Bot* **57**, 1553–1562.

## Rootomics: The Challenge of Discovering Plant Defense-Related Proteins in Roots

Angela Mehta<sup>1,\*</sup>, Beatriz S. Magalhães<sup>1,a</sup>, Djair S. L. Souza<sup>1,a</sup>, Erico A. R. Vasconcelos<sup>1,a</sup>, Luciano P. Silva<sup>1,a</sup>, Maria Fátima Grossi-de-Sa<sup>1,2,a</sup>, Octávio L. Franco<sup>2,3,a</sup>, Paulo H. A. da Costa<sup>1,a</sup>, and Thales L. Rocha<sup>1,a</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brazil; <sup>2</sup>Centro de Análises Proteômicas e Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil; <sup>3</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

**Abstract:** In recent years, a strong emphasis has been given in deciphering the function of genes unraveled by the completion of several genome sequencing projects. In plants, functional genomics has been massively used in order to search for genes products of agronomic relevance. As far as root-pathogen interactions are concerned, several genes are recognized to provide tolerance/resistance against potential invaders. However, very few proteins have been identified by using current proteomic approaches. One of the major drawbacks for the successful analysis of root proteomes is the inherent characteristics of this tissue, which include low volume content and high concentration of interfering substances such as pigments and phenolic compounds. The proteome analysis of plant-pathogen interactions provides important information about the global proteins expressed in roots in response to biotic stresses. Moreover, several pathogenic proteins superimpose the plant proteome and can be identified, and used as targets for the control of viruses, bacteria, fungi and nematode pathogens. The present review focuses on advances in different proteomic strategies dedicated to the challenging analysis of plant defense proteins expressed during bacteria-, fungi- and nematode-root interactions. Recent developments, limitations of the current techniques, and technological perspectives for root proteomics aiming at the identification of resistance-related proteins are discussed.

**Keywords:** Roots, proteome, 2DE, mass spectrometry.

### INTRODUCTION

Root tissues represent an important structure for plant growth and development, and are continuously invaded by microorganisms, which cause deleterious effects that culminate in the development of disease and/or death of the plant. Roots are intrinsically complex tissues to explore and slow progress has been made in discovering plant-genes and proteins in these tissues governing the interaction of plant pathogens and their hosts. Most studies are focused on the developmental aspects of roots and with the increase in the availability of expressed sequence tag (EST) sequences, several genes involved in cell cycle, cell growth, abiotic stresses and hormone signaling have been identified [1-5].

In recent years, the application of proteomic approaches as a tool for global expression analysis and protein identification has been highly efficient in the field of protein research. Improvements in the main techniques and equipments for 2-DE (bidimensional gel electrophoresis) and mass spectrometry have allowed a high throughput analysis of protein expression in different fields. While the proteomics research is greatly advanced in animals, plant proteomics has

not yet reached a sufficient level of complexity to identify and study plant proteins involved during the pathogen-host plant interactions. Many proteins involved in the mechanisms of response to biotic/abiotic stress signals are present in low abundance and thus are not easily detectable in crude extracts. Major studies in plant proteomics involve subcellular proteomes, including chloroplasts, mitochondria, nuclei and plasma membranes [6-11] and most of them still rely on 2-DE separations of crude cellular extracts.

The study of proteins has also become progressively more important since it is now well established that there is little correspondence between the transcript and protein levels [12, 13]. Post-translational modifications such as the removal of signal peptides, phosphorylation, glycosylation, ubiquitination, among others are important processes for protein function and subcellular localization which are not accounted for using genomic strategies [14]. Therefore, proteomics is playing an increasingly important role in addressing these issues and has become a necessary and complementary approach in the post-genomic era. Furthermore, by analyzing the proteins being expressed during a specific condition, information regarding the genes/proteins that are co-regulated and act together in response to a given stress can be identified. Nevertheless, the root proteomics (here termed rootomics) analysis is still incipient when compared to other plant tissues and even more when compared to other organisms such as prokaryotes, yeasts and mammals [15]. One of the major factors responsible for the limited data re-

\*Address correspondence to this author at the Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB Av. W5 Nucleo Final, Asa Norte, CEP 70770-900 Brasília, DF, Brazil; Tel: +55 61 3448-4901; Fax: +55 61 3340-3653; E-mail: amehta@cenargen.embrapa.br

<sup>a</sup>These authors are arranged alphabetically by author's first name since they contributed equally to the work

garding root proteomics is related to low protein and tissue amounts. Interestingly, Mooney *et al.* [16] showed that proteins involved in disease resistance represented 13% of root proteins compared to 7% identified in leaves. These results indicate that root tissue is an excellent target to study plant-pathogen interactions and the use of differential proteomic studies can aid in the discovery of resistance- and defense-related proteins.

## PROTEIN ANALYSIS TOOLS FOR ROOTEDOMICS

### Sample Preparation

In general, protein sample preparation is a key step in any proteomic approach. When considering the extraction of proteins in plant tissue, the difficulty often resides in their low overall intrinsic amounts, the presence of proteases and contaminants such as polyphenols, polysaccharides, lipids and secondary metabolites that usually hinder an efficient protein extraction [17]. In addition, the proteomic profile is often dominated by the more abundant components, which considerably limit the number of proteins that can be successfully identified. For these reasons, most protocols for protein extraction from plant tissues include a protein precipitation step, in order to concentrate the total protein content in the sample and clean it from contaminants. In this sense, a common approach for protein extraction has been to homogenize the plant material in the presence of liquid nitrogen, precipitate the protein content in a methanol/acetic acid/acetone solution and re-solubilize the pellet in a chaotropic agent [18]. Due to its simplicity, it remains the preferred protocol of total protein extraction from root tissue, as demonstrated by recent proteomic studies of wheat [19], maize [20], *Moringa tomentosa* [21], rice [22] and ginger [23] roots.

An alternative procedure has been to extract proteins with phenol and subsequently precipitate them in ammonium acetate and methanol [24]. Although fewer research groups adopt this protocol, the procedure was recently judged more efficient in terms of the number of proteins detected in tomato root tissue, when compared to the number extracted with the standard methanol/acetic acid/acetone method [25]. Despite this result, the type of protocol employed is in fact greatly dependent upon the type of tissue and the subsequent purification strategies. In some instances, the application of both protocols to the same tissue sample can result in different proteomic profiles, as was demonstrated in banana, apple and potato leaves [26].

Another method recently proposed by Demas Gaudet *et al.* [27] optimizes the amount of root material under study. These authors report a method for the extraction of RNA and proteins from the same sample. Ground material is homogenized in buffered phenol and RNA is further collected from the aqueous phase, while proteins are recovered from the phenolic phase [27]. This is an interesting alternative when genomic and proteomic approaches are intended.

The need to enrich samples with specific proteins has also contributed to the optimization of extraction protocols among the study of plant subproteomes. In this sense, from the perspective of identifying symbiosis-related proteins, the possibility of restricting the tissue of interest to the actual

nodule and peribacteroid membranes has proved successful. The protocols employed to study the nodule proteomes are quite diverse, but they have generally resorted to differential centrifugation steps. Recently, this type of procedure has been demonstrated in proteomic studies of *M. truncatula* root nodules infected by *Agrobacterium tumefaciens* [28], in soybean root nodules infected by *Bradyrhizobium japonicum* [29], in pea root and Weymouthia roots infected by *Rhizobium leguminosarum* [30, 31], in *Lotus japonicus* root nodules infected by *Mesorhizobium loti* [32]. Furthermore, the characterization of membrane-associated proteins has also been possible with an additional chloroform/methanol extraction step, as demonstrated in the comparative proteomic study of *M. truncatula* roots inoculated with the fungus *Gliovir intraradicis* [33].

When considering root-pathogen interactions and the subsequent identification of resistance-related and pathogenesis-related (PR) proteins, no particular effort has been made towards the physical separation of the pathogen from the root tissue before proteomic analysis. In fact, much of the literature on the subject simply assesses the differences observed between proteomic profiles of infected versus non-infected roots, as in the case of *M. truncatula* infected by the fungi *Sphaeromyces metchnikii* [34]. One avenue left to explore remains the possibility of studying the pathogen and the root individual proteomics upon interaction. The specific structures formed within the root tissue upon infection, such as specialized giant cells in the case of nematode infection [35], or localized infected cell populations could well be the target of specific proteomic studies. To this end, the application of laser capture microdissection could prove a powerful new tool towards the isolation of these structures and advance the understanding of the proteomic profiles of the initial stages of root infection. Although much of the work describing the application of this technique in the characterization of plant-microbe interaction has focused on gene expression [36], it could well be extended in the field of root proteomics.

### Two Dimensional Gel Electrophoresis

In recent years, the field of proteomics has expanded considerably and several new technologies have been developed and applied to an enormous variety of biological questions [37]. Although some authors have suggested that bidimensional gel electrophoresis (2-DE) is an ancient and surpassed technique, this procedure has been frequently utilized in plant proteomic studies. In fact, promising alternative technologies such as multidimensional protein separation, protein arrays and others have emerged recently. However, 2-DE is currently the only technique that can be routinely applied for quantitative expression profiling of large sets of complex protein mixtures such a root cell lysates [38]. Although 2-DE technology is not properly cheap, the equipments are much more accessible than mass spectrometers, for example. This particularity makes proteomic studies possible for several research groups located in developing countries, spreading the proteomic science around the world. It is true that protein identification is an important step in proteomic analysis and mass spectrometry-based strategies has contributed enormously in this aspect. Thus, the recent enthusiasm in proteomic studies is a result of the union of

techniques based on 2-DE and those focused on mass spectrometry, and this union has been responsible for the increase in the functional assignment of proteins and genes in various organisms, including plants. The 2-DE technology began to be explored in the 1970s [38] and several modifications have been added to this classical technique, especially for plant tissues analysis [40]. Immobilized pH gradients and gels, as well as power supplies and gyl supports are now commercially available and have clearly improved reproducibility and decreased vesant time. By using these benefits, several good quality 2-D gels have been obtained, generating valuable information for the understanding of root metabolism and physiology.

Initially, model plants such as *Arabidopsis thaliana* and *M. truncatula* were used to develop extraction and gel protocols. Therefore, 2-DE associated to peptide mass fingerprinting was used to investigate the natural variation in the root proteome among eight *A. thaliana* ecotypes [41]. Comparison of 2-D maps demonstrated that only one-quarter of spots were shared by all accessions, suggesting that proteomics could be a valuable tool to understand natural variations of plants and also to compare susceptible and resistant varieties to isolate resistance proteins.

The proteomic knowledge achieved in root models was applied to crop plants, aiming to solve agricultural problems and find biotechnological targets and/or tools. However, most studies have focused on developmental aspects. Liu et al. [26] produced 2-D gels of primary maize roots, aiming to identify proteins that are differentially accumulated during root growth. Differential spots were identified by MS showing that two proteins that were shown to accumulate differentially between wild type and treated roots can be linked to lignin metabolism, giving clues on genes that might be involved in the developmental switch that results in the initiation of lateral roots [26]. By using high-resolution 2-DE, the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root proteome was also evaluated [42]. Gel image analysis revealed an average of 1467 electrophoretically resolved spots in 6 hrs and 1595 spots on tubes in the pH 3–10 range. As cassava is a major source of energy in the diet of more than 700 million people, particularly in the developing countries of South America, Africa and Asia, the proteomic approach could be useful for a better understanding of protein and carbohydrate accumulation in tubers. Therefore, results reported by Sheffield et al. [43] not only facilitate insights into the molecular processes underlying root physiology and differentiation, but can also give valuable information for cassava genetic improvement programs in order to solve some problems as disease susceptibility, low production and reduced nutritional quality.

New improvements in electrophoresis tools such as the development of algorithms for gel image analysis [44], difference gel electrophoresis (DIGE) that facilitates complex protein comparison analysis by labelling different samples with Fluorescein dyes [44] and dilute bromolime™ gels for the resolution of large proteins [45] are already being used in biomedical research. The utilization of these techniques in plant research could contribute for the development of plant proteomics, specifically for proteomic processes involving root pathogen interaction.

Although by no means perfect, 2-DE coupled with mass spectrometry remains the main technology for separating and identifying complex protein mixtures in proteomic projects at least for the foreseeable future [38]. Electrostatic studies aiming at the identification of agroindustrially important proteins is a field that can be largely explored using both these techniques. It is certain an array of novel interesting proteins will be discovered using these approaches.

#### Gel-Free Systems

Despite the undeniable applicability of 2-DE in the field of proteomic research, the limitations of the technique in terms of its unsuitability to identify less abundant proteins [46] or to characterize membrane proteins, together with the difficulties to automate the procedure, have prompted the search for gel-free systems in order to improve the extent of protein separation [47]. One way to circumvent these limitations has been through the incorporation of multidimensional chromatographic steps before mass spectrometric analysis [48]. This procedure incorporates ion-exchange and reverse-phase capillary columns directly linked to a nanospray mass spectrometer. The samples applied to these columns consist of digested proteins with several proteolytic enzymes which greatly increases the number of peptide targets available for the identification of the parent protein. In order to ensure the feasibility of this method, a good genome database (e.g. cDNA library) should be available for the organism in question, which is why this approach has only been successful so far in the field of plant proteomics when characterizing the rice proteome [49].

On a much smaller scale, the application of liquid chromatography for protein separation instead of 2-DE has proved successful in a proteomic approach aiming to characterize the small protein content of *M. truncatula* root tips [50]. In this case, the protein extraction protocol was simplified and consisted of a single extraction step with 50% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid followed by size exclusion and reverse phase chromatographic purification steps. Despite this attempt, the lack of literature available on the application of gel-free systems to the study of root-microbe interactions reinforces the practicality of the 2-DE methods for protein separation, but at the same time opens up new possibilities for large scale protein identification projects through the optimization of multidimensional chromatographic steps prior to mass spectrometric analysis.

#### Mass Spectrometry Identification Methods

Mass spectrometry (MS) has become an essential tool for protein identification. Recent developments and technical improvements have allowed a large scale analysis of proteins, which have accompanied the increasing amount of proteins being analysed by the 2-DE techniques. Accurate molecular mass information provided by MS and tandem MS experiments has enabled a rapid comparison of differentially expressed proteins in plants in diverse biological conditions.

Mass spectrometry is a powerful tool for protein identification and also enables the characterization of post-translational modifications (PTMs) as well as the identification of protein-protein interactions and multimeric com-

plexes [14]. Proteins can be initially resolved by electrophoresis (top-down) or chromatographic (bottom-up) approaches. Further enzymatic digestion allows the identification of these proteins via peptide mass fingerprinting (PMF) using MS or via *de novo* sequencing using tandem MS (MS/MS and MS<sup>n</sup>).

Peptides generated by enzymatic digestion have taken advantage of two major MS ionization methods: matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) and electrospray ionization (ESI). In MALDI, peptides are co-crystallized with a large molar excess of a small molecular organic acid on a metallic plate following the desorption and ionization by intense and short pulses from a laser beam. In ESI, peptides in an acidic solution are sprayed in a fine mist and the solution in the droplets evaporates leaving the peptide ionized.

Besides the development of the MALDI and ESI ionization methodologies, improvement in MS devoted to proteomic studies has also resulted from advances in mass analyzers. The time-of-flight (TOF), quadrupole (Q), ion trap (IT) and Fourier transform ion cyclotron (FTIC) are the major types of mass analyzers currently interfacing MALDI and ESI. Each of them shows specific features and several instruments use two or more mass analyzers to separate the ions according to their mass-to-charge ratios. Finally, a detector is used to register the number of ions emerging from the analyzer.

Root proteomic analyses of plant-microorganism interactions described to date were mostly focused on differential protein composition induced by symbiotic microbes [51–53, 27, 54, 32, 29]. In contrast, the study of proteins differentially expressed in response to root pathogens is a neglected area of proteomics. Only few investigations were carried out on altered protein composition induced by root pathogens [34, 55, 56]. Most of these studies have used a 2-D gel approach followed by *in-gel* tryptic digestion and MALDI-TOF MS and several proteins have been identified.

MALDI-TOF MS is a highly advantageous strategy when compared to NEDs terminal sequencing, which was the only method available for protein identification until recently. However, some problems need to be taken into consideration, such as protein amounts. As mentioned in this review, roots have intrinsically low amounts of proteins and therefore, the chances of a successful identification by MS or MS/MS is low. In our experience, when analyzing the proteomics of cotton and coffee, a successful identification was obtained for only 30% of the proteins analyzed. Therefore, care must be taken to optimize the amount of proteins obtained from the root tissue in order to successfully identify proteins by using the MALDI-TOF MS approach.

### ROOT-PATHOGEN INTERACTIONS

Nutrient acquisition is an essential process for the survival of all heterotrophic organisms. As primary nutrient source, plants represent an important carbon source for a wide number of organisms. Several species of microorganisms live in close association with plants colonizing the surface (epiphytic colonization) or tissues (endophytic colonization), and sometimes causing diseases (pathogenic colonization).

The events that trigger the establishment of these interactions are activated by the recognition of specific signal molecules associated to plants and microorganisms, which are detected by sensorial proteins. Upon detection of these stimuli, there is a continuous process of response between plants and microorganisms that characterizes the plant-microorganism interaction. Several plant factors such as pathogen recognition receptors and phenolic compounds as well as pathogen proteins and molecules including virulence factors and exopolysaccharides play important roles in plant-microorganism relation and are determinants in the nature of the interaction [57].

Extensive genomic studies have revealed several resistance and defense-related genes expressed during pathogen infection. After the recognition of the pathogen by the plant, signal transduction pathways are triggered, which result in the production of reactive oxygen species, accumulation of pathogenesis-related proteins and phytoalexins, as well as localized cell death [58, 59]. Among the defense-related genes reported are chitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, chitinase synthases and peroxidases. Regarding proteomic analyses, some efforts have been made aiming at the comprehension of root-fungi, -bacteria and -nematode interactions, and the findings are discussed below. Some of the most proteins differentially expressed during plant-microorganism interaction identified by proteomic approaches are listed in Table II.

### Proteomics of Fungal-Fungi Interactions

Regarding the proteomic analysis of root-pathogen association, the most studied interaction is that of root fungi. Several reports have shown the use of proteomics for the isolation of proteins of agronomic relevance including chitinases, pathogenesis-related proteins, among others. However, still little proteomic information is available regarding the biochemical and physiological interactions in this host-parasite system. Moreover, the molecular bases of the interaction between pathogenic fungi and roots are not well understood.

The proteomic tools offer an excellent way to evaluate the host proteome during the host-parasite interaction process. Compared to the number of publications on the proteomics of symbiotic interactions (nitrogen-fixing and arbuscular mycorrhizae), the use of this strategy appears rather limited in the area of plant responses to pathogens. The amount of root material available for analysis is frequently a major drawback for more detailed studies. Similar difficulties have been reported in the symbiotic root-fungi interactions in *M. truncatula* [27]. These authors report that few studies have been performed in the appressoria stage, in which limited amounts of root are available, making proteomic studies a difficult task. The extraction of proteins and RNAs from the same sample is one of the alternatives to overcome this problem. Techniques that allow this analysis have been developed for root-fungi interaction and have been used successfully [27]. This strategy could be applied for other plant-microbial interactions in order to optimize the results obtained.

Additionally, plants are able to synthesize and secrete enzymes that are able to degrade the cell wall of the invading pathogen and these enzymes are often classified as patho-

Table 1. Host Proteins Differentially Expressed During Fungal-Plant/Insect-Plant Interactions Identified by Proteomic Studies

Protein	Plant	Pathogen/Insect	Reference
Dinucleoside diphosphate reductase protein p149	<i>M. truncatula</i>	<i>A. ostrobocki</i>	Calditz et al., 2004
ABA-responsive protein ABR17	<i>M. truncatula</i>	<i>A. ostrobocki</i>	Calditz et al., 2004
Pathogenesis-related protein class 10 (PR10)	<i>M. truncatula</i>	<i>A. ostrobocki</i>	Calditz et al., 2004
Isoliquiritigenin 3-O-methyltransferase	<i>M. truncatula</i>	<i>A. ostrobocki</i>	Calditz et al., 2004
Glyoxalase 5-oxalaldehyde	<i>M. truncatula</i>	<i>Stromos evanense</i>	Brechl-Ceas et al., 2002
Cytochrome c-oxidase	<i>M. truncatula</i>	<i>Stromos evanense</i>	Brechl-Ceas et al., 2002
Phenylalanine	<i>M. truncatula</i>	<i>Stromos evanense</i>	Brechl-Ceas et al., 2002
Pathogenesis-related protein PR1	<i>Gryzot setivus</i>	<i>Ascaris sp.</i>	Mitchel et al., 2006
Pathogenesis-related protein PR3a/PR3b	<i>Gryzot setivus</i>	<i>Ascaris sp.</i>	Mitchel et al., 2006
GuDin superoxide dismutase	flower culture Weopari LLP	<i>Rhizoctonia leguminosarum</i> var. <i>sofisti</i>	Moran and Djerdjevic, 2001
Chaperone 71 precursor	flower culture Weopari LLP	<i>Rhizoctonia leguminosarum</i> var. <i>sofisti</i>	Moran and Djerdjevic, 2001
L-ascorbate peroxidase	<i>M. truncatula</i>	<i>N. vici</i> , hexastamine Intra (S.EI.) treated	Maffei et al., 2003
Hiponoxidase-isohyalal response protein (HIR1)	<i>M. truncatula</i>	<i>N. vici</i> , hexastamine Intra (S.EI.) treated	Macharius et al. 2003
Saprosidine dehydroase	<i>M. truncatula</i>	<i>N. vici</i> , hexastamine Intra (S.EI.) treated	Macharius et al. 2003
PR1 b-1 protein	<i>M. truncatula</i>	<i>N. vici</i> , hexastamine Intra (S.EI.) treated	Macharius et al. 2003
Paroxidase	<i>M. truncatula</i>	<i>N. vici</i> , hexastamine Intra (S.EI.) treated	Macharius et al. 2003
Ascorbate hydroxylase	<i>M. truncatula</i>	<i>Nectaribolus medialis</i>	Van Nieuwen et al., 2007
Timolase	<i>M. truncatula</i>	<i>Nectaribolus medialis</i>	Van Nieuwen et al., 2007
PR10 protein	<i>M. truncatula</i>	<i>Nectaribolus medialis</i>	Van Nieuwen et al., 2007
Heat shock protein 70	<i>M. truncatula</i>	<i>Nectaribolus medialis</i>	Van Nieuwen et al., 2007
Protein disulfide isomerase precursor	<i>M. truncatula</i>	<i>Nectaribolus medialis</i>	Van Nieuwen et al., 2007
Chitinase	<i>C. sinoplatensis</i>	<i>M. persimmonis</i>	-
Pathogenesis-related protein class 10	<i>C. sinoplatensis</i>	<i>M. persimmonis</i>	-
Quercetin oxidase 2	<i>C. viticulus</i>	<i>M. anisopliae</i>	-
14-3-3 polypeptide	<i>C. viticulus</i>	<i>M. anisopliae</i>	Collahan et al., 1997

glycine-related proteins because high-level expression is normally induced upon infection. By using 2-DE, the root protein profiles of *M. truncatula* after *Aphanomyces coenocyticus* pathogenic infection were analyzed [55]. Several differentially expressed proteins in response to the infection were identified by MALDI-TOF-MS and the majority of the induced proteins belonged to the family of the class 10 of PR proteins. Other protein spots were also identified as putative cell wall proteins and enzymes of the phenylpropanoid-metabolism pathway, including an isochlorogenicin (chlorogenic) 3-O-methyltransferase (cOMT) and a chitinase reductase (CHR), which are required for the production of melatonin, the major phytoalexin accumulated in response to fungal pathogens. More recently, a comparison of *M. truncatula* lines with different susceptibility to the *A. ostrobocki* was

performed and two proteomic alpha subunits in the main reaction line were identified [34].

The number of protein spots identified in the *M. truncatula* root-fungus interaction (520 proteins) is impressively low, when compared to the number of transcripts sequenced using a genomic approach (5000 transcripts). This result represents another challenge for proteomic analysis and can be explained by the limitations of the proteomic tools and methods such as protein extraction protocols that do not allow the isolation of proteins with certain biophysical properties, such as hydrophobicity (hydrophobic proteins are lost due to low solubility), limitations in the pI range for 2-DE separation and low abundance proteins that can not be observed in the 2-DE gels. One of the techniques that can over-

error: this problem is the 2Dall901 (multidimensional protein identification technology), already successfully applied to plant systems [63]. However, quantification of expression levels is not possible with this technique. These aspects need to be taken into consideration when analysing the protein expression in a given condition.

Another strategy that can be applied for plant disease control is the analysis of the pathogen proteins, which can be identified and used as targets. Pathogenic fungi have several effector proteins that play a key role in successful colonisation of plants [61]. Appropriate effectors are secreted into the plant extracellular space, where they interact with extracellular targets and surface receptors. By using a proteomic approach, *Aspögg et al.* [62] investigated the role of the extracellular matrix secreted by the cereal pathogenic fungus *Hymenochaete vermiculata*. However, the proteins isolated from 2-DE gels and analysed by MS revealed no significant matches to sequences available in public databases. Protein identification by using the MS technology is highly dependent on the public databases, and the amount of information currently deposited is impressively large. However, caution must be drawn to the fact that a large number of proteins with unknown functions or not yet isolated can be completely ignored when protein homology is searched. This is also true for most proteins. An interesting result was obtained by *Péresse et al.* [63], who analysed root transcriptomics of *Arabidopsis thaliana* using the SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) technique. These authors reported 6000 different transcript tags, which showed no match to the *Arabidopsis* gene pool and suggest that a significant amount of transcripts present in roots originate from unknown or wrongly annotated genes. This is an intriguing result and may reflect the difficulty in most protein identification.

Several proteomic studies on symbiotic fungus-root interactions have also been conducted and these organisms, although beneficial to the plant, seem to induce an array of defence-related proteins during colonisation. Proteomic analysis has identified proteins involved in mycorrhiza development and functioning including proteins involved in defence response and root physiology [64]. An interesting case is that of *Trichoderma*, which is a fungus that can overcome root growth, control deleterious non-pathogenic root microflora, destroy toxic metabolites produced by deleterious microflora and control root pathogens [65]. Several studies have shown that root colonisation by *Trichoderma* strains results in increased levels of defence-related plant responses, including various peroxidases, chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, and the ligninase pathway. *Trichoderma* species have been reported as potentially useful for biological control, since they are able to attack or inhibit the growth of plant pathogens directly. Proteomic studies of the interaction of *Trichoderma* and maize seedlings grown from treated and non-treated seeds were investigated by 2-DE. About 40% of the proteins observed in the presence of *Trichoderma* were not detected in untreated plants [65]. Similarly, *Mora* [66] identified 29 proteins related to the triple interaction among bean roots (*Phaseolus vulgaris*) with the fungi *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani* and its antagonist *Trichoderma*. Proteins with differential expression patterns were evaluated by MS and in root proteome, 198 proteins and other factors related to resistance were associated to the interaction be-

tween the plant and the two pathogenic fungi as well as with the antagonist. These results are in agreement with the findings of *Harman et al.* [65], which showed that *Trichoderma* has the capacity of inducing resistance to many pathogenic microorganisms.

Another important approach is the analysis of the *Trichoderma* proteome in response to the interaction with the plant. The proteins identified in this interaction process may shed some light over the processes that trigger plant defence, and may be used for the induction of resistance in plants. Some efforts have been made in this direction. *Stametz et al.* [67] analysed the extracellular proteome secreted by *Trichoderma harzianum* in the presence of different fungal cell walls. A combination of liquid chromatography and mass spectrometry allowed the identification of a novel aspartic protease, which showed 44% identity with the aspartic protease polypeptidase (P47342.29) from the basidiomycete *Hyph. lacteus*. In summary, the results discussed here exemplify the range of proteomic applications that can successfully be applied to the study of fungi-root molecular interactions.

#### Root-Bacteria Interactions

Plant-bacteria interactions have been extensively studied over the years and various plant genes involved in the response to bacterial phytopathogen infections have been identified [58,68-70]. However, few studies have focused on root-bacteria associations, and these studies have mostly employed genomic techniques. *Ohit et al.* [71] recently reported the transcriptomic analysis of *Arabidopsis thaliana* in response to *A. tumefaciens* infection and several up-regulated genes encoding known defence proteins were identified.

Regarding the proteomic approach, *Madsen et al.* [56] reported the analysis of *At. thaliana* roots in response to *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signals. The recognition of these signals by the plant is important for the response to the invading pathogen. Several proteins involved in defence, including 198 proteins, peroxidases, aspartic proteases and a hypoxanthine induced response protein (C0081) were identified [56]. The lack of information in this field shows that there is important knowledge regarding protein expression in roots in response to bacterial infections. This is an interesting area of investigation and should be better explored.

The root symbiosis association has been the most studied root-bacteria interaction and as a symbiotic fungi-root interaction, defence-related genes have been reported in nodulated roots. A pioneering proteomic work aiming to study this type of interaction was performed with the legume *Medicago sativa* infected by the bacterium *Sinorhizobium meliloti* [72]. This study revealed over 250 proteins induced in up-regulated upon infection, which were mainly of bacterial origin present in the nodules as compared with the roots. Other studies followed, such as that reported by *Morris and Djordjevic* [73] and more recently by *Michele et al.* [74] and *van Hoeselt et al.* [75], in which proteins involved in root-bacteria interaction were identified. These data reinforce the importance of the study of roots for the discovery of resistance-related genes and proteins in plants.

Bacteria belonging to the *Rhizobium* genus may also establish beneficial or harmful relationships with plants. The pathogenic strains of this legume endosymbiont contain *vir* genes, which cause the formation of tumors or hairy roots [76]. Strains of *R. rhizogenes* were shown to be able to induce hairy roots or tumors in plants and also to modulate *P. vulgaris* under natural environmental conditions [76]. In *M. truncatula*, a time-course analysis of root protein profiles was investigated using 2-DE and MS identification after inoculation with the nitrogen fixing bacterium *Sinorhizobium meliloti*. An *M. truncatula* leghemoglobin induced in nodulated roots was identified, as well as an elongation factor Tu from *S. meliloti*, while another one could not be assigned a function. These results emphasize the usefulness of proteomic analysis in identifying molecular events occurring in plant root symbioses and also call attention to the fact that microorganism proteins are not separated from the root tissues when the interaction is being analyzed. This is especially important when a function can not be assigned to the proteins and therefore it is not possible to determine if the protein was expressed in the plant or in the microorganism.

#### Root-Nematode Interactions

The current knowledge on plant-nematode interactions has reached the frontier regarding new scientific approaches. A high amount of information has been generated based on genomic and transcriptomic analysis, however few studies have focused on the proteomic profiles of plants infected by nematodes. When the nematodes invade plant roots and establish as the sedentary form, several plant genes are up- or down-regulated in order to form the nematode feeding sites [77]. Diverse resistance genes have been identified as induced in infested roots, all conferring resistance against these pathogens [78]. Activated defense genes include peroxidase, chitinase, lipoxigenase, chitinase, and proteinase inhibitors [77]. The discovery of these genes expressed upon nematode parasitism can provide important information about natural resistance in plants. Studies have shown the efficiency of the bioactive anti-nematode molecules such as oryzoxystatin and espicamin (proteinase inhibitors) that confer resistance to *M. incognita* and *Dityrodium schachtii*, respectively [79, 80]. Several other genes have been isolated and presented a potential application for nematode control in transgenic plants. Some proteins encoded by these genes include the  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) [81] and lectins [82]. The products of the nematode resistance (Nem-R) genes can be specifically active against some nematode species or pathogens [78] and include the genes Cico1-4 [83], Mti-1 [84], Hstlpro-1 [85], Hrcs A [86-88], Cre1 [89], among others. Secondary metabolites such as phytoalexins are also synthesized in the roots and confer higher resistance levels to nematode pathogens [90, 91]. All these genes however, were isolated using genomic approaches. A proteomic strategy could be applied in order to complement these data and isolate the proteins encoded by these genes.

The lack of data regarding proteomic studies focused on root-nematode interaction is intriguing. Laubert and colleagues [92] shed some light on this point when 2-DE and microsequencing were employed to analyze the proteomes of the pathogen *Meloidogyne incognita* stilet. A total of 7 proteins were identified, including a calreticulin that is believed

to be related with infectivity of nematodes in plants [92]. Regarding root-nematode proteomics, a study performed by Callahan et al. [93] reported one- and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of resistant and susceptible cotton (*Gossypium hirsutum* L.) root protein extracts. Several polypeptides were differentially expressed in response to the root-knot nematode infection. A polypeptide with 14 kDa was abundantly and differentially expressed in young galls of the resistant isolate 81-249 at 8 days after inoculation. The amino acid sequences obtained did not reveal considerable homologies with other sequences. However, this novel root-knot nematode-inducible 14kDa protein can be related with a specific resistance in nematode galls [93].

Besides the identification of natural anti-nematode molecules, the profile of genes or proteins induced by the nematodes during the feeding site formation can generate potential targets for reverse-genetics. An example of this response is the case of an expansin gene expressed during *Meloidogyne javanica* parasitism that acts as a facilitator of cell expansion *in vivo*, being extremely important for the expansion of the giant cell. The LeCRP45 antisense transgenic roots reduce the nematode ability to complete its life cycle [94]. Therefore, proteomic approaches can act together with other functional genomic tools for identification of specific protein / RNA targets and for the development of new transgenic crops resistant to nematodes.

Our research group has been studying proteins differentially expressed in cotton and coffee resistant cultivars infected with *M. incognita* and *Meloidogyne paranasais*, respectively. We have used a proteomic approach to analyze the proteins expressed in these plant genotypes and compared infected versus non-infected roots by 2-DE. Several differentially expressed proteins could be observed in the gels [95] and some proteins were identified by MS/MS. One differentially expressed protein in infected coffee roots was identified as a chitinase class III of *C. arabica* (Table 2), known to be involved in defense responses to pathogens [96]. Also a constitutive protein expressed in infected and non-infected coffee roots was identified as a PR protein of *Vitis quinquangularis* (Table 2). It is known that most resistance genes are constitutively expressed in plants [78] and this may be the case of the PR protein identified in coffee. In cotton, we have identified a protein similar to *Triticum monococon* quinnone reductase 2 (QR2) (Table 2). In plants these proteins catalyze the divalent reduction of quinnone to hydroquinones protecting the plant cells from oxidative damages [97]. Our results emphasize the importance of root proteomics in the isolation of resistance and defense-related proteins and genes.

#### PERSPECTIVES

As emphasized in this review, there is insipient data on rootomics analysis focused on root-pathogen interactions. Analysis of 2-DE based approaches provides a convenient way to study and identify proteins that are regulated in response to stress conditions. Moreover, the potential of these techniques in the identification of defense/resistance-related proteins is undeniable. Future discovery of novel proteins involved in pathogen response could lead to the isolation of



Table 2. Identification of *C. rosaceorum* and *C. rosacearum* Proteins by Peptide Sequencing

Spot n <sup>o</sup>	Peptide Sequence	Protein Identification	Accession #	MW (kDa)	pI (pI)	Identity
Spot 1	LSLGNAPRLSS	chitinase	gi4813564	28	5.8	100%
Spot 2	YEVTESEPPAR	Palaeomyces-robust protein	gi89977947	17	7.2	98%
Spot 3	TDAFHTLVLETRADGVLEDFPTR	quorum reduction 2	gi5898257	33	7.0	92%

genes, which could be introduced into agronomically important crops aiming to obtain resistant plants.

Proteomics analyses present several challenges, which include the presence of low amounts of proteins in root tissues and limitations of protein extraction protocols currently available. Another important task when studying proteomics is the absence of similarity hits when peptide sequences are searched in the current databases. When analyzing structural and functional genomic sequencing projects, around 30% of the genes sequenced represent hypothetical proteins or are no hits. In the case of mass spectrometry analysis of root proteins with no genome sequence available, the identification of these proteins can be a major problem. In this review, we have emphasized the promising analysis of proteomics research in order to identify proteins and genes of agronomic relevance to be used in the development of a sustained agriculture in the future. The proteomic analyses have been increasingly performed and the current techniques promises a great deal for better understanding the root-pathogen interactions.

REFERENCES

[1] Salmons, B., Bentley, P. and Dehn, L. (2003) In *The Arabidopsis Book* (Gainesville, G.R. and Meyerowitz, E.M. Eds) Rockville, MD: American Society of Plant Biologists (<http://www.aspb.org/downloads/usbiodiversity/arabidopsis.pdf>).

[2] Kulkarni, A., Deckerhoed, G., Klotze, D., Baudet, H. and Martin, F. (2003) *FEBS Lett.*, **547**, 41-41.

[3] Jiang, Y. and Deyhghan, M.K. (2006) *Plant Physiol.*, **141**, 1148-58.

[4] Kwasniewski, M. and Sauerbrun, L. (2006) *Plant Physiol.*, **141**, 1148-58.

[5] Hwang, C.F., Goman, K.S. and Bentley, G.S. (2006) *Antonie*, **443**, 438-481.

[6] Pellier, J. B., Fross, G., Kuhnert, D. E., Rappelhof, P., Hilber, F., Adenot, I. and van Wijk, K. J. (2000) *Plant Cell*, **12**, 319-343.

[7] Franz, M., Sabet, D., Bagnara, S., Hwang, S., Kowalski, S., Lamsbacher, M., Gault, J., Taylor, J. and Railroad, H. (2003) *Mol Cell Proteomics*, **2**, 323-343.

[8] Winkler, W. and Boman, H.P. (2002) *Electrophoresis*, **23**, 648-648.

[9] Ben, M. S., Gao, B. J., Choi, B. Y. and Park, O. K. (2003) *Plant J.*, **36**, 632-633.

[10] Kawamura, Y. and Demura, H. (2003) *Plant J.*, **36**, 141-154.

[11] Gonzalez-Gonzalez, F. and Melnick, F.J. (2007) *Mol Biol Cell*, **18**, 515-522.

[12] Gyp, S.P., Rochon, Y., Poirier, B.R. and Arkenhold, R. (1999) *Mol Cell Biol*, **19**, 1720-30.

[13] Chong, G., Ghosh, T.C., Huang, C.C., Taylor, J.M., Hwang, D.H., Kachik, S.L., Guzman, T.J., Isonstein, M.D., Kung'u, M.B., Hwang, S.M. and Bost, D.G. (2003) *Mol Cell Proteomics*, **2**, 104-113.

[14] Jansen, O.H. (2005) *Mol Biol Cell Biol*, **7**, 381-403.

[15] Aggarwal, G.K. and Redwood, K. (2006) *Mass Spectrom Rev*, **25**, 1-33.

[16] Hwang, B.P., Mitter, J.A., Gonzalez, C.M. and Taylor, J.J. (2006) *Physiology Plantarum*, **118**, 237-250.

[17] Dreyfus, A. and Kuan, M. (1939) *Mol Biol Cell Biol*, **11**, 95-97.

[18] Damour, C., de Vries, D., Zeng, M. and Thellmann, H. (1996) *Electrophoresis*, **17**, 52-54.

[19] Robinson, H., Gony, A., Deviance Brand, F., Bond, B., Vachin, F. and Le Gouis, J. (2003) *Plant Sci*, **165**, 81-87.

[20] Liu, Y., Liang, X., Tang, T., Jia, A., He, G., Zhang, B., Huo, H., A. and Hwang, B.P. (2006) *Proteomics*, **6**, 4368-4376.

[21] Hwang, D., Kwon, G., Hwang, S.H.A., Watanabe, J.J., Hwang, M.A. and Redwood, K.G. (2001) *Proteomics*, **1**, 1424-1430.

[22] Kondo, H., Kondo, H. and Kwon, S. (2005) *Plant Cell Environ*, **28**, 129-137.

[23] Kim, S., Kim, J.Y., Kim, E.A., Kwon, K.H., Kim, K.W., Cho, K., Lee, J.H., Han, M.H., Yang, D.C., Yoo, J.S. and Park, Y.M. (2003) *Proteomics*, **3**, 2379-2392.

[24] Hurlbert, W.J. and Tanaka, C.K. (1986) *Plant Physiol.*, **81**, 607-608.

[25] Stevenson, B.S. and Bost, J.S.C. (2004) *Proteomics*, **4**, 2322-2332.

[26] Caporaso, S.C., Wilson, T., Lankau, K., Dreyfus, P., Sauerbrun, L. and Potts, B. (2005) *Proteomics*, **5**, 2477-2507.

[27] Danes-Guadalupe, E., Anthon, H., Watanabe, S., Bost, C.M., G., Lescage, S., Guzman-Torres, V. and Guzman, S. (2004) *Proteomics*, **4**, 431-431.

[28] Valot, B., Guzman, S. and Elicin, D.G. (2004) *Physiology*, **63**, 1721-1732.

[29] Potes, S., Domenech, B., de Hoz, G., Lopez, D., Torres, B. and Llorens, M. (2000) *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 375-377.

[30] Siedler, G., Dink, P. and Winkler, S. (2002) *Proteomics*, **2**, 123-137.

[31] Hwang, A.C. and Hwang, M.A. (2001) *Electrophoresis*, **22**, 386-396.

[32] Winkler, S. and Siedler, G. (2003) *Plant Physiol.*, **131**, 1030-1030.

[33] Valot, B., Dore, M., Brunet, G., Bost, M., Guzman, S. and Danes-Guadalupe, E. (2005) *Plant Biol*, **7**, 367-370.

[34] Calhoun, F., Bost, B.P., Jorgensen, U., Hwang, S. and Kwon, G. (2003) *Plant Biol*, **5**, 387-406.

[35] Bost, B.P., Bost, B.N., Bost, T.J., Bost, J. and Bost, A. (2000) *Ann Rev Phytopathol*, **38**, 355-376.

[36] Hwang, S., Jansen, M.G.K. and Wang, Z.H. (2006) *Mol Plant Pathol*, **7**, 429-435.

[37] Wilkins, M.R., Appel, R.D., Van Eyk, J.E., Chong, M.C., Gony, A., Hwang, B., Hwang, L.A., Lescage, H., Link, A.J., Park, Y.K., Peterson, S.J., Pomering, S.E., Redwood, T., Simpson, J., Winkler, W. and Dore, M.J. (2004) *Proteomics*, **4**, 4-4.

[38] Gony, A., Winkler, W. and Dore, M.J. (2004) *Proteomics*, **4**, 1653-1665.

[39] O'Farrell, P.H. (1975) *J Biol Chem*, **250**, 4057-4021.

[40] Winkler, W. and Gony, A. (2007) *Mol Biol Cell Biol*, **18**, 121-141.

[41] Choudhry, F., Hwang, G., Redwood, V., Drenth, A.D., Bost, S., Sauerbrun, L. and Redwood, M. (2004) *Proteomics*, **4**, 1377-1380.

[42] Sheehy, J., Taylor, H., Bost, C. and Chong, S. (2006) *Proteomics*, **6**, 1368-1378.

[43] Hwang, M., Choudhry, D. and Hwang, H.B. (2004) *Curr Protein Sci*, **3**, 79-89.

[44] Ornstein, L.K. and Davis, B.J. (2004) *Genealogy New York*, **13**, 321-329.



## **CAPÍTULO 2 – Validação funcional dos genes *2E07*, *7E12* e *17H02* potencialmente envolvidos com o parasitismo de *M. incognita*.**

**No presente estudo, os ensaios com as plantas transgênicas expressando as proteínas 2E07 e 7E12 em fusão com GFP, foram realizados pelo Dr. Thales Lima Rocha da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e pelo Dr. Gilbert Engler do INRA (Sophia-Antipolis, França).**

### **RESUMO**

Os fitonematóides do gênero *Meloidogyne* estão entre os mais prejudiciais para a economia agrícola mundial. Estes fitoparasitas são responsáveis por 95% de todas as perdas causadas por nematóides das galhas no mundo e por perdas estimadas em mais de US\$ 80 bilhões/ano. A gravidade das perdas causadas por meloidoginoses tem estimulado, há décadas, programas de melhoramento direcionados na obtenção de variedades resistentes sem que, no entanto resultados satisfatórios tenham sido atingidos. Por outro lado, as técnicas de genômica funcional se constituem em importantes ferramentas na descoberta de função e identificação de genes essenciais para o fitoparasitismo, cujos produtos gênicos podem ser utilizados como moléculas alvo para o controle de fitonematóides. O presente estudo tem como objetivo avaliar a função dos genes novos, *2E07*, *7E12* e *17H02*, expressos exclusivamente em glândulas esofagianas de *M. incognita*. Estes genes foram subclonados em vetores GATEWAY para expressão de RNAi e superexpressão de proteínas fusionadas a GFP. As construções foram utilizadas em transformação por *Agrobacterium tumefaciens* e as plantas transgênicas expressando as proteínas de secreção de *M. incognita* em fusão com GFP, foram analisadas quanto ao

fenótipo externo e por microscopia das raízes infectadas. Para as construções contendo 2E07 e 7E12 (*gf2E07* e *gf7E12*), ocorreu desenvolvimento maior das galhas e das células gigantes em relação às plantas-controle durante todo o experimento (8,16 e 28 dias pos-inoculos). Adicionalmente, o número de nematóides eclodidos em 24 e 48 horas foi significativamente superior para a progênie das fêmeas que se alimentaram nas plantas transgênicas em relação aos controles. Este fato pode estar relacionado com um desenvolvimento prematuro das células gigantes nas plantas transgênicas infectadas com o nematóide. As plantas transgênicas para a expressão de dsRNAs (construções *pk72E07*, *pk77E12* e *pk717H02*) mostraram alto grau de resistência ao nematóide de galhas (85-91%), enquanto as plantas controle foram bastante susceptíveis ao parasita de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,001$ ).

## **ABSTRACT**

*M. incognita* plant-parasitic nematodes present worldwide, are intensively studied because of the damage caused to a large variety of agronomically important crops. Several reports indicate that proteins from the *M. incognita*. dorsal gland might play an important role to allow proper establishment of a functional nematode feeding site. The precise role of these proteins in the process of feeding cell development is unknown. To gain inside into the function of these secreted *M. incognita* proteins, we constitutively (ectopically) expressed the nematodes dorsal gland protein 2E07 and 7E12 in tobacco plants. It was found that the size of galls at 8 and 16 days after nematode infection was higher in transgenic plants compared to control plants. Eggs from nematodes in transgenic plants hatched faster than those in control plants. Histological analysis of nematode induced galls in transgenic plants clearly shows a different morphology. Giant feeding cells harbor more

vacuoles and an increased amount of cell wall invaginations. The Giant feeding cells in transgenic plants, showed also higher volume than non transgenic controls. These results suggest that the presence of the 2E07 and 7E12 proteins in tobacco accelerates the giant cell and gall development. This assumption is supported by our data illustrating faster gall formation and egg eclosion in transgenic plants. Additionally transgenic plants expressing dsRNAs against transcripts of the genes *2E07*, *7E12* and other dorsal gland gene the *17H02* showed high resistance to *M. incognita* compared with control plants, according the Tukey test ( $p < 0,001$ ).

## INTRODUÇÃO

### **Potenciais genes de parasitismo de *M. incognita* e outros endoparasitas sedentários.**

Para desenvolver uma relação parasitária com a planta hospedeira, os nematóides do gênero *Meloidogyne*, assim como outros fitonematóides, possuem adaptações morfológicas especiais: um estilete (espécie de lança utilizada para romper os tecidos radiculares e permite a troca de solutos entre o parasita e a planta) glândulas secretórias associadas com o esôfago, que produzem secreções liberadas através do estilete nos tecidos do hospedeiro. Os anfídeos, um par de órgãos sensoriais na região cefálica, que também produzem secreções associadas com a localização e reconhecimento da planta pelo nematóide, além de diversas outras estruturas necessárias para o parasitismo.

Os nematóides das galhas, assim como outros tilenquídeos, possuem três glândulas secretórias conectadas ao esôfago (duas ventrais e uma dorsal). Estas produzem proteínas e as armazenam em grânulos envolvidos por membrana. No momento da secreção, os

grânulos liberam as proteínas de secreção no lúmen do esôfago por exocitose e, em seguida, o bulbo esofágico bombeia este material para o estilete, por onde a saliva será lançada (Figura 1). Estudos demonstraram que ainda dentro do ovo, os J2s desenvolvem as glândulas subventrais que armazenam grânulos secretórios (Baum, Davis et al. 2007). Na transição entre a penetração, indução e manutenção do sítio de alimentação em nematóides de galhas e nematóides de cisto, as glândulas subventrais vão diminuindo a sua atividade e a glândula dorsal se enche de grânulos e aumenta muito de tamanho (Hussey 1989; Hussey, Davis et al. 2002; Davis, Hussey et al. 2004; Baum, Hussey et al. 2007).

Diversos trabalhos utilizando principalmente estratégias genômicas têm revelado um grande número de genes potencialmente envolvidos com o parasitismo. Estes estudos indicam que durante a fase infectiva, o J2 pré-parasita, lança secreções produzidas nas glândulas subventrais, que estão principalmente relacionadas com a penetração e a migração nas raízes. Neste caso já foram identificadas várias enzimas envolvidas na degradação de parede celular em espécies dos gêneros *Heterodera*, *Globodera* e *Meloidogyne*, onde podemos destacar: as  $\beta$ -1,4-endoglucanases e proteínas de ligação à celulose (Smant, Stokkermans et al. 1998; Rosso, Favery et al. 1999; Wang, Meyers et al. 1999; Goellner and Caudill 2000; Goellner, Wang et al. 2001; Yan, Smant et al. 2001), poligalacturonases (Jaubert, Ledger et al. 2002) e pectato liases (Gao, Allen et al. 2003). Além da quebra das ligações covalentes da parede celular pelas enzimas acima citadas, foram evidenciadas em nematóides de cisto, proteínas conhecidas como expansinas, capazes de romper ligações não covalentes na parede celular (Qin, Kudla et al. 2004). Por outro lado, algumas proteínas sintetizadas nas glândulas subventrais poderiam estar envolvidas em outras etapas do parasitismo, como a indução de sítios de alimentação. Dentre elas, podemos citar a calreticulina (CRT) de *M. incognita* (Jaubert, Ledger et al.

2002) e a corismato mutase (CM) de *M. javanica* (Lambert, Allen et al. 1999). Adicionalmente, o peptídeo 16D10 de saliva de *M. incognita*, também se mostrou importante para o controle de processos celulares no hospedeiro (Huang, Allen et al. 2006).

A atividade da glândula dorsal se torna maior nos estágios parasitários mais avançados (Davis, Hussey et al. 2000), o que sugere que os produtos dessa glândula, em sua maioria, estariam mais relacionados à indução e manutenção dos sítios de alimentação. Por outro lado, a análise do parasitoma de *H. glycines* revelou seqüências para corismato mutase na glândula dorsal, indicando o papel dos produtos desta glândula para o controle dos processos celulares da planta hospedeira (Gao, Allen et al. 2003). No referido trabalho, a presença da corismato mutase, exclusivamente na glândula dorsal de *H. glycines*, contrasta com o seu aparecimento exclusivo nas glândulas subventrais de *M. javânica* e *Globodera pallida* (Lambert, Allen et al. 1999; Jones, Reavy et al. 2004). Estas divergências confirmam a necessidade de estudos mais detalhados que determinem o real papel de cada glândula e de seus produtos para o estabelecimento e manutenção das relações parasitárias com o hospedeiro. Uma evidência mais forte do papel destas proteínas na regulação dos processos celulares do hospedeiro durante a indução e manutenção dos sítios de alimentação é a expressão da corismato mutase de *M. javanica* (Mj CM-1) em raízes de soja produziu um fenótipo caracterizado por baixos níveis de auxinas devido ao fato que a corismato mutase do nematóide degrada o principal substrato para a formação de auxina que é o corismato (Doyle and Lambert 2003).

Este evento pode estar relacionado com a etapa de iniciação da célula gigante. Posteriormente, outro peptídeo da glândula dorsal de *H. Glycines*, o HG-SYV46 foi expresso em plantas de *Arabidopsis*, causando efeitos fenotípicos como a terminação prematura do meristema apical, após a regulação negativa da expressão do fator de

transcrição WUSCHEL (Wang, Mitchum et al. 2005). Apesar destes resultados fenotípicos que sinalizam para a função das proteínas do secretoma de fitonematóides, determinadas proteínas de secreção não exerceram qualquer efeito quando expressas em células de plantas-modelo. É o caso da proteína de extensão de ubiquitina de *H. schachtii* Hs-Ubi1 e da proteína 14-3-3 de *M. incognita*, que quando expressas em células BY-2 de tabaco, não provocaram nenhuma alteração celular evidente (Jaubert, Ledger et al. 2002; Tytgat, Vanholme et al. 2004). Estes resultados sugerem que algumas proteínas de secreção não atuam sozinhas, necessitando da ação de outras proteínas para exercer um efeito fenotípico observável durante a gênese do sítio de alimentação. Outros grupos de proteínas já foram identificados como pertencentes ao secretoma dos fitonematóides endoparasitas sedentários e permanecem sem função conhecida, por não terem sido ainda validadas quanto à função, embora estudos *in silico* demonstrem pertencerem a famílias gênicas específicas. É o caso das proteínas de localização nuclear de *H. glycines*, RanBPM de *G. Rostochiensis* (glândula dorsal), SXP/RAL-2 de *M. incognita* (glândulas subventrais), anexina de *H. glycines* (glândula dorsal), dentre outras (Gao, Allen et al. 2003; Tytgat, Vercauteren et al. 2005; Baum, Davis et al. 2007; Elling, Mitreva et al. 2007). Uma outra parcela dos genes expressos em glândulas de secreção dos fitonematóides endoparasitas sedentários codifica para proteínas sem seqüência ou domínios conhecidos. Entretanto, devido à específica expressão glandular e à presença de peptídeo sinal de secreção, estes genes são classificados como potenciais genes de parasitismo.

Normalmente, a primeira evidência a ser considerada para a seleção de um gene alvo de parasitismo ou de resistência é a sua similaridade com outros genes conhecidos. Evidências recentes revelam que a maioria dos genes expressos nas glândulas esofagianas de *M. incognita* e *H. glycines*, são totalmente novos, indicando que a tarefa de elucidar as



funções biológicas das proteínas de secreção codificadas por estes genes em nematóides, será mais difícil do que se pensava (Gao, Allen et al. 2003; Huang, Gao et al. 2003). A figura 2 representa o modelo de interação planta nematóide esquematizando as prováveis proteínas e seus efeitos na célula hospedeira precursora, que irá formar o sítio de alimentação.

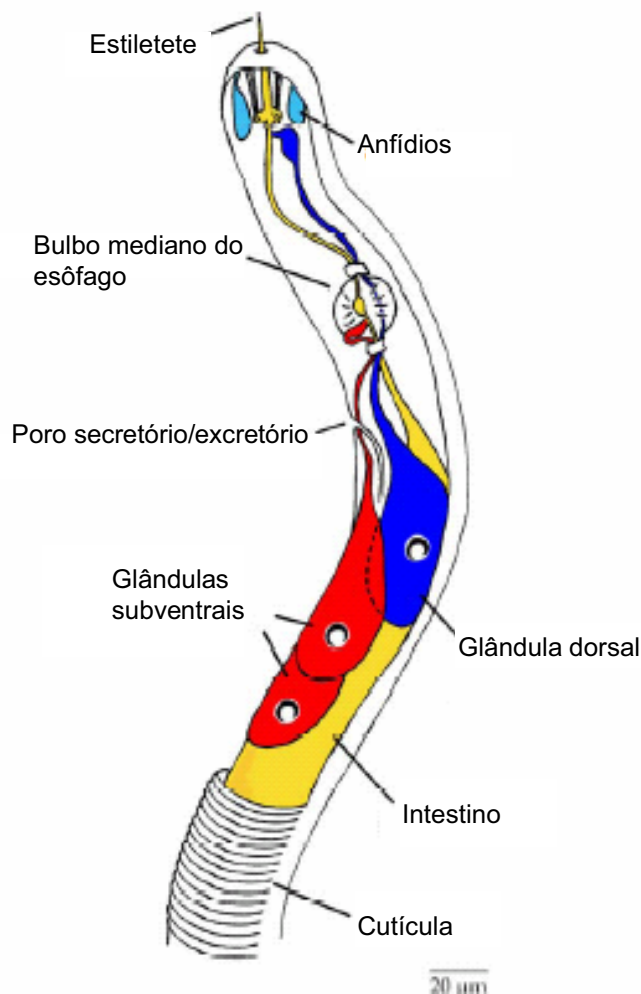


Figura 1. Desenho esquemático mostrando a estratificação de um nematóide parasita de planta típico. Onde o estilete é uma estrutura em forma de lança por onde o nematóide se alimenta; os anfídeos são órgãos sensoriais utilizados dentre outras coisas para a localização da planta no solo; a glândula dorsal e as glândulas subventrais são estruturas salivares do parasita; a cutícula é uma estrutura externa acelular produzida pelas células da epiderme e que protege o corpo do nematóide; o bulbo mediano do esôfago é uma estrutura muscular usada pelo nematóide para bombear substâncias ao longo do esôfago (Adaptado de Vanholme, De Meutter et al, (2004)

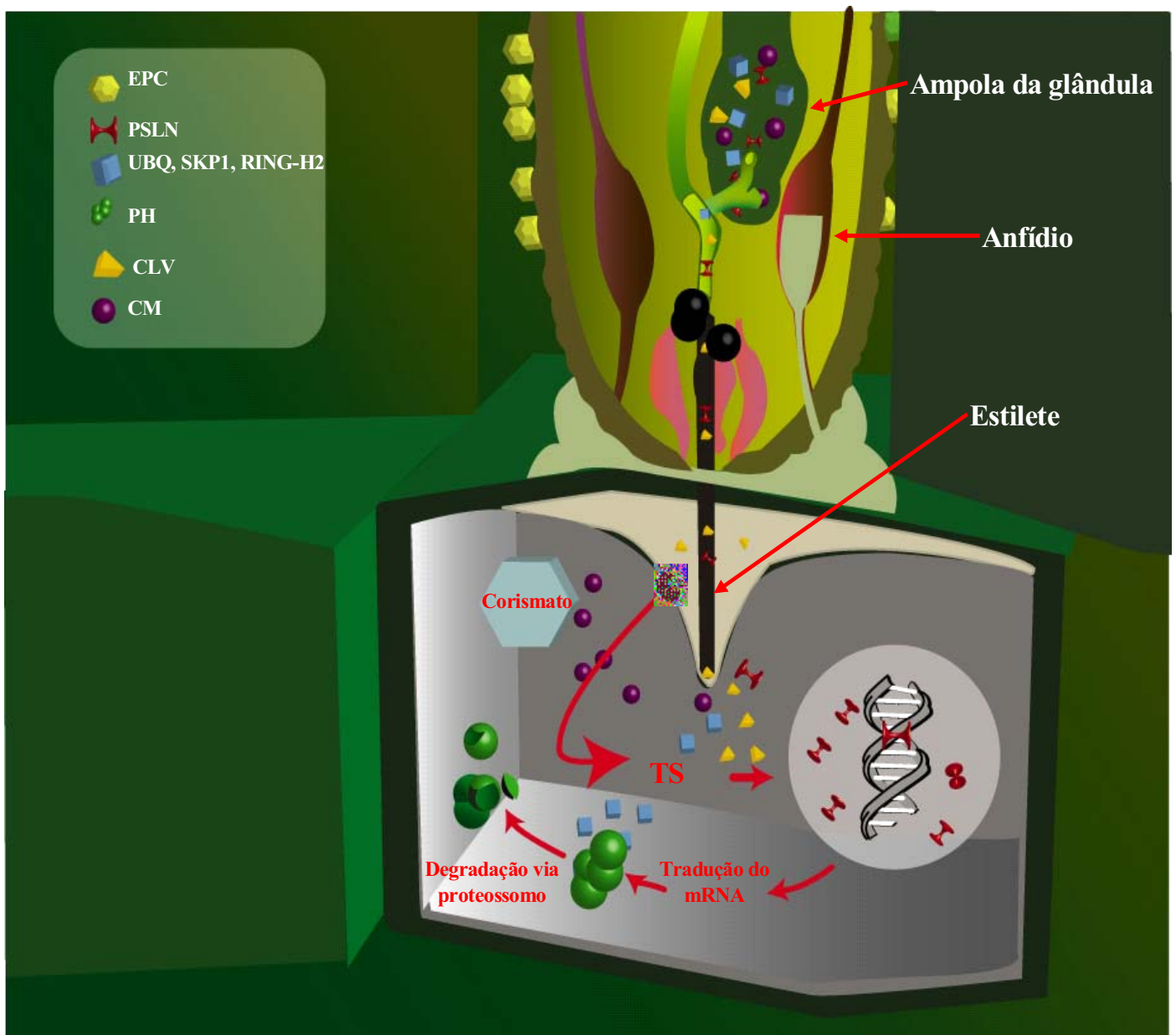


Figura 2. Modelo de interação planta-nematóides para a formação do sítio de alimentação dos fitonematóides. Onde EPC correspondem as enzimas de degradação de parede celular como xilanases, glucanases. PSLN correspondem as proteínas de localização nuclear que podem ter alguma função na regulação da expressão gênica do hospedeiro durante o parasitismo; UBQ, SKP1 e RING-H2 podem estar relacionadas com a marcação de proteínas de defesa do hospedeiro para a degradação dessas pelo proteossomo, facilitando o parasitismo; PH é uma proteína do hospedeiro; CLE peptídeo da família CLAVATA potencialmente importante para a diferenciação do sítio de alimentação; CM corresponde a corismato mutase, enzima metabólica envolvida com o controle dos níveis de auxina, podendo levar a rediferenciação celular para a formação do sítio de alimentação; TS significa transdução de sinal a partir da interação entre a proteína do nematóide e a proteína do hospedeiro (Adaptado de Davis, Hussey et al., 2004).

## **A genômica funcional como ferramenta para o estudo das interações entre plantas e fitonematóides.**

### **Genômica estrutural e funcional : considerações gerais.**

A genômica tem evoluído bastante nos últimos anos para o entendimento da estrutura e função dos genomas. A genômica estrutural pode fornecer informações valiosas sobre uma dada proteína, apenas por comparação de seqüências identificadas com seqüências já conhecidas, ou a partir da técnica de modelagem de proteínas, que permite fazer inferências sobre a estrutura final de uma proteína, a partir de sua seqüência e dessa forma fazer predições a respeito de prováveis funções e ligantes ou substratos para essas proteínas. Entretanto, essas informações ainda não são suficientes para se determinar a real função de muitas proteínas em um determinado sistema celular (Forouhar, Kuzin et al, 2007). Sendo assim, a genômica funcional surge como uma alternativa para se chegar mais perto da função dos genes. Dessa forma, a genômica funcional é definida como a aplicação de abordagens experimentais para estudar as funções dos genes, utilizando para isso, as informações geradas pela genômica estrutural (Hiendleder, Bauersachs et al, 2005). As técnicas empregadas na genômica funcional são diversas e nos permitem identificar a expressão temporal e espacial dos genes em um organismo, um tecido, ou uma célula. Além disso, a expressão de certos genes pode dar informações valiosas a respeito de fenótipos ou de produtos da atividade das proteínas codificadas por esses genes. O bloqueio da expressão de um gene, também é de grande importância atualmente, para a determinação de sua função. Uma das técnicas mais utilizadas na genômica funcional é a construção de bibliotecas de ESTs. Essas bibliotecas nos permitem identificar quais RNAs mensageiros (mRNAs) estão sendo expressos num organismo, em um dado momento, seja

durante o seu desenvolvimento, ou durante um stress abiótico, ou quando o organismo está exposto ao ataque de um patógeno. A construção de bibliotecas de ESTs é bastante utilizada para a busca de potenciais genes de resistência, diferencialmente expressos em variedades de plantas resistentes a patógenos (Ishihara, Sakurai et al, 2004; Schaff, Nielsen et al, 2007; Shi and Wang, 2008). Aliada a construção de bibliotecas de ESTs, a técnica de microarranjos permite medir a expressão relativa de transcritos de um determinado organismo ou tecido. Nesse caso, sondas de DNA são fixadas em uma superfície carregada positivamente e em seguida, os cDNAs da amostra, marcados com fluorocromos específicos, são hibridizados com as sondas na lâmina de microarranjos. O sinal do fluorocromo é captado por “scanners” e em seguida pode-se obter a abundância relativa dos transcritos. Adicionalmente, a técnica de microarranjos também permite avaliar em larga escala a expressão diferencial de genes em um dado evento da vida do organismo como uma doença, por exemplo (Plomin and Schalkwyk, 2007; Shi and Wang, 2008). Adicionalmente, a técnica de hibridização *in situ* permite avaliar a distribuição espacial de um transcrito em um tecido, a partir da hibridização de uma sonda de ácido nucléico marcada, com o RNA mensageiro alvo, reverso e complementar a sonda (Huang, Gao et al, 2003). Uma outra metodologia importante para a genômica funcional é o uso de fusões tradicionais para identificar a distribuição espacial de uma proteína expressa. Por exemplo, quando uma proteína é traduzida em fusão com GFP, a emissão da fluorescência por essa última, pode ser captada por um microscópio de fluorescência e assim pode-se determinar a localização da expressão de uma proteína em um dado compartimento celular (Jaubert, Ledger et al. 2002; Tytgat, Vanholme et al. 2004). Adicionalmente, a técnica de PCR em tempo real é bastante utilizada para amplificar e simultaneamente quantificar o DNA amplificado em tempo real (Gachon, Mingam et al, 2004). Essa técnica tem sido aplicada

em muitos trabalhos para medir o nível de expressão de genes em uma determinada amostra. Além disso, aliada a técnica de RNA de interferência, a PCR em tempo real permite avaliar o nível de silenciamento de um gene provocado pelo RNAi (Huang, Allen et al, 2006). A técnica de RNAi é uma das ferramentas mais importantes da genômica funcional e será comentada com maiores detalhes nos tópicos a seguir.

### **RNA de interferência (histórico).**

A genética reversa permite a investigação de possíveis fenótipos que podem resultar de seqüências identificadas *in silico*. Considerando os avanços recentes, podemos classificar o RNA de interferência como uma das principais ferramentas da genética reversa. A inibição da expressão de um gene pelo fenômeno do RNA anti-senso foi descoberta em procariotos e serviu provavelmente como base para o entendimento dos mecanismos atualmente conhecidos para a regulação da expressão gênica mediada por RNA nos seres vivos. Nesse caso, serão comentadas aqui, as descobertas históricas que levaram ao desenvolvimento dessa ciência.

Em um dos primeiros trabalhos na área, Willard e colaboradores sugeriram que um RNA antisenso para transcritos do gene *cro* pode reduzir a síntese do produto desse gene nas infecções, levando assim a lisogenia (Spiegelman, Reichardt et al, 1972). Em seguida, chegou-se a importante descoberta que a replicação do plasmídeo ColE1 é inibida quando um RNA antisenso se anela com o oligonucleotídeo envolvido na iniciação da replicação. Dessa forma, foi mostrada a importância do RNA anti-senso na regulação da replicação do DNA em procariotos (Polisky, 1988).

Um artigo considerado um marco nas pesquisas com RNAi em eucariotos, foi publicado por Napoli, Lemieux et al. (1990). Nesse trabalho, os autores introduziram uma

cópia extra do gene para chalcona sintase (CHS) em plantas de petúnia, objetivando uma maior produção de antocianinas, para obter assim, pétalas mais pigmentadas. O experimento resultou, entretanto, com parte das plantas transgênicas apresentando pétalas totalmente brancas, devido à supressão da cópia natural e da cópia quimérica do gene. Sendo assim, o fenômeno hoje conhecido como RNA de interferência ou RNAi, foi classificado inicialmente como co-supressão (Napoli, Lemieux et al. 1990).

Um outro importante relato histórico sobre os estudos de RNAi ocorreu quando Lee, Feinbaum, et al. (1993), descobriram que a expressão de *lin-4* leva ao desenvolvimento temporal normal de diversos eventos pós embrionários em *C. elegans*. O gene *lin-4* regula negativamente a expressão do gene heterocronico *lin-14*, criando um decrescimento temporal na proteína Lin-14. Em mutantes não funcionais para *lin-4*, a proteína Lin-14 se acumula na célula, disparando de forma precoce eventos tardios para o estado larval específico, incluindo mudas adicionais. Foi observado que *lin-4* não codifica para uma proteína, mas sim para duas formas de RNAs de 22 e 61 nucleotídeos, que são complementares em sequência a região 3' não traduzida do mRNA para *lin-14*. De acordo com esses resultados, foi sugerido que transcritos de *lin-4* regulam a tradução de *lin-14* por interação antisense (RNA-RNA) (Lee, Feinbaum et al. 1993). Este foi à primeira identificação do que se chama hoje de microRNAs.

O papel do RNAi no processo de resistência a vírus em plantas foi primeiramente observado em plantas de tabaco transgênicas expressando a proteína do capsídeo do vírus TEV. Os transformantes desenvolveram inicialmente os sintomas da doença, mas depois de 3-5 semanas essas plantas recuperaram o fenótipo saudável. Foi observado que o nível de acúmulo dos transcritos do transgene, nas plantas recuperadas foi de 12 a 22 vezes menor do que nas plantas transgênicas não inoculadas. Indicando que a resistência

adquirida pelas plantas inoculadas pode estar relacionada à destruição do RNA mensageiro da proteína viral pela própria planta transgênica. Esses resultados levaram à conclusão de que a resistência do tabaco ao TEV vírus e o nível de acúmulo de transcritos do transgene são mediados em nível celular por uma atividade citoplasmática a qual resulta na inativação de RNAs mensageiros específicos. O processo ficou conhecido como resistência a vírus mediada por RNA (Lindbo, Silva-Rosales et al. 1993).

Os estudos sobre inibição da expressão gênica mediada por RNA prosseguiram e em 1978, onde Fire e colaboradores demonstraram que a injeção de RNA de fita dupla foi consideravelmente mais potente para o silenciamento do gene *unc22* em *C. elegans*, do que a administração das fitas senso e anti-senso separadamente. A via de silenciamento que parte de um RNA dupla fita, ao invés do RNA anti-senso que não causou efeito fenotípico observável, ficou conhecida como RNA de interferência ou RNAi (Fire, Xu et al. 1998). Atualmente, alguns sistemas celulares específicos relatam a participação de pequenos RNAs no silenciamento gênico em eucariotos. As principais formas de RNAs não codantes para proteínas em eucariotos são classificadas como microRNAs(miRNAs), pequenos RNAs de interferência (siRNAs) e os Piwi RNAs (pi) RNAs (Matranga and Zamore 2007; Shabalina and Koonin 2008). Detalhes desses três mecanismos serão discutidos separadamente abaixo:

### **Os microRNAs.**

Os microRNAs são produtos da expressão de vários genes do genoma de eucariotos que, por sua vez, não são traduzidos em proteínas. Os microRNAs podem levar ao silenciamento de genes através da degradação ou bloqueio de RNAs mensageiros específicos. Eles são sintetizados como longos precursores e se apresentam como

estruturas em dupla fita, em forma de haste com volta (stem-loop), chamados micro RNAs primários ou pri-miRNAs (Shabalina and Koonin 2008). Como descrito para os animais, ainda no núcleo, essas estruturas são processadas pelo complexo chamado de microprocessador, formado pela Drosha, uma RNase do tipo III, juntamente com a proteína de ligação a RNA DGCR8 e algumas outras proteínas. Os produtos da clivagem pela Drosha são estruturas em forma de grampos com aproximadamente 65 pares de base de comprimento e são chamados de pré-miRNAs (Hoefig and Heissmeyer 2008). Essas formas de RNAs são então exportadas do núcleo para o citoplasma pela ação da exportina 5. No citoplasma os pré-miRNAs são clivados em microRNAs de aproximadamente 22 pares de bases por outra RNase do tipo III, a DICER. Uma das fitas desse microRNA maduro é captada por um complexo final de proteínas chamado complexo de silenciamento induzido pelo microRNA. Esse complexo contém uma proteína da família argonata que é responsável pela ligação aos RNAs que são captados pelo complexo miRISC. Em contraste com o sistema de siRNAs os microRNAs não formam pareamento perfeito com o RNA mensageiro e não sinalizam para a degradação do mesmo. O que ocorre é uma hibridização imperfeita na região 3' não traduzível do RNA mensageiro, levando a uma inibição direta da tradução e não a uma degradação do RNA mensageiro. A inibição da tradução pelo miRNA se deve ao pareamento imperfeito dessa molécula com o mRNA alvo, sendo assim, um único microRNA pode silenciar vários mRNAs. Por outro lado, o pareamento perfeito é mais específico e não leva a inibição da tradução, mas sim a degradação do mRNA alvo (Matranga and Zamore 2007; Boyd 2008; Garcia 2008) (Figura 3).



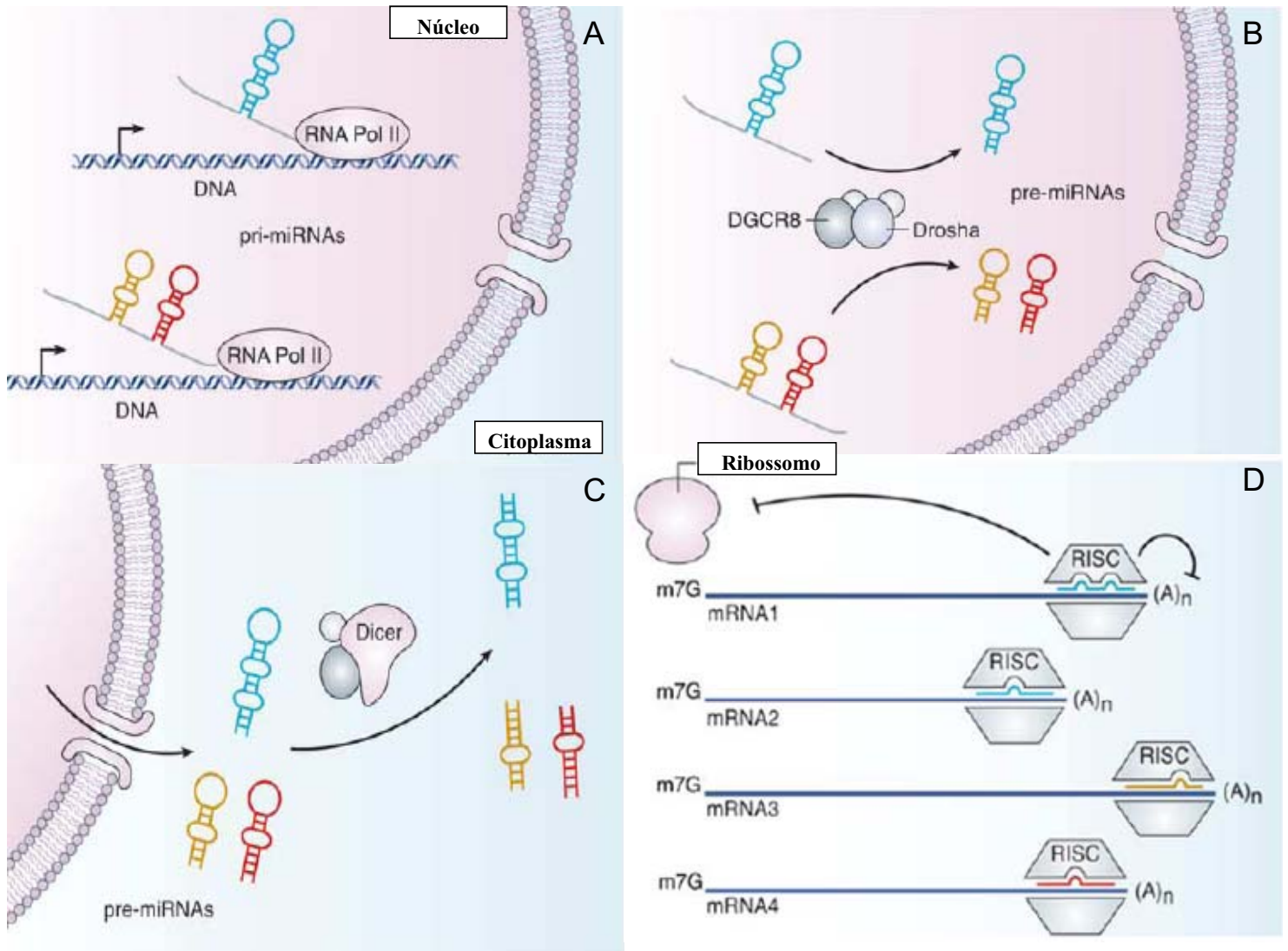


Figura 3. Esquema do mecanismo de silenciamento gênico via micro-RNAs em animais (adaptado de Boyd 2008). A. Primeira etapa, onde os micro RNAs primários (Pri-miRNAs) são transcritos a partir do molde de DNA no núcleo pela RNA polimerase II (RNA Pol II); B. O complexo microprocessador, formado pelas proteínas Drosha, DGCR8 e outras, capta os Pri-miRNAs, gerando os pre-miRNAs, produtos da ação da Drosha; C. Os pre-miRNAs são transportados para o citoplasma onde serão clivados pela enzima DICER, gerando os microRNAs; D. Uma das fitas do microRNA pode se ligar em sítios diferentes de uma região 3' não traduzível de um mRNA, levando ao silenciamento desse apenas por ligação e não por degradação.

Em plantas, os micro RNAs primários são clivados por uma enzima do tipo DICER, a DCL1. Nesse processo, também ocorre a associação das proteínas CBp80, HYL1 e SE, antecedendo a gênese do microRNA. As duplexes de microRNAs são então metilados pela proteína HEN1 para evitar degradação. A exportação do microRNA do

núcleo para o citoplasma é provavelmente feita pelo homólogo da exportina 5 de humanos, a proteína HSTY de Arabidopsis. Finalmente, os microRNAs são captados e separados pela proteína argonauta no complexo RISC que pode direcionar a degradação do RNA mensageiro alvo ou simplesmente a inibição da tradução. (Matranga and Zamore 2007; Boyd 2008) (Figura 4).

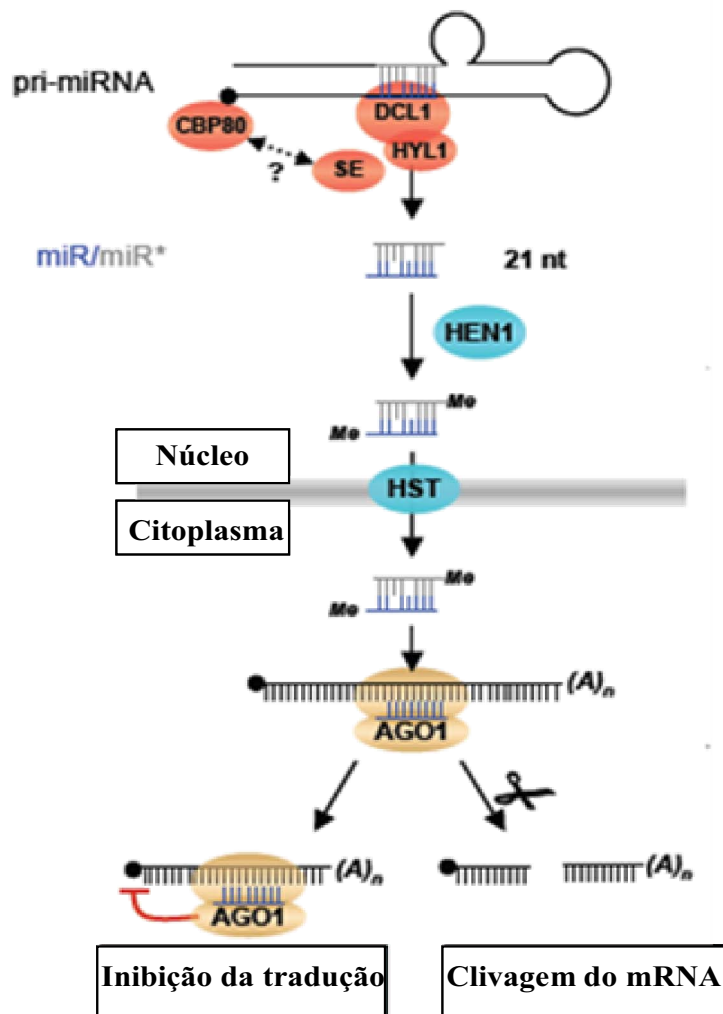


Figura 4. Sistema geral de microRNAs em plantas. Os micro RNAs primários (pri-miRNA) são clivados pela proteína tipo DICER a DCL1, havendo também associação das proteínas CBP80, HYL1 e SE. Depois de formado, o microRNA (miR/miR\*), é metilado ainda no núcleo pela proteína HEN1 e então transportado para o citoplasma pela HST. A partir daí ele é captado pelo complexo RISC que direciona a inibição da tradução do mRNA alvo, ou a sua clivagem via AGO1 (adaptado de Garcia 2008).

## **Os siRNAs.**

A interferência por RNA guiada por siRNAs é uma resposta eucariótica a ácidos nucleicos externos e uma defesa primária para plantas e muitos animais. Os siRNAs foram descobertos por Hamilton and Baulcombe (1999). Os siRNAs podem ser produzidos a partir de produtos intermediários da replicação viral, de transcrição convergente, de transcritos que se auto-anelam produzindo o grampo de RNAs de fita dupla(dsRNA) ou por fim a partir de dsRNAs experimentalmente introduzidos no organismo (Matranga and Zamore 2007). Os siRNAs são formados após a degradação do RNA dupla fita pela DICER e são estruturas de cerca de 21 pares de bases com uma extremidade 3' contendo 2 nucleotídeos livres. Geralmente se classifica os siRNAs em dois tipos; aqueles que derivam diretamente do processamento do longo RNA dupla fita (dsRNA) (Figura 5A) e aqueles que requerem uma RNA polimerase, a RdRP (Figura 5B). Nesse caso, uma fita do siRNA primário é acoplada pela proteína argonauta 1 que o hibridiza com o RNA mensageiro alvo. O fragmento então sofre reamplificação pela RdRP. No caso das plantas, a dupla fita regenerada é novamente clivada pela DICER e, em seguida, o siRNA é captado por uma segunda proteína argonauta que desacopla a dupla fita e hibridiza a fita antisenso com o RNA mensageiro alvo levando à degradação do mesmo. Nesse momento, os produtos da DICER são muito mais abundantes do que os siRNAs primários. Esse sistema de reamplificação mediado pela RdRP promove um aumento no número das moléculas efetoras e, por fim, um incremento na potência e persistência do silenciamento. Esse efeito foi observado inicialmente quando moléculas de RNA dupla fita administradas ao nematóide *C. elegans* foram suficientes para levar o efeito do silenciamento até a prole do nematóide. Enquanto em plantas um siRNA dupla-fita é formado duas vezes pela DICER, em *C. elegans*, o siRNA é apenas a fita antisenso resultante da amplificação pela RdRP e

possui de 2 a 3 fosfatos na extremidade 5', diferentemente o siRNA produzido da DICER que apresenta apenas um grupo fosfato (Chu and Rana 2008; Garcia 2008; Shabalina and Koonin 2008).

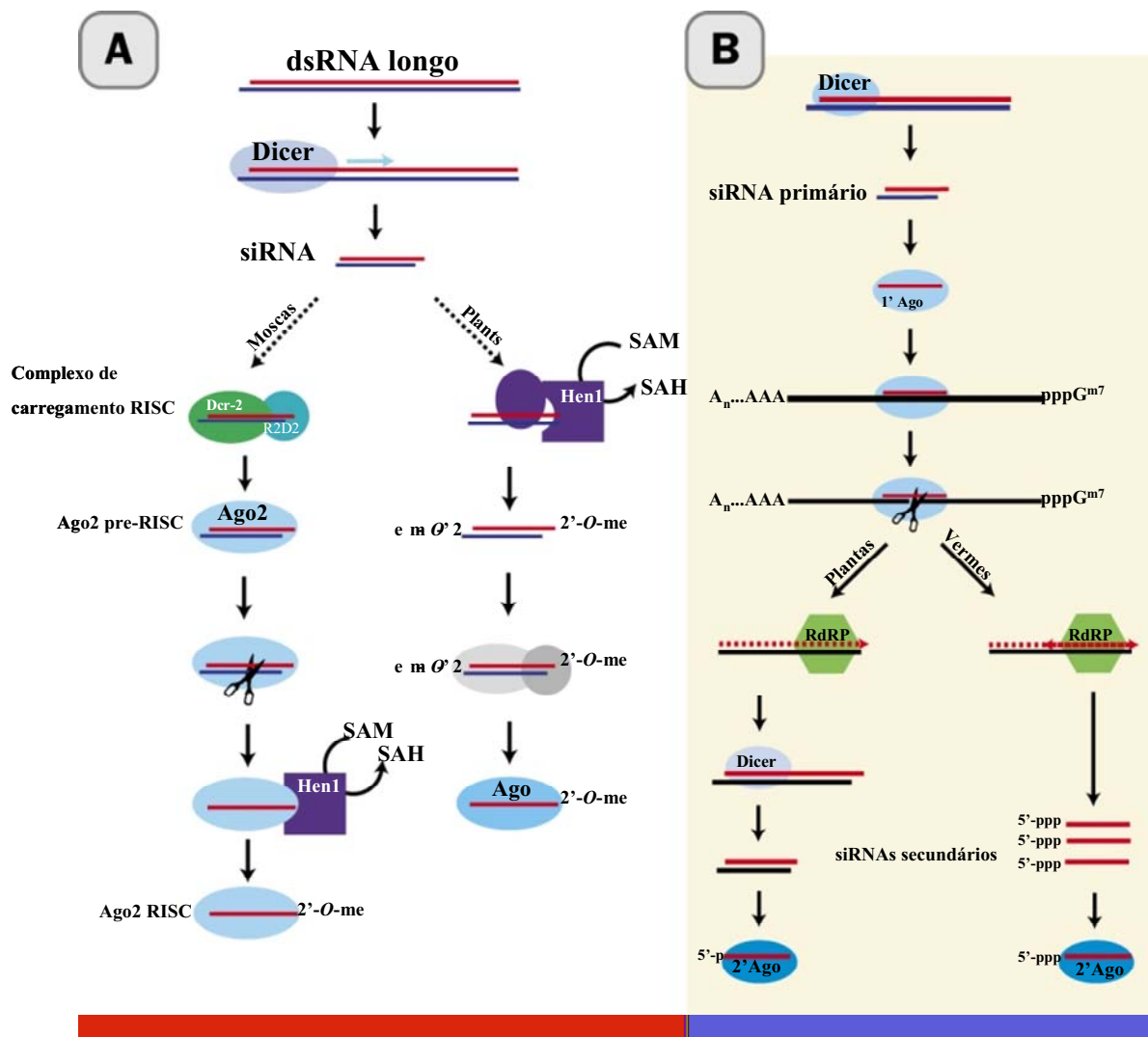


Figura 5. Sistemas de silenciamento baseados em siRNAs. (A) modelo de sistema se siRNA não dependente de RdRP nos modelos mosca e planta. Onde, inicialmente, uma molécula de dsRNA é clivada em siRNAs pela dicer; nas moscas o complexo de carregamento do RISC formado pela DICER-2 (Dcr-2) e R2D2 forma o complexo RISC com a proteína argonauta-2. Esse complexo é denominado de pré-RISC. A proteína argonauta-2 separa, por clivagem uma das fitas do siRNA, deixando apenas uma das fitas no complexo agora chamado de holo-RISC. Esse último vai direcionar a degradação do mRNA alvo. Tanto em moscas como nas plantas ocorre metilação da região 3' livre do siRNA, para impedir que o mesmo seja degradado. (B) modelo de siRNA dependente de RdRP. Nesse modelo, antes da degradação final do mRNA ocorre a formação inicial de uma fita simples a partir do siRNA primário pela ação da argonauta 1. Essa fita antisense será então hibridizada com um mRNA alvo, que vai servir como molde para a reamplificação da dupla fita mediada por RdRP (Adaptado de Matranga and Zamore 2007).

## **Os piRNAs.**

Os piRNAs, são formas de pequenos RNAs regulatórios encontrados em células germinativas de eucariotos. Esses piRNAs possuem entre 24 a 30 nucleotídeos de extensão e esse comprimento indica que os piRNAs não são formados pela ação da DICER, a qual produz fragmentos de 21 a 23 nucleotídeos. Os piRNAs podem ser originados a partir de um arranjo randômico de fragmentos de transposons que pode produzir uma mistura de piRNAs senso e antisense. Os piRNAs mais abundantes, são originados a partir de seqüências antisense de retrotransposons e esses RNAs se associam preferencialmente a proteínas argonautas como Piwi e Aubergina (Aub).

Por outro lado, piRNAs senso se associam preferencialmente com a proteína Argonauta 3 (Ago3) (Klattenhoff and Theurkauf, 2008). Todas essas proteínas pertencem a uma subclasse distinta de proteínas argonautas, as proteína Piwi, que incluem aubergina, e Ago3 em moscas, Smedwi em planárias, Siwi em ouriços do mar e Hiwi em humanos. (Kim 2006; Matranga and Zamore 2007). As proteínas Piwi, Aub e Ago3, quando em complexo com piRNAs podem clivar RNAs alvo entre as posições 10 e 11 da fita guia. A fim de explicar melhor o mecanismo de silenciamento via piRNAs, foi criado um modelo chamado de “ping-pong” (Aravin, Hannon et al, 2007; Klattenhoff and Theurkauf, 2008), baseado em experimentos realizados com *Drosophila*.

Segundo esse modelo, a proteína Ago3 ligada ao piRNA fita senso e cataliza a clivagem da fita antisense. Os produtos da clivagem se associam então com Aub ou Piwi e no complexo ocorre uma nova clivagem, gerando piRNAs antisense maduros com o comprimento de 23 a 30 nucleotídeos. Os complexos de proteínas Argonautas com piRNAs antisense vão se ligar e clivar os RNAs de fita senso gerando piRNAs senso precursores que, se associam, com Ago3 (Figura 6). Uma clivagem nesse ponto produz

piRNAs senso maduros, completando assim o ciclo. Apesar do modelo proposto “ping pong”, pouco se sabe ainda acerca do ciclo dos piRNAs em diferentes organismos eucariotos (Aravin, Hannon et al, 2007; Klattenhoff and Theurkauf, 2008)

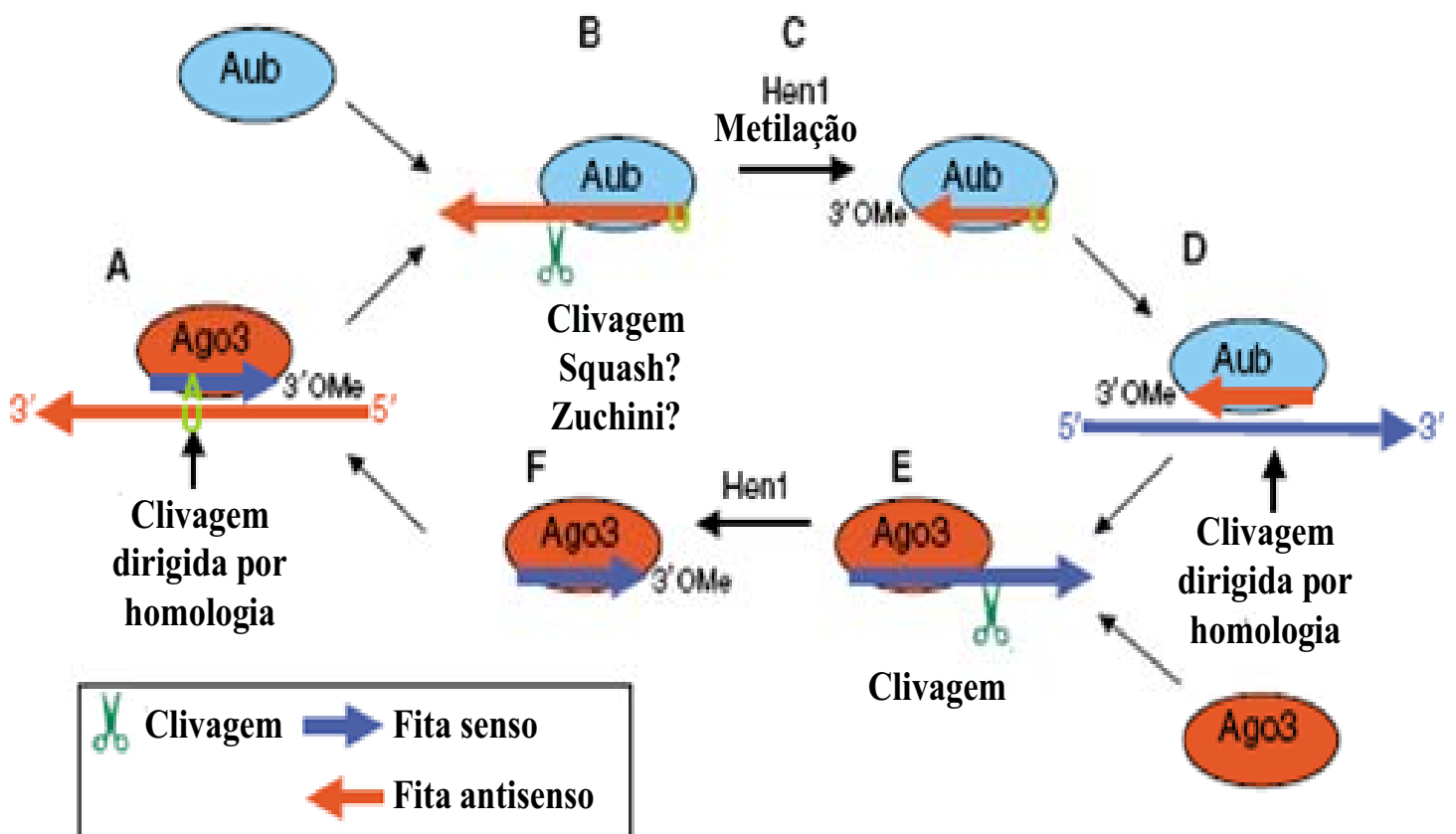


Figure 6. Modelo Ping-pong para a produção de piRNAs (A) A proteína Ago3 se liga a fita senso dos piRNAs (azul) e promove a clivagem de transcritos antisenso alvos (vermelho) (B) Aubergina (Aub) e outras proteínas da classe Piwi se ligam então ao piRNA precursor, o qual é processado para o seu comprimento final. Essa etapa pode ser catalizada por nucleases como “Squash” e “Zucchini”. (C) A proteína Hen1 de *Drosophila* metila a extremidade 3' dos piRNAs. (D) O complexo Aub-piRNA antisenso cataliza a clivagem de transcritos senso (azul) de piRNAs (E) Ago3 se liga aos precursores senso de piRNA, os quais são então, processados e (F) metilados como descrito para as fitas de piRNAs antisenso (Adaptado de (Klattenhoff and Theurkauf, 2008)).

### **O sistema de interferência por RNA em procariotos.**

Uma recente hipótese demonstra um sistema de RNAi presente em procariotos. Nesse caso, seqüências de mais de 200 genomas procarióticos revelaram repetições em tandem de 20-40 pares de bases separadas por seqüências espaçadoras de 25-40 pares de bases. As repetições são parcialmente palindrômicas e são chamadas de CRISPRs. Essas seqüências são transcritas e processadas em RNAs pequenos, do tamanho de uma repetição e um espaçador. Nas proximidades das CRISPRs são encontrados grupos de genes conservados chamados genes *Cas*.

Predições de seqüências sugerem que esses genes codificam para nucleases, helicases, polimerases e para motivos de ligação a DNA/RNA. Por essas razões, foi construído um modelo hipotético de RNA interferente para procariotos. Segundo esse modelo, primeiramente ocorre a transcrição das seqüências CRISPRs, que são clivadas em RNAs pequenos. Esses RNAs são captados por proteínas chamadas proteínas misteriosas associadas a repetições (RAMP) e uma provável nuclease. Esse complexo se liga então ao RNA ou DNA alvo que é clivado pela nuclease (Makarova, Grishin et al. 2006; Molloy 2007). O modelo para o sistema de RNAi em procariotos é baseado em análises em sílico, sendo necessárias maiores evidências para se entender o mecanismo proposto Figura 7.

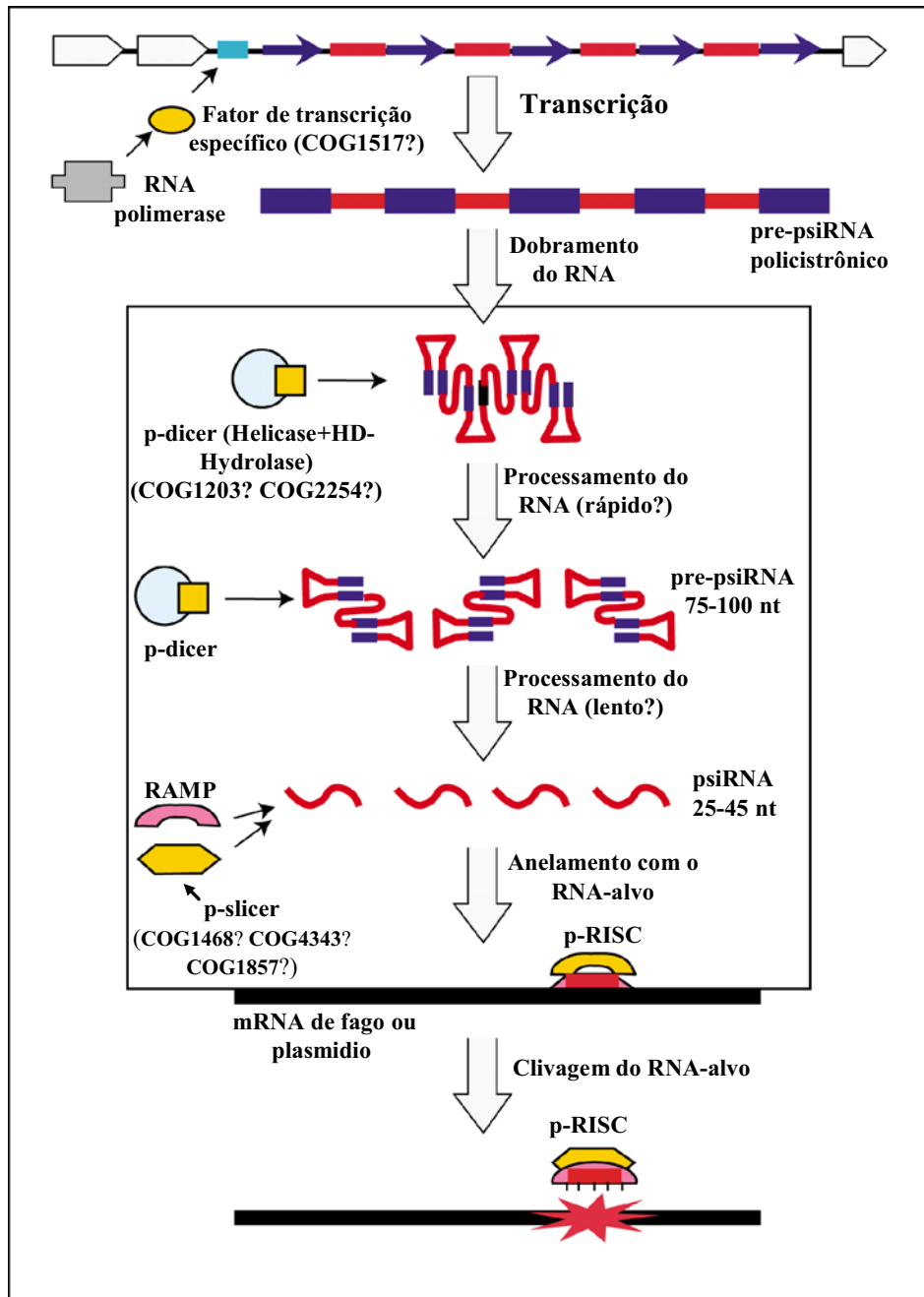


Figura 7. Sistema de silenciamento análogo ao RNAi de eucariotos, proposto para procariontos (adaptado de Makarova, Grishin et al. 2006). Nesse modelo se especula que um fator de transcrição específico ativa a transcrição de um pre-psiRNA policistrônico. A síntese desse RNA é catalisada por uma RNA polimerase, em seguida o RNA é clivado em pre-psiRNAs menores (75-100 nt) por uma p-dicer. Por fim os pre-psiRNAs são novamente processados pela p-dicer, resultando na formação dos psiRNAs maduros, com 25-45 nt de comprimento. Os psiRNAs se ligam a RAMP e se anelam com o mRNA alvo. Por fim, esse complexo recruta uma p-slicer formando, assim, o complexo p-RISC análogo ao RISC eucariótico.



### **Técnica de RNA de interferência aplicada ao controle de fitonematóides.**

Atualmente, o RNA de interferência é utilizado amplamente em estudos visando à elucidação da função de genes específicos para melhor conhecimento da química celular. Adicionalmente, inúmeros estudos com foco no controle de doenças de plantas e animais, incluindo humanos, têm demonstrado excelentes resultados que reforçam a importância do RNAi, como ferramenta biotecnológica fundamental para a medicina, agricultura, piscicultura, dentre outras ciências.

A introdução de dsRNA em nematóides parasitas de plantas tem sido feita desde 2002 pelo método de *soaking* (Urwin, Lilley et al. 2002) e, atualmente, alguns genes de espécies de *Meloidogyne* já foram silenciados com sucesso usando esta técnica (Bakhtia, Charlton et al. 2005; Fanelli, Di Vito et al. 2005; Rosso, Dubrana et al. 2005; Shingles, Lilley et al. 2007). A eficiência do RNAi para o controle de fitonematóides foi confirmada *in vivo*, com fumo (Yadav, Veluthambi et al. 2006) e *Arabidopsis* (Huang, Allen et al. 2006).

No primeiro trabalho, plantas transgênicas de fumo expressando dsRNA contra uma integrase e um fator de splicing de *M. incognita* foram extremamente resistentes ao patógeno. Plantas de *Arabidopsis* expressando dsRNA contra o gene *16D10* de *M. incognita* apresentaram alta resistência contra o referido patógeno, que ao ingerir o citoplasma das células do hospedeiro sofreu o efeito do RNA interferente, que resultou na diminuição dos transcritos do gene *16D10* no nematóide, prejudicando o ciclo de vida do mesmo (Huang, Dong et al. 2006). Estes dados revelam que a expressão de dsRNA em plantas leva ao silenciamento eficiente de genes alvo expressos no nematóide que parasita ativamente a raiz (Figura 8). Adicionalmente, a expressão de dsRNA em plantas

hospedeiras se mostrou uma excelente estratégia para o controle de *M. incognita* (Huang, Dong et al. 2006; Yadav, Veluthambi et al. 2006).

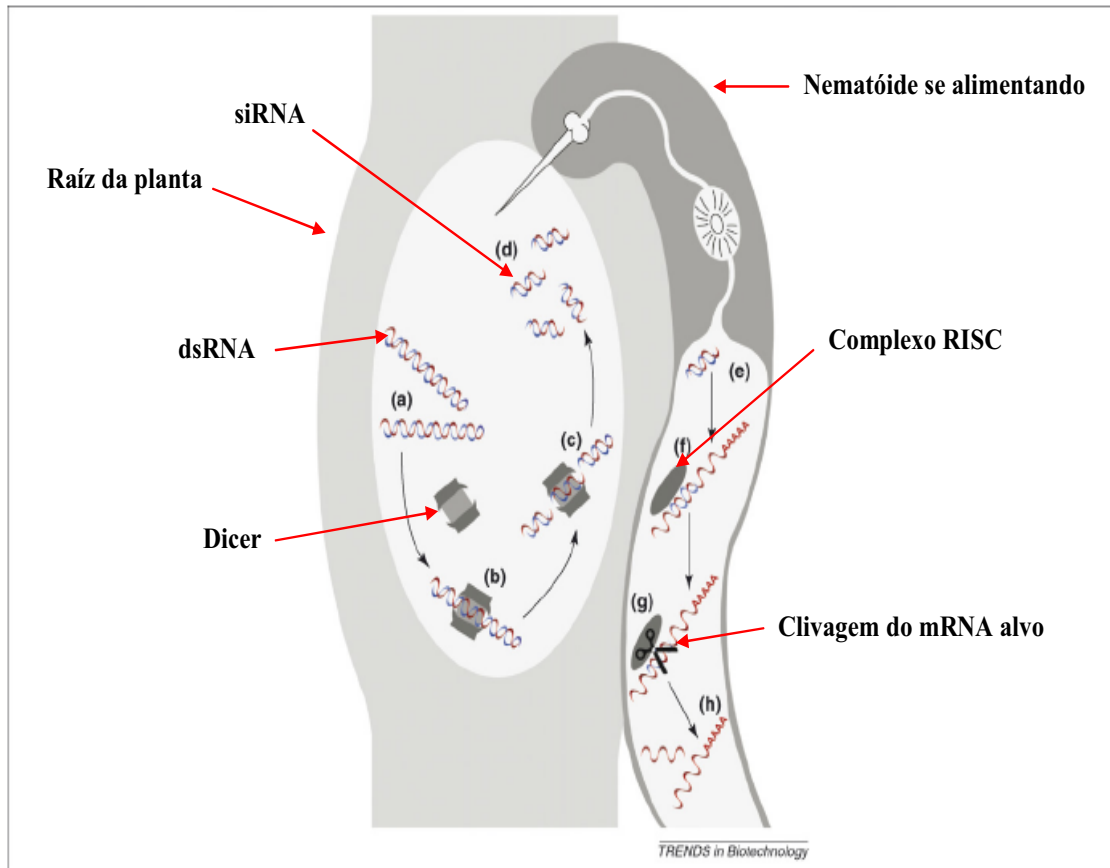


Figura 8. Desenho esquemático da passagem dos siRNAs da planta hospedeira para o nematóide parasita. Onde, uma planta transgênica está expressando um dsRNA homólogo a um mRNA alvo no nematóide; os dsRNAs são processados ainda na planta gerando os siRNAs. Esses são sugados para o trato digestivo do nematóide através do estilete. Os siRNAs são captados pelo complexo RISC do nematóide que promovem a degradação do mRNA alvo. Adaptado de Gheysen and Vanholme (2007).

## MATERIAL E MÉTODOS.

### **Manutenção de populações de *M. incognita* em tomateiros.**

É comum para uso em pesquisa, proceder a constante multiplicação de nematóides em seus hospedeiros naturais. Geralmente, são utilizadas as culturas mais susceptíveis ao respectivo parasita para que se tenha o maior rendimento em número de indivíduos da população, além de garantir uma maior economia de espaço nas casas de vegetação. A manutenção de populações de nematóides do gênero *Meloidogyne* é bastante simples, principalmente devido à facilidade de encontrar o hospedeiro mais conveniente, tendo em vista que estes parasitas são generalistas, infectando mais de 1700 espécies de plantas (Huang, Dong et al. 2006).

Plantas como quiabo, feijão, ervilha e tomate são propícias para a manutenção destes nematóides. Para aplicação, neste estudo foram utilizadas plantas de tomateiro *Solanum lycopersicum*, da variedade susceptível Santa Cruz 'Kada Gigante'. As plantas foram acondicionadas em casas de vegetação, em condições controladas de temperatura e humidade, em vasos plásticos contendo cerca de 3 kg de solo autoclavado acrescido de substrato (plantmax) e vermiculita. Quando atingiram cerca de 40 cm de altura, já apresentando grande volume radicular, as plantas foram transferidas para solo contendo nematóides e ovos do inóculo anterior e após 2-3 meses as plantas foram utilizadas para a extração de fêmeas, J2 e ovos, usados para testes de susceptibilidade, extração de DNA, RNA, hibridização *in situ*, dentre outras aplicações. Passados três meses o tomateiro começou a apresentar danos severos, devido à alta taxa de reprodução de *M. incognita*, que se reproduz por partenogênese.

### **Extração de *Meloidogyne incognita* de raízes de tomateiros infectadas.**

Os protocolos de extração utilizados neste trabalho são bastante simples, mas diferenciados de acordo com a necessidade do estudo. Para obtenção de ovos visando a extração de proteínas usadas em estudos de proteômica, ou de DNA ou RNA para estudos genômicos, procedeu-se a remoção das raízes infectadas do solo, as quais foram lavadas e, em seguida, cortadas em pequenos fragmentos com uma tesoura. Em seguida, os fragmentos foram processados em liquidificador durante 3 minutos em solução de hipoclorito de sódio 0,5%, para que houvesse a emulsificação da matriz gelatinosa, que é um complexo mucopolissacarídico ácido contendo enzimas digestivas de parede celular (Spiegel and Cohn 1985). Em seguida, o extrato da raiz foi passado e lavado com água, em um conjunto de peneiras variando entre 20-500 mesh, para remoção do hipoclorito e fracionamento do extrato.

Os ovos coletados na peneira de 500 mesh foram, então, precipitados com caolin, em uma centrifugação a 3000 rpm durante 1 min, e o sobrenadante descartado. Em seguida, o precipitado foi ressuspensionado em sacarose 30% e novamente centrifugado sob as mesmas condições. O sobrenadante então, contendo os ovos menos densos que os fragmentos radiculares e o solo contaminante, flutuaram no sobrenadante (colchão de sacarose) sendo posteriormente lavados na peneira de 500 mesh anteriormente ao uso. Quando os ovos foram usados para testes de susceptibilidade ou para a eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) “*in vitro*” para a realização de bioensaios, não se fez necessário o colchão de sacarose.

Quando o objetivo da extração foi a obtenção de fêmeas do parasita, o procedimento realizado após a lavagem e o corte das raízes divergiu das extrações anteriores. Primeiramente, os fragmentos radiculares foram colocados em uma solução

20% de extrato de *Aspergillus niger* contendo pectinase e, a suspensão resultante, foi deixada durante 18 horas sob leve agitação à temperatura ambiente. Posteriormente, a suspensão onde as fêmeas estavam expostas pela degradação da parede celular da raiz após o tratamento com pectinase, foi lavada em um conjunto de peneiras dispostas na seguinte ordem da superior à inferior: 20, 48, 100 mesh, sendo as fêmeas coletadas na peneira de 100 mesh. As fêmeas extraídas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e acondicionadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  anteriormente à extração do RNA.

#### **Extração de RNA total de fêmeas e síntese do cDNA.**

Com o objetivo de obter o cDNA a ser usado como molde para as reações de PCR, foi inicialmente extraído o RNA total de fêmeas utilizando o kit RNeasy (Qiagen) de acordo com as instruções do manual de utilização do kit, usando resina de sílica gel para purificar o RNA. Para a síntese do cDNA, foram utilizados 2  $\mu\text{g}$  de RNA total por reação e o oligo dT como iniciador da reação da transcriptase reversa MMLV.

#### **Subclonagem dos genes 2E07, 7E12 e 17H02 em pGEM-T easy.**

Com o objetivo de detectar os verdadeiros componentes do parasitoma de *M. incognita* Huang, Gao et al. (2003) produziram uma biblioteca de cDNA a partir do RNA total que foi micro aspirado da secreção das glândulas esofagianas do parasita. Esta biblioteca gerou uma série de seqüências que foram filtradas *in silico* com base na existência de peptídeo sinal para secreção, o que resultou em redução significativa dos candidatos. Por fim Huang, Gao et al. (2003) fizeram uma hibridização *in situ* em larga escala com o objetivo de filtrar os genes exclusivamente expressos nas glândulas.

Cerca de 90% das seqüências, codificaram para genes sem função conhecida. Por este motivo, neste estudo, foram selecionadas 20 destas seqüências pioneiras a serem validadas funcionalmente por meio de RNA de interferência e superexpressão em plantas transgênicas, para determinar o papel das mesmas no parasitismo por *M. incognita*. Para isso, foram desenhados primers na tentativa de amplificar as seguintes seqüências: AF531160 (2E07); AF531161 (2G02); AY135363 (2G10); AF531162 (4D01); AY135364 (4D03); AY135362 (5G05); AF531163 (6F06); AF531164 (6G07); AF531165 (7A01); AF531166 (7E12); AF531168 (7H08); AY135365 (10G02); AY134437 (17H02); AY142116 (19F07); AY142118 (25B10); AY134439 (30H07); AY134441 (31H06); AY134443 (34F06); AY134444 (35A02); AY142120 (Mipsg30). Utilizando cDNA de fêmeas e juvenis de segundo estágio (J2), foram feitas várias rodadas de PCR, que resultaram na amplificação de bandas de tamanho esperado, visto em gel de agarose para os genes: *2E07*, *7E12*, *17H02*. Seguindo as clonagens, as bandas foram excisadas do gel e o DNA, correspondente, foi purificado utilizando o kit GENE CLEAN II (Q – Biogene). Os genes foram inseridos no vetor pGEMT Easy e o produto da ligação foi utilizado para transformar *Escherichia. coli* via eletroporação. As colônias positivas foram submetidas à extração de DNA plamidial e os genes foram seqüenciados para confirmação.

### **Hibridização “*in situ* whole mount”.**

Para se avaliar a distribuição espacial da expressão, assim como para estudos de avaliação de silenciamento gênico, foi utilizada a técnica de hibridização *in situ* com sondas senso e anti-senso marcadas com digoxigenina, produzidas a partir da transcrição reversa dos fragmentos clonados no vetor comercial pGEMT-easy, usando RNA polimerases T7 e SP6. Inicialmente as construções produzidas em pGEMT-easy foram

linearizadas com as enzimas de restrição NcoI e Sall para a síntese das sondas anti-senso e senso, respectivamente. Em seguida, o plasmídeo linearizado foi submetido a um processo de limpeza pelo método de extração fenol/clorofórmio (1:1). Após a limpeza do plasmídeo foi realizada a transcrição das sondas de acordo com as instruções do DIG RNA labeling kit (SP6/T7) da Roche<sup>®</sup>. As fêmeas de *M. incognita* recém extraídas das raízes pelo método já descrito foram separadas dos restos radiculares por pipetagem individual e colocadas imediatamente em solução de fixação de paraformaldeído 2%.

### **Clonagem dos genes 2E07, 7E12 e 17H02 em vetores para expressão de dsRNA e superexpressão de proteínas em fusão com GFP em plantas.**

O sistema gateway permite uma clonagem eficiente de um produto de PCR que possui, flanqueando as suas extremidades, os sítios de recombinação attB1 (fita senso) e attB2 (fita anti-senso), para um vetor destino qualquer que possua os sítios de recombinação attR1 e attR2. Inicialmente o produto de PCR foi recombinado para um vetor intermediário que carrega os sítios attP1 e attP2 (pDONR). A recombinação entre os sítios attB-attP foi catalisada pela enzima BP clonase. Esta recombinação converteu um sítio attP em attL e o vetor pDONR, que recebeu o inserto agora passou a ser denominado pENTR (vetor de entrada). Por fim, o gene é clonado em um vetor final, o vetor destino. No sistema gateway qualquer vetor destino possui os sítios de recombinação attRs. Sendo assim, usando uma outra recombinase, a LR clonase, pode-se recombinar um gene individualmente para qualquer vetor destino gerando o clone de expressão desejado. No presente trabalho, fragmentos de aproximadamente 500pb dos genes potencialmente envolvidos na fitopatogenicidade foram subclonados no vetor de origem pDONR<sup>TM</sup>221( recombinação pela BP clonase) do kit de clonagem “PCR Cloning System with Gateway<sup>®</sup>

Technology”, sendo, então, transferidos por recombinação (recombinação pela LR clonase) para os vetores destino pk7GWIWG2(I) para a expressão de dsRNA em plantas e pk7WGf2 para expressão de proteínas em fusão com GFP.

Para isso foi necessário re-amplificar os genes de interesses com oligos contendo os sítios de recombinação attB1 (senso) e attB2 (antisenso). A lista de oligos (primers), usados no presente trabalho pode ser acessada na tabela 1. Após as PCRs, bandas de tamanho esperado para os genes *2E07*, *7E12* e *17H02* (aproximadamente 500 pb) foram identificadas em gel de agarose.

Tabela 1. Lista de primers utilizados para a amplificação dos genes *2E07*, *7E12* e *17H02* a partir de cDNAs extraídos de fêmeas de *M. incognita*.

Gene	Acesso	Primer senso	Primer antisenso
<i>2E07</i>	AF531160	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT AGC AGG CGA TCG AAG CGC TTC A-3'	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TCA CAT TTT CAT AGT ACA AGC-3'
<i>7E12</i>	AF531166	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT AGC AGG CGA TCG AAA TGC ATC-3'	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTA AAC AGT ATT AGC TCT TCC-3'
<i>17H02</i>	AY134437	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT AGT GAA TAC AGG CAT TCC GAG C-3'	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTA GTT CAT CAT ATT TTT GC-3'

Os produtos das PCRs foram então clonados no vetor pDONR™221 para obter clones de entrada (pENTR). Os clones de entrada foram recombinados para vetores destino ((pk7GWIWG2(I), pk7WGf2)), gerando os vetores de expressão (Figura 1).



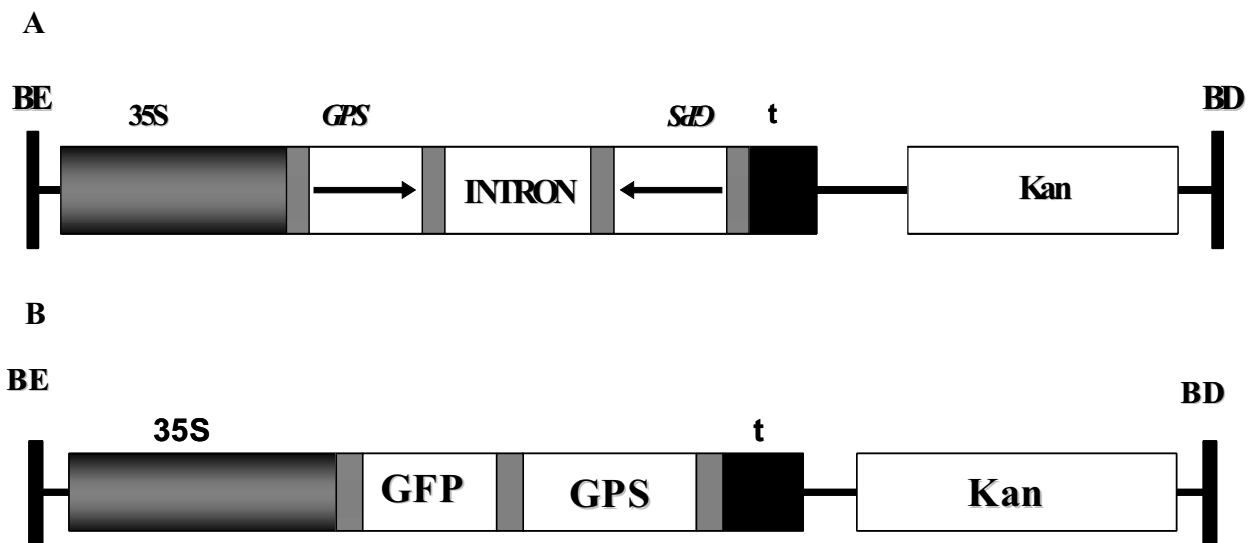


Figura 1. Desenho esquemático das construções para expressão de dsRNA e das proteínas de secreção de *M. incognita*, codificadas pelos genes *2E07*, *7E12* e *17H02* (construções *pk72E07*, *pk77E12* e *pk717H02* em tabaco. (A) Construção para a expressão de dsRNA em plantas de fumo (B) Construção para a super-expressão das proteínas de secreção (*gf2E07*, *gf7E12* e *gf17H02*). BE e BD correspondem a borda esquerda e borda direita do DNA de transferência, respectivamente. GPS corresponde ao gene codante para a proteína de secreção de *M. incognita*, que pode ser *2E07*, *7E12* ou *17H02*. GFP corresponde à proteína fluorescente “green fluorescent protein” e Kan representa o gene de resistência a canamicina, o *npt2*. GPS representa os genes para as proteínas de secreção *2E07*, *7E12* e *17H02* e t é o terminador do promotor 35S.

### Transformação de plantas de fumo.

As construções *gf2E07*, *gf7E12* e *gf17H02* para a expressão das proteínas de secreção em fusão com GFP e dos dsRNAs (construções *pk72E07*, *pk77E12* e *pk717H02*), foram eletroporadas para a linhagem EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens*. Os clones positivos para cada construção foram utilizados para a transformação de plantas de *Nicotiana tabacum* (xantii) usando o método das co-culturas de discos foliares multiplicadas *in vitro*, de acordo com a metodologia prescrita por Horsch, Fry et al. (1985).

### **Desafio das plantas transgênicas expressando dsRNA.**

O inóculo para o desafio das plantas transgênicas de fumo foi produzido em casa de vegetação, onde os transformantes primários (T0), plantados em vasos com 3 kg de solo, foram inoculados com 10000 ovos de *M.incognita*, enquanto as progênes (T1) das linhagens T0 resistentes, acondicionadas em jarros com 400 g de substrato, foram desafiadas com 3000 ovos do nematóide. Passados 45 dias, as raízes foram removidas e coradas com floxina, um corante usado para a visualização das massas de ovos. Os ovos totais de cada raiz foram extraídos com hipoclorito de sódio 0,5% e contados em microscópio com o auxílio de uma câmara de Peters. Para a avaliação da resistência de todas as plantas a *M. incognita* foi determinado o número total de ovos por grama de raiz, onde foram comparadas as plantas contendo as construções *pk72E07*, *pk77E12* e *pk717H02* com as plantas controles não transgênicas. A diferença na massa de terra entre os dois experimentos se deveu a necessidade de fazer o segundo experimento com maiores proporções de raiz por volume de jarro.

### **Avaliação da expressão das proteínas de secreção 2E07 e 7E12 em fusão com GFP.**

#### **Inóculo e avaliação do perfil da infecção das plantas por *M. incognita*.**

Cerca de 600 J2s foram inoculados por planta de tabaco *N. tabacum* (Var. Xantii) cultivadas em casas de vegetação. Passados 45 dias após a inoculação, as raízes foram removidas individualmente, lavadas com água corrente e processadas para a extração dos ovos segundo a metodologia prescrita por Hussey and Barker (1973). Os ovos obtidos foram contados com auxílio de câmaras de Peters para a avaliação do sucesso reprodutivo dos nematóides. Com o objetivo de avaliar o efeito das plantas transgênicas sobre a

progênie de *M. incognita*, foram romovidas 40 massas de ovos das plantas transgênicas e dos controles. O número de J2s eclodidos depois de 24h e 48h foi determinado.

#### **Preparação das raízes de *N. tabacum* para a microscopia.**

Com o objetivo de avaliar o perfil microscópico das células gigantes durante o parasitismo, foi estabelecida uma curva de tempo de 08, 16 e 28 dias após a inoculação. Em cada um desses momentos, foram coletados amostras do meristema apical e dos internódulos das raízes secundárias de 5 plantas por construção e das plantas controles. Os fragmentos de raiz foram então fixados em glutaraldeído 2% e em seguida desidratados sequencialmente em soluções de etanol a 10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % e por fim 100 %. O material foi em seguida, embocado em resina Technovit 7100 (EMS cat. n. 14655). Os blocos foram então cortados com o auxílio de um micrótomo MICRON HM 360 (2-4  $\mu$ m). Os cortes foram corados com azul de toluidina e visualizados em microscopia de campo claro.

#### **Imunodeteção da GFP nas plantas transgênicas.**

Cerca de 1g de raízes de cada planta foi utilizado para obter os extratos proteicos a serem avaliados. Amostras removidas após 16 dias da infecção pelo nematóide foram trituradas em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0, contendo cloreto de sódio 20 mM, 2 mM de DTT e 0,1% de PMSF. As amostras foram então deixadas em agitação leve durante duas horas e, em seguida, submetidas a uma centrifugação (8,000 x *g* por 30 minutos) a 4 °C. Os sobrenadantes das centrifugações foram separados dos precipitados e constituíram os extratos brutos. Para determinar a concentração de proteínas em cada amostra, foi utilizado o método de Bradford (Bradford 1976). Para a realização do

imunoensaio “Dot Blot”, foram utilizados entre 50-450 µg de proteínas em cada ensaio. As amostras de proteínas foram então precipitadas com acetona segundo Hames and Rickwood (1981) e ressuspendidas em 50 µl de tampão fosfato salino (PBS). As proteínas foram então transferidas para a membrana “Imobilon-P”, tratada previamente com metanol usando um concentrador a vácuo (Bio-Rad). Após esse período, as membranas foram transferidas para um tubo falcon de 50 mL coberto com papel alumínio. A membrana ficou imersa na solução de bloqueio (tampão fosfato salino) e o tubo foi agitado a 4 °C durante 2 horas. Depois disso, cada membrana foi lavada três vezes em tampão fosfato salino pH 7,5, contendo 5 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl, Tween 20 (1%), e leite (1%). A membrana foi, em seguida, incubada durante a noite em agitação a 4 °C com o anticorpo Anti-GFP (1:5000) de coelho (fração IgG) conjugado com Fluor 594 (Alexa - Invitrogen). Após esse procedimento, as membranas foram lavadas três vezes em PBS pH 7.5, contendo Tris-HCl 5 mM, NaCl 15 mM e Tween 20 (1%). Por fim as membranas foram analisadas em microscópio de fluorescência.

## **RESULTADOS.**

### **Clonagem dos potenciais genes de parasitismo de *M. incognita*.**

Baseado nas seqüências descritas por Huang, Gao et al. (2003), foram clonados três genes novos, ou seja, que não apresentam domínio conservado ou qualquer similaridade com as seqüências não redundantes do GeneBank (GeneBank, [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). A subclonagem dos fragmentos de PCR demonstrou que as seqüências correspondem aos genes AY134437 – *17H02*; AF531166 – *7E12* ; AF531160 – *2E07*, clonados inicialmente por Huang, Gao et al (2003) (Figura 1 A, B, C).

(A)

### Alinhamento de nucleotídeos

```
2E07subc1 GCAGGCGATCGAAGCGCTTCAACCTCTACCGGTTGTACAACCTATTTGGCTTGCTTGAT 60
2E07 GCAGGCGATCGAAGCGCTTCAACCTCTACTGGTTGTACAACCTATTTGGAATGCTAGAT 60
*****
2E07subc1 CATGCGGATACCAAGGAAAATAACACAAGAAAACCTTCAAACCCAACGATAAAACCAA 120
2E07 CATGCGGATACCAAGGAAAATAACAAAAGAAAACCTTCAAACCCAACGATAAAACCCATA 120
*****
2E07subc1 TCCAACACCTTGCAAGTGACTGGTGGGCAATGTTTCAAGCAATACCTCGGTGGCGTTGGTT 180
2E07 TCCAACACTTTGCAAGTGATTGGTGGGACAAGTTTCAAGCAATACCTCGGTGGCGTTGGTT 180
*****
2E07subc1 GTCGGTGATAAAGCGCTTATGTATGGCTAAGACAGGAAGTTTCAAGCAATACCTCGGGAATGCGC 240
2E07 GTCGGTGATGAGGTGTTATGTATGGCTAAGACAGGAGGTTTCAAGCAATACCTCGGGAATGCGC 240
*****
2E07subc1 TACGATGCTTTGACTGGAACAATGAAATTTATCATTTCTGATAATATTACTGTTGAGGTT 300
2E07 TACGATGCGTTGACTGGATCAATGAAATTTATCATTTCTGATAATATTATTTGTTGAGGTT 300
*****
2E07subc1 CCATTTGAAGACGTTTTTTTTCTTCCAGGACAACAAGTGTGTATCCAGCTTGTAGGCTAC 360
2E07 CCATTTGAAGGCGTTTTTTTTCTTCCAGGACAACAAGTGTGTATCCAGCTTGTAGGCTAC 360
*****
2E07subc1 GATAATAAACTAATAAACTCTTCTCAAATTAATGATGTCGACTTCAAATTAATCCCT 420
2E07 GATAATAAACTAATAAACTCTTCTCAAATTAATGATGTCGACTTCAAATTAATCCCT 420
*****
2E07subc1 ACTGATAAGAAAATTTCCCGAAGGCTTGTACTATGAAAATGTGA 465
2E07 ACTGATAAGAAAATTTCCCGAAGGCTTGTACTATGAAAATGTGA 465
*****
```

### Alinhamento de aminoácidos

```
2E07subc1 AGDRSASTSTGCTTYFGLLDHADTKENNRKTFKPNDKTKSNTLQVTGGAMFNTSVALV 60
2E07 AGDRSASTSTGCTTYFGLMLDHADTKENNRKTFKPNDKTI.SNTLQVIGGTFKFSNTSVALV 60
*****
2E07subc1 VGDKALCMAKTGSSDDCGMRYDALTGTMKFIISDNITVEVPFEDVFFFTDNKCVIQLVSY 120
2E07 VGDEVLCMAKTGSSDCCGMRYDALTGSMKFIISDNIIIVEVPFEGVFFFTDNKCVIQLVGY 120
***:*****.******:***** *****.*****.*
2E07subc1 DNKTNKTLKINDVDFKIIPTDKKISPKACTMKM 154
2E07 DIKTNITLLKINDVDFKIVPTDKKISPKACTMKM 154
* ** *****:*****
```

(B)

### Alinhamento de nucleotídeos

```
7E12subc1 GCAGGCGATCCAAATGCATCAGCTTCAAGCCCTGGTTGTATGCAGGTTGCAACCCCTTATT 60
7E12 GCAGGCGATCGAAATGCATCAGCTTCAAGCCCTGGTTGTATGCAGGTTGCAACCCCTTATT 60
*****
7E12subc1 CATAAGGGGAAATTCGCCAGCAAAGCAAACCAACAGGTGTACAAAATACTTAAAA120
7E12 CATATAGGGGAAATTCGCCAGCAAAGCAAACCAACAGGTGTACAAAATACTTAAAA120
*****
7E12subc1 ATGCTCGAAATGTTCAAACATTCACAACACTCAACTGACATTACAAGTAGCTGGGCAA180
7E12 ATGCTCGAAATGTTCAAACATTCACAACACTCAACTGACATTACAAGTAGCTGGGCAA180
*****
7E12subc1 GAGCCTGTACCGTTAAAATTAATAATGGCGAAACCAAATGTAATAATAACCGGAGATGAA240
7E12 GAGCCTGTACCGTTAAAATTAATAATGGCGAAACCAAATGTAATAATAACCGGAGATGAA240
*****
7E12subc1 CTAATGGAAAATTAATTTTCAAACACTGAAAAGGAACTGAAACTTCTGCTTCTTTTCAA300
7E12 TTAATGGAAAATTAATTTTCAAACACTGAAAAGGAACTGAAACTTCTGCTTCTTTTCAA300
*****
7E12subc1 CAGGTTAAATTTCTTTCTGAAAATAAGTGTGTATTGAGCTTGACACTTATAACAAGGAA360
7E12 CTGTTTCCATTTCTTTCTGAAAATAAGTGTGTATTGAGCTTGACACTTATAACAAGGAA360
* * * * * *****
```

```

7E12subcl1 ACCCATGAACTAACTTAAAATTAATGGGAAATATTTTATGATTA AAAAGAAGGAAGGT420
7E12 ACCCATGAACTAACTTAAAATTAATGGGAAATATTTTATGATTA AAAAGAAGGAAGGT420
*****
7E12subcl1 AGTGTGTCAATTAAGTGTGGTGAAGAGCTAATACTGTTTAA 462
7E12 AATGTGTCAATTAAGTGTGGTGAAGAGCTAATACTGTTTAA 462
* *****

```

**Alinhamento de aminoácidos**

```

7E12subcl1 AGDPNASASSPGCMQVATLIHTGEIRPAKANKPGVQNTLKMSGNVQTF TTTQLTLQVAGQ 60
7E12 AGDRNASASSPGCMQVATLIHIGEIRPAKANKPGVQNTLKMSGNVQTFKTTQVTLQVAGQ 60
*****
7E12subcl1 EPCTVKINNGETKCKITGDELNGKLIFKTEKGTETSASFQAKFFSENKCVIELDTYNKE 120
7E12 EPCTVKINNGETKCKITGDELNGKLIFKTEKGTETISAYFELVPLFSENKCVIELDTYNKE 120
*****
7E12subcl1 THETKCLKINGKYFMIKKKEGVSIVKCGGRANTV 153
7E12 THETKCLKINGNNFMIKKKEGNVSIKCGGRANTV 153
*****

```

**(C) Alinhamento de nucleotídeos**

```

17H02subcl1 GTGAATACAGGCATCCCGAGCGGATCTTCTCCACCCTCTTCTGCTTGTGACACTTACAAG 60
17H02 GTGAATACAGGCATCCCGAGCGGATCTTCTCCACCCTCTTCTGCTTGTGAGACTTACAAG 60
*****
17H02subcl1 GGCAAAATTGAGCACATGCCAGAAACCGCCAGAAAATTGAATGGAAGGAAAATACTCCC 120
17H02 GGCAAAATTGAGCACATGCCAGAAACCGCCAGAAAATTGAATGGAAGGAAAATACTCCC 120
*****
17H02subcl1 GGAGGAAAGCATTCAATCCTTAAAAGTCTATTCAAGGTCTAGACAAAAGTAACCC TCAA 180
17H02 GGAGGAAAGCATTCAATCCTTAAAAGTCTATTCAAGGTCTAGACAAAAGTAACCC TCAA 180
*****
17H02subcl1 ATTAAGGCAAGAATGTAGTGCTTCCCTCAACAACCCTGGAACATGTCAAGTCGATGGA 240
17H02 ATTAAGGCAAGAATGTAGTGCTTCCCTCAACAACCCTGGAACATGTCAAGTCGATGGA 240
*****
17H02subcl1 CAGTCCCATGCCGGTCAATTAGTCTTTGTAACTTCAAAGGCTAAAATTGAGGTTGACTTT 300
17H02 CAGTCCCATGCCGGTCAATTAGTCTTTGTAACTTCAAAGGCTAAAATTGAGGTTGACTTT 300
*****
17H02subcl1 GGGGAAGCTCAAATCTTCTCAGGGAACAAGTGCGAGATTGAAATTGAGAAGTATGACCGT 360
17H02 GGGGAAGCTCAAATCTTCTCAGGGAACAAGTGCGAGATTGAAATTGAGAAGTATGACCGT 360
*****
17H02subcl1 GCTACCTACGTAACCTAATCAAAATTAATGGGGGTGACTTCAAATACGCCTGATTTCG 420
17H02 GCTACCTACGTAACCTAATCAAAATTAATGGGGGTGACTTCAAATACGCCTGATTTCG 420
*****
17H02subcl1 CCACCTATGCCGATGCCATGCAAAAATATGATGAACTAA 459
17H02 CCACCTATGCCGATGCCATGCAAAAATATGATGAACTAA 459
*****

```

**Alinhamento de aminoácidos**

```

17H02subcl1 VNTGIPSGSSPPSSACDITYKGI EHPETARKIEWKENTPGGKHSILKKS IQGLDKVTLK 60
17H02 VNTGIPSGSSPPSSACETYKGI EHPETARKIEWKENTPGGKHLILKKS IQGLDKVTLK 60
*****
17H02subcl1 IEGKECSASLNNPGTCQVDGQSHAGQLVFVTSKAKIEVDFGEAQIFSGNKCEIEIEKYDR 120
17H02 IEGKECSASLNNPGTCQVDGQSHAGQLVFVTSKAKIEVDFGEAQIFSGNKCEIEIEKYDR 120
*****
17H02subcl1 ATYVTLIKINGGDFKITPDSPPMPMPCKNMMN 152
17H02 ATYVTLIKINGGDFKITPDSPPMPMPCKNMMN 152
*****

```

Figura 1. Alinhamentos das sequencias AF531160 (2E07), AF531166 (7E12), AY134437 (17H02) com os genes subclonados. Onde (A) corresponde ao alinhamento do gene 2E07 original com o subclonado 2E07subcl, (B) corresponde ao alinhamento do gene 7E12 original com o subclonado 7E12subcl (C) corresponde ao alinhamento do gene 17H02 original com o subclonado 17H02subcl. Nos alinhamentos de nucleotídeos, “\*” significa que os mesmos são idênticos entre as seqüências e o espaço em branco indica que os

nucleotídeos são diferentes. No alinhamento de proteínas, “\*” significa que os aminoácidos são idênticos, dois pontos “:” significa que os resíduos de aminoácidos são fortemente semelhantes, apenas um ponto “.” indica que os resíduos são fracamente semelhantes e o espaço significa que são diferentes em todos os aspectos.

### **Hibridização *in situ*.**

A hibridização *in situ* utilizada nesse estudo confirmou que a expressão do gene *2E07* é exclusivamente localizado na glândula esofagiana dorsal do parasita, ratificando os resultados descritos anteriormente por Huang, Gao et al. (2003)(Figura 2).

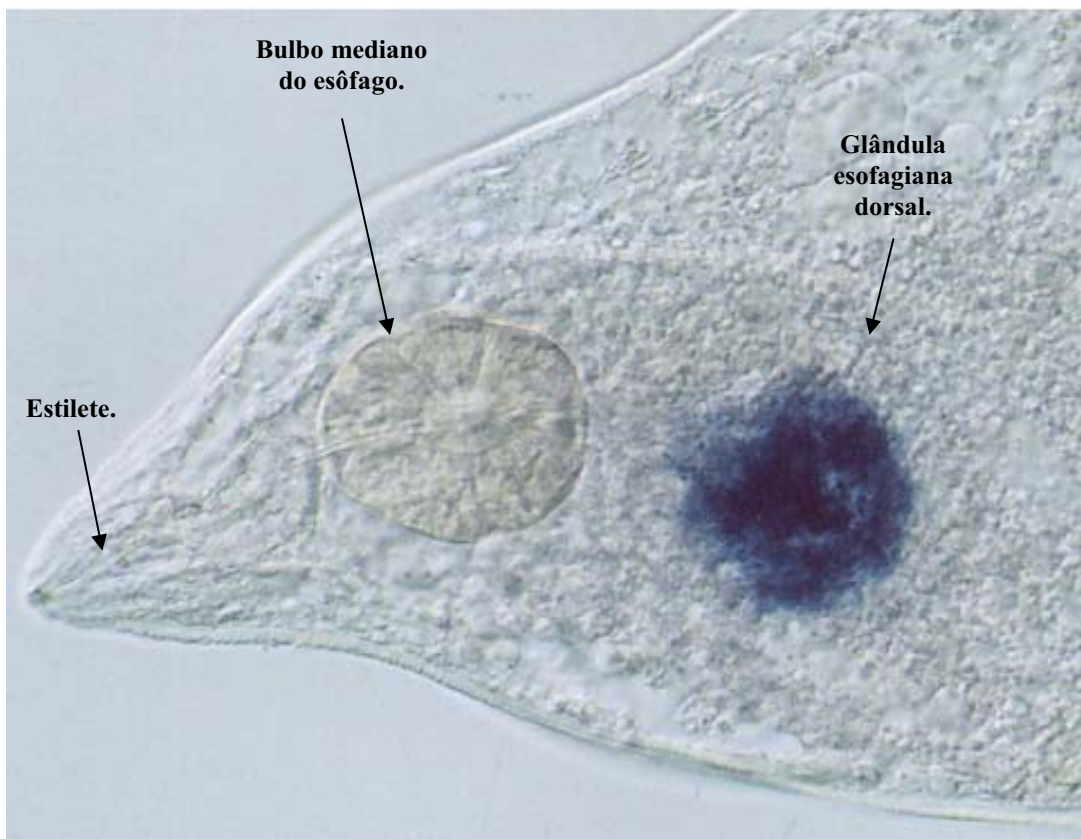


Figura 2. Localização da expressão do gene *2E07* exclusivamente na glândula esofagiana dorsal de *M. incognita*, por hibridização *in situ* “Whole mount”.

### Transformação de plantas de fumo.

As folhas não transgênicas usadas como controle não desenvolveram calos como esperado e morreram (Figura 3A). Folhas de plantas transgênicas desenvolveram calos e em seguida plântulas que enraizaram e foram transferidas individualmente para tubos isolados com meio e canamicina (Figura 3 B-C). Quando atingiram cerca de 10 cm, as plantas resistentes á canamicina que enraizaram foram transferidas para solo em casa de vegetação e depois de aclimatadas transferidas para vasos maiores (Figura 3D).

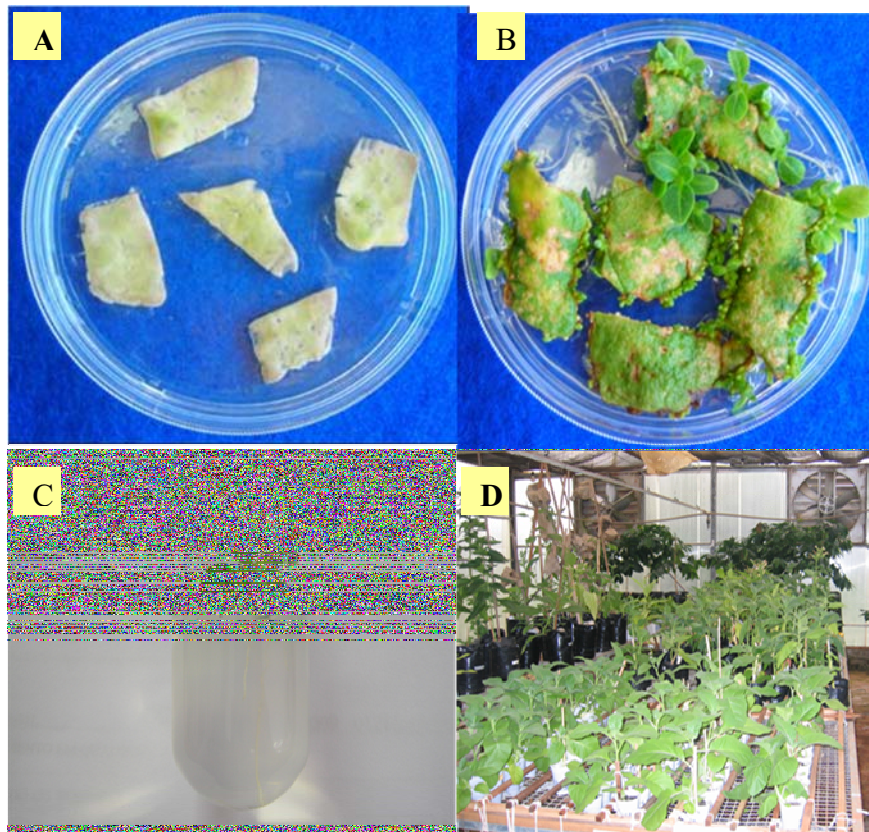


Figura 3. Obtenção de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) por transformação de discos foliares. (A) Fragmentos foliares amarelados de plantas não transgênicas mortas pela ação da canamicina; (B) calos e plântulas desenvolvidos na periferia dos discos foliares; (C) plântulas obtidas a partir da regeneração dos calos; (D) plantas de 4 meses acondicionadas em solo em casa de vegetação.



### **Expressão ectópica dos genes de parasitismo 2E07, 7E12.**

O resultado deste experimento demonstrou a presença da proteína GFP nos extratos de raízes das plantas 2E07, 7E12 e do controle positivo. A intensidade de fluorescência emitida pelo extrato da planta 2E07 foi maior do que aquela observada para o extrato da planta 7E12, indicando um maior nível de expressão protéica daquele mutante. Nenhuma emissão de fluorescência foi observada para o controle negativo (Figura 4).

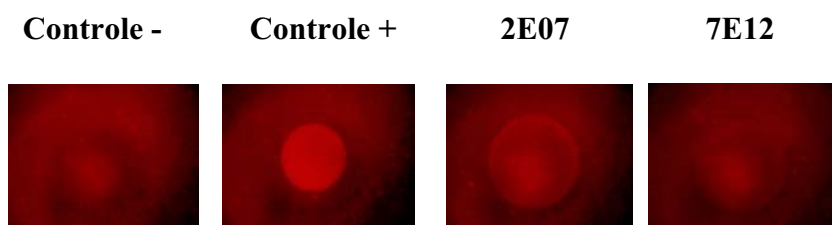


Figura 4 - Dot blot utilizando 400 µg dos extratos protéicos de raízes das plantas de *Nicotiana tabacum* não transformadas (controle -) e transformadas com os genes 2E07 e 7E12, específicos da glândula esofagiana dorsal de *Meloidogyne incognita* e, 50 µg de extratos protéicos de raízes de plantas transformadas com o gene GFP (controle +).

### **Inóculo e avaliação do perfil da infecção das plantas por *M. incognita*.**

Durante todo o período de avaliação (08, 16 e 28 dias após os inóculos), as plantas transgênicas 2E07 e 7E12 apresentaram galhas de tamanhos maiores e mais alongadas quando comparadas às galhas das raízes das plantas controle não transgênicas (Figura 5).

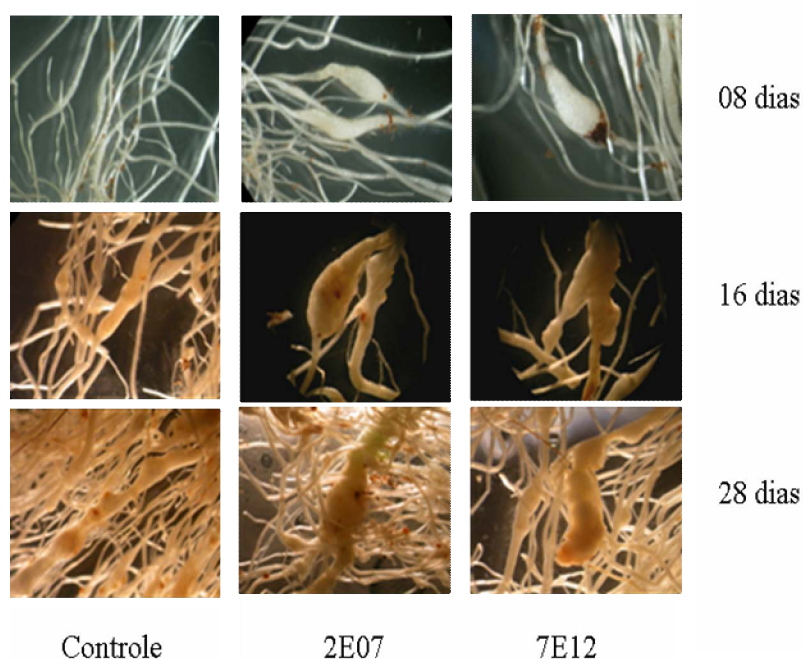


Figura 5. Plantas de *Nicotiana tabacum* inoculadas com J2 de *M. incognita* e coletadas em diferentes pontos da curva de tempo exibindo galhas de tamanhos diferentes. Onde podemos observar que, as galhas desenvolvidas na raiz da planta controle não-transgênica se desenvolveram mais lentamente e se apresentaram menores do que as raízes transgênicas 2E07 e 7E12 considerando todos os pontos da curva de tempo, 08, 16 e 28 dias.

O número médio de galhas observado para cada uma das 16 plantas dos diferentes mutantes, após 08 e 16 dias de infecção, foram significativamente maiores do que o observado para a média de galhas de cada uma das 16 plantas utilizadas como controle de acordo com o teste de Tukey  $p < 0,001$  (Figura 6). Após 28 dias de infecção, uma média de 600 galhas foram observadas tanto para as plantas controle quanto para as plantas transformadas (Figura 6). Estes resultados indicam que o processo e formação das galhas aconteceu de maneira mais rápida nas plantas transformadas do que nas plantas controle reforçando os dados observados nas análises morfológicas.

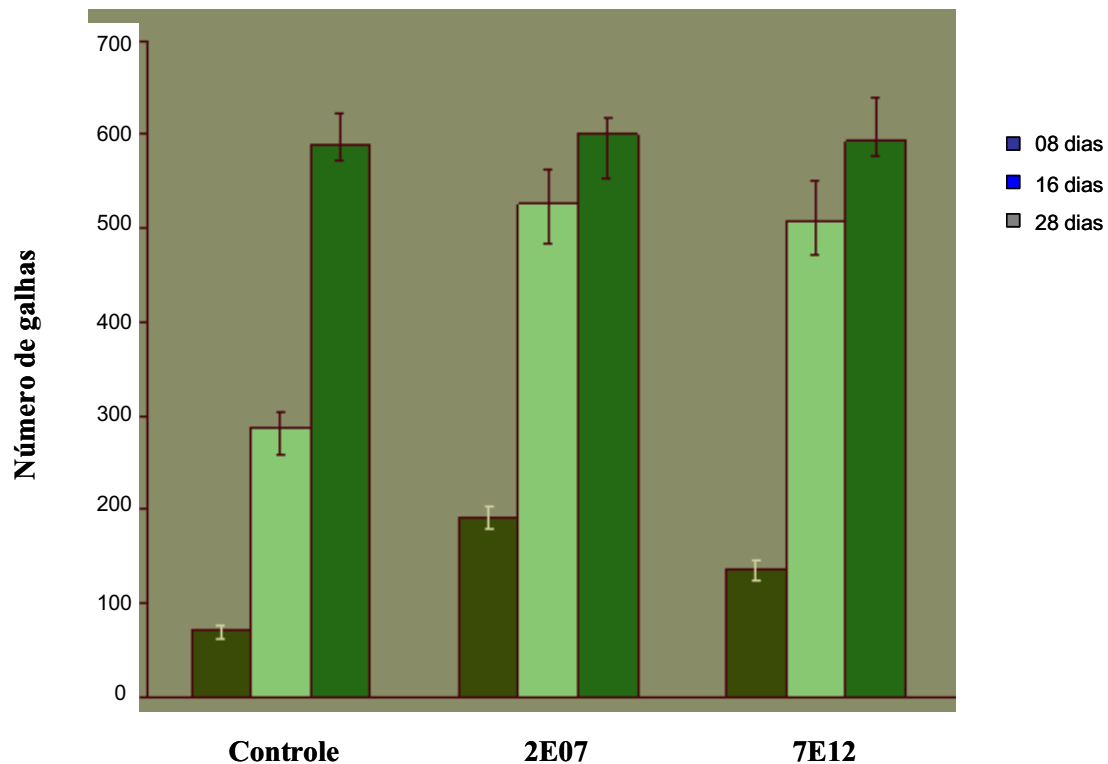


Figura 6 - Avaliação do número de galhas de plantas de *Nicotiana tabacum* carregando os genes, *2E07* e *7E12* coletadas 08, 16 e 28 dias após a inoculação com J2 de *Meloidogyne incognita*.

O teste de avaliação da eclosão de J2 usando massas de ovos isoladas 45 dias após a infecção das plantas controle e transformadas apresentou uma grande variação, porém, o número de J2 recuperados foi significativamente nos mutantes comparado-os aos controles não transgênicos de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,001$ ) (Figura 7).

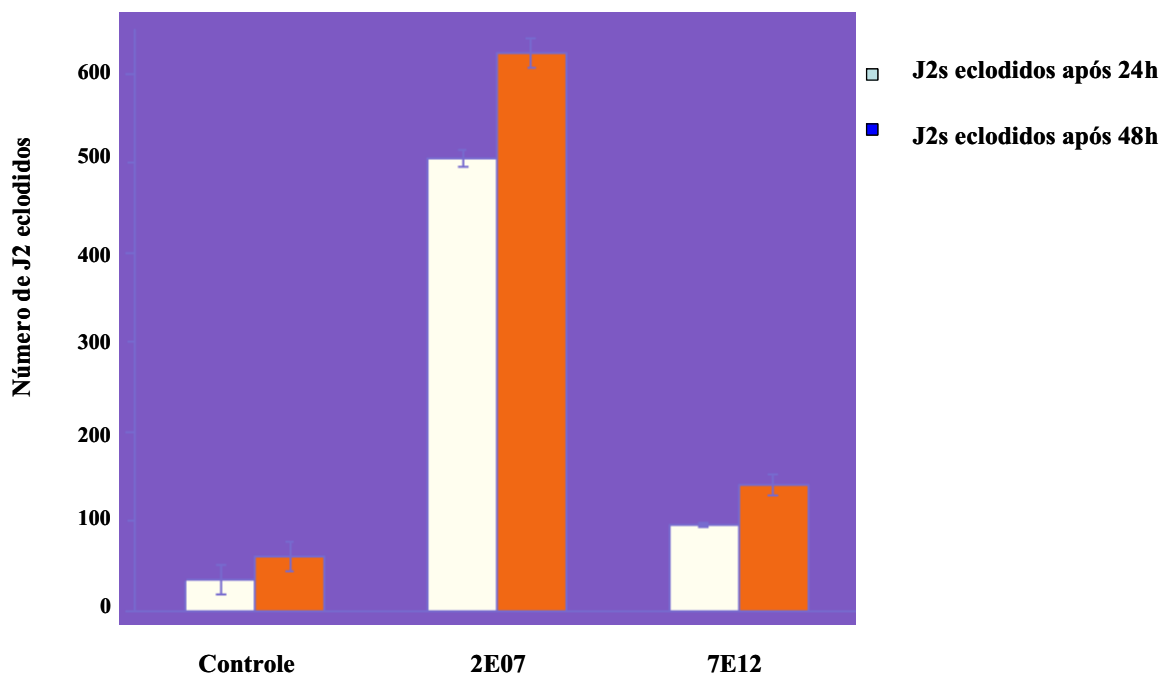


Figura 7. Teste de avaliação da eclosão de juvenis de *Meloidogyne incognita* de plantas transformadas e controle após 45 dias da inoculação com o nematóide.

#### **Avaliação microscópica das células gigantes.**

Os resultados da avaliação microscópica das células gigantes das plantas controle e transformadas de *N.tabacum* exibiram morfologia e tamanhos bastante variados. Nas galhas das raízes das plantas transgênicas 2E07 (Figura 8) e 7E12 (Figura 9), as células gigantes se apresentaram mais volumosas, com invaginações na membrana plasmática bem mais pronunciadas do que nas plantas controle. Adicionalmente, o número das células vizinhas nos mutantes, foi evidentemente mais acentuado do que nas plantas não transgênicas.

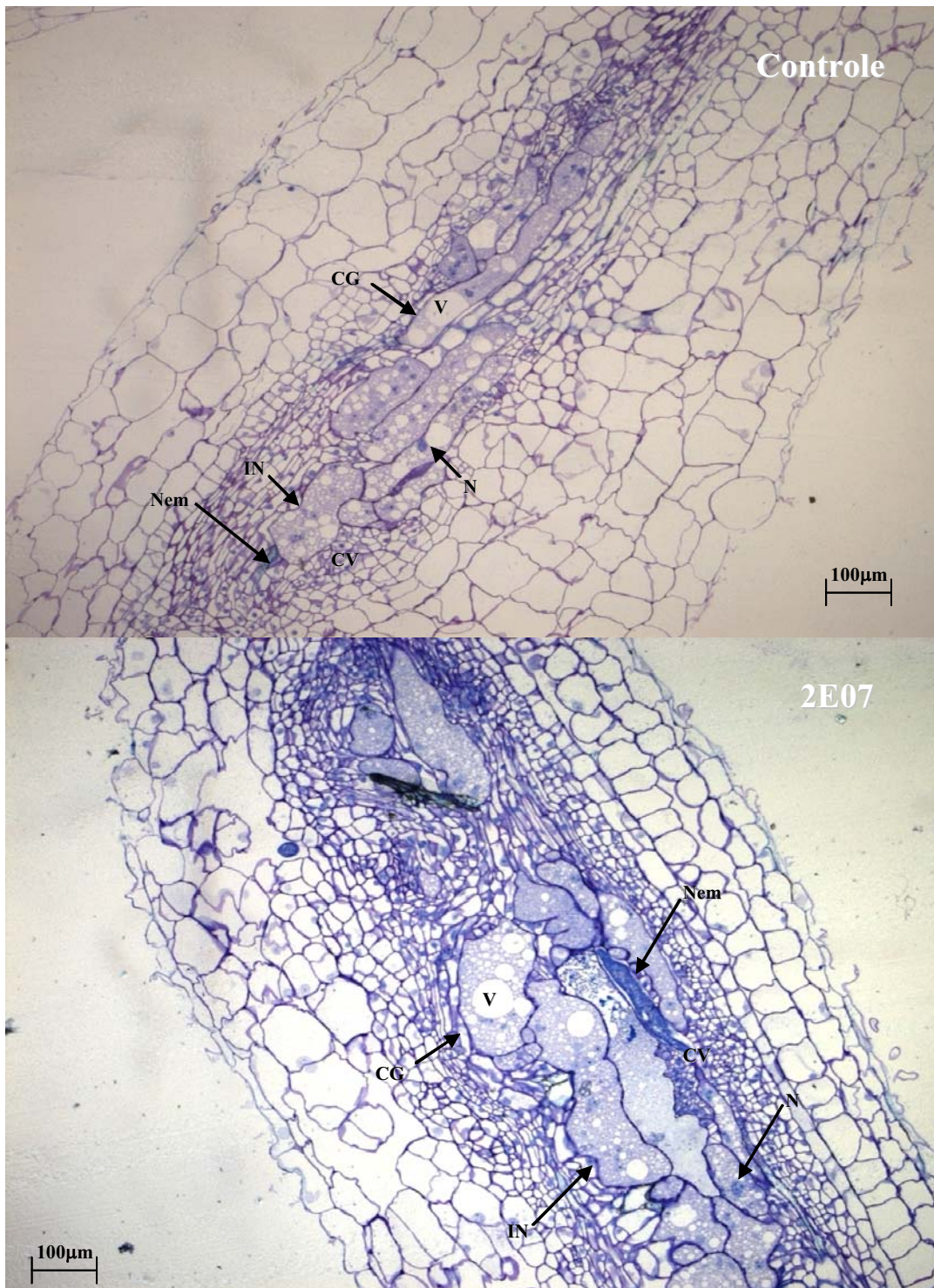


Figura 8. Análise histopatológica das raízes de *Nicotiana tabacum* 08 dias após a inoculação com *Meloidogyne incognita*. Onde controle, corresponde a planta não transgênica usada no experimento e 2E07 é a planta transgênica com 8 dias de inoculo. CG = célula gigante; IN = invaginação; V = vacúolo; N = núcleo; Nem = nematóide; CV = células vizinhas.

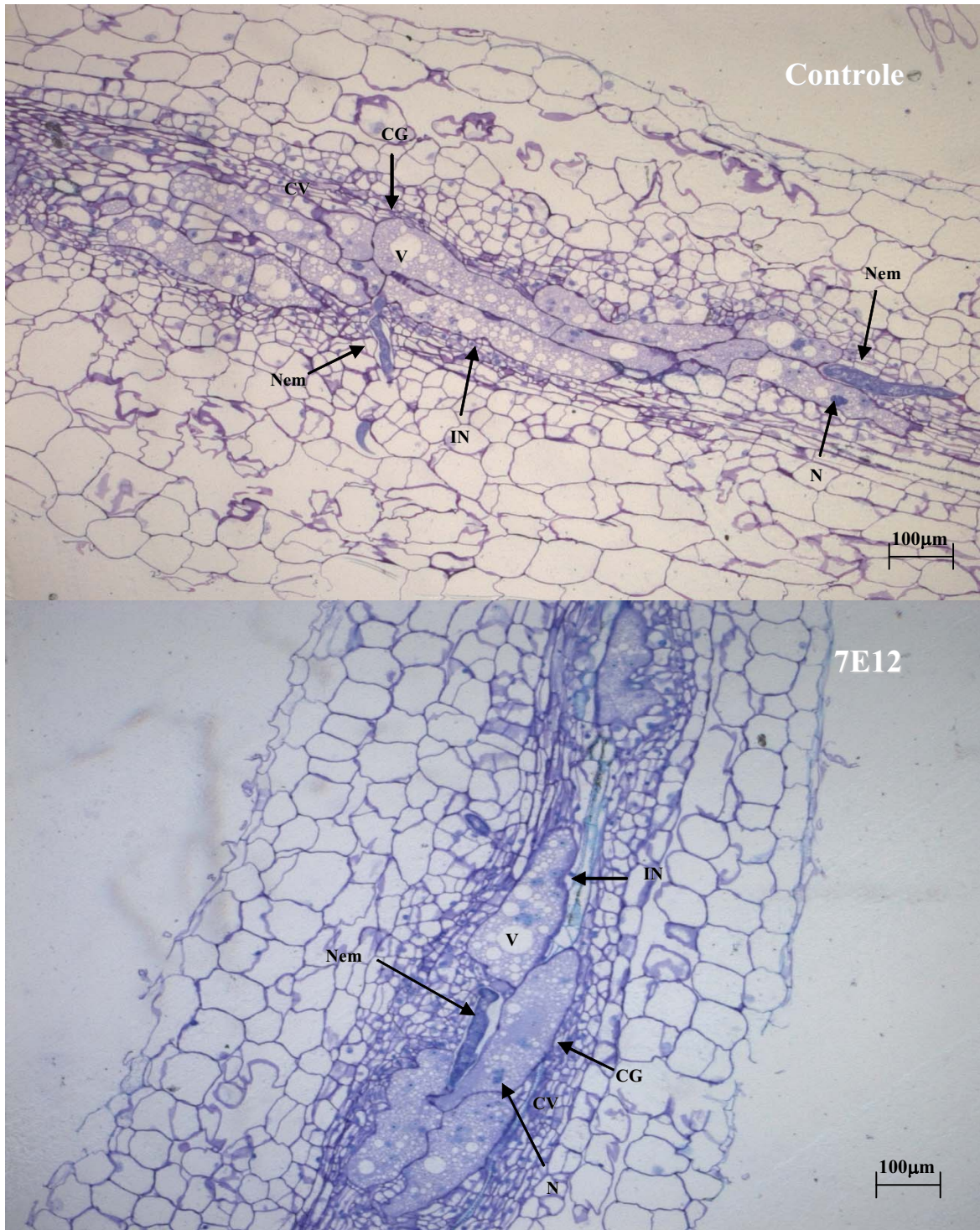
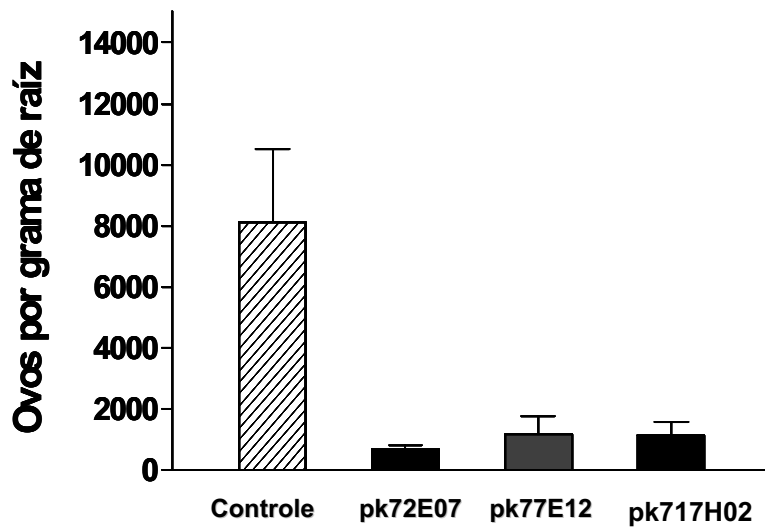


Figura 9. Análise histopatológica das raízes de *Nicotiana tabacum* 08 dias após a inoculação com *Meloidogyne incognita*. Onde controle, corresponde a planta não transgênica usada no experimento e 7E12 é a planta transgênica com 8 dias após a inoculação. CG = célula gigante; IN = invaginação; V = vacúolo; N = núcleo; Nem = nematóide; CV = células vizinhas.

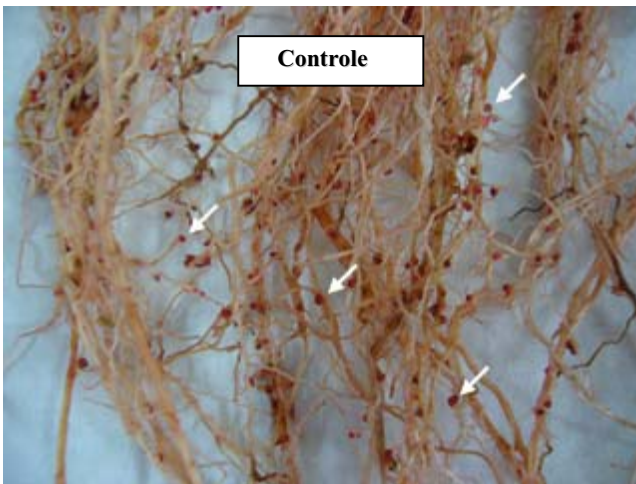
### **Expressão ectópica de dsRNA em plantas de fumo.**

As plantas transgênicas contendo os genes 2E07, 7E12 ou 17H02 conferiram resistência ao nematóide, sendo que o percentual de resistência variou de 85-91%. O número médio de ovos por grama de raiz, considerando as três construções foi significativamente menor do que o ocorrido para as plantas controle segundo o teste de Tukey ( $p < 0.001$ ) (Figura 10 A). Algumas plantas contendo a construção pk717H02 se mostraram praticamente imunes ao inoculo, não apresentando sequer uma galha ou massa de ovos externa ou ovos internos (Figura 10 C), enquanto que as plantas transformadas com o vetor desarmado se mostraram repletas de massas de ovos quando coradas com floxina (Figura 10 B).

A



B



C



Figura 10. Análise da resistência de plantas transgênicas expressando dsRNA contra os transcritos dos genes *2E07*, *7E12* e *17H02* de *Meloidogyne incognita*. (A) Média do número de ovos por grama de raiz, em plantas de fumo, 45 dias após a inoculação. Cada planta foi desafiada com 10000 ovos de *M. incognita*. Como controle positivo da infecção foram usadas plantas de tabaco transformadas com o vetor desarmado. (B e C) Raízes de *Nicotiana tabacum* após 45 dias da inoculação com 10.000 ovos de *M. incognita*, onde as raízes da planta controle (vetor) se encontram repletas de massas de ovos reveladas pelo corante floxina e as das plantas transgênicas (pk717H02) que aparentemente não apresentam nenhuma massa de ovos.



## DISCUSSÃO.

O principal foco deste estudo foi avaliar a participação de três genes novos no processo de parasitismo de *M. incognita*. Para isso, foram utilizadas plantas hospedeiras expressando dsRNA específicos para transcritos dos referidos genes. Adicionalmente, construções para superexpressão destas proteínas de secreção foram introduzidas em plantas de fumo com o objetivo de avaliar seus efeitos nas raízes do hospedeiro. Apesar das discrepâncias (polimorfismos), as seqüências aqui utilizadas a princípio foram descritas por Huang, Gao et al., (2003). Identificar e caracterizar genes de nematóides, são excelentes estratégias para o entendimento de processos biológicos vitais como a alimentação, desenvolvimento, sinalização, reprodução e longevidade (Antoshechkin and Sternberg 2007; Mukhopadhyay and Tissenbaum 2007), bem como para a compreensão das interações de vários nematóides parasitas com seus hospedeiros (Gheysen and Vanholme, 2007; Knox, Geldhof et al. 2007). Um grande número destas seqüências obtidas por projetos de genômica ou transcriptômica, entretanto, codificam para proteínas com função desconhecida (genes novos), considerando também os nematóides parasitas de plantas e animais (Ghedín, Wang et al. 2004; Parkinson, Mitreva et al. 2004). Surpreendentemente, em bibliotecas que incluem apenas genes especificamente expressos nas glândulas esofagianas de *M. incognita* e *H. glycines*, o percentual de seqüências pioneiras atinge cerca 89% e 72%, para as duas espécies, respectivamente (Gao, Allen et al. 2003; Huang, Gao et al. 2003), indicando que grande parte dos genes expressos nas glândulas esofagianas destas espécies de fitonematóides é constituída de proteínas novas, sem domínios e seqüências conhecidas, o que não nos permite classificá-las funcionalmente em famílias gênicas específicas.

Adicionalmente, é freqüente ocorrer discrepâncias entre as classificações das sequências *in silico* e a atividade biológica da proteína após sua validação funcional. Como exemplo, pode ser citado o inibidor ativo de xilanase isolado de arroz, que possui estrutura primária similar às quitinases da família GH18 (Durand, Hughes et al. 2005). Além de serem novos, os genes selecionados no presente estudo são exclusivamente expressos na glândula dorsal de *M. incognita* em estádios avançados do parasitismo como mostra a hibridização *in situ* (Figura 2).

Como já foi mencionado, na transição entre penetração na raiz hospedeira e a indução e manutenção do sítio de alimentação, a glândula dorsal do parasita se desenvolve e acumula uma grande quantidade de grânulos protéicos. Estas evidências contribuem com a hipótese de que é na glândula dorsal de fitonematóides endoparasitas sedentários onde é expressa a maioria dos fatores relacionados com o controle das funções celulares do hospedeiro para a sustentação do parasitismo (Baum, Davis et al. 2007).

A expressão dos genes *2E07* e *7E12* não ocasionou alterações fenotípicas externas observáveis nas plantas de fumo transgênicas em relação às plantas controles não transgênicas. Por outro lado, a avaliação das plantas infectadas com *M. incognita* após 08, 16 e 28 dias, revelou diferenças nos sintomas das raízes causados pelos parasitas. Essas diferenças sugerem que a expressão das proteínas de secreção nas plantas transgênicas, somado à ação dos fitonematóides, podem provocar um desenvolvimento prematuro dos sintomas do parasitismo. Dentre esses, pode ser citado o desenvolvimento de galhas nas raízes, que apareceram bem evidentes nas plantas transgênicas após 8 dias das inoculações, enquanto que nos controles não transgênicos não foram evidenciadas galhas nesse momento. Nos demais períodos de coleta (16 e 28 dias), as galhas nas raízes também se apresentaram maiores nas plantas transgênicas, reforçando a hipótese do desenvolvimento

precoce. Outra análise que suporta essa inferência é o número de galhas formadas por raiz. Esse número foi significativamente maior para as plantas transgênicas aos 08 e aos 16 dias da inoculação, entretanto, após 28 dias, o número médio de galhas por planta transgênica não foi estatisticamente diferente das plantas controle. Adicionalmente, o número de J2s após a eclosão dos juvenis das plantas transgênicas (24 h e 48 h) foi significativamente maior do que nas plantas controle. Isso sugere que o desenvolvimento precoce dos sintomas do parasitismo se reflete também na maior frequência de eclosão de juvenis dos ovos depositados nas raízes transgênicas. Essa análise foi feita no final do ciclo dos nematóides, 45 dias após a inoculação. A avaliação histológica das raízes das plantas infectadas demonstrou diferenças morfológicas entre as células gigantes formadas nas plantas transgênicas e não-transgênicas. As diferenças mais marcantes incluem maior volume da célula gigante e invaginações mais acentuadas da membrana plasmática nas plantas transgênicas, comparando-se com os controles que demonstraram um formato celular mais alongado com invaginações pouco evidentes. Essas diferenças sugerem que o desenvolvimento e amadurecimento das células gigantes podem estar acontecendo de forma mais acelerada nas plantas transgênicas expressando 2E07 e 7E12. Esses resultados indicam que as referidas proteínas são importantes para o desenvolvimento dos sítios de alimentação pelos nematóides de galhas.

Já foi demonstrado que a expressão de genes oriundos de patógenos nos tecidos de plantas hospedeiras pode levar a uma repetição de certos sintomas resultantes do parasitismo, indicando assim a importância e, às vezes, a função das proteínas presentes em um parasitoma. Como exemplo, a expressão de um único gene, o *pthA* do patógeno *Xanthomonas citri* em laranja (*Citrus sinensis*), é suficiente para provocar divisão e hipertrofia celular, e ainda morte celular nas plantas transgênicas (Duan, Castaneda et al.

1999). O primeiro gene de um nematóide parasita de plantas a ser caracterizado dessa forma, foi o da corismato mutase de *M. javanica* (Doyle and Lambert 2003). Nesse trabalho, a expressão da corismato mutase I de *M. javanica* em raízes de soja levou a um fenótipo de raízes laterais reduzidas ou abortadas. A partir deste resultado, acredita-se que a corismato mutase do nematóide, quando secretada no citoplasma da planta, pode degradar o corismato, alterando, assim, a via do siquimato, o que pode resultar dentre outras alterações, na diminuição drástica nos níveis de auxina plastidial, causando o referido fenótipo. Acredita-se que este evento seja essencial para o início da formação do sítio de alimentação. Outra proteína que está sendo relacionada a eventos que levam à formação dos sítios de alimentação é o peptídeo secretório Hg-SYV4 de *H. glycines*, que possui motivo C-terminal da família CLAVATA3 de plantas. Quando expresso em plantas de *Arabidopsis*, o peptídeo Hg-SYV4 regulou negativamente o fator de transcrição WUSCHEL, levando a uma redução na população de células meristemáticas, à terminação prematura do meristema apical e o desenvolvimento de flores sem o ginecio central (Wang, Mitchum et al. 2005). Finalmente, a expressão de um pequeno peptídeo secretório de *M. incognita* (16D10) em *A. thaliana* leva a um aumento na taxa de divisão celular no meristema radicular, por interação com um fator de transcrição da família SCARECROW. Este é o primeiro relato de interação regulatória entre proteínas de plantas e nematóides, sendo um importante ponto a ser explorado na compreensão do modelo de interação planta-nematóide (Huang, Dong et al. 2006; Baum, Davis et al. 2007).

Em outros trabalhos, a expressão de potenciais genes de parasitismo de fitonematóides em fusão com GFP revelou apenas a localização subcelular e não a função das proteínas de secreção. Por exemplo, a expressão de uma nova proteína de extensão de ubiquitina *Hs-Ubi1* de *H. schachtii* em células BY-2 de tabaco levou a um acúmulo do

sinal da GFP no núcleo da célula (Tytgat, Vanholme et al. 2004). Por outro lado, uma outra proteína, a 14-3-3, de secreção de *M. incognita*, quando expressa em células BY-2, apresentou um acúmulo preferencialmente citoplasmático, considerando a emissão da fluorescência pela GFP fusionada (Jaubert, Ledger et al. 2002). A diferença na localização destas proteínas quando expressas em células hospedeiras constitui mais um importante resultado a contribuir com o entendimento das interações entre plantas e seus nematóides parasitas. Uma outra técnica usada neste trabalho, na tentativa de elucidar as funções dos genes *2E07*, *7E12* e *17H02*, foi o RNA de interferência (RNAi). Este mecanismo é diferente da superexpressão em fusão com GFP, que permite ver o efeito da proteína de secreção do nematóide nos tecidos da planta hospedeira. Pelo contrário, o RNAi provoca a degradação de um RNA mensageiro que possui seqüência complementar, levando ao silenciamento do gene alvo (Bakhetia, Charlton et al. 2005). Este processo de nocaute por RNA pode levar a uma mudança de fenótipo, perda ou diminuição da capacidade infectiva se o gene for importante para o parasita, revelando assim um potencial alvo para o controle desses fitopatógenos radiculares. O RNA de interferência foi pela primeira vez descrito em *C.elegans*, onde a administração de dsRNA ao respectivo nematóide, pela técnica de soaking, levou ao silenciamento de um gene específico (Fire, Xu et al. 1998).

Esta técnica também foi aplicada em nematóides de plantas, onde se utilizou os neurotransmissores octopamina (nematóides de cisto) e resorcinol (nematóides de galhas) para induzir a larva J2 a se alimentar do dsRNA do meio (Urwin, Lilley et al. 2002; Rosso, Dubrana et al. 2005). Atualmente outras rotas para a administração do RNAi em fitonematóides já são conhecidas e incluem: absorção via anfidios, poro excretório/secretório e ovos ou ingestão de plantas transgênicas expressando dsRNA (Huang, Allen et al. 2006; Yadav, Veluthambi et al. 2006; Lilley, Bakhetia et al., 2007). Os

resultados obtidos aqui até o momento demonstraram que a introdução de dsRNAs homólogos aos transcritos dos genes 2E07, 7E12 e 17H02 em *N. tabacum* resultou em plantas com alta resistência ao parasita *M. incognita*. Os níveis de resistência variaram de 85% a 91%, e as diferenças entre as plantas dsRNA positivas e os controles foram significativas de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,001$ ),  $n = 3-11$ .

Outros trabalhos já demonstraram anteriormente que a expressão de dsRNA em plantas hospedeiras leva ao silenciamento de genes alvo no nematóide que se alimenta da planta. No primeiro trabalho (Yadav, Veluthambi et al. 2006), plantas transgênicas de fumo expressando dsRNA contra uma integrase e um fator de splicing de *M. incognita* se tornaram altamente resistentes. Neste caso, poucas plantas (Fator de splicing - 2 de 25; integrase - 6 de 19) apresentaram galhas pequenas e contendo fêmeas mal formadas e transparentes. Em um outro trabalho, (Huang, Allen et al. 2006) demonstraram que plantas transgênicas de *Arabidopsis* adquiriram resistência de até 96% ao expressarem dsRNA contra transcritos do gene *16D10* Huang, Gao et al. (2003) de glândula salivar de *M. incognita*. Estes resultados foram bastante similares aos obtidos neste estudo para os genes *2E07*, *7E12* e *17H02*, contribuindo para o fato de que plantas transgênicas expressando dsRNA, contra genes envolvidos com a fitopatogenicidade, podem ser uma importante ferramenta para o controle de fitonematóides. Adicionalmente, plantas de soja expressando dsRNA específico para a proteína mais abundante do esperma (MSP) de *H. glycyne*s suprimiram em cerca de 32% a reprodução do parasita, comparando com as plantas controle. Surpreendentemente, a inoculação destes ovos da progênie em outras plantas dsRNA-MSP resultou em uma resistência de 75%, sendo este o primeiro relato de que o efeito do RNAi em um nematóide parasita de planta pode passar para a progênie do mesmo, afetando a sua capacidade de infectar o hospedeiro (Steeves, Todd et al. 2006).

Em contradição a estes resultados, expressão de dsRNA em plantas de tabaco contra transcritos *MjTis11*, um fator de transcrição expresso em ovos e em fêmeas produtoras de ovos, não resultou em qualquer resistência a *M. javanica*. Este gene foi selecionado tendo em vista que o nocaute de homólogos no nematóide *C.elegans* levou a um fenótipo letal (Fairbairn, Cavallaro et al. 2007). Este resultado exemplifica que não só a presença ou o nível de expressão de um gene é suficiente para determinar a sua importância, tornando-se necessário o uso de técnicas de genética reversa (RNAi) complementando técnicas como a hibridização *in situ*, microarranjos, PCR em tempo real dentre outras. Vários outros trabalhos utilizando a técnica de “soaking” para a administração de dsRNAs em fitonematóides têm revelado que o silenciamento de proteinases, quitina sintases, celulases, pode levar à incapacidade ou diminuição da capacidade de desenvolvimento de um nematóide que infecta uma planta. Em um desses trabalhos, o nocaute de genes de proteinases cisteínicas e de uma proteína tipo lectina levou a alteração da proporção sexual favorecendo machos e prejudicou o estabelecimento dos nematóides do cisto nas raízes (Urwin, Lilley et al. 2002). Neste caso, foi utilizada a técnica de “soaking” utilizando um neurotransmissor (octopamina) para induzir os juvenis infectivos (J2s) a se alimentarem das moléculas do meio, incluindo dsRNA. Logo em seguida foi demonstrado que o neurotransmissor a ser aplicado em nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne*) seria o resorcinol ou resorcina (Rosso, Dubrana et al. 2005).

A partir daí a aplicação de RNA de interferência em nematóides parasitas de plantas utilizando o “soaking” já demonstrou a participação de diversos genes no parasitoma de fitonematóides. Em um desses trabalhos, (Chen, Rehman et al. 2005) alimentaram juvenis de segundo estágio (J2) de *G. rostochiensis* com dsRNAs contra uma glucanase (Gr-eng) e uma proteína de secreção dos anfídios deste parasita (gr-ams-1). O

tratamento com *Gr-eng* dsRNA reduziu significativamente a capacidade dos nematóides penetrarem na raiz, indicando que o nematóide precisa desta celulase para romper os tecidos da raiz enquanto penetra na planta. No tratamento com *gr-mas-1* dsRNA, os nematóides foram incapazes de localizar a raiz no solo e, por isso, o potencial de penetração dos juvenis foi bastante reduzido. Imergindo ovos de *M. artiellia* em uma solução de dsRNA contra a sua quitina sintase, foi prejudicial ao desenvolvimento dos ovos e inibiu a eclosão dos juvenis (Fanelli, Di Vito et al. 2005). A introdução da dual oxidase dsRNA em J2 de *M. incognita* via soaking levou a uma diminuição significativa no número de fêmeas estabelecidas na raiz e, conseqüentemente, de ovos depositados. A dual oxidase está provavelmente envolvida na síntese da cutícula do nematóide, que é muito importante na fase que precede a ecdise e na expansão do corpo da fêmea (Bakhetia, Charlton et al. 2005).

Juntamente com as recentes publicações acima citadas, os resultados obtidos neste trabalho constituem uma importante contribuição para o entendimento do modelo de interação, plantas-fitonematóides. Além disso, a resistência adquirida pelas plantas expressando o dsRNA confirmam, que o RNA de interferência é uma estratégia promissora a ser utilizada para a criação de plantas transgênicas resistentes a *M. incognita*.



## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DO TRABALHO.

### CONCLUSÕES

- Os genes de resistência expressos diferencialmente na biblioteca de cDNA de algodão podem estar relacionados com mecanismos de resistência que levam a resposta de hipersensibilidade, resposta sistêmica adquirida e a resposta vegetal ao estresse abiótico.
- As plantas de tabaco transformadas com os genes *2E07*, *7E12* em fusão com GFP apresentaram aspecto normal. Porém, quando infectadas com os nematóides apresentaram uma evolução prematura da doença. Esse fato pode ser confirmado em vários experimentos, principalmente os de microscopia, onde as células gigantes nas plantas transgênicas apresentaram evolução prematura passados 8 dias dos inóculos, sendo mais volumosas e com invaginações mais pronunciadas do que nas plantas controle.
- As plantas transgênicas expressando dsRNAs contra transcritos dos genes *2E07*, *7E12* e *17H02* foram significativamente resistentes ao nematóide de galhas *M. incognia*.

### PERSPECTIVAS

É de grande interesse para a economia agrícola, a criação de cultivares transgênicos com alta e ampla resistência a nematóides. A introdução de um dsRNA em plantas nos permite silenciar até grupos gênicos em pragas ou patógenos, desde que sejam selecionadas regiões conservadas das seqüências. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a expressão em plantas do dsRNA para o genes de oriundos do parasita pode ser uma boa estratégia a ser aplicada em cultivares de grande importância agrônômica e que são extremamente afetadas por espécies do gênero *Meloidogyne*. Como exemplos,

podemos salientar o café, o algodão e a cana-de-açúcar. Além disso, serão realizadas avaliações de risco do dsRNA em campo e em mamíferos, assim como ensaios de citotoxicidade. Este trabalho abre caminho para a utilização de outros genes de parasitismo de fitonematóides, como alvos para a criação de plantas transgênicas resistentes expressando dsRNA. Os resultados obtidos com a superexpressão dos genes *2E07* e *7E12* em plantas de tabaco podem ser usados para incrementar os conhecimentos sobre a interação planta-nematóide. Os genes diferencialmente expressos na biblioteca do algodão resistente ao nematóide de galhas serão avaliados quanto ao potencial, em plantas transgênicas modelo, visando a criação de novas cultivares de interesse econômico.

## REFERÊNCIAS

- Agudelo, P., R. T. Robbins, et al. (2005). "Histological changes in *Gossypium hirsutum* associated with reduced reproduction of *Rotylenchulus reniformis*." Journal of Nematology **37**(2): 185-189.
- Aguinaldo, A. M., J. M. Turbeville, et al. (1997). "Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals." Nature **387**(6632): 489-493.
- Almeida, M. T. S. C. M. and W. Decraemer (2005). "Trichodoridae, familia de nematoides vetores de vírus." RAPP **13**.
- Antoshechkin, I. and P. W. Sternberg (2007). "The versatile worm: genetic and genomic resources for *Caenorhabditis elegans* research." Nat Rev Genet **8**(7): 518-532.
- Aravin, A.A., G.J. Hannon, et al. (2007) "The Piwi-piRNA Pathway Provides an Adaptive Defense in the Transposon Arms Race". Science **318**: 761-764
- Bhattacharai, K.K., Q. Li, et al. (2007) "The *Mi-1*-Mediated Pest Resistance Requires *Hsp90* and *Sgt1*" Plant Physiol **144**:312-323.
- Bakhetia, M., W. Charlton, et al. (2005). "RNA interference of dual oxidase in the plant nematode *Meloidogyne incognita*." Mol Plant Microbe Interact **18**(10): 1099-1106.
- Baldwin, J. G., S. A. Nadler, et al. (2004). "Evolution of plant parasitism among nematodes." Annu Rev Phytopathol **42**: 83-105.
- Baum, T. J., E. L. Davis, et al. (2007). "Root-knot and cyst nematode parasitism genes: the molecular basis of plant parasitism." Gen Eng, Princ Meth, **28**:17-43.
- Bellaafiore S.P., Z. Shen, et al. (2008). "Direct Identification of the *Meloidogyne incognita* Secretome Reveals Proteins with Host Cell Reprogramming Potential." PLoS Pathog **4**:1-12.
- Bird, D. M., M. L. Blaxter, et al. (2005). "A white paper on nematode comparative genomics." J. Nematol **37**(4): 408-416.
- Blair, J. E., K. Ikeo, et al. (2002). "The evolutionary position of nematodes." BMC Evol Biol **2**: 7.
- Blaxter, M. L. (2003). "Nematoda: genes, genomes and the evolution of parasitism." Adv Parasitol **54**: 101-195.
- Boyd, S. D. (2008). "Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask." Lab Invest **88**(6): 569-578.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brizard, J.P., C. Carapito, et al. (2006) "Proteome analysis of plant-virus interactome: comprehensive data for virus multiplication inside their hosts." Mol Cell Proteomics, **5**: 2279-2297.
- Cai, D., M. Kleine, et al. (1997). "Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet." Science **275**(5301): 832-834.
- Cai, D., T. Thurau, et al. (2003). "Sporamin-mediated resistance to beet cyst nematodes (*Heterodera schachtii* Schm.) is dependent on trypsin inhibitory activity in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) hairy roots." Plant Mol Biol **51**(6): 839-849.
- Carlini, C.R. and M.F. Grossi de Sá (2002). "Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities of bioinsecticides." Toxicon, **40**(11), 1515-1539.

- Casado-Vela J., S. Selles et al.(2006) "Proteomic analysis of tobacco mosaic virus-infected tomato (*Lycopersicon esculentum* M.) fruits and detection of viral coat protein." Proteomics 6:196–206.
- Chen, Q., S. Rehman, et al. (2005). "Functional analysis of pathogenicity proteins of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* using RNAi." Mol Plant Microbe Interact 18(7): 621-625.
- Chitwood, D. J. (2002). "Phytochemical based strategies for nematode control." Annu Rev Phytopathol 40: 221-249.
- Chu, C. Y. and T. M. Rana (2008). "Potent RNAi by short RNA triggers." Rna 14(9): 1714-1711.
- Coaker, G., A. Falick, et al. (2005). "Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin." Science 308(5721): 548-550.
- Coghlan, A. (2005). "Nematode genome evolution." WormBook: 1-15.
- Dangl, J. and J.D.G. Jones. (2001). "Plant pathogens and integrated defense responses to infection" Nature 411, 826-833.
- Dangl, J.L. and J.M. McDowell (2006) "Two modes of pathogen recognition by plants". Proc Natl Acad Sci 103(23): 8575–8576.
- Das, P. P., M. P. Bagijn, et al. (2008). "Piwi and piRNAs act upstream of an endogenous siRNA pathway to suppress Tc3 transposon mobility in the *Caenorhabditis elegans* germline." Mol Cell 31(1): 79-90.
- Davis, E. L., R. S. Hussey, et al. (2000). "Nematode Parasitism Genes." Annu Rev Phytopathol 38: 365-396.
- Davis, E. L., R. S. Hussey, et al. (2004). "Getting to the roots of parasitism by nematodes." Trends Parasitol 20(3): 134-141.
- Davis, E. L. and M. G. Mitchum (2005). "Nematodes. Sophisticated parasites of legumes." Plant Physiol 137(4): 1182-1188.
- De la Fuente van Bentem, S., Vossen, J.H. et al. (2005). "Heat shock protein 90 and its co- chaperone protein phosphatase 5 interact with distinct regions of the tomato I-2 disease resistance protein." Plant J 43(2):284-298.
- De Waele, D. and A. Elsen (2007). "Challenges in tropical plant nematology." Annu Rev Phytopathol 45: 457-485.
- De Young B.J. and R.W. Innes. (2006). "Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense." Nat Immunol. 7(12):1243-1249.
- Diévert, A. and S.E. Clark. (2004) "LRR-containing receptors regulating plant development and defense" Development 131: 251-261.
- Dopazo, H. and J. Dopazo (2005). "Genome-scale evidence of the nematode-arthropod clade." Genome Biol 6(5): R41.
- Doyle, E. A. and K. N. Lambert (2003). "Meloidogyne javanica chorismate mutase 1 alters plant cell development." Mol Plant Microbe Interact 16(2): 123-131.
- Duan, Y. P., A. Castaneda, et al. (1999). "Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death." Mol Plant Microbe Interact 12(6): 556-560.
- Durand, A., R. Hughes, et al. (2005). "Emergence of a subfamily of xylanase inhibitors within glycoside hydrolase family 18." Febs J 272(7): 1745-1755.
- Durrant, W.E. and X. Dong. (2004). "Systemic acquired resistance" Ann Rev Phytopathol. 42: 185-209.

- Elling, A. A., M. Mitreva, et al. (2007). "Divergent evolution of arrested development in the dauer stage of *Caenorhabditis elegans* and the infective stage of *Heterodera glycines*." Genome Biol **8**(10): R211.
- Ernst, K., A. Kumar et al (2002) "The broad-spectrum potato cyst nematode resistance gene (Hero) from tomato is the only member of a large gene family of NBS-LRR genes with an unusual amino acid repeat in the LRR region." Plant J **31**:127–136.
- Fairbairn, D. J., A. S. Cavallaro, et al. (2007). "Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes." Planta **226**(6): 1525-1533.
- Fanelli, E., M. Di Vito, et al. (2005). "Analysis of chitin synthase function in a plant parasitic nematode, *Meloidogyne artiellia*, using RNAi." Gene **349**: 87-95.
- Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-811.
- Flor H,H, (1971). "Current status of the gene-for-gene concept". Ann Rev Phytopathol. **9**: 275-296.
- Forouhar, F., A. Kuzin, et al. (2007) "Functional insights from structural genomics" J Struct Funct Gen **8**:37–44.
- Fuller, V.L., Lilley, et al. (2008). "Nematode resistance." New Phytopatology **180**: 27-44.
- Gachon, C., A. Mingam, et al. (2004). "Real-time PCR: what relevance to plant studies?". J Exp bot **55**: 1445-1454.
- Gao, B., R. Allen, et al. (2003). "The parasitome of the phytonematode *Heterodera glycines*." Mol Plant Microbe Interact **16**(8): 720-726.
- Gao, S.Q., M. Chen, et al. (2009). "A cotton (*Gossypium hirsutum*) DRE-binding transcription factor gene, GhDREB, confers enhanced tolerance to drought, high salt, and freezing stresses in transgenic wheat." Plant Cell Rep**28**(2):301-311.
- Gao, X., J. Starr, et al. (2008). "Maize 9-lipoxygenase ZmLOX3 controls development, root-specific expression of defense genes, and resistance to root-knot nematodes." Mol Plant Microbe Interact **21**(1): 98-109.
- Gao S., H. Zhang, et al. (2008). "Expression of TERF1 in rice regulates expression of stress-responsive genes and enhances tolerance to drought and high-salinity." Plant Cell Rep **27**(11):1787-1795.
- Garcia, D. (2008). "A miRacle in plant development: Role of microRNAs in cell differentiation and patterning." Semin Cell Dev Biol **19**(6):586-595.
- Ghedini, E., S. Wang, et al. (2004). "First sequenced genome of a parasitic nematode." Trends Parasitol **20**(4): 151-153.
- Gheysen G, B. Vanholme. (2007). "RNAi from plants to nematodes." Trends Biotechnol. **25**(3):89-92.
- Giebel, J. (1976). "Beta-glucosidase activity in potato roots and its possible role in plant tissue response to *Heterodera rostochiensis*." Bull Acad Pol Sci Biol **24**(1): 37-42.
- Goellner, J. R. and J. L. Caudill (2000). "Intranuclear holes (cytoplasmic pseudoinclusions) in parathyroid neoplasms, or "holes happen"." Cancer **90**(1): 41-46.
- Goellner, M., X. Wang, et al. (2001). "Endo-beta-1,4-glucanase expression in compatible plant-nematode interactions." Plant Cell **13**(10): 2241-2255.
- Goverse, A., J. A. de Engler, et al. (2000). "Cell cycle activation by plant parasitic nematodes." Plant Mol Biol **43**(5-6): 747-761.
- Hamilton, A. J. and D. C. Baulcombe (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." Science **286**(5441): 950-952.
- Hames, B.D., and D.Rickwood. (1981). "Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach." IRL Press, Oxford, UK

- He, P., L. Shan, et al. (2007) "Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions" Cell Microbiol 9(6): 1385-1396.
- Hiendleder, S., S. Bauersachs, et al. (2005). "Functional genomics: tools for improving farm animal health and welfare" Rev sci tech Off int Epiz. 24 (1): 354-377.
- Hirsch, A. M., W. D. Bauer, et al. (2003). "Molecular signals and receptors: Controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms." Ecology 84(4): 858-868..
- Hoefig, K. P. and V. Heissmeyer (2008). "MicroRNAs grow up in the immune system." Curr Opin Immunol 20(3): 281-287.
- Horsch, R., J. Fry, et al. (1985). "A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants." Science 227(4691): 1229-1231.
- Huang, G., R. Allen, et al. (2006). "Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene." Proc Natl Acad Sci U S A 103(39): 14302-14306.
- Huang, G., R. Dong, et al. (2006). "A root-knot nematode secretory peptide functions as a ligand for a plant transcription factor." Mol Plant Microbe Interact 19(5): 463-470.
- Hussey, R.S. (1989). "Disease-Inducing Secretions of Plant-Parasitic Nematodes". Ann Rev Phytopathol. 27: 123-141.
- Huang, G., B. Gao, et al. (2003). "A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*." Mol Plant Microbe Interact 16(5): 376-381.
- Huang, H., C. Liu, et al. (2007) "Resistance Enhancement of Transgenic Tomato to Bacterial Pathogens by the Heterologous Expression of Sweet Pepper Ferredoxin-I Protein" Biochem cell Biol 97: 900-906.
- Hussey, R. S. and A. A. Barker (1973). "Comparison methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. ." Plant Disease Reporter 57: 1025-1028.
- Hussey, R. S., E. L. Davis, et al. (2002). "Secrets in secretions: genes that control nematode parasitism of plants " Braz. J. Plant Physiol. 14 (3): 183-194.
- Iakimova, E.T., L. Michalczuk, et al. (2005) "Hypersensitive cell death in plants – its mechanisms and role in plant defence against pathogens". J Fruit Ornamental plant Res 13: 135-158.
- Iriti, M. and F. Faoro. (2007). "Review of innate and specific immunity in plants and animals" Mycopathologia 164:57-64.
- Ishihara, T., N. Sakurai, et al. (2004). "Comparative Analysis of Expressed Sequence Tags in Resistant and Susceptible Ecotypes of *Arabidopsis thaliana* Infected with Cucumber Mosaic Virus". Plant Cell Physiol 45: 470-480.
- James, C. (2007). Global status of commercialized biotech/GM crops: 2007. ISAAA Brief No. 37. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, NY, USA.
- Jaubert, S., T. N. Ledger, et al. (2002). "Direct identification of stylet secreted proteins from root-knot nematodes by a proteomic approach." Molecular and Biochemical Parasitology 121(2): 205-211.
- Jellouli, N., H. Ben Joira, et al. (2008) "Proteomic analysis of Tunisian grapevine cultivar Razegui under salt stress." J Plant Physiol 165(5):471-481.

- Jia, Y., S.A. McAdams, et al. (2000) "Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance." EMBO J 19 (15): 4004-4014.
- Johnk, N., A. M. Hietala, et al. (2005). "Defense-related genes expressed in Norway spruce roots after infection with the root rot pathogen *Ceratobasidium bicorne* (anamorph: *Rhizoctonia* sp.)." Tree Physiol 25(12): 1533-1543.
- Jones A.M.E., V. Thomas, et al (2004) "Specific changes in the Arabidopsis proteome in response to bacterial challenge: differentiating basal and R-gene mediated resistance." Phytochemistry 65: 1805–1816
- Jones, J.D.G. and J.L. Dangl (2006) "The plant immune system" Nature 444: 323-329.
- Jones, J. T., B. Reavy, et al. (2004). "Glutathione peroxidases of the potato cyst nematode *Globodera Rostochiensis*." Gene 324: 47-54.
- Jung, C. and U. Wyss (1999). "New approaches to control plant parasitic nematodes." Appl Microbiol Biotechnol 51(4): 439-446.
- Kasprzewska, A. (2003). "Plant chitinases--regulation and function." Cell Mol Biol Lett 8(3): 809-824.
- Kawasaki, T., H. Koita, et al. (2006). "Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice." Proc Natl Acad Sci U S A 103(1): 230-235.
- Kim, S.T., S.G. Kim, et al. (2004). "Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*." Proteomics 4:3569–3578.
- Kim, V. N. (2006). "Small RNAs just got bigger: Piwi-interacting RNAs (piRNAs) in mammalian testes." Gen Develop 20(15): 1993-1997.
- Klattenhoff, K. and W. Theurkauf. (2008) "Biogenesis and germline functions of piRNAs". Development 135: 3-9.
- Knox, D. P., P. Geldhof, et al. (2007). "RNA interference in parasitic nematodes of animals: a reality check?" Trend Parasitol 23(3): 105-107.
- Kottapalli, K. R., N. Sarla, et al. (2006). "In silico insight into two rice chromosomal regions associated with submergence tolerance and resistance to bacterial leaf blight and gall midge." Biotechnol Adv 24: 561–589.
- Lambert, K. and S. Bekal (2002). "Introduction to Plant-Parasitic Nematodes." The Plant Health Instructor.
- Lambert, K. N., K. D. Allen, et al. (1999). "Cloning and characterization of an esophageal-gland-specific chorismate mutase from the phytoparasitic nematode *Meloidogyne javanica*." Mol Plant Microbe Interact 12(4): 328-336.
- Lee J., T.M. Bricker, et al. (2006) "Proteomic and genetic approaches to identify defence-related proteins in rice challenged with the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*." Mol Plant Pathol 7: 405–416.
- Lee, J. R., S. C. Park, et al. (2007). "Molecular and functional characterization of a cyclophilin with antifungal activity from Chinese cabbage." Biochem Biophys Res Commun 353(3): 672-678.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell 75(5): 843-854.
- Lehmann, P. (2002) "Structure and evolution of plant disease resistance genes" J. Appl. Genet. 43(4): 403-414.
- Li, X. Q., J. Z. Wei, et al. (2007). "Resistance to root-knot nematode in tomato roots expressing a nematocidal *Bacillus thuringiensis* crystal protein." Plant Biotechnol J 5(4): 455-464.

- Lilley, C. J., P. Devlin, et al. (1999). "Parasitic nematodes, proteinases and transgenic plants." Parasitol Today **15**(10): 414-417.
- Lilley, C.J., M. Bakhetia, et al. (2007). "Recent progress in the development of RNA interference for plant parasitic nematodes." Mol. Plant Pathol. **8**(5): 701-711.
- Lindbo, J. A., L. Silva-Rosales, et al. (1993). "Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance." Plant Cell **5**(12): 1749-1759.
- Mackey, D., B.F. Holt III, et al. (2002) "RIN4 Interacts with *Pseudomonas syringae* Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in *Arabidopsis*." Cell **18**: 743-754.
- Maggenti, A. R. (1981). "Nematodes: development as plant parasites." Annu Rev Microbiol **35**: 135-154.
- Makarova, K. S., N. V. Grishin, et al. (2006). "A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action." Biol Direct **1**: 7.
- Malloy, M.P. and F.A. Witzmann. (2002) "Proteomics: technologies and applications" Brief Func Gen Prot. **1**: 29-39.
- Masamune, T., M. Anetai, et al. (1982). "Isolation of a Natural Hatching Stimulus, Glycinoeclepin-a, for the Soybean Cyst Nematode." Nature **297**(5866): 495-496.
- Matranga, C. and P. D. Zamore (2007). "Small silencing RNAs." McBride, R. G., R. L. Mikkelsen, et al. (2000). "The role of low molecular weight organic acids from decomposing rye in inhibiting root-knot nematode populations in soil." Appl S Ecol **15**(3): 243-251.
- McBride, R. G., R. L. Mikkelsen, et al. (2000) "The role of low molecular weight organic acids from decomposing rye in inhibiting root-knot nematode populations in soil." Appl Soil Ecol **15**: 243-251.
- McDowell, J.M. and S. A. Simon (2008). "Molecular diversity at the plant–pathogen interface." Dev Comp immunol **32**: 736–744
- McLean, M. D., D. P. Yevtushenko, et al. (2003). "Overexpression of glutamate decarboxylase in transgenic tobacco plants confers resistance to the northern root-knot nematode." Mol Breed **11**(4): 277-285.
- Mehta ,A., A.C.M. Brasileiro, et al. (2008) "Plant–pathogen interactions: what is proteomics telling us?." FEBS J **275**: 3731–3746.
- Mehta, A., B. S. Magalhães, et al. (2008). "Rooteomics: The Challenge of Discovering Plant Defense-Related Proteins in Roots." Curr.t Pro Pep Sci **9**: 108-116.
- Meldal, B. H., N. J. Debenham, et al. (2007). "An improved molecular phylogeny of the Nematoda with special emphasis on marine taxa." Mol Phylogenet Evol **42**(3): 622-636.
- Miklis, M., C. Consonni, et al. (2007). "Barley MLO modulates actin-dependent and actin-independent antifungal defence pathways at the cell periphery." Plant Physiol **144**(2): 1132–1143.
- Milligan, S. B., J. Bodeau, et al. (1998). "The root knot nematode resistance gene Mi from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes." Plant Cell **10**(8): 1307-1319.
- Mitreva, M., M. L. Blaxter, et al. (2005). "Comparative genomics of nematodes." Trends Genet **21**(10): 573-581.



- Moffett, P. G. Franham, et al. (2002). "Peart, J.; Baucombe, D.C. Interaction between domains of a plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death." *EMBO J* **21**(17):4511-4519.
- Molloy, S. (2007). "Immune evasion - First evidence of prokaryotic RNAi?" *Nat Rev Microbiol* **5**(5): 329-329.
- Mukhopadhyay, A. and H. A. Tissenbaum (2007). "Reproduction and longevity: secrets revealed by *C. elegans*." *Trends Cell Biol* **17**(2): 65-71.
- Nakashita, H., M. Yasuda, et al. (2003). "Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice." *Plant J* **33**(5): 887-898.
- Napoli, C., C. Lemieux, et al. (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans." *Plant Cell* **2**(4): 279-289.
- Niebel, A., G. Gheysen, et al. (1994). "Plant-cyst nematode and plant-root-knot nematode interactions." *Parasitol Today* **10**(11): 424-430.
- Nurnberger, T. and V. Lipka (2005) "Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon." *Mol Plant Pathol* **6** (3): 335-345.
- Okinaka, Y., K. Mimori, et al. (1995). "A Structural Model for the Mechanisms of Elicitor Release from Fungal Cell Walls by Plant Beta-1,3-Endoglucanase." *Plant Physiol* **109**: 839-845.
- Paal, J., H. Henselewski, et al. (2004). "Molecular cloning of the potato Gro1-4 gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach." *Plant J* **38**(2): 285-297.
- Park, H. C., M. L. Kim, et al. (2007). "Pathogen-induced binding of the soybean zinc finger homeodomain proteins GmZF-HD1 and GmZF-HD2 to two repeats of ATTA homeodomain binding site in the calmodulin isoform 4 (GmCaM4) promoter." *Nucleic Acids Res* **35**(11): 3612-3623.
- Parkinson, J., M. Mitreva, et al. (2004). "A transcriptomic analysis of the phylum Nematoda." *Nat Genet* **36**(12): 1259-1267.
- Perry, R. N. (1996). "Chemoreception in plant parasitic nematodes." *Annu Rev Phytopathol* **34**: 181-199.
- Pieterse, C.M.J., S. Van der Ent, et al (2007) "The role of ethylene in rhizobacteria-induced systemic resistance (ISR)" *Adv Plant Ethyl Res.* 325-331
- Plomin R. and L.C. Schalkwyk. (2007). "Microarrays" *Dev Sci* **10**(1): 19-23.
- Polisky B. (1988). "ColE1 replication control circuitry: sense from antisense." *Cell*. **55**(6):929-932.
- Potenza, C., S. H. Thomas, et al. (2001). "Genes induced during early response to *Meloidogyne incognita* in roots of resistant and susceptible alfalfa cultivars." *Plant Sci* **161**(2): 289-299.
- Qin, L., U. Kudla, et al. (2004). "Plant degradation: A nematode expansin acting on plants." *Nature* **427**(6969): 30-30.
- Ralph, S., J. Y. Park, et al. (2006). "Dirigent proteins in conifer defense: gene discovery, phylogeny, and differential wound- and insect-induced expression of a family of DIR and DIR-like genes in spruce (*Picea* spp.)." *Plant Mol Biol* **60**(1): 21-40.
- Resende, M.L., S.M.L. Salgado et al. (2003) "Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos". *Fitopatol Bras* **28**:123-130
- Robatzek, S. (2007). "Vesicle trafficking in plant immune responses." *Cellular Microbiology* **9**(1): 1-8.

- Roh, J.Y., J.Y Choi, et al. (2007) “*Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control.” Microbiol Biotechnol 17(4):547-59.
- Romeis, T., P. Piedras, et al. (2000). "Resistance Gene-Dependent Activation of a Calcium-Dependent Protein Kinase in the Plant Defense Response." The Plant Cell 12: 803–815.
- Rosso, M. N., M. P. Dubrana, et al. (2005). "Application of RNA interference to root-knot nematode genes encoding esophageal gland proteins." Mol Plant Microbe Interact 18(7): 615-620.
- Rosso, M. N., B. Favery, et al. (1999). "Isolation of a cDNA encoding a beta-1,4-endoglucanase in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and expression analysis during plant parasitism." Mol Plant Microbe Interact 12(7): 585-591.
- Rostoks, N., D. Schmierer, et al. (2003). "Barley putative hypersensitive induced reaction genes: genetic mapping, sequence analyses and differential expression in disease lesion mimic mutants." Theor Appl Genet 107(6): 1094-1101.
- Rouhier, N., E. Gelhaye, et al. (2004). "Poplar Peroxiredoxin Q. A Thioredoxin-Linked Chloroplast Antioxidant Functional in Pathogen Defense." Plant Physiology 134: 1027–1038.
- Sasser, J. N. and D. W. Freckman (1986). "A World Perspective on Nematology - the Role of the Society." J Nematol 18(4): 596-596.
- Seah, S., C. Miller, et al. (2000). "Root responses to cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*) in hosts with different resistance genes." New Phytol 146(3): 527-533.
- Seah, S., J. Yaghoobi, et al. (2004). "The nematode-resistance gene, Mi-1, is associated with an inverted chromosomal segment in susceptible compared to resistant tomato." Theor Appl Gen 108(8): 1635-1642.
- Selth, L. A., S. C. Dogra, et al. (2006). "Identification and characterization of a host reversibly glycosylated peptide that interacts with the Tomato leaf curl virus V1 protein." Plant Mol Biol 61: 297–310.
- Shabalina, S. A. and E. V. Koonin (2008). "Origins and evolution of eukaryotic RNA interference." Trends Ecol Evol. 23(10):578-587.
- Shah, J.M., V. Raghupathy, et al. (2009) “Enhanced sheath blight resistance in transgenic rice expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*.” Biotechnol Lett 31(2):239-244.
- Shi, B. J. and G.L. Wang. (2008). “Comparative study of genes expressed from rice fungus-resistant and susceptible lines during interactions with *Magnaporthe oryzae*”. Gene 427: 80-85.
- Shingles, J., C. J. Lilley, et al. (2007). "Meloidogyne incognita: molecular and biochemical characterisation of a cathepsin L cysteine proteinase and the effect on parasitism following RNAi." Exp Parasitol 115(2): 114-120.
- Smant, G., J. P. Stokkermans, et al. (1998). "Endogenous cellulases in animals: isolation of beta-1, 4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes." Proc Natl Acad Sci U S A 95(9): 4906-4911.
- Sobczak, M., A. Avrova, et al. (2005). "Characterization of susceptibility and resistance responses to potato cyst nematode (*Globodera* spp.) infection of tomato lines in the absence and presence of the broad-spectrum nematode resistance Hero gene." Mol Plant Microbe Interact 18(2): 158-168.
- Schaff J.E., D.M. Nielsen, et al. (2007) “Comprehensive Transcriptome Profiling in Tomato Reveals a Role for Glycosyltransferase in Mi-Mediated Nematode Resistance”. Plant Physiol 144 : 1079–1092.

- Shah, J.M., V. Raghupathy, et al. (2009) "Enhanced sheath blight resistance in transgenic rice expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*." Biotechnol Lett 31(2):239-244.
- Shi, B. J. and G.L. Wang. (2008). "Comparative study of genes expressed from rice fungus-resistant and susceptible lines during interactions with *Magnaporthe oryzae*". Gene 427: 80-85.
- Spiegel, Y. and E. Cohn (1985). "Chitin is present in the gelatinous matrix of *Meloidogyne*." Rev Nematol 8: 179-190.
- Spiegelman, W.G, L.F. Reichardt, et al. (1972). "Bidirectional Transcription and the Regulation of Phage  $\lambda$  Repressor Synthesis" Proc Natl Acad Sci 69 (11): 3156-3160.
- Steeves, R. M., T. C. Todd, et al. (2006). "Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction." Func Plant Biol 33(11): 991-999.
- Thurau, T., S. Kifle, et al. (2003). "The promoter of the nematode resistance gene Hs1pro-1 activates a nematode-responsive and feeding site-specific gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and *Arabidopsis thaliana*." Plant Mol Biol 52(3): 643-660.
- Tian, B., J. Yang, et al. (2007). "Role of an extracellular neutral protease in infection against nematodes by *Brevibacillus laterosporus* strain G4." Appl Microbiol Biotechnol 74(2): 372-380.
- Trudgill, D. L. and V. C. Blok (2001). "Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens." Annu Rev Phytopathol 39: 53-77.
- Tytgat, T., B. Vanholme, et al. (2004). "A new class of ubiquitin extension proteins secreted by the dorsal pharyngeal gland in plant parasitic cyst nematodes." Mol Plant Microbe Interact 17(8): 846-852.
- Tytgat, T., I. Vercauteren, et al. (2005). "An SXP/RAL-2 protein produced by the subventral pharyngeal glands in the plant parasitic root-knot nematode *Meloidogyne incognita*." Parasitol Res 95(1): 50-54.
- Urwin, P. E., C. J. Lilley, et al. (2002). "Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference." Mol Plant Microbe Interact 15(8): 747-752.
- Urwin, P. E., C. J. Lilley, et al. (1997). "Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin." Plant J 12: 455-461.
- Van der Vossen, E. A., J. N. Van der Voort, et al. (2000). "Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode." Plant J 23(5): 567-576.
- Vanholme, B., J. De Meutter, et al. (2004). "Secretions of plant-parasitic nematodes: a molecular update." Gene 332: 13-27.
- Vos, P., G. Simons, et al. (1998). "The tomato Mi-1 gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids." Nat Biotechnol 16(13): 1365-1369.
- Wang, X., D. Meyers, et al. (1999). "In planta localization of a beta-1,4-endoglucanase secreted by *Heterodera glycines*." Mol Plant Microbe Interact 12(1): 64-67.
- Wang, X. H., M. G. Mitchum, et al. (2005). "A parasitism gene from a plant-parasitic nematode with function similar to CLAVATA3/ESR (CLE) of *Arabidopsis thaliana*." Mol Plant Pathol 6(2): 187-191.

- Wei, J. Z., K. Hale, et al. (2003). "*Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2760-2765.
- Williamson, V. M. (1998). "Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use." Ann Rev Phytopathol **36**: 277-293.
- Williamson, V. M. and C. A. Gleason (2003). "Plant-nematode interactions." Curr Opin Plant Biol **6**(4): 327-333.
- Williamson, V. M. and A. Kumar (2006). "Nematode resistance in plants: the battle underground." Trends Genet **22**(7): 396-403.
- Xue, Y., R. Peng et al. (2009) "Yeast heat-shock protein gene HSP26 enhances freezing tolerance in Arabidopsis." J Plant Physiol doi:10.1016/j.jplph.2008.11.013
- Yadav, B. C., K. Veluthambi, et al. (2006). "Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection." Mol Biochem Parasitol **148**(2): 219-222.
- Yaish, M.W., L.E. Saenz de Miera, et al. (2004). "Perez de la Vega, M. Isolation of a family of resistance gene analogue sequence of the nucleotide binding site (NBS) type from lens species." Genome **47**(4):650-659.
- Yan, Y., G. Smant, et al. (2001). "Functional screening yields a new beta-1,4-endoglucanase gene from *Heterodera glycines* that may be the product of recent gene duplication." Mol Plant Microbe Interact **14**(1): 63-71.
- Zheng, J., L. Jiang, et al. (2004). "Three trichodorid species (Nematoda : Trichodoridae) occurring in China." Helminthol **41**(1): 39-44.

## ANEXO. Publicações.

### Artigos

Marra, B.M., **Souza, D.S.L.**, Aguiar, J.N., Firmino, A.P., Silva, F.B., Almeida, C.D.S., Cares, J.E., Coutinho, M.V., Martins-de-Sá, C., Franco, O.L., Grossi-de-Sá, M.F. (2009) “Protective effects of a cysteine proteinase propeptide expressed in transgenic soybean roots” Peptides, *In Press, Accepted Manuscript*.

**Souza, D.S.L.**, Grossi-de-Sá, M.F., Silva, L.P., Franco, O.L., Gomes Júnior, J.E., Rocha, T.L., Magalhães, C.P., Marra, B.M., Grossi-de-Sa, M., Romano, E., Sá, C. M., Kombrink, E., Jimenez, A.V., Abreu, L.R.D. (2008) “Identification of a novel -N-acetylhexosaminidase (Pcb-NAHA1) from marine Zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa, Zoanthidea). Prot Express Purifi. 58: 61-69.

Mehta, A., Brasileiro, A.C. M., **Souza, D.S. L.**, Romano, E., Campos, M.A., Grossi-de-S, M. F., Silva, M. S., Franco, O. L., Fragoso, R.R., Bevitori, R., Rocha, T.L. (2008). “Plantpathogen interactions: what is proteomics telling us?” FEBS J. 275:3731-3746.

Mehta, A., Magalhaes B.S., **Souza D.S.L.**, Vasconcelos, E.A.R., Silva, L.P., Grossi-de-Sa, M.F., Franco, O.L., Costa PHA., Rocha, T.L. (2008). “Rooteomics: the challenge of discovering defense-related proteins in plants.” Curr Prot Pep Sci 9: 108-115.

Silva, F. B., Monteiro, A.C.S., Sarto, R.P.D., MARRA, B.M., Figueira, E. L.Z. , Franco, O.L., Oliveira, G.R., Rocha, T.L., **Souza, D.S.L.**, Silva, M.C.M., SA, M.F.G. (2007) “Proregion of *Acanthoscelides obtectus* cysteine proteinases: a novel peptide with enhanced activity selectivity toward endogenous enzymes.” Peptides 366:113-115.

Magalhães, C.P., Fragoso, R.R., **Souza, D.S.L.**, Barbosa, A.E.A.D., Silva C.P., Finardi Filho, F., Silva, M.C.M. , Rocha, T.L., Franco, O.L., Grossi-de-As, M.F. (2007). “Molecular characterization of a trypsin-like serine proteinase from larval *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). Arch Insect Biochem Physiol. 66: 169-182.

### Patente publicada

Marra, B.M. ; Sá, M.F.G., **Souza, D.S.L.** Ginani M. (2007) “Processo De Uso Do Abrandador Quitosana, Como Removedor De Congêneres Secundários Tóxicos De Destilados, Principalmente Da Aguardente De Cana Ou Cachaça” **PI 0601586 -7 A**

### **Comunicado técnico.**

Rocha, T.L., Costa, P.H.A., Magalhães, J.C.C., Carneiro, R.M.D.G., Oliveira Neto, O.B., **Souza, D.S.L.**, Firmino, A.A.P, Fragoso, R.R., Vasconcelos, E.A.R., Cia, E., Grossi-De-Sá, M.F. Análise proteômica de raízes de algodoeiro resistente e susceptível infectadas com *Meloidogyne incognita*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007, 11 p. (Comunicado Técnico 162).

### **Documentos da EMBRAPA**

Rocha T.L., Evaristo R.G.S., Silva, L.P., **Souza, D.S.L.**, Marra, B.M., Costa, P.H.A., Magalhães, J.C.C., Silva, M.C.M., Grossi-De-Sá, M.F. Metabolômica: Aplicações e Perspectivas. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006, 38 p. (Documentos 189).

### **Capítulo de livro**

Romano, E., **Souza, D.S. L.**, Grossi-de-Sá, M.F. Estratégias Moleculares para Contenção de Organismos Geneticamente Modificados. In: Betânia F. Quirino. (Org.). REVOLUÇÃO DOS TRANSGÊNICOS. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda, 2008, v. 1, p. 1-172.

### **Textos em jornais de notícias/revistas**

Grossi-de-Sá, M.F., Oliveira-Neto, O.B., **Souza, D.S.L.**, Romano, E. Biotecnologia do algodão no Brasil: os benefícios do algodão transgênico. Cotton business, p. 30 - 33, 01 abr. 2007.

