

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO GÊNICA EM RESPOSTA AO DANO
CAUSADO POR *Plutella xylostella* (L., 1758) EM PLANTAS
DE REPOLHO INOCULADAS COM *Kluyvera ascorbata*.**

**Paula Cristina Brunini Crialesi
Bióloga**

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Setembro de 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO GÊNICA EM RESPOSTA AO DANO
CAUSADO POR *Plutella xylostella* (L., 1758) EM PLANTAS
DE REPOLHO INOCULADAS COM *Kluyvera ascorbata*.**

Paula Cristina Brunini Crialesi

Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

Co-orientador: Prof. Dr. Robson Thomaz Thuler

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Setembro de 2009

C928e Crialesi, Paula Cristina Brunini
Expressão gênica em resposta ao dano causado por *Plutella xylostella* (L., 1758) em plantas de repolho inoculadas com *Kluyvera ascorbata* / Paula Cristina Brunini Crialesi. -- Jaboticabal, 2009
xiii, 75 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Manoel Victor Franco Lemos
Banca examinadora: Janete Aparecida Desidério Sena, João Roberto Spotti Lopes
Bibliografia

1. *Kluyvera ascorbata*. 2. *Brassica oleracea* var. *capitata*. 3. *Plutella xylostella*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 635.34:632.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

PAULA CRISTINA BRUNINI CRIALESI – nascida em 18 de abril de 1979, na cidade de São Paulo - SP, graduada no curso de Biologia (Licenciatura Plena) pelo Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto - SP, em dezembro de 2003. Em abril de 2005 finalizou o curso de Especialização “Latu Sensu”, em Didática: A Prática Escolar nos Diferentes Níveis de Ensino; pela Faculdade de Educação São Luís, Jaboticabal – SP. Foi bolsista de Treinamento Técnico – TT-3 da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) em 2006, pela Instituição: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), na qual contribuiu com o desenvolvimento do Projeto Temático intitulado “Manejo de pragas com a utilização de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis*”, financiado pela FAPESP. Em março de 2007 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal, desenvolvendo a pesquisa da dissertação como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES).

Dedicação é a capacidade de se entregar à realização de um objetivo.
Não conheço ninguém que tenha progredido na carreira sem trabalhar pelo menos doze horas por dia nos primeiros anos.
Não conheço ninguém que conseguiu realizar seu sonho sem sacrificar feriados e domingos pelo menos uma centena de vezes.
Da mesma forma, se você quiser construir uma relação amigável com seus filhos, terá de se dedicar a isso, superar o cansaço, arrumar tempo para ficar com eles, deixar de lado o orgulho e o comodismo.
Se quiser um casamento gratificante, terá de investir tempo, energia e sentimentos nesse objetivo.
O sucesso é construído à noite! Durante o dia você faz o que todos fazem.
Mas, para conseguir um resultado diferente da maioria, você tem de ser especial. Se fizer igual a todo mundo, obterá os mesmos resultados.
Não se compare à maioria, pois, infelizmente, ela não é modelo de sucesso.
Se você quiser atingir uma meta especial, terá de estudar no horário em que os outros estão tomando chope com batatas fritas.
Terá de planejar, enquanto os outros permanecem à frente da televisão.
Terá de trabalhar, enquanto os outros tomam sol à beira da piscina.
A realização de um sonho depende da dedicação.
Há muita gente que espera que o sonho se realize por magia.
Mas toda magia é ilusão.
A ilusão não tira ninguém do lugar onde está.
Ilusão é combustível de perdedores.

(Roberto Shinyashiki)

A *Deus*, por me permitir acordar a cada novo dia de muitas bênçãos, pelo pleno funcionamento do meu corpo físico, mental, espiritual e emocional, por iluminar meu caminho atendendo minhas orações pedindo força e sabedoria para continuar.

Ao meu pai *Verdino Crialesi*, por me apoiar e incentivar, pela presença em todos os momentos de minha vida, pelo amor, educação e principalmente por acreditar em mim. *Te amo!*

A minha mãe *Maria Martha Brunini Crialesi*, por estar ao meu lado, pela paciência, compreensão, educação e amor que me dedicou. *Te amo!*

A minha irmã *Marina Brunini Crialesi*, pelo companheirismo, fidelidade, apoio, paciência, carinho e amor! *Te amo meu anjo!!!*

DEDICO

AGREDECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, pela orientação, ensinamentos, confiança, apoio, disponibilidade e oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Robson Thomaz Thuler pela co-orientação, credibilidade, incentivo, apoio e pelos ensinamentos e oportunidade de crescimento.

A Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena, pela amizade e profissionalismo, pela participação como membro da banca examinadora do exame da dissertação e pelas sugestões para o enriquecimento deste trabalho.

O Prof. Dr. Sergio Antonio de Bortolli, pela participação no exame geral de qualificação e pelas sugestões importantes para a elaboração do artigo científico.

Ao Prof. Dr. Irlan Leite de Abreu, pela amizade, apoio e participação no exame geral de qualificação e pelas sugestões importantes para a elaboração do artigo científico.

Ao Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes pela participação como membro da banca examinadora do exame da dissertação e pelas sugestões para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rinaldo César de Paula, que coordenou o curso de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) no primeiro ano do meu mestrado, pela disponibilidade e atenção.

Ao Prof. Dilermando Perecin que coordenou o curso de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) a partir do segundo ano do meu mestrado, pela disponibilidade e compreensão nos pedidos de auxílio.

À Eliane Cristina da Cunha Alves, pela amizade, profissionalismo e auxílio nas técnicas realizadas neste estudo.

A Profa. Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos e à Profa. Dra. Maria Inês Tiraboshi Ferro, por permitirem o uso dos equipamentos de seus respectivos laboratórios durante o desenvolvimento dos experimentos.

A Ana Paula Souto que na forma de estagio curricular me auxiliou no desenvolvimento das técnicas com RNA e construções das bibliotecas de cDNA. Sua ajuda foi muito importante Ana, muito obrigada por tudo e principalmente pela amizade.

A pós-doutoranda Ana Maria Guidelli Thuler, pelo valioso auxílio durante o desenvolvimento desta pesquisa, pela amizade e paciência.

A minha amiga e companheira de mestrado Camila Chiaradia Davolos, pela amizade, disposição, incentivo e pelas palavras. Obrigada também pelo auxílio no sequenciamento dos clones deste estudo. Juntas aprendemos muito mais; sempre! (Vamos que vamos..., não pode ficar parada...!)

A todos que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), Eliane, Ana Maria, Irlan, Juliana Costa, Marta, Janaína, Viviane, Larissa, Juliana Rossi, Juliana Xavier, Najara, Camila, Vivian, Suzana, Emeline, Fernanda, Lúcia, Daniel, Sandrinha; pela amizade, palavras, experiências trocadas e principalmente pela oportunidade de convívio que tanto auxiliou no meu crescimento pessoal e profissional.

A todos os colegas e professores da pós-graduação, pelos ensinamentos, e experiências partilhadas.

Aos funcionários do departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, em especial a Maria Lucina, Aldo e Ivana; pela amizade, auxílio e disposição.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação e da Biblioteca da UNESP/FCAV, pela disponibilidade e atenção na prestação de serviços.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

Agradeço a uma pessoa especial que passou a fazer parte de minha vida no momento de finalização desta pesquisa e dedicou-me tanto amor, carinho, atenção e paciência num relacionamento sincero e maduro, a você meu coração Ronaldo Legori.

A Maria de Lourdes e Rosiane Legori que me acolheram de forma tão carinhosa, obrigada pela amizade e oportunidade de convívio.

A minha amiga Renata Mônico de Mesquita pela amizade sincera, carinho, apoio, disponibilidade em qualquer situação, pelas palavras e paciência. Te adoro Amiga!

Aos meus amigos e amigas, Thais, Tiago, João, Junior, Gisele, Priscila, Larissa, Felipe, Anita, Lídia, Ana Lúcia, Maria Elisa, Morgana, Taisa; pela amizade e compreensão nos momentos em que faltei.

A toda minha família, pelo carinho e incentivo.

Obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

"A única maneira de ter amigos é ser amigo".
(R. Waldo)

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 <i>Plutella xylostella</i>	4
2.2 Resistência Induzida nas plantas.....	6
2.3 Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCP).....	9
2.4 Biblioteca de DNA complementar – cDNA.....	12
3. OBJETIVO.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Bacterização das sementes de repolho.....	16
4.2 Plantio, transplantio e infestação das plantas de repolho.....	17
4.3 Coleta e armazenamento do material vegetal.....	19
4.4 Extração do RNA total.....	20
4.5 Isolamento do RNA mensageiro – mRNA.....	22
4.6 Construção da biblioteca de cDNA.....	23
4.6.1 Síntese da 1ª fita de cDNA.....	23
4.6.2 Síntese da 2ª Fita de cDNA.....	24
4.6.3 Adição do Sal I-Adapter.....	24
4.6.4 Digestão com Not I.....	25
4.6.5 Fracionamento por tamanho dos fragmentos de cDNA em Coluna de Cromatografia.....	26
4.6.6 Ligação dos fragmentos de cDNA ao Vetor.....	27
4.7 Transformação por choque térmico.....	28
4.8 Extração do DNA plasmidial.....	29
4.9 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	30
4.10 Sequenciamento.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34

5.1 Integridade do RNA total e mRNA.....	34
5.2 Bibliotecas de cDNA.....	36
5.3 Extração do DNA plasmidial, PCR e seleção dos clones.....	37
5.4 Sequenciamento e análise das seqüências.....	41
6. CONCLUSÕES.....	47
7. REFERÊNCIAS.....	48
8. APÊNDICE.....	64

EXPRESSÃO GÊNICA EM RESPOSTA AO DANO CAUSADO POR *Plutella xylostella* (L., 1758) EM PLANTAS DE REPOLHO INOCULADAS COM *Kluyvera ascorbata*.

RESUMO - A traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*) é uma praga que ataca culturas de brássicas, causando enormes prejuízos econômicos aos agricultores. O aparecimento de populações resistentes a inseticidas tem dificultado seu manejo, fazendo-se necessário a busca por alternativas de controle que viabilizem a economia do custo de produção, preservando o ambiente de inseticidas químicos em altas doses. As plantas possuem um mecanismo constitutivo de resistência que atua na sua defesa frente às diferentes adversidades bióticas e abióticas, o que representa altos gastos metabólicos. O mecanismo de resistência pode ser melhorado com a indução de resistência por um ou mais elicitores, como é o caso das bactérias promotoras de crescimento. O objetivo deste estudo foi detectar sequências gênicas expressas em resposta à indução de resistência de repolho à traça das crucíferas. A bactéria utilizada como indutora das respostas de defesa foi a *Kluyvera ascorbata* devido à ação já descrita anteriormente com repolho e traça-das-crucíferas, onde ficou evidente sua influência na defesa contra essa praga. Por meio do sequenciamento de cDNA foi possível identificar uma significativa alteração no metabolismo de plantas que abrigavam esta bactéria, suprimindo da ação de muitos genes, durante o processo de defesa da planta contra o estresse causado pela injúria de lagartas de *P. xylostella*.

Palavras-Chave: BPCP, traça-das-crucíferas, sequenciamento, indução de resistência

GENE EXPRESSION IN RESPONSE TO DAMAGE CAUSED BY *Plutella xylostella* (L., 1758) ON CABBAGE PLANTS INOCULATED WITH *Kluyvera ascorbata*.

SUMMARY – The diamondback moth *Plutella xylostella* is a pest that attacks brassics causing great economic losses to the growers. The rise of resistant populations to the chemical insecticides imposes difficulties on this pest management, so the search of other ways to overcome this situation became quite relevant so as to help to reduce production costs and at the same time avoiding the use of high dosage of the commonly used pesticides. Plants exhibit a constitutive resistance mechanism that acts favoring their defense towards biotic and abiotic stress situations, which involves high metabolic energetic challenges. The defense mechanisms may be improved with the induction of resistance by a number of different elicitors, such as the use of plant growth promoting bacteria. The aim of the present work was to detect plant gene sequences in response to cabbage resistance induction against the diamondback moth. *Kluyvera ascorbata* was used to induce the plant's growth promotion elicitor due to previously described influence. Analyzing DNA sequencing procedures from cDNA library samples, it was possible to observe drastic differences on the plants metabolism when such bacteria was used, either by suppressing the action of several genes while the plant's defense mechanisms was in action against injuries caused by *P. xylostella* larvae.

Keywords: PGPB, diamondback moth, DNA sequencing, resistance induction

1. INTRODUÇÃO

A traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) (DICKSON et al., 1990) é conhecida por ser a principal praga em plantas da família Brassicaceae, tendo como representantes de importância econômica, o repolho, couve, couve-flor, brócolis, dentre outros.

Esta espécie se destaca como uma praga de maior expressão econômica especialmente em culturas de repolho, tanto no Brasil como em outros países produtores (FRANÇA & MEDEIROS, 1998; CASTELO BRANCO et al., 1996; TALEKAR & SHELTON, 1993), podendo ocasionar prejuízos de até 100% nas cabeças, classificadas como inadequadas para o comércio (BARROS et al., 1993; BEZERRIL & CARNEIRO, 1992; CHEN et al., 1996; OOI & KELDERMAN, 1979).

No Brasil a sua ocorrência é constatada em regiões produtoras durante praticamente todo o ano (CASTELO BRANCO & GUIMARÃES, 1989; BARROS et al., 1993; MELO et al., 1994), principalmente devido ao seu ciclo curto e alto potencial reprodutivo, o que determina grande número anual de gerações (ULMER et al., 2002).

Além do alto potencial biótico, o aparecimento de populações da traça-das-crucíferas resistentes aos inseticidas tem concorrido para dificultar o manejo desta praga. GEORGHIOU & LAGUNES-TEJADA (1991) relataram que em 1989 já eram conhecidos cerca de 50 inseticidas químicos aos quais *P. xylostella* apresentava resistência, sendo que no Brasil essa resistência a inseticidas foi relatada por CASTELO BRANCO & GATEHOUSE (1997), em relação a diferentes princípios ativos.

De acordo com CAMPOS et al., (1997), o uso indiscriminado de inseticidas sem prévia estimativa dos danos da *P. xylostella* nos cultivos tem aumentado os custos da produção, eliminando os inimigos naturais e selecionando populações da praga com resistência a diversos inseticidas pertencentes a vários grupos de ingredientes ativos.

Como alternativa aos inseticidas, a utilização de cultivares resistente tem assumido relevante papel no manejo da traça-das-crucíferas (LIN et al., 1983; LIN et al., 1984; EIGENBRODE et al., 1990; ULMER et al., 2002).

As características de resistência, descritas até então, se referem a mecanismos constitutivos da planta, que representam altos custos metabólicos. No entanto, além da resistência constitutiva, tem sido mencionado que injúrias mecânicas ou causadas por insetos, além da infecção por microrganismos podem desencadear a produção e/ou acúmulo de compostos como quitinases e glucanases, entre outros, envolvidos na resistência induzida (RI), que ocorre tanto contra patógenos como contra pragas (FIDANTSEF et al., 1999; STOUT et al., 1999; BOSTOCK, 1999; FELTON & KORTH, 2000; RAMAMOORTHY et al., 2001; SAMIYAPPAN, 2003).

A RI desencadeada por processos, tanto bióticos como abióticos, representa custos metabólicos mais baixos, sem que aconteçam grandes modificações fisiológicas na planta e, muitas vezes, é altamente eficiente (VALLAD & GOODMAN, 2004).

Microrganismos como fungos, vírus e bactérias estão relacionados à indução de resistência em plantas e podem ser epifíticos (que colonizam externamente as plantas) (HALLMANN et al., 1997; AZEVEDO et al., 2000) ou endofíticos (que, durante pelo menos um período do seu ciclo vital, habitam o interior da planta, sem causar danos representativos a ela) (HALLMANN et al., 1997).

A maioria dos relatos de RI mediada por microrganismos está relacionada às Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCP), organismos que colonizam epifítica ou endofiticamente qualquer parte dos vegetais, promovendo efeitos benéficos como o maior desenvolvimento de plantas, resistência a doenças e artrópodes, além de adaptação a estresses ambientais (HALLMANN et al., 1997; MARIANO & ROMEIRO, 2000; TOMCZYCK, 1999; ROMEIRO, 2000; STURZ & NOWAK, 2000; MEDEIROS et al., 2001). No Brasil a cultura de repolho tem recebido especial atenção e resultados promissores foram obtidos no controle da

traça-das-crucíferas pela utilização das bactérias endofíticas *Alcaligenes piechaudii* e *Kluyvera ascorbata* (THULER et al., 2006).

Quando plantas são previamente expostas a um elicitor, seus tecidos reagem mais rapidamente e com mais eficiência às tentativas de colonização por um patógeno virulento. Diz-se que a planta foi levada ao estado de indução, estado este denominado por STICHER et al. (1997) de “condicionamento” ou “sensibilização”.

Diversos estudos realizados com o objetivo de esclarecer os mecanismos envolvidos na indução de resistência têm apresentado resultados contrastantes. Isto sugere que em cada espécie vegetal esses mecanismos se expressam de maneira diferenciada, fazendo-se necessário a descoberta das rotas em que atuam esses compostos no interior da planta para ativação da resistência.

Muitos testes foram realizados com vários isolados de BPCP, no entanto, informações sobre a ação na planta, bioquímica ou molecularmente, são ainda incipientes. Neste estudo, evidenciamos as alterações metabólicas ocorridas em plantas inoculadas com a BPCP *K. ascorbata* em culturas de brássicas infestadas por larvas de *P. xylostella*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Plutella xylostella* (L., 1758)

A traça-das-crucíferas é considerada a praga que causa maiores prejuízos em brássicas, com ocorrência frequente em todas as áreas de cultivo no mundo (TALEKAR & SHELTON, 1993; CASTELO BRANCO et al., 2001; DIAS et al., 2004, THULER, 2006).

O repolho se destaca como a espécie mais importante dentre as brássicas, devido a sua ampla distribuição, facilidade na produção e grande consumo (SILVA JÚNIOR, 1987). Esta praga causa sérios danos à cultura, depreciando o produto, interferindo no crescimento da planta e até mesmo provocando sua morte ou perda total nos campos de produção (CASTELO BRANCO & GATEHOUSE, 2001; MONNERAT et al., 2004).

Assim que eclodem, as larvas penetram no interior das folhas onde ficam durante 2 ou 3 dias alimentando-se de células do parênquima. Em seguida abandonam a galeria e passam a alimentar-se da epiderme inferior da folha. Com isso, inutilizam as folhas para o consumo e comercialização (CASTELO BRANCO & VILLAS BOAS, 1997; GALLO et al., 2002; MONNERAT, 1995). Se as lagartas se alimentarem das folhas novas antes da formação da cabeça de repolho, este pode apresentar sérias deformações e a não formação da cabeça (MAU & KESSING, 2007).

MUSSURY et al. (2002) relataram que *P. xylostella* tem sido também considerada uma das principais pragas em plantios de canola, causando danos desde a fase vegetativa até o final do florescimento, destruindo, muitas vezes, a haste floral.

Algumas das dificuldades observadas no controle desta praga se devem às áreas de cultivo coexistirem durante todo o ano, com plantas de idades diferentes, proporcionando à praga quantidade abundante e contínua de alimento (IMENES et al., 2002).

O método de controle mais utilizado em áreas de cultivo de brássicas ainda é o químico, sendo que aparentemente é o que traz os melhores resultados, de forma rápida, prática e eficiente na redução dos prejuízos ocasionados pela praga (CASTELO BRANCO et al., 2003; DIAS et al., 2004). Contudo, o emprego deste método de forma contínua e em grandes quantidades traz riscos de intoxicação aos produtores, animais domésticos e selvagens podendo também deixar resíduos nos alimentos que são consumidos em sua maioria *in natura* ou com pouco preparo, além da contaminação do ambiente e, principalmente, dos inimigos naturais (CHEN et al., 1996; MONNERAT et al., 2004).

Apesar da eficiência do método, a utilização inadequada do controle químico, vem ocasionando o aumento da frequência de resistência de insetos, dentre os quais GEORGHIOU & LAGUNES-TEJADA (1991) apontaram a traça-das-crucíferas como uma das espécies com maior número de casos de resistência.

O aparecimento de populações da traça-das-crucíferas resistentes aos inseticidas tem concorrido para dificultar o manejo desta praga. GEORGHIOU & LAGUNES-TEJADA (1991) relataram que em 1989 já eram conhecidos cerca de 50 inseticidas químicos aos quais *P. xylostella* apresentava resistência, sendo que no Brasil essa resistência a inseticidas foi relatada por CASTELO BRANCO & GATEHOUSE (1997), em relação a diferentes princípios ativos.

Como alternativa aos inseticidas, a utilização de cultivares resistentes tem assumido relevante papel no manejo da traça-das-crucíferas (LIN et al., 1983; LIN et al., 1984; EIGENBRODE et al., 1990; ULMER et al., 2002).

Essa resistência de plantas a *P. xylostella* tem sido avaliada com base em duas características principais: a cerosidade da superfície foliar, determinada pelo teor de alceno, e o teor de sinigrina presente nas folhas (LIN et al., 1983; LIN et al., 1984; EIGENBRODE et al., 1990; EIGENBRODE et al., 1991; SPENCER, 1996; SPENCER et al., 1999; ULMER et al., 2002). Entretanto, EIGENBRODE et al. (1990) consideram que os mecanismos envolvidos nas características de resistência relacionadas à quantidade de cera presente na superfície foliar não

são conclusivos e sugerem que a característica pode estar ligada também a estímulos químicos como toxinas ou substâncias que causam a clássica antibiose.

Cresce a cada ano a necessidade de serem estudados métodos alternativos de controle que se ajustem ao manejo integrado de pragas devido à importância da traça-das-crucíferas, que causa perdas significativas na cultura da couve e problemas ligados às medidas de controle, pois muitas vezes, devido à proximidade da época de colheita, não se podem utilizar inseticidas químicos (LARA, 1991).

2.2 Resistência Induzida nas plantas

As plantas são constantemente expostas a condições ambientais desfavoráveis como temperaturas extremas, falta de água, salinidade, poluição e ataques de patógenos, que afetam o seu crescimento, desenvolvimento e produtividade. Para que estas sobrevivam e se desenvolvam perante todas as adversidades encontradas durante seu ciclo de vida, elas desenvolveram uma complexa rede de sinalizações que as protege de condições ambientais adversas (KOVTON et al., 2000).

As plantas usam uma variedade de sistemas de defesa que incluem barreiras físicas, químicas pré-existent e defesas induzidas. Dois processos diferentes estão envolvidos na indução de defesa de plantas a patógenos e herbívoros, onde, genes de resistência de plantas reconhecem compostos liberados por insetos ou patógenos e ativam respostas de defesa e resistência específica para o organismo invasor ou acontece o reconhecimento de danos nos tecidos da planta provocado pelo agressor. O dano leva a mudanças químicas nas plantas, seguidas da produção de moléculas de sinalização que desencadeiam uma resposta de estresse generalizada (TURLINGS et al., 2000; DANGL & JONES, 2001; AUSUBEL, 2005; SCHMELZ et al., 2006; SMITH & BOYKO, 2007).

As respostas das plantas ao ataque por herbívoros ou patógenos são regidas por uma reorganização enorme de transcrição e expressão de um grande

conjunto de genes, incluindo aqueles com importância na defesa (AGRAWAL et al., 2003). Portanto, as plantas precisam ser capazes de identificar e priorizar cada via de sinalização a fim de montar a estratégia de defesa mais eficaz para minimizar danos correntes e futuros preservando o crescimento vegetativo e sucesso reprodutivo (KARBAN & BALDWIN, 1997; MENOSSI et al., 2008).

A produção de ácido salicílico (SA), ácido benzóico (BA), etileno (ET) e ácido jasmônico (JA), estão relacionados à resposta a fitopatógenos e insetos. Os sinais hormonais que navegam do tecido atacado por toda a planta incluem o JA e intermediários da via octadecanóide, ET e SA, entre outros (RYAN & PEARCE, 2001). A produção de vários compostos relacionados com defesa requer a sinalização por octadecanóide, JA e metil jasmonato, todos derivados do ácido linolênico (CREELMAN & MULLET, 1997).

Diversos relatos têm apontado que a via de sinalização do jasmonato é crucial para a proteção contra a agressão por insetos (OROZCO-CARDENAS et al 1993; BALDWIN, 1998; STOTZ et al., 2000).

O ET é um hormônio cuja exposição leva a muitas modificações na fisiologia e bioquímica das plantas, além de também estar envolvido na indução de defesa (KARBAN & BALDWIN, 1997).

O SA é responsável por uma importante sinalização de resistência a plantas contra patógenos, pois o aumento nos níveis endógenos de SA tem sido associado com a resposta de hipersensibilidade bem como a resistência sistêmica adquirida. O SA também induz a expressão de um conjunto de genes relacionados com a patogênese (SHAH et al., 1997).

Geneticistas, fisiologistas e ecologistas (THOMMA et al., 1998; REYMOND & FARMER, 1998; MALECK & DIETRICK, 1999; RYAN, 2000; BECKERS & SPOEL, 2006) afirmam que existe uma clara interação das vias de sinalização na regulação da expressão dos genes de defesa. Por exemplo, o SA pode inibir tanto a biossíntese do JA (PENA-CORTES et al., 1993) quanto sua percepção (DOARES et al., 1995).

As características de resistência, descritas até então, se referem a mecanismos constitutivos da planta, que representam altos custos metabólicos. No entanto, além da resistência constitutiva, tem sido mencionado que injúrias mecânicas ou causadas por insetos, além da infecção por microrganismos podem desencadear a produção e/ou acúmulo de compostos como quitinases e glucanases, entre outros, envolvidos na resistência induzida (RI), que ocorre tanto contra patógenos como contra pragas (FIDANTSEF et al., 1999; STOUT et al., 1999; BOSTOCK, 1999; FELTON & KORTH, 2000; RAMAMOORTHY et al., 2001). A RI desencadeada por processos, tanto bióticos como abióticos, representa custos metabólicos mais baixos, sem que aconteçam grandes modificações fisiológicas na planta e, muitas vezes, é altamente eficiente (VALLAD & GOODMAN, 2004).

Existem dois mecanismos de defesa induzida, bastante complexos que as plantas utilizam, denominados resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR).

A SAR é um tipo de resistência induzida em plantas contra a infecção por patógenos, que resulta na atuação de eliciadores que envolvem o acúmulo de PRPs (Proteínas Relacionadas com a Patogênese); sua indução é salicilato-dependente e pode resultar em alterações visuais, como necroses na planta que sofreu a indução e, geralmente, é elicitada por patógenos, substâncias naturais ou sintéticas (STICHER et al., 1997).

Na ISR, não há acúmulo de PRPs, pois a planta que sofreu indução não exibe alterações visuais (necrose), o agente indutor é, usualmente, um não-patógeno e sua indução não é salicilato-dependente, parecendo haver outra rota de sinalização mais associada aos jasmonatos e/ou etileno (PIETERSE et al., 1998; VAN LOON et al., 1998).

O conhecimento que se tem sobre sinais bioquímicos desencadeadores de eventos que culminam na resistência sistêmica induzida ainda é fragmentado (DELANEY et al., 1995; LAWTON et al., 1994; SHAH et al., 1997), baseado em sistemas-modelo envolvendo plantas transgênicas, como mutantes de

Arabidopsis sp. e ação de inibidores de rotas de síntese de certos compostos. Contudo, já existem evidências suficientes para certas hipóteses serem formuladas e certos conceitos básicos estabelecidos.

O tratamento com indutores tem a vantagem de ser livre de resíduo e não oferece risco à saúde humana e ao ambiente, podendo ser mais uma ferramenta do controle integrado de pragas.

2.3 Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCP)

Bactérias com capacidade de promover o crescimento de plantas são mundialmente conhecidas como "*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*" - PGPR (Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas), sendo definidas como bactérias que colonizam raízes de plantas e promovem um aumento no desenvolvimento e na produção do hospedeiro, devido à promoção de crescimento (efeito direto) ou biocontrole de doenças e pragas (efeito indireto). BASHAN & HOLGUIN (1998) propuseram uma nova terminologia para melhor classificar essas bactérias. O termo rizobactérias seria substituído por bactérias, uma vez que nem todas as bactérias colonizam a raiz, surgindo duas novas denominações: "*biocontrol plant growth-promoting bacteria - biocontrol-PGPB*" (bactérias promotoras de crescimento de plantas biocontroladoras) e "*plant growth-promoting bacteria-PGPB*" (bactérias promotoras de crescimento de plantas - BPCP). No entanto, essa terminologia ainda não vem sendo utilizada pela maioria da comunidade científica, embora represente bem a atual compreensão do potencial dessas bactérias.

As BPCP podem ser tanto epifíticas como endofíticas. Bactérias epifíticas são encontradas na superfície de órgãos vegetais, onde sobrevivem em locais protegidos utilizando exsudatos e nutrientes de fontes externas, sem causar doença. Bactérias endofíticas são aquelas que podem ser isoladas de tecidos vegetais desinfestados ou extraídas de dentro da planta e não causa prejuízo visível a mesma (HALLMANN et al., 1997).

Essas bactérias penetram nas plantas através das sementes, aberturas ou ferimentos que naturalmente ocorrem como resultado do crescimento da planta (emergência de raízes laterais), ferimentos em geral induzidos por fatores bióticos (fungos, nematóides, insetos) e abióticos (manejo da cultura, variações extremas de temperatura, transplantio, etc.) e ativamente pela produção de enzimas hidrolíticas (celulase e pectinase).

Após atravessar a barreira da endoderme, as endofíticas podem colonizar todos os tecidos da planta (AGARWAL & SHENDE, 1987). A colonização parece ser um fenômeno natural e os principais gêneros de bactérias endofíticas já foram detectados em vários órgãos da planta tais como: caules (McINROY & KLOEPPER, 1994); raízes (AGARWAL & SHENDE, 1987; McINROY & KLOEPPER, 1994); sementes (FISHER et al., 1992) e tubérculos (STURZ, 1995).

A maioria dos relatos de resistência induzida mediada por microrganismos está relacionada às BPCPs, que promovem efeitos benéficos como o maior desenvolvimento de plantas, resistência a doenças e artrópodos, além de adaptação a estresses ambientais (HALLMANN et al., 1997; MARIANO & ROMEIRO, 2000; TOMCZYCK, 1999; ROMEIRO, 2000; STURZ & NOWAK, 2000; MEDEIROS et al., 2001). Observações mais recentes de algumas dessas bactérias mostraram que podem, também, apresentar efeito entomopatogênico, quando utilizadas diretamente sobre insetos (THULER, 2003).

As BPCPs têm sido relacionadas a estímulos gerados na própria planta pela atuação em diferentes caminhos metabólicos, principalmente nas rotas relacionadas ao Ácido Salicílico (SA), Jasmonato (JA) e Etileno (FIDANTSEF et al., 1999; STOUT et al., 1999; BOSTOCK, 1999). Estas são mundialmente reconhecidas como eficientes contra fungos e outras bactérias causadoras de doenças em plantas (MARIANO & ROMEIRO, 2000; ROMEIRO, 2000) e, recentemente, descobriu-se que elas também possuem efeito contra insetos herbívoros (AZEVEDO et al., 2000; AZEVEDO et al., 2002; FELTON & KORTH, 2000), sendo que as causas desses efeitos ainda não se encontram bem esclarecidas.

Como exemplo de alguns resultados de BPCP contra insetos pode ser citado à alteração no crescimento larval e a redução da emergência de adultos, causada por *Pseudomonas maltophila* em *Helicoverpa zea* (BONG & SIKOROWSKI, 1991).

Resultados importantes de RI mediadas por BPCP a insetos e patógenos têm sido observados em vários trabalhos, que representam uma pequena parte do potencial de utilização destes microrganismos.

Em um estudo realizado por TOMCZYCK (1999) com sementes de curcubitáceas bacterizadas com *Pseudomonas* sp., foi observado a supressão da população de ácaro *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) em até 40% para a cultivar suscetível quando se comparou a cultivar moderadamente resistente, além de uma redução de 18% na fecundidade das fêmeas na cultivar suscetível. Foi observado que a bacterização das sementes também promoveu um efeito adicional à resistência constitutiva já expressada pela cultivar moderadamente resistente. Em 2000, a mesma autora estudou a influência de rizobactérias sobre ácaros em pepinos e tomate e verificou que as estas suprimiram o desenvolvimento do ácaro em ambas populações; em pepineiros a população de ácaros foi menor em 40%, em tomateiros foi inibida 43% em folhas jovens.

Em experimentos de campo realizado por ZEHNDER et al. (1997) relataram que a prévia bacterização de sementes de pepino *Cucumis sativus* L. com suspensão das linhagens de *B. pumillus* e de *Serratia marcescens* reduziu a população de *Diabrotica undecimpunctata hawardi* Barber e *Acalymma vittatum* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae) mais que em tratamentos com inseticida.

No Brasil, SILVA & MARIANO (1999) realizaram estudos preliminares com BPCP visando avaliar sua ação contra a traça-das-crucíferas e selecionaram as bactérias ENF14 – *Enterobacter cloacae*, EN 4 – *K. ascorbata*, EN5 – *A. piechaudii* e E8 – *B. cereus* como os mais eficientes. Posteriormente experimentos conduzidos em laboratório revelaram que a bacterização de sementes de repolho *B. oleracea* var. *capitata* com suspensões de EN5 de *A. piechaudii*, ENF14 de *E. cloacae* e EN4 de *K. ascorbata* reduziram em até 35% a viabilidade de lagartas de

P. xylostella alimentadas com folhas de repolho provenientes de plantas bacterizadas, decorridos 45 dias do tratamento das sementes (MEDEIROS et al., 2001).

THULER et al. (2006) bacterizou discos foliares com suspensões de linhagens de BPCP colocando larvas de *P. xylostella* para se alimentarem e avaliou-se a viabilidade das diferentes fases biológicas da praga constatando que as linhagens de EN4, EN5, HPF14 – *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, RAB7 – *B. megaterium* pv. *cerealis* e PEP81 – *B. amyloliquefaciens* foram os que mais reduziram a viabilidade pupal, atribuindo destaque especial para a linhagem EN4. As linhagens de EN4 e EN5 também foram referenciadas por terem reduzido a viabilidade de *P. xylostella* em 80 e 50% respectivamente.

Informações sobre a ação direta dessas bactérias têm sido avaliadas por meio da produção ou alteração da concentração de fitohormônios, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo; oxidação do enxofre; aumento de permeabilidade das raízes e produção de sideróforos (CATTELAN, 1999; MARIANO & KLOEPPER, 2000). Destacando-se os gêneros *Pseudomonas* (GERMIDA & FREITAS, 1994) e *Bacillus* (TURNER & BACKMAN, 1991; LAZAROVITS & NOWAK, 1997), sendo este último produtor de endósporos que sobrevivem por longos períodos no solo e em armazenamento (LAZAROVITS & NOWAK, 1997).

Vários testes foram e estão sendo realizados com isolados de BPCP, no entanto, informações sobre sua influência nas rotas metabólicas de plantas ainda são insuficientes, o que ressalta a importância de estudos relacionados a esse mecanismo de defesa da planta junto a um agente indutor.

2.4 Biblioteca de DNA complementar – cDNA

A utilização das informações dos bancos de DNA e proteínas é de grande utilidade para a elucidação da função e expressão de novos genes. Os dados disponíveis podem ser utilizados de duas formas, direta ou indiretamente. A utilização direta implica em identificar sequências similares, ou com propriedades

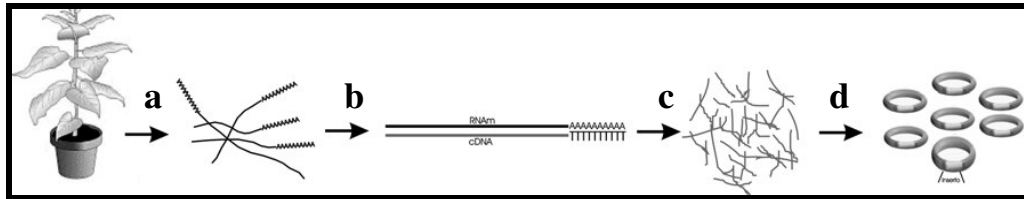
comuns, e estabelecer relações entre elas (por exemplo, filogenia molecular). A aplicação indireta é feita através da predição de regiões e sequências de genes relacionados, em espécies desconhecidas, através de alinhamento local (BLAST).

A construção de biblioteca de cDNA faz referência a uma coleção de fragmentos de cDNA (DNA complementar a moléculas de mRNA), representando as sequências expressas em um determinado tecido ou órgão, sob influência de uma determinada condição do ambiente, num determinado momento. Esses fragmentos são normalmente armazenados em vetores de clonagem que, devido a sua estabilidade podem ser armazenados por períodos prolongados de tempo (BIRREN et al., 1999).

Ao contrário de uma biblioteca genômica, que contém em princípio qualquer fragmento de DNA do organismo doador, a biblioteca de cDNA contém os genes expressos no tempo e local específicos. As moléculas de mRNA (altamente instáveis) são convertidas à cDNA para a sua clonagem e armazenamento.

As bibliotecas de cDNA apresentam várias vantagens quando o objetivo é a identificação de genes diferencialmente expressos ou quando se está prospectando um determinado gene, do qual se têm apenas algumas sequências do gene homólogo de outra espécie. A principal vantagem é a ausência de íntrons nas sequências clonadas, o que facilita a identificação de sequências expressas, pois somente a sequência codificante (exons) é clonada.

A geração de uma biblioteca de cDNA inclui, primeiramente, a extração de mRNA do tecido ou organismo de interesse, a síntese de cDNA a partir do mRNA, a clonagem das moléculas de cDNA em um vetor de clonagem e a incorporação do mesmo em uma bactéria para a sua multiplicação (transformação bacteriana). A Figura 1 ilustra, de forma resumida, os passos envolvidos na construção de uma biblioteca de cDNA.



Malone, G et al (2006)

Figura 1. Esquema representativo das principais etapas na geração de bibliotecas de cDNA. a) Extração de RNA mensageiro; b) Síntese reversa utilizando RT-PCR; c) Síntese de cDNA dupla fita; d) Clonagem dos cDNAs.

O sequenciamento de cDNAs para gerar ESTs (“Etiquetas de Genes Expressos”), tem sido considerado uma abordagem versátil, rápida e econômica para identificar genes que são preferencialmente expressos em certos tecidos ou células de organismos multicelulares (ADAMS et al., 1995, HWANG et al., 1997, LIEW et al., 1994). Esta abordagem tem se tornado cada vez mais utilizada para a anotação de sequências genômicas de organismos eucariotos, pois podem dar evidências biológicas para a previsão de centenas de genes (já conhecido em outros organismos) ou podem identificar a presença de novos genes.

3. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo detectar sequências gênicas relacionadas às respostas de indução de resistência em repolho contra larvas de *P. xylostella*, na presença e ausência da BPCP *K. ascorbata*, bem como relacionar com as alterações que esta bactéria poderia proporcionar no metabolismo de plantas de repolho.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em Estufa da Área de Olericultura e Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP-FCAV) Campus de Jaboticabal/SP.

4.1 Bacterização das sementes de repolho

A linhagem bacteriana de *K. ascorbata* foi fornecida pela Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco/PE (UFRPE), isolada endofiticamente de folhas de *B. oleracea* var. *capitata*.

Suspensões bacterianas de *K. ascorbata* foram quantificadas em unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/ml). A quantificação foi realizada pela adaptação do método descrito por MARIANO & ASSIS (2000), para o ajuste de uma concentração de 9×10^{10} UFC/ml.

As células bacterianas de *K. ascorbata* foram recuperadas em erlenmeyers contendo 50 ml de meio de cultura NYDA líquido (Dextrose, Extrato de Carne, Extrato de levedura e H₂O) e incubada por 24 h sob agitação de 150 rpm na temperatura de 30°C. Após este período, 50 µl da cultura foram inoculados em placa de Petri contendo meio de cultura NYDA sólido, sendo incubadas por 36 h a 30°C. Retirou-se uma alçada de massa bacteriana e inoculou-se em 100 ml de meio NYDA líquido, deixando-a 13 h a 30°C, sob agitação de 150rpm. Em tubos tipo “falcon” centrifugou-se 10 ml do cultivo bacteriano a 4000 xg por 10 min, descartando o meio de cultura em seguida. As células bacterianas foram lavadas com água estéril, duas vezes, por meio de centrifugação a 4000 xg, por 5 min, descartando-se o sobrenadante a cada processo. O precipitado bacteriano foi ressuscitado em 10ml de água estéril adicionada de 0,05% do espalhante adesivo Tween 80[®], e quantificados em espectrofotômetro (BECKMAN[®], modelo

DU-640B), ajustando-se as Densidades Óticas (DO), por suspensão seriada para as absorvâncias de 1,0; 0,8; 0,6; 0,4 e 0,2; em triplicata e foram plaqueadas 50 μ l das suspensões com concentrações ajustadas nas absorvâncias citadas, para obtenção de colônias isoladas contáveis. Essa quantificação foi feita também em triplicata, contando-se as colônias após 12h. Os valores de número de colônias obtidos foram calculados para adequação das suspensões numa concentração pré-estabelecida de 9×10^{10} UFC/ ml.

As sementes da cultivar de repolho *Brassica oleracea* var. *capitata* híbrido 'Midori' foram imersas em suspensão bacteriana padronizada numa concentração de 9×10^{10} UFC/ml em água Milli-Q estéril e Tween 80, por 30 min. Estas foram levadas para secar a temperatura ambiente, por 12h "overnight" (Figura 2).

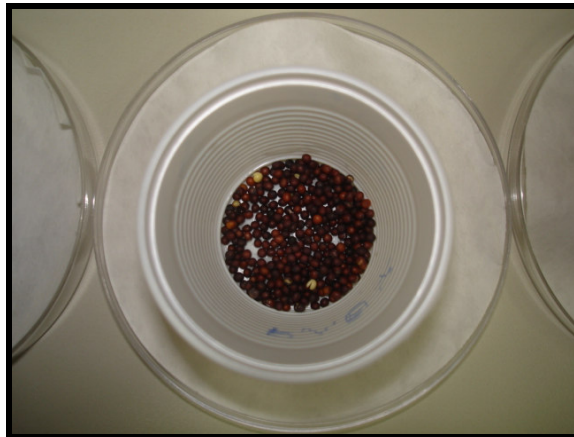


Figura 2. Sementes de repolho *Brassica oleracea* var. *capitata* híbrido Midori bacterizadas, após a imersão na suspensão bacteriana.

4.2 Plantio, transplântio e infestação das plantas de repolho.

As sementes foram plantadas em bandejas de poliestireno contendo substrato comercial (figura 3-A), e mantidas em casa de vegetação, recebendo os tratamentos padrões de mudas de hortaliças para comércio. Trinta e cinco mudas provenientes de sementes inoculadas e trinta e cinco de sementes sem inoculo, produzidas, foram transplantadas para uma estufa (Figura 3-B) e mantidas

observando-se os tratos culturais necessários, sendo uma adubação corretiva no plantio e três adubações de cobertura, aos 15, 30 e 45 dias de plantio.

Das plantas inoculadas com a bactéria *K. ascorbata*, sete foram infestadas com lagartas de *P. xylostella* e outras sete não inoculadas também receberam infestação semelhante.

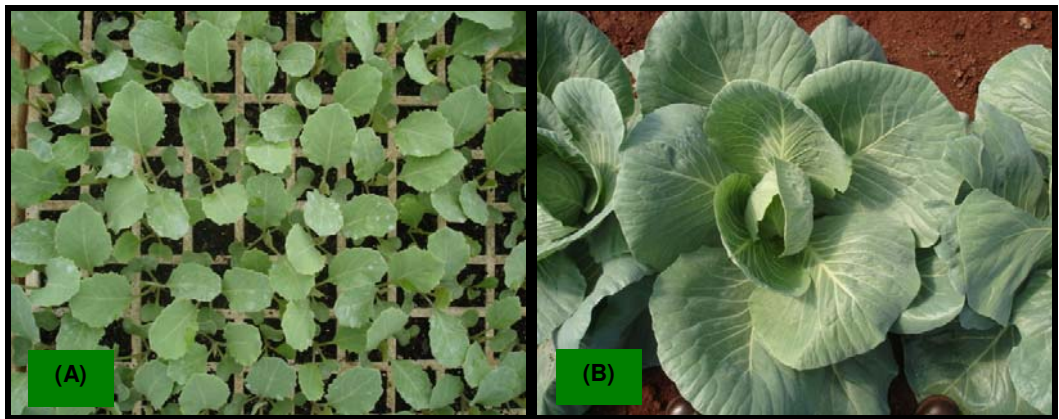


Figura 3. (A) mudas de repolho oriundas das sementes bacterizadas. (B) plantio aos 45 dias.

A infestação foi realizada após 60 dias de transplantio, quando as plantas já possuíam tamanho suficiente para suportar as injúrias provocadas pelas lagartas. Os tratamentos receberam 10 lagartas de *P. xylostella* de 2º ínstar confinadas em gaiolas plásticas de 12 cm de diâmetro presas em folhas sem danos (uma folha por planta). Essas gaiolas continham um orifício circular coberto com tecido do tipo “voil”, para permitir a troca gasosa dos insetos e das folhas, e foram presas interpondo-se uma folha aos dois lados da gaiola, pressionada contra a folha, por gomas elásticas presas a varetas de madeira fina (Figura 4).



Figura 4. Gaiola utilizada para o confinamento das larvas de *P. xylostella* na estufa.

4.3 Coleta e armazenamento do material vegetal

Decorridos 8 dias em que as lagartas estavam se alimentando da planta, período esse em que a lagarta chega ao estágio de pupa, foram realizadas as amostragens das plantas para análise molecular.

As amostras de folhas medianas foram retiradas, laterais à folha infestada concomitantemente à formação das pupas, sendo destacada manualmente uma folha de cada planta, em ambos os tratamentos, ou seja, das plantas oriundas de sementes inoculadas com a BPCP *K. ascorbata* e das plantas oriundas de sementes não inoculadas, sendo que todas haviam sofrido injúrias pelas lagartas de *P. xylostella*. Essas amostras foram envolvidas em papel alumínio, congelada em nitrogênio líquido imediatamente e armazenados em congelador a 80°C negativos, até o momento da extração de RNA.

4.4 Extração do RNA total

O RNA total foi isolado do tecido foliar de plantas de repolho que sofreram injúrias por larvas de *P. xylostella* em casa de vegetação, cujas sementes haviam sido inoculadas e não inoculadas com a BPCP *K. ascorbata*. O procedimento foi realizado de acordo com o proposto por CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987) e modificado por CHOMCZYNSKI & MACKEY (1995), utilizando-se da solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (TRIzol). Para a manipulação das técnicas moleculares com RNA, todo o material plástico utilizado foi tratado por 30 min com solução aquosa 3% de peróxido de hidrogênio (Merck) para evitar a presença de RNases (SAMBROOK & RUSSEL, 2001), todas as soluções foram feitas com água ultra pura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma), assim como, todas as vidrarias e metais foram autoclavados a 120°C por 20 min e posteriormente levados para estufa a 180°C por 8 h, conforme recomendado por SAMBROOK & RUSSEL (2001).

Três gramas de tecido foliar foram macerados com auxílio de cadinho e pistilo, em N₂ líquido e homogeneizado em 15 ml de Trizol Reagent (TRIzol®, Invitrogen™). As amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 min a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C) para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Adicionou-se 3 ml de clorofórmio (0,2 ml de clorofórmio para cada ml de reagente Trizol), a solução foi agitada e novamente incubada por 3 min a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 xg por 15 min a 4°C em centrifuga Beckman, modelo J2-21. O volume do sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo para centrifuga previamente tratado com H₂O₂.

A precipitação do RNA da fase aquosa foi feita pela mistura da solução com álcool isopropílico (adição de 0,5 ml de álcool isopropílico por ml de reagente Trizol usado na homogeneização inicial). Manteve-se a mistura a temperatura ambiente por 10 min seguida de centrifugação a 12.000 xg por igual período a 4°C (o RNA precipitado, até então invisível, forma um precipitado gelatinoso no

fundo do tubo). O sobrenadante foi descartado lavando-se o precipitado por duas vezes com etanol 70% gelado (preparado com água DEPC 0,01%). As amostras foram centrifugadas a 7.500 xg por 5 min a 4°C.

O precipitado de RNA foi parcialmente dissolvido em água livre de RNase (água Milli-Q tratada com dietilpirocarbonato 0,1% v/v) e armazenado a -80° C até o momento do uso.

A quantificação do RNA total extraído foi realizada em espectrofotômetro (BECKMAN®, modelo DU-640B), medindo a absorvância em contraste com uma amostra de água DEPC, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A leitura de 260 nm mostra a quantidade de ácido nucléico na amostra. A quantidade de RNA da amostra foi estimada utilizando-se o padrão de que uma unidade de densidade óptica equivale a aproximadamente 40 µg de RNA por ml de solução. A relação entre as leituras $^{260}/_{280}$ prevê uma estimativa da pureza do ácido nucléico (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

A integridade do RNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose, onde 1µl de cada amostra foram transferidos para outro microtubo adicionando-se às amostras 3 µl de tampão de amostra ("loading buffer" - 0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%). O volume total de 4 µL de cada amostra foi aplicado em gel de agarose a 1,0%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e submetido à eletroforese horizontal em aparelho Horizon® 58 – Life Technologies por 2 h, 50 V, conduzida em tampão TAE (40 mM Tris, 20 mM Acido acético, 1 mM EDTA, água DEPC, pH7,6), também adicionado de brometo de etídeo (0,5 µg/mL).

Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados em equipamento fotodocumentador (GEL DOC 2000 – Bio-Rad®), através do software Quantity-one.

4.5 Isolamento do RNA mensageiro – mRNA

O mRNA das amostras foi isolado através do Kit PolyATtract[®] mRNA Isolation System III (Promega, USA), utilizando-se um volume correspondente a \approx 0,5 mg de RNA total, sendo ajustado para o volume final de 500 μ l com água-DEPC. O material foi incubado por 10 min a 65°C em banho seco, posteriormente, foram adicionados 3 μ l de “Biotinylated-Oligo (dT) Probe” e 13 μ l de 20 X SSC, em seguida incubou-se por 10 min a temperatura ambiente para resfriamento da amostra. Enquanto isso, as seguintes soluções foram preparadas:

- a) 0,5 X SSC (30 μ l de 20 X SSC + 1,170 ml de água DEPC = 1,2 ml)
- b) 0,1 X SSC (07 μ l de 20 X SSC + 1,393 ml de água DEPC = 1,4 ml)

Durante o período de resfriamento das amostras, as partículas paramagnéticas (ASPMPs) foram ressuspensas gentilmente por inversão e deixadas na estante magnética (MSS) por aproximadamente 30 s para completa captura. O sobrenadante foi removido cuidadosamente com pipetador e as partículas paramagnéticas capturadas foram lavadas com 300 μ l de 0,5 X SSC por três vezes consecutivas, removendo-se sempre o sobrenadante cuidadosamente. Em seguida foram ressuspensas em 100 μ l de 0,5 X SSC. O material genético foi adicionado ao tubo contendo a solução com as partículas paramagnéticas, incubada por 10 min à temperatura ambiente, sendo o tubo invertido gentilmente a cada 2 min. Ao fim deste procedimento, foram capturadas as partículas paramagnéticas utilizando-se a estante magnética e o sobrenadante foi removido. Estas foram lavadas com 300 μ l de 0,1 X SSC, sendo repetido este passo por mais três vezes, totalizando quatro lavagens, sempre capturando as partículas paramagnéticas com a estante magnética e removendo o sobrenadante cuidadosamente. Na última lavagem tomou-se o cuidado de remover todo o sobrenadante.

As partículas foram ressuspensas em 100 µl de água DEPC para a eluição do mRNA e capturadas utilizando-se a estante magnética, removendo-se o sobrenadante para um tubo estéril de 1,5 ml acondicionado em gelo, pois, nele se encontra o RNAm eluído. Para finalizar o processo de eluição, o mesmo procedimento foi realizado utilizando-se 150 µl de água DEPC. As partículas paramagnéticas foram capturadas e o sobrenadante foi transferido para o tubo que já continha 100 µl do material eluído, totalizando um volume final de 250 µl. O mRNA isolado foi mantido a -20°C até o momento do uso.

As amostras de mRNA foram quantificadas em espectrofotômetro e sua integridade foi visualizada através da eletroforese conforme procedeu-se com o RNA total.

4.6 Construção das Bibliotecas de cDNA (DNA complementar)

As bibliotecas de cDNA de folhas de *B. oleracea* var. *capitata* que sofreram injúrias por *P. xylostella*, onde apenas em uma situação inoculou a *K. ascorbata*, foram construídas utilizando o kit SuperScript Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning (INVITROGEN®-Catalog no. 18248-013 e 18248-039), consistindo dos seguintes passos:

4.6.1 Síntese da 1ª fita de cDNA

Para iniciar a síntese da 1ª fita de cDNA, partiu-se de um volume total de 9 µl, sendo 4 µl de mRNA e 5 µl de água-DEPC para concentração final de 1µg/µl, adicionou-se 2 µl de “not I primer-adapter” e o material foi incubado a 70°C por 10 min. Passado o tempo de incubação o material foi imediatamente resfriado em gelo. Adicionou-se ao microtubo 4 µl de “first strand buffer” (5 x), 2 µl de DTT (0,1 M), 1 µl de dNTP Mix (10 mM) e 1 µl de água-DEPC, perfazendo um volume final de 19 µl. A solução foi misturada, brevemente centrifugada e mantida a 37°C por 2 min para equilibrar a temperatura. Adicionou-se 1 µl de “SuperScript”, misturou-se

gentilmente levando a solução para incubação por 2 h a 37°C. Em seguida o tubo foi acondicionado em gelo para terminar a reação.

4.6.2 Síntese da 2ª Fita de cDNA

Para a síntese 2ª fita de cDNA, foi adicionado em um novo microtubo de 0,5 mL, 18 µl da reação, 93 µl de água-DEPC, 30,0 µl de “5X second strand buffer”, 3,0 µl de “10 mM dNTP mix”, 1,0 µl de “DNA ligase” (10 U/µl – *E. coli*), 4,0 µl de “DNA Polimerase I” (10 U/µl), 1,0 µl de “RNase H” (2 U/µl), perfazendo um volume final de 150 µl, misturando-se gentilmente e incubado a 16°C por 2 h.

Adicionou-se 2,0 µl de “T4 DNA Polimerase” (2 U/µl) seguida de incubação a 16°C por mais 5 min. O tubo foi colocado no gelo e adicionou-se 10 µl de EDTA 0,5 M, 150 µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), agitou-se rapidamente em agitador Phoenix – AP56. O material foi centrifugado em centrífuga 5810R (Eppendorf), a temperatura ambiente por 5 min a 14.000 xg para separar as fases. Coletou-se cuidadosamente o sobrenadante de aproximadamente 140 µl e este foi adicionado em um novo tubo de 1,5 ml onde se adicionou 70 µl de acetato de amônio (NH₄AOc) 7,5 M e 500 µl de álcool etílico absoluto (-20°C), seguido de mistura por inversão de tubo.

Centrifugou-se este material a temperatura ambiente (24°C) por 20 min a 14.000 xg, sendo a remoção do sobrenadante realizada cuidadosamente. Adicionou-se 500 µl de etanol 70% (-20°C) e submeteu-se a uma centrifugação por 2 min a 14.000 xg, descartando o sobrenadante e o tubo foi mantido a 37°C por 10 min para evaporação de resíduos de álcool.

4.6.3 Adição do *salI*-adapter

Ao tubo contendo o cDNA, acondicionado em gelo, foi adicionado 25 µl de água-DEPC, 10 µl de 5 x “T4 DNA Ligase Buffer”, 10 µl de “*salI*-adapter” (1 µg/µl) e 5 µl de “T4 DNA Ligase” (1 U/µl), perfazendo um volume final de 50 µl. A solução foi gentilmente misturada e mantida a 16°C por, no mínimo, 16 h. Seguiu-se a adição de 50 µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1), misturando-se

vigorosamente. Centrifugou-se o material por 5 min a 14.000 xg a temperatura de 24°C para separar as fases. Removeu-se 45 µl do sobrenadante e este foi transferido para um novo tubo de 1,5 ml. Ao sobrenadante recuperado, adicionou-se 25 µl de acetato de amônio (NH₄OAc) 7,5 M e 150 µl de álcool etílico absoluto (-20°C), seguida de uma mistura por inversão do tubo. Realizou-se uma centrifugação por 20 min em 14.000 xg a temperatura de 24°C, seguida da remoção cuidadosa do sobrenadante. Adicionou-se ao tubo 500 µl de etanol 70% (-20°C) e seguiu-se de uma nova centrifugação por 2 min a 14.000 xg em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o tubo com o cDNA sedimentado foi mantido a 37°C por 10 min para secagem do material.

4.6.4 Digestão com *notI*

Adicionou-se ao tubo contendo o cDNA, em gelo, 41 µl de água-DEPC, 5 µl de “react 3 buffer” e 4 µl de “*notI*” (15 U/µl), perfazendo um volume final de 50 µl, que foram gentilmente misturados e mantidos por 2 h a 37°C. Passado o período de incubação adicionou-se 50 µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1), seguido por uma vigorosa mistura em aparelho tipo “vortex”. Realizou-se então uma centrifugação por 5 min em 14.000 xg a temperatura de 24°C para separar as fases e então recuperar 45 µl da fase superior e transferi-la para um novo tubo de 1,5 ml, onde se adicionou 25 µl de acetato de amônia (NH₄OAc) 7,5 M e 150 µl de álcool etílico absoluto (-20°), seguido de uma mistura por inversão do tubo. Por 20 min foi realizada uma centrifugação do material em 14.000 xg a temperatura de 24°C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e adicionou-se ao tubo 500 µl de etanol 70% (-20°) realizando-se uma nova centrifugação em 14.000 xg por 2 min a temperatura de 24°C e a remoção cuidadosa do sobrenadante antes do tubo ser mantido a 37°C por 10 min.

4.6.5 Fracionamento por tamanho dos fragmentos de cDNA em Coluna de Cromatografia

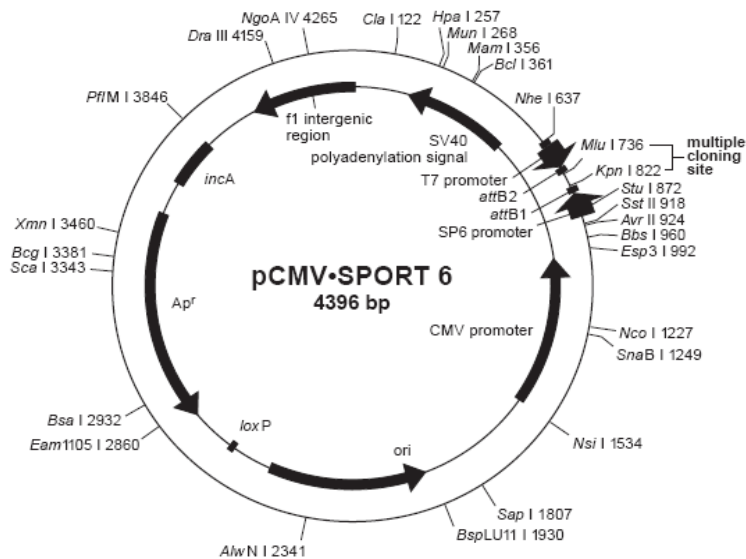
O fracionamento por tamanho dos fragmentos de cDNA foi realizado inicialmente ressuspensando o cDNA em 100 µl de TEN buffer [10mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 mM EDTA, 25 mM NaCl; autoclavado] em gelo. A coluna de cromatografia foi “tratada” quatro vezes com 800 µl de TEN buffer para remover todo o álcool que vem com a coluna. Vinte tubos de 1,5 ml foram enumerados do 1 ao 20 e após a remoção de todo o álcool da coluna, adicionou-se na mesma o cDNA hidratado com TEN buffer, com o tubo de número 1 posicionado sob a coluna para receber o material adicionado até parar de gotejar. Adicionou-se mais 100 µl do TEN buffer e coletou-se o segundo tubo como feito anteriormente. Após coletados os dois tubos foi adicionada uma nova alíquota de TEN buffer e coletou-se uma gota de aproximadamente 35 µl para cada tubo enumerado restante (do 3 ao 20). Coletado todo material nos 20 tubos, este foi mensurado com o auxílio de uma micropipetadora e o valor anotado na tabela que acompanha o kit “SuperScript™ Plasmid System for cDNA Syntesis and Plasmid Cloning” (Invitrogen. Os volumes foram somados de acordo com as instruções do fabricante para que os tubos fossem selecionados como fragmentos com os tamanhos adequados para dar seqüência ao procedimento.

Adicionou-se em cada tubo selecionado após a soma, 5 µl de “yeast tRNA”, 0,5 volume de acetato de amônio (NH₄OAc) 7,5 M, e 2 volumes de álcool etílico absoluto (-20°C), estes foram misturados em aparelho tipo “vortex” e centrifugados por 20 min em 14.000 xg na temperatura de 24°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e ao sedimentado adicionou-se 500 µl de etanol 70% (-20°C). Seguiu-se uma nova centrifugação por 2 min em 14.000 xg em temperatura ambiente e o sobrenadante foi removido. Os fragmentos de cDNA foram mantidos a 37°C por 10 min e então adicionou-se 10 µl de TEN buffer. O material foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

4.6.6 Ligação dos fragmentos de cDNA ao vetor

O vetor utilizado para a clonagem dos fragmentos de cDNA foi o pCMV.SPORT 6 (Figura 5).

A preparação da reação de ligação dos fragmentos no vetor foram realizadas em novos tubos de 0,2 ml, adicionando-se 4 µl de “5 x T4 DNA ligase buffer”, 1 µl de “pCMV.SPORT 6, *notI* / *salI* – cut”, 10 µl do fragmento de cDNA, 4 µl de água e 1 µl “T4 DNA Ligase”, perfazendo um volume final de 20 µl. As reações foram mantidas a 4°C por 16 h em termociclador (PTC-100 “Programmable Thermal Controller” - MJ Research, inc.). Os fragmentos foram clonados no sítio de múltipla clonagem entre os sítios de restrição das enzimas *notI* e *salI*.



Catalog nos. 18248-013 and 18248-039 (Invitrogen)

Figura 5. Vetor plasmidial pCMV-Sport 6. Mapa do vetor utilizado para clonagem dos fragmentos de cDNA que acompanha o kit “SuperScript Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning”.

4.7 Transformação por choque térmico

As células competentes de *Escherichia coli* DH10B foram removidas do freezer -80 °C e descongeladas em gelo por aproximadamente 30 min. O produto da ligação foi adicionado no tubo com as células competentes (200 µl) descongeladas e mantidas em gelos por 20 min. Em seguida foram levadas em banho-maria a 42 °C por 90 s e imediatamente recolocados em gelo por 2 min. Após esse processo foram transferidas para tubos “Falcon” com capacidade de 15 ml estéreis, adicionado 1 ml de meio SOC (20 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 0,5 g de NaCl e 0,19 g de KCl em 1000 ml de água destilada Milli-Q - pH 7,0) e incubado por 1 h a 37 °C, com agitação de 180 rpm em agitador orbital. Adicionou-se ao meio uma solução de 2% de glicose 1M e 1% de MgCl₂ 1M, filtrada. Com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada, 100 µl de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-Gal) em 5% de dimetilformamida foi espalhada sobre a superfície das placas de Petri contendo meio LB (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de NaCl; 10 g/L de ágar, pH 7) contendo ampicilina (50 mg/ml).

Podemos conferir no mapa do vetor de clonagem (Figura 5) utilizado na ligação dos fragmentos de cDNA, que não há sítio para o gene *lacZ* responsável pela produção da enzima β – galactosidase. Este facilitaria a seleção das bactérias transformadas, pois, quando o fragmento de interesse é inserido, esse gene é interrompido e não há produção de β - galactosidase, selecionando os clones viáveis pela indicação da cor branca diferindo das colônias não transformadas de cor azul. Portanto, foi adicionado ampicilina ao meio de cultura onde cresceram os transformantes, pois o vetor utilizado possui um gene de resistência a este antibiótico.

Após incubação das células transformadas em meio SOC, 100 µl de cada cultura foram espalhadas em placas de Petri com o meio LB e incubadas a 37 °C por 16 h. Os clones foram coletados com palitos de madeira estéreis e cultivados em microplacas de 96 poços com 80 µl de meio CG (Circle Grow, B10101) e

ampicilina (50 mg/ml) durante 22 h, a 37°C. Passado esse período, adicionou-se aos clones cultivados 80 µl de glicerol 40% estéril para estoque e armazenado no freezer -80°C.

4.8 Extração do DNA plasmidial

A extração de DNA plasmidial dos clones foi realizada em placas de 96 poços, inoculando-se 20 µl de cada colônia estocada em 1,0 ml de meio CG com ampicilina (50 µg/ml) em cada poço. As placas foram incubadas a 37°C por 22 h, sob agitação a 200 rpm. Passado o período de agitação, as placas foram centrifugadas a 3.220 xg durante 5 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de células obtidas foram ressuspensas em 240 µl de solução I (Glicose 50 mM, Tris-HCl pH 8,0 25mM; EDTA 10 mM), sendo as amostras de DNA coletadas por centrifugação, como descrito acima. As amostras foram ressuspensas em solução de lise (NaOH 200 4M; SDS 10%) com RNase (10 mg/ml), em um volume de 60 µl da solução. As placas foram agitadas por inversões suaves e incubadas por 10 min. Decorrido o tempo, foram adicionados 60 µl de solução de neutralização (acetato de potássio 3M pH 5,8 ajustado com ácido acético glacial), seguindo-se suaves agitações por inversão.

Após a neutralização, as placas foram centrifugadas rapidamente, incubadas por 30 min em estufa a 90°C e imediatamente após o tempo decorrido foram esfriadas em gelo por 10 min. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para novas placas onde foram adicionados 100 µl de isopropanol absoluto gelado, centrifugando-se 45 min a 3.220 xg e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 200 µl de etanol 70% gelado, seguido de nova centrifugação por 5 min a 3.220 xg e descarte do conteúdo líquido. As placas foram secas em fluxo laminar por 20 min. As amostras de DNA plasmidial foram ressuspensas em 30 µl de água Milli-Q estéril e mantida a temperatura de -20°C.

Para verificar a integridade do DNA plasmidial extraído, 1µl de cada amostra foram transferidos para outra placa juntamente com 3 µl de tampão de

amostra (“loading buffer” - 0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%). O volume total de 4 µl de cada amostra foi aplicado em gel de agarose a 0,8%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) em eletroforese horizontal, cuba tipo “sunrise” (96 canaletas), por 2 h a 100 V, conduzida em tampão TEB (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM com pH 8,3), também adicionado de brometo de etídeo (0,5 µg/ml).

Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados em equipamento fotodocumentador (GEL DOC 2000 – Bio-Rad®), através do software Quantity-one.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (BECKMAN®, modelo DU-640B), medindo a absorbância em contraste com uma amostra de água Milli-Q, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, sendo a relação $^{260}/_{280}$ calculada. Para estimar a quantidade de produto obtido foi utilizado o padrão em que uma unidade de densidade óptica (DO) equivale a 50 µg de DNA por ml de solução (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Todas as amostras foram ajustadas para uma concentração final de 40 ng/µl.

4.9 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os fragmentos de cDNA inseridos no vetor pCMV•SPORT 6 clonados em *E. coli*, foram amplificados por reações de PCR, utilizando iniciadores universais. Uma reação também foi realizada apenas com o vetor, para comparação entre as amostras.

Utilizou-se os oligonucleotídeos T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') e o Sp6 (3'ATTTAGGTGACACTATAG 5'), que reconhecem uma região específica do vetor. Para tanto as reações de amplificação foram conduzidas em um volume de 20 µl contendo: 160 ng de DNA plasmidial, 250 µM de uma solução de dNTPs (10 mM); 1,5 mM de MgCl₂ ; 7 pmol de cada iniciador; 1,0 U da enzima Taq DNA

polimerase (Invitrogen®); solução tampão para a reação de PCR (1X) e água destilada Milli-Q previamente esterilizada (qsp 20 µl).

Para as reações de PCR realizou-se uma mistura, onde se multiplicou a quantidade em microlitros, de cada reagente, com exceção do DNA, pelo número de amostras. Os reagentes foram misturados até completa homogeneização e 16 µl da mistura foram depositados em placas para PCR (Costar, 96 poços) adicionando-se 4 µl da amostra de DNA plasmidial de cada isolado.

As reações de amplificação foram submetidas em aparelho termociclador (PTC-100 “Programmable Thermal Controller” - MJ Research, inc.), equipado com circuito “Hot Bonnet”, onde foi utilizada uma termociclagem contendo um passo inicial de desnaturação de 5 min a 94°C e 35 ciclos consistindo de um ciclo de desnaturação a 94°C por 30 s; pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores a 49°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min e, ao final dos ciclos, um passo extra de extensão a 72°C por 1 min. Ao fim do programa foi adicionado um passo para a manutenção da amostra a 4°C até a retirada da placa do termociclador.

Após as amplificações, 5 µl das amostras foram transferidos para outra placa juntamente com 3 µl de tampão de amostra (“loading buffer” - 0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%). O volume total de 8 µl de cada amostra foi aplicado em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e submetido à eletroforese horizontal em cuba tipo “sunrise” (96 canaletas), por 2 h, a 100 V, conduzida em tampão TEB (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM com pH 8,3), também adicionado de brometo de etídeo (0,5 µg/ml). Em todas as eletroforeses realizadas empregou-se uma amostra de DNA, com fragmentos de tamanhos conhecidos, múltiplos de 1 quilo base “1kb DNA ladder®” (Fermentas), a qual serviu como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação. Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados em equipamento fotodocumentador (GEL-DOC 2000 – Bio-Rad®), através do software Quantity-one. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro

(BECKMAN®, modelo DU-640B), suas concentrações foram ajustadas para uma concentração final de 100 ng/μl e armazenadas em freezer -20°C.

4.10 Sequenciamento

O sequenciamento unidirecional de cada clone selecionado foi realizado utilizando o iniciador SP6 e o *Kit Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing-Ready ABI Prism (Version 3)*. Para tanto utilizou-se de 3,2 pmols de SP6 promoter primer, 100 ng do DNA plasmidial, 2,0 μl de tampão 2,5X (400mM Tris-HCl, pH 9,0, 10mM MgCl₂), 2,0 μl de Big Dye e água Milli-Q para um volume final de 10 μl. As reações foram incubadas em termociclador (PTC-100 – MJ Research, Inc.®), equipadas com circuito “Hot Bonnet”, com um programa constituído de 34 ciclos, referentes à desnaturação da fita de DNA na temperatura de 96°C por 10 s, pareamento das fitas de DNA a 52°C por 5 s e extensão a 60°C por 4 min. Ao fim dos 34 ciclos foi adicionado um passo único para a manutenção da amostra a 4°C até a retirada da microplaca do termociclador.

Após a reação de sequenciamento, as amostras de DNA foram precipitadas utilizando um protocolo sugerido pelo suporte da Applied Biosystems, onde adicionou-se às amostras: 2 μl de EDTA 125mM, 2 μl de acetato de sódio 3M e 50 μl de etanol absoluto, seguido de uma rápida agitação em aparelho tipo “vortex”, o material foi incubado por 15 min a temperatura ambiente protegido de luz. Decorrente desse período as amostras foram submetidas à centrifugação por 25 min na temperatura de 4°C na rotação de 3.220 xg. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e adicionou-se 70 μl de etanol 70% seguindo de uma centrifugação nas mesmas condições por 5 min. Novamente o sobrenadante foi descartado cuidadosamente e as amostras foram deixadas por 30 min em fluxo laminar desprovido de luz para secar.

Adicionou-se 10 μl de HiDi Formamida (Applied Biosystems) em cada amostra, estas foram desnaturadas em termociclador a 95°C por 5 min e

imediatamente resfriadas em gelo para serem seqüenciadas em aparelho 3100 *Genetic Analyzer* ABI - *Applied Biosystems Prism*.

As análises das seqüências foram realizadas utilizando o software MEGA versão 4 (TAMURA *et al.*, 2007), onde foram gerados os eletroferogramas e comparadas pela ferramenta BLAST "*Basic Local Alignment Search Tools*" (ALTSCHUL *et al.* 1997). Estas foram descritas com base no genoma de *Arabidopsis thaliana* disponíveis no site <http://www.arabidopsis.org/> (acessado em 06/2009), onde dispõe-se de um recurso de informação sobre *Arabidopsis* ("*The Arabidopsis Information Resource*" ou TAIR).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Integridade do RNA total e mRNA

Após a extração do RNA total de folhas de brássicas, os resultados obtidos na quantificação dos diferentes RNAs apresentaram densidade óptica (A^{260}/A_{280}) em torno de 1,8. O grau de pureza do RNA será estimado pela razão entre as absorvâncias medidas a 260 e 280 nm, que deve estar entre 1,8 e 2,0 para uma amostra de RNA pura.

A integridade do RNA total demonstrada pelas eletroforeses em géis de agarose 1,0 % está representada na Figura 6.

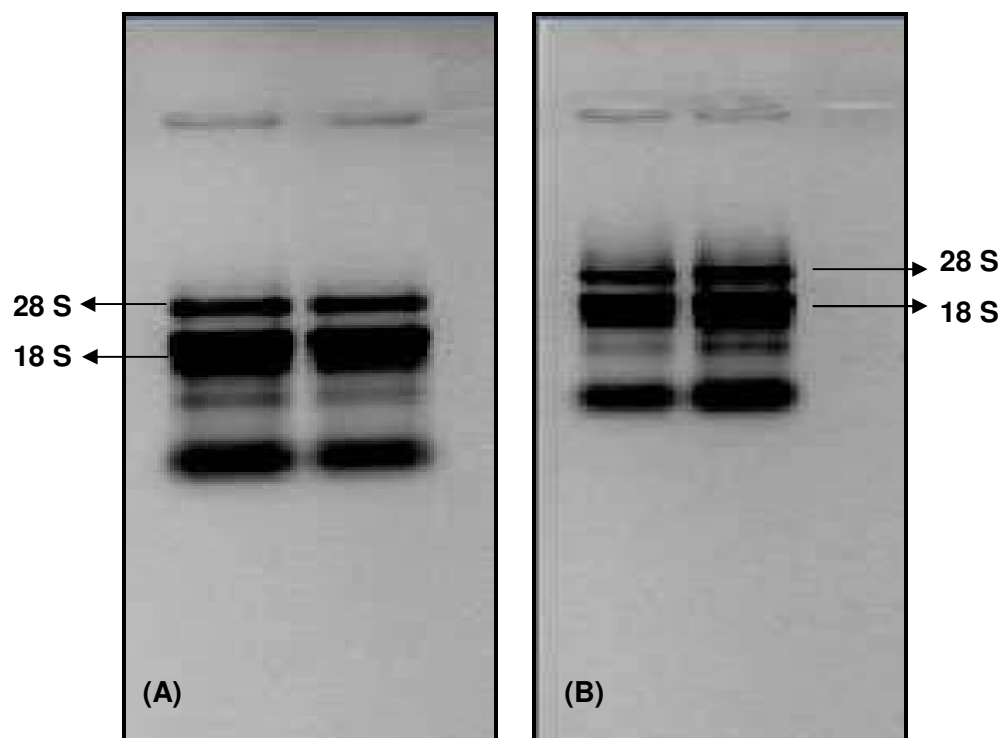


Figura 6. Eletroforograma resultante da extração do RNA total de folhas de repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) que sofreram injúrias por *P. xylostella*. **(A)** RNA isolado de plantas que não foram inoculadas com a *K. ascorbata*. **(B)** RNA total isolado de plantas que foram inoculadas com a bactéria *K. ascorbata*.

Conforme observado na Figura 6, verificou-se a qualidade do RNA total das amostras, baseado na presença de bandas dos rRNAs (RNAs ribossômicos) 28S e 18S. O perfil visualizado nas amostras pela eletroforese comprova que o material genético manteve-se íntegro após seu isolamento (BIRREN et al., 1997).

A integridade do mRNA também foi confirmada com o gel de eletroforese, para garantir que os materiais a serem empregados na construção da biblioteca de genes expressos estivessem em perfeitas condições (Figura 7).

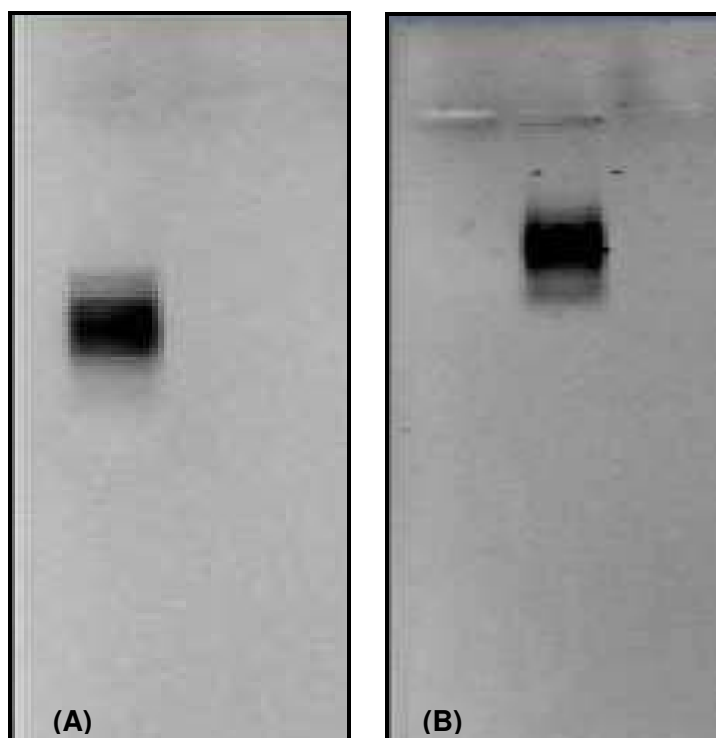


Figura 7. Eletroforograma resultante do isolamento do mRNA de folhas de repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) que sofreram injúrias por *P. xylostella*. **(A)** mRNA isolado de plantas que não foram inoculadas com a *K. ascorbata*. **(B)** mRNA isolado de plantas que foram inoculadas com a bactéria *K. ascorbata*.

O mRNA corresponde a apenas 5% do total de RNA da célula e é responsável por transportar a informação genética expressa em determinadas condições diferenciais. A quantificação e a integridade do mRNA são de grande

importância para dar continuidade a construção de uma biblioteca de cDNA , pois, a eficiência do processo depende da qualidade e quantidade de mRNA exigido para se iniciar a construção da primeira fita de DNA complementar.

5.2 Bibliotecas de cDNA

O cDNA é produzido por meio da transcrição reversa do mRNA isolado de cada tecido. As reações de síntese de cDNA foram realizadas com aproximadamente 1µg de mRNA para cada planta em situações distintas. Após a síntese da primeira e segunda fita de cDNA, a adição do adaptador e da digestão com a enzima *notI*, foi realizado o fracionamento dos fragmentos de cDNA em coluna cromatográfica, onde, somando o volume acumulado de cada microtubo foi possível identificar os tubos que continham os fragmentos de tamanho adequado para a ligação no vetor de clonagem.

A ligação com o vetor de clonagem pCMV.SPORT 6, requer 10 ng de cDNA em aproximadamente 14 µl de TEN buffer, deste modo, conhecendo as concentrações dos fragmentos, estes podem ser agrupados para que seja possível obter a concentração de cDNA necessária. No entanto, os fragmentos de cDNA não foram quantificados e isso contribuiu para o não agrupamento dos fragmentos; cada tubo foi preparado separadamente para a realização da ligação deste fragmento no vetor de clonagem.

Após a transformação, todas as colônias que cresceram em meio de cultura contendo ampicilina foram coletadas e armazenadas como parte da biblioteca de cDNA. Foram coletados 1709 clones referente à transformação com fragmentos de cDNA de plantas que sofreram injúrias pela praga *P. xylostella* somente.

Os resultados referentes à biblioteca de cDNA de plantas que sofreram injúria pela praga cujas sementes haviam sido inoculadas com a BPCP foram contrastantes, levando a repetição de todo o procedimento de construção da biblioteca de cDNA em triplicata desde o início. Esse procedimento foi adotado

para suprimir qualquer hipótese de ineficiência na construção da biblioteca de cDNA das plantas inoculadas.

Mesmo sendo realizada a triplicata da construção da biblioteca de cDNA de plantas cuja sementes foram inoculadas e as folhas sofreram injúria pela praga, apresentaram apenas 395 colônias no seu total, contrastando das 1709 colônias obtidas com a única construção da biblioteca para planta que sofreu apenas injúria. O fato ocorrido nos leva a presumir que a presença da bactéria *K. ascorbata* em plantas de repolho que estavam sofrendo injúrias pela alimentação de *P. xylostella* altera o metabolismo das plantas que estão tentando se defender das injúrias.

5.3 Extração do DNA plasmidial, PCR e seleção dos clones

Durante a extração do DNA plasmidial ocorre quebras da cadeia de DNA, de modo que a molécula não mais se apresente na forma circular normalmente encontrada nas bactérias. Este fato pode levar a obtenção de duas bandas distintas em um gel de eletroforese. Isso ocorre porque na conformação normal superespiralada o plasmídeo migra rapidamente no gel, enquanto que na forma quebrada (porém não desnaturada), migra mais lentamente.

O material genético dos transformantes foi extraído e o seu perfil eletroforético pode ser visualizado na Figura 8.

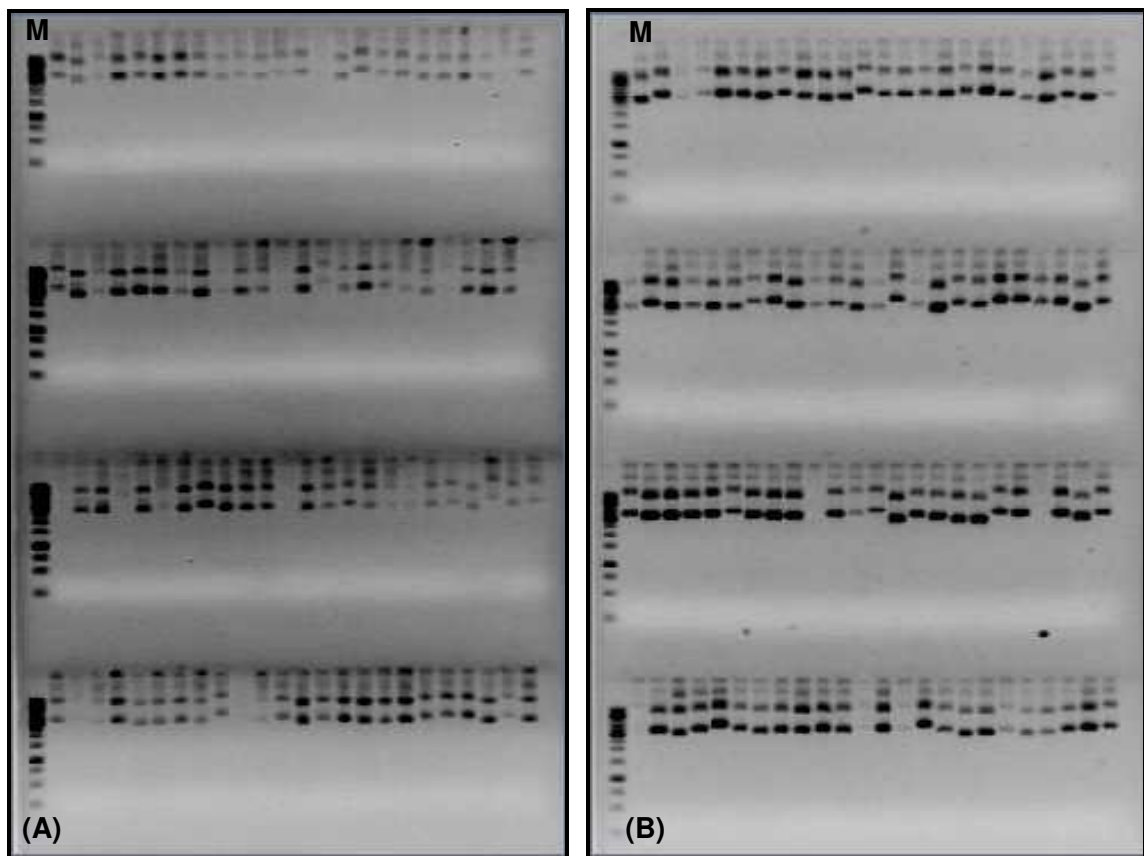


Figura 8. Eletroforograma representativo do DNA plasmidial extraído a partir dos clones obtidos por meio da transformação. **(A)** DNA plasmidial de plantas que somente sofreram injúrias em casa de vegetação **(B)** DNA plasmidial de plantas cujas sementes foram inoculadas com a BPCP *K. arcorbata* e sofreram injúrias pela *P. xylostella*. **M** = marcador molecular múltiplos de 1kb “1kb DNA ladder®” (Fermentas).

A PCR com oligonucleotídeos universais que reconhecem o sítio de clonagem do vetor utilizado serviu como ferramenta para a seleção dos clones que apresentavam fragmentos inseridos no vetor. Primeiramente foi realizada uma PCR com o vetor de clonagem para comparação de seu tamanho em pares de bases (Figura 9) quando não carregam o cDNA.

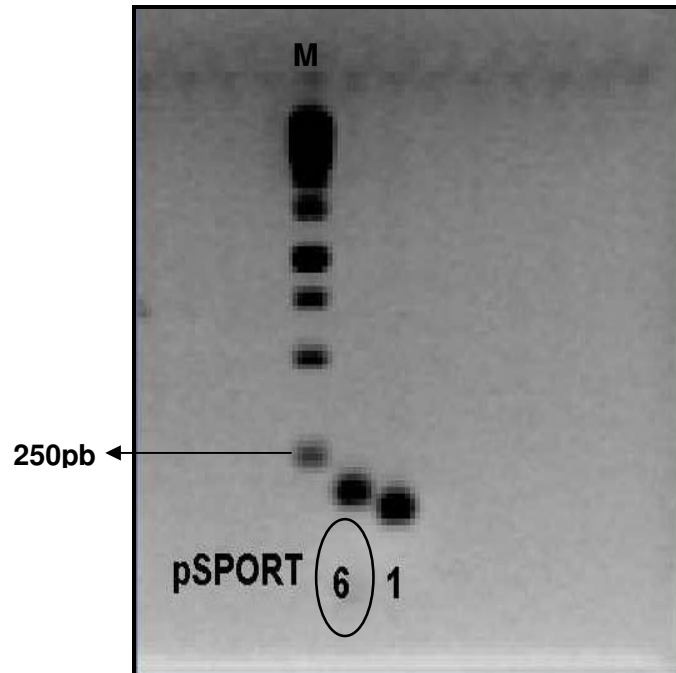


Figura 9. Eletroforograma da amplificação dos vetores que acompanham o kit para construção da biblioteca de cDNA, utilizando-se dos oligonucleotídeos iniciadores T7 e Sp6. Na primeira canaleta pode-se visualizar o marcador molecular (**M**) múltiplos de 1 quilo base “1kb DNA ladder®” (Fermentas), na segunda canaleta foi aplicado o produto de PCR realizado com o vetor pCMV•SPORT6 (utilizado neste estudo) e na terceira canaleta foi aplicado o produto referente ao vetor pSPORT1.

Em seguida foi realizada as PCRs com os DNAs plasmidiais extraídos cuja concentração foi ajustada para 40 ng/ μ l e utilizando oligonucleotídeos específicos T7 e Sp6 para a amplificação da região de interesse. Esta metodologia permitiu selecionar os clones que apresentaram fragmentos de cDNA incorporados nos vetores plasmidiais. Realizou-se este procedimento com base na comparação do tamanho dos vetores sem o fragmento (Figura 9). O perfil eletroforético da PCR com os clones pode ser observado na Figura 10.

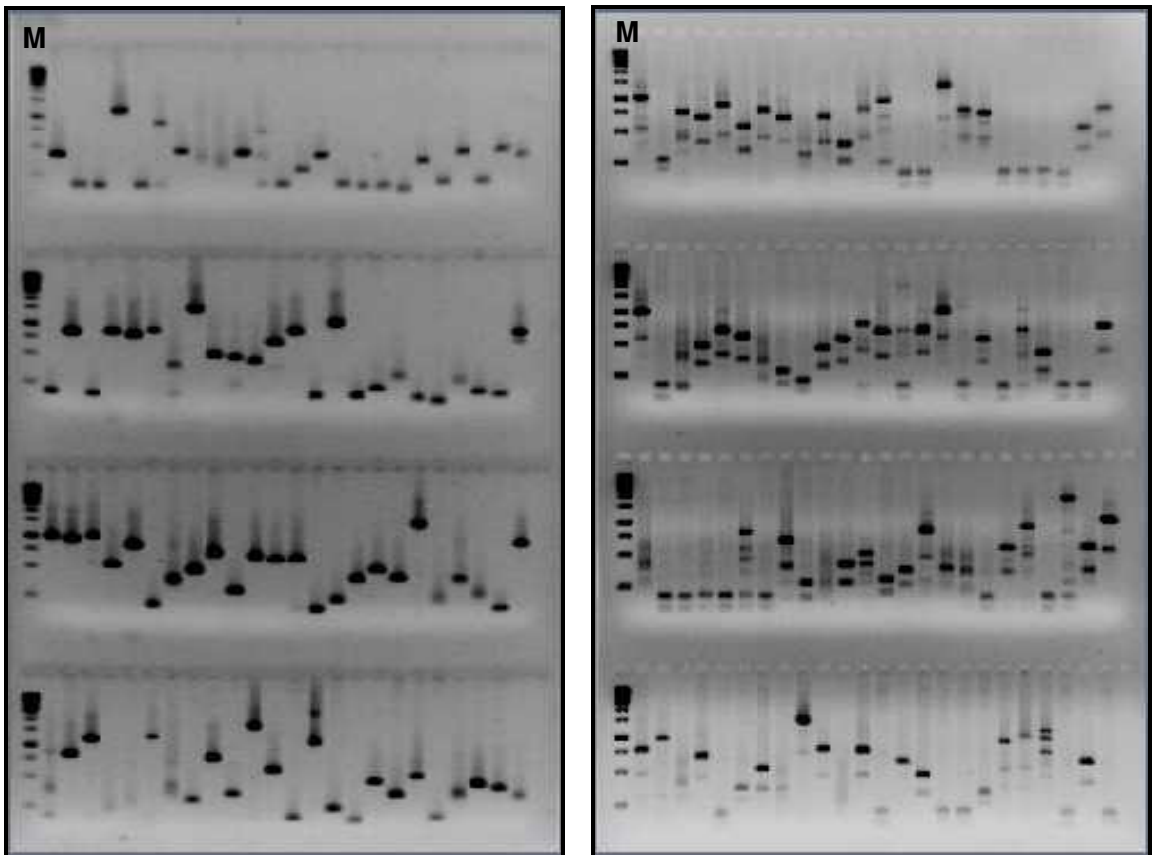


Figura 10. Eletroforograma representativo da amplificação por PCR dos DNAs plasmidiais extraídos, utilizando-se dos oligonucleotídeos iniciadores T7 e Sp6 . **M** = marcador molecular múltiplos de 1 quilo base “1kb DNA ladder®” (Fermentas).

Como pode-se observar no gel de eletroforese representada na Figura 10, os fragmentos possuem tamanhos variados e diferentes do observado na Figura 9 referente ao vetor de clonagem, o que possibilitou a seleção dos clones com fragmento e eliminação dos clones que apresentavam somente o vetor plasmidial. Esta seleção permitiu uma recontagem do número de clones das duas bibliotecas de cDNA construídas.

Partindo desta análise, foi possível selecionar 1108 clones referentes à biblioteca de cDNA de plantas de repolho que sofreram injúria por larvas de *P. xylostella* e 143 clones referentes a biblioteca de cDNA de plantas de repolho que

sofreram injúria pela praga cujas sementes haviam sido inoculadas com a *K. ascorbata*.

5.4 Sequenciamento e análise das sequências

A coleção de ESTs gerada foi submetida ao sequenciamento automático e utilizando a ferramenta BLAST foi possível realizar uma análise comparativa com sequências gênicas depositadas nos principais bancos de dados que congregam informações genéticas de inúmeras espécies de plantas e outros organismos, e que podem ser acessados pelo site www.ncbi.nlm.nih.gov/ da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Assim, foram selecionadas 376 sequências de amostras de plantas não inoculadas e 29 sequências de amostras de plantas inoculadas. As sequências referentes a plantas não inoculadas podem ser conferidas no apêndice Tabela 1, onde foram anotadas o número AGI (“*Arabidopsis Genome Initiative*”) de localização no site da NCBI, o valor de similaridade com as sequências depositadas nos bancos de dados, a possível proteína a que se refere, sua descrição relativa a vias metabólicas de atuação e o número de transcritos encontrados com essa sequência.

Para ater-se às seqüências de maior confiabilidade, foram selecionadas apenas as que apresentaram um valor estimativo “E-value > 10” de similaridade entre as sequências depositadas. Estas foram comparadas com sequências da planta modelo *A. thaliana* disponíveis no site <http://www.arabidopsis.org/> onde dispõe-se de um recurso de informação sobre *Arabidopsis* (“*The Arabidopsis Information Resource*” ou *TAIR*)., uma vez que são raras as informações para brássicas (em especial de repolho – planta alvo do estudo), o que aumenta a validade e importância das informações aqui expostas, haja vista o pioneirismo do presente estudo.

Este site congrega informações incluindo a sequência do genoma completo juntamente com a estrutura genética; informações do gene como: metabolismo,

expressão, DNA, mapas do genoma, marcadores genéticos, marcadores físicos e informações sobre a Comunidade de Investigação de Arabidopsis.

Dentre as 376 sequências obtidas referentes a plantas de repolho que receberam como fator indução de resistência a injúria por *P. xylostella* demonstradas na Tabela I (apêndice), pode-se relacionar: 42 genes envolvidos diretamente com a defesa da planta, 23 com a degradação e/ou modificação de proteínas, 14 com a transdução de sinal, 40 com o estresse, 59 com a fotossíntese, 49 com o metabolismo, 69 com a tradução e transcrição de proteínas, 35 com o crescimento e desenvolvimento da planta, 28 com o transporte endógeno e 17 classificadas como “outros” devido à escassez de informações de referência.

A defesa da planta contra a infestação de insetos e/ou a infecção por patógenos envolve basicamente caminhos de uma complexa rede de sinais mediada por três moléculas sinalizadoras denominadas: ácido salicílico (SA), etileno (ET) e ácido jasmônico (JA) (CLARCKE et al., 2000; TON et al., 2002). A rota de resistência mediada pelo SA envolve a ativação de respostas de defesa no local da infecção e sistêmicas (*Systemic Acquired Resistance* – SAR) (RYALS et al., 1996). O processo ocorre por um fluxo de íons através da membrana plasmática, seguido pelo acúmulo de radicais superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que são espécies de oxigênio reativo (ROS – *Reactive Oxygen Species*), que interagem com o óxido nítrico, que pode provocar a morte das células no sítio de infecção (HR – reação de hipersensibilidade) (McDOWELL & DANGL, 2000). Com os resultados obtidos por meio do sequenciamento de ESTs, vários genes descritos na literatura como atuantes em determinadas vias metabólicas de defesa das plantas foram encontrados, pode-se conferir a presença destes genes na Tabela I (apêndice) como é o caso da EST relacionada com os ROS (localizado na tabela com número de identificação AGI - AT1G07890).

A resistência tipo SAR resulta na atuação de eliciadores que envolvem o acúmulo de PRPs (Proteínas Relacionadas com a Patogênese); sua indução é

salicilato-dependente e pode resultar em alterações visuais, como necroses na planta que sofreu a indução e, geralmente, é elicitada por patógenos, substâncias naturais ou sintéticas (STICHER et al., 1997). Sequências presentes neste estudo também foram descritas como PRPs, como é o caso dos transcritos AT1G33970, AT5G39730 AT2G38540, AT5G59320, AT5G59310 e AT5G55450 encontrados em sequências de plantas que não foram inoculadas com a PGPR.

A ativação dos genes relacionados à virulência (*avr*) estimula a entrada dos íons Ca^{2+} e H^+ na célula e a saída de K^+ e Cl^- (NUMBERGER & SCHEEL, 2001). O rápido acúmulo de Ca^{2+} citosólico regula o complexo NADPH oxidase diretamente ou indiretamente, por meio do aumento de produção de NADPH pela proteína de ligação a Ca^{2+} , calmodulina. Assim, o acúmulo de Ca^{2+} estaria envolvido na produção de ROS (GRANT & LOAKE, 2000). Presume-se que o Ca^{2+} também possa sinalizar outras reações de defesa.

Alguns ESTs descritos na Tabela I (apêndice) deste estudo indicam que a rota de resistência mediada pelo SA possa ter sido ativada no tratamento onde as plantas sofreram injúrias por larvas de *P. xylostella*. Este fato deve-se ao aparecimento de genes relacionados com a diferenciação no fluxo de íons de O_2 e íons Ca^{2+} , como por exemplo, a proteína calcineurina (AT4G17615) que participa da via de sinalização de cálcio e sequências correspondentes a proteínas *avr* (AT4G17615, AT5G39730, AT5G13320), transporte de íons de hidrogênio (AT4G00895) e calmodulinas (AT2G26190, AT4G25800).

Apesar de haver em alguns casos a expressão de genes diretamente relacionados com o acúmulo de SA ou de resposta a ação de bactérias, fungos e vírus, esses podem ter relação com alguma infecção secundária por fitopatógenos, que não chegaram a ocasionar lesões perceptíveis nas folhas.

A resposta de defesa da planta contra insetos é regulada principalmente pela ação ou ativação da molécula JA, que também está relacionada à defesa contra estresses ambientais, ferimentos mecânicos e infecção por fitopatógenos (McCONN et al., 1997; OVERMYER et al., 2000). Algumas dessas respostas também podem envolver a participação sinérgica do ET (GUO & ECKER, 2004).

O JA é sintetizado a partir do ácido linolênico, o qual é liberado dos lipídeos da membrana plasmática via rota dos octadienóides (TAIZ & ZEIGER, 2004). No entanto, é possivelmente reconhecido e transduzido por receptores ainda não identificados.

Várias ESTs tiveram alta homologia com genes que participam em algum momento da cadeia formadora do JA ou do ET, como por exemplo, as proteínas sulfotransferase que têm sua expressão induzida por ferimentos. Esses acionam a cadeia de formação do jasmonato e estimula a produção ou acúmulo de etileno (AGI - AT1G74100). No entanto, a afirmação de que após a síntese do JA, alguns receptores são ainda desconhecidos, pode remeter à questão de que alguns dos genes descritos nesse trabalho, como não envolvidos na defesa da planta contra insetos, possam estar envolvidos; no entanto, ainda não reconhecidos como tal, por serem citados em outros estudos de resposta a diferentes fatores de estresse.

As 29 sequências obtidas referentes a plantas de repolho cujas sementes receberam como fator de indução a BPCP *K. ascorbata* e injúrias pelo inseto podem ser conferidas na Tabela II (apêndice), onde: 4 genes estão relacionados diretamente com a defesa da planta, 7 com o estresse, 2 com a fotossíntese, 5 com o metabolismo, 4 com a tradução e transcrição, 2 com o crescimento e desenvolvimento da planta e 5 relacionados ao transporte endógeno.

Dentre os ESTs gerados com esta biblioteca, pode-se observar que muitos genes que apareceram na construção da biblioteca de cDNA de plantas que não receberam o fator de indução pela BPCP foram suprimidos, o que reforça a hipótese de que a BPCP *K. ascorbata* alterou diretamente o metabolismo da planta. O menor número de genes expressos pode indicar um direcionamento da expressão dos genes de defesa da planta, de forma que esta pudesse se defender das injúrias causadas pela alimentação de lagartas de *P. xylostella*.

Pode-se observar o aparecimento de alguns genes em ambas as situações, como é o caso do citocromo p450. Estes formam uma grande família de monooxigenases envolvidas na síntese de vários metabólitos secundários que incluem hormônios, esteróis, ácidos graxos e aleloquímicos de plantas

(SMIGOCKI & WILSON, 2004). As enzimas da família do citocromo p450 são capazes de hidroxilar ácidos graxos e estes estão envolvidos na resposta de plantas a estresse abiótico, bem como a ferimentos e ataques de insetos e patógenos (KANDEL *et al.* 2005). No entanto, seria necessária a quantificação dos níveis de expressão deste gene, assim como de outros que se repetem, para estabelecer uma relação com sua influência nas diferentes situações avaliadas neste estudo.

O ajuste de estratégias de seleção bem como a caracterização de genes importantes na indução de resistência em plantas contra insetos pode favorecer a obtenção de cultivares resistentes de caráter mais eficiente do que a observada por meio de técnicas agrícolas tradicionais.

Segundo AGRAWAL (2000), a manutenção da defesa da planta, promove gastos energéticos e uma alternativa para este episódio seria o emprego de defesas induzidas como uma estratégia oferecida a plantas para economizar energia com o ataque por herbívoros. É sabido que essa resistência induzida contra doenças e herbivoria, desencadeada por processos, tanto bióticos como abióticos, representam custos metabólicos mais baixos, sem que aconteçam grandes modificações fisiológicas na planta e, muitas vezes, é altamente eficiente (VALLAD & GOODMAN 2004).

Com o advento das informações relacionadas às sequências de transcritos encontradas neste estudo, foi possível construir um gráfico da porcentagem do desempenho metabólico da planta frente a injúrias causadas por *P. xylostella* sem e com estímulos de indução de resistência pela BPCP *K. ascorbata*, como podemos observar na Figuras 11 (A e B).

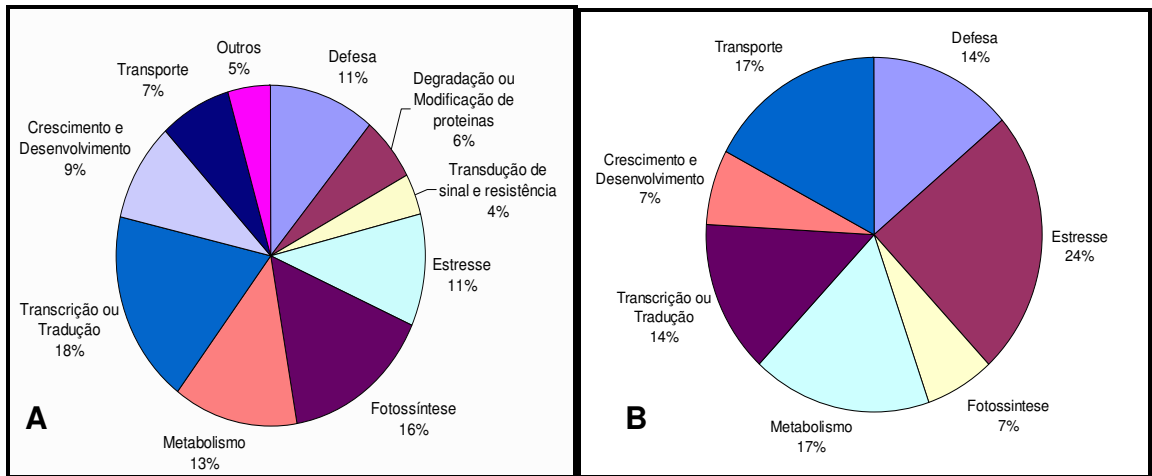


Figura 11. (A) Porcentagem de ESTs relacionados ao metabolismo de plantas de repolho que sofreram indução pela injúria pela traça das crucíferas *P. xylostella*. **(B)** Porcentagem de ESTs relacionadas ao metabolismo de plantas de repolho que sofreram indução pela injúria da traça-das-crucíferas *P. xylostella* e inoculação da BPCP *K. ascorbata*.

As descrições dos possíveis papéis onde estão envolvidas as sequências de genes citadas neste estudo são indicações de caminhos a serem seguidos que dependerão de novas pesquisas e de um estudo mais minucioso das rotas relacionadas às sequências descritas anteriormente.

No entanto, ainda são necessários inúmeros esclarecimentos a respeito de sequências gênicas, às quais não se obteve pareamento ainda, ou mesmo em relação aos caminhos metabólicos seguidos até a formação de proteínas envolvidas na defesa contra insetos, ainda pouco estudadas ou mesmo, desconhecidas.

6. CONCLUSÕES

1. A planta inoculada com a BPCP *Kluyvera ascorbata* sofre alterações metabólicas, suprimindo o aparecimento de alguns genes durante o processo de defesa da planta contra o estresse causado pela injúria de insetos;

2. O menor número de genes transcritos para plantas inoculadas reafirma a necessidade da utilização de fatores extrínsecos, como a utilização de BPCPs, no processo de indução de defesa da planta contra insetos;

3. São necessários estudos para complementar as informações geradas no presente trabalho e proporcionar maior conhecimento dos genes e seus níveis de expressão, relacionando-os à defesa das plantas.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, M. D.; KERLAVAGE, A. R.; FLEISCHMANN, R. D.; FULDNER, R. A.; BULT, C. J.; LEE, N. H.; KIRKNESS, E. F.; WEINSTOCK, K. G.; GOCAYNE, J. D.; WHITE, O.; SUTTON, G.; BLAKE, J. A.; BRANDON, R. C.; CHIU, M. W.; CLAYTON, R. A.; CLINE, R. T.; COTTON, M. D.; EARLE-HUGHES, J.; FINE, L. D.; FITZGERALD, L. M.; FITZHUGH, W. M.; FRITCHMAN, J. L.; GEOGHAGEN, N. S. M.; GLODEK, A.; GNEHM, C.L.; HANNA, M. C.; HEDBLUM, E.; HINKLE, JR. P.S.; KELLEY, J. C.; KLIMEK, K. M.; LIU, L. I.; MARMAROS, S. M.; MERRICK, J. M.; MORENO-PALANQUES, R. F.; MCDONALD, L. A.; NGUYEN, D. T.; PELLEGRINO, S. M.; PHILLIPS, C. A.; RYDER, S. E.; SCOTT, J. L.; SAUDEK, D. M.; SHIRLEY, R.; SMALL, K. V.; SPRIGGS, T. A.; UTTERBACK, T. R.; WEIDMAN, J. F.; LI, Y.; BARTHLOW, R.; BEDNARIK, D. P.; CAO, L.; CEPEDA, M. A.; COLEMAN, T. A.; COLLINS, E. J.; DIMKE, D.; FENG, P.; FERRIE, E.; FISCHER, C.; HASTINGS, G. A.; HE, W. W.; HU, J. S.; HUDDLESTON, K. A.; GREENE, J. M.; GRUBER, J.; HUDSON, P.; KIM, A.; KOZAK, D. L.; KUNSCH, C.; JI, H.; LI, H.; MEISSNER, P. S.; OLSEN, H.; RAYMOND, L.; WEI, Y. F.; WING, J.; XU, C.; YU, G. L.; RUBEN, S. M.; DILLON, P. J.; FANNON, M. R.; ROSEN, C. A.; HASELTINE, W. A.; FIELDS, C.; FRASER, C. M.; VENTER, C. J. Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. **Nature**, v. 377 , p. 3-174, 1995.

AGARWAL, S. & SHENDE, S. T. Tetrazolium reducing microorganisms inside the roots of *Brassica* species. **Current Science**, Bangalore, v.56, p.187-188, 1987.

AGRAWAL, A. Plant defense: signal in insect eggs. **Tree**, Iowa, v.15, n.9, p. 357, 2000.

AGRAWAL, G. K.; JWA, N. S.; HAN, K. S.; AGRAWAL, V. P. AND RAKWAL, R. Isolation of a novel rice PR4 type whose mRNA expression is modulated by blast

pathogen attack and signaling components. **Plant Physiology Biochemistry**, Paris, v.41, p.81-90, 2003.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. AND LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p.3389-3402, 1997.

AUSUBEL, F. M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? **Nature Immunology**, v.6, p.973–979, 2005

AZEVEDO, J. L. **Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, p.233-268, 2002.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 40-62, 2000. Disponível em: <http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/3/4> acesso em 06/2009.

BALDWIN, I. T. Jasmonate induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 8113- 8118, 1998.

BARROS, R.; ALBERT JÚNIOR, I. B.; OLIVEIRA, A. J.; SOUZA, A. C. F.; LOGES, V. Controle químico da traça das crucíferas, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) em repolho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 22, n. 3, p. 463-469, 1993.

BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.16, n. 4, p.729-770, 1998.

BECKERS, G. J. M. & SPOEL, S. H. Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. **Plant Biology**, New York, v. 8, pp. 1-10, 2006.

BEZERRIL, E. F. & CARNEIRO, J. S. Manejo integrado da traça do repolho, *Plutella xylostella* (L.) no Planalto do Ibiapaba-Ceará. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.10, p. 49, 1992.

BIRREN, B.; GREEN, E. D.; KLAPHOLZ, S.; MYERS, R. M.; ROSKAMS, J. **Genome analysis: a laboratory manual**. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.2, p.80-82, 1997.

BOSTOCK, R. M. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 99-109, 1999.

BONG, C. F. J. & SIKOROWSKI, P. P. Effects of cytoplasmic polyhedrosis virus and bacterial contamination on growth and development of the corn earworm, *Helicoverpa zea*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v.57, p.406-412, 1991.

CAMPOS, L. C. A.; CASTELO BRANCO, M.; JUNQUEIRA, A. M. R. Suscetibilidade de três populações de traça-das-crucíferas a *Bacillus thuringiensis*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.15, n.1, p.40-42, 1997.

CASTELO BRANCO, M.; VILLAS BÔAS, G. L.; FRANÇA, F. H. Nível de dano de traça-das-crucíferas em repolho. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.14, n.2, p.154-157, 1996.

CASTELO BRANCO, M. & GATEHOUSE, A. G. Insecticide resistance in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) in the Federal District, Brazil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Piracicaba, v. 26, n.1, p. 75-79, 1997.

CASTELO BRANCO, M. & GUIMARÃES, A. L. Controle da traça das crucíferas em repolho. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.8, n.1, p. 24-25, 1989.

CASTELO BRANCO, M.; FRANÇA, F. H.; MEDEIROS, M. A.; LEAL, J. G. Uso de inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e traça-das-crucíferas: um estudo de caso. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.19, n.1, p.60-63, 2001.

CASTELO BRANCO, M.; VILLAS BÔAS, G. L. Traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* – Artrópodes de importância econômica. **Comunicado Técnico da Embrapa Hortaliças**, Brasília, n. 4, p. 1-3, 1997.

CASTELO BRANCO, M.; PONTES, L. A.; AMARAL, P. S. T.; MESQUITA, M. V. Inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e broca grande e impacto dos produtos sobre *Trichogramma pretiosum*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, n.4, p.652-654, 2003.

CATTELAN, A. J. Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal. Londrina: **EMBRAPA/CNPS**, p. 36, 1999.

CHEN, C.; CHANG, S.; CHENG, L. & HOU, R. F. Deterrent effect of the chinaberry extract on oviposition of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 120, p. 165-169, 1996.

CHOMCZYNSKI, P. & MACKEY, K. Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. **Biotechniques**, v.19, n.6, p. 942-945,1995.

CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v.162, n.1, p.156-159, 1987.

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

CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Biosynthesis and action of jasmonate in plants. **Annual Review of Plant and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 355-381, 1997.

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

DELANEY, T. P.; FRIEDRICH, L.; RYALS, J. A. *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 92, p. 6602–6606. 1995.

DIAS, D. G. S.; SOARES, C. M. S.; MONNERAT, R. G. Avaliação de larvicidas de origem microbiana no controle de traça-das-crucíferas em couve-flor no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 387-390, 2004.

DICKSON, M. H.; SHELTON, A. M.; EIGENBRODE, S. D.; VAMOSY, M. L.; MORA, M. Selection for resistance to diamondback moth (*Plutella xylostella*) in cabbage. **Hortscience**, Alexandria, v.25, n.12, p.1643-1646, 1990.

DOARES, S. H.; NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J.; CONCONI, A.; RYAN, C. A. Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 1741–1746, 1995.

EIGENBRODE, S. D.; SHELTON, A. M.; DICKSON, H. Two types of resistance to the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in cabbage. **Environmental Entomology**, College Park, v. 19, n.4, p. 1086-1090, 1990.

EIGENBRODE, S. D.; STONER, K. A.; SHELTON, A. M.; KAIN, W. C. Characteristics of glossy leaf waxes associated with resistance to diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in *Brassica oleracea*. **Journal of Economic Entomology**. Lanham, v. 84, n. 5, p. 1609-1618, 1991.

FELTON, G. W. & KORTH, K. L. Trade-offs between pathogen and herbivore resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 309-314, 2000.

FISHER, P. J.; PETRINI, O.; LAPPIN SCOTT, H. M. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, Cambridge, v.122, n. 2, p.299-305, 1992.

FIDANTSEF, A. L.; STOUT, M. J.; THALER, J. S.; DUFFEY, S. S.; BOSTOCK, R. M. Signal interections in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 54, p. 97-114, 1999.

FRANÇA, F. H. & M.A MEDEIROS. Impacto da combinação de inseticidas sobre a produção de repolho e parasitóides associados com a traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v. 16, p.132-135, 1998.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S. & OMOTO C. **Entomologia Agrícola**. FEALQ. Piracicaba. p. 920, 2002.

GEORGHIOU, G. P. & LAGUNES-TEJADA, A. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Rome: AGPP/MISC/91-1. p. 318, 1991.

GERMIDA, J. J. & FREITAS, J. R. Growth promotion of cabbage, lettuce and onion by fluorescent pseudomonads under growth chamber conditions. In: **Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria**, Adelaide. Proceedings... Adelaide: OEDC-OEDC, p. 37-39, 1994.

GRANT, J. J. & LOAKE, G. J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiology**, Washington, v. 124, n. 1, p. 21-29, Sep 2000.

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

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE W. F.; KLOPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p. 895-914, 1997.

HWANG, C. F.; LIN, Y.; D'SOUZA, T.; CHENG, C. L.; Sequences necessary for nitrate-dependent transcription of Arabidopsis nitrate reductase genes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, p. 853–862, 1997.

IMENES, S. D. L.; CAMPOS, T. B.; RODRIGUES NETTO, S. M.; BERGMANN, E. C. Avaliação da atratividade de feromônio sexual sintético da traça das crucíferas, *Plutella Xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), em cultivo orgânico de repolho. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69 p. 81-84, 2002.

KANDEL, S.; MORANT, M.; BENVENISTE, I.; BLÉE, E.; WERCK-REICHHART, D.; PINOT, F. Cloning, functional expression, and characterization of CYP709C1, the sub-terminal hydroxylase of long chain fatty acid in plants. **The Journal of Biological Chemistry** **280**, v.43, p. 35881-35889, 2005.

KARBAN, R. & BALDWIN I. T. Induce responses to herbivory. **University of Chicago Press**, Chicago, p. 319, 1997.

KOVTUN, Y.; CHIU, W. L.; TENA, G.; SHEEN, J. Functional analysis of oxidative stressactivated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, USA, v. 97, p. 2940-2945, 2000.

LAWTON, K. A.; POTTER, S. L.; UKNES, S.; RYALS, J. Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 581–588, 1994.

LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. São Paulo, Ícone, p.336, 1991.

LAZAROVITS, G. & NOWAK, J. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n. 2, p. 188-192, 1997.

LIEW, C. C., HWANG, D. M.; FUNG, Y. W.; LAURENSSEN, C.; CUKERMAN, E.; TSUI, S. AND LEE, C. Y. A catalogue of genes in the cardiovascular system as identified by expressed sequence tags. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, v. 91, p. 10645-10649, 1994.

LIN, J.; ECKENRODE, C. J.; DICKSON, M. H. Variation in *Brassica oleracea* resistance to diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 76, n.6, p. 1423-1427, 1983.

LIN, J.; DICKSON, M. H.; ECKENRODE, C. J. Resistance of *Brassica* lines to the diamondback moth (Lepidoptera: Yponomeutidae) in the field, and inheritance of resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 77, n.5, p. 1293-1296, 1984.

MALECK, K. & DIETRICH, R. Defense on multiple fronts: How do plants cope with diverse enemies? **Trends Plant Sciences**. v. 4, p. 215–219, 1999.

MALONE, G., ZIMMER, P.D., MENEGHELLO, G.E., BINNECK, E., PESKE, S.T. Prospecção de genes em bibliotecas de cDNA. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 1, p. 07-13, 2006.

MARIANO, R. L. R. & ROMEIRO, R. S. Indução de resistência sistêmica mediada por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. In: MELO, I. S. &

AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, Cap. 9, p. 305-324, 2000.

MARIANO, R.L.R. & KLOEPPER, J.W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p.121-137, 2000.

MARIANO RLR & ASSIS SMP. Preservação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO RLR. (Ed.) **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. Recife, p. 37-47. 2000.

McCONN, M.; CREELAMAN, R. A.; BELL, E.; MULLET, F. E.; BROWSE, J. Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 94, n. 10, p. 5473-5477, 1997.

McDOWELL, J.M. & DANGL, J.L. Signal transduction in the plant immune response. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v.25, n.2, p.79-82, 2000.

McINROY, J. A. & KLOEPPER, J. W. Studies on indigenous endophytic bacteria of sweet corn and cotton. In: **Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the Release of GMOs**. O'GARA, F.; DOWLING, D. N. AND BOESTEN, B. eds. VCH, New York. p.19-28. 1994.

MAU, R. F. L. & KESSING, J. L. M. **Ceratitis capitata**. 2007. disponível em: <http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/crop/Type/ceratiti.htm> ; acesso em jun/2009.

MEDEIROS, F. H. V.; MARIANO, R. L. R.; BARROS, R. Potencial de bactérias no controle biológico da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) em repolho. In: **Jornada de Iniciação Científica**, 5, Recife: Resumos... Recife: FACEPE/CNPq, 2001. p. 264, 2001.

MELO, P. E.; CASTELO BRANCO, M.; MADEIRA, N. R. Avaliação de genótipos de repolho para a resistência à traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.12, n.1, p.19-24, 1994.

MENOSSEI, M.; SILVA-FILHO, M. C.; VINCENTZ, M.; VAN-SLUYS, M-A.; SOUZA, G. M. Sugarcane functional genomics: gene discovery for agronomic trait development.

International Journal of Plant Genomics, USA, v. 2008, n. 458732, Article ID 458732, 2008.

MONNERAT, R. G.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; BUTT, T. M.; BORDAT, D. Caracterização de populações geograficamente distintas da traça-das-crucíferas por suscetibilidade ao *Bacillus thuringiensis* Berliner e RAPD-PCR. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 607-609, 2004.

MONNERAT, R. G. Interrelations entre la teigne des cruciferes, *Plutella xylostella*, son parasitoide *Diadegma sp.* et la bacterie entomopathogene *Bacillus thuringiensis* Berliner. **These de doctorat en Sciences Agronomiques**. Ecole Nationale Superieure Agronomique de Montpellier, p.160, 1995.

MUSSURY, R. M.; FERNANDES, W. D.; SCALON, S. P. Q. População de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) e *Plutella xylostella* Linnaeus, 1758, associada a *Brassica napus* L. em função de dois métodos de captura. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 993-998, 2002.

NURNBERGER, T. & SCHEEL, D. Signal transmission in the plant immune response. **Trends in Plant Science**, London, v. 6, n. 8, p. 372-379, Aug. 2001.

OOI, P. A. C. & KELDERMAN, W. The biology of three common pests of cabagges in Cameron Highlands. **Malaysian Agricultural Journal**, Malaysia v. 52, p.85-101, 1979.

OROZCO-CÁRDENAS, M. L.; MCGURL, B.; RYAN, C. A. Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. **Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America**, USA, v.90, n. 17, p.8273–8276, 1993.

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

PEÑA-CORTÉS, H.; ALBRECHT, T.; PRAT, S.; WEILER, E. W.; WILLMITZER, L. Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. **Planta**, Berlin, v.191, n.1, p.123–128, 1993.

PIETERSE, C. M. J.; VAN WEES, S. C. M.; VAN PELT, J. A.; KNOESTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, H.; WEISBEEK, P. J.; VAN LOON, L. C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Rockville, v.10, p.1571–1580, 1998.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, Guildford, v.20, p.1-11, 2001.

REYMOND, P. & FARMER, E. E. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.1, n. 5, p.404–411, 1998.

ROMEIRO, R. S. PGPR e indução de resistência sistêmica em plantas a patógenos. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 26, n.1, p.177-184, 2000.

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

RYAN, C. A. & PEARCE, G. L. Polypeptide hormones. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 125, p. 65-68, 2001.

RYAN, C. A. The system in signaling pathway: Differential activation of plant defensive genes. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1477, p.112–121, 2000.

SAMBROOK J. & RUSSELL D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMIYAPPAN, R. Molecular mechanisms involved in the PGPR mediated suppression of insect pests and plant pathogens attacking major agricultural and horticultural crops in India. In: **International PGPR Workshop**, 6, Calicute-India: Anais...p. 5-10, 2003.

SCHMELS, E. A.; CARROL, M. J.; LECLERE, S. L.; PHIPPS, S. M.; MEREDIT, J. A.; CHOUREY, P. S.; ALBORN, H. T.; TEAL, P. E. Fragments of ATP sintase mediate plant perception of insect attack. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 103, n. 23, p. 8894-8899, 2006.

SHAH, J.; TSUI, F.; KLESSIG, D. F. Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sai1) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the tms2 gene. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 10, n.1, p.69-78, 1997.

SILVA, G. & MARIANO, R. L. R. Potencial de bactérias endofíticas para controle biológico da traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella* L. 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) em repolho. In: **Congresso de Iniciação Científica**, 9, Anais...Recife: UFRPE, p. 70, 1999.

SILVA JÚNIOR, A. A. Repolho: fitologia, fitotecnia, tecnologia alimentar e mercadológica. **EMPASC**, Florianópolis, p. 259, 1987.

SMITH, C. M. & BOYKO, E. V. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Oxford, v. 122, n. 1, p.1–16, 2007.

SMIGOCKI, A. C.; WILSON, D. Pest and disease resistance enhanced by heterologous suppression of a *Nicotiana plumbaginifolia* cytochrome P450 gene CYP72A2. **Biotechnology Letters**. v. 26, p. 1809-1814, 2004.

SPENCER, J. L. Waxes enhance *Plutella xylostella* oviposition in response to sinigrin and cabbage homogenates. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Oxford, v. 81, n. 2, p. 165-173, 1996.

SPENCER, J. L.; PILLAI, S.; BERNAYS, E. A. Synergism in the oviposition behavior of *Plutella xylostella*: sinigrin and wax compounds. **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 12, n. 4, p. 483-500, 1999.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.35, p.235-270, 1997.

STOUT, M. J.; FIDANTSEF, A. L.; DUFFEY, S. S.; BOSTOCK, R. M. Signal interactions in pathogen and insect attack: systemic plant-mediated interactions between pathogens and herbivores of the tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.54, n. 3-4, p.115-130, 1999.

STOTZ, H. U.; PITTENDRIGH, B. R.; KROYMANN, J.; WENIGER, K.; FRITSCH, J.; BAUKE, A.; MITCHELL-OLDS, T. Induced plant defense responses against chewing insects. Ethylene signaling reduces resistance of Arabidopsis against egyptian cotton worm but not diamondback moth. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 124, n. 3, p.1007-1018, 2000.

STURZ, A. V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.175, n. 2, p.257-263, 1995.

STURZ, A. V. & NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, v. 15, n. 2, p.183-190, 2000.

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

TALEKAR, N. S. & SHELTON, A. M. Biology, ecology and management of the diamondback moth. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.38, p.275-301, 1993.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. & KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, USA, v. 24, n.8, p.1596-1599, 2007.

THOMMA, B. P. H. J.; EGGERMONT, K.; PENNINGCKX, I. A. M. A.; MAUCH-MANI, B.; VOGELSANG, R.; CAMMUE, B. P. A. AND BROEKAERT, W. F. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America**. USA, v. 95, n. 25, p.15107–15111, 1998.

THULER, R. T. Efeito da bacterização de cultivares de repolho com isolados endofíticos e epifíticos no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae). 74f. **Dissertação (Mestrado em Agronomia)** – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2003.

THULER, R. T. *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae): Estratégias para o manejo integrado. 83f. **Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola)**, Universidade Estadual Paulista, Unesp, Jaboticabal, 2006.

- TOMCZYK, A. The use of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to decrease the susceptibility of cucumber to spider mites. **IOBC WPRS Bulletin**, France, v. 22, n. 1, p. 251-254, 1999.
- TOMCZYK, A. & KIELKIEWICZ, M. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on development of spider mite populations on glasshouse cucumber and tomato. **Journal of Plant Protection Research**, Poland, v. 40, n.1, p. 22-25, 2000.
- TON, J.; VAN PELT, J. A.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. Differential effectiveness of salicylate and jasmonic acid/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 15, n.1, p.27-34, set/2002.
- TURLINGS, T. C. J.; ALBORN, H. T.; LOUGHRIN, J. H. & TUMLINSON, J. H. VOLICITIN. An elicitor of maize volatiles in the oral secretion of *Spodoptera exigua*: its isolation and bioactivity. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, n. 1, p.1573-1561, 2000.
- TURNER, J. T. & BACKMAN, P. A. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, USA, v. 75, n. 4, p. 347-353, 1991.
- ULMER, B. C.; GILLOTT, C.; WOODS, D.; ERLANDSON, M. Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), feeding and oviposition preferences on glossy and waxy *Brassica rapa* (L.) lines. **Crop Protection**, Guildford, v. 21, n. 4, p. 327-331, 2002.
- VALLAD, G. E. & GOODMAN, R. M. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. **Crop Science Society of America**, Madison, v.44, p.1920–1934, 2004.
- VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 453–483, 1998.

ZEHNDER, G.; KLOEPPER, J.; YAO, C.; WEY, G. Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) by plant growth-promoting rhizobacteria. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 90, n. 2, p. 391-396, 1997.

8. APÊNDICE

Tabela I. ESTs resultantes do sequenciamento do material genético de folhas de Brássicas que sofreram injúrias em casa de vegetação por *Plutella xylostella*.

Número AGI	Melhor e-value	Possível Proteína	Descrição	Nº de Transcritos
I. Relacionado à resposta de defesa				
AT2G26190	2,00E-129	Família de proteína de ligação calmodulina	Resposta de defesa a fitopatógenos	3
AT4G25800	1,00E-23	Proteína ligação a calmodulina	Resposta de defesa a fitopatógenos	1
AT1G17190	1,00E-130	Glutathione S-transferase (class tau) 26	Processo catabólico de Toxinas	2
AT1G65820	1,00E-104	Microsomal glutathione S-transferase	Metabolismo do citocromo P450	2
AT1G74100	9,00E-55	Família de proteínas sulfotransferase	Expressão induzida por ferimento, jasmonato e estimula o etileno.	2
AT1G55490	1,00E-156	CPN60B (chaperonina 60 beta)	Resistência sistêmica adquirida	3
AT5G13320	4,00E-72	PBS3 (AVRPPHB suscetível 3)	Necessário para o acúmulo de ácido salicílico	4
AT4G37930	3,00E-135	SHM1 (serina hidroximetiltransferase 1)	Resposta a hipersensibilidade da planta	1
AT3G66654	4,00E-39	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	Libera citocromo envolvido na apoptose celular ou morte celular programada	1
AT1G07890	7,00E-151	APX1 (ascorbato peroxidase 1)	Envolvido na produção de ROS	2
AT1G33970	2,00E-71	Proteína sensível a avirulência	Interage com as proteínas PR	1
AT5G39730	8,00E-132	Proteína sensível a avirulência	Interage com as proteínas PR	1
AT4G24220	7,00E-30	VEP1 (vein patterning 1)	Expressão induzida por ferimento	1
AT2G44490	6,00E-30	PEN2 (penetração 2)	Deposição de calose na parede celular durante a resposta de defesa	2
AT5G59890	1,00E-72	ADF4 (fator 4 de despolimerização de actina)	Gene de resistência	2
AT3G45640	5,00E-152	MPK3 mitógeno ativado por proteínas quinases	Percepção de diferentes patógenos e/ou elicitores.	1
AT2G38540	9,00E-62	LTP1 (proteína de transferência de lipídeos)	Proteína relacionada com patogênese PR-14	1
AT5G59320	2,00E-33	LTP3 (proteína de transferência de lipídeos)	Proteína relacionada com patogênese PR-14	2
AT5G59310	1,00E-57	LTP4 (proteína de transferência de lipídeos)	Proteína relacionada com patogênese PR-14	1
AT5G55450	7,00E-15	LTP1 (proteína de transferência de lipídeos)	Proteína relacionada com patogênese PR-14	1
AT1G76650	9,00E-62	CML38; ligação de íon de cálcio	Envolvido na resposta ao ferimento.	1
AT1G31580	3,00E-14	ECS1	Codifica proteínas de parede celular. Resposta de defesa.	1
AT1G62380	7,00E-26	ACO2 (ACC oxidase 2)	Estímulo do etileno, resposta ao estresse salino.	1
AT1G70830	2,00E-81	MLP28 (MLP-LIKE proteína 28)	Envolvido na resposta a defesa e estímulo biótico	1

AT5G06320	4,00E-28	NHL3 (NDR1/HIN1-like 3)	Resposta de defesa a bactéria e vírus.	1
AT1G72290	8,00E-55	Família de proteínas Kunitz	Envolvido na defesa da planta contra herbívoros	2
AT2G17660	5,00E-78	Proteína suscetível ao óxido nítrico (NO)	Elicitor das vias de respostas de defesa de plantas	1
II. Degradação ou Modificação de proteína				
AT2G35780	4,00E-97	SCPL26 (serina carboxipeptidase-like 26)	Envolvido na proteólise	1
AT4G16190	1,00E-31	Cisteína proteinase	Proteólise mediadora na morte celular induzida por patógenos	1
AT3G59940	2,00E-22	Proteína F-Box contendo repetições kelch	Degradação proteica relacionada à ubiquitina/proteossomo	1
AT1G21270	3,00E-17	WAK2 (parece associada à quinase 2)	Atividade Serina/Treonina envolvida na fosforilação de proteínas	1
AT1G74330	1,00E-35	Proteína quinase	Atividade Serina/Treonina envolvida na fosforilação de proteínas	1
AT2G37840	2,00E-71	Proteína quinase	Atividade Serina/Treonina envolvida na fosforilação de proteínas	1
AT2G35795	4,00E-57	DNAJ proteína de choque térmico	Envolvidas na Dobragem de proteínas	1
AT3G02090	3,00E-120	MPPBETA; metaloendopeptidase	Catalisa a hidrólise de ligações peptídicas não terminais em polipeptídeos	1
AT1G67870	8,00E-15	Proteína rica em glicina	Dinâmica celular	1
AT1G64040	1,00E-20	TOPP3 (proteína fosfatase tipo um serina/treonina)	Codifica a subunidade catalítica do tipo fosfoproteína ser/Thr fosfatase	1
AT5G64350	8,00E-143	FKBP12 (FK506 proteína de ligação 12 kD)	Envolvido na Dobragem de proteínas	3
AT2G43560	1,00E-46	FKBP peptidil-prolil cis-trans isomerase	Dobragem de proteínas	1
AT1G67000	7,00E-59	Quinase	Atividade quinase serina/treonina, fosforilação de proteínas	1
AT3G19595	1,00E-45	Fosfoproteína fosfatase	Desfosforilação de proteínas	1
AT4G28470	1,00E-130	RPN1B (subunidade 26S proteassome S2 1B)	Degradação de proteínas marcadas com ubiquitina	1
AT3G60820	4,00E-17	PBF1 (subunidade 20S proteassome beta F1)	Processo catabólico de proteínas ubiquitina-dependentes	1
AT1G75950	2,00E-54	SKP1 (SKP1 homólogo)	Família de E3 ubiquitina ligases	1
AT3G55380	9,00E-22	UBC14 (ubiquitina conjugando enzima 14)	Processo catabólico de proteínas ubiquitina-dependentes	1
AT5G58710	7,00E-19	ROC7; peptidil-prolil cis-trans isomerase	Isomerases, dobramento de proteínas	3
III. Transdução de Sinal e Resistência				
AT4G11110	0.0	SPA2 (SPA1 relacionado 2)	Regula o desenvolvimento das mudas principalmente no escuro	1

AT4G17615	1,00E-170	CBL1 (proteína 1 calcineurina B-Like)	Participa da via de sinalização de cálcio	1
AT4G33920	3,00E-109	Proteína da família fosfatase 2C	Proteína desfosforilação do aminoácido	1
AT5G66210	1,00E-163	CPK28	Transdução de sinais e fosforilação de proteínas	1
AT1G56140	8,00E-40	Proteínas de repetições ricas em leucina	Percepção hormonal, função de resistência	1
AT1G51860	5,00E-104	Proteínas de repetições ricas em leucina	Percepção hormonal, função de resistência	1
AT2G31880	1,00E-119	Proteína transmembrana repetições ricas em leucina	Percepção hormonal, função de resistência	1
IV. Resposta ao Estresse				
AT5G52300	8,00E-22	LTI65/RD29B (29B sensível a dessecação)	Responde à falta de água, frio e salinidade	1
AT5G17920	5,00E-111	Cobalamina independente metionina sintase	Responde ao estresse salino e a íons de cádmio	1
AT1G35720	1,00E-71	ANNAT1 (anexina 1)	Responde ao estresse osmótico, estresse oxidativo e ao estímulo de ácido abscísico	1
AT5G55070	8,00E-96	Família proteína 2-oxoacido desidrogenase	Responde ao estresse oxidativo	2
AT3G11630	3,00E-25	2-cis peroxiredoxina, cloroplasto (BAS1)	Responde ao frio e ataque por bactérias	3
AT4G03520	1,00E-68	Tioredoxina M-tipo 2	Responde ao estresse oxidativo	1
AT3G11410	2,00E-92	Proteína fosfatase 2CA	Responde ao Frio, à falta de água, resposta ao estímulo de ácido abscísico	1
AT1G53580	2,00E-144	GLY3 (glioxilase II 3)	Responde ao estresse salino	1
AT4G12770	6,00E-34	Proteína de ligação de choque térmico	Responde ao choque térmico	1
AT3G10920	4,00E-83	MSD1 manganês superóxido dismutase 1	Responde ao estresse salino, defesa para bactéria	2
AT1G34000	1,00E-38	OHP2 (uma hélice de proteína 2)	Estresse relacionado a luminosidade	1
AT3G22370	2,00E-15	AOX1A (alternativa oxidase 1A)	Responde ao frio, ao estresse, a respiração celular, a redução de oxidação.	1
AT4G02380	1,00E-20	SAG21 (senescência associado ao gene 21)	Responde ao frio, ao estresse oxidativo, à espécie reativa de oxigênio	1
AT3G12780	5,00E-57	PGK1 (fosfoglicerato quinase 1)	Responde ao frio, Glicólise e íons de cádmio	1
AT3G05880	3,00E-11	RCI2A (rare-cold-inducible 2A)	Responde ao Frio, ao estímulo pelo ácido abscísico, a salinidade.	1
AT5G62520	4,00E-57	SRO5 (similar ao RCD 1)	Induz a morte celular e responde ao estresse salino (induzido por NaCl)	2
AT4G10250	1,00E-178	Proteína 22.0 de choque térmico	Responde ao calor	1
AT4G24280	2,00E-11	CPHSC70-1 (cloroplasto prot. choque térmico 70-1)	Responde a íons de cádmio e choque térmico	1
AT4G34190	4,00E-97	SEP1 (proteína 1 de estresse aumentado)	Estresse relacionado a luminosidade	1
AT2G36530	1,00E-138	LOS2 (baixa expressão de genes 1)	Envolvidos na tolerância ao frio dependente de luz e	1

AT2G41430	5,00E-12	ERD15 (resposta a desidratação 15)	codifica uma enolase Responde a falta de água, bactéria e intensidade de luz	1
AT1G76180	1,00E-46	ERD14 (resposta a desidratação 14)	Responde ao frio, dissecação, água e estímulo do ácido abscísico	6
AT3G22840	1,00E-38	ELIP1 (early light-inducible protein)	Responde a baixas temperaturas	1
AT2G17840	3,00E-73	ERD7 (resposta a desidratação 7)	Gene induzido pela seca. Estresse por alta luminosidade, frio e salinidade	1
AT1G54410	2,00E-70	Família de proteínas desidrin	Estresse por falta de água, responsáveis por estímulos endógenos e abióticos	4
AT1G20450	7,00E-67	ERD10 resposta a desidratação 10	Responde ao frio, a falta de água e ao estímulo de ácido abscísico.	1
AT5G59880	7,00E-30	ADF3 fator 3 de despolimerização da actina	Responde ao estresse oxidativo e a íons de cádmio	1
V. Fotossíntese				
AT4G22260	5,00E-93	IM (immutans)	Processo biossintético dos carotenóides, organização cloroplasto e de plastídeo	2
AT1G15820	9,00E-73	LHCB6 (complexo de captação de luz PSII)	Ligação da clorofila. Fotossíntese	2
AT1G30380	3,00E-91	PSAK (subunidade K do fotossistema I)	Codifica a subunidade K de fotossistema, centro de reação	3
AT1G79040	3,00E-120	PSBR (subunidade R fotossistema II)	Envolvido na montagem estável de PSII, da subunidade complexa de oxigênio PsbP	5
AT4G28750	1,00E-42	PSAE-1 (PSA E1 knockout)	Tem atividade catalítica e participa da via da fotossíntese	2
AT3G18410	3,00E-73	NADH-ubiquinona relacionado a oxidoreductase	Fotorespiração e via de fosforilação oxidativa	1
AT3G25860	2,00E-129	LTA2 (subunidade E2 plastídeo de piruvato descarboxilase)	Disidrolipolisina-resíduo acetiltransferase	2
AT1G42970	2,00E-26	GAPB gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Glicólise, biossíntese de metionina	1
AT2G06520	2,00E-30	PSBX (fotossistema II subunidade X)	Fotossíntese	1
AT3G15840	1,00E-148	PIFI (pós iluminação aumento fluorescência clorofil)	Clororespiração	4
AT1G11750	5,00E-16	CLPP6 (Clp protease proteolítica subunidade 6)	Fotossíntese – organização de cloroplasto	1
AT3G47470	8,00E-55	LHCA4 (gene 4 complexo Fotossistema I captação luz)	Codifica uma proteína de ligação de um clorofil a/b	1
AT2G01290	4,00E-46	Ribose-5-fosfato isomerase	Fixação de carbono pela fotossíntese e na via de fosfato pentose	1
AT1G67090	2,00E-89	Ribulose – bisfosfato - carboxilase	Utiliza carbono pela fixação do dióxido de carbono	2
AT5G66570	0.0	OEE33 / PSBO-1 (oxygen-environment enhancer 33)	Envolvido na fotossíntese	1
AT1G06680	5,00E-130	PSBP-1 (oxygen-environment enhancer 2)	Participa do fotossistema II e participa na regulação do oxigênio.	1

AT1G08380	2,00E-140	PSAO (subunidade O do fotossistema 1)	Codifica a subunidade O de fotossistema	1
AT4G15510	1,00E-83	Proteína da família PsbP	Centro de reação do fotossistema II	1
AT4G05180	2,00E-63	PSBQ-2/PSII-Q (Subunidade Q-2 do fotossistema II)	Evolução complexo do fotossistema II	1
AT1G67090	2,00E-89	RBCS1A; ribulose bisfosfato carboxilase	Fixação de carbono na fotossíntese	2
AT5G38420	0.0	RBCS-2B ribulose bisfosfato carboxilase cadeia menor 2B	Fixação de carbono na fotossíntese	16
AT5G38410	6,00E-133	RBCS-3B ribulose bisfosfato carboxilase cadeia menor 3B	Fixação de carbono na fotossíntese	1
AT2G34430	8,00E-70	LHB1B1 (gene 4 complexo fotossistema I captação luz)	Fotossistema II tipo I clorofil a / b proteína ligação	2
AT1G67090	2,00E-89	RBCS1A; ribulose bisfosfato carboxilase	Fixação de carbono na fotossíntese	2
AT2G39730	2,00E-55	RCA (rubisco ativase)	Proteína de cloroplasto	3
VI. Metabolismo				
AT1G69523	1,00E-31	Proteína da família metiltransferase	Biossíntese da biotina e esteroide	1
AT4G38970	3,00E-21	Frutose – bisfosfato aldolase	Envolvido na shunt-pentose-fosfato, Glicólise, neoglicogenese	1
AT1G13560	4,00E-53	AAPT1 (aminoalcoolfosfotransferase 1)	Metabolismo do aminofosfonato, glicerofosfolípídeo e éter lipídeo	1
AT3G61610	2,00E-52	Família de proteínas aldose 1-epimerase	Envolvida no processo metabólico da galactose	2
AT5G62790	0.0	DXR (1-deoxi-d-xilulose 5-fosfato reductoisomerase)	Biossíntese de esteróides	2
AT3G44300	2,00E-96	NIT2 (nitrilase 2)	Metabolismo do nitrogênio e triptofano	1
AT4G26900	0.0	HF (Hisf proteínas)	Metabolismo da histidina	1
AT4G33910	8,00E-44	2OG-Fe(II) oxigenase, oxidoreductase	Incorporação ou redução de oxigênio molecular	1
AT4G23430	5,00E-12	Proteína prot. de cadeia curta desidrogenase/reductase (SDR)	Envolvido no processo metabólico	1
AT3G17770	6,00E-159	Proteína da família desidroxiacetona quinase	Processo metabólico do glicerol	2
AT1G75330	2,00E-96	OTC (ornitina carbamoiltransferase)	Metabolismo do ciclo da urea e arginina e prolina	2
AT4G39660	1,00E-20	AGT2 (alanina: glioxilato aminotransferase 2)	Metabolismo da alanina, atividade transaminase	2
AT1G71750	9,00E-91	Fosforibosiltransferase	Via de metabolismo das purinas e metabolismo de drogas	3
AT1G20620	7,00E-151	CAT3 (catalase 3)	Metabolismo do triptofano e metano	4
AT5G21170	1,00E-137	5'-AMP-ativada prot. quinase subunidade beta-2	Envolvidos na miristoilação de proteínas N-terminal	1
AT1G66430	6,00E-38	Proteínas tipo pfkB carboidrato quinase	Biossíntese de sacarose e processo metabólico D-esqueleto	1
AT1G03980	9,00E-51	ATPCS2 fitoquelatina sintase 2	Responsáveis pela biossíntese de proteínas quelantes de metais	1
AT3G46970	6,00E-71	PHS2 (alfa glucano fosforilase 2)	Metabolismo do Amido e sacarose	1
AT3G14990	8,00E-70	4-metil-5 (b-hidroxietil) - tiazole	Processo biossintético	1

AT3G26650	3,00E-131	monofosfato Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)	tiamina Produção de energia no metabolismo dos carboidratos	2
AT5G59420	1,00E-109	Família de proteína de ligação oxisterol	Processo metabólico do esteróide	1
AT3G51730	3,00E-25	Saposina B	Processo metabólico do lipídio	2
AT1G48520	6,00E-100	GATB (GLU-ADT subunidade B)	Metabolismo glutamato, alanina e aspartato e biossíntese de aminoacil- tRNA	2
AT3G55800	6,00E-137	SBPASE (sedoheptulose- bisfosfatase)	Biossíntese de glicídeos	1
AT3G15355	1,00E-35	PFU1/UBC25 (ubiquitina conjugada enzima 25)	Regulamento do processo metabólicas de proteínas	2
AT3G02350	3,00E-32	GAUT9 (Galacturonosiltransferase 9)	Biossíntese da pectina	1
AT3G03640	1,00E-38	GLUC (homologa Beta-glucosidase)	Processo metabólico do carboidrato	2
AT2G29630	2,00E-34	Família de proteína thiC	Processo biossintético da tiamina e resposta a vitamina B11	1
AT5G26667	9,00E-25	UMP quinase (PYR6)	Processo metabólico da pirimidina ribonucleosídeo monofosfato	1
AT3G50930	1,00E-97	AAA - ATPase família de proteínas	Envolvida no metabolismo de carboidratos	1
AT5G61410	9,00E-40	Ribulose fosfato epimerase	Processo metabólico de glicídios	2
AT5G08280	0.0	HEMC (hidroximetilbilane sintase)	Processo biosintético da clorofila e Porfirina	1
AT1G30620	2,00E-34	HSR8/MUR4/UXE1 (murus 4)	Biogênese da planta	1
VII. Transcrição ou Tradução				
AT5G59820	2,00E-36	RHL41 (sensível a luz alta 41)	Fator de transcrição sensível a baixas temperaturas	1
AT5G22250	9,00E-99	Complexo protéico CCR4-NOT	Atividade ribonuclease	1
AT1G53170	4,00E-46	ERF-8	Fator de transcrição relacionado com patogênese	1
AT5G67300	7,00E-19	Proteína MYB de domínio 44	Fator de transcrição envolvidas na mediação vegetal	1
AT5G04760	4,00E-46	Família MYB	Fator de transcrição	1
AT3G24120	5,00E-75	Família MYB	Fator de transcrição, resposta contra ataque de insetos	1
AT1G80480	1,00E-57	PTAC17	Plastídio transcritionalmente ativo 17	1
AT1G14340	9,00E-88	RNA motivo de reconhecimento (RRM)	Ligação de ácidos nucleicos	2
AT1G80840	5,00E-60	WRK40	Regula a expressão de genes que possuem W-box em sua região promotora	1
AT5G64810	2,00E-22	WRK51	Regula a expressão de genes que possuem W-box em sua região promotora	1
AT2G38470	7,00E-74	WRK33	Regula a expressão de genes que possuem W-box em sua região promotora	1
AT4G23810	6,00E-82	WRK53	Senescência	1

AT1G23860	2,00E-37	SRZ-21	mRNA nuclear splicing, via spliceosome.	1
AT5G51660	6,00E-23	CPSF160	Clivagem do mRNA, poliadenilação do mRNA	1
AT1G11870	2,00E-55	SRS (ovule abortion 7); serina-tRNA ligase	Sintetase de Seril-tRNA orientada para cloroplastos e mitocôndrias	1
AT2G17040	8,00E-26	ANAC036 (proteína 36 contendo domínio NAC)	Envolvido no desenvolvimento de organismo multicelular	1
AT3G53460	2,00E-15	CP29 (cloroplasto 29 kDa ribonucleoproteína)	Ligação de RNA consenso	1
AT3G55980	2,00E-22	Família de proteínas dedo de zinco (CCCH-tipo)	Resposta a quitina, ao regulação de transcrição.	2
AT1G23260	3,00E-113	(MMS ZWEI homólogo 1)	Repara erros após a replicação	2
AT1G03970	9,00E-51	GBF4 (G-box fator 4 de ligação); fator de transcrição	Codifica uma base leucina zíper G-box	1
AT3G27700	2,00E-30	RRM motivo de reconhecimento do RNA	Ligação de RNA, ligação de nucleotídeo	2
AT1G09340	1,00E-23	CRB	Ligação do RNA, organização do cloroplasto	1
AT2G18760	7,00E-19	CHR8 (remodelação da cromatina 8)	Via de reparo e excisão de nucleotídeos	1
AT3G04600	8,00E-26	Família de proteínas tRNA sintetase classe I (W e Y)	Aminoacilação do tRNA para tradução de proteínas	1
AT3G47650	6,00E-85	Bundle-sheath defective proteína 2	Dobramento de proteínas – participa da regulação pós transcricional	1
AT5G43650	5,00E-13	Proteína básica helix – loop – helix (bHLH)	Envolvidos na regulação da transcrição	1
AT1G69170	5,00E-45	Squamosa promoter-binding protein-like 6 (SPL6)	Regula a transcrição.	1
AT1G03280	2,00E-154	Fator IIE de inicio da transcrição (TFIIE)	Via de fator de transcrição basal	1
AT2G04520	1,00E-42	eIF-1	Fator de inicio da tradução.	1
AT5G35680	1,00E-16	eIF-1A	Fator de inicio da tradução.	1
AT1G13690	2,00E-29	ATE1 (ATPase E1); acido nucléico de ligação	Correto dobramento de prot. sintetizadas e prevenção da agregação protéica	1
AT2G18160	1,00E-46	GBF5 (G-BOX fator de ligação 5)	Codifica um fator de transcrição de b-ZIP , moduladores de expressão	1
AT5G15200	5,00E-60	Proteína ribossomal 40S (RP S9B)	Atua na tradução	2
AT3G25920	7,00E-316	RPL15 (proteína ribossomal L15)	Codifica uma proteína ribossomal CL15 do Plastídeo	1
AT5G17870	3,00E-47	PSRP6 (proteína 6 plastídio ribossomal 50S)	Precursor de proteínas de ribossomal Plastídeo (especifico)	1
AT5G17870	5,00E-56	ARC6H	Uma divisão de fator do cloroplasto localizado no plastídeo	1
AT4G27090	2,00E-66	Proteína ribossomal 60S (RPL 14B)	Envolvida na tradução, biogênese do ribossomo	2
AT1G02780	2,00E-77	EMB2386 proteína embrião-abundante	Desenvolvimento embrionário de sementes, tradução, biogênese do ribossomo	2
AT3G55620	9,00E-80	EMB1624	Fator de inicio da tradução	3

AT5G02610	3,00E-51	Proteína ribossomal 60S (RPL35D)	envolvido no desenvolvimento de sementes	2
AT2G24090	4,00E-39	Família de proteína ribossomal L35	Tradução, biogênese do ribossomo	1
AT3G53890	7,00E-23	Proteína ribossomal 40S (RPS21B)	Envolvidos na tradução	1
AT3G03600	2,00E-23	Proteína ribossomal S2 (RPS2)	Tradução, Ribossomo Biogênese	1
AT5G09850	4,00E-39	Relacionado ao fator de alongação da transcrição	Componente estrutural da subunidade menor do ribossomo mitocondrial	1
AT1G62750	1,00E-134	Snowy cotyledon1	Transcrição	2
AT4G31985	1,00E-71	60S proteína ribossomal L39 (RPL39C)	Fator de alongação da tradução, organização de cloroplasto	1
AT5G54600	8,00E-26	50S proteína ribossomal L24, cloroplasto (CL24)	Tradução	1
AT4G34670	9,00E-66	40S proteína ribossomal S3A (RPS3aB)	Estrutura constituinte do ribossomo	1
AT1G29970	2,00E-26	RPL18AA (60S proteína ribossomal L18A-1)	Envolvido na tradução	1
AT3G44110	2,00E-48	Homologo a proteína ATJ3 (DnaJ)	Estrutura constituinte do ribossomo, Tradução	1
AT1G07920	2,00E-125	Fator de alongação 1-alfa / EF-1-alfa	Evita que as proteínas se agreguem de forma irreversível durante a síntese.	4
AT3G11940	8,00E-44	RPS5A (proteína ribossomal 5A)	Atua na alongação da cadeia polipeptídica no ribossomo	2
AT1G08450	1,00E-13	CRT3 (calreticulina 3)	Estrutura constituinte do ribossomo	1
AT3G46040	4,00E-28	RPS15AD (proteína ribossomal S15A D)	Armazena Ca (2+) no lúmen do RE, regula a transcrição	1
VIII. Crescimento e Desenvolvimento				
AT4G04610	2,00E-63	APR1 (paps reductase homolog 19)	Regulado por TCP20. Tradução	2
AT5G45280	2,00E-154	Pectinacetilesterase	Envolvido na assimilação sulfato, redução de sulfato	2
AT3G09840	6,00E-67	CDC48 (ciclo 48 de divisão celular)	Biogênese da parede celular	2
AT5G35735	9,00E-146	Família de proteína sensível a auxina	Expressa em todas as regiões da divisão celular	2
AT1G05850	3,00E-95	POM1 (POM-POM1); quitinase	Desenvolvimento da raiz, processo metabólico do ácido salicílico	2
AT4G14880	1,00E-71	OASA1 (O-acetilserine (tio) liase	Enzima chave na biossíntese de cisteína	1
AT1G14610	2,00E-133	TWN2 (twin 2)	Necessário para correta proliferação das células basal	2
AT5G57560	3,00E-149	TCH4 (TOUCH 4)	Organização da parede celular da planta	3
AT3G18780	2,00E-22	ACT2 (actina 2)	Diferenciação celular, alongamento da raiz	1
AT3G07160	4,00E-86	GSL10 (glucano sintase – like 10)	Crescimento e desenvolvimento de vegetais gametófitos	3

AT3G02230	6,00E-34	RGP1 (polipeptídeos reversivelmente glicosilados 1)	machos Síntese de parede celular de vegetais	2
AT1G30825	1,00E-72	ARPC2A/DIS2 (tricomas distorcidos 2)	Envolvido na maturação do Tricoma	1
AT4G02350	6,00E-45	Exocyst complex subunit Sec15-like	Envolvido na germinação do pólen, crescimento do tubo de pólen	2
AT5G44340	9,00E-84	TUB4 (cadeia tubulina beta-4)	Polimerização de proteínas	2
AT1G57770	9,00E-22	Oxidase	Tem atividade oxireductase	1
AT1G73177	8,00E-22	BNS (bonsai)	Envolvido na inflorescência desenvolvimento, desenvolvimento de filoma	1
AT2G34850	1,00E-53	MEE25 (maternal effect embryo arrest 25)	Desenvolvimento embrionário de sementes em dormência e tubo de pólen	1
AT2G34090	3,00E-91	MEE18 (maternal effect embryo arrest 18)	Desenvolvimento embrionário de sementes em dormência e tubo de pólen	2
AT3G16640	2,00E-71	TCTP	Regula o crescimento de célula, raiz, tubo de pólen	2
AT1G07490	3,00E-120	DVL9/RTFL3 (rotundifolia like 3)	Função sinalizadora indispensável ao crescimento e desenvolvimento vegetal	1
AT1G14830	1,00E-125	ADL1C/ADL5 (proteína 5 dynamin-like)	Envolvida no desenvolvimento de morfogênese e pólen mitocondrial.	1
IX. Transporte				
AT5G20230	1,00E-20	BCB (proteína ligação blue-copper)	Transporte de íons de alumínio, resposta ao ferimento	1
AT4G04940	2,00E-67	Proteína da família das transducina / WD-40	Proteína de ligação a nucleotídeos transporte de proteínas	1
AT5G19150	2,00E-30	Família carboidrato quinase	Transporte de grupos fosfato	1
AT3G07700	6,00E-148	Família de proteínas ABC	Transportadores de membrana que participam no transporte de lipídios	1
AT4G00895	9,00E-99	ATP relacionado a sintase da cadeia delta.	Transporte de íons de hidrogênio	1
AT2G18710	1,00E-141	SCY1 (secY homolog 1)	Transportadora de proteínas	2
AT4G11960	8,00E-66	PGRL1B (PGR5-LIKE B)	Proteína transmembrana presente no tilacoídes	1
AT5G58070	4,00E-68	TIL (temperatura induzida lipocalin)	Transportes de nutrientes	2
AT1G01820	5,00E-53	PEX11C (peroxina 11C)	Eficiente processo de transporte através da membrana e importação de proteínas da matriz do peroxissoma	1
AT3G04240	1,00E-46	SEC (secret agent)	Transferência de grupos glicosil	1
AT4G32390	3,00E-54	Relacionado à translocação de fosfato	Transportador de transmembrana	1
AT3G56190	2,00E-29	ALPHA-SNAP2 (proteína NSF alfa solúvel ligada)	Proteína de transporte intracelular	1
AT5G05000	2,00E-122	ATTOC34/OEP34 (Translocase do	Importa proteínas	1

AT3G21670	4,00E-108	cloroplasto 34) NTP3	codificadas no cloroplasto	2
AT5G22140	3,00E-24	TOM5	Transporte de nitrato	1
AT3G62790	1,00E-79	NADH ubiquinona oxiredutase	Receptor mitocondrial, importação	1
AT3G47960	1,00E-82	POT	Transporte de elétrons na mitocôndria ligando-se a íons de Fe	1
AT5G13490	9,00E-77	ADP/ATP transportador 2	Proteínas de transporte de oligopeptídeos prótons dependentes	3
AT5G19760	2,00E-92	Dicarboxilato/tricarboxilato transportador (DTC)	Transporte de nucleotídeos purínicos	1
AT5G04920	2,00E-88	Família proteína vacuolar triagem 36 / VPS36	Transporte mitocondrial	1
AT4G35100	4,00E-65	Aquaporin	Transporte mediado em vesícula	1
AT2G40060	3,00E-124	Ligação a proteínas/proteína transportadora/molécula estrutural	Proteína de membrana envolvida na formação de canais de água.	1
AT3G01290	0.0	Proteína da família band 7	Transporte de proteína intracelular, mediada em vesícula	1
X. Outros				
AT3G58830	6,00E-78	Haloacid dehalogenase (HAD)	Regula condutividade do cátion	1
AT5G19120	6,00E-19	Endopeptidase tipo aspartica/ pepsina A	Atividade catalítica	1
AT5G67360	8,00E-26	ARA12; subtilasev	Atividade aspártico-tipo endopeptidase; envolvida na proteólise.	1
AT4G03410	5,00E-78	Proteína relacionada membrana peroxissomal		1
AT1G15730	4,00E-105	PRLI interagindo ao factor L		1
AT1G26550	1,00E-123	PPIC peptidil-prolil cis-trans isomerase		1
AT4G14030	2,00E-162	Proteína de ligação do selênio	Envolvido na resposta iônica do cádmio	1
AT1G26630	8,00E-70	FBR12 (fumosin B1 resistente12)		2
AT3G61080	4,00E-149	Frutosamina quinase		1
AT5G66550	1,00E-24	Família de proteínas Maf		1
AT5G58290	6,00E-63	RPT3 (root phototropism 3); ATPase		1
AT5G26610	2,00E-40	D111/G-patch domain-containing protein		1
AT1G04430	7,00E-74	Dehydration-responsive protein- related		1
AT2G23810	1,00E-20	TET8 (tetraspanin 8)		1
AT1G66360	5,00E-38	C2 domain-containing protein		1
AT3G08640	1,00E-17	Família de proteínas essência alfavirus		1

Tabela II. ESTs resultantes do sequenciamento do material genético de folhas de Brássicas inoculadas com a bactéria promotora do crescimento de plantas *Kluyvera ascorbata* e que sofreram injúrias em casa de vegetação por *Plutella xylostella*. (*genes com possíveis repetições na tabela I referente a plantas não inoculadas)

Número	AGI	Melhor e-value	Possível Proteína	Descrição	N° de Transcritos
I. Relacionado à resposta de defesa					
AT2G05630		9,00E-77	Autophagy 8d (APG8d)	Processo de degradação dos componentes citoplasmáticos	1
*AT1G11680		5,00E-16	CYP51G1 (citocromo P450 51G1); esterol 14-demetilase	Metabolismo secundário. Biossíntese de esterol	3
II. Resposta ao Estresse					
AT1G44170		8,00E-73	ALDH3H1 (aldeído desidrogenase 3H1)	Responde à dissecação, ao estresse salino e ao estímulo de ácido abscísico	2
AT1G20440		7,00E-41	COR47 (cold-regulated 47)	Responde ao estresse osmótico, ABA, desidratação, baixa temperatura	3
*AT5G02490		9,00E-25	HSC70-2 (choque termico 70 kDa proteina 2)	Responde a temperatura	1
AT3G54960		2,00E-19	ATPDIL1-3 (PDI-LIKE 1-3); protein disulfide isomerase	Responde ao estresse de retículo endoplasmático	1
III. Fotossíntese					
*AT5G38420		3,00E-47	ribulose bisfosfato carboxilase cadeia menor 2B	Fixação de carbono na fotossíntese	1
*AT2G34420		1,00E-61	LHB1B2; ligação de clorofila	Captação de luz no fotossistema II	1
IV. Metabolismo					
AT5G17560		2,00E-100	Bola-like	Metabolismo associado ao Fe e S	1
AT5G60620		3,00E-128	Fosfolipideo/glicerol aciltransferase	Processo biossintético do Triacilglicerol	1
AT1G01610		5,00E-137	GPAT4 (glicerol-3-fosfato aciltransferase 4)	Processo metabólico, processo biossintético da cutina.	2
AT2G42790		1,00E-101	CSY3 (citrate sintase 3)	Participa do ciclo do citrato (TCA) e metabolismo do glioxilato e dicarboxilato	1
V. Transcrição ou Tradução					
AT4G25500		8,00E-22	RSP35; RNA ligação	Envolvido no splicing de RNA, splicing do mRNA nuclear, via spliceossomo	1
*AT2G17510		5,00E-20	EMB2763 (embrião-abundante 2763)	Atividade ribonuclease, vinculativas de RNA.	1
AT2G34640		8,00E-81	PTAC12 (plastídeo 12 ativo transcricionalmente)	Regulamento positivo de transcrição, DNA-dependentes, transcrição do promotor de Plastídeo.	2
VI. Crescimento e Desenvolvimento					
AT5G07370		8,00E-77	IPK2a (inositol polifosfatase quinase 2 alfa)	Germinação do pólen, crescimento de tubo de pólen	1
AT2G47470		8,00E-22	UNE5 (unfertilized embrio sac 5)	Desenvolvimento do saco embrionário e tubo de	1

pólen terminam da
dormência de sementes

VII. Transporte				
AT4G19640	9,00E-11	ARA7; GTP ligação	Transporte de proteínas	2
AT2G01970	3,00E-50	Proteína de endomembrana 70	Transporte.	2
AT5G08670	8,00E-22	Ligação ATP / íons de hidrogênio transportando	Transporte de íons de hidrogênio	1