

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

ROSANA ALESSANDRA SEGATTO

ANÁLISE DE GENES DE RESISTÊNCIA NO TRANSCRIPTOMA DE *Urochloa decumbens*
CV. BASILISK

Dourados

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

Rosana Alessandra Segatto

**ANÁLISE DE GENES DE RESISTÊNCIA NO TRANSCRIPTOMA DE *Urochloa*
decumbens CV. BASILISK**

Trabalho apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof.Dr. Rodrigo Matheus Pereira

Dourados
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S454a	<p>Segatto, Rosana Alessandra. Análise de genes de resistência no transcriptoma de <i>Urochloa decumbens</i> cv. Basilisk. / Rosana Alessandra Segatto. – Dourados, MS : UFGD, 2014. 48f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira. Monografia (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Bioinformática. 2. Braquiária. 3. Genes R. I. Título.</p> <p>CDD – 575.12</p>
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

ROSANA ALESSANDRA SEGATTO

**ANÁLISE DE GENES DE RESISTÊNCIA NO TRANSCRIPTOMA DE *Urochloa*
decumbens CV. BASILISK**

Trabalho apresentado ao Curso de
Bioctenologia da Universidade
Federal da Grande Dourados como
parte dos requisitos para obtenção
do título de Bacharel em

Aprovado em 22 de julho de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. Rodrigo Matheus Pereira - Orientador
Universidade Federal da Grande Dourados

Prof. Dra. Alexéia Barufatti Grisólia
Universidade Federal da Grande Dourados

Prof. Dr. Rodrigo Kelson Silva Rezende
Universidade Federal da Grande Dourados

Dedico este trabalho a minha mãe Neiva Fátima Reiter e minhas irmãs Karine e Angélica Segatto, que sempre me apoiaram durante todos os anos da graduação. E também ao meu orientador professor Rodrigo Matheus Pereira, por esta oportunidade e por sua ajuda e disposição.

AGRECIAMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao meu orientador Professor Dr. Rodrigo Matheus Pereira, que me possibilitou este trabalho, e foi de grande ajuda durante sua elaboração, esta foi uma oportunidade de novos conhecimentos, de testar limites e buscar esclarecimentos.

Agradeço também a Doutora Lucimara Chiari e sua equipe da EMBRAPA Gado de Corte em Campo Grande que realizou a parte laboratorial deste trabalho e nos disponibilizou os dados. Sem esta parceria meu trabalho não seria possível.

Agradeço a minha família pelo apoio incondicional e pela motivação nas horas de necessidade, e ao meu namorado pelo incentivo sempre presente.

Agradeço também aos amigos que participaram da minha vida acadêmica, por simplesmente serem meus amigos e por todas as lições que também me ensinaram, pelo seu caráter que me influenciou e por me mostrarem que é possível mudar, conquistar e realizar desafios.

Finalmente agradeço as instituições: CNPQ, UNIPASTO, FUNDAPAM, CAPES e EMBRAPA por financiarem a pesquisa.

RESUMO

As pastagens ocupam 35% da área territorial do centro-oeste, tendo a pecuária grande importância regional. A *Urochloa decumbens* cv. Basilisk é uma gramínea forrageira e suas variedades foram responsáveis pela revolução das pastagens na pecuária nacional em 1970. Objetivou-se fazer uma análise dos genes de resistência no transcriptoma de *Urochloa decumbens* cv. Basilisk através das ferramentas da Bioinformática. Averiguar os domínios de resistência presentes em *U. decumbens* e construir árvores filogenéticas. Este trabalho tem importância para o conhecimento desta espécie vegetal e levantamento de genes que possam ser usados em programas de melhoramento de resistência em gramíneas. Foram obtidos 164.920 transcritos únicos com a EMBRAPA Gado de Corte em Campo Grande - MS e em seguida foi realizado um alinhamento local dos transcritos únicos contra os genes de resistência do banco de dados PRGdb instalado localmente. Estes resultados foram organizados em um banco de dados usando MySQL, e os domínios de proteínas de resistência foram contados. Então 2% de 1221 genes foram anotados em detalhes por comparações com os bancos de dados Interpro, Non-redundant Protein Data- NR , Genbank-NT, Refseq, Clusters of Orthologous Grups- COG Gene Ontology-GO, Kioto Encyclopedia of Genes and Genomes-KEGG e Conserved Domains Database- CCD, afim de verificar suas características e funções. Em seguida os mesmos foram usados para uma análise filogenética, utilizando-se os programas Bioedit, Clustal e MEGA 6.06 respectivamente, resultando em árvores filogenéticas. Das 164.920 sequências transcritas por *Urochloa decumbens* foi possível encontrar 2.445 sequências referentes a genes de resistência em plantas através da comparação com o banco PRGdb. Dos 2.445 genes, 1.221 eram diferentes entre si e podiam ser divididos em 12 domínios e multi-domínios de proteínas de resistência, sendo os domínios mais abundantes a Serina-Treonina-Quinase, NBS-LRR, e Serina-Treonina-Quinase – LRR. Outros domínios encontrados em menor quantidade foram MLO, GNK2, Unknown, Receptor like kinase, NBARC e TIR. As árvores filogenéticas permitiram relacionar os genes de *U. decumbens* aos de outras espécies conhecidas. Espera-se que este trabalho possa ser de auxílio em programas de melhoramento da *Urochloa decumbens* e de outras pastagens.

Palavras-chave: Bioinformática, Braquiária, genes R.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Principais classes de genes R	19
Figura 2. Gráfico apresentando os domínios e multidomínios de resistência em <i>Urochloa Decumbens</i>	25
Figura 3. Árvore filogenética sequência NBS CL9668	27
Figura 4. Árvore filogenética sequência NBS CL1094	28
Figura 5. Árvore filogenética sequência LRR CL14784	29
Figura 6. Árvore filogenética sequência LRR CL7135	30
Figura 7. Árvore filogenética sequência Ser-Thr Kinase CL2023	32
Figura 8. Árvore filogenética sequência Ser-Thr Kinase CL52	33
Figura 9. Árvore filogenética sequência Ser-Thr Kinase –LRR CL734	34
Figura 10. Árvore filogenética sequência MLO CL2381	35
Figura 11. Árvore filogenética sequência Ser-Thr Kinase- GNK2 CL14588	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Domínios e multi-domínios de resistência presentes em <i>Urochloa decumbens</i>	24
--	----

LISTA DE ABREVIACOES

ABA: hormônio ácido abscisico
ARC: região de conexão entre NBS e LRR
BGI: Beijing Genomics Institute
BLAST: do ingls Basic Local Alignment Search Tool
CC: do ingls Coiled Coil
CCD: Conserved Domains Database
CNL: Classe CC-NBS-LRR
COG: Clusters of Orthologous Groups
ETI: do ingls effector-triggered immunity
Genes Avr: genes de virulência
Genes R: genes de resistência
GNK2: Ginkgo Bilobin domain
GO: Gene Ontology
INTERPRO: Protein Sequence Analysis and Classification
KEGG: Kioto Encyclopedia of Genes and Genomes
LRR: do ingls Leucine Rich Repeat
MLO: do ingls Mutation induced
NBARC: domínio NBS e ARC
NBS : do ingls Nucleotide Binding Site
NCBI: do ingls National Center for Biotechnology Information
NR: Non-redundant Protein Data
NT: Nucleotides Genbank data base
PAMPs: padrões moleculares associados
PRGdb: do ingls Plant Resistance Gene data base
RefSeq: Reference Sequence Database
RLK: do inglês Receptor like kinase
Ser-Thr Kinase: Serina-Treonina-Quinase
T: domínio TIR
TIR: do inglês Toll/Interleukin-1- receptor
TNL: TIR-NBS-LRR
TrD: do inglês transmembrane domain

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Objetivos	12
1.2 Justificativa	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 <i>Urochloa decumbens</i> cv Basilisk	13
2.2 Transcriptômica	14
2.3 Aplicações de RNA-seq	16
2.4 Genes de resistência	17
2.4.1 Aspectos gerais da resistência	19
2.5 Bancos de dados de genes de resistência	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Proteínas R em <i>Urochloa decumbens</i> cv Basilisk	25
4.2 Domínio de proteínas de resistência NBS.....	26
4.3 Domínio de proteínas de resistência LRR	28
4.4 Domínio de proteínas de resistência Ser-Thr-Kinase	30
4.5 Domínio de proteínas de resistência MLO	34
4.6 Domínio de proteínas de resistência Ser-Thr-Kinase –GNK2	36
4.7 Domínio de proteínas de resistência NBARC	37
4.8 Domínio de proteínas de resistência TIR	38
4.9 Domínio de proteínas de resistência Receptor Like Kinase	39
5. Importância dos Domínios de Resistência a fungos	39
6. CONCLUSÃO	41
7. REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de carne do mundo, o rebanho bovino no país ocupa uma área de 174 milhões de hectares de pastagem o equivalente a 20% do território nacional (AIBEC, 2011). Das forrageiras que constituem as pastagens nacionais de grande significância é a *Urochloa decumbens*, popularmente conhecida como capim braquiária, da qual a variedade Basilisk originária da Austrália foi introduzida em 1960 e se adaptou muito bem as condições climáticas do Brasil tornando-se a principal espécie forrageira, sendo considerada uma das responsáveis pela revolução pecuária brasileira em 1970 (KARIA et al, 2006).

O grande uso do gênero *Urochloa* é devido a essa forrageira possuir boa tolerância a solos ácidos com alto teor de alumínio e baixa fertilidade, rápido estabelecimento, alta competição com plantas invasoras, proteção contra a erosão do solo fornecendo boa cobertura vegetativa, e enraizamento fácil (BOTREL, 1998).

Algumas das desvantagens de *Urochloa decumbens* são sua suscetibilidade a praga cigarrinha e a fungos, e o seu baixo valor nutricional, portanto existem muitos trabalhos voltados a melhorar o valor nutricional desta pastagem (ROSA, 1998). O sucesso na utilização de pastagens não depende apenas da disponibilidade de nutrientes, mas também dos mecanismos morfofisiológicos, da interação com o ambiente, e de seu sistema de defesa, fundamental para o crescimento da planta e a manutenção da sua capacidade de suporte (FAGUNDES et al, 2006).

Para que as plantas sobrevivam com sucesso ao meio em que se encontram elas precisam de um variado sistema de defesa contra o ataque de patógenos. Algumas estratégias baseiam-se em barreiras físicas e químicas e ainda existem mecanismos bioquímicos mais sofisticados que são as interações entre os genes da planta e do agente invasor. Estes são conhecidos como genes de resistência por possibilitarem mecanismos imunológicos de proteção e defesa para as plantas contra ataques variados e até mesmo estresse abiótico (PRGdb, 2014).

A comunicação planta-patógeno, depende de a planta ser capaz de reconhecer o patógeno que esta na sua superfície e se defender, e o patógeno deve ser capaz de manipular a biologia da planta e desenvolver um ambiente suscetível para seu crescimento e reprodução. Para isso existe um espectro de genes que realizam essa comunicação. Os genes de resistência da planta (genes R) tem um papel fundamental no reconhecimento de proteínas específicas de genes de virulência (genes Avr) dos patógenos (BOYD, 2013).

Os benefícios do uso de genes de resistência incluem redução eficaz no crescimento do patógeno, danos mínimos a planta hospedeira e a redução do uso de pesticidas, resultando em um

cultivo com menor impacto ambiental. Porém é importante considerar que com o tempo os patógenos evoluem superando as barreiras dos genes de resistência e toxicidade dos pesticidas, portanto a busca por novos genes R é um trabalho contínuo e necessário (BOYD, 2013).

O crescimento da população mundial traz preocupações para o suprimento de alimentos, o rendimento das culturas e seu desempenho frente a mudanças climáticas, doenças e predações. É urgente a necessidade de conhecimentos mais esclarecidos sobre as interações planta-patógeno.

Métodos estatísticos e de análise em conjunto com avanços na genética permitem a identificação de mais genes de resistência de plantas. A Bioinformática tem um papel vital nesta identificação de genes, hoje muitas plantas são sequenciadas e gera-se dezenas de gigas de dados que dependem da bioinformática e seus profissionais para serem analisados. As pesquisas da Bioinformática facilitam o trabalho de outros pesquisadores, geram dados inéditos e podem esclarecer mecanismos moleculares e evolucionários.

1.1 Objetivos

Geral: Buscar genes de resistência em *Urochloa decumbens* utilizando as ferramentas da Bioinformática.

Específico 1. Levantar os domínios de proteínas de resistência presentes em *Urochloa decumbens* cv Basilisk.

Específico 2. Anotar genes de resistência presentes em *Urochloa decumbens*.

Específico 3. Construir árvores filogenéticas com os genes de *Urochloa decumbens*.

1.2 Justificativa

Esta pesquisa é de grande interesse para o conhecimento dos genes de resistência do capim braquiária, também os genes R observados na planta poderão auxiliar futuros trabalhos a respeito do melhoramento desta espécie e de outras pastagens.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Urochloa decumbens* cv Basilisk

As pastagens para criação bovina ocupam 20% do território nacional, na região centro-oeste são 35% (ABIEC, 2012), o gênero *Urochloa* possui grande importância na constituição destas pastagens. Existem discussões a respeito da classificação deste capim, certos pesquisadores dizem que pertence ao gênero *Brachiaria* da família Paniceae, ocorrendo em regiões tropicais e subtropicais dos continentes americano, africano e asiático (KUMBLE, 1996) porém segundo outros autores e estudos moleculares feitos em 2005, o gênero foi classificado como *Urochloa* (VALLE, 2010). Havendo outras posteriores discussões sobre veracidade das classificações. Neste trabalho consideraremos os gêneros *Brachiaria* e *Urochloa* sinônimos.

A primeira introdução oficial de *Urochloa decumbens*, foi em 1952 no Pará, para avaliar seu potencial, porém a forrageira apresentou baixa produção de sementes e não foi comercializada. De novo em 1960 foi introduzida uma nova variedade de *U. decumbens*, a Basilisk originária da Austrália, que se adaptou otimamente logo se tornando a principal forrageira no país, conhecida como capim braquiaria ou braquiarinha. Muitas sementes foram importadas e extensas plantações estabelecidas. Em 1970 houve a primeira revolução pecuária nacional, onde o governo subsidiou vários projetos e que só foi possível devido a boa produção da variedade Basilisk. Ainda na mesma época outras cultivares australianas foram introduzidas e seu sucesso se deu devido a grande adaptação a solos pobres de baixa fertilidade destinados a constituição de pastagens no Brasil central (KARIA et al, 2006).

A expansão das áreas de braquiaria, o desmatamento e a diminuição de inimigos naturais trouxe o problema da cigarrinha das pastagens, que causou enormes perdas a pecuária, outro problema foi a micotoxina do fungo *Pithomyces chartarum* que se desenvolve com sucesso na *Urochloa decumbens*, e causa fotossensibilização em caprinos, ovinos e bezerros. Em 1984 a EMBRAPA introduziu a *Brachiaria brizantha*, conhecida como capim-braquiarião ou capim-brizantão, que possui resistência a cigarrinha das pastagens, boa cobertura vegetal, melhor valor nutricional, pode crescer na sombra e responde bem a adubação. Por todas essas qualidades esta é a braquiaria mais cultivada no Brasil, porém comparada a *Urochloa decumbens* necessita de solos de melhor qualidade, e não é tão tolerante a seca (BOTREL, 1998).

Definitivamente o gênero *Urochloa* é o mais utilizado no Brasil, no cerrado 85% das pastagens são braquiarias, e na venda de sementes em âmbito nacional estima-se que 80% do total de sementes são do gênero *Urochloa* (PEREIRA, 2006). A maioria das cultivares possui modo de

reprodução apomítico, isto é são clones da planta mãe, e esta uniformidade das culturas traz problemas pela falta de variabilidade genética que torna as plantas mais suscetíveis a ataques, são estes conhecidos como os problemas da "monocultura do braquiário". Já foram relatados ataques da cigarrinha em plantas que eram resistentes e também perda de produtividade, por degradação da pastagem (KARIA et al, 2006).

O potencial de produção de uma forrageira é determinado geneticamente, porém para que este potencial seja alcançado são necessárias condições ambientais favoráveis como, temperatura, umidade, luminosidade, disponibilidade de nutrientes, e também o manejo correto. Nas regiões tropicais um dos maiores problemas esta na disponibilidade de nutrientes, especialmente o nitrogênio, o que interfere muito na produtividade e qualidade, somente o nitrogênio do solo não é suficiente para atender a demanda das pastagens de alto potencial de produção (FAGUNDES et al, 2005).

Quanto ao valor nutricional de *Urochloa decumbens*, verifica-se altos teores de componentes da fração fibrosa, baixo conteúdo de proteína e energia digestível, lentas taxas de fermentação dos carboidratos estruturais e, conseqüentemente, consumo voluntário deficiente. Entre as estratégias para aumentar o valor nutricional está o tratamento do feno com produtos químicos, fontes de nitrogênio, que deve estar disponível para os micro-organismos fermentativos no rúmem. Características importantes para a adição de nitrogênio ao capim são a sua umidade relativa, e também a dose de fontes de nitrogênio deve ser bem balanceada, pois foi comprovado que doses menores levam a maior rendimento final de nitrogênio. Estas técnicas são simples e especialmente interessantes para a melhoria nutricional do capim braquiaria (ROSA, 1998).

O estudo de novas cultivares, e do melhoramento dos cultivares já existentes é e será sempre necessário para a manutenção da qualidade das áreas de pastagem no Brasil, os programas de pesquisa buscam boa produção por hectare, adaptabilidade a clima e solo, um sistema sustentável por longo tempo, alto valor nutricional, resistência a estresses bióticos e abióticos, produção de sementes de boa qualidade, e um bom pastejo em condições gerais, que assegure a transformação vegetal em proteína animal de alto valor (PEREIRA et al, 2006).

2.2 Transcriptômica

Os últimos anos têm visto avanços revolucionários nas tecnologias de sequenciamento de DNA pois com o advento do sequenciamento de nova geração (NGS), é possível que milhões de bases possam ser sequenciadas de uma vez, por uma fração do custo em relação ao tradicional

sequenciamento por Sanger (EAGAN, 2012). Uma análise bastante beneficiada por tais avanços metodológicos foi a transcriptômica.

Transcriptômica é uma técnica amplamente utilizada que obtém informação sobre a abundância de múltiplos transcritos de RNA mensageiro (RNAm) em uma amostra biológica. Hoje sabe-se da importância do papel do RNA na regulação gênica, onde o RNA é capaz de controlar a tradução de RNAm em proteínas (GLAVES, 2011).

Estudos de RNAm visam observar o que está sendo transcrito do genoma total de uma espécie, afinal sabe-se que nem todos os genes são transcritos e expressos em todos os momentos. Este tipo de pesquisa também pode fornecer informações sobre as diferentes respostas que os organismos apresentam em condições diferentes, como clima, estresse hídrico, disponibilidade de nutrientes e respostas a doenças e patógenos (CLARK, 2012).

O transcriptoma é o conjunto completo de transcritos em uma célula, e também uma técnica que permite acessar a quantidade dos transcritos por célula em um determinado estágio de desenvolvimento. Compreender o transcriptoma é essencial para interpretar os elementos funcionais do genoma e revelar os componentes moleculares de células e tecidos. Os objetivos principais da transcriptômica são catalogar todas as espécies de transcrição, incluindo mRNAs, RNAs não-codificantes e pequenos RNAs, para determinar a estrutura da transcrição de genes, em termos dos seus locais de iniciação, 5' e 3', os padrões de splicing e de outras modificações pós-transcricionais, e para quantificar alteração dos níveis de expressão de cada transcrito durante o desenvolvimento e sob diferentes condições (WANG, 2010).

A técnica de RNAseq foi desenvolvida para o sequenciamento de RNA e usa recentes tecnologias de sequenciamento, esta foi a técnica utilizada para o sequenciamento da *Urochloa decumbens*. Um pool de RNA é convertido em uma biblioteca de fragmentos de cDNA com adaptadores em uma ou nas duas extremidades, cada molécula com ou sem amplificação é então sequenciada com métodos de alto rendimento obtendo sequências curtas: reads de 30 a 400 pb, dependendo da tecnologia de sequenciamento de DNA utilizada. Em princípio qualquer sequenciamento de alto rendimento pode ser usado para o RNAseq, já foram publicados trabalhos com Illumina IG, Applied Biosystems SOLiD, Roche 454 Life Science. Os reads resultantes são alinhados a genomas ou transcriptomas referências, ou montados de novo para produzir um mapa da transcrição, que consiste tanto das estruturas transcricionais quanto do nível de expressão para cada gene (WANG, 2010).

O RNA-seq, apresenta vantagens interessantes como o fato de que não é limitado a detecção de transcritos que correspondem a sequências genômicas existentes, o que é bom para estudar organismos não-modelos, que possuem sequências genômicas ainda não determinadas. A técnica

revela a localização precisa das fronteiras da transcrição na resolução de até uma base, e os reads curtos de 30 pb permitem entender como dois éxons estão conectados, enquanto que os reads mais longos revelam a conectividade entre múltiplos éxons, e o RNAseq também mostra as variações de sequências, como os SNPs, nas regiões transcritas. Estes fatores tornam possível o estudo de transcriptomas complexos através da metodologia de RNAseq (WANG, 2010).

2.3 Aplicações de RNA-seq

São de interesse a esta pesquisa os trabalhos que utilizaram a técnica de RNAseq para a investigação de genes de resistência. Através de RNAseq é possível evitar o trabalho árduo de clonagem posicional para o isolamento de genes de resistência, como mostra o trabalho de Strau et al (2012) onde isolou-se o gene Bs4C um gene de resistência da pimenta, que reconhece a proteína de virulência AvrBs4 de bactérias *Xanthomonas*, sendo que o gene Bs4C transcrito é expresso exclusivamente na presença da proteína de virulência bacteriana. O trabalho comprovou a eficiência de RNAseq para a clonagem de genes R.

O departamento de agricultura dos Estados Unidos (USDA) também usa RNAseq no desenvolvimento de um estudo de transcriptoma de citrus resistentes e suscetíveis a infecção huanglongbing (HLB) para identificar genes de resistência chaves, genes de expressão diferencial, e agrupamentos gênicos que se relacionem ao combate a infecção. Para tal identificação faz-se necessário o uso intenso das ferramentas de bioinformática e também de RT-PCR. O objetivo maior do estudo é gerar variedades transgênicas contendo os genes de resistência (USDA-ARS, 2014).

Outro uso do RNAseq na descoberta de genes de resistência foi no trabalho de Sookruksawong et al (2013), que realizou o primeiro estudo de transcriptoma das respostas imunes em hemolinfa e hemácias com fins de identificar genes de expressão diferencial relacionados a resistência a Taura syndrome virus (TSV) no camarão do pacífico *Litopenaeus vannamei*. RNA-Seq de alta capacidade foi feito com Illumina obtendo um total de 61,937 contigs, foi feito BLASTX ($E\text{-value} < 10^{-5}$) que permitiu a identificação de 12,398 proteínas contra o banco de dados de proteínas não redundante do NCBI. As análises permitiram encontrar vários genes envolvidos no sistema imune, incluindo respostas de ativação como reconhecimento patógeno/antígeno: reguladores imunológicos, proteínas adesivas, transdutores de sinais, coagulação, antioxidação e proteases. Os padrões de expressão de 22 genes envolvidos no sistema imune foram validados por RT-PCR o que gerou informações valiosas sobre as funções de genes associados a resistência no camarão *L. vannamei*.

2.4 Genes de resistência

A segurança alimentar é preocupação mundial principalmente quanto ao fornecimento de alimentos de primeira necessidade como trigo, arroz, milho, soja, feijão, entre outros. Diversos fatores ambientais podem afetar a produção destes cultivos e entre eles estão as doenças que afetam as plantas. Um exemplo foi em 2010 quando o preço do trigo e arroz subiram devido as perdas na produção causadas por um novo tipo de ferrugem do caule, originária do leste da África e que chegou ao Oriente Médio causando grandes prejuízos (DOODS, 2010).

A maneira mais efetiva e ambientalmente correta para a prevenção de doenças nas culturas é a geração de plantas com resistência. De fato, melhoristas de plantas têm usado genes de resistência para combater doenças por mais de 140 anos. A efetividade desta estratégia logo despertou estudos genéticos que definiram as relações gene-a-gene entre a defesa da planta e os fatores de virulência do patógeno (FLOR, 1971). Entretanto foi só recentemente com estudos de biologia molecular que se tornou claro que os genes de resistência codificavam os componentes do sistema imune das plantas responsáveis por reconhecer e responder a patógenos específicos. O sistema imune das plantas depende de eventos celulares autônomos, eventos esses que são aparentados ao sistema imune dos animais, mas as plantas tem um repertório de reconhecimento muito maior para compensar o fato de serem entes estáticos (AUSUBEL, 2005).

Conhecimentos recentes tem revelado ainda mais sobre a complexidade do sistema imune das plantas e de como os patógenos manipulam o mesmo trazendo novas perspectivas para o desenvolvimento de cultivares resistentes (DOODS, 2010). O que são estudos importantes pois a perda de produção mundial dos cultivos devido a bactérias, fungos, vírus, nematóides e insetos foi descrita em 2010 como 14% da produção total igual a 220 bilhões de dólares anuais. Mas existe ainda outro problema que devemos considerar que é redução da qualidade dos produtos pois estes organismos podem liberar toxinas nos alimentos que consumimos e prejudicar a saúde humana (BAKER et al, 2010).

A indução de resistência a plantas é uma boa estratégia na proteção das culturas pois é eficiente no controle ao crescimento do patógeno, causa dano mínimo a planta, não necessita de pesticidas tornando a agricultura uma atividade menos impactante a natureza. Contudo no melhoramento tradicional para resistência a introdução de um gene de resistência de uma espécie, no pool de genes de outra, é feito por repetidos retro-cruzamentos, o que leva a muitas gerações híbridas antes da completa inserção do gene. A alternativa é o estudo completo de função, clonagem, caracterização e transformação genética dos genes de resistência das plantas através da biologia molecular (GURURANI, 2012).

Os genes de resistência ou genes R, são sequências de bases nitrogenadas com características específicas que constituem o DNA, material genético responsável pela constituição, regulação e ação do sistema imune das plantas. Já os domínios de proteínas são uma parte conservada de uma dada sequência de proteína. Um domínio possui uma estrutura que pode evoluir, funcionar e existir independentemente do resto da cadeia de proteína. Uma proteína pode ser constituída de vários domínios estruturais diferentes, o que é conhecido como multi-domínios e um domínio pode aparecer em uma variedade de proteínas diferentes (BOYD, 2013).

O sistema imune das plantas pode ser dividido em 2 grandes frentes uma é a defesa basal, que é a primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos, descrita como uma situação onde os patógenos estão presentes mas não conseguem infectar a planta, esta defesa é constituída pela membrana celular vegetal, que reconhece enzimas hidrolíticas secretadas pelos patógenos. Este reconhecimento se dá pelos PAMPs (padrões moleculares associados) dos patógenos que no caso de rompimento da membrana celular levam a ativação do sistema imune (HEATH in Gururani, 2012).

O segundo tipo de defesa é a mediada por genes R, que são traduzidos em proteínas R que são ativadas quando patógenos liberam efetores específicos, referidos como genes de virulência (genes Avr). A classe mais prevalente de proteínas R contem repetições ricas em leucina (LRR), um nucleotídeo de ligação central e uma terminação de aminoácidos variáveis. Outras classes possuem um domínio LRR extra-celular, um domínio transmembrana e um domínio intracelular serina-treonina-kinase. Essas proteínas agem na percepção do patógeno e ativação de redes conservadas de sinais de defesa mais fortes do que os da defesa basal, mecanismo conhecido como imunidade ativada pelo efector (ETI do inglês effector-triggered immunity). A relação entre genes R e genes Avr, é chamada de resistência gene-a-gene (BOYD, 2013).

Quando se dá a infecção, efetores específicos (moléculas produzidas pelo patógeno), são diretamente reconhecidos pelas proteínas R, este reconhecimento também pode acontecer indiretamente através de outras proteínas alvo na planta que por sua vez são protegidas, por proteínas R. Então uma cascata de sinais é ativada através de fosforizações, oligomerizações, degradações, mudanças conformacionais e o movimento de proteínas R entre o citoplasma da célula vegetal e o núcleo. A célula é dramaticamente reprogramada para a coordenação da defesa, tanto a nível local de infecção, quanto sistemicamente (HAMMOND-KOSACK, 2007).

Os genes de resistência podem ser classificados em 8 classes diferentes, de acordo com Gururani (2012), que em sua revisão do assunto, determina as classes de acordo com o arranjo dos domínios funcionais como exibido na figura 1.

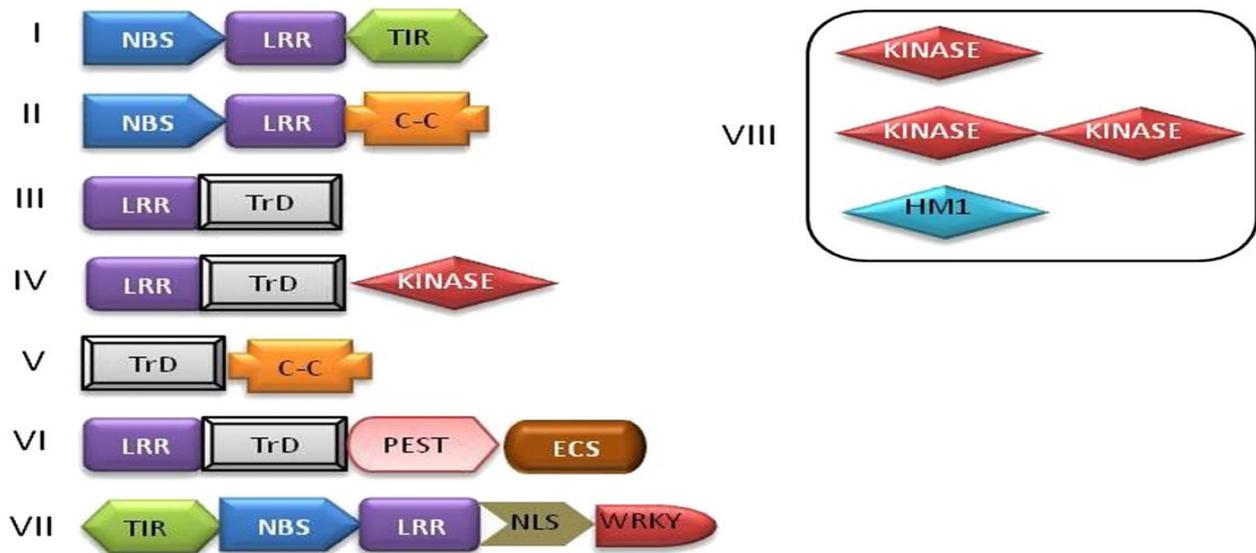


Figura 1. Principais classes de genes R. LRR Leucine rich repeats; NBS Nucleotide-binding site; TIR Toll/Interleukin-1- receptors; C-C Coiled coil; TrD transmembrane domain; PEST Protein degradation domain (proline-glycine-serine-threonine); ECS Endocytosis cell signaling domain; NLS Nuclear localization signal; WRKY Amino acid domain; HM1 *Helminthosporium carbonum* toxin reductase enzyme (GURURANI, 2012).

2.4.1 Aspectos gerais da resistência

A resistência é descrita como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e a posterior atividade de um patógeno em seus tecidos. A tolerância é a capacidade inerente ou adquirida de uma planta em suportar o ataque do patógeno sem que ocorram danos significativos em sua produção. E a imunidade é a incapacidade de estabelecimento das relações entre patógeno e hospedeiro, na qual a planta apresenta-se 100 % livre do patógeno (VALLE, 1999).

Cada estresse sofrido pela planta promove uma resposta molecular e celular complexa implementada pelo sistema da planta afim de prevenir danos e garantir a sobrevivência, porém estas repostas geralmente deprimem o crescimento e produtividade da planta (HERMS;MATTSON, 1992). Nos últimos dois anos têm se olhado a problemática da defesa das plantas com um olhar mais amplo, pois as plantas sofrem múltiplos estresses ao mesmo tempo e devem responder de forma adequada, portanto é mais interessante estudar como reage o mecanismo de defesa frente a diferentes fatores do que apenas um, encontrando assim elementos comuns para resistência a seca, salinidade, calor, patógenos, etc (ATKINSON, 2012).

Sabe-se que a formação do complexo gene de resistência - fator de virulência, desencadeia uma cascata de reações na planta levando a resistência a estresses propriamente dita. São exemplos de mecanismos de defesa a rápida oxidação, o fortalecimento da parede celular, a indução da expressão de genes de resistência, e a morte celular acelerada no lugar da infecção (PAN, 2000).

O hormônio ABA é considerado um regulador global do estresse, ele pode suprimir as rotas metabólicas de defesa a patógenos, controlando o que é prioridade entre respostas de estresse biótico e abiótico, e possibilitando que as plantas respondam a ameaça mais severa. Portanto o ABA é um fator crucial na determinação de como as plantas respondem a múltiplos estresses (ASSELBERGH et al, 2008).

Com o passar do tempo ficou mais evidente a divisão do sistema imune de plantas em duas grandes ramificações, uma usa receptores transmembranas para o reconhecimento de fatores moleculares oriundos de patógenos, como a flagelina, e a segunda ramificação age dentro da célula através de proteínas ligadoras de nucleotídeos e repetições ricas em leucina NB-LRR, codificadas pela maioria dos genes R (DANGL E JONES, 2006).

A maioria dos genes de resistência codificam um sítio de ligação de nucleótídeos (NBS) e um número variável de LRR no C-terminal. Proteínas de resistência NBS-LRR diferem principalmente no terminal N que inclui ou um TIR ou um domínio coiled coil (CC), como em TIR-NBS-LRR (TNL) e CC-NBS-LRR (CNL), respectivamente. No genoma de *Arabidopsis*, cerca de 82 genes codificam TNL e aproximadamente 51 codificam CNL. A ativação direta ou indireta dessas proteínas R por produtos de genes microbianos ocorre através de mecanismos de reconhecimento em sua maioria desconhecidos e resulta em morte celular localizada, visível macroscopicamente como a resposta de hipersensibilidade (FLUHR, 2001; PAN 2000; DANGL 2006; HEATH, 2000).

2.5 Bancos de dados de genes de resistência

Com a descoberta de muitos genes de resistência, em diferentes trabalhos, fez-se necessária uma ferramenta que agrupasse todas as informações na área e facilitasse a busca por genes R, assim bancos de dados foram criados para esta finalidade.

Informações sobre genes de resistência podem ser encontradas em bancos de dados online como o **SolRgenes**, que é um banco de dados específico para genes de resistência da *Solanum tuberosum* (VLEESHOUWERS, 2011). Outro banco é o **Plant Stress Gene Database**, que contém genes de resistência a fatores de estresse biótico e abiótico (PRABHA, 2011), o **Resist Vir** banco de dados de resistência a vírus, o **PathoPlant**, banco de dados de interações planta-patógeno (BÜLOW, 2004) e também o **PRGdb** – Plant Resistance Gene data base, o mais completo banco de dados com informação sobre genes R de várias plantas (SANSEVERINO, 2010).

O mais importante e o primeiro banco de dados online a reunir especificamente sequências relacionadas a defesa das plantas foi o PRGdb, criado por Walter Sanseverino e seus colaboradores na Universidade de Nápoles, Itália em 2010. O objetivo do banco de dados PRGdb é disponibilizar

uma coleção atualizada, bem organizada e curada manualmente de genes de resistência descobertos em várias plantas. O banco de dados pode ser acessado livremente no endereço: <http://prgdb.crg.eu/>, sendo sua última atualização realizada em 4 de fevereiro de 2014. Este foi o banco de dados utilizado para os estudos de comparação deste trabalho.

O acervo do PRGdb contém genes extraídos da literatura e outros 16.000 novos genes R potenciais, totalizando 104.447 sequências. Também o banco de dados é aberto para que outros pesquisadores integrem mais dados sobre genes de resistência.

Na criação deste banco de dados, primeiramente as sequências foram inseridas manualmente no banco, sendo 73 genes R isolados de 22 espécies de plantas com resposta imune a 31 patógenos. As plantas estudadas no isolamento de genes de resistência foram em maioria da família Solanaceae, e outras como *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* (arroz), *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Glicine Max* (soja), *Zea mays* (milho), *Hordeum vulgare* (cevada), *Cucumis melo* (melão), *Lactuca sativa* (alface), *Beta vulgaris* (beterraba), *Linum usatissimum* (linho). Em seguida foram usados sistemas automatizados de busca por similaridade do NCBI nucleotídeos. Ainda foram usados métodos de predição computacional para identificar mais genes R no banco de dados UniGene. Hoje o banco contém mais de 104 mil sequências, 241 espécies de plantas, 138 patógenos, 16 classes de genes R, entre outras utilidades (SANSEVERINO, 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os 164.920 transcritos únicos de *Urochloa decumbens* cv. Basilisk foram obtidos com a EMBRAPA Gado de Corte em Campo Grande - MS, que realizou a parte prática de acordo com a seguinte metodologia:

Perfilhos de *U. decumbens* cv. Basilisk foram colhidos. Eles foram enraizadas em vasos contendo solo adubado anteriormente (mistura de 0,2% de preto: terra vermelha 1:3, 0,2% de cal, 0,02% 0-20-20 fertilizantes e 0,005% de uréia) e foram mantidas em casa de vegetação. Quarenta e cinco dias depois, as plantas foram cortadas para estimular o perfilhamento. Após 15 dias, os jovens brotos foram removidos e transferidos para uma mesa de hidroponia contendo solução de enraizamento preparada de acordo com Hoagland & Arnon (1950). Este procedimento foi realizado para padronizar a idade dos brotos usados na cultura hidropônica nas soluções com e sem alumínio (CHIARI, et al, 2011).

Plântulas de *U. decumbens* cv. Basilisk com 11 dias de idade, foram submetidas às condições de estresse (com alumínio) e não estresse (sem alumínio) em hidropônia por oito horas. O experimento foi inteiramente casualizado com três repetições, formadas por 20 plântulas cada. As pontas das raízes foram excisadas para extração de RNA total e enviadas para sequenciamento pela plataforma Illumina HiSeq™ 2000 no Beijing Genomics Institute (BGI). As seis bibliotecas construídas geraram aproximadamente 40 Gb de dados (DOS SANTOS, 2014).

Após a obtenção dos dados foi realizado um alinhamento local dos transcritos únicos (incluindo plântulas estressadas e não estressadas) contra os 104.447 genes de resistência do banco de dados de genes de resistência de plantas PRGdb (<http://prgdb.crg.eu/wiki/MainPage>) (SANSEVERINO, 2010) instalado localmente, utilizando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al, 1990). Somente sequências similares que apresentaram e-value igual a 0.0 foram usadas nesse estudo. O e-value é um parâmetro usado na ferramenta de alinhamento local (BLAST) e mostra se um alinhamento ocorreu ou não ao acaso. Um resultado igual a 0.0 significa que o alinhamento não teve nenhuma chance de ter ocorrido ao acaso.

Os dados obtidos foram organizados em um banco de dados usando MySQL através do programa phpmyadmin, disponibilizado pelo pacote de código aberto XAMP. O phpmyadmin é uma interface gráfica gratuita para o banco de dados MySQL. Este banco de dados possibilitou a filtragem dos resultados, permitindo separar os transcritos que se encontravam repetidos.

Posteriormente foi realizado um levantamento dos domínios de resistência presentes em *Urochloa decumbens* averiguando as sequências diferentes uma a uma por comparação com o PRGdb e anotando os domínios presentes em cada transcrito. Esses dados foram organizados em

uma tabela e um gráfico (Tabela 1 e Figura 2). Em seguida mais informações sobre as características e funções dos domínios de resistência foram buscadas através de revisão de artigos.

Foi realizada uma busca, pelas funções específicas, estrutura e localização celular dos transcritos de *Urochloa decumbens* com alguns genes selecionados ao acaso para representar os domínios em uma amostragem de 2%. A busca foi feita por comparações nos seguintes bancos de dados: **Protein Sequence Analysis and Classification- Interpro** (HUNTER, 2008), **SwissProt** (BAIROCH, 1996), **Non-redundant Protein Data- NR** (NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2013) **Genbank-NT** (BENSON, et al 2014), **Reference Sequence Database - Refseq** (PRUITT, 2013), **Clusters of Orthologous Groups- COG** (TATUSOV, 2000), **Gene Ontology- GO** (GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2003), **Kioto Encyclopedia of Genes and Genomes- KEGG** (KANEHISA, 1999), **Conserved Domains Database- CCD** (MARCHLER-BAUER, 2008).

Genes de resistência já conhecidos foram relacionados aos transcritos de *Urochloa decumbens* através da ferramenta Blast do banco de dados PRGdb. Os mesmos foram usados para uma análise filogenética.

Para essa análise foram usados os programas Bioedit (TIPPMANN, 2004), Clustal X (LARKIN, 2007) e MEGA 6.06 (KUMAR, 2001), respectivamente. Primeiro foi realizado um alinhamento global no ClustalX, seguido da edição das sequências que se encontravam em sentido inverso no Bioedit, o alinhamento foi convertido ao formato MEGA. Uma distância média foi calculada para verificar o melhor método de construção. O modelo de substituição de nucleotídeos Neighbor-joining foi escolhido para as distâncias maiores que 0.2 e o modelo P-distance para as distâncias menores que 0.2. Foi selecionado como método estatístico de avaliação da árvore o Bootstrap no valor de 1000. As árvores resultantes tiveram o intuito de ilustrar a homologia entre os genes R de *Urochloa decumbens* e os genes R de outras espécies conhecidas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O BLAST dos 164.920 transcritos únicos de *Urochloa decumbens* contra o banco de dados de genes de resistência de plantas PRGdb pôde identificar similaridade com 2.245 genes de resistência expressos, exibindo valores de e-value de 0.0, o que significa que nenhum alinhamento aconteceu ao acaso. Dos 2.245 genes de resistência encontrados 1.221 eram diferentes entre si.

Foram encontradas 1055 sequências contendo o domínio Serina-treonina-quinase; 449 sequências com o multi-domínio NBS-LRR ; 349 sequências com o multi-domínio LRR-Serina-treonina-quinase; 251 sequências com o domínio NBS; 78 sequências com o multi-domínio Serina-treonina-quinase- GNK2; 74 sequências com o domínio LRR; 62 sequências com o multi-domínio NBS- Serina-treonina-quinase, 14 sequências com o domínio MLO; 107 sequências com domínios desconhecidos (Unknown); 4 sequências com domínio Receptor-Like Kinase e os multi-domínios NBS-TIR-LRR e NBARC ambos apresentaram 1 sequência cada. Os dados podem ser vistos na Tabela 1 e na Figura 1.

Tabela 1. Domínios e multi-domínios de resistência presentes em *Urochloa decumbens*

Domínios	Total de sequências	Porcentagem %
LRR	74	3.02
LRR, Ser-Thr Kinase	349	14.27
MLO	14	0.57
NBS	251	10.26
NBS, LRR	449	18.36
NBS, Ser-Thr Kinase	62	2.53
Ser-Thr Kinase	1055	43.14
Unknown	107	4.37
Ser-Thr Kinase, GNK2	78	3.19
Receptor-Like Kinase	4	0.16
NBARC	1	0.04
NBS, TIR, LRR	1	0.04
	2445	100%

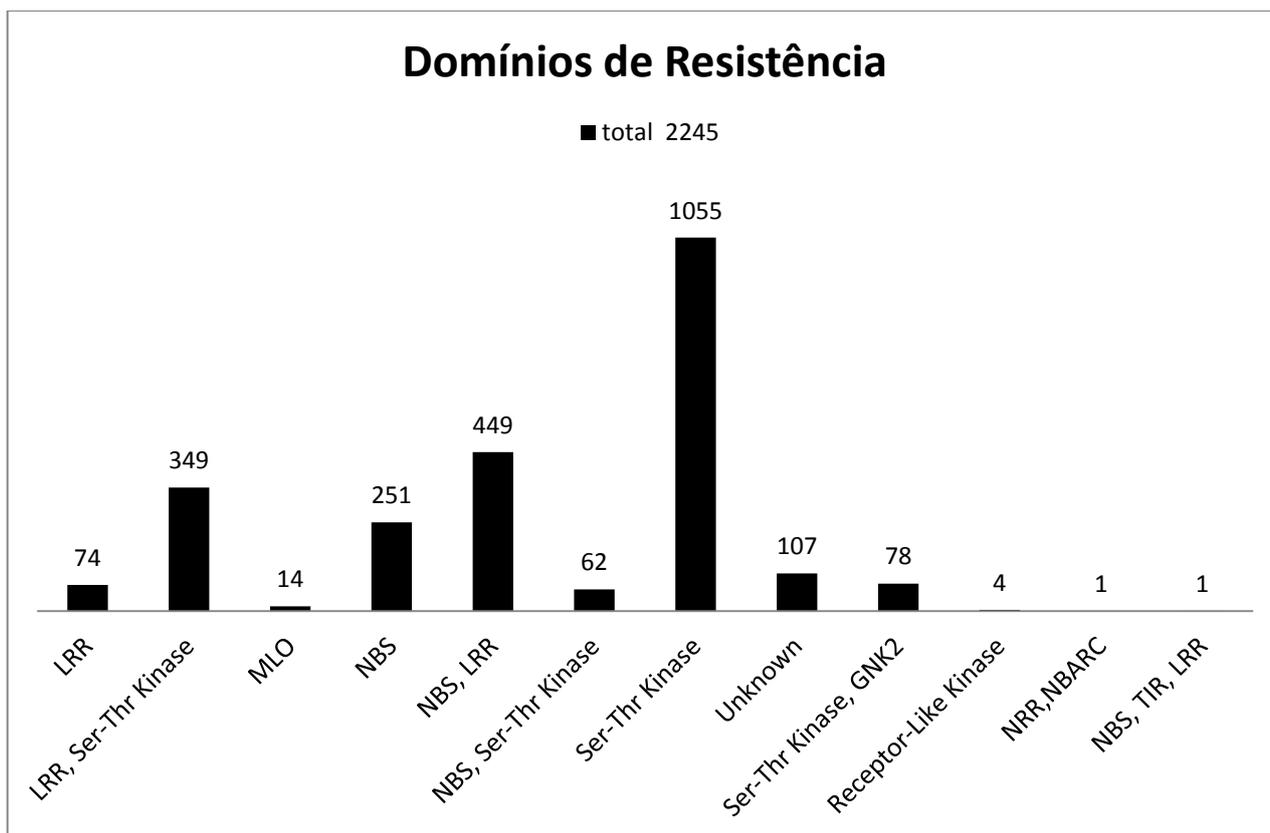


Figura2. Gráfico apresentando os domínios e multi-domínios de resistência em *Urochloa decumbens*

Na literatura foi possível encontrar informações de alguns domínios do estudo relacionados a resistência contra alguns patógenos: Observou-se que MLO pode fornecer resistência ao fungo *Blumeria graminis f. sp. hordei*, e *Pseudomonas syringae* (KIM et al, 2002). O domínio TIR pode prover resistência a *Caenorhabditis elegans* e fungos (COUILLAULT, 2004). NBARC-LRR ligado a proteínas Pto pode conferir resistência a *Pseudomonas syringae* (MUCYN, 2006). GNK2 pode conferir resistência a *Fusarium oxysporum* e outros fungos fitopatogênicos (MIYAKAWA, 2009). Ser-Thr-quinase pode fornecer resistência a *Xanthomonas* patogênicas (FRIEDRICHSEN, 2000). LRR reconhece flagelina de bactérias patogênicas (JONES, 2006), e por fim NBS pode conferir resistência ao fungo *Magnaporthe grisea* (ZHOU, 2006).

4.1 Proteínas R em *Urochloa decumbens*

O número de sequências similares a genes de resistência encontrados em *Urochloa decumbens*, exatamente 2.445 sequências com alinhamento perfeito no banco PRGdb, pode ser devido ao fato de a planta ter sido exposta a estresse por alumínio. O estresse por ataque de patógenos é um estresse que a planta fica exposta normalmente. Segundo Atkinson (2012), em tais

condições como em alta salinidade e acidez espera-se que a planta expresse em maior quantidade genes de resistência afim de proteger-se contra as agressões do meio e manter suas funções vitais, e silencie outros genes não necessários no momento.

Nesta condição fisiológica *Urochloa decumbens*, expressou 12 domínios e multi-domínios de proteínas relacionadas a resistência, apresentados sozinhos em um gene, ou combinados a outros domínios em um mesmo gene. Sendo os domínios mais expressivos NBS, LRR e Serina-Treonina-Quinase. A seguir discutiremos os domínios e multi-domínios encontrados, suas funções e características.

4.2 Domínio de proteínas de resistência NBS

O domínio NBS esteve presente em 763 transcritos de *Urochloa decumbens*. Sozinho ou acompanhado de outros domínios, NBS esteve presente em terceira maior quantidade do total de genes em *Urochloa decumbens*, como pode ser visto na Figura 2. Isto pode ser explicado pelo fato de que este domínio tem como função principal a sinalização inicial da presença de fatores Avr, portanto ele é fundamental para iniciar as respostas de resistência (PARNISKE, 1997).

A maioria dos genes de resistência de plantas possui um sítio NBS do inglês nucleotide binding site e repetições ricas em leucina LRR, do inglês leucine rich repeats, estes são domínios extremamente conservados e evoluíram em diferentes espécies (FLUHR, 2001). Um exemplo são os genes de resistência do arroz contra o fungo *Magnaporthe grisea*, Pi2 e Piz-t que são membros de um cluster gênico que consiste de nove genes que codificam proteínas com os domínios NBS e LRR conhecidas como Nbs1-Pi2 a Nbs9-Pi2 (ZHOU, 2006).

Genes que contém estes domínios são conhecidos como genes tipo NBS-LRR, o N-terminal de alguns destes genes apresenta homologia com genes desde moscas a humanos o que sugere uma origem comum para a resistência multicelular inata nos organismos (DELLEDONNE, 2005). A razão por trás da existência destes domínios conservados nos genes R é que os domínios NBS e LRR se ajudam e são estruturas hiper-variáveis para o reconhecimento de um grande número de fatores Avr. Estes domínios formam uma estrutura terciária em forma de folha beta paralela que é exposta aos fluidos celulares, o que facilita a interação da proteína R com seu fator Avr. Esta organização fornece diferentes especificidades de reconhecimento para fatores Avr distintos (ALVARENGA, 2007).

Para a representação do domínio NBS duas sequências foram escolhidas CL9668.Contig2_All, e CL1094.Contig29_All. A sequência CL9668.Contig2_All possui 1130 nucleotídeos, e foi anotada em seis bancos de dados biológicos diferentes como pode ser visto a

seguir. No banco de dados biológicos Non-Redundant Protein Data (NR) do NCBI (National Center for Biological Information) apresentou similaridade com uma proteína hipotética de *Sorghum bicolor* mostrando os seguintes valores de blast (e-value 5.00E-143, score 509.2) no banco NT também do NCBI a sequência mostrou-se similar a uma ATPase de *Zea mays* acoplada a uma proteína transmembrana para movimento de substâncias (e-value 0.0, score 894). No banco Swissprot retornou similaridade com uma ABC transporter G family member de *Arabidopsis thaliana* (e-value 3.00E-80, score 295). No banco COG (Clusters of Orthologous Groups) sua função foi definida como ABC-type multidrug transport system, proteína transmembrana (e-value 1.00E-12, score 72.4). No banco Kegg Orthology foi classificada como U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein PRP3 (e-value 2.00E-39, score 161). No banco GO (Gene Ontology) CL9668.Contig2_All resultou similar a uma ATPase, acoplada a uma proteína transmembrana para movimento de substâncias, estando localizada na membrana plasmática.

Pelos resultados foi possível identificar a sequência como possivelmente sendo uma proteína transmembrana.

Pela análise da árvore filogenética exibida na Figura 3 é possível observar que a sequência CL9668.Contig2_All é mais proximamente relacionada às sequências das plantas *Setaria italica* e *Panicum virgatum*.

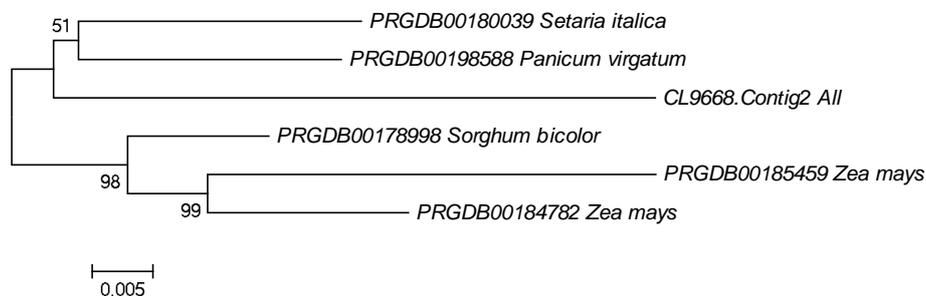


Figura 3. Árvore filogenética sequência NBS CL9668, construída com o programa Mega versão 6.06, usando o método de construção neighbor-joining e bootstrap de 1000.

A segunda sequência escolhida para representar o domínio NBS foi CL1094.Contig29_All, com 2828 nucleotídeos. No banco Conserved Domains (CCD) do NCBI, esta sequência foi similar a uma pleiotropic drug resistance protein 4-like de *Setaria italica*, da família das ABC-transportadoras (ATP-binding cassette -ABC transporters), com e-value 2.25e-27. O Interpro apresentou resultado de uma proteína não caracterizada de *Setaria italica* com e-value 3.00e-18. O banco NR retornou similaridade com uma proteína hipotética de *Sorghum bicolor* (e-value 2.00e-11, score 73.6), no banco NT foi similar a pleiotropic drug resistance protein 4-like de *Brachypodium distachyon* (e-value 0.0, score 983). No SwissProt foi similar a uma pleiotropic drug resistance protein 2 de *Oryza*

sativa (e-value 0.0, score 867). O COG a define como uma ABC-transportadora (e-value 1.00E-39, score 164). O banco KO retornou similaridade como uma U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein PRP3 (e-value 5.00e-43, score 174) , e o GO define sua participação nas funções de resposta a ozônio;ATP catabolic process; transporte de íons e transporte de ácido abscísico.

Pelos resultados foi possível identificar a sequência como possivelmente sendo uma proteína transmembrana.

Pela análise da árvore filogenética exibida na Figura 4 é possível observar que a sequência CL1094.Contig29_All é mais proximamente relacionada as sequências das plantas *Setaria italica* o que também foi observado na árvore anterior, demonstrado coerência entre os resultados do domínio NBS.

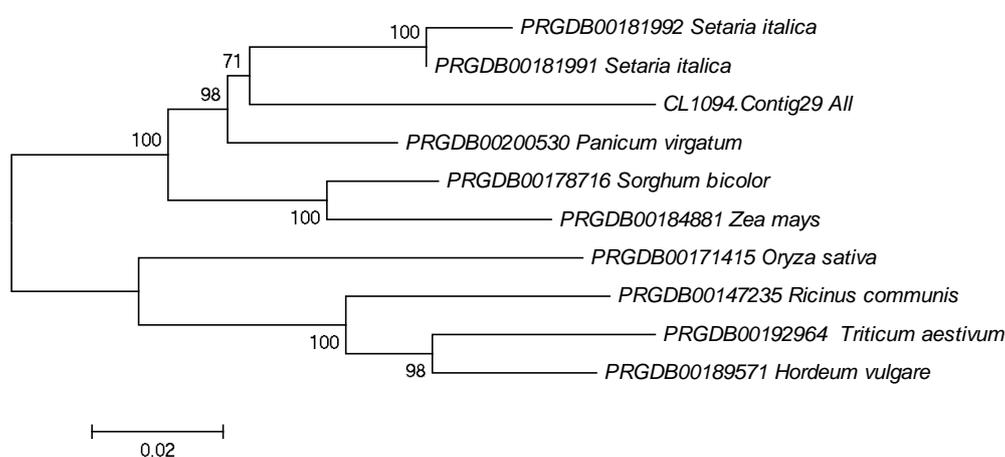


Figura 4. Árvore filogenética sequência NBS CL1094, construída com o programa Mega versão 6.06, usando o método de construção neighbor-joining e bootstrap de 1000.

4.3 Domínio de proteínas de resistência LRR

O domínio LRR apareceu em um total de 873 vezes nas sequências transcritas de *Urochloa decumbens*, sozinho ou com outros domínios, este foi o domínio presente em segunda maior quantidade do total de genes em *Urochloa decumbens*, como pode ser visto no Gráfico 1 exibido anteriormente. Uma possível explicação para este número é devido a necessidade da planta possuir diferentes variações na região LRR para poder responder aos diferentes estresses.

A localização do domínio LRR pode ser intra ou extracelular, o LRR é composto por resíduos de leucina em regiões conservadas, a média do comprimento destas repetições é de 24 aminoácidos, relativamente constante em todos os produtos de genes R, enquanto que o número de repetições LRR em diferentes plantas pode variar de 14 a 37 vezes, em especial a variação na região LRR tem se mostrado responsável por diferentes tipos de respostas de resistência (TAKKEN, 2000). Um

exemplo é a detecção de flagelina de bactérias patogênicas que é feita pela proteína FLS2 e o reconhecimento de Fatores de Elongação bacteriana pela proteína EFR ambas receptores quinase-LRR de *Arabidopsis thaliana* (JONES, 2006).

Selecionamos ao acaso duas sequências de *Urochloa decumbens* pertencentes ao domínio LRR identificadas como CL14784.Contig1_All e CL7135.Contig2_All para serem anotadas em maiores detalhes. A sequência CL14784.Contig1_All possui 1727 nucleotídeos, e no banco de dados Non-Redundant Protein Data (NR) esta sequência foi classificada como uma proteína da família LRR similar a *Zea mays* (e-value 0.0, score 680.2). No banco NT esta sequência apresentou similaridade com *Phyllostachys edulis* cDNA clone (e-value 0.0, score 906). No banco Swissprot esta sequência apresentou similaridade com LRR extensin-like protein de *Arabidopsis thaliana* (e-value 1.00E-102 , score 370). O banco COG (Clusters of Orthologous Grups) define sua função como DNA-directed RNA polymerase (e-value 6.00E-14, score 74.3). O banco Kegg Orthology (KO) como LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase (e-value 1.00E-29, score 129), e o Gene Ontology (GO) indica que é uma proteína de atividade quinase com função de fosforilação sendo componente da membrana citoplasmática.

Pelos resultados foi possível identificar a sequência como possivelmente sendo uma proteína de fosforilação.

Pela análise da árvore filogenética exibida na Figura 5 é possível observar que a sequência CL14784.Contig1_All é mais proximamente relacionada as sequências das plantas *Zea mays* e *Sorghum bicolor*.

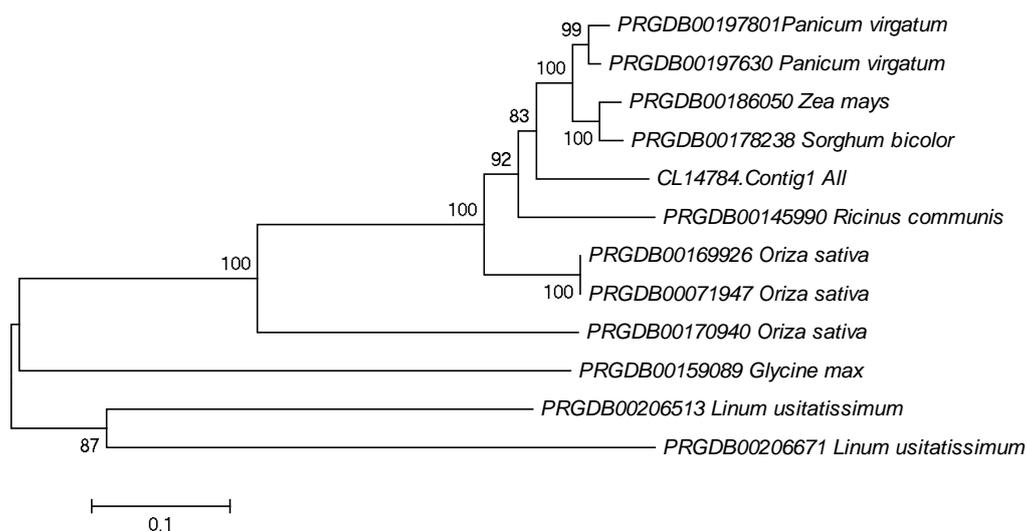


Figura 5. Árvore filogenética sequência LRR CL14784, construída com o programa Mega versão 6.06, usando o método de construção neighbor-joining e bootstrap de 1000.

A outra sequência escolhida para representar o domínio LRR foi a CL7135.Contig2_All, com 3880 nucleotídeos. No banco NR e NT ela foi similar a uma proteína não caracterizada de *Zea mays* (e-value 0.0, score 1530), no SwissProt foi similar a proteína de resistência a doenças RGA2 de *Solanum bulbocastanum* (e-value 6.00E-91, score 333). O banco COG a descreveu como uma proteína rica em leucina (e-value 4.00E-07, score 56.2). O banco KO mostrou similaridade com uma DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1 (e-value 1.00e-137, score 489). E o GO a localizou na membrana citoplasmática acoplada a vesícula.

Pelos resultados foi possível identificar a sequência como possivelmente sendo uma proteína LRR envolvida no reconhecimento de patógenos.

Pela análise da árvore filogenética exibida na Figura 6 é possível observar que a sequência CL7135.Contig2_All é mais proximamente relacionada as sequências das plantas *Panicum virgatum*.

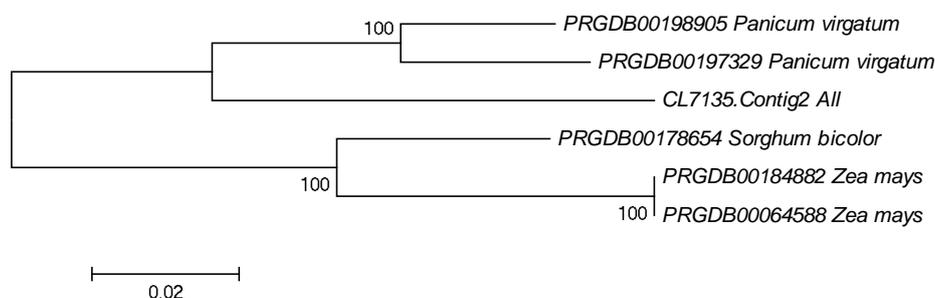


Figura 6. Árvore filogenética sequência LRR CL7135, construída com o programa Mega versão 6.06, usando o método de construção neighbor-joining e bootstrap de 1000.

4.4 Domínio de proteínas de resistência Serina-Treonina-Quinase

Este domínio foi o mais abundante nas sequências transcritas de *Urochloa decumbens*, receptores tipo quinases ativam um complexo arranjo de sinais intracelulares em resposta ao ambiente extracelular. A função geral das quinases é a fosforilação mecanismo que pode ativar ou inativar a molécula alvo, a Serina-treonina-quinasefosforiliza especificamente os aminoácidos serina e treonina, este grupo de quinases tem um papel importante na regulação da proliferação celular, morte celular programada, e diferenciação celular (HANKS, 1995). Este grupo não é específico e pode fosforilar uma grande família de substratos que possuem elementos de reconhecimento similares. Enquanto o domínio catalítico é bastante conservado, há muita variação nos genes que codificam para as Ser-Thr Kinase, possibilitando o reconhecimento de distintas moléculas (AHERN, 2012).

O domínio das proteínas quinases em eucariotos impacta a atividade catalítica. Três funções podem ser descritas para este domínio: 1) ligação e orientação do ATP doador de fosfato por

complexação com o cátion divalente (usualmente Mg^{2+} ou Mn^{2+}), 2) ligação e orientação de proteínas ou peptídeos, e 3) transferência do γ -fosfato do ATP para o aceptor hidroxil (Ser, Thr, or Tyr) da proteína substrato (HANKS, 1995).

Young et al, descobriu em 2003 que o domínio Ser-Thr Kinase, se encontrava presente tanto em bactérias quanto eucariotos, e em seus estudos concluiu que este domínio possui um mecanismo universal de ativação em procariotos e eucariotos. Depois, Shah et al 2008, também verificou que o domínio Serina-treonina-quinase em bactérias *M. tuberculosis*, é estruturalmente homólogo ao de eucariotos, este domínio na bactéria apresenta funções de fosforilar diversas proteínas, incluindo ativadores de transcrição, e divisão celular, e é parte do mecanismo de reconhecimento ambiental que as bactérias fazem para determinar a saída ou não do estado de dormência. Isto é feito com base no reconhecimento de um único aminoácido, pelo domínio Serina-treonina-quinase que contém uma membrana externa capaz de ligar peptídios-glicanos que é responsável por esta resposta.

Kristich et al, 2007, mostrou que em *Enterococcus faecalis*, o domínio Serina-treonina-quinase está envolvido na resistência contra antibióticos e é responsável pela persistência da bactéria no intestino. A arquitetura do domínio consiste de uma quinase citoplásmica separada por um segmento transmembrana extracelular, que liga peptídeos-glicanos, sugerindo a função de receptor transmembrana que monitora a integridade da parede celular e media respostas adaptativas para manter a integridade da parede celular.

A grande abundância deste domínio em *Urochloa decumbens* pode ser devido ao fato de que este é um domínio muito abundante na maioria dos seres vivos, também as fosforilações são modeladoras da transcrição e seus produtos, essenciais para as respostas ao estresse.

A maioria dos receptores tipo quinases pertence a família Ser/Thr quinases e grande parte também possui um domínio LRR extracelular. O domínio LRR- Serina-treonina-quinase está envolvido em múltiplos processos incluindo regulação do desenvolvimento (ERECTA, HAESA, e CLV1), resistência a doenças (Xa21) e sinalização de hormônios esteróides (brassinosteroid insensitive-1BRI1). O gene Xa21 confere resistência a *Xanthomonas* patogênicas em arroz e ERECTA é importante para a devida formação dos órgãos originando o meristema apical. CLV1 é responsável pelo controle da divisão celular e diferenciação do meristema. Mutações tanto no domínio LRR ou quinase de ERECTA e CLV1 levam a perda de função, confirmando a importância destes domínios para seu funcionamento. BRI1 codifica para um receptor do hormônio brassino-esteróide e mutantes BRI1 demonstram um fenótipo deficiente em hormônio brassino-esteróide que não é passível de reposição com tratamento hormonal (FRIEDRICHSEN, 2000).

Para a representação deste domínio 3 sequências foram escolhidas. A primeira foi CL2023.Contig1_All, possuindo 2954 aminoácidos. No banco NR apresentou similaridade com

uma proteína hipotética de *Sorghum bicolor* (e-value 0.0, score 1271), no banco NT foi similar a *Zea mays* tousled-like kinase (TLK2) (e-value 0.0, score 2872). No banco Swissprot foi similar a Serine/threonine-protein kinase tousled de *Arabidopsis thaliana* (e-value 0.0, score 833), o COG confirma sua função como sendo uma Serine/threonine protein kinase (e-value 3.00e-25, score 116), e o GO também aponta sua função de fosforilação de proteínas e sua localização nos cloroplastos e núcleo.

Pelos resultados foi possível identificar a sequência como possivelmente sendo uma proteína quinase com função de fosforilação.

Pela análise da árvore filogenética exibida na Figura 7 é possível observar que a sequência CL2023.Contig2_All é mais proximamente relacionada as sequências das plantas *Panicum virgatum*.

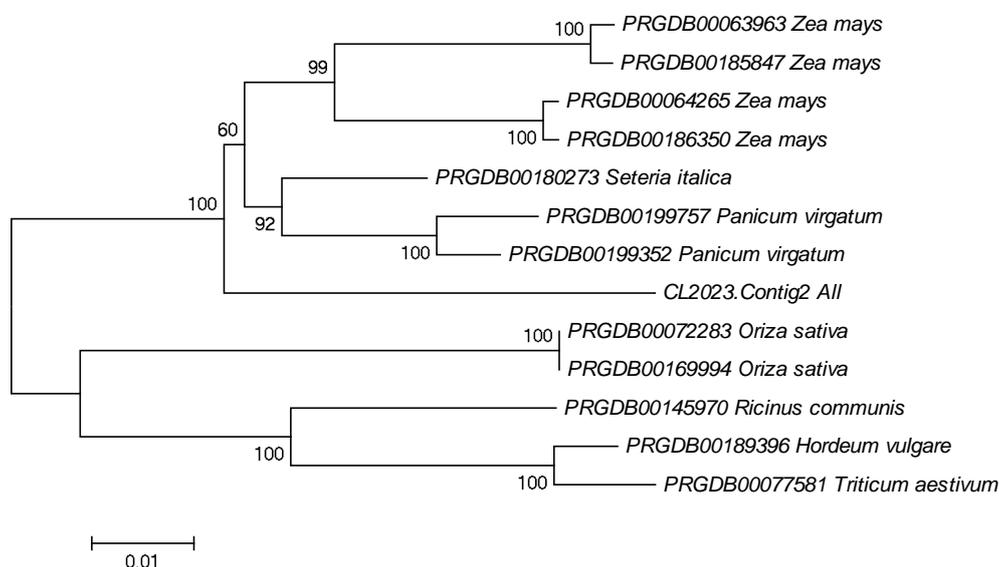


Figura 7. Árvore filogenética sequência Ser-Thr Kinase CL2023, construída com o programa Mega versão usando o método de construção neighbor-joining e bootstrap de 1000.

A segunda sequência escolhida para representar esse domínio foi CL52.Contig1_All com 1272 nucleotídeos. No PRGdb apresentou similaridade com serina-treonina-quinases de *Panicum virgatum* e *Setaria italica*. No banco NR apresentou similaridade com uma proteína quinase de *Oriza sativa* (e-value 2.00e-73, score 117.1), no NT com uma proteína hipotética de *Sorghum bicolor* (e-value 7.00e-21, score 109). No banco Swissprot foi similar a receptor tipo serina-treonina-quinase de *Arabidopsis thaliana*, (e-value 2.00e-51, score 128), o COG descreve sua função como serina-treonina-quinase (e-value 5.00e-12, score 53.1), e o GO indica participação nos processos de resposta celular a estímulos, resposta a substâncias orgânicas; regulação de morte celular programada; comunicação celular; processos imunes; resposta de defesa e processos metabólicos.

Pelos resultados foi possível identificar a sequência como possivelmente sendo uma proteína quinase com função de fosforilação.

Pela análise da árvore filogenética exibida na Figura 8 é possível observar que a sequência CL52.Contig1_All é mais proximamente relacionada as sequências das plantas *Panicum virgatum*, que também foi observado na árvore anterior, demonstrado coerência entre os resultados do domínio Ser-Thr-Kinase.

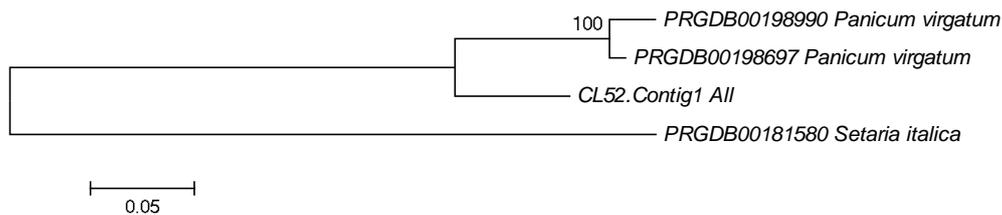


Figura 8. Árvore filogenética sequência Ser-Thr Kinase CL52, construída com o programa Mega versão 6.06, usando o método de construção neighbor-joining e bootstrap de 1000.

A terceira sequência escolhida para representar este domínio foi CL734.Contig6_All com 1461 nucleotídeos. No PRGdb apresentou similaridade com Serina-treonina-quinases-LRR de *Oriza sativa*, *Panicum virgatum*, *Setaria italica* e *Ricinus communis*. No banco NR e NT esta sequência resultou similar a uma proteína hipotética de *Oriza sativa* (e-value 0.0, score 957). De acordo com o Swissprot e KO foi similar a um receptor do tipo LRR - serine/threonine- kinase de *Arabidopsis thaliana* (e-value 2.00-64, score 245). O banco COG a define como uma serina-treonina-quinase (e-value 4.00e-20, score 97.8), e o GO confirma a função de fosforilação de proteínas e ligação de ATP e indica sua localização na membrana citoplasmática ligada a vesícula.

Pelos resultados foi possível identificar a sequência como possivelmente sendo uma proteína quinase com função de fosforilação.

Pela análise da árvore filogenética exibida na Figura 9 é possível observar que a sequência CL734.Contig6_All é mais proximamente relacionada as sequências das plantas de *Oriza sativa*.

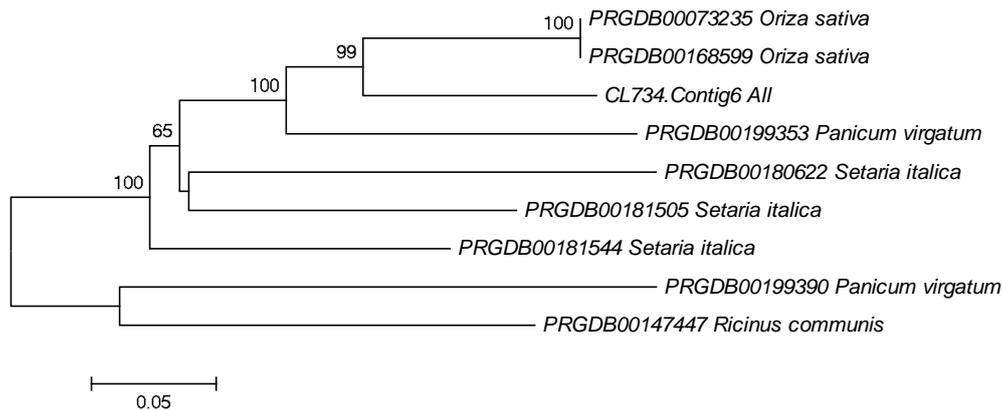


Figura 9. Árvore filogenética sequência Ser-Thr Kinase –LRR CL734, construída com o programa Mega versão 6.06, usando o método de construção neighbor-joining e bootstrap de 1000.

4.5 Domínio de proteínas de resistência MLO

O domínio MLO é restrito ao reino vegetal, ele consiste de 7 transmembranas, similarmente as proteínas G em animais, sua localização esta na membrana plasmática com o N-terminal extracelular e o C-terminal intracelular. Na cevada a presença do gene MLO codifica resistência ao fungo *Blumeria graminis f. sp hordei* (KIM et al, 2002) . Plantas mutantes homozigotas para o gene MLO apresentam resistência total ao fungo patogênico e plantas com super-expressão de MLO apresentam suscetibilidade ao fungo. MLO ainda pode ter outras funções biológicas, certas mutações no gene induzem a senescência acelerada das folhas e morte celular espontânea, o que sugere uma função de proteção celular mediante estresse biótico (DEVOTO, et al 2002).

Em muitas plantas pesquisadores descreveram um rápido aumento de cálcio no momento em que patógenos penetram a parede celular, um aumento de Ca^{2+} rápido e sustentado foi observado em folhas inteiras de *Arabidopsis* durante resistência específica a bactéria patogênica *Pseudomonas syringae*, por essas evidencias acredita-se que o cálcio tem um papel fundamental nas primeiras sinalizações de ataque por patógenos (XU, 1998). Também existem proteínas específicas, como a Calmodulina, que ligam-se ao cálcio mas pouco se entende deste mecanismo a nível molecular. Kim et al, 2002 isolou um gene MLO de arroz (ozMlo), verificando que sua proteína possui peso molecular de 62 kDA e identidade de 65% com a sequência MLO de cevada. Em seguida por meio de ensaios de hibridização mostrou que ozMlo se liga a calmodulina de forma dependente de cálcio, e localizou um domínio de 20 aminoácidos de calmodulina ligados no C-terminal de MLO, que era suficiente e necessário para a formação de um complexo de cálcio em respostas a patógenos. Os autores concluíram que a ligação de calmodulinas carregadas de Ca^{2+} no C-terminal de MLO pode ser uma característica comum do domínio de proteínas MLO (KIM, et al, 2002).

Duas sequências foram escolhidas para representar MLO a primeira foi CL2381.Contig2_All e possui 3136 nucleotídeos. No PRGbd ela foi similar a proteínas MLO de *Setaria italica*, *Panicum virgatum*, *Sorghum bicolor* e *Ricinus communis*. Nos bancos NT e NR apresentou similaridade com uma gamma-glutamylcysteine synthetase de *Zea mays* (e-value 0.0 , score 1824). No Swissprot é similar a Glutamaté-cysteine ligase B, de cloroplastos de *Oryza sativa* subsp. Japonica (e-value 0.0 , score 922). O banco COG, o KO e o banco GO todos apresentam os mesmos resultados apontando esta sequência como gamma-glutamylcysteine synthetase (e-value 0.0 , score 940), o GO ainda mostra que esta proteína tem funções de resposta de defesa contra bactérias, resposta de defesa por deposição de calose na parede celular; resposta ao estímulo de ácido jasmônico; resposta de defesa a fungos; processo biossintético da fitoalexina, processo de biossíntese de glucosinolatos; resposta de defesa a insetos; resposta aos íons cádmio; resposta ao calor; resposta ao ozônio e síntese de glutatona. Estando presente nos cloroplastos e no estroma.

Pelos resultados foi possível identificar a sequência como possivelmente sendo uma gamma-glutamylcysteine synthetase com função de defesa.

Pela análise da árvore filogenética exibida na Figura 10 é possível observar que a sequência CL2381.Contig1_All é mais proximamente relacionada as sequências das plantas de *Setaria italica*.

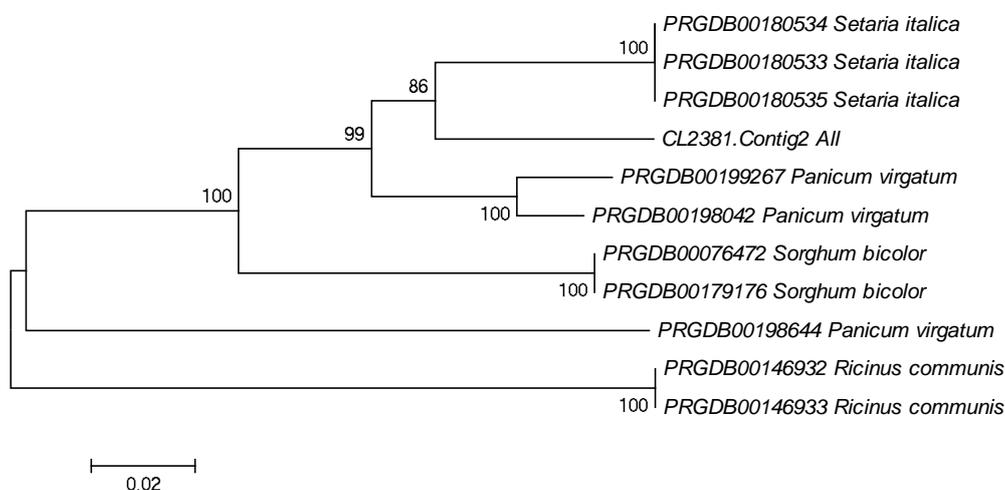


Figura 10. Árvore filogenética sequência MLO CL2381, construída com o programa Mega versão 6.06, usando o método de construção neighbor-joining e bootstrap de 1000.

A segunda sequência escolhida para representar este domínio foi Unigene26277_All com 1089 nucleotídeos. No PRGdb ela apresentou similaridade com uma MLO sete-transmembrana de *Setaria italica*, no banco NR e NT com uma proteína de *Zea mays* (e-value 0.0, score 1433), no Swissprot com uma proteína tipo MLO de *Arabidopsis thaliana* (e-value 2.00e-145, score 511), o KO como proteína MLO (e-value 6.00e-145, score 511) e o GO indica funções de resposta de

defesa; morte celular; resposta a estímulos bióticos, ligação de calmodulina e indica sua localização na membrana celular.

Pelos resultados foi possível identificar a sequência como possivelmente sendo uma proteína MLO com função de defesa.

4.6 Domínio de proteínas de resistência GNK2

Este domínio de proteínas foi descrito em 2009 por Takuya Miyakawa e parceiros e trata-se de proteínas antifúngicas, originalmente presentes no endosperma de sementes de Ginkgo Bilobin. Gnk2 consiste de 108 aminoácidos e inibe o crescimento de fungos fitopatogênicos tais como *Fusarium oxysporum*.

Gnk2 tem uma homologia considerável (~ 85 %) com proteínas abundantes no embrião de gimnospermas (EAP) como *Picea abies* e *P. glauca*, o que sugere que as proteínas são amplamente conservadas nas sementes das gimnospermas. Estas proteínas são expressas na fase final de maturação das sementes e estão envolvidas na proteção contra estresses ambientais como a seca. A sequência de Gnk2 é também 28-31 % idêntica ao domínio extracelular dos receptores quinases ricos em cisteína (CRK) de Arabidopsis, que tem função de ativar espécies reativas de oxigênio, ácido salicílico, e estão envolvidos na reação de hipersensibilidade a patógenos e morte celular programada (MIYAKAWA, 2009).

No presente trabalho 78 sequências transcritas apresentaram o domínio GNK2 conjuntamente ao Serina-treonina-quinase, como pode ser observado na figura 2.

Duas sequências foram escolhidas para representar este domínio. A primeira foi uma serina-treonina-quinase-GNK2, identificada como CL14588.Contig1_All, que possui 1728 nucleotídeos.

Ao comparar a sequência acima escolhida contra o banco PRGbd foi possível observar similaridade a proteínas Serina-treonina-quinases-GNK2 de *Setaria italica*, *Oriza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Ricinus communis*, entre outras como pode ser visualizado na árvore filogenética exibida pela figura 11.

No banco NR apresentou similaridade com uma proteína hipotética de *Sorghum bicolor* (evaluate 0.0, score 728), no banco NT foi similar a um receptor tipo quinase rico em cisteína de *Brachypodium distachyon* (evaluate 1.00e-120, score 438). No banco Swissprot retornou similaridade a um receptor tipo quinase rico em cisteína de *Arabidopsis thaliana* (evaluate 7.00e-85, score 311). O banco COG aponta sua função como Translation initiation factor 2 (IF-2; GTPase) (evaluate 3.00e-10

, score 65.5), o KO como interleukin-1 receptor-associated kinase (evalue $3.00e-33$, score 141), e o GO indica sua função na fosforilação de proteínas.

Pelos resultados foi possível identificar a sequência como possivelmente sendo uma Serina-treonina-quinase com função de fosforilação.

Pela análise da árvore filogenética exibida na Figura 11 é possível observar que a sequência CL14588.Contig1_All é mais proximamente relacionada as sequências das plantas de *Sorghum bicolor* e *Zea mays*.

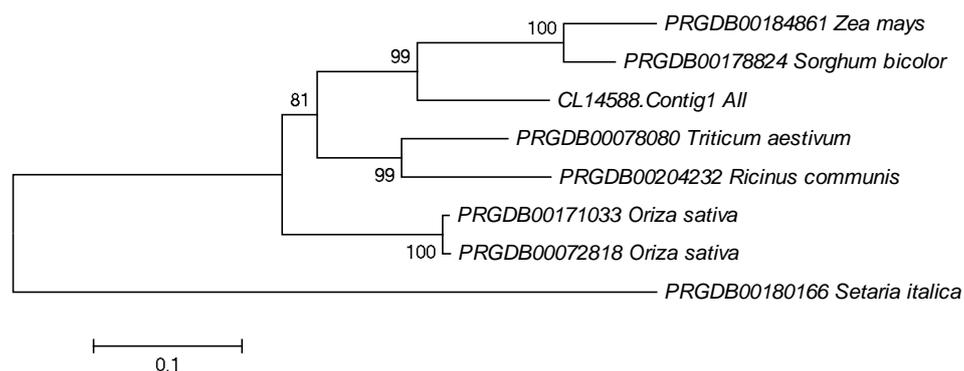


Figura 11. Árvore filogenética sequência Ser-Thr Kinase- GNK2 CL14588, construída com o programa Mega versão 6.06, usando o método de construção neighbor-joining e bootstrap de 1000.

A segunda sequência escolhida para representar este domínio foi Unigene 69220_All com 1915 nucleotídeos. No PRGdb ela apresentou similaridade com uma serina-treonina-quinase-GNK2 de *Panicum virgatum*. No banco NR retornou similaridade com uma serina-treonina-quinase-LRR de *Brachypodium distachyon* (e-value $2.00e-143$, score 511.1), no NT com uma proteína de *Zea mays* (e-value $1.00e-133$, score 484). No banco Swissprot apresentou similaridade com uma serina-treonina-quinase-LRR de *Arabidopsis thaliana* (e-value $3.00e-100$, score 362). O COG e o GO a definem como uma serina-treonina-quinase (e-value $3.00e-18$, score 92), e o GO indica funções de fosforilação, resposta a estímulos e ligação de nucleotídeos.

Pelos resultados foi possível identificar a sequência como possivelmente sendo uma Serina-treonina-quinase-LRR com função de fosforilação.

4.7 Domínio de proteínas de resistência NBARC

Uma grande família de genes R apresenta um domínio NBARC conservado para ligação de peptídeos, Fenyk (2012) fala da abundância deste domínio nas proteínas R de sua função no reconhecimento direto e indireto de elicitores produzidos por patógenos. Geralmente este domínio

vem ligado a um domínio LRR no N-terminal, formando as proteínas NBARC-LRR, este grupo em *Arabidopsis* tem a função de reconhecer elicitores de patógenos de modo indireto. Ainda podem ser observadas proteínas NBARC-LRR-TIR, que são aquelas que possuem um domínio adicional TIR no C-terminal (MUCYN, 2006).

Mucyn (2006) verificou que a imunidade do tomate (*Solanum lycopersicum*) contra *Pseudomonas syringae* depende de proteínas quinase Pto que são responsáveis pelo reconhecimento do elicitador e que para realizar as corretas ligações Pto deve estar associada ao domínio NBARC-LRR para seu funcionamento sendo este processo conhecido como reconhecimento indireto de elicitador através de co-fatores quisase.

A sequência escolhida para representar este domínio foi uma NRR-NBARC, identificada como CL5.CONTIG3_ALL, possuindo 4469 aminoácidos. O banco NR mostrou similaridade desta sequência com proteína hipotética de resistência a doenças RGA4-like de *Brachypodium distachyon* (e-value 0.0, score 1218), o banco NT mostrou similaridade com a sequência completa do cromossomo 12 de *Oryza sativa*, cultivar japônica (e-value 3.00e-35, score 159). O Swissprot retornou similaridade com uma proteína de resistência a doenças RGA2 de *Solanum bulbocastanum* (e-value 3.00e-72, score 271). O KO definiu sua função como DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1 (e-value 1.00e-86, score 320), e o COG e GO não apresentaram função ou localização para esta sequência.

Pelos resultados foi possível identificar a sequência como possivelmente sendo uma proteína de defesa RGA com função de supressão do crescimento.

Para este domínio não foi possível a elaboração de uma árvore filogenética porque não haviam suficientes sequências similares a esta no banco de dados PRGdb.

4.8 Domínio de proteínas de resistência TIR

O domínio TIR (Toll–interleukin 1 receptor) esta presente em uma das duas grandes classes de proteínas R a TIR-NBS-LRR ou (TNL) e é bem conservado no sistema imune de plantas, animais e insetos. Este domínio possui em média 200 aminoácidos e é usualmente parte de um multi-domínio contendo LRR no N-terminal, uma transmembrana e o domínio TIR no C-terminal dentro da célula (MEYERS, 2002).

Dangl e Jones (2006), mostram que o domínio TIR-NBR-LRR em plantas é homólogo em seu N-terminal ao domínio TIR de *Drosophila* e de mamíferos. Em *Drosophila* este domínio tem atividade anti-fúngica, e em mamíferos pode agir como um sinalizador para detecção de patógenos.

Couillault verificou em 2004 que TIR tem participação na defesa do nematóide *Caenorhabditis elegans*, contra fungos e bactérias em um experimento onde a inativação de *tir-1* provocou aumento da suscetibilidade a infecções no nematóide. Assim concluindo que este domínio conservado está envolvido na inibição do crescimento de patógenos (COUILLAULT, 2004). Dados de sequenciamento mostram que nas plantas este domínio é mais abundante em dicotiledônias e menos abundantes nas gramíneas ou capins (MEYERS, 2002). O que explica o fato de este ser um domínio pouco representado em *Urochloa decumbens*.

A sequência escolhida para representar o domínio TIR foi uma NBS-TIR-LRR, identificada como UNIGENE831_All, e que possui 3711 nucleotídeos. O banco NR mostrou similaridade com uma proteína hipotética de *Zea mays* (e-value 0.0, score 1854). O banco NT apresentou similaridade com mRNA de *Oryza sativa*, complete cds (e-value 0.0, score 2603). O GO indicou funções de resposta de defesa, e transdução de sinais, ligação de ADP e ATP e a localizou na membrana plasmática e nos plastídeos.

Pelos resultados é difícil identificar a sequência. Possivelmente trata-se de uma proteína de reconhecimento de fatores avr, como é a função de NBS-LRR.

Para este domínio não foi possível a elaboração de uma árvore filogenética porque não haviam suficientes sequências similares a esta no banco de dados PRGdb.

4.9 Domínio de proteínas de resistência Receptor-like Kinase

Os Receptor-like kinases (RLK) pertencem a grande família de genes RLK/Pelle, sabe-se que o genoma de *Arabidopsis thaliana* contém aproximadamente 600 destes genes, o que tem um papel importante no crescimento e desenvolvimento da planta e também nos mecanismos de defesa. Foi descoberto que o arroz tem o dobro desta quantidade de genes tipo RLK, o que acredita-se ter ocorrido devido as plantas ancestrais do arroz possuírem mais RLK. Ainda os RLK responsáveis por crescimento e desenvolvimento possuem poucas cópias no arroz enquanto aqueles envolvidos com a resistência apresentam muitos eventos de duplicação. Portanto hipotetiza-se que esta família gênica esteja diretamente relacionada a defesa (SHIU, 2004). *Urochloa decumbens* e *Oriza sativa* são espécies filogeneticamente próximas assim podemos entender a presença de 4 sequências deste domínio em *Urochloa decumbens*.

Para a representação deste domínio a sequência escolhida foi CL12055.Contig2_All, com 1168 nucleotídeos. No PRGdb ela apresentou similaridade com uma Receptor-like Kinase de *Oriza sativa*, com função de fosfatase. No banco NR com uma proteína hipotética de *Sorghum bicolor* (e-value 3.00e-153, score 543), no NT com uma proteína de *Zea mays* (e-value 0.0, score 1066). No banco

Swissprot retornou similaridade com uma fosfatase de *Arabidopsis thaliana* (e-value 7.00e-91, score 330), o COG a define como uma fosfatase do tipo serina-treonina (e-value 5.00e-16, score 84). No banco KO ela também aparece como fosfatase (e-value 2.00e-124, score 433), e o GO indica sua participação em fosforilação e defosforilação de proteínas, regulação e organização do meristema, e transdução de sinais, e a localiza na membrana plasmática e citoplasmática ligada a vesícula.

Pelos resultados pode-se identificar a sequência como possivelmente sendo uma proteína fosfatase similar a serina-treonina-quinase.

Para este domínio não foi possível a elaboração de uma árvore filogenética porque não haviam suficientes sequências similares a esta no banco de dados PRGdb.

5. Importância dos Domínios de Resistência a fungos

Um dos principais problemas de *Urochloa decumbens* é a sua susceptibilidade a fungos, neste trabalho pode-se observar que a espécie possui alguns domínios com característica de resistência a fungos. Como o GNK2 que apresenta resistência contra *Fusarium oxysporum* e outros fungos fitopatogênicos (MIYAKAWA, 2009). MLO que possibilita resistência a *Blumeria graminis* (KIM et al, 2002), TIR também fornece resistência a fungos (COUILLAULT, 2004). E NBS que possibilita resistência a *Magnaporthe grisea* (ZHOU, 2006) .

Entre os quatro domínios aqui mencionados, o que esteve em maior quantidade foi o NBS. Sozinho ou acompanhado de outros domínios, NBS esteve presente em terceira maior quantidade do total de genes de resistência em *Urochloa decumbens*, como pode ser visto na Figura 2.

Esta informação serve como uma base para busca de genes específicos contra fungos fitopatogênicos. Já que eles se encontram presentes na espécie, uma possibilidade para estudos futuros seria o aumento da expressão destes domínios, para verificar se a resistência contra fungos aumentaria proporcionalmente.

6. CONCLUSÃO

Das 164.920 sequências transcritas pela planta *Urochloa decumbens* foi possível encontrar 2.445 sequências referentes a genes de resistência em plantas através da comparação com o banco PRGdb. Dos 2.445 genes, 1.221 eram diferentes entre si.

O domínio de proteínas de resistência mais abundante foi Serina-Treonina-Quinase. O segundo e terceiro domínios mais abundantes foram: NBS-LRR e Serina-Treonina-Quinase – LRR, respectivamente. Os domínios que foram menos observados nesse trabalho foram NBARC, com uma sequência, NBS-TIR-LRR também com uma sequência e Receptor Like Kinase com 4 sequências. .

As árvores filogenéticas possibilitaram verificar a homologia dos genes R de *Urochloa decumbens* e dos genes R de outras espécies.

Este trabalho trouxe informações inéditas sobre genes e domínios de resistência em *Urochloa decumbens* cv Basilisk, e espera-se que os resultados possam auxiliar em programas de melhoramento deste cultivar e de outras gramíneas.

7. REFERÊNCIAS

- ABIEC. **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes**. Disponível em: http://www.abiec.com.br/3_pecuaria.asp Acesso em 20 de jan, 2014.
- AHERN, K.; RAJAGOPAL, I. *Biochemistry Free and Easy*. **Oregon Staté University**, 2013. Disponível em: <http://biochem.science.oregonstaté.edu/biochemistry-free-and-easy> Acesso em 6 de maio de 2014.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v.215, n.3, p.03–10, 1990.
- ALVARENGA, S.M.; CAIXETA, E.T.; ZAMBOLIM, E.M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N.S. *Categorização Funcional de Sequências Expressas Envolvidas na Defesa do Cafeeiro a Doenças*. **EMBRAPA**. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/43405/1/Catégorizacáo-funcional.pdf>. Acesso em 23 de fev de 2014.
- ATKINSON, N. J; URWIN, P. E. The Interaction of Plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 10, 2012.
- AUSUBEL, F. M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? **Nature Immunology**, v. 6, p. 973 – 979, 2005. Disponível em: <http://www.nature.com/ni/journal/v6/n10/abs/ni1253.html> Acesso em 3 de março de 2014.
- BAIROCH, A.; APWEILER, R. The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL. Oxford Journals, **Nucleic Acids Research**, v.25, 1996.
- BAKER, C.M.; CHITRAKAR, R.; OBULAREDD, N.; PANCHAL, S.; WILLIAMS, P.; MELLOTO, M. Molecular battles between plants and pathogenic bacteria in the phyllosphere. **Braz J. Med Bio Res**, v. 43, n.8, p. 698-704, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3041987/> Acesso em 9 de fev de 2014.
- BENSON, D.A.;CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; SAYERS, E.W. GenBank. **Nucleic Acids Res.** v.42, p.32-37, 2014
- BOTREL, M.A; NOVAES, L.P.; ALVIM, M.J. Características forrageiras de algumas gramíneas tropicais. **EMBRAPA, documentos n. 66**, 1998.
- BOYD, A.L.; RIDOUT, C.; O’SULLIVAN, D.M.; LEACH, J.E.; LEUNG, H. Plant–pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. **Trends in Genetics**, v. 29, n.4, p. 233-240, 2013.
- BÜLOW, L.; SCHINDLER, M.; CHOI, C.; HEHL, R. PathoPlant: a database on plant-pathogen interactions (<http://www.pathoplant.de/>). **In Silico Biol.** v.4, n.4, p.529, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15752070> Acesso em 10 de fev de 2014.
- CHIARI, L.; BITENCOURT, G. A. Aluminum tolerance on genotypes of signal grass. **R. Bras. Zootec.**, Viçosa , v. 40, n. 2, fev. 2011.

CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J. *Biotechnology*. **Academic cell**, 2012.

COUILLAULT, C.; PUJOL, N.; REBOUL, J.; SABATIER, L.; GUICHOU, J.; KOHARA, Y.; EWBANK, J. J. TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. **Nature Immunology**, v. 5, p. 488-494, 2004.

DELLEDONNE, M. NO news is good news for plants. **Elsevier**, 2005. Disponível em: <http://profs.sci.univr.it/~delledon/Papers/2005%20Delledonne%20COPB.pdf> Acesso em 12 de fev de 2014.

DEVOTO, A.; HARTMANN, A.; PIFFANELLI, P.; ELLIOTT, C.; SIMMONS, C.; TARAMINO, G. Molecular phylogeny and evolution of the plant-specific seven-transmembrane MLO family. **J. Mol. Evol.** v. 56, p. 77-88, 2002.

DO VALLE, C.B. Brachiaria e/ou Urochloa: Dando nome as plantas. **Dia de campo**, 2010. Disponível em: <http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/matérias/Matéria.asp?id=22378&secao=Colunas+e+Artigos> Acesso em 3 de fev, 2014.

DODDS, P.N.; RATHJEN, J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature reviews**, v. 11, 2010.

DOS SANTOS, B.F.; VILELA, M.M.; LAURA, V.A.; NEPOMUCENO, A.L.; CHIARI, L. Análise do Transcriptoma de Raízes de Plântulas de *Urochloa decumbens* Cv. Basilisk (Syn. *Brachiaria decumbens* Cv. Basilisk) em Resposta ao Alumínio. EMBRAPA Gado de Corte. Resumo apresentado no **Workshop de Melhoramento Vegetal de Culturas do Cerrado – UFGD**, maio de 2014.

EGAN, A.N.; SCHLUETER, J.; SPOONER, D.M. Applications Of Next-Generation Sequencing In Plant Biology. **American Journal of Botany** v. 99, n.2, p. 175–185, 2012.

FAGUNDES, J.L.; DA FONSECA, D.M.; MISTURA, C.; DE MORAIS, R.V.; TEIXEIRA VITOR, C.M.; GOMIDE, J.A. Características morfogênicas e estruturais do capim-braquiária em pastagem adubada com nitrogênio avaliadas nas quatro estações do ano. **R. Bras. Zootec**, v.35, n.1, p.21-29, 2006.

FAGUNDES, J.L.; DA FONSECA, D.M.; MISTURA, C.; DE MORAIS, R.V.; TEIXEIRA VITOR, C.M.; GOMIDE, J.A. Acúmulo de forragem em pastos de *Brachiaria decumbens* adubados com nitrogênio. **Pesq. Agropec. Bras**, v. 40, 2005.

FENYK, S.; CAMPILLO, A.; POHL, E.; HUSSEY, P. J; CANN, M. J. A Nucleotide Phosphatase Activity in the Nucleotide Binding Domain of an Orphan Resistance Protein from Rice. **J. Biol. Chem.** v. 287, n. 6, 2012. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/287/6/4023.full.pdf+html>. Acesso em 03 de jun de 2014.

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

1971. Disponível em:
<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.py.09.090171.001423?journalCode=phyto>
Acesso em 2 de fev de 2014.

FRIEDRICHSEN, D.M.; JOAZEIRO, C.A.P.; LI, J.; HUNTER, T.; CHORY, J. Brassinosteroid-Insensitive-1 Is a Ubiquitously Expressed Leucine-Rich Repeat Receptor Serine/Threonine Kinase. **Plant physiology**, vol.123, 2000.

GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. Oxford Journals, **Nucleic Acids Research**, v.32, 2003.

GLAVES, P.D.; TUGWOOD, J.D. Generation and analysis of transcriptomics data. **Methods Mol. Biol.** v.69, p. 67-85, 2011.

GURURANI, M.A.; VENKATÉSH, J.; UPADHYAYA, P.; NOOKARAJU, A.; PANDEY, S.K.; PARK, S.W. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, 2012.

HAMMOND-KOSACK, K. KANYUKA, E.K. Resistance genes (R genes) in plants. **Plant disease**, 2007. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0020119/abstract>
Acesso em 15 de fev de 2014.

HANKS, S. K.; HUNTER, T. The eukaryotic protein kinase superfamily: Kinase (catalytic) domain structure and classification. Vanderbilt University. **The Federation of American Societies for Experimental Biology**, 1995.

HUNTER, S.; APWEILER, R.; ATTWOOD, T.K.; BAIROCH, A.; BATÉMAN, A.; BINNS, D.; BORK, P.; DAS, U.; DAUGHERTY, L.; DUQUENNE, L.; FINN, R.D.; GOUGH, J.; HAFT, D.; HULO, N.; KAHN, D.; KELLY, E. InterPro: the integrative protein signature database. Oxford Journals, **Nucleic Acids Research**, v. 37, 2008.

JONES, J. D.G.; DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**, v.444, p. 323-329, 2006.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Oxford Journals, **Nucleic Acids Research**, v.28, 1999.

KARIA, C.T.; DUARTE, J.B.; GUERRA DE ARAUJO, A.C. Desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (trin.) Griseb. no Brasil. **EMBRAPA Documentos 163**, 2006.

KIM, M.C.; PANSTRUGA, R.; ELLIOTT, C.; MÜLLER, J.; DEVOTO, A.; YOON, W.H.; PARK, H.C.; CHO, M.J.; SCHULZE-LEFERT, P. Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. **Nature**, v. 416, p. 447-451, 2002.

KIM, M.C; LEE, S.H.; KIM, J.K.; CHUN, H.J.; CHOI, M.S.; CHUNG, W.S.; MOON, B.C. Mlo, a Modulator of Plant Defense and Cell Death, Is a Novel Calmodulin-binding Protein. Isolation and Characterization of a Rice Mlo Homologue. **J. Biol. Chem.** v. 277, p.19304-19314, 2002.

KRISTICH, C.J.; WELLS, C.L.; DUNNY, G.M. A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in *Enterococcus faecalis* mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence. **PNAS**, v. 104 n. 9, 2007. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/104/9/3508.full> Acesso em 26 de fev de 2014.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I.B.; MASATOSHI N. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Oxford Journals, Life Sciences & Mathematics & Physical Sciences, **Bioinformatics**, v.17, Issue 12. 2001

KUMBLE, V.; MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. Brachiaria: biology, agronomy, and improvement. 1996. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?hl=en&lr=&id=dMF6QpfVdjMC&oi=fnd&pg=PR8&dq=Brachiaria:+bioly,+agronomy+and+improvement&ots=7vWQv4929&sig=HBaU6DD8CXfS85LBDruEOASN4wQ#v=onepage&q=Brachiaria%3A%20bioly%2C%20agronomy%20and%20improvement&f=false>. Acesso em 18 de fev, 2014.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F. Clustal W and Clustal X version 2.0. Oxford Journals, Life Sciences & Mathematics & Physical Sciences, **Bioinformatics**, v.23, Issue 12. 2007.

MARCHLER-BAUER, A.; ANDERSON, J.B.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M.K.; DEWEESE-SCOTT, C.; FONG, J.H.; GEER, L.Y.; GEER, R.C.; GONZALES, N.R.; GWADZ, M.; HE, S.; HURWITZ, D.I. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. Oxford Journals, **Nucleic Acids Research**, v.37, 2008.

MEYERS, B. C.; MORGANTE, M.; MICHELMORE, R.W. TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in *Arabidopsis* and other plant genomes. **The Plant Journal**, v.32, n.1, p.77-92, 2002.

MIYAKAWA, T.; MIYAZONO, K.; SAWANO, Y.; HATANO, K.; TANOKURA, M. Crystal structure of ginkbilobin-2 with homology to the extracellular domain of plant cysteine-rich receptor-like kinases. **Proteins** v. 77, p. 247-251, 2009. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.22494/full> Acesso em 01 de junho de 2014.

MUCYN, T.; CLEMENTE, A.; ANDRIOTIS, M.; ALEXI, L.; GILES, E. D.; OLDROYD, B. J.; RATHJENA, J.P. The Tomato NBARC-LRR Protein Prf Interacts with Pto Kinase in Vivo to Regulate Specific Plant Immunity. **Plant Cell**, v. 18, 2006. Disponível em: <http://www.plantcell.org/content/18/10/2792.full.pdf+html> Acesso em 02 de jun de 2014.

NCBI RESOURCE COORDINATORS. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Oxford Journals, **Nucleic Acids Research**, v.42, 2013.

PAN, Q.; WENDEL, J.; FLUHR, R. Divergent Evolution of Plant NBS-LRR Resistance Gene

Homologues in Dicot and Cereal Genomes. **Journal of Molecular Evolution**, v.50, 2000. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s002399910023#page-2> Acesso em 10 de março de 2014.

PARNISKE, M.; HAMMOND-KOSACK, K.; GOLSTEIN, C. Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the Cf-4/9 locus of tomato. **Cell**, v.91, n.6, 1997.

PEART, J.R.; LU, R.; SADANANDOM, A.; MALCUIT, I.; MOFFETT, P.; BRICE, D. C. Ubiquitin ligase- associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 2002. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/99/16/10865.full?sid=198b8fbe-f25e-4d89-ab69-f32bdac2aa18> . Acesso em: 28 de jan. 2014.

PEREIRA, A.V; VALLE, C.B ; FERREIRA,R.; MILES, J. W. Melhoria de Forrageiras Tropicais. **EMBRAPA Documentos 163**, 2006.

PRABHA, R.; GHOSH, I.; SINGH, D.P. Plant Stress Gene Database: A Collection of Plant Genes Responding to Stress Condition (<http://www.resistvir-db.org/>). **ARNP Journal of Science and Technology** v. 1, n. 1, 2011. Disponível em: http://www.ejournalofscience.org/archive/vol1no1/vol1no1_5.pdf . Acesso em 10 de fev de 2014.

PRGdb Wiki. **Plant Resistance Gene Wiki**. Disponível em: http://prgdb.crg.eu/wiki/Main_Page acesso em: 28 de jan 2014.

PRUITT, K. D.; BROWN, G.R.; HIATT, S.M.; THIBAUD-NISSEN, F.; ASTASHYN, A.; ERMOLAEVA, O.; HART, J.; LANDRUM, M.J.; MCGARVEY, K.M. RefSeq: an update on mammalian reference sequences. Oxford Journals, **Nucleic Acids Research**, v.42, 2013.

ROSA, B.; ANDRADE REIS, R.; DE RESENDE, K.T.; DO NASCIMENTO, S.; JOBIM, C.C. Valor Nutritivo do Feno de *Brachiaria decumbens* Stapf cv. Basilisk Submetido a Tratamento com Amônia Anidra ou Uréia. **R. Bras. Zootec**, v.27, n.4, p.815-822, 1998.

SANSEVERINO, W.; ERCOLANO, M.R. In silico approach to predict candidate R proteins and to define their domain architecture. PubMed: **BMC Res Notes**, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23216678> Acesso em: 28 de jan 2014

SANSEVERINO, W.; ROMA, G.; DE SIMONE, M.; FAINO, L.; MELITO, S.; STUPKA, E.; FRUSCIANTE, L.; ERCOLANO, M.R. PRGdb: A Bioinformatics Platform For Plant Resistance Gene Analysis. **Nucleic Acids Research**, Vol. 38, 2010.

SHIU, S.H.; KARLOWSKI, W. M.; PAN, R.; TZENG, Y.; MAYER, F. X.; LI, W. Comparative Analysis of the Receptor-Like Kinase Family in Arabidopsis and Rice. **The Plant Cell**, v.16, n.15, p.1220-1234, 2004.

SOOKRUKSAWONG, S.; SUN, F.; LIU, Z.; TASSANAKAJON, A. RNA-Seq analysis reveals genes associated with resistance to Taura syndrome virus (TSV) in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 41, n. 4, p. 523–533, 2013.

STRAU, T.; STRAU, A.; RÖMER, P.; MINSAVAGE, G.V.; SINGH, S.; WOLF, C.; KIM, S.; LEE, H. RNA-seq pinpoints a *Xanthomonas* TAL-effector activated resistance gene in a large-crop genome. **PNAS**, 2012. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/early/2012/11/06/1212415109.short?rss=1> Acesso em 20 de fev. 2014.

TAKKEN, F. L.W.; JOOSTEN, M. H. A. Plant Resistance Genes: Their Structure, Function, and Evolution. **European Journal of Plant Pathology**, 2000. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1026571130477#page-1> Acesso em 12 de fev de 2014.

TATUSOV, R.L.; NATALE, D.A.; GARKAVTSEV, I.V.; TATUSOVA, T.A.; SHANKAVARAM, U.M.; RAO, B.S.; KIRYUTIN, B.; GALPERIN, M. Y.; FEDOROVA, N.D.; KOONIN, E.V. The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. Oxford Journals, **Nucleic Acids Research**, v. 29, 2000.

TIPPMANN, H. Analysis for free: Comparing programs for sequence analysis. **Briefings In Bioinformatics**, v.5, n.1, p. 82–87. March 2004. Disponível em: <http://bib.oxfordjournals.org/content/5/1/82.full.pdf> Acesso em 20 de abril de 2014.

USDA- ARS. Screening and Cloning of Resistance Related Genes by Rna-Seq in Huanglongbing (HLB) Resistant and Susceptible Citrus Breeding Lines. **USDA- ARS**, 2014. Disponível em: http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?accn_no=422845 Acesso em 1 de março de 2014

VALLE, L.A.C.; ALFENAS, A.C.; BROMMONSSCHENKEL, S.H. Resistência genética no controle de doenças de plantas. *Ação Ambiental*, Viçosa, n.5, p.20-23, 1999.

VLEESHOUWERS, V.; FINKERS, D.; BUDDING, M.; VISSER, M.; JACOBS, R.; VAN BERLOO, M.; PEL, N.; CHAMPOURET, E.; BAKKER, P.; KRENEK, H.; RIETMAN, D.; JAN HUIGEN, R.; HOEKSTRA, A.; GOVERSE, B.; VOSMAN, E. SolRgene: an online database to explore disease resistance genes in tuber-bearing *Solanum* species (<http://ccbb.jnu.ac.in/stressgenes>). **BMC Plant Biology**, v.11, p.116, 2011.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet**, v.10, n.1, p. 57–63, 2010.

WHEELER D.L.; CHURCH C.H.; EDGAR, R.; FEDERHEN, S.; HELMBERG, W.; MADDEN, T.L.; PONTIUS, J.U. Database resources of the National Center for Biotechnology Information: updated. Oxford Journals, **Nucleic Acids Research**, v.32, 2003.

XU, H.; HEATH, M.C. Role of Calcium in Signal Transduction during the Hypersensitive Response Caused by Basidiospore-Derived Infection of the Cowpea Rust Fungus. **The Plant Cell**, v.10, p.

585–597, 1998. Disponível em : <http://www.plantcell.org/content/10/4/585.full.pdf>. Acesso em 01 de junho de 2014.

YOUNG, T.A.; DELAGOUTTE, B.; ENDRIZZI, J.A.; FALICK, A.M.; ALBER, T. Structure of *Mycobacterium tuberculosis* PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.10, p.168 – 174, 2003.

ZHOU, B.; QU, S.; LIU, G.; DOLAN, M.; SAKAI, H.; LU, B.; BELLIZZI, M.; WANG, G. The Eight Amino-Acid Differences Within Three Leucine-Rich Repeats Between Pi2 and Piz-t Resistance Proteins Determine the Resistance Specificity to *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n.11, p. 1216-1228, 2006.