

GUSTAVO AUGUSTO MOREIRA GUIMARÃES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE DA  
EXPRESSÃO DE MEMBROS DA FAMÍLIA  
GÊNICA PR-1 EM TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Melhoramento, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2007**

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

T

G963c  
2007

Guimarães, Gustavo Augusto Moreira, 1982-  
Caracterização molecular e análise da expressão de  
membros da família gênica PR-1 em tomateiro / Gustavo  
Augusto Moreira Guimarães. – Viçosa, MG, 2007.  
x, 48f. : il. ; 29cm.

Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f.43-48.

1. Tomate - Genética. 2. Tomate - Resistência a doen-  
ças e pragas. 3. Genética molecular. 4. Regulação de  
expressão gênica. I. Universidade Federal de Viçosa. II.  
Título.

CDD 22.ed. 635.6422

GUSTAVO AUGUSTO MOREIRA GUIMARÃES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE  
MEMBROS DA FAMÍLIA GÊNICA PR-1 EM TOMATEIRO.**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Melhoramento, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

APROVADA: 20 de março de 2007.

---

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti  
(Co-orientador)

---

Prof. Wagner Campos Otoni  
(Co-orientador)

---

Prof. Fabrício de Ávila Rodrigues

---

Prof. Luciano Gomes Fietto

---

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel  
(Orientador)

Dedico  
À Deus.  
Aos meus pais e irmãos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus, por seu infinito amor e por tudo o que me concedeu.

Aos meus pais, Antônio Afonso Guimarães e Vânia Lúcia Moreira Guimarães, pelo carinho e apoio em todos os momentos. Aos meus irmãos, Léo, Lauro, João e Xande, pela amizade e apoio.

A todos meus familiares, em especial a meu padrinho tio Homero e minhas madrinhas tia Vilma e tia Mercês, pelo carinho e apoio.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste curso. À Capes e ao CNPq, pela concessão de bolsas de estudo.

Ao professor Sérgio Héminio Brommonschekel, pela orientação, confiança e amizade.

Aos professores Eduardo Seiti Gomide Mizubuti, Wagner Campos Otoni, Fabrício de Ávila Rodrigues e Luciano Gomes Fietto, pela presteza, sugestões e correções desta dissertação. Ao professor Eduardo pela realização das análises filogenéticas e ao professor Fabrício por ter cedido o Bion.

À todos do Laboratório de Genômica, André, Brunão, Bruninho, Cynthia, Douglas, Edgar, Evandro, Fernanda, Janaína, Júlio, Jamile, Léo, Lúcio, Luís, Michelle, Murilo, Reginaldo, Renata, Ricardo, Sônia, Stefânia, Tadeu e Thaís, pela amizade e apoio, e em especial à Elene (Miki), pelos ensinamentos e sobretudo pela amizade, e ao Klaus, que muito contribuiu para a realização deste trabalho.

A todos do Laboratório de Cultura de Tecidos e do Laboratório de Patologia Vegetal, pela disponibilidade e amizade construída nestes anos.

Aos professores e amigos do curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pelos momentos de convívio e de aprendizagem. À Conceição, Rita e Rose pela paciência e presteza.

Aos amigos da Agronomia 2000, em especial aos que continuaram em Viçosa e com os quais tive oportunidade de conviver por mais tempo, André, Antônio Marcos, Daniel Falkoski, Demerson, Denise, Fabiano, Flávio Lemes, Jardel, Marcelo Reis, Mário Oda, Mauro, Max Lenine, pela amizade e momentos de descontração.

Aos amigos do Programa Milho, Aurélio, Birigüi, Ciro, Fernando, Gustavo, Guta, Helder, Jéferson, Jorge, Joyce Julien, Leandro, Lucimar, Marcelo, Priscila, Rodrigo, Tiago e Zé Roberto e às amigas, Camila, Carolina, Darlene, Emília, Flávia, Kelly, Mari, Patrícia e Renata pela amizade e pelos inesquecíveis momentos de convivência.

Aos companheiros e grande amigos do Posinho (apartamentos 1532 e 1511), e das repúblicas, Luciano (Exótico), Rafael (Pará), Daniel, Klaus, Ulisses e Valdir pela amizade e apoio.

Aos demais, que contribuíram de maneira direta ou indireta, e que foram omitidos, o meu muito obrigado.

## **BIOGRAFIA**

GUSTAVO AUGUSTO MOREIRA GUIMARÃES, filho de Antônio Afonso Guimarães e Vânia Lúcia Moreira Guimarães, nasceu em 29 de março de 1982, em Sete Lagoas, Minas Gerais.

Em 1999 formou-se no curso de técnico em agropecuária da CEDAF (Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal) e em 2000 ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), graduando-se em janeiro de 2005.

Em fevereiro de 2005 iniciou o curso de mestrado em Genética e Melhoramento na UFV, sob orientação do professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel, tendo a dissertação sido aprovada em 20 de março de 2007.

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| RESUMO .....   | vii |
| ABSTRACT .....   | ix  |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 1   |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 3   |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....  | 14  |
| 3.1. Identificação e caracterização de membros da família PR-1 do<br>tomateiro por meio da pesquisa em bancos de dados do NCBI e SGN ... | 14  |
| 3.2. Análise da expressão dos membros da família PR-1 do tomateiro por<br>PCR em tempo real .....  | 15  |
| 3.2.1. Obtenção de oligonucleotídeos específicos para cada membro da<br>família PR-1 do tomateiro .....                                  | 15  |
| 3.2.2. Análise da expressão dos membros da família PR-1 em tomateiro<br>inoculado com <i>A. solani</i> .....                             | 15  |
| 3.2.3. Análise da expressão de genes PR-1 do tomateiro em resposta<br>ao tratamento com indutores químicos .....                         | 16  |
| 4. RESULTADOS .....  | 18  |
| 4.1. Identificação e caracterização de membros da família PR-1 do<br>tomateiro por meio da pesquisa em bancos de dados do NCBI e SGN ... | 18  |
| 4.2. Análise da expressão dos membros da família PR-1 do tomateiro por<br>PCR em tempo real .....  | 28  |
| 4.2.1. Obtenção de oligonucleotídeos específicos para cada membro da<br>família PR-1 do tomateiro .....                                  | 28  |
| 4.2.2. Análise da expressão dos membros da família PR-1 em tomateiro<br>inoculado com <i>A. solani</i> .....                             | 31  |
| 3.2.3. Análise da expressão de genes PR-1 do tomateiro em resposta<br>ao tratamento com indutores químicos .....                         | 35  |
| 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....  | 38  |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 43  |

## RESUMO

GUIMARÃES, Gustavo Augusto Moreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007. **Caracterização molecular e análise da expressão de membros da família gênica PR-1 em tomateiro.** Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Co-orientadores: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Wagner Campos Otoni.

As plantas resistem à infecção por patógenos utilizando defesas constitutivas e induzidas. A defesa induzida é ativada pelo reconhecimento pelas plantas de elicitores gerais e proteínas de avirulência do patógeno. Este reconhecimento leva à rápida ativação de respostas de defesa, que incluem a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR). São conhecidas 17 famílias de proteínas PR (PR-1 a PR-17) que são expressas em resposta a patógenos e ou a indutores químicos. Os genes que codificam proteínas PR-1 constituem famílias gênicas em diversas espécies vegetais. Com base na análise de seqüências depositadas em bancos de dados foram identificados sete possíveis membros da família gênica PR-1 do tomateiro, os genes: *PR-1a P4* (números de acessos: AJ011520 e M69247); *P1p14* (Y08804, M69248 e 68738); *PR1A1* (X71592); *PR1A2* (Y08844); *PR1D* (AJ001627) depositados no NCBI e as seqüências de dois unigenes depositadas no SGN, o SGN-U213451 e SGN-U220473. Os genes *PR-1a P4* e *P1p14* e os representados pelos unigenes SGN-U213451 e SGN-U220473 codificam proteínas PR-1 básicas, enquanto os genes *PR1A1*, *PR1A2* e *PR1D* codificam proteínas ácidas. O gene representado pelo unigene SGN-U213451 parece codificar a proteína P14c que apresenta atividade antimicrobiana e até o momento não está anotada nos bancos de dados. Neste trabalho, foram desenvolvidos ensaios para a detecção da expressão desses genes por PCR em tempo real em resposta à

infecção por *Alternaria solani* e a aplicação de indutores químicos. Apenas para o gene *PR1D* não foi possível obter oligonucleotídeos adequados para efetuar análises específicas de expressão por PCR em tempo real. A análise da cinética de expressão demonstrou que os genes analisados podem ser diferenciados pelo seu padrão qualitativo e quantitativo de expressão. Os genes *PR-1a*, *P4*, *P1p14*, *PR1A1* e o SGN-U213451 tiveram maior indução da expressão no terço superior de plantas inoculadas com *A. solani*; enquanto o gene *PR1A2* foi mais induzido no terço inferior destas plantas, onde a severidade da doença é maior. Já o gene representado pelo SGN-U220473 não apresentou indução após a inoculação com *A. solani*. A expressão dos genes *P1p14* e *PR1A2* foi induzida pela aplicação de benzotiadiazole (produto comercial Bion) e ácido jasmônico, respectivamente. Menores níveis de expressão dos genes foram detectados nos ensaios com indutores químicos comparativamente à indução biótica indicando que ensaios mais refinados de cinética de indução de genes *PR-1* do tomateiro em resposta a indutores químicos são necessários para estabelecer quais sinais moleculares induzem a expressão de cada membro desta família.

## ABSTRACT

GUIMARÃES, Gustavo Augusto Moreira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2007. **Molecular characterization and expression analysis of *PR-1* gene family members from tomato.** Adviser: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Co-advisers: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Wagner Campos Otoni.

The plants resist to the infection caused by pathogens using constitutive and induced defenses. The induced defense is activated by the plants when they recognize general elicitors and effector proteins. This recognition leads to the rapid activation of the defense responses, including the synthesis of Pathogenesis-related proteins - PR proteins. There are 17 known PR-protein families (PR-1 to PR-17) that are expressed in response to pathogens and/or chemical inductors. The genes that codes for PR-1 proteins share a high sequence identity and are used as markers of the systemic acquired resistance (SAR). However the biochemical function of these proteins is still unknown. Antimicrobial activities were reported only for basic PR-1 proteins. PR-1 genes are members of gene families in many plant species. Based on sequence analysis of sequences deposited in public database the following possible PR-1 gene family members from tomato plant were identified: *PR-1aP4* (accession numbers AJ011520 and M69247); *P1p14* (Y08804, M69248 and 68738); *PR1A1* (X71592); *PR1A2* (Y08844); *PR1D* (AJ001627) in the NCBI database and two unigenes sequences from the Solanaceae Genomics Network database, SGN-U213451 and SGN-U220473. The genes *PR-1aP4* and *P1p14* and the unigenes SGN-U213451 and SGN-U220473 encode basic PR-1 proteins and the genes *PR1A1*, *PR1A2* and *PR1D* encode acid proteins. The gene represented by the

unigene SGN-U213451 seems encode the P14c protein, that has a reported antimicrobial activity and until this moment is not in the databases. In this work were developed essays to detect the expression of PR-1 family members by real-time PCR. The analyzed genes can be distinguished by their quantitative and qualitative expression pattern. *PR-1aP4*, *P1p14*, *PR1A1* and the SGN-U213451 had a higher level of expression in younger leaves in response to *A. solani*; while, the gene *PR1A2* was more induced in the older leaves of these plants, where severity of the disease is greater. The gene represented by the SGN-U220473 did not show induction by *A. solani*. The *P1p14* and *PR1A2* expression was induced by benzothiadiazole (commercial product Bion) and jasmonic acid, respectively. Lower gene expression levels were obtained with chemical induction showing that more refined kinetic induction essays of PR-1 genes of the tomato plant in response to chemical inductors are needed in order to establish which specific signaling molecule is able to trigger the expression of each family member.

## 1. INTRODUÇÃO

Plantas possuem múltiplas estratégias de defesa para combater patógenos. A cutícula e compostos antimicrobianos pré-formados, presentes na superfície das plantas, e a parede celular constituem efetivas barreiras que podem prevenir a invasão de diversos patógenos. Uma vez suplantada estas barreiras, os fitopatógenos podem ser contidos no interior dos tecidos pelo sistema imune da planta. A resposta imune primária está associada ao reconhecimento de PAMPs (“Pathogen-associated Molecular Patterns”) e é referida como imunidade desencadeada por PAMP (“PAMP-triggered immunity” - PTI) (Chisholm *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006). Contudo, os patógenos desenvolveram estratégias para suprimir a PTI, interferindo nos processos de reconhecimento na membrana plasmática ou nas proteínas efetoras que são secretadas dentro do citosol da célula vegetal, alterando a sinalização ou as respostas de defesa da planta. Uma vez que os patógenos adquiriram a capacidade de suplantar as defesas primárias, as plantas desenvolveram mecanismos especializados para reconhecer os patógenos, denominado de imunidade desencadeada por efetores (“effector triggered immunity” - ETI). A ETI envolve proteínas de resistência da planta capazes de reconhecer, direta ou indiretamente, proteínas usadas pelo patógeno para suplantar a PTI (Chisholm *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006).

Vários tipos de resposta de defesa são induzidas após o reconhecimento do patógeno, entre elas a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (“Pathogenesis-related proteins”, ou proteínas PRs) (Van Loon & Van Strien, 1999). Moléculas sinalizadoras, tais como ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno estão envolvidos na ativação destas respostas induzidas a patógenos (Glazebrook, 2005).

As proteínas PRs estão distribuídas em 17 famílias, tendo sido comprovada a participação de diversas proteínas PRs na restrição de infecção provocadas por patógenos (Van Loon *et al.*, 2006). Membros da família PR-1 estão entre os genes que são mais fortemente induzidos após as plantas serem infectadas por patógenos. Em tabaco, proteínas PR-1 mostram um incremento de cerca de 10000 vezes em folhas infectadas, podendo atingir de 1 a 2% do total de proteínas da folha (Alexander *et al.*, 1993). Scheuermann (2006) verificou que entre os genes avaliados, o gene *PR-1 P1-p14* foi o que apresentou maior diferença de expressão entre o terço inferior e superior de plantas de tomateiro infectadas com *Alternaria solani*. No terço superior das plantas, onde a severidade da doença é menor, a expressão deste gene foi 5000 vezes maior que no terço inferior. Estes dados indicam que proteínas PR-1 são importantes em processos de defesa das plantas, porém até o momento foi relatada ação antimicrobiana apenas para proteínas PR-1 básicas (Van Loon *et al.*, 2006).

Em tomateiro genes *PR-1* constituem uma família gênica, que codificam proteínas ácidas e básicas e possuem alta identidade de seqüência (Van Loon & Van Strien, 1999). A alta identidade de seqüência compartilhada por membros de uma família gênica possibilita a pesquisa em bancos de dados por novos membros desta família (Mayrose *et al.*, 2006). Até fevereiro de 2007 encontravam-se disponíveis no banco de dados da “Solanaceae Genomics Network” (SGN - <http://www.sgn.cornell.edu>) seqüências de 239.593 etiquetas de seqüências expressas (ESTs, “Expressed Sequence Tags”) de tomateiro agrupadas em 34.829 unigenes. Todavia, apesar do grande número de ESTs depositadas no banco do SGN, ainda não se efetuou um estudo detalhado dessas seqüências e sua comparação com seqüências de genes *PR-1* já caracterizados e depositadas no GenBank (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos a caracterização da família gênica PR-1 em tomateiro, por meio de análises de seqüências depositadas em bancos de dados, e a avaliação da cinética de expressão dos diferentes membros desta família em resposta à inoculação com *Alternaria solani* e a tratamentos com benzotriazolazole e ácido jasmônico, utilizando a técnica de PCR em tempo real.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As plantas resistem à infecção por patógenos por meio da utilização de defesas constitutivas e induzidas. A primeira linha de defesa induzida é ativada pelo reconhecimento de elicitores gerais ou PAMPs (“Pathogen-associated Molecular Patterns”), tais como a flagelina bacteriana ou fragmentos da célula vegetal resultantes de danos provocados pelo patógeno (Martin *et al.*, 2003, Chisholm *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006). Adicionalmente, as plantas desenvolveram um mecanismo de reconhecimento para detectar proteínas produzidas por raças específicas do patógeno. Estas proteínas, codificadas por genes de avirulência (*Avr*) no patógeno, também denominadas proteínas efetoras, são reconhecidas de maneira altamente específica por proteínas codificadas por genes de resistência (*R*) da planta (Martin *et al.*, 2003).

Este reconhecimento leva ao aumento rápido e transitório de agentes oxidantes, a perda de íons potássio ( $K^+$ ) e ganho de íons hidrogênio ( $H^+$ ) pelas células, a destruição de compartimentos, ao espessamento das paredes celulares e da cutícula e à síntese de proteínas relacionadas à patogênese (“Pathogenesis-related proteins”, ou proteínas PR) (Van Loon & Van Strien, 1999). Esse reconhecimento pode, ainda, levar à morte programada de células no sítio de infecção, fenômeno denominado de reação de hipersensibilidade (“Hypersensitive Response”, HR). Esta morte celular desencadeia a produção de moléculas sinalizadoras, ainda não plenamente identificadas, que induzem respostas de defesa, no sítio de infecção (“Local Acquired Resistance” ou LAR) ou em tecidos distantes (“Systemic Acquired Resistance” ou SAR) (Schaffrath *et al.*, 1997; Chamnonpol *et al.* 1998; Herms *et al.*, 2002).

A SAR é uma resposta de defesa de amplo espectro caracterizada pelo acúmulo de ácido salicílico (AS) e pela expressão de genes PR em tecidos distantes do sítio de infecção (Van Loon & Van Strien, 1999; Rowland & Jones, 2001; Durrant & Dong, 2004; Li *et al.*, 2004). Além dos indutores biológicos, produtos químicos sem efeito antimicrobiano direto, como o ácido salicílico (AS) e seus análogos sintéticos tais como benzotidiazole (BTH, produto comercial Bion) e ácido 2,6-dicloroisonicotínico (DCINA) podem induzir a SAR (Ward *et al.*, 1991; Schaffrath *et al.* 1997; Rauscher *et al.*, 1999; Percival, 2001; Thaler *et al.*, 2002).

Mesmo em situações em que a resistência de plantas a fitopatógenos não seguem o modelo gene-a-gene, as proteínas PRs também possuem papel determinante na resposta de defesa. Por exemplo, a resistência do tomateiro a *Alternaria solani* é uma característica quantitativa (Thirthamallappa & Lohisthaswa, 2000; Foolad *et al.*, 2002; Zang *et al.* 2003) e está associada ao nível de expressão de proteínas PRs. A expressão de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases é maior em cultivares resistentes do que em cultivares suscetíveis, uma vez que estas enzimas inibem *in vitro* o crescimento de micelo de *A. solani* é esperado que estejam diretamente associadas à resistência do tomateiro a este fungo (Lawrence *et al.*, 1996; Lawrence *et al.*, 2000). Foi verificado também, que o aumento da resistência a *A. solani* pode ser induzido em tomateiro pela aplicação de AS via água de hidropoquia, havendo também a indução da expressão de *PR1b1* (ou *P1p14*) (Spletzer & Enyedi, 1999).

As proteínas PRs foram primeiramente descritas em interações incompatíveis entre tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Sansun NN) e TMV (*Tobacco mosaic virus*) (Van Loon & Van Kammen, 1970). Por definição, proteínas PRs são proteínas expressas pela planta em situações patológicas ou relacionadas, fortemente induzidas após a infecção, particularmente quando ocorre HR, e também quando a SAR é ativada biologicamente ou quimicamente (Fritg *et al.*, 1998; Van Loon & Van Strien, 1999).

Inicialmente, as proteínas PRs foram separadas em cinco classes distintas (PR-1 a PR-5), com base em características bioquímicas e moleculares (Van Loon & Van Strien, 1999). Em 1994, Van Loon e colaboradores propuseram a reclassificação das proteínas PRs em 11

famílias (PR-1 a PR-11), de acordo com a similaridade de seqüência de aminoácidos, relação sorológica e/ou atividade enzimática ou biológica. Atualmente, as proteínas PRs estão distribuídas em 17 famílias (Fritig *et al.*, 1998; Van Loon *et al.*, 2006). De acordo com essa nova classificação, os membros dentro de uma família possuem atividades biológicas similares, mas podem diferir em outras propriedades, tais como, especificidade de substrato, propriedades físico-químicas ou localização na célula vegetal (Guzzo, 2003).

As funções biológicas de diversas proteínas pertencentes às diferentes famílias PRs já foram estabelecidas (Van Loon *et al.*, 2006) (Quadro 1). Apesar da expressão de genes PR-1 ser utilizada como marcador bioquímico da SAR, ainda não se comprovou o papel de nenhuma proteína PR-1 ácida na restrição de infecções de plantas por patógenos, enquanto que para proteínas PR-1 básicas foram relatadas atividades antimicrobianas. Niderman *et al.* (1995), avaliaram proteínas PR-1 de tabaco e de tomateiro em relação à atividade contra *Phytophthora infestans*, e demonstraram que as proteínas PR-1 básicas PR-1g e P14c, de tabaco e tomateiro, respectivamente, são capazes de inibir o crescimento desse oomiceto. Também foi verificado que uma PR-1 básica induzida em feijão fava pelo tratamento com AS e DCINA possui alta atividade contra a diferenciação de estruturas de infecção (célula mãe do haustório e haustório) de *Uromyces fabae* (Rauscher *et al.*, 1999).

Quadro 1 – Famílias de proteínas relacionadas com a patogênese <sup>1</sup>.

| <b>Família</b> | <b>Membro típico</b>          | <b>Função Bioquímica</b>          |
|----------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| PR-1           | PR-1a (tabaco)                | desconhecida*                     |
| PR-2           | PR-2 (tabaco)                 | $\beta$ -1,3-glucanase            |
| PR-3           | P, Q (tabaco)                 | quitinase tipos I,II, IV,V,VI,VII |
| PR-4           | 'R' (tabaco)                  | quitinase tipos I,II              |
| PR-5           | S (tabaco)                    | "taumatina-like"                  |
| PR-6           | Inibidor I (tabaco)           | inibidor de proteinase            |
| PR-7           | P <sub>69</sub> (tomate)      | endoproteinase                    |
| PR-8           | Quitinase (cucurbitacea)      | quitinase tipo III                |
| PR-9           | 'peroxidase' (tabaco)         | peroxidase                        |
| PR-10          | 'PR1' (salsa)                 | "ribonuclease-like"               |
| PR-11          | Quitinase 'classe V' (tabaco) | quitinase, tipo I                 |
| PR-12          | Rs-AFP3 (rabanete)            | defensina                         |
| PR-13          | THI2.1(Arabidopsis)           | tionina                           |
| PR-14          | LTP4 (cevada)                 | transferência de lipídeos         |
| PR-15          | OxOa (germinina) (cevada)     | oxalato oxidase                   |
| PR-16          | OxOLP (cevada)                | "oxalato oxidase-like"            |
| PR-17          | PRp27 (tabaco)                | desconhecida                      |

<sup>1</sup> Adaptado de Van Loon *et al.* (2006). \* Atividade antifúngica foi estabelecida apenas para membros básicos da família PR-1, ver referências Niderman *et al.* (1995) e Rauscher *et al.* (1999).

Em muitos casos, diferenças entre suscetibilidade e resistência estão associadas à velocidade e à magnitude da expressão de diferentes genes de defesa, como, por exemplo, aqueles que codificam proteínas PR (Van Loon *et al.*, 2006). A ativação das defesas de plantas às infecções por patógenos é um processo extremamente complexo que envolve diferentes moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição.

O ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) são as moléculas sinalizadoras normalmente associadas à resposta de defesa de plantas a patógenos (Dong, 1998; Schenk *et al.*, 2000; Rowland & Jones, 2001; Singh *et al.*, 2002; Bostock, 2005; Glazebrook, 2005; Journot-Catalino *et al.*, 2006; Van Loon *et al.*, 2006). Fatores de transcrição, como ERF ("ethylene-responsive element binding factors"), WRKY, TGAs entre outros, estão associados à ativação da transcrição de genes relacionados com as respostas de defesa de plantas a patógenos. Esses fatores de transcrição se ligam a *cis*-elementos específicos presentes nas regiões promotoras de

genes que codificam proteínas PR, estimulando ou reprimindo a transcrição (Singh *et al.*, 2002).

A importância do AS na ativação da expressão de genes relacionados com respostas de defesa e com o estabelecimento da SAR foi demonstrada por meio da análise de plantas transformadas com o gene *nahG* e em diferentes mutantes. O gene *nahG* codifica a enzima salicilato hidroxilase responsável pela conversão de AS em catecol, prevenindo o acúmulo de AS nos tecidos vegetais e a ativação das respostas de defesa mediadas por este sinal (Durrant & Dong, 2004). A análise de plantas mutantes, como, por exemplo: *npr1* (“non-expressor of PR genes”; também conhecido como *nim1*, “noninducible immunity” e *sai1*, “SA insensivite”); *sid1/eds5* (“SA-induction deficient”/“enhanced disease susceptibility”), *cim* (“constitutive immunity”), e *cpr* (“constitutive expressor of PR genes”), entre outros, também revelou a importância de AS nessas respostas de defesa (Bostock, 2005).

Plantas mutantes *npr1* não são responsivas ao acúmulo de AS, não exibem SAR e nem a expressão de genes PR que são induzidos pela rota de sinalização dependente de AS (Kim & Delaney, 2002). Quando o nível de AS é baixo, monômeros de NPR1 estão associados em uma forma oligomérica, biologicamente inativa. Porém, quando o nível de AS se eleva, ocorre a dissociação dos oligômeros em monômeros devido à redução das pontes dissulfídricas que mantinham os monômeros unidos. Os monômeros ativos de NPR1 migram para o núcleo da célula, onde interagem com fatores de transcrição TAGs que são responsáveis pela ativação da expressão de genes PR-1 na rota mediada pelo AS (Glazebrook, 2005). Outro fator de transcrição, denominado WRKY70, também é requerido para a plena ativação da expressão de genes *PR-1*. A expressão de WRKY70 é induzida por AS e é dependente de NPR1, porém interações diretas entre NPR1 e WRKY70 ainda não foram relatadas. Este fator de transcrição, além de induzir a expressão de genes relacionados com a rota mediada pelo AS, também participa da repressão da expressão de genes que são induzidos pelo AJ (Li *et al.*, 2004).

Análises de plantas mutantes que são insensíveis a AJ e ET também demonstram a importância dessas moléculas na sinalização em rotas de defesa de plantas a patógenos. O mutante de arábido *bos3* (“Botrytis

susceptible”) apresenta maior suscetibilidade a *Botrytis cinerea* e a *Alternaria brassicicola*, dois patógenos necrotróficos e maior resistência aos patógenos *Peronospora parasítica* e *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. Plantas *bos3* apresentam altos níveis de expressão de *PR-1*, que é induzido por AS, e menor nível de expressão da defensina *PDF1.2*, que é marcador das respostas de defesa mediadas pelo AJ, indicando que *bos3* faz parte da rota de sinalização de resposta de defesa a patógenos necrotróficos mediada pelo AJ (Veronese *et al.*, 2004).

Plantas deficientes na percepção e resposta ao etileno, como, por exemplo, o mutante *ein3* (“ethylene insensitive 3”) também apresentam deficiências na expressão de genes de respostas de defesa. A proteína EIN3 é necessária para ativar a expressão de *erf1* (“ethylene response factor”) que codifica um fator de transcrição responsável pela ativação da expressão dos genes *PR* que codificam quitinases básicas e a defensina *PDF1.2*, que são responsivos a etileno (Solano *et al.*, 1998). A expressão de *ein3* é constitutiva, sendo o nível da proteína EIN3 regulado por processos de degradação pós-transcricional mediado por ubiquitinação. O processo bioquímico de ubiquitinação é operado por um sistema multienzimático seqüencial em que participam enzimas envolvidas na ativação (E1), na conjugação (E2) e na ligação (E3) da ubiquitina. Na etapa de ligação da ubiquitina, muitas vezes, atuam complexos SCF, compostos por quatro subunidades: “cullin”, RBX, SKP1 (ou “SKP1-like”) e uma proteína com motivos “F-box”. Este motivo “F-box” é responsável pela interação entre proteínas e recruta de forma específica substratos para o processo de ubiquitinação, através de interações físicas entre o motivo “F-box” e a subunidade SKP1. No complexo SCF envolvido na degradação de EIN3 participam as proteínas EBF1 e EBF2 (“EIN3-binding F box protein 1 e 2”) que interagem fisicamente com EIN3 levando à sua degradação. O complexo SCF<sup>EBF1/EBF2</sup> só permite o acúmulo de EIN3, e conseqüentemente de ERF1, após a percepção de ET (Potuschak *et al.*, 2003).

As diferentes rotas de sinalização de plantas envolvidas em resposta a patógenos podem interagir de maneira sinérgica ou antagônica. A ativação da rota de sinalização mediada pelo AS, muitas vezes, inibe a ativação de genes regulados por AJ; o inverso também é observado. Porém, em alguns

casos é observada a indução de genes regulados pelas duas rotas de sinalização. Na maioria das vezes, são observados efeitos sinérgicos entre as rotas mediadas pelo AJ e pelo ET (Schenk *et al.*, 2000; Kunkel & Brooks, 2002). A rota de sinalização mediada pelo AS está normalmente associada à resposta de defesa a patógenos biotróficos, enquanto que as rotas mediadas pelo AJ e/ou ET estão mais relacionadas com a resistência a patógenos necrotróficos (Glazebrook, 2005). Este fato é compreensível uma vez que a HR normalmente está associada à contenção de patógenos biotróficos ao sítio de infecção. Como já enfatizado anteriormente, a morte celular é um dos fatores que sinalizam para o acúmulo local e sistêmico de AS (Delaney, 1997; Rowland & Jones, 2001; Durrant & Dong, 2004; Lin *et al.*, 2004).

A expressão dos diferentes genes PR é dependente da rota de sinalização envolvida na indução das respostas de defesa na planta. Em *Arabidopsis* a expressão de genes *PR-1*, *PR-2* e *PR-5* são dependentes de AS e aumentam a proteção contra fungos biotróficos, enquanto que a expressão de genes *PR-3*, *PR-4* e *PR-12* é induzida por ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) e está associada à indução de resistência contra fungos necrotróficos (Van Loon & Van Strien, 1999). As rotas de sinalização também influenciam de maneira distinta a ativação da expressão de membros de uma mesma família de genes PR. Em tabaco foi demonstrado que diferentes membros de uma mesma família são diferentemente regulados por AS e por AJ/ET. Formas ácidas de *PR-1*, *PR-2*, e *PR-5* acumulam no apoplasto e são induzidas primariamente por AS, enquanto ET e/ou AJ atuam somente de forma sinérgica; já as formas básicas encontradas no vacúolo são induzidas por AJ e ET (Van Loon *et al.*, 2006). Tornero *et al.* (1997) trabalhando com plantas transgênicas de tabaco transformadas com construções em que a região promotora de genes que codificam *PR-1* do tomateiro (*PR1A2* e *PR1b1*) foi fusionada ao gene repórter GUS, verificaram a existência de diferenças no padrão de expressão de formas ácida e básica de *PR-1*. Estes autores verificaram que o promotor do gene que codifica a proteína ácida *PR1A2*, apresenta expressão constitutiva, não sendo induzido pela inoculação com TMV ou pela aplicação de AS ou ET. Já o promotor do gene que codifica a forma básica *PR1b1* (ou *P1p14*), proporcionou uma forte indução local em folhas

exibindo lesões necróticas após a inoculação com TMV, além de ser induzido por AS e por ACC (ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano), um precursor do etileno.

Na co-evolução com seus hospedeiros, os patógenos adquiriram a habilidade de manipular as rotas de respostas de defesa da planta para permitir o seu estabelecimento nos tecidos vegetais. A bactéria fitopatogênica *Pseudomonas syringae* suplanta as defesas do hospedeiro via bloqueio da rota de sinalização mediada por AS. Estirpes dessa bactéria produzem, durante o processo de infecção, a toxina coronatina. Coronatina possui estrutura molecular análoga ao metil jasmonato sendo capaz de ativar a rota de sinalização mediada pelo AJ, bloqueando a rota mediada por AS (Zhao *et al.*, 2003; Abramovitch & Martin, 2004; Normura *et al.*, 2005). Mutantes de *Arabidopsis* denominados de *coi1* (“coronatine insensitive 1”) são insensíveis a coronatina e ao AJ, e apresentam maior nível de resistência a *P. syringae*. Essa resistência está relacionada com uma maior rapidez da indução de genes *PR* dependentes de AS (Nomura *et al.*, 2005). O gene *coi1* codifica uma proteína com motivos “F-box”, que pode atuar em processos de proteólise. A proteína COI1 forma o complexo SCF<sup>COI1</sup> com as proteínas “cullin”, Skp1-like e AtRbx1, este complexo participa da degradação de proteínas dependentes de ubiquitina, regulando, desse modo, a abundância de proteínas que controlam a expressão de genes regulados por AJ (Zhao *et al.*, 2003; Glazebrook, 2005).

As rotas de sinalização ativadas em respostas de defesa de plantas a fitopatógenos também interagem com rotas de sinalização ativadas por estresses abióticos. Por exemplo, os fatores de transcrição AtMYC2 e ERF1 estão envolvidos tanto em resposta a patógenos como a ferimento. Plantas de *Arabidopsis* mutantes para o gene *jin1*, que codifica para o fator de transcrição AtMYC2, são insensíveis a AJ, porém são mais resistentes a patógenos necrotróficos (*B. cinerea* e *Plectosphaerella cucumerina*) e apresentam expressão constitutiva dos genes *PR-4* e *PDF1.2*, que são regulados positivamente pela interação entre AJ e ET através de ERF1. Esses resultados indicam que AtMYC2 atua como repressor da rota de sinalização dependente de AJ. Em contraste, plantas *jin1* apresentam inibição da expressão de genes (*VSP2*, *VOX3* e *TAT*) relacionados com

resposta a ferimento e que são induzidos normalmente por AJ. A expressão destes mesmos genes é negativamente regulada por ET, sendo reprimida por ERF1 (Lorenzo *et al.*, 2004). Este exemplo demonstra a complexidade de interações entre rotas de sinalização relacionadas a respostas de plantas a estresses bióticos e abióticos.

A expressão de genes que codificam proteínas PR também pode ser influenciada pela quantidade de açúcares nos tecidos vegetais. A infecção de plantas por patógenos além de induzir respostas de defesa também modifica o metabolismo de carboidratos da planta. Por um lado, o patógeno tenta manipular o metabolismo de carboidratos da planta em seu benefício; do outro lado, a planta reorganiza o fluxo de carbono para garantir o combate ao patógeno (Berger *et al.*, 2004). A sacarose é o principal açúcar transportado em várias espécies vegetais; sua hidrólise em glicose e frutose é catalisada por invertases. Vários estudos demonstram que em interações entre plantas e patógenos, além da indução da transcrição de genes que codificam proteínas PR, também ocorre aumento na atividade de invertases extracelulares. Essa elevada atividade da invertase nesses casos pode satisfazer o aumento da demanda por carboidratos como fonte de energia para os tecidos invadidos pelo patógeno, uma vez que a ativação das cascatas de defesa demanda energia adicional (Roitsch *et al.*, 2003). Herbers e colaboradores (2000) observaram que o acúmulo de açúcares nas folhas de tabaco após a infecção por PVY (*potato virus Y*) é acompanhado da indução da expressão de invertases e de genes que codificam proteínas PR. O fato de invertases extracelulares serem induzidas por açúcares leva ao estabelecimento de uma possível resposta positiva, em que a indução de invertases após a infecção por patógenos levaria ao aumento da concentração de açúcares nos tecidos que, por sua vez, pode ser responsável pela indução da própria invertase e de genes *PR* (Roitsch, 1999; Roitsch *et al.*, 2003).

Muitos genes que codificam proteínas PR são expressos em diferentes tecidos de plantas saudáveis, sugerindo também uma regulação dependente do estágio de desenvolvimento da planta. Por exemplo, em soja, feijão e trevo-amarelo (*Lupinus albus*), genes que codificam proteínas PR-10 são expressos em altos níveis em raízes e folhas velhas, e em menor

nível em folhas jovens (Pinto *et al.*, 2005). A expressão de PR-1 ácida em plantas saudáveis de tabaco também é maior em folhas mais velhas em comparação com folhas mais novas (Grüner & Pfitzner, 1994).

Em algumas espécies vegetais, genes *PR-1* constituem famílias gênicas, em que seus membros podem codificar proteínas de caráter ácido ou básico. No genoma de *Arabidopsis* existem 22 genes que apresentam similaridade de sequência com genes *PR-1*. Porém apenas um membro apresenta indução de expressão após a infecção por patógenos. Com o sequenciamento completo do genoma do arroz foram identificados 39 genes com seqüências similares a genes *PR-1*, muitos dos quais se encontram agrupados; no cromossomo 7, por exemplo, existe um agrupamento de 14 genes *PR-1* (Van Loon *et al.*, 2006). Em tomateiro e em tabaco genes que codificam proteínas PR-1 também constituem famílias gênicas (Van Loon & Van Strien, 1999).

Diferenças no acúmulo de formas ácidas e básicas de proteínas PR-1 do tomateiro são observadas em respostas a patógenos e à aplicação de indutores químicos (Torneró *et al.*, 1994; 1997). Os genes que codificam as proteínas ácidas PR1A1 e PR1A2 possuem expressão constitutiva em raízes e na parte aérea do tomateiro, respectivamente (Torneró *et al.*, 1994; 1997). A expressão do gene *PR1A1* na parte aérea da planta pode ser induzida pela infecção por viróides (*Citrus exocortis viroid* – CEVd) ou pela aplicação de ethephon, enquanto que para o gene *PR1A2* não foram observadas indução na expressão em plantas infectadas com TMV e tão pouco com o tratamento das plantas com precursores do etileno ou ácido salicílico (Torneró *et al.* 1994; 1997). Os genes que codificam as formas básicas P1p14 e PR-1a P4 apresentam indução na expressão em plantas tratadas com AS (Torneró *et al.*, 1997; Thaler *et al.*, 2002).

A expressão de genes que codificam proteínas PR-1 é normalmente utilizada como marcador da SAR (Van Loon *et al.*, 2006), entretanto, devido a complexidade observada na indução de membros dessa família em resposta a patógenos e a AS, conhecimentos prévios do padrão de indução destes são necessários para que sejam adequadamente utilizados neste tipo de análise. Por exemplo, a análise da expressão de genes *PR-1* em tabaco revelou que membros ácidos desta família devem ser utilizados como

marcadores da SAR, enquanto que em arábida e tomateiro é conveniente utilizar a indução da expressão de genes que codificam PR-1 básicas como marcadores da SAR, por serem induzidos por AS e em situações onde ocorrem HR (Ryals *et al.*, 1996; Laird *et al.*, 2004).

A avaliação da expressão de genes que codificam proteínas PR-1 no tomateiro é frequentemente realizada por análises de “Northern blot” ou “Western blotting” (Van Kan *et al.*, 1992; Spletzer & Eneyedi, 1999; Niderman *et al.* 1995). Todavia, a determinação do nível de RNA ou da proteína codificada por um membro específico dessa família por estas técnicas é dificultada pelas poucas diferenças na seqüência de nucleotídeos dos membros estudados da família PR-1 do tomateiro (Van Loon & Van Strien, 1999), o que pode resultar em hibridizações cruzadas (Gachon *et al.*, 2004). Por exemplo, Van Kan e colaboradores (1992) utilizando a técnica de “Northern blot” verificaram que a sonda utilizada para o gene *P6 (P1p14)*, além de hibridizar com mRNA do próprio gene *P6*, hibridizou com o mRNA do gene *P4 (PR-1a P4)*. *P1p14* e *PR-1a P4* são dois genes que codificam diferentes proteínas PR-1 básicas do tomateiro.

Ao contrário das técnicas que requerem a hibridização com sondas de ácidos nucléicos com centenas de bases, tais como microarranjos baseados em cDNA e “Northern blot”, a utilização oligonucleotídeos específicos na PCR em tempo real garante a alta especificidade na detecção da seqüência alvo, tornando esta técnica recomendada para avaliações da expressão de genes pertencentes à famílias gênicas. Em comparação com a técnica de “Northern blot”, a PCR em tempo real quando utilizada em análises de expressão de membros de famílias gênicas, é menos trabalhosa, mais acurada e permite a avaliação de genes que possuem baixo nível de expressão (Gachon *et al.*, 2004).

Embora as seqüências de genes *PR1* do tomateiro compartilhem alta identidade, nenhum estudo de análise de expressão por PCR em tempo real foi efetuado para cada membro da família PR1 do tomateiro. Estudos dessa natureza poderão contribuir no entendimento da importância do envolvimento de cada membro dessa família gênica em respostas a patógenos e qual ou quais sinais estão envolvidos na indução da expressão desses genes.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Identificação e caracterização de membros da família PR-1 do tomateiro por meio da pesquisa em bancos de dados do NCBI e SGN

Seqüências de genes que codificam diferentes proteínas PR-1 no tomateiro, foram obtidas dos bancos de dados: GenBank do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando os números de acessos de genes PR-1 do tomateiro apresentados por Van Loon e Van Strien (1999) e a ferramenta BlastN (“Basic Local Alignment Search Tool”), e do banco da “Solanaceae Genomics Network” (SGN - <http://www.sgn.cornell.edu>) empregando-se a ferramenta “research annotation” e o termo PR-1. As seqüências de nucleotídeos dos membros da família PR-1 do tomateiro foram alinhadas utilizando-se o programa *Clustal W* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

A determinação das possíveis seqüências abertas de leitura (ORFs, “Open Reading Frames”) das proteínas codificadas pelos genes identificados foi realizada com o programa *ORF finder* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html)). A árvore filogenética foi construída com as seqüências das ORFs dos membros da família PR-1 e como membro externo a seqüência da ORF do gene *pti5* de tomateiro (número de acesso no NCBI U89256.1), utilizando o programa Phylml. O ponto de clivagem do peptídeo sinal das possíveis proteínas foi determinado com o programa *PREDiction of Signal peptides* (PrediSi - [www.predisi.de/](http://www.predisi.de/)) e as possíveis localizações celulares das proteínas PR-1 pelo programa *PSORT Prediction* (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>). Os pontos isoelétricos

(PI) das proteínas maduras, excluindo-se a região do provável peptídeo sinal, foram estimados utilizando o programa *Compute pI/Mw tool* ([http://expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://expasy.org/tools/pi_tool.html)).

### **3.2. Análise da expressão dos membros da família PR-1 do tomateiro por PCR em tempo real**

#### **3.2.1. Obtenção de oligonucleotídeos específicos para cada membro da família PR-1 do tomateiro**

Pares de oligonucleotídeos específicos para cada membro da família PR-1 do tomateiro foram desenhados considerando as diferenças encontradas com o alinhamento das seqüências deduzidas de suas ORFs. Para garantir que os oligonucleotídeos desenhados fossem adequados às condições de análise de PCR em tempo real, a temperatura de anelamento e outras características dos pares de oligonucleotídeos, como a formação de “hairpin”, foram determinadas com o programa *Sequence Manipulation Suite: PCR Primer Stats* ([http://bioinformatics.org/sms2/pcr\\_primer\\_stats.html](http://bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html)).

Para verificar a existência de amplificações inespecíficas, os pares de oligonucleotídeos foram testados por meio de reação de PCR, utilizando como molde cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído de tomateiros inoculados com *A. solani*. Os produtos da reação de PCR foram analisados em gel de agarose a 3,5%. Também foram realizados testes de dissociação e de eficiência de amplificação com os pares de oligonucleotídeos que passaram no teste de amplificação inespecífica. Estes testes foram realizados de acordo com o procedimento descrito por Scheuermann (2006).

#### **3.2.2. Análise da expressão dos membros da família PR-1 em tomateiro inoculado com *A. solani***

As análises de expressão por PCR em tempo real foram realizadas utilizando o sistema *SYBR<sup>®</sup> Green PCR-Master Mix* (Applied Biosystems) e

os pares de oligonucleotídeos selecionados para ensaios específicos da expressão de genes que codificam proteínas PR-1 no tomateiro, sendo as leituras realizadas no equipamento ABI 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) no Laboratório de Genômica do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro/UFV).

As cinéticas da indução desses genes foram determinadas para os terços inferior e superior de plantas de tomateiro NC EBR-2 inoculadas com *A. solani*. As análises de expressão foram realizadas com amostras de cDNA sintetizadas por Scheuermann (2006) a partir de RNA extraídos de folhas do terço inferior (1ª e 2ª folhas) e do terço superior (4ª e 5ª folhas), de plantas com 42-45 dias após a semeadura, da linhagem de tomateiro NC EBR-2 inoculadas com uma suspensão de  $10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *A. solani* (isolado ASA 62 de tomateiro, cedido pelo laboratório de Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia/UFV) e em plantas não inoculadas (controle). Foram utilizados para as análises de PCR em tempo real, cDNAs sintetizados a partir RNA extraído de folhas às 0, 6, 12, 24, 36, 48 e 60 horas após a inoculação com o patógeno. Nestas análises, o calibrador utilizado corresponde à amostra coletada às 0 h em plantas não inoculadas. Como controle endógeno foi utilizada a expressão do gene que codifica actina do tomateiro, utilizando os oligonucleotídeos Actina-F (CGCTGACCACTTTCCGATCT) e Actina-R (TCCTCACCGTCAGCCATTT). As condições da reação e a análise dos dados obtidos na quantificação relativa do nível de expressão dos genes foram as mesmas empregadas por Scheuermann (2006).

### **3.2.3. Análise da expressão de genes PR-1 do tomateiro em resposta ao tratamento com indutores químicos**

Sementes de tomateiro da linhagem NC EBR-2 foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato Plantmax. Aos 15 dias após a semeadura as mudas foram transplantadas para vasos plásticos de dois litros de capacidade contendo como substrato mistura de solo, esterco e areia na proporção 3:1:1 (v/v).

Para avaliar a cinética da indução de genes PR-1 em respostas as rotas de sinalização mediadas por AS e AJ, plantas com 45 dias de idade foram tratadas com benzotiadiazole, produto comercial Bion 500 W (1,2 mM.L<sup>-1</sup> do princípio ativo acibenzolar-s-methyl diluído em água + 0,01% de Triton X) e ácido jasmônico (Sigma – J250; 1 mM.L<sup>-1</sup> em DMSO, água + 0,01% de Triton X). Como controles foram utilizadas plantas atomizadas somente com mistura de água + 0,01% de Triton X e de água + DMSO + 0,01% de Triton X nos ensaios com o indutor da rota do AS e do AJ, respectivamente. As 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> folhas de duas plantas controles foram coletadas às 0 e 72 horas e de duas plantas tratadas foram coletadas às 0, 12, 24, 48 e 72 horas após a aplicação dos tratamentos. As folhas coletadas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o processamento.

A extração de RNA foi feita de acordo com o protocolo proposto por Longemann *et al.* (1987) e a integridade do RNA foi avaliada em gel desnaturante de agarose 1,2%. A quantidade e a qualidade do RNA foram determinadas por leituras em espectrofotômetro. A síntese de cDNA a partir de 5 µg de RNA total obtido de cada amostra foi realizada com o kit *Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR*. Os cDNAs sintetizados foram utilizados para análise da expressão dos membros da família PR-1 de tomateiro por PCR em tempo real, utilizando os mesmos pares de oligonucleotídeos usados nos ensaios com *A. solani*. Nestas análises, o calibrador utilizado corresponde à amostra coletada das plantas controles às 0 h. As condições da reação de PCR em tempo real e a análise dos dados obtidos na quantificação relativa do nível de expressão dos genes foram as mesmas empregadas por Scheuermann (2006).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Identificação e caracterização de membros da família PR-1 do tomateiro por meio da pesquisa em bancos de dados do NCBI e SGN

Foram identificadas oito seqüências depositadas no banco de dados GenBank do NCBI anotadas como genes *PR-1* do tomateiro. Essas seqüências correspondem a todos os membros da família PR-1 do tomateiro analisados por Van Loon & Van Strien (1999), não sendo encontrada seqüência de nenhum possível novo membro da família depositada neste banco de dados. Comparações dessas seqüências por meio do algoritmo BlastN resultou em cinco seqüências únicas (Quadro 2), doravante denominadas *PR-1a P4*, *P1p14*, *PR1A1*, *PR1A2* e *PR1D*.

Quadro 2 – Seqüências depositadas no NCBI e anotadas como genes *PR-1* do tomateiro.

| Nº de acesso da seqüência    | Gene  | ORF (pb) | Referências  |
|------------------------------|---|----------|--|
| AJ011520;<br>M69247          | <i>PR -1a P4</i> ;<br><i>P4</i>               | 480      | van Kan <i>et al.</i> , 1992   |
| X68738;<br>Y08804;<br>M69248 | <i>P1p14</i> ;<br><i>Pr1b1</i> ;<br><i>P6</i> | 480      | Tornero <i>et al.</i> , 1993; Tornero <i>et al.</i> , 1997; van Kan <i>et al.</i> , 1992 |
| X71592                       | <i>PR1A1</i>                                  | 528      | Tornero <i>et al.</i> , 1994   |
| Y08844                       | <i>PR1A2</i>                                  | 507      | Tornero <i>et al.</i> , 1997   |
| AJ001627                     | <i>PR1D</i>                                   | 483      | Eugene & Dommes (não publicado)  |

Foram identificados 14 unigenes depositados no SGN anotados como *PR-1*, entretanto, comparações destes por meio do algoritmo BlastN revelou que vários unigenes são seqüências repetidas do mesmo agrupamento de ESTs. Desta forma foram selecionados somente os seguintes unigenes únicos depositados no SGN e anotados como *PR-1* do tomateiro: SGN-U212922 (também depositado sob o número de acesso SGN-U314797 e SGN-U339133); SGN-U212923 (idem SGN-U314796 e SGN-U339055); SGN-U213451 (idem SGN-U312367); SGN-220473 (idem SGN-U314863) e SGN-U232216 (idem SGN-U339116) (Quadro 3). Os unigenes depositados no SGN apesar de possuírem seqüências idênticas contêm mais de um número de acesso, o qual foi atribuído de acordo com a ordem cronológica de deposição da seqüência no banco de dados. Neste trabalho adotou-se o número de acesso relativo à primeira seqüência depositada no SGN.

As seqüências selecionadas no SGN foram comparadas com as depositadas no GenBank utilizando-se a ferramenta BlastN, através desta análise foi possível verificar que a seqüência do unigene SGN-U212923 corresponde ao gene *PR-1a P4*, o unigene SGN-U212922 corresponde ao gene *P1p14* e o unigene SGN-U232216 corresponde ao gene *PR1D*. Além disso, foram identificadas no banco SGN seqüências de dois possíveis novos membros da família *PR-1* do tomateiro representados pelos unigenes SGN-U213451 e SGN-220473.

Quadro 3 – Unigenes depositados no banco de dados da SGN - “Solanacea Genomics Network” (www.sgn.cornell.edu) e anotados como *PR-1* do tomateiro.

| Acesso SGN-U            | ORF (pb) | Nº de ESTs | Bibliotecas de cDNA que deram origem aos ESTs                   |
|-------------------------|----------|------------|---|
| 212922; 314797; 339133. | 480      | 175        | cLEC; cLER; cLES; cLET; cTOE; cTOF; cTOS; FB; FC; TUS; LB       |
| 212923; 314796; 339055. | 480      | 18         | cLEC; cLES; cTOE; cTOS; TUS                                     |
| 213451; 312367.         | 540      | 79         | cLEC; cLER; cLES; cLET; cLEW; cLEX; cLEY; cLEZ; cTOE; cTOS; TUS |
| 214259; 315428.         | 531      | 41         | cLEC; cLET; cLEX; TUS   |
| 220473; 314863.         | 441      | 7          | cLEL; cTOF  |
| 232216; 339116          | 483      | 1          | cLEX  |

Bibliotecas de cDNAs de tomateiro: cLEC – calos indiferenciados (7-10 dias após a germinação); cLEL – flores (antese, plantas de 4 a 8 semanas); cLER e cLES – folhas (4 semanas); cLET – folhas (4 - 6 semanas); cLEW – raiz (plantas de 4 a 8 semanas em diferentes condições de deficiência mineral); cLEX – raiz (durante e após a frutificação); cLEY – raiz (pré-antese a pré-frutificação); cLEZ – raiz (plântulas); cTOE – galha da coroa; cTOF – brotações; cTOS e TUS – vários cDNAs de tomateiro; FB e FC – frutos (vários estágios de desenvolvimento); LB – folhas maduras.

O alinhamento das seqüências das ORFs de todos os possíveis membros da família PR-1 do tomateiro revelou que estas compartilham entre 51,67 e 99,44% de identidade de seqüência de nucleotídeos e entre 45,14 e 97,73% da seqüência deduzida de aminoácidos a partir das ORFs. As seqüências dos unigenes selecionados no SGN como prováveis novos membros da família PR-1 do tomateiro apresentam pelo menos 75% de identidade de seqüência de nucleotídeos das ORFs deduzidas com algum gene *PR-1* do tomateiro. A seqüência de nucleotídeos da ORF deduzida a partir da seqüência do unigene SGN-U213451 possui 80,11% de identidade de seqüência com a ORF do gene *PR1A1*, enquanto que a seqüência de nucleotídeos deduzida para a ORF do unigene SGN-U220473 apresenta 76,67% de identidade com a ORF do gene *P1p14* (Quadro 4).

Quadro 4 – Porcentagem de identidade de seqüências de nucleotídeos das ORFs (diagonal inferior) e da seqüência deduzida aminoácidos (diagonal superior) dos possíveis membros da família PR-1 do tomateiro<sup>1</sup>.

|                 | P1p14 | PR-1a<br>P4 | PR1A1 | PR1A2 | PR1D  | SGN-U<br>213451 | SGN-U<br>214259 | SGN-U<br>220473 |
|-----------------|-------|-------------|-------|-------|-------|-----------------|-----------------|-----------------|
| P1p14           | -     | 96,86       | 43,07 | 81,07 | 87,50 | 57,78           | 48,60           | 72,33           |
| PR-1a<br>P4     | 96,46 | -           | 46,07 | 82,25 | 88,75 | 57,78           | 48,04           | 71,70           |
| PR1A1           | 53,16 | 53,35       | -     | 42,25 | 44,69 | 73,63           | 97,73           | 45,14           |
| PR1A2           | 85,13 | 84,90       | 54,80 | -     | 92,90 | 52,49           | 46,11           | 66,86           |
| PR1D            | 90,68 | 90,89       | 53,60 | 93,74 | -     | 53,59           | 47,22           | 72,50           |
| SGN-U<br>213451 | 56,91 | 56,72       | 80,11 | 56,10 | 55,29 | -               | 77,22           | 51,96           |
| SGN-U<br>214259 | 53,52 | 53,52       | 99,44 | 54,88 | 53,96 | 80,48           | -               | 47,73           |
| SGN-U<br>220473 | 76,67 | 75,83       | 51,61 | 71,43 | 76,40 | 51,67           | 51,98           | -               |

<sup>1</sup>A porcentagem de identidade foi determinada após o alinhamento entre as seqüências.

A seqüência de nucleotídeos do unigene SGN-U214259 possui mais de 99% de identidade com a seqüência de nucleotídeos da ORF do gene *PR1A1* (Quadro 4). A comparação mais detalhada das diferenças de nucleotídeos das seqüências dos ESTs que compõem o unigene SGN-U214259 com a seqüência do gene *PR1A1* revelou que provavelmente existam erros na seqüência depositada do gene *PR1A1* e que o gene representado pelo unigene SGN-U214259 é o próprio gene *PR1A1* (Figura 1). Apesar de existir maior número de seqüências depositadas nos bancos de dados correspondentes à seqüência do unigene SGN-U214259 designou-se o gene e a proteína por ele codificada como *PR1A1*, pelo fato do gene *PR1A1* já ter sido descrito na literatura.

|              |   |
|--------------|---|
| <i>PR1A1</i> | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TATATAAGCACAACTC--TACGGTGATCTTGA |
| SGN-U214259+ | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TATATAAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA |
| SGN-E209265+ | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TATATAAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA |
| SGN-E204085+ | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTGAT TATATAAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA |
| SGN-E290145+ | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TATATAAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA |
| SGN-E204158+ | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTGAT TATATAAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA |
| SGN-E297243+ | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TATATAAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA |
| SGN-E211716+ | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TATATAAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA |
| SGN-E390408+ | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TAAATAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA  |
| SGN-E204387+ | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TATATAAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA |
| SGN-E210791+ | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TATATAAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA |
| SGN-E211283+ | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TATATAAGCACAACTCCTTACNGTGATCTTGA |
| SGN-E211076+ | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TATATAAGCACAACTCCTTACGGGGATCTTGA |
| SGN-E213830+ | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TATATAAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA |
| SGN-E374650+ | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTTAA TATATAAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA |
| EST301288+   | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TATATAAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA |
| SGN-E302547+ | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TATATAAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA |
| EST265454+   | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TATATAAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA |
| EST532602+   | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TATATAAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA |
| SGN-E210649- | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TATATAAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA |
| SGN-E206705- | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TATATAAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA |
| SGN-E213026- | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TATATAAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA |
| consensus    | AACGTGCAATTATGATCCACCCGGTAAT TATATAAGCACAACTCCTTACGGTGATCTTGA |

Figura 1 - Alinhamento da seqüência do gene *PR1A1* (X71592) e das seqüências de ESTs que compõem o unigene SGN-U214259. Os retângulos indicam as posições onde existem diferenças de nucleotídeos entre as seqüências do gene *PR1A1* e os ESTs do unigene SGN-U214259. Este alinhamento foi realizado com o programa CAP3 (<http://deepc2.psi.iastate.edu/aat/cap/cap.htm>).

As ORFs preditas para os genes *P1p14* e *PR-1a P4* possuem 480 nucleotídeos e para os genes *PR1A2* e *PR1D* possuem 507 e 483 nucleotídeos, respectivamente (Quadros 2 e 3). Apesar da identidade compartilhada entre as seqüências de nucleotídeos das ORFs dos genes

*P1p14* e *PR-1a P4* ser maior do que a compartilhada entre as seqüências de nucleotídeos das ORFs dos genes *PR1A2* e *PR1D* (Quadro 4), os genes *PR1A2* e *PR1D* parecem ser mais relacionados do que os genes *P1p14* e *PR-1a P4* (Figura 2).

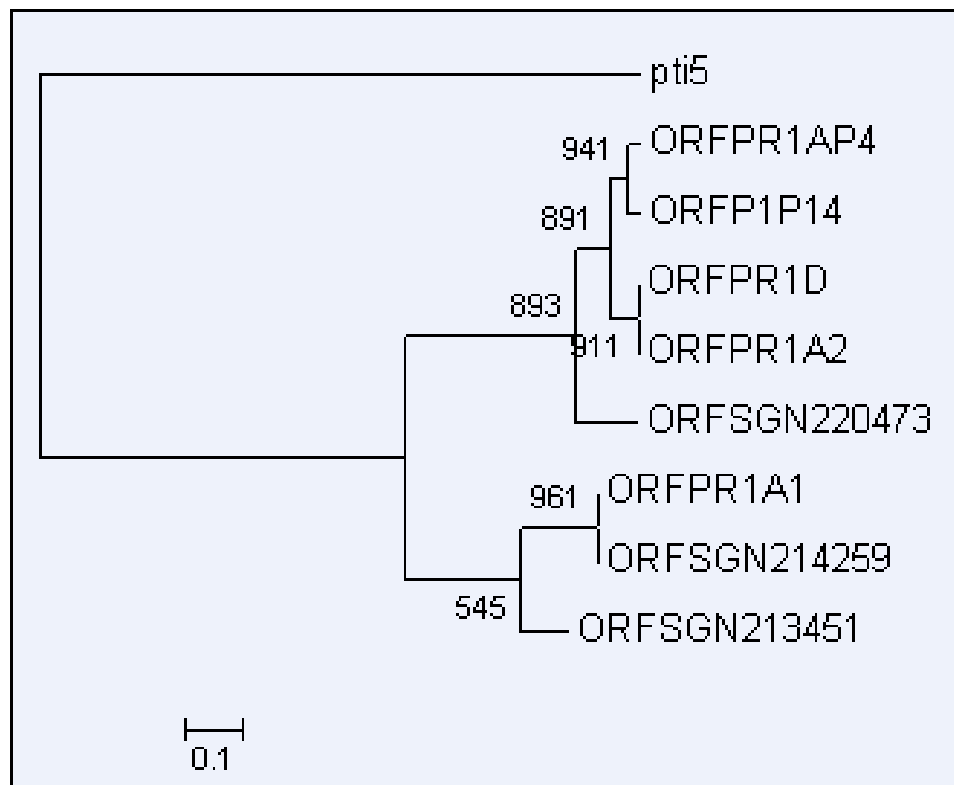


Figura 2 - Árvore filogenética das seqüências das ORFs dos possíveis membros da família PR-1 do tomateiro. Os números são valores de "bootstrap" em 1000 repetições. A seqüência da ORF do gene *pti5* de tomateiro (número de acesso no NCBI U89256.1) foi utilizada como membro externo nesta análise.

Os genes e números de acessos das seqüências dos prováveis membros da família PR-1 do tomateiro são sumarizados no Quadro 5.

Quadro 5 - Sumário dos membros da família PR-1 do tomateiro caracterizados neste trabalho.

| Genes  | Acesso NCBI*           | Unigene SGN-U* | Denominação do gene |
|--------|------------------------|----------------|---------------------|
| Gene 1 | AJ011520; M69247       | 212923         | <i>PR -1a P4</i>    |
| Gene 2 | X68738; Y08804; M69248 | 212922         | <i>P1p14</i>        |
| Gene 3 | X71592                 | 214259         | <i>PR1A1</i>        |
| Gene 4 | Y08844                 | ND             | <i>PR1A2</i>        |
| Gene 5 | AJ001627               | 232216         | <i>PR1D</i>         |
| Gene 6 | ND                     | 213451         | Neste trabalho      |
| Gene 7 | ND                     | 220473         | Neste trabalho      |

\* ND – seqüência não depositada.

O alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos revelou que todos os sete membros possuem os seis resíduos conservados de cisteínas, as quatro estruturas em  $\alpha$ -hélice e as quatro folhas  $\beta$ -pregueadas encontradas em proteínas PR-1 (Fernández *et al.*, 1997; Van Loon & Van Strien, 1999) (Figura 3). Por meio do alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas PR-1 com a seqüência parcial da proteína P14c, determinada por Niderman *et al.* (1995), foi possível verificar que o gene representado pelo SGN-U213451 provavelmente codifica a proteína P14c (Figura 4). As seqüências de nucleotídeos e de aminoácido de P14c não estão presentes no banco de dados do NCBI. As diferenças encontradas entre a seqüência de aminoácidos deduzida a partir da ORF estabelecida para o unigene SGN-U213451 e a seqüência de aminoácidos de P14c podem ser decorrentes de falhas na determinação da seqüência de P14c.

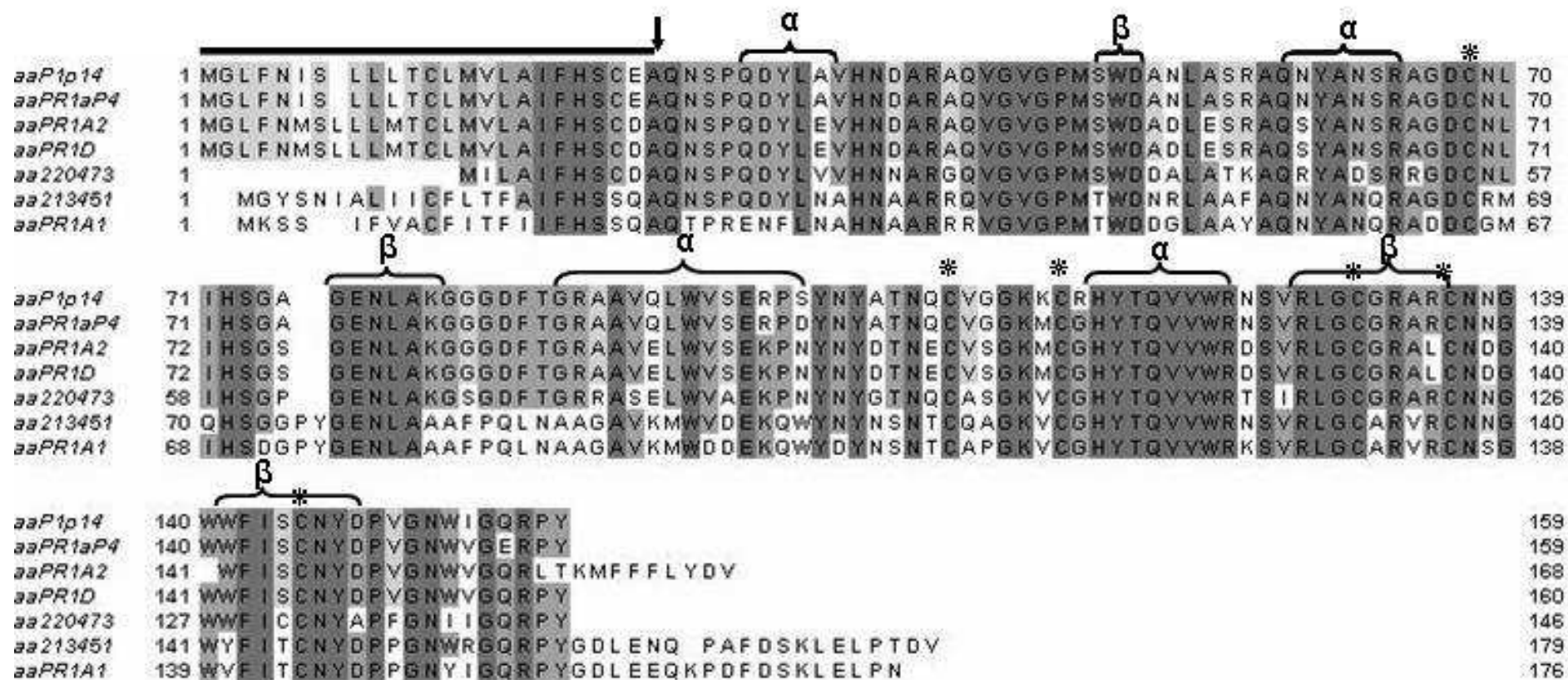


Figura 3 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos das prováveis proteínas PR-1 de tomateiro. A linha na parte superior esquerda indica a seqüência do peptídeo sinal; a seta indica o ponto de clivagem entre o peptídeo sinal e a seqüência da proteína madura; as posições das estruturas em  $\alpha$ -hélice e das folhas  $\beta$ -pregueadas são indicadas pelas chaves e as posições dos seis resíduos conservados de cisteína são indicadas pelo símbolo \*.

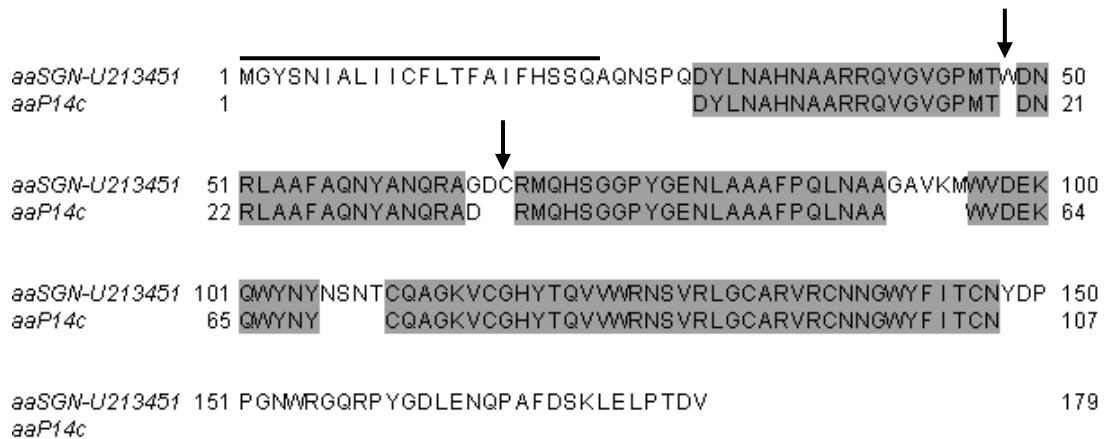


Figura 4 – Alinhamento da seqüência da proteína codificada pelo SGN-U213451 e da seqüência parcial da proteína P14c. A linha na parte superior esquerda indica a seqüência do peptídeo sinal da seqüência do SGN-U213451. As setas indicam posições em que não foram determinados os aminoácidos correspondentes na seqüência de P14c (Niderman *et al.*, 1995).

Dos sete possíveis membros da família PR-1 do tomateiro, quatro codificam proteínas ácidas e outros três proteínas básicas que podem se localizar em diferentes compartimentos da célula. Com exceção da proteína codificada pelo gene representado pelo SGN-U220473, as proteínas codificadas pelos demais membros desta família possuem um peptídeo sinal com provável endereçamento extracelular (Quadro 6).

Apesar de existirem genes desta família que codificam proteínas ácidas e outros que codificam proteínas básicas, a identidade de seqüências de aminoácidos compartilhada entre membros que codificam proteínas PR-1 com a mesma natureza (ácida ou básica) pode ser menor do que com genes que codificam proteínas de natureza diferente. Por exemplo, a identidade de seqüência de aminoácidos das proteínas PR1D (proteína ácida) e PR-1a P4 (proteína básica) é de 88,75%, enquanto que, a identidade entre as seqüências de aminoácidos entre as proteínas ácidas PR1D e PR1A1 é de apenas 44,69% (Quadro 4).

Quadro 6 – Características bioquímicas das possíveis proteínas PR-1 do tomateiro determinadas por meio de ferramentas de bioinformática.

| Proteína | PI*  | Caráter | Peptídeo sinal**          | Possíveis localizações (% de certeza da possível localização)*** |
|----------|------|---------|---------------------------|--|
| P1p14    | 9,19 | Básico  | MGLFNISLLLTCMLVLAIFHSCEA  | Extracelular (82%)   |
| PR-1a P4 | 8,29 | Básico  | MGLFNISLLLTCMLVLAIFHSCEA  | Extracelular (82%)   |
| 213451   | 8,57 | Básico  | MGYSNIALIICFLTFAIFHSSQA   | Extracelular (68%), peroxissoma (13%)                            |
| 220473   | 8,48 | Básico  | Não possui                | Estroma do cloroplasto (62%), citoplasma (45%)                   |
| PR1A2    | 5,03 | Ácido   | MGLFNMSLLLMTCLMVLAIFHSCDA | Extracelular (82%), peroxissoma (12%)                            |
| PR1D     | 5,01 | Ácido   | MGLFNMSLLLMTCLMVLAIFHSCDA | Extracelular (82%)   |
| PR1A1    | 5,89 | Ácido   | MKSSIFVACFITFIIFHSSQA     | Extracelular (77%), peroxissoma (12%)                            |

\* PI (ponto isoelétrico) teórico determinado computacionalmente através de [http://expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://expasy.org/tools/pi_tool.html); \*\* Peptídeo sinal determinado através de <http://www.predisi.de/>; \*\*\* A predição da possível localização celular da proteína foi realizada através do programa PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>).

## 4.2. Análise da expressão dos membros da família PR-1 do tomateiro por PCR em tempo real

### 4.2.1. Obtenção de oligonucleotídeos específicos para cada membro da família PR-1 do tomateiro

Por meio do alinhamento das seqüências de nucleotídeos foi possível desenhar pares de oligonucleotídeos localizados em regiões que diferenciam membros específicos da família PR-1 do tomateiro. As seqüências dos oligonucleotídeos inicialmente propostos para a realização de ensaios de expressão por PCR em tempo real são apresentadas no Quadro 7.

Quadro 7 – Oligonucleotídeos desenhados para análise de expressão por PCR em tempo real de membros da família PR-1 do tomateiro.

| Gene alvo       | Oligo   | Seqüência (5' 3')          | Amplicon (pb) |
|-----------------|---------|----------------------------|---------------|
| SGN-U 213451    | 213451F | TAACTGGAGAGGACAACGTCCATAT  | 72            |
|                 | 213451R | GGAAGTTCCAACCTTGGAATCAAAG  |               |
| SGN-U 220473    | 220473F | CCAGGGGAGAATCTTGCCAAGGGTA  | 73            |
|                 | 220473R | TCTCCGCCACCCACAATTCAGAG    |               |
| <i>P1p14</i>    | P1p14F  | CGGGCACGTTGCAACAACGGA      | 81            |
|                 | P1p14R  | GTAAGGACGTTGTCCGATCCAG     |               |
| <i>PR-1a P4</i> | PR1aP4F | CGGGCTCGTTGCAACAATGGG      | 81            |
|                 | PR1aP4R | ATAAGGACGTTCTCCAACCCAG     |               |
| <i>PR1A1</i>    | PR1A1F  | GGTAATTATATAGACAACGTCTACGG | 74            |
|                 | PR1A1R  | GGAAGCTCCAACCTTGGAATCAAAG  |               |
| <i>PR1A2</i>    | PR1A2F  | TTGCAACGACGGGTGGTTTATTTT   | 76            |
|                 | PR1A2R  | CATTTTAGTAAGACGTTGTCCGAC   |               |
| <i>PR1D</i>     | PR1DF   | TCTTTGCAACGACGGGTGGTGGT    | 78            |
|                 | PR1DR   | TAGTAAGGACGTTGTCCGACCCAA   |               |

Através dos testes de especificidade de amplificação foi verificado que os pares de oligonucleotídeos desenhados para os genes *PR1D* e SGN-U220473 produziram mais de um amplicon (Figura 5), tornando-os inadequados para as análises de expressão por PCR em tempo real.

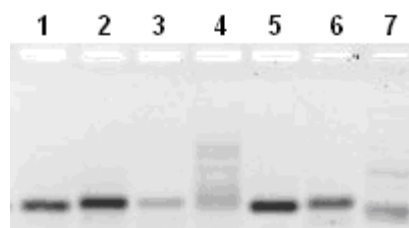


Figura 5 – Análise eletroforética da especificidade da amplificação. Nas canaletas de 1 a 7 foram analisados em gel de agarose 3,5%, os produtos de PCR realizada com os oligonucleotídeos desenhados para os genes *PR1A2*, *P1P14*, *PR1a P4*, *PR1D*, *SGN-U213451*, *PR1A1* e *SGN-U 220473*, respectivamente.

Os amplicons gerados pelos demais pares de oligonucleotídeos apresentaram apenas um pico no teste de dissociação, indicando tratar-se de amplicons únicos (exemplo, Figura 6).

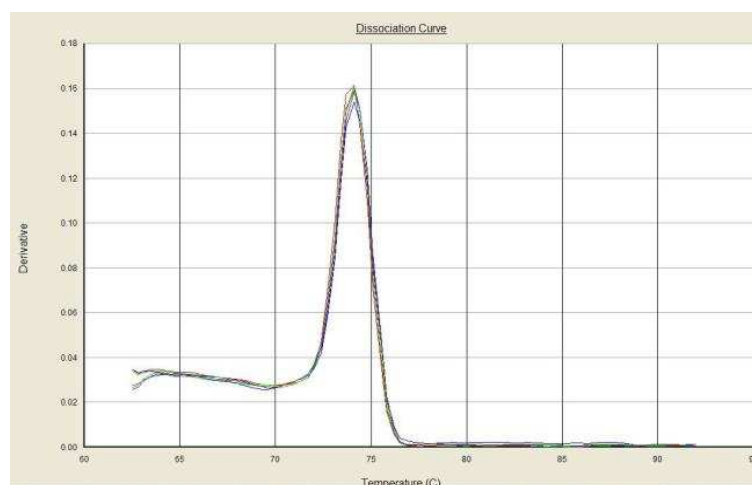


Figura 6 – Curva de dissociação do amplicon obtido pela amplificação por PCR com os oligonucleotídeos 213451F e 213451R utilizando cDNA sintetizado a partir de RNA isolado de folhas de tomateiro inoculadas com *A. solani*.

As eficiências de amplificação dos oligonucleotídeos desenhados para os genes *PR-1a P4*, *P1p14*, *PR1A2* e *SGN-U213451* foram estimadas em 100%. A eficiência de amplificação estimada para os oligonucleotídeos desenhados para o gene *PR1A1* foi baixa (79%), tornando-os inadequados para a análise de expressão por PCR em tempo real.

Devido à falta de especificidade dos pares de oligonucleotídeos desenhados para o gene *PR1D* e para o SGN-U220473 e à baixa eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos desenhados para o gene *PR1A1*, novos oligonucleotídeos foram desenhados para estes genes (Quadro 8).

Quadro 8 – Oligonucleotídeos desenhados para análise de expressão por PCR em tempo real de membros da família PR-1 do tomateiro.

| Gene alvo    | Oligo    | Seqüência (5' 3')       | Amplicon (pb) |
|--------------|----------|-------------------------|---------------|
| PR1A1        | PR1A1NF  | CGTTGCTTGTTTCATTACCTTCA | 83            |
|              | PR1A1NR  | CATTGTGAGCGTTGAGAAAATTC |               |
| SGN-U 220473 | 220473NF | TTGGGCCTATGTCTTGGGATGAT | 74            |
|              | 220473NR | GCAATCACCTCTTCTTGAGTCA  |               |
| <i>PR1D</i>  | PR1DNF   | GTAGTCTGGCGTGACTIONCAG  | 76            |
|              | PR1DNR   | TGCAAGAAATAAACCACCACC   |               |

A análise de especificidade de amplificação em gel de agarose revelou que estes novos pares de oligonucleotídeos geraram apenas um amplicon quando utilizados em reações de PCR. Os novos pares de oligonucleotídeos desenhados para os unigenes SGN-U214259 e SGN-U220473 apresentaram 100% de eficiência de amplificação e a curva de dissociação obtida a partir dos amplicons gerados com estes oligonucleotídeos possuíram apenas um pico. Todavia a curva de dissociação para o amplicon obtido com os oligonucleotídeos PR1DNF e PR1DNR revelou que os oligonucleotídeos podem formar dímeros, tornando-os inadequados para a análise de expressão do gene *PR1D* (Figura 7).

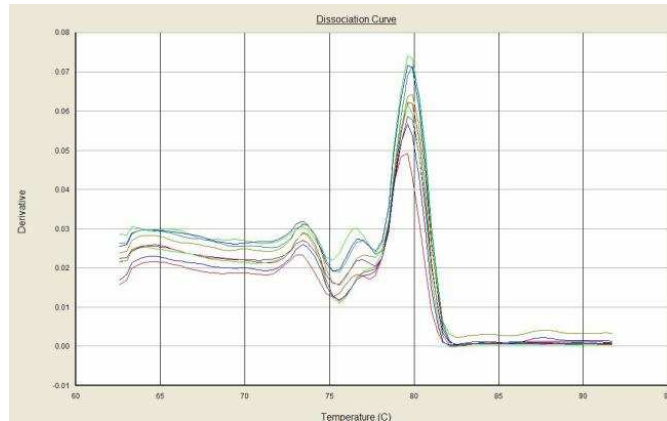


Figura 7 – Curva de dissociação do amplicon obtido pela amplificação por PCR utilizando os oligonucleotídeos PR1DNF e PR1DNR e cDNA sintetizado a partir de RNA isolado de folhas de tomateiro inoculadas com *A. solani*. A presença de múltiplos picos na curva de dissociação indica a formação de dímeros entre os oligonucleotídeos PR1DNF e PR1DNR.

#### 4.2.2. Análise da expressão dos membros da família PR-1 em tomateiro inoculado com *A. solani*

Os seis genes avaliados apresentaram diferentes cinéticas de expressão (Figura 8). Quatro genes (*P1p14*, *PR-1a P4*, SGN-U213451 e *PR1A1*) tiveram maior indução no terço superior das plantas inoculadas (painéis A-B, C-D, E-F e G-H), onde a severidade da doença é menor, enquanto que o gene *PR1A2* apresentou maior nível de indução no terço inferior das plantas inoculadas (painéis I-J) e o SGN-U220473 parece não ser induzido pela interação com o patógeno (painéis K-L).

O gene *P1p14* apresentou maior nível de expressão, cerca de 9000 vezes superior no terço superior de plantas inoculadas com *A. solani* em relação à sua expressão às 0 h, sendo cerca de 65 vezes maior do que sua indução no terço inferior destas plantas. Entre os genes que apresentaram indução da expressão após a inoculação, o gene *PR1A1* atingiu o nível máximo de expressão 24 h e foi o que apresentou menor diferença no nível de expressão entre os terços superior e inferior nas plantas inoculadas, atingindo, respectivamente, 520 e 340 vezes sua expressão em relação ao tempo 0 h. O gene representado pelo SGN-U213451, provável *P14c*, também foi mais induzido nas plantas inoculadas no terço superior em

relação ao terço inferior. O nível de expressão deste gene atingiu o máximo 36 h após a inoculação das plantas com *A. solani*, sendo observada indução relativa de 220 e 68 vezes no terço superior e inferior, respectivamente.

O gene *PR1A2* foi o único com maior nível de expressão no terço inferior das plantas inoculadas, e também o gene que apresentou menor velocidade na indução. Nesta análise, o nível de expressão deste gene atingiu o máximo 60 h após a inoculação, superando em 882 e em 22 vezes sua expressão no tempo 0 h, no terço inferior e superior, respectivamente.

O gene representado pelo SGN-U220473 apresentou menor indução após as plantas serem inoculadas com *A. solani*. Além disso, sua expressão parece não ser induzida pela interação entre a planta e o patógeno, mas por algum outro fator inerente à manipulação das plantas durante o processo de inoculação, visto que seu nível de expressão nas plantas controles e inoculadas são similares.

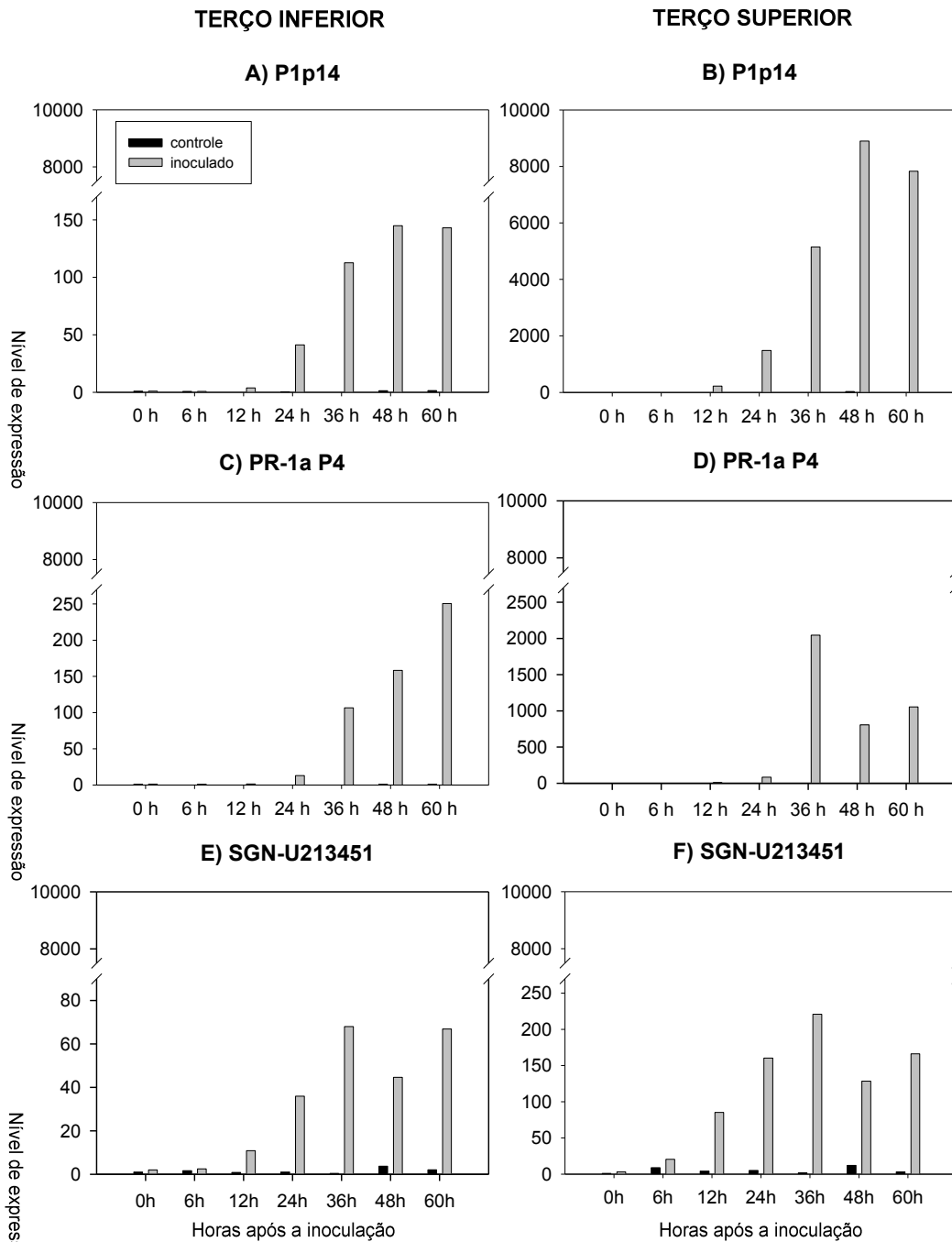


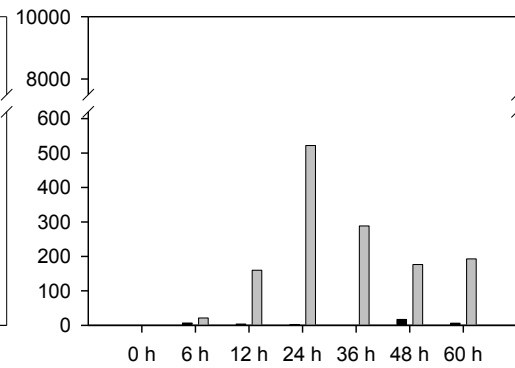
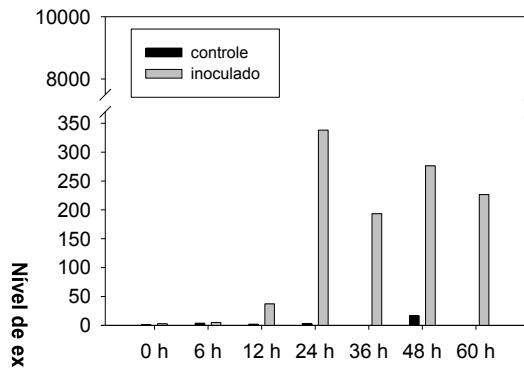
Figura 8 – Cinética de indução da expressão de membros da família PR-1 do tomateiro em resposta a infecção por *Alternaria solani*. A quantificação relativa da expressão dos genes foi calculada utilizando a equação:  $(1+E_E)^{Ct_{E_{am}} - Ct_{E_{cal}}} \times (1+E_A)^{Ct_{A_{cal}} - Ct_{A_{am}}}$ , onde: EE, eficiência de amplificação do gene endógeno; EA, eficiência de amplificação do gene alvo; Ct refere-se ao número de ciclos necessários para que a fluorescência gerada seja maior que o “background”; Ct E am, valor de Ct do gene endógeno na amostra; Ct E cal, valor de Ct do gene endógeno no calibrador; Ct A cal, valor de Ct do gene alvo no calibrador; Ct A am, valor de Ct do gene alvo na amostra. O controle endógeno foi actina e o calibrador foi controle 0 h não inoculado.

### TERÇO INFERIOR

### TERÇO SUPERIOR

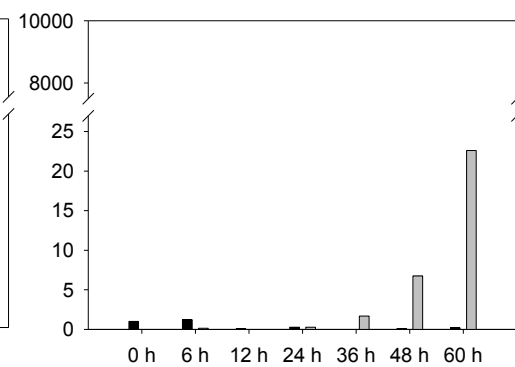
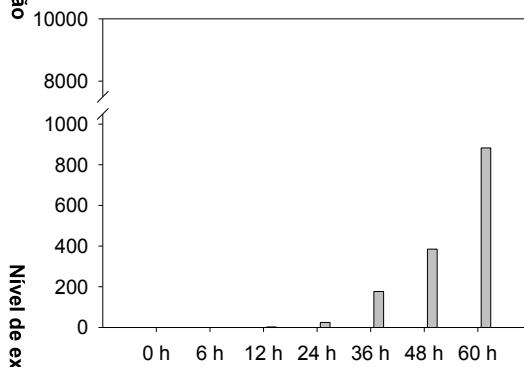
#### G) PR1A1

#### H) PR1A1



#### I) PR1A2

#### J) PR1A2



#### K) SGN-U220473

#### L) SGN-U220473

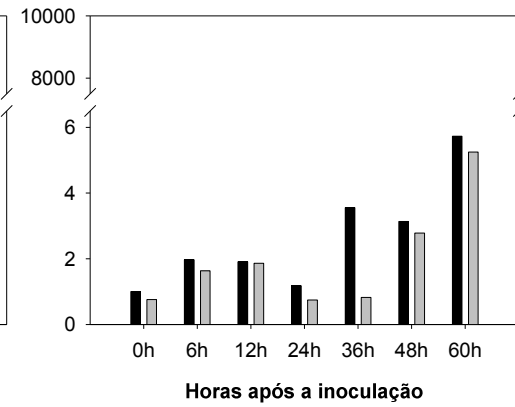
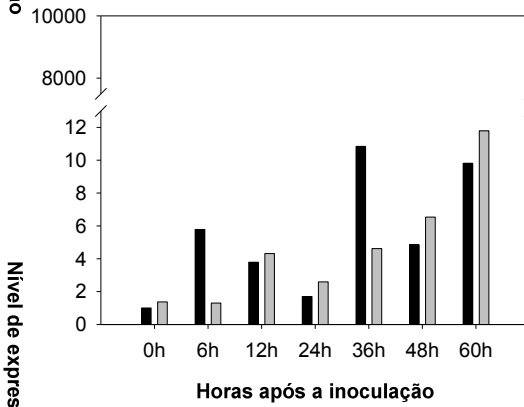


Figura 8 - Continuação

### 3.2.3. Análise da expressão de genes PR-1 do tomateiro em resposta ao tratamento com indutores químicos

Pela análise de expressão por PCR em tempo real foi possível verificar que existem diferenças no padrão de indução dos diferentes membros da família PR-1 do tomateiro em resposta à aplicação de indutores químicos (Figura 9, painéis A a L). Todavia, o nível de expressão foi muito inferior ao observado na indução com *A. solani* e a cinética de expressão não apresentou resultados consistentes durante o período avaliado.

O gene *P1p14* apresentou maior indução com a aplicação do produto comercial Bion, que possui o princípio ativo benzotiadiazole um análogo do AS, do que com a aplicação de ácido jasmônico. No tratamento das plantas com Bion o nível de expressão deste gene 72 h após a aplicação deste indutor é 44 vezes maior que seu nível de expressão no tempo 0 h em plantas não tratadas; já com a aplicação de ácido jasmônico a indução na expressão deste gene é de apenas 9 vezes (Figura 9, painéis A e B).

Os genes *PR-1a P4* e *PR1A2* e o gene representado pelo SGN-U213451 foram induzidos pelo tratamento com ácido jasmônico, sendo que o gene *PR1A2* foi o que apresentou maior nível de indução em resposta a este tratamento. O nível de expressão 24 h após a aplicação de ácido jasmônico foi de 7 e 31 vezes maior nas plantas tratadas que nas plantas controles para os genes SGN-U213451 e *PR1A2*, respectivamente (Figura 9, painéis F e J). Para o gene *PR-1a P4* o maior nível de expressão foi constatado 72 h após a aplicação de ácido jasmônico, atingindo 13 vezes o nível de expressão das plantas controles 0 h (Figura 9, painel D).

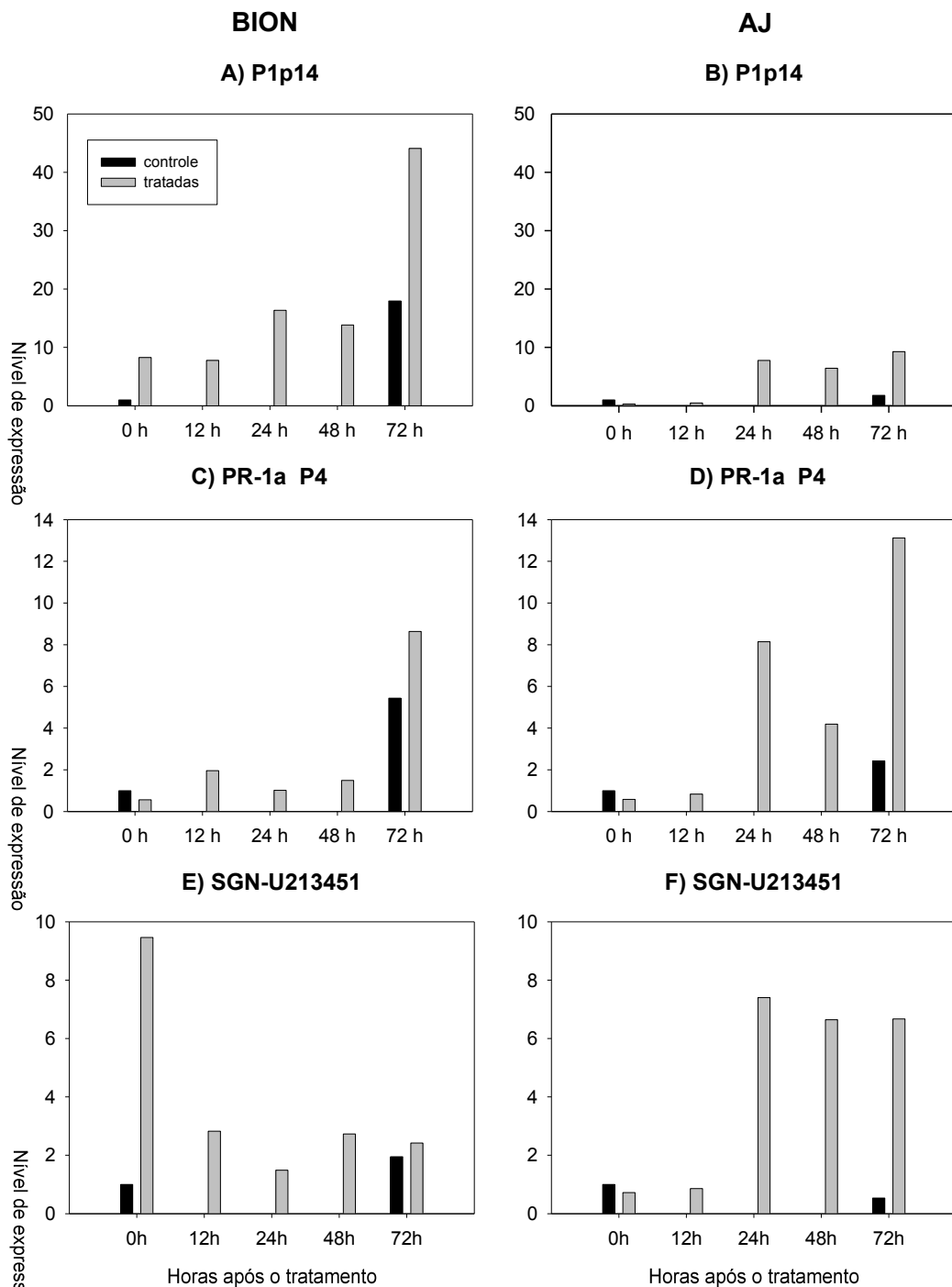


Figura 9 – Cinética de indução da expressão de membros da família PR-1 do tomateiro em resposta a tratamento com indutores químicos. A quantificação relativa da expressão foi calculada utilizando a equação  $(1+E_E)^{Ct E_{am}} - Ct E_{cal} \times (1+E_A)^{Ct A_{cal}} - Ct A_{am}$ , onde: EE, eficiência de amplificação do gene endógeno; EA, eficiência de amplificação do gene alvo; Ct refere-se ao número de ciclos necessários para que a fluorescência gerada seja maior que o “background”; Ct E am, valor de Ct do gene endógeno na amostra; Ct E cal, valor de Ct do gene endógeno no calibrador; Ct A cal, valor de Ct do gene alvo no calibrador; Ct A am, valor de Ct do gene alvo na amostra. O controle endógeno foi actina e o calibrador foi o controle 0 h não inoculado.

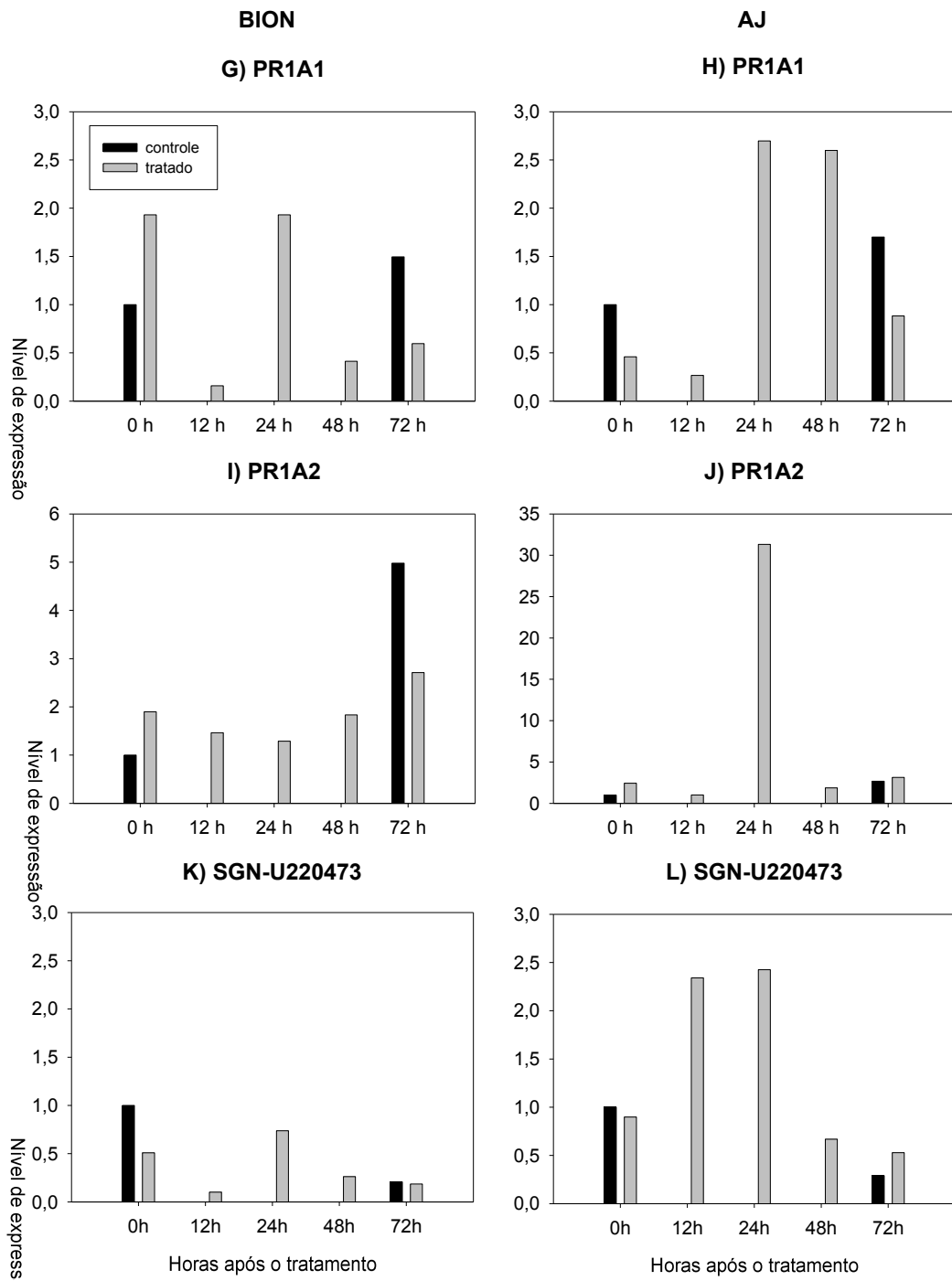


Figura 9 – Continuação

#### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Pesquisas nos bancos de dados do NCBI e da SGN possibilitaram a identificação de sete possíveis membros da família PR-1 do tomateiro: *PR-1a P4* (números de acessos: AJ011520 e M69247); *P1p14* (Y08804, M69248 e 68738); *PR1A1* (X71592); *PR1A2* (Y08844); *PR1D* (AJ001627) e os genes representado pelos unigenes SGN-U213451 e SGN-U220473. Os genes *PR-1a P4*, *P1p14*, *PR1A1* e *PR1A2* já haviam sido caracterizados como genes pertencentes à família PR-1 do tomateiro.

Apesar da seqüência de nucleotídeos do gene *PR1D* depositada no NCBI ser anotada como gene *PR-1* do tomateiro, análises de sua indução em resposta a patógenos são necessárias para confirmar essa identidade, visto que não existem relatados neste sentido na literatura e nem foi possível efetuar análises de sua expressão neste trabalho.

O gene representado pelo SGN-U213451 foi induzido em plantas de tomateiro após a inoculação com *A. solani* e é o provável gene que codifica a proteína P14c. Para a inclusão do gene representado pelo unigene SGN-U220473 na família PR-1 do tomateiro são necessários análises adicionais, uma vez que este não foi induzido pela inoculação de *A. solani*, novos ensaios em que as plantas sejam inoculadas com outros patógenos poderão revelar se este gene é induzido durante interações entre o tomateiro e algum fitopatógeno.

A proteína P14c é uma proteína PR-1 do tomateiro de caráter básico que é induzida em tomateiro inoculado com *P. infestans* e possui atividade contra este mesmo patógeno (Niderman *et al.*, 1995). A seqüência parcial de aminoácidos de P14c foi determinada (Niderman *et al.*, 1995), todavia a seqüência completa de aminoácidos desta proteína ou mesmo de

nucleotídeos do gene que a codifica não foi depositada até o momento no banco NCBI. A seqüência de aminoácidos da proteína deduzida a partir da seqüência de nucleotídeos da ORF estabelecida para o gene representado pelo SGN-U213451 apresenta elevada identidade de seqüência com a seqüência parcial de P14c, desta forma o gene representado pelo SGN-U213451 parece ser o gene que codifica a proteína P14c.

Comparações entre as seqüências também possibilitou determinar que o unigene SGN-U214259 corresponde ao gene *PR1A1* (X71592). As poucas diferenças existentes entre estas seqüências podem ser atribuídas a erros de sequenciamento ou a diferenças existentes entre alelos de diferentes cultivares do tomateiro.

Os genes *PR1A2* e *PR1D*, apesar de serem mais relacionados, compartilham menor identidade de seqüência que as ORFs dos genes *P1p14* e *PR-1a P4*. As seqüências das ORFs deduzidas para os genes *P1p14* e *PR-1a P4* apresentam 17 diferenças dentro da seqüência de 480 nucleotídeos que as compõe, já a ORF determinada para o gene *PR1A2* possui 507 nucleotídeos e apresenta quatro deleções em comparação com a região de maior identidade com a ORF do gene *PR1D*, compreendida entre o 1º e o último (483º) nucleotídeo da ORF do gene *PR1D*; isto causa o deslocamento do códon de parada da tradução na seqüência do mRNA do gene *PR1A2* tornando a proteína codificada por este gene maior que a codificada pelo gene *PR1D*. O resequenciamento destes genes é necessário para verificar se são de fato dois genes ou se existem erros nas suas seqüências depositadas nos bancos de dados. Além disso, a análise da cinética de indução desses genes poderia revelar se existem diferenças em seus padrões de expressão. Todavia, neste trabalho foi possível efetuar análises de expressão por PCR em tempo real apenas para o gene *PR1A2*.

O ponto isoelético (PI) estimado para as possíveis proteínas maduras codificadas pelos membros da família PR-1 do tomateiro está coerente com a natureza ácida ou básica das diferentes proteínas PR-1 do tomateiro já estudadas (Van Kan *et al.*, 1992; Tornero *et al.*, 1994; Niderman *et al.*, 1995; Tornero *et al.*, 1997). As possíveis localizações subcelulares destas proteínas também estão coerentes com os relatados da literatura para proteínas PR-1 do tomateiro (Van Kan *et al.*, 1992; Hong & Hwang, 2002). O gene

representado pelo SGN-U220473 foi o único gene analisado que não é induzido durante a interação tomateiro-*A. solani*. Além disso, a seqüência de aminoácidos da proteína determinada a partir de sua suposta ORF é a única que não possui a seqüência de um peptídeo de sinal de endereçamento extracelular. Caso o gene representado pelo SGN-U220473 seja membro da família PR-1, sua proteína poderá estar envolvida em processos de defesa diferentes das proteínas PR-1 que são exportadas. Entretanto, análises adicionais são necessárias para a confirmação desta hipótese.

No banco de dados do SGN as seqüências dos possíveis membros da família PR-1 são seqüências de unigenes, obtidos pelo alinhamento de etiquetas de genes expressos (ESTs – “expressed sequence tags”) em diferentes tecidos do tomateiro, em diferentes estágios de desenvolvimento ou sob diferentes condições de crescimento. Isto demonstra que membros da família PR-1 do tomateiro possuem uma pequena expressão basal em diversos tecidos sadios da planta, sendo induzidos após interações com patógenos, como *A. solani*, e pela aplicação de indutores químicos. Todavia, o padrão de expressão de cada membro da família PR-1 do tomateiro foi diferente nestas distintas situações, como pode ser constatado pela análise das bibliotecas que deram origem aos diferentes ESTs depositados e pela cinética de expressão revelada por PCR em tempo real utilizando oligonucleotídeos específicos para cada membro. As diferentes cinéticas de indução observadas fortalecem o fato de que membros que possuem alta identidade de seqüência, como os genes *P1p14* e *PR-1a P4*, são genes diferentes e comprovam a eficácia da técnica de PCR em tempo real em discriminar membros de uma família gênica.

Os genes do tomateiro que codificam proteínas PR-1 básicas e a proteína ácida PR1A1 apresentam maior nível de indução no terço superior de plantas infectadas por *A. solani*, indicando um possível papel destas proteínas no processo de resistência da planta a este patógeno. O maior nível de indução do gene *PR1A2* em folhas do terço inferior de plantas inoculadas com *A. solani*, onde a severidade da doença é maior, indica que proteína codificada por este gene pode possuir papel diferente das proteínas PR-1 básicas. Proteínas PR-1 básicas do tomateiro, em especial a proteína P14c, possuem atividade contra *P. infestans* (Niderman *et al.*, 1995).

Entretanto, ainda não foram relatadas atividades destas proteínas contra *A. solani*. Tendo em vista a maior expressão deste gene no terço superior das plantas inoculadas, é interessante fazer análises funcionais para comprovar a atividade da proteína codificada por este gene contra *A. solani*.

O gene representado pela seqüência do unigene SGN-U220473, apesar de possuir alta identidade de seqüência com genes PR-1, 76,67% de identidade de seqüência com a ORF do gene *P1p14*, não foi induzido após as plantas serem confrontadas com *A. solani*. Portanto, a sua classificação como um novo membro da família PR-1 do tomateiro depende da análise de sua expressão em resposta a inoculação com outros patógenos, pois genes *PR-1* podem ser diferencialmente induzidos por patógenos de diferentes requerimentos nutricionais. Por exemplo, o gene *PR1A2* parece ser diferencialmente induzido por patógenos biotróficos e necrotróficos. O gene repórter GUS sob o controle do promotor deste gene não apresentou indução na expressão em resposta a TMV (Tornerio *et al.*, 1997), porém no presente trabalho foi demonstrado que este gene é induzido em resposta a infecção por *A. solani*.

O nível de expressão dos genes *PR-1* em resposta à aplicação dos indutores químicos, benzotiadiazole (BTH – produto comercial Bion) e ácido jasmônico (AJ), foi muito inferior àquele observado em resposta a inoculação com *A. solani*. Somente para o gene *P1p14* no ensaio com BTH e o gene *PR1A2* no ensaio com AJ apresentaram indução superior a 30 vezes em relação à expressão observada no controle. É possível que diferentes moléculas sinalizadoras possam ser produzidas a partir da infecção da plantas pelo patógeno possibilitando a ocorrência de interações sinérgicas entre diferentes rotas de sinalização. Além disso, pode ser que a indução biológica resulte em maior nível intracelular de AS e AJ do que aquele obtido com a aplicação das concentrações de BTH e AJ empregadas neste estudo, fazendo com que a indução da expressão de genes *PR-1* seja maior na interação entre tomateiro e *A. solani* do que com o tratamento de indutores individualmente. Ward e colaboradores (1991) avaliaram a expressão de vários genes que codificam proteínas PRs em tabaco e verificaram que a expressão destes genes é maior em tabaco infectado com TMV do que em

plantas tratadas com AS, o que corrobora os resultados obtidos neste trabalho.

Em comparação com arábido, um maior número de genes *PR-1* de tomateiro responde à infecção por patógenos. Análise de expressão de 22 genes de arábido que apresentam alta identidade de seqüência com genes *PR-1* revelou que apenas um gene é induzido por patógenos (Van Loon *et al.*, 2006). Dos seis genes avaliados que constituem a família PR-1 em tomateiro cinco foram induzidos após a inoculação com *A. solani*. Para incluir o gene representado pelo SGN-U220473 e o gene *PR1D* como membros da família PR-1 do tomateiro torna-se necessária a confirmação de suas induções em resposta a patógenos, através da inoculação do tomateiro com patógenos diferentes de *A. solani* e do desenho de oligonucleotídeos específicos para o gene *PR1D* e avaliação da expressão desses genes.

A função bioquímica das proteínas PR-1 é ainda desconhecida. Existem relatos de atividades antimicrobianas para proteínas PR-1 básicas (Niderman *et al.*, 1995; Rauscher *et al.*, 1999), além disso, estudos recentes demonstram que plantas transgênicas de arábido superexpressando o gene *CABPR1* isolado de pimentão que codifica uma proteína PR1 básica, apresentam aumento de resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 e tolerância ao estresse oxidativo (Hong & Hwang, 2005).

Em síntese, com este trabalho foi possível concluir que a família PR-1 do tomateiro é constituída por pelo menos cinco genes (*PR-1a P4*, *P1p14*, *PR1A1*, *PR1A2* e SGN-U213451), e que existem depositadas em bancos de dados seqüências de dois genes (*PR1D* e SGN-U220473) que apresentam alta identidade com genes *PR-1* cuja inclusão na família PR-1 demanda a comprovação de sua indução em resposta a patógenos. Também foi possível desenvolver ensaios de análise de expressão gênica de membros específicos da família PR-1 do tomateiro por PCR em tempo real. Estes ensaios facilitarão a confirmação da superexpressão ou supressão da expressão destes genes em plantas transgênicas, facilitando estudos funcionais de membros específicos desta família gênica

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVITCH, R. B. & MARTIN, G. B. Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 356-394, 2004.

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

BERGER, S.; PAPADOPOULOS, M.; SCHREIBER, U.; KAISER, W.; ROITSCH, T. Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. **Physiologia Plantarum**, v. 122, p. 419-428, 2004.

BOSTOCK, R. M. Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 545-580, 2005.

CHAMNONPOL, S.; WILLEKENS, H.; MOEDER, W.; LANGEBARTELS, C.; SANDERMANN, H.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN CAMP, W. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 95, p. 5818-5823, 1998.

CHISHOLM, S. P.; COAKER, G.; DAY, B.; STAKAWICZ, B. J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v. 124, p. 803-814, 2006.

DELANEY, T. P. Genetic dissection of acquired resistance to disease. **Plant Physiology**, v. 113, p. 5-12, 1997.

DONG, X. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 1, p. 316-323, 1998.

DURRANT, W. E. & DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 185-209, 2004.

FOOLAD, M. R.; ZHANG, L. P.; KHAN, A. A.; NIÑO-LIU, D.; LIN, G. Y. Identification of QTLs for early blight (*Alternaria solani*) resistance in tomato using backcross populations of a *Lycopersicon esculentum* × *L. hirsutum* cross. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 945-958, 2002.

FRITIG, B.; HEITZ, T.; LEGRAND, M. Antimicrobial proteins in induced plant defense. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, p. 16-22, 1998.

FULTON, T.M.; CHUNWONGSE, J.; TANKSLEY, S.D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. **Plant Molecular Biology Reports**, v.13, p.207-209, 1995.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-Time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 402, p. 1445-1454, 2004.

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

GRÜNER, R. & PFITZNER, U. M. The upstream region of the gene the pathogenesis-related protein 1a from tobacco responds to environmental as well as to developmental signals in transgenic plants. **European Journal of Biochemistry**, v. 220, p. 247-255, 1994.

GUZZO, S. D. Proteínas relacionadas à patogênese. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 11, p. 283-330, 2003.

HERBERS, K.; TAKAHATA, Y.; MELZER, M.; MOCK, H. P.; HAJIREZAEI, M.; SONNEWALD, U. Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of Potato virus Y with tobacco. **Molecular Plant Pathology**, v. 1, p. 51-59, 2000.

HERMS, S.; SEEHAUS, K.; KOEHLE, H.; CONRATH, U. A strobilurin fungicide enhances the resistance of tobacco against Tobacco Mosaic Virus and *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Plant Physiology**, v. 130, p. 120-127, 2002.

HONG, J. K.; HWANG, B. K. Induction by pathogen, salt and drought of a basic class II chitinase mRNA and its in situ localization in pepper (*Capsicum annuum*). **Physiologia Plantarum**, v.114, p.549-558, 2002.

HONG, J. K.; HWANG, B. K. Induction of enhanced disease resistance and oxidative stress tolerance by overexpression of pepper basic PR-1 gene in Arabidopsis. **Physiologia Plantarum**, v.124, p.267-277, 2005.

INNES, R. W. Guarding the goods. New insights into central alarm system of plants. **Plant Physiology**, v. 135, p. 695-701, 2004.

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

JOURNOT-CATALINO, N.; SOMSSICH, I. E.; ROBY, D.; KROJ, T. The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, v. 18, p. 3289-3302, 2006.

KIM, H. S. & DELANEY, T. P. Arabidopsis SON1 is an F-box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, v. 14, p. 1469-1482, 2002.

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

LAIRD, J.; ARMENGAUD, P.; GIUNTINI, P.; LAVAL, V.; MILNER, J. J. Inappropriate annotation of a key marker in Arabidopsis: Will the real *PR-1* please stand up? **Planta**, v. 219, p. 1089-1092, 2004.

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

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

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

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

LORENZO, O.; CHICO, J. M.; SÁNCHEZ-SERRANO, J. J., SOLANO, R. JASMONATE-*INSENSITIVE1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense response in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 16, p. 1938-1950, 2004.

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

MAYROSE M.; EKENGREN, S. K.; MELECH-BONFIL, S.; MARTIN, G. B.; SESSA G. A novel link between tomato GRAS genes, plant disease resistance and mechanical stress response. **Molecular Plant Pathology**, v.7, p.593-604, 2006.

NIDERMAN, T.; GENETET, I.; BRUYÈRE, T.; GEES, R.; STINTZI, A.; LEGRAND, M.; FRITIG, B.; MÖSINGER, E. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal – Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. **Plant Physiology**, v. 108, p. 17-27, 1995.

NOMURA, K., MELOTTO, M., HE, S. Y. Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 361-368, 2005.

PERCIVAL, G.C. Induction of systemic acquired disease resistance in plants: potential implications for disease management in urban forestry. **Journal of Arboriculture**, v. 27, n. 4, p. 181-192, 2001.

PINTO, M. P.; RIBEIRO, A.; REGALADO, A. P.; RODRIGUES-POUSADA, C.; RICARDO, C. P. P. Expression of *Lupinus albus* PR-10 proteins during root and leaf development. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 2, p. 187-193, 2005

POTUSCHAK, T.; LECHNER, E.; PARMENTIER, Y.; YANAGISAWA, S.; GRAVA, S.; KONCZ, C.; GENSCHIK, P. EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two *Arabidopsis* F box proteins: EBF1 and EBF2. **Cell**, v. 115, p. 679-689, 2003.

RAUSCHER, M.; ÁDÁM, A. L.; WIRTZ, S.; GUGGENHEIM, R.; MENDGEN, K.; DEISING, H. B. PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. **The Plant Journal**, v. 19, n. 6, p. 625-633, 1999.

ROITSCH, T. Source-sink regulation by sugar and stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 198-206, 1999.

ROITSCH, T.; BALIBREA, M. E.; HOFMANN, M.; PROELS, R.; SINHA, A. K. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 382, p. 513-524, 2003.

ROWLAND, O. & JONES, J. D. G. Unraveling regulatory networks in plant defense using microarrays. **Genome Biology**, v. 2, 100.1-1001.3, 2001.

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

SCHAFFRATH, U.; FREYDL, E.; DUDLER, R. Evidence for different signaling pathways activated by inducers of resistance in wheat. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, n. 6, p. 779-783, 1997.

SCHENK, P. M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J. P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S. C., MANNERS, J. M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 97, n. 21, p. 11655-11660, 2000.

SCHEUERMANN, K. K. **Identificação de genes diferencialmente expressos na interação tomateiro – *Alternaria solani*. Viçosa, MG: UFV, 2006. 86p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.**

SINGH, K.B.; FOLEY, R.C.; OÑATE-SÁNCHEZ, L. Transcription factors in plant defense and stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p. 430-436, 2002.

SOLANO, R.; STEPANOVA, A.; CHAO, Q.; ECKER, J. R. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. **Genes & Development**, v. 12, p. 3703-3714, 1998.

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

THALER, J. S.; FIDANTSEF, A. L.; BOSTOCK, R. M. Antagonism between jasmonate- and salicylate-mediated induced plant resistance: effects of concentration and timing of elicitation on defense-related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 6, p. 1131-1159, 2002.

THIRTHAMALLAPPA & LOHITHASWA, H. C. Genetics of resistance to early blight (*Alternaria solani* Sorauer) in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). **Euphytica**, v. 113, p. 187–193, 2000.

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

TORNERO, P.; CONEJERO, V.; VERA, P. A gene encoding a novel isoform of the PR-1 protein family from tomato is induced upon viroid infection. **Molecular and General Genetics**, v. 243, p. 47-53, 1994.

TORNERO, P.; GADEA, J.; CONEJERO, V.; VERA, P. Two *PR-1* genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis-related gene during the hypersensitive response and development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, p. 624-634, 1997.

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

VAN LOON, L.C. & VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN'. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. **Virology**, v.40, p.199–211, 1970.

VAN LOON, L. C.; PIERPOINT, W. S.; BOLLER, T.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, p. 245-264, 1994.

VAN LOON, L. C. & VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p. 85-97, 1999.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

VERONESE, P.; CHEN, X.; BLUNHM, B.; SALMERON, J.; DIETRICH, R.; MENGISTE, T. The *BOS* loci of *Arabidopsis* are required for resistance to *Botrytis cinerea* infection. **The Plant Journal**, v. 40, p. 558-574, 2004.

WARD, E. R.; UKNES, S. J.; WILLIAMS, S. C.; DINCHER, S. S.; WIEDERHOLD, D. L.; ALEXANDER, D. C.; AHL-GOY, P.; MÉTRAUX, J. P.; RYALS, J. A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, v. 3, p. 1085-1094, 1991.

ZHANG, L. P.; LIN, G. Y.; NIÑO-LIU, D.; FOOLAD, M. R. Mapping QTLs conferring early blight (*Alternaria solani*) resistance in a *Lycopersicon esculentum* x *L. hirsutum* cross by selective genotyping. **Molecular Breeding**, v. 12, p. 3-19, 2003.

ZHAO, Y., THILMONY, R.; BENDER, C. L.; SCHALLER, A.; HE, S. Y.; HOWE, G. A. Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. **The Plant Journal**, v. 36, p. 485-499, 2003.