

CYNTHIA DE MELO ROCHA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DOIS FATORES DE  
TRANSCRIÇÃO WRKY EXPRESSOS NA INTERAÇÃO  
TOMATEIRO - *Alternaria solani*

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2005

CYNTHIA DE MELO ROCHA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DOIS FATORES DE  
TRANSCRIÇÃO WRKY EXPRESSOS NA INTERAÇÃO  
TOMATEIRO - *Alternaria solani*

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

APROVADA: 28 de Abril de 2005.

---

Prof. Francisco Murilo Zerbini Junior  
(Conselheiro)

---

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti  
(Conselheiro)

---

Prof. Marisa Vieira de Queiroz

---

Pesq. Douglas Lau

---

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel  
(Orientador)

A Deus, toda honra e toda glória

Aos meus pais Ruy e Lúcia (*in memoriam*)

A Walnir Jr.

## **AGRADECIMENTO**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do programa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel pelo respeito, confiança e orientação.

Aos professores Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Francisco Murilo Zerbini Junior pelo apoio durante a realização desse trabalho.

A professora Marisa Vieira de Queiroz e ao pesquisador Douglas Lau pelas críticas e sugestões.

Aos colegas de laboratório André, Bruno, Bruno capoeira, Edgar, Evandro, Fernanda, Francis, Gustavo, Janaína, João Paulo, Leonardo, Luana, Reginaldo, Sônia e Stefânia pelos momentos de descontração e companheirismo, em especial para Miki, Klaus e Lúcio pela experiência transmitida e por toda disponibilidade em ajudar.

Ao Luiz e Tadeu, pelo auxílio na execução desse trabalho.

A pesquisadora Rita Maria Alves Moraes por ter sido um exemplo de dedicação e amor à pesquisa, a ela também dedico esse trabalho.

Aos amigos da ABU-Pós (Aliança Bíblica Universitária – Pós graduação de Viçosa), pelo compartilhamento da fé e por tornar as noite de sexta-feira um momento de amizade sincera.

A todos os meus amigos, em especial para as minhas sempre amigas Claudia, Daniella e Ionara e à minha família, pelo carinho e apoio.

## **BIOGRAFIA**

CYNTHIA DE MELO ROCHA, filha de Ruy Rocha e Lúcia Matos de Melo Rocha, nasceu em Belo Horizonte, estado de Minas Gerais.

Cursou o segundo grau no Colégio Universitário (COLUNI) da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Em setembro de 2002, graduou-se em Agronomia pela mesma instituição.

Em março de 2003, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, submetendo-se a defesa de tese em 28 de abril de 2005.

## CONTEÚDO

	Página
<b>RESUMO</b>	v
<b>ABSTRACT</b>	vii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	5
2.1. Origem dos clones MG.LE.EB.A3.0208D3 e MG.LE.EB.A3.0209E3.	5
2.2. Análise de <i>Southern blot</i>	5
2.3. Triagem da biblioteca de foscídeos	6
2.4. Construção das bibliotecas <i>shotgun</i> dos foscídeos	8
2.5. Seqüenciamento dos subclones e análise de seqüências	9
<b>3. RESULTADOS</b>	12
3.1. Caracterização dos insertos dos clones MG.LE.EB.A3.0208D3 e MG.LE.EB.A3.0209E3.	12
3.2. Determinação da organização genômica dos genes representados pelos insertos dos clones MG.LE.EB.A3.0208D3 e MG.LE.EB.A3.0209E3.	12
3.3. Identificação de clones foscídeos correspondentes aos insertos dos clones MG.LE.EB.A3.0208D3 e MG.LE.EB.A3.0209E3.	14
3.4. Construção da biblioteca <i>Shotgun</i> e identificação das seqüências correspondentes aos clones MG.LE.EB.A3.0208D3 e MG.LE.EB.A3.0209E3.	14
3.5. Caracterização dos genes <i>LeWRKY1</i> e <i>LeWRKY2</i>	16
<b>4. DISCUSSÃO</b>	29
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	33

## RESUMO

ROCHA, Cynthia de Melo, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Abril de 2005. **Caracterização Molecular de Dois Fatores de Transcrição WRKY Expressos na Interação Tomateiro - *Alternaria solani***. Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Conselheiros: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Francisco Murilo Zerbini Júnior.

Os genes WRKY codificam proteínas de ligação ao DNA que reconhecem a seqüência conservada de nucleotídeos (T)(T)TGAC(C/T) (*W box*), presente em promotores de genes de defesa relatados em plantas. As proteínas WRKY podem ser divididas em grupos e subgrupos distintos, com base nas características do domínio WRKY de ligação ao DNA altamente conservado entre os membros dessa família e de pequenos domínios adicionais conservados. Esse trabalho objetivou caracterizar, mediante a obtenção da seqüência completa, dois fatores de transcrição WRKY relacionados aos clones de cDNA MG.LE.EB.A3.0208D3 e MG.LE.EB.A3.0209E3 que foram expressos na linhagem resistente NC-EBR-2 de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 36 horas após a inoculação com o fungo *Alternaria solani*. A triagem efetuada por PCR de uma biblioteca de foscídeos da linhagem NC-EBR-2, utilizando-se oligonucleotídeos derivados das seqüências dos clones MG.LE.EB.A3.0208D3 e MG.LE.EB.A3.0209E3, resultou na identificação de um clone foscídeo correspondente a cada clone. Por meio do seqüenciamento *shotgun* desses clones, foram obtidas duas ORFs (*open reading frame*, seqüência aberta de leitura) denominadas de *LeWRKY1* (fator de transcrição

WRKY 1 de *L. esculentum*) com 1.165pb e *LeWRKY2* (fator de transcrição WRKY 2 de *L. esculentum*) com 1.570pb, correspondente aos clones MG.LE.EB.A3.0208D3 e MG.LE.EB.A3.0209E3, respectivamente. A proteína codificada por *LeWRKY1*, que apresenta similaridade de seqüência com a proteína NtWRKY3 de *Nicotiana tabacum*, possui em sua seqüência de 328 aminoácidos um domínio WRKY de ligação ao DNA, um motivo dedo de zinco do tipo Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>, um motivo conservado denominado domínio 1 que constitui um sinal de localização nuclear e um domínio conservado que inclui a região C de ligação a calmodulina. Essas características permitem classificar *LeWRKY1* no grupo II, subgrupo d, dos fatores de transcrição WRKY. Esta proteína apresenta também um domínio N-terminal de 41 aminoácidos com função ainda desconhecida. Na região promotora de *LeWRKY1* foi observada a presença do elemento promotor *TATA box* a -55pb e duas regiões *W box* a -89pb (WA) e a -76pb (WB) do sítio de início da transcrição. Análise de *Southern blot* revelou que esse gene está presente em mais de uma cópia no genoma do tomateiro. A proteína codificada pelo gene *LeWRKY2* apresentou similaridade de seqüência com a proteína *tWRKY4* de *Nicotiana tabacum* e possui uma seqüência de 291 aminoácidos constituída de um domínio WRKY de ligação ao DNA e um motivo dedo de zinco Cys<sub>2</sub>HisCys, sendo classificada como membro do grupo III dos fatores de transcrição WRKY. A análise por meio de *Southern blot* indicou que o gene *LeWRKY2* está presente em única cópia no genoma do tomateiro. A comprovação e a quantificação da contribuição desses genes na resistência do tomateiro a *Alternaria solani* depende, entretanto, de estudos de expressão e análise funcional.

## ABSTRAT

ROCHA, Cynthia de Melo, M.S., Universidade Federal de Viçosa, April 2005.  
**Molecular Characterization of two WRKY transcription factors expressed in the tomato – *Alternaria solani* interaction.** Advisor: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Committee members: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Francisco Murilo Zerbini Júnior.

The WRKY genes codify to DNA binding proteins that recognize the conserved nucleotide sequences (T)(T)TGAC(C/T) (W box) present in promoters of plant defense genes. The WRKY proteins can be divided in distinct groups and subgroups, based on characteristics of the DNA binding WRKY domain and on additional conserved small domains. This work aimed to characterize, by means of sequencing, two WRKY transcription factors related to cDNA clones MG.LE.EB.A3.0208D3 and MG.LE.EB.A3.0209E3 expressed in the resistant tomato lineage NC-EBR-2 36 hours post inoculation with the fungus *Alternaria solani*. Genomic DNA fragments that contained the genes correspondent to each cDNA clones were identified by PCR screening of NC-EBR-2 fosmid genomic library making use of primers derived from MG.LE.EB.A3.0208D3 and MG.LE.EB.A3.0209E3 sequences. Two ORFs (*open reading frame*) were obtained by sequencing clones from the shotgun library of these fosmids. They were designated as *LeWRKY1* (*L. esculentum* WRKY transcription factor 1, correspondent to MG.LE.EB.A3.0208D3) and *LeWRKY2* (*L. esculentum* WRKY transcription factor 2, correspondent to MG.LE.EB.A3.0209E3), having 1.165bp and 1.570bp, respectively. The protein codified by *LeWRKY1* that is similar to the protein NtWRKY3 of *Nicotiana tabacum* and has 328 amino acids with one

WRKY DNA binding domain, one Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> zinc finger motif, one conserved nuclear localization signal, and one conserved domain that included the calmodulin binding region C. These characteristics classify *LeWRKY1* into group II, subgroup d of WRKY transcription factors. This protein also presents an N-terminal domain that comprises 41 amino acids of unknown function. One *TATA* box element at –55 bp and two *W* box regions at –89 bp (WA) and –76 bp (WB) at the transcription start position were observed in promoter region of *LeWRKY1*. *Southern blot* analysis indicated that more than one copy of this gene is present in the tomato genome. The protein codified by *LeWRKY2* presented sequence similarity to tWRKY4 protein of *N. tabacum* and has 291 amino acids sequence that consists of WRKY DNA binding protein domain and one Cys<sub>2</sub>HisCys zinc finger motif, being classified as group III member of WRKY transcription factors. *Southern blot* analysis indicated that of *LeWRKY2* is a single copy gene.

## 1. INTRODUÇÃO

A resistência de plantas a fitopatógenos é um processo biológico complexo que envolve a regulação transcricional de grande número de genes e múltiplas rotas de sinalização (Rushton & Somssich, 1998, Singh *et al.*, 2002). Muitos dos genes induzidos codificam proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR), incluindo quitinases e glucanases, que são capazes de degradar os componentes da parede celular de fungos. Outros genes codificam fatores de transcrição envolvidos na ativação e supressão de várias rotas de sinalização na interação planta-patógeno. Desse modo, a regulação transcricional de genes da planta hospedeira é uma etapa fundamental do sistema de defesa em plantas (Chen & Chen, 2002).

A regulação transcricional da expressão de um gene é mediada pela ligação de fatores de transcrição a seqüências específicas no promotor deste gene. Dentre os vários fatores de transcrição existentes em organismos eucarióticos, merecem destaque os fatores WRKY, presentes somente em plantas e constituídos de uma família de 74 membros em *Arabidopsis thaliana* (Eulgem *et al.*, 2000, Singh *et al.*, 2002) e mais de 90 membros em arroz (*Oryza sativa* L.) (Ülker & Somssich, 2004).

Proteínas WRKY possuem um ou dois domínios WRKY que são uma região de aproximadamente 60 aminoácidos que contém a seqüência WRKYGQK altamente conservada entre os membros da família e um motivo estrutural de ligação ao DNA do tipo dedo de zinco. Baseado no número de domínios WRKY e na característica do motivo dedo de zinco, Eulgem *et al.* (2000) classificaram os membros da superfamília WRKY de *Arabidopsis* em três grupos. Geralmente, membros do grupo I e II possuem o mesmo motivo

dedo de zinco, sendo que os membros do grupo I tipicamente contêm dois domínios WRKY, enquanto que muitas proteínas com único domínio WRKY pertencem ao grupo II, o qual foi dividido em cinco subgrupos distintos baseado em outros pequenos motivos conservados. Proteínas do grupo III, também possuem um único domínio WRKY, mas o modelo estrutural do motivo dedo de zinco é único.

Os membros da família WRKY possuem acentuada expressão e/ou atividade de ligação ao DNA em resposta à indução por patógenos, sinais de defesa e ferimentos (Eulgem *et al.*, 2000). Diversos estudos demonstram a importância das proteínas WRKY na regulação das respostas de defesa da planta a infecção por patógenos. Vários genes WRKY de plantas são rapidamente induzidos por patógenos, elicitores ou tratamento com ácido salicílico (Eulgem *et al.*, 1999; Chen & Chen, 2000; Dellagi *et al.*, 2000; Hara *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000; Keates *et al.*, 2003; Laloi *et al.*, 2004). Diversos genes de resposta de defesa, incluindo os genes que codificam para as proteínas PR, possuem em sua região promotora um ou mais elementos *W box*, com a seqüência (T)(T)TGAC(C/T) (Eulgem *et al.*, 2000). Essas seqüências são especificamente reconhecidas pelas proteínas WRKY e são necessárias para a expressão desses genes de defesa (Rushton *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1999).

O envolvimento das proteínas WRKY na regulação da resposta de defesa em plantas foi comprovado pelo estudo da expressão em paralelo de grande número de genes em arabidopsis. A análise de microarranjos de DNA representativos de cerca de 10.000 ESTs (*expressed sequence tags*, etiquetas de seqüências expressas) resultou na identificação de 26 genes, incluindo o gene *PR-1*, coordenadamente induzidos durante o processo de resistência sistêmica adquirida (SAR, *systemic acquired resistance*) (Maleck *et al.*, 2000). Análise *in silico* da região promotora desses 26 genes revelou, em média, quatro sítios de ligação para as proteínas WRKY (*W boxes*). Em contraste, os promotores dos genes controles, que não foram expressos de forma coordenada com *PR-1*, continham em média, menos de dois sítios de ligação (Maleck *et al.*, 2000).

A participação das proteínas WRKY em resposta de defesa a fitopatógenos também tem sido comprovada por meio de experimentos de transformação de plantas. A superexpressão do gene *AtWRKY18* em níveis

moderados em arábida, resultou em acentuada expressão de genes PR e no aumento da resistência a *Pseudomonas syringae* (Chen & Chen, 2002). A superexpressão de *AtWRKY70* aumentou a resistência de arábida à bactéria *Erwinia carotovora* e levou a expressão constitutiva de genes normalmente induzidos pelo ácido salicílico (Li *et al.*, 2004). Asai *et al.* (2002), demonstraram que os fatores *AtWRKY22* e *AtWRKY29* aumentaram a sua expressão na presença da proteína elicitora flagelina. Esse trabalho também evidenciou que esses dois fatores de transcrição são componentes importantes da via de transdução de sinais mediada pela MAP-quinase em arábida e uma superexpressão transitória de *AtWRKY29* resultou em aumento de resistência a *P. syringae* e *Botrytis cinerea*, o que comprova a importância do *AtWRKY29* nos eventos de sinalização envolvidos na resistência a esses patógenos.

Kim & Zhang (2004), também analisando o efeito da cascata de sinalização mediada por MAP-quinase na resposta de defesa, identificaram em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) uma MAPK quinase (*NtMEK2*) que atua anteriormente às proteínas quinases SIPKs e WIPKs, induzidas por ácido salicílico e ferimentos, respectivamente. Plantas transgênicas superexpressando *NtMEK2* apresentam níveis elevados de expressão de vários genes que atuam posteriormente ao gene *NtMEK2*, incluindo o fator de transcrição WRKY *NtWRKY3*, assim como aumento da atividade de ligação a W-box. Liu *et al.* (2004) utilizando a técnica de silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS, *virus induced gene silencing*), silenciaram genes que codificam as proteínas quinases *NtNTF6* e *NtMEK1* e os fatores de transcrição *NbWRKY1* e *NbWRKY3* em plantas de *Nicotiana benthamiana* que expressam o gene *N*, que confere resistência ao vírus TMV (*Tobacco mosaic virus*). Esses autores concluíram que a resistência ao TMV, mediada pelo gene *N*, foi comprometida pelo silenciamento desses genes, sugerindo uma importante função dos fatores de transcrição WRKY na coordenação das vias de resposta de defesa mediada pelo gene *N*.

Apesar da importância dos fatores de transcrição WRKY na regulação da resposta de defesa, existem poucos estudos focalizando especificamente a importância desses fatores na resistência de plantas a fungos fitopatogênicos (Asai *et al.*, 2002). Scheuermann *et al.* (2004) analisando a expressão diferencial de genes em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) em resposta

a infecção por *Alternaria solani*, utilizando a técnica de hibridização subtrativa com supressão por PCR (*Subtractive suppressive hybridization* – SSH, Diatchenko *et al.*, 1996), identificaram vários clones de cDNA que representam genes supostamente expressos em maior intensidade na linhagem resistente NC-EBR-2, 36 horas após a inoculação. O seqüenciamento parcial desses clones e comparação das seqüências obtidas com seqüências depositadas no *GenBank* resultou na identificação de clones com similaridade às proteínas PRs, incluindo PR1, glucanases, formas ácidas e básicas de quitinases, osmotina, PR6 e PRSTH2; à proteínas envolvidas em sinalização celular, como Ras-GTP, calmodulinas e cinases, incluindo adenilato cinase, serina/treonina cinase e diacilglicerol; à proteínas envolvidas em resposta oxidativa, como catalase e ascorbato peroxidase e à fatores de transcrição como WRKY, ERF e CREB.

Os clones MG.LE.EB.A3.0208D3 e MG.LE.EB.A3.0209E3, apresentaram similaridade com fatores de transcrição WRKY de arabidopsis, evidenciando dessa forma, um possível papel desses genes na resposta do tomateiro à infecção por *A. solani*. Diante do exposto e da importância dos fatores de transcrição WRKY na regulação da resposta de defesa em plantas, esse trabalho teve por objetivo a clonagem e a caracterização da seqüência completa dos genes representados pelos clones MG.LE.EB.A3.0208D3 e MG.LE.EB.A3.0209E3, visando futuros estudos funcionais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Origem dos clones MG.LE.EB.A3.0208D3 e MG.LE.EB.A3.0209E3

Os clones de cDNA MG.LE.EB.A3.0208D3 e MG.LE.EB.A3.0209E3, são clones derivados da biblioteca de cDNAs representativos de mRNA diferencialmente expressos na linhagem de tomateiro resistente NC EBR-2, 36 horas após a inoculação com *Alternaria solani*. Essa biblioteca foi construída utilizando-se a técnica de hibridização subtrativa com supressão por PCR (*Subtractive suppressive hybridization* – SSH, Diatchenko *et al.*, 1996) (Scheuermann *et al.*, 2004). Os cDNAs foram clonados no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega).

### 2.2. Análise de *Southern blot*

Para análise de *Southern blot*, o DNA total da linhagem resistente NC EBR-2 e da suscetível *MoneyMaker* foram extraídos de acordo com os procedimentos de Fulton (1995). O DNA total (5 µg) foi digerido com as enzimas *EcoRI*, *EcoRV* e *XbaI* e submetido à eletroforese a 24V em gel de agarose 1% durante cerca de 20 h. Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado com água destilada durante 20 min e com HCl 0,25 N durante 10 min, sendo neutralizado por 20 min em solução de NaOH 0,4 N. As amostras de

DNA foram transferidas por capilaridade para membrana de náilon Hybond N+ (GE Healthcare, Freiburg, Germany) em NaOH 0,4 N durante 24 h. Após a transferência, a membrana foi lavada em SCC 2X por 10 min para a retirada de fragmentos do gel ou impurezas.

A membrana foi pré-hibridizada em solução de Denhardt 5X (composta de tampão contendo 0,2% de FICOLL 400, 0,2% de Polivinilpirrolidona 400 e 0,2% de BSA (Albumina Sérica Bovina)) adicionado de 5X SSC, 0,5% p/v SDS e  $100\mu\text{g.mL}^{-1}$  de DNA de esperma de salmão desnaturado, ficando nessa solução durante uma noite sob agitação, a  $65^{\circ}\text{C}$ . Após a pré-hibridização, procedeu-se a hibridização com 150ng de cada sonda. Como sonda, foi utilizado o inserto dos clones MG.LE.EB.A3.0208D3 e MG.LE.EB.A3.0209E3 liberados por clivagem com a enzima *EcoRI*, sendo os mesmos purificados do gel de agarose 1% com a utilização do kit Sephaglas™ BandPrep (GE Healthcare, Freiburg, Germany). As sondas foram marcadas com  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP (3000 Ci mmol) conforme as instruções do kit *Random Priming DNA Labelling System* (Invitrogen). Após a desnaturação, as sondas foram adicionadas à solução de pré-hibridização juntamente com a membrana e a hibridização aconteceu por um período de 16 h a  $65^{\circ}\text{C}$ . A seguir, a membrana foi lavada, iniciando-se com um enxágüe em solução de 2X SSC e 0,5% de SDS, logo após 2X SSC e 0,5% de SDS por 20 min a  $65^{\circ}\text{C}$ , 1X SSC e 0,5% de SDS por 20 min a  $65^{\circ}\text{C}$  e por último, 0,5X SSC e 0,5% de SDS por 20 min a  $65^{\circ}\text{C}$ . A membrana foi colocada em cassete com intensificador de sinal contendo filme Kodak-Omat AR5 (Eastman Kodak Company), que foi mantido a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante sete dias.

### **2.3. Triagem da biblioteca de foscímicos**

Utilizou-se uma biblioteca de foscímicos da linhagem de tomateiro NC EBR-2 construída no vetor foscímico pCC1FOS (*Epicentre Technologies, Madison, Wisconsin*). Esta biblioteca é atualmente constituída por  $7,4 \times 10^4$  foscímicos recombinantes, com tamanho médio de inserto de 40 kb,

representando cerca de 3X o genoma do tomateiro, que possui um tamanho médio de 953Mb.

Para a triagem da biblioteca foram construídos os oligonucleotídeos D308F (5'-ACCCCTCAACTGCCACCAA-3') e D308R (5'-TAGAGGCTGTCCGGCGAGAA-3') a partir da seqüência do clone MG.LE.EB.A3.0208D3; e os oligonucleotídeos E309F (5'-CAGAAAATCCAAGACAACCCACAA-3') e E309R (5'-TGCCGGAGGATTCAAATGTT-3') a partir da seqüência do clone MG.LE.EB.A3.0209E3, desenhados com auxílio do programa *Primer3* ([www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)).

A triagem foi realizada por meio de PCR utilizando os pares de oligonucleotídeos D308F, D308R e E309F, E309R. As condições de PCR foram otimizadas para a amplificação de fragmentos únicos a partir de DNA genômico da linhagem NC EBR-2.

A reação de PCR foi efetuada em um volume de 25 $\mu$ L, utilizando 25ng de DNA, 2,5 $\mu$ L de tampão 10X, dNTP 0,2mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, 200nM de cada oligonucleotídeos específico e 2.5U de Taq Polimerase (Invitrogen). As condições da PCR foram executadas primeiramente a 94°C durante 3 min, logo após 35 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 30 s, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 5 min. Após cada PCR, o produto de amplificação foi separado em gel de agarose 1,5% em tampão TAE1X, corado com brometo de metila e visualizado em transluminador. As imagens foram armazenadas em sistema de fotodocumentação "*Gel Logic 200 Imagem System*" (Kodak). Como controle da amplificação por PCR foi utilizado o DNA genômico da variedade resistente NC EBR-2, que foi extraído de acordo com os procedimentos de Fulton (1995).

Para facilitar a triagem por PCR, o DNA dos clones fosmídeos foram extraídos pelo método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) e agrupados em 154 *pools*. Cada *pool* correspondeu a uma microplaca de 96 cavidades, sendo que cada cavidade continha 5 clones de fosmídeos, em um total de 480 clones por microplaca. Para a triagem inicial, os *pools* foram amplificados com os oligonucleotídeos D308F+D308R e E309F+E309R, com o objetivo de identificar o *pool* (microplaca) positivo. Identificada a microplaca contendo 480 colônias de fosmídeos correspondente ao *pool* positivo, foi realizada PCR de colônia com os mesmos pares de oligonucleotídeos visando à identificação da

cavidade contendo o clone de interesse. As condições das reações de PCR foram de acordo com as descritas anteriormente.

Depois da triagem, colônias da cavidade positiva foram repicadas para uma placa de petri contendo meio Luria-Bertani-LB (Sambrook *et al.*, 1989) e cloranfenicol ( $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e colocadas para crescer a  $37^{\circ}\text{C}$  por um período de 16 a 20 h com o objetivo de obter colônias isoladas.

Novamente, PCR de colônia com as mesmas condições anteriores e com os mesmos oligonucleotídeos foi realizada com 25 colônias individuais para identificar colônias isoladas positivas. Depois de identificadas, foi escolhida uma colônia positiva e colocada para crescer em 100mL de 2XLB (Sambrook *et al.*, 1989) e cloranfenicol ( $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sob agitação de 280rpm a  $37^{\circ}\text{C}$  por um período de 16 a 20 h. O DNA do clone fosmídeo foi isolado utilizando-se o kit *Large construct kit* (Qiagen).

#### **2.4. Construção das bibliotecas *Shotgun* de fosmídeos**

O DNA dos fosmídeos foi fragmentado por nebulização de modo a obter fragmentos de DNA na faixa de 0,5 a 2 kb. As extremidades dos fragmentos foram reparadas com as polimerases *T4* e *Klenow* de acordo com o manual de instruções do fabricante do kit de subclonagem (*TOPO Shotgun Subcloning kit*, Invitrogen). Posteriormente, os fragmentos de DNA foram desfosforilados com fosfatase alcalina. Os fragmentos desfosforilados foram ligados ao vetor *pCR4Blunt* - TOPO (Invitrogen) e transformados em células eletrocompetentes de *Escherichia coli* EC100. As células transformadas foram selecionadas em meio LB sólido contendo, canamicina ( $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), IPTG ( $100\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e X-gal ( $20\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sendo incubadas por um período de 16 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . As colônias transformantes foram transferidas para microplaca de 96 cavidades contendo  $100\mu\text{L}$  de *Freezing media* (Budiman *et al.*, 2000) acrescido de canamicina ( $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 16 h e posteriormente estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2.5. Seqüenciamento dos subclones e análise de seqüências

As colônias transformantes estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , foram transferidas por meio de repicador para uma placa de microcultura de 96 cavidades contendo 1,25mL de meio 2XLB (Sambrook *et al.*, 1989) acrescido de canamicina ( $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), com o objetivo de purificar os plasmídeos recombinantes.

As placas foram mantidas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 16 h sob agitação de 280rpm. Após esse período, as células foram centrifugadas a 3700rpm por 15 min sendo em seguida retirado o sobrenadante. As células foram ressuspensas em vortex por 2 min em 240 $\mu\text{L}$  de solução G.E.T. (0,5M de EDTA pH 8,0, 1M de Tris-HCl pH 7,4 e Glicose 20%) e centrifugadas a 3000rpm por 7 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram novamente ressuspensas com 80 $\mu\text{L}$  de solução G.E.T acrescido de RNase ( $150\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por 2 min e posteriormente incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 20 min sob agitação de 230rpm. Uma suspensão de 60 $\mu\text{L}$  de células foi transferida para microplaca de polipropileno de fundo redondo. Foi acrescentado a cada suspensão, 80 $\mu\text{L}$  de NaOH 0,2N e SDS 1% (1:1). A suspensão foi misturada por inversão para a lise das células, deixada a temperatura ambiente por 5 min e após esse período foi centrifugada a 3700rpm por 2 min. Logo após, a suspensão foi neutralizada em 80 $\mu\text{L}$  KOAc 3M, pH 4.8 (pH ajustado com ácido acético glacial); misturada por inversão e mantida no gelo por 10 min, em seguida mantida em estufa a  $90^{\circ}\text{C}$  por 30 min e novamente no gelo por 10 min, sendo depois centrifugada a 3700rpm por 9 min. Em cima de uma microplaca de polipropileno de fundo V, foi fixada uma placa Millipore (MAGV N22) a fim de filtrar 100 $\mu\text{L}$  do sobrenadante sendo centrifugado a 3000rpm por 6 min. Ao filtrado, foi adicionado 100 $\mu\text{L}$  de isopropanol (Merck), misturado por inversão para a precipitação do DNA e em seguida centrifugado a 3700rpm por 45 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado com etanol 70% gelado (Merck) a 3700rpm por 5 min. O DNA foi deixado em temperatura ambiente por 15 min ou até secar todo etanol e ressuspendido em 60 $\mu\text{L}$  de água Milli-Q a temperatura ambiente por 1 h.

As reações de seqüenciamento foram conduzidas utilizando-se oligonucleotídeos T7, T3, M13F e M13R que flanqueiam o múltiplo sítio de clonagem do vetor *pCR4Blunt* (Invitrogen) utilizando-se o *kit DYEnamic™ ET*

*Dye Terminators* (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante. Para isso, as reações de seqüenciamento foram efetuadas em um volume de 5µL, utilizando 100ng de DNA, 10µM do oligonucleotídeo específico e 2,0µL de *DYEnamic™ ET Terminator Sequencing Pre-mix* (GE Healthcare). As condições da PCR foram executadas primeiramente a 95°C durante 10 s, 52°C por 5 s e por último 60°C durante 2 min, sendo essas condições repetidas durante 35 ciclos. Logo após, o DNA foi precipitado em acetato de amônio 7,5M e etanol 100% (Merck) por 10 min a temperatura ambiente e depois centrifugado a 3700rpm por 45 min. Depois de descartado o sobrenadante, o DNA foi lavado em etanol 70% a 3700rpm por 10 min e deixado secar por 10 min para que todo o etanol se evapore. Após a precipitação, o DNA foi ressuspenso em 5µL de *Loading Buffer* (GE Healthcare). A análise das amostras foi efetuada em seqüenciador automático MegaBace™ 500 (GE Healthcare).

Após a remoção de seqüências do vetor pelo programa *Cross\_match* ([www.phrap.org](http://www.phrap.org)), as seqüências obtidas foram comparadas com seqüências depositadas no *Genbank* ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) por meio do algoritmo *BLASTx*, e os resultados das análise foram armazenadas em banco de dados local. Os contíguos de seqüências foram montados utilizando-se o pacote de programas *Phred/phrap/consed* ([www.phrap.org](http://www.phrap.org)). Bases incorretas ou ambíguas foram removidas manualmente e a seqüência consenso de cada contíguo foi novamente comparada com seqüências depositadas no *GenBank* e bancos de dados do *SGN* (*Solanaceae Genomics Network* – [www.sgn.cornell.edu](http://www.sgn.cornell.edu)), por meio do algoritmo *BLASTn*. A identificação de fases de leitura aberta ou ORFs (*open-reading-frame*) nos contíguos que mostraram similaridade com os genes WRKY foi realizada através do programa *ORF Finder* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html)). As junções intron-exon foram determinadas com auxílio do programa *GENSCAN* ([http://bioweb.pasteur.fr/seganal/interfaces/genSCAN\\_simple.html](http://bioweb.pasteur.fr/seganal/interfaces/genSCAN_simple.html)). Após a identificação da ORF, as seqüências de aminoácidos foram comparadas com seqüências depositadas no *GenBank* por meio do programa *BlastP* e alinhadas utilizando os programas *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994) e *Clustal X* (Thompson *et al.*, 1997). A identificação de domínios conservados foi realizado pelo programa *MEME* e *MAST* versão 3.0 (<http://meme.sdsc.edu/meme/website/meme.html>), utilizando as ORFs

identificadas e sequências de maior similaridade do *GenBank*. A árvore de similaridade de sequências foi elaborada por meio do programa *Clustal X* (Thompson *et al.*, 1997).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Caracterização dos insertos dos clones MG.LE.EB.A3.0208D3 e MG.LE.EB.A3.0209E3

Os clones MG.LE.EB.A3.0208D3 e MG.LE.EB.A3.0209E3 apresentaram insertos de 525 e 310 pb, respectivamente. Essas seqüências apresentaram similaridade com os genes *AtWRKY11* (acesso AAK96194, 975pb, *e-value*:  $5.e^{-15}$ ) de *A. thaliana* e *tWRKY4* (acesso AAF61864, 864bp, *e-value*:  $2.e^{-10}$ ) de *N. tabacum*, respectivamente. A seqüência do clone 525pb apresentou identidade completa com o contíguo SGN-U146115, constituído por 1280pb e depositado no banco de seqüências de solanáceas ([www.sgn.cornell.edu](http://www.sgn.cornell.edu)). A seqüência desse contíguo apresentou alta similaridade (*e-value*:  $2,2.e^{-82}$ ) com a seqüência do gene *NtWRKY3* de *N. tabacum* (acesso BAA77358), que é constituído por 927pb. Portanto, esses clones possuem seqüências incompletas dos genes que representam.

#### 3.2. Determinação da organização genômica dos genes representados pelos insertos dos clones MG.LE.EB.A3.0208D3 e MG.LE.EB.A3.0209E3

A determinação do possível número de cópias no genoma do tomateiro foi efetuada para os genes correspondentes aos clones MG.LE.EB.A3.0208D3

e MG.LE.EB.A3.0209E3. Aproximadamente de dois a quatro fragmentos de DNA digeridos com três diferentes enzimas de restrição, hibridizaram com a sonda originada do clone MG.LE.EB.A3.0208D3, indicando que o gene referente a esse clone poderá estar organizado em mais de uma cópia no genoma do tomateiro (Figura 1a).

O inserto do clone MG.LE.EB.A3.0209E3, hibridizou com apenas um fragmento de DNA genômico da variedade NC EBR-2 e da variedade *MoneyMaker* digeridos com três diferentes enzimas de restrição (Figura 1b), indicando que este gene está presente em cópia única no genoma do tomateiro.

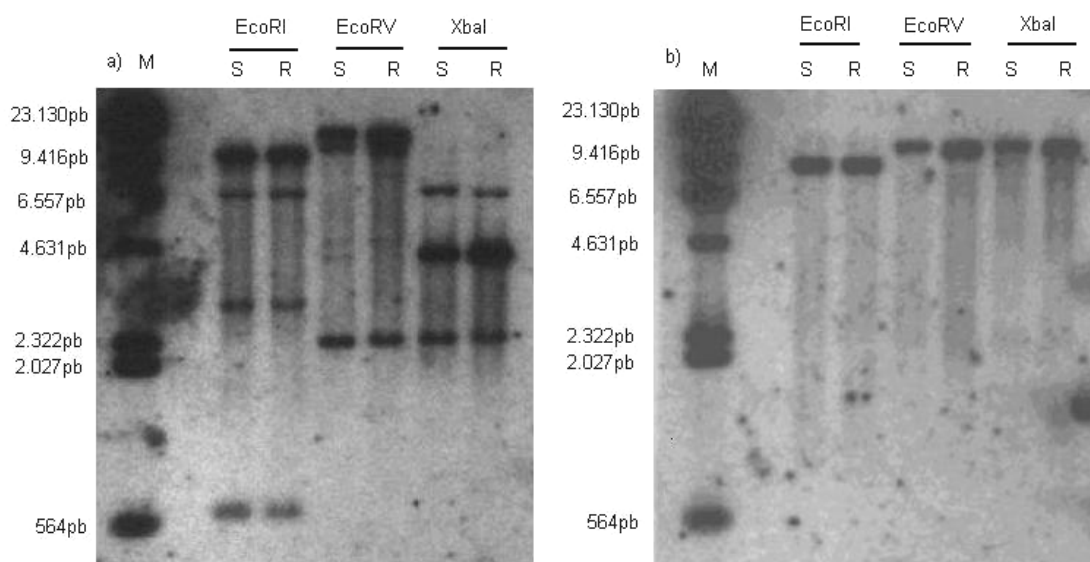


Figura 1. Organização genômica dos genes representados pelos insertos dos clones MG.LE.EB.A3.0208D3 (a) e MG.LE.EB.A3.0209E3 (b). Cerca de 5µg de DNA da variedade tomateiro *MoneyMaker* (S) e da linhagem NC EBR-2 (R) foram digeridos com as enzimas de restrição indicadas na figura, separados por eletroforese em gel de agarose 1% e transferidos para membrana Hybond-N+ e hibridizados com 150ng de cada sonda marcadas com [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP (3000 Ci mmol). A primeira coluna (M) representa o padrão de peso molecular  $\lambda$  *Hind* III.

### 3.3. Identificação de clones fosmídeos correspondentes aos insertos dos clones. MG.LE.EB.A3.0208D3 e MG.LE.EB.A3.0209E3

Foram identificados um clone fosmídeo para cada par de oligonucleotídeo, sendo esses denominados LYES.FO.SG.001.130.D5 e LYES.FO.SG.001.119.D3. Em ambos os casos o fragmento amplificado dos fosmídeos apresentou o mesmo tamanho do produto de amplificação derivado do DNA genômico de NC EBR-2 (Figura 2).

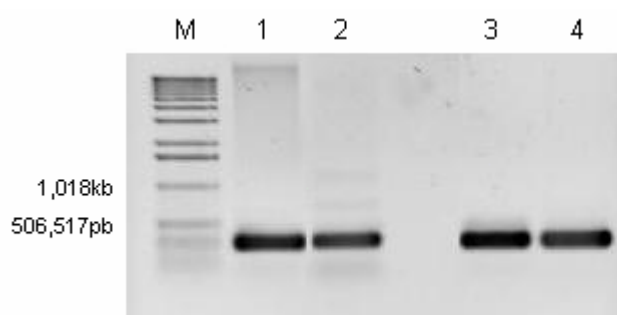


Figura 2. Análise do produto de amplificação do DNA dos clones fosmídeos LYES.FO.SG.001.130.D5 (canaleta 2) e LYES.FO.SG.001.119.D3 (canaleta 4) utilizando os oligonucleotídeos D308F/D308R e E309F/E309R, respectivamente. A canaleta 1 representa o produto de amplificação da linhagem NC EBR-2, constituído de 310pb, utilizando os oligonucleotídeos D308F/D308R. A canaleta 3 representa o produto de amplificação da linhagem NC EBR-2, constituído de 301pb, utilizando os oligonucleotídeos E309F/E309R. A primeira coluna (M) representa o padrão de comprimento de DNA *1Kb DNA Ladder* (Invitrogen).

### 3.4. Contrução da biblioteca *Shotgun* e identificação das seqüências correspondentes aos clones MG.LE.EB.A3.0208D3 e MG.LE.EB.A3.0209E3

Foram selecionados e estocados 480 subclones do fosmídeo LYES.FO.SG.001.130.D3 e igual número do fosmídeo

LYES.FO.SG.001.119.D5. Esses subclones possuem insertos que variam de 0,5 a 2,5 Kb (Figura 3). Utilizando-se o primer T7, foram parcialmente seqüenciados 288 subclones provenientes do fosmídeo LYES.FO.SG.001.130.D3 e 384 subclones provenientes do fosmídeo LYES.FO.SG.001.119.D5. Desses, onze apresentaram insertos com similaridade em nível de proteína aos fatores de transcrição *tWRKY4* (acesso AAF61864) de *N. tabacum* e *NbWRKY3* (acesso AAT12505) de *N. benthamiana* quando suas seqüências parciais foram comparadas com seqüências depositadas no *GeneBank*. Para o fosmídeo LYES.FO.SG.001.130.D3, também foram identificados 11 subclones com similaridade em nível de proteína ao fator de transcrição *NtWRKY3* (acesso BAA77358) de *Nicotiana tabacum*. Esses 11 subclones de cada fosmídeo foram reseqüenciados, utilizando-se os oligonucleotídeos T7 e T3 gerando um total de 22 seqüências que foram alinhadas pelo programa *Phred/phrap/consed*.

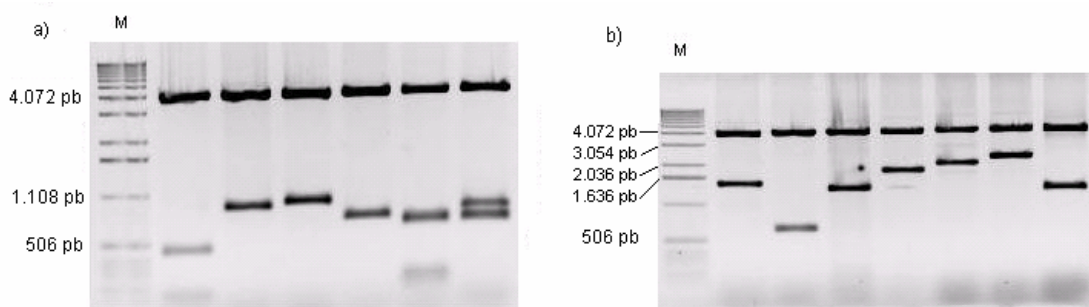


Figura 3. Análise do tamanho dos insertos dos subclones com similaridade aos fatores de transcrição WRKY, correspondentes aos fosmídeo LYES.FO.SG.001.119.D5 (a) e LYES.FO.SG.001.130.D3 (b) digeridos com a enzima *EcoRI* a 37°C, por 12 h. Os fragmentos provenientes da digestão foram separados em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1X corado com brometo de metila e visualizados em transluminador. Esses subclones possuem insertos que variam de 0,5 a 2,5 Kb. Fragmentos de aproximadamente 4Kb correspondem ao plasmídeo pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen). A primeira coluna (M) representa o padrão de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Life Technologies).

### 3.5. Caracterização dos genes *LeWRKY1* e *LeWRKY2*

O alinhamento das seqüências referentes aos 22 subclones selecionados gerou duas seqüências consenso, de 2.121pb e 2.148pb, onde foram identificadas duas ORFs (*open reading frame*, seqüência aberta de leitura) sendo denominadas de *LeWRKY1* (fator de transcrição WRKY 1 de *L. esculentum*) com 1.165pb e *LeWRKY2* (fator de transcrição WRKY 2 de *L. esculentum*) com 1.570pb, correspondente aos clones MG.LE.EB.A3.0208D3 (Figura 4) e MG.LE.EB.A3.0209E3 (Figura 5), respectivamente. Quando comparados com seqüências depositadas no NCBI, os genes *LeWRKY1* e *LeWRKY2* apresentaram maior similaridade em nível de proteína com os genes *NtWRKY3* (acesso BAA77358, *e-value*:  $6.e^{-81}$ ) e *tWRKY4* (acesso AAF61864, *e-value*:  $3.e^{-19}$ ), respectivamente. Quando comparados com o banco de seqüências de solanáceas ([www.sgn.cornell.edu](http://www.sgn.cornell.edu)), a seqüência de nucleotídeos de *LeWRKY1* apresentou identidade completa com o contígua de ESTs SGN-U215729, constituído por 1.285pb que apresenta similaridade com o gene *NtWRKY3* (*e-value*:  $2,2.e^{-82}$ ). A seqüência de nucleotídeos de *LeWRKY2*, apresentou identidade completa com o contígua de ESTs SGN-U213637, constituído de 1.165pb correspondente ao fator de transcrição *tWRKY4* (*e-value*:  $3,3.e^{-58}$ ). O alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos do produto da tradução dos genes *LeWRKY1* e *LeWRKY2* comparadas com as seqüências de aminoácidos deduzidas das proteínas *NtWRKY3* e *tWRKY4*, respectivamente, é demonstrado na figura 6.

A região codificadora de *LeWRKY1* (Figura 4) é dividida em três éxons interrompidos por dois íntrons, sendo o primeiro constituído de 88pb e o segundo constituído de 90pb. Cada íntron possui as seqüências conservadas G/GT e AG/G em suas extremidades. No caso de *LeWRKY2* (Figura 5), a seqüência codificadora é composta de três éxons interrompidos por dois íntrons, sendo o primeiro de 575pb e o segundo composto de 119pb. Cada íntron também possui seqüências conservadas G/GT e AG/G em suas extremidades. Essas regiões foram determinadas através de comparações com a seqüência de nucleotídeos do contígua de ESTs SGN-U215729 e SGN-U213637 do banco de solanáceas, respectivamente, e por meio do programa *GENSCAN*.

**ATG**GCTGTAGATTTGTTAAATTATTCGAATTTGAATGAACAATTAGCTTT  
 ACAAGAAGCTGCTACAGCCGTTTAAAATCTATGGATAATTTAATCCGGT  
 TCGTTTCATTTCAACAACAGCAAAATCAAACGGTTCAGCCGGATTGTAGA  
 GAGATAACTGATTATACTGTTTCGAATTTTAGAAAGGTTATTACTATTTT  
 GAACCGGACCGGTCATGCCCGGTTTAGACGTAGTCCGGTTCAGGTTACTG  
 ATGATTCGTCTACGGCTTTAACTCTATCGCCGTTGACAAATCCGGCGGAG  
 GAAACTGTACCGGCGGTGAAAGTACCGGTTGAGAAGTATCAATCGAAGGC  
 GTTGACTTTTAGATTTTACGAAACGGAAAGTTGGTAAATCTATTGGATGTG  
 AAGCTGTTCCGGTAGCGAGTTCGACGACGTCGTCGTCGTTTATGTCGACG  
 ATTACAGGTGAAGGAAGTGTTCGAATGGTAAAGTGTTCGTCGATGAG  
 TTTACCTCCTCGTCCGCCTGTTTCTCCGGGAAGCCGCCAATCGCCGGGA  
 AAAGATGTCGTGATCATGAGCTGTCTGATGAATTTTCCGGTAGAACTTCT  
 AGCTCCGGGAAGTGTGAGTGC AAAAAGAG ***GTTGGTGATCTCTTCATAACC***  
***ACATCGCATTTTCAGCTTCTCCGATGAAAACCTCAGACTTTCTAATCTGTT***  
***TTTTTTTTCTGAAACAG***GAAATCTCGAGTAAAAAAGTGATCAGAGTTCC  
 GCGATCAGTTC AAAA ACTGCTGGTATTCCGGCAGATGAATACTCATGGA  
 GAAAGTACGGTCAAAGCCGATCAAAGGTTACCATACCCAAG ***GTAGTTA***  
***CACATACACCATTATCAATCATCACGGTTCAGTTTTTTGTACGAATGAAA***  
***TTTCCAGATCTGAAACTTCACTTCAATTTTCAGGGGATATTACCGATGTA***  
***GTAGTGTTAGAGGCTGTCCGGCGAGAAAGCACGTAGAAAGAGCCACCGAT***  
***GATCCTGGAATGCTTGTGTGACTTACGGCGGAGAGCATCGTCATGTTCA***  
***AACCACGATCTCCGGCAACGTCACCGGCGCTGGAGCTGGAAGTTCCGGCG***  
***AGAGAATGATGGCTTTTGAGTTAACAGGACAGAAAATGGAGAAAGATTA***  
***GGTTAGAGATTTAG***

Figura 4. Seqüência de nucleotídeos referente à região codificadora de *LeWRKY1* (1.165 pb) identificadas com o auxílio dos programas *ORF Finder* e *GENSCAN*. Códon de iniciação (ATG) e término da transcrição (TAG) sublinhado em negrito. Itálico em negrito representa a seqüência dos íntrons de 88pb e 90pb, respectivamente. Seqüências conservadas G/GT e AG/G das extremidades de cada íntron estão em sublinhado duplo. Exons, em preto. O tracejado representa a seqüência de nucleotídeos que apresenta identidade com o inserto do clone MG.LE.EB.A3.0208D3 de 525 pb.

**ATG**GATAACTCATCGTCTGATCTAAATAGAGCAATAGAAGGTTTAATTCG  
 TGGTCGAGAAATTTACTCGACGACTAAAACAGATTATTTAAAATATCTGGTG  
 GTGAAGTTGAAAACATTATGGCTGAGGATTTAGTTGCCAAAATTCTGGAT  
 TCATTTTCTGAGACTCTCTCCGTTATAAACAATTCTGATGTGCTGCTCGC  
 TACGGCGGTGGAGGTCAAGTCGCCGGAAGATTATTCTAGTGGAAAGTTGCA  
 AGAGTTCAGATCGAAGAGGATGCTACAAGAGAAG**GTGATT**CATTAATTT**C**  
**ATTACTTACTAATTTTTTCATGGAGGGTATTTTAGTCTTTGTCACGTTTGT**  
**GGTCACAAGTTTTGATTGGTAATTGGTTGGTTCTCTTTTAGTTTTAATAAT**  
**TATTGCCAAGTTTTGGTCGGTCGTTGATTGGTTATTGACAATTTTGTCTT**  
**CAACAAATGGTTGAAGTACTTTTTTGGTTGGTTGGTCCCTACAAAGCATTG**  
**GTGATAATTAGATTGATTAAGATTTGTTTCATACTGAATTCATGATGAGGG**  
**CCTTGGGGTTATCTATTTCTTATATAGTTAATTGTA**CTACT**CATTA**AAT  
**ACAATAATCATAGAGCTCTCTAGGGTGTGTA**AGTACCATT**GTGCTTGGT**  
**TGGGGTAAAGGCAGACCTAAAATTATTTTATCTCATTTTTTACGTCA**  
**TTGATGAAGTAAGTATATGGTGA**AATAACTTAGTCAAGATAACT**CTTTAC**  
**GAGATAAATAATTTTAGGATAATTTGTTTCCAATCAAACGA**ACC**CTAAAA**  
**TAATTA**ACTT**GTGCTCTTTTAGAA**CAATTT**CTGATAGATGTTTTGGAA**  
**AATATACAG**GAAA**ACTT**CAGAATCAGACATAAAGGAATCCTCAGATTTGG  
 TGGATGATGGTCATGCTTGGAGAAAATATGGACAAAAACAGATCCTTAAT  
 TCTACTTATCCAAG**GTATGA**ATTTTT**TAATAATGATAGAGTTGATGTGAT**  
**AGATGTACAGTTAATCCATATATTTTATATTTGTTTTTATATATCTATTT**  
**ATAATAATTATAATAAAATGAATGTGTATGCAG**GCACTACTTTAGGTGCA  
 CACATAAATATGATCAGAAATGTCAAGCAAGCAAACAAGTACAGAAAATC  
 CAAGACAACCCACAAAGATTTAGAACAACATACTATGGACATCACACTTG  
 CAAAGCTTTTCTAGAGTTTCACAAATAATATTGGATTCTCAAATTGATG  
 GAAATTC**TAAT**TATATTAGTTTTGATCAAAATCATA**CATTTCCATCAATA**  
 AAACAGGAAACAAAGGAGGAAGTAGTTTT**CAGATTCTATCCTAAAATTGA**  
 AGATCAAATTC**CAATCATCAAGCTCTGATTATTTTCTTCCAATGATCATG**  
 ATCATGATCATCTCACTCCAGCAACATTTGAAGCCTCCGGCAGCCGTATG  
 ACCTCGCCCGATGTTATTT**CATCTGGGGTTACTCTTCTTGTACTACTAC**  
 TAGCAACAATGATAATCTTGAGATAGATATAGATTTTGAGGAGGGTCTTT  
 GGA**ACTTTGATCAAGTGTAG**

Figura 5. Seqüência de nucleotídeos referente à região codificadora de *LeWRKY2* (1.570 pb) identificadas com o auxílio dos programas *ORF Finder* e *GENSCAN*. Códon de iniciação (ATG) e término da transcrição (TAG) sublinhado em negrito. Em itálico em negrito, representa a seqüência dos íntrons de 575pb e 119pb, respectivamente. Seqüências conservadas G/GT e AG/G das extremidades de cada íntron estão em sublinhado duplo. Exons, em preto. O tracejado representa a seqüência de nucleotídeos que apresenta identidade com o inserto do clone MG.LE.EB.A3.02 09E3 de 310 pb.

a)

```
NtWRKY3      MAVDFIGFSKMNEQLALQEAASAGLKSMEHLIRLVSHQQQQ-QPVQLDCREITDFTLSKF 59
LeWRKY1      MAVDLLNYSNLNEQLALQEAATAGLKSMDNLRVSVFQQQQNQTVQPDCEITDYTVSNF 60
              ****:.:.*:*****:*****:***:*.* ** * *****:***:
              *

NtWRKY3      KKVVSILDRTGHARFRRGVPVHPDNFTSLSLSPSNQQLNLAPAKETPPPPSVSLPLTA 119
LeWRKY1      RKVITILNRTGHARFRRSPVQVTDSSSTALTLSPLTNPAEETVPAVKVPVEKYQSK---A 117
              **:***:*****.* ** * **:* ** .: : ** :.* * *
              *

NtWRKY3      LTLDFTKPNVDRPTGNSNAIVAVKSKETFCISTPMATSANSSSFMSITGEGSVSNGKQG 179
LeWRKY1      LTLDFTKRKVGKSG-----CEAVPVASSTTSSSFMSITGEGSVSNGKVF 163
              ***** :*:. * * :.*:***:*****:*****
              *

NtWRKY3      SSVFLPPAPSVSAGKPPISGKRCREHEPSEDISGKSNNGSGKCHCKKRKSRVKKVIRPAI 239
LeWRKY1      SSMFLPPRPVSSGKPPVIAKRCRDHELSDEFSGRTSSSGKQCKKRKSRVKKVIRPAI 223
              **: ** * **:* **:* ** * **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **
              *

NtWRKY3      SSRIADIPGDEYSWRKYGQKPIKGSFYPRGYKCSSVRGCPARKHVERAMDDPAMLIVTY 299
LeWRKY1      SSKTAGIPADEYSWRKYGQKPIKGSFYPRGYRCSVRGCPARKHVERATDDPGMLVVTY 283
              **: *.*.* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **
              *

NtWRKY3      EGEHRHTIGAMQENNT-----QMMVFGSTEERRE----- 328
LeWRKY1      GGEHRHVQTTISGNVTGAGAGSSGERMMAFELTGQKNGERLGLI 328
              ***** . :. * * * :*. * * :.
              *


```

b)

```
tWRKY4      MEPENYTSRLEKVAEKLNRGRELTRRLREMIKKPEARAGDGSVILTEELVGKIMSSFSE 60
LeWRKY2      MD--NSSSDLNRAIEGLIRGREPTRRLKQIIKIS--GGEVENIMAEDLVAKILDSFSE 54
              *: :.* **:. * * *****:*****:*** . * :. * :***:***:***
              *

tWRKY4      TLSILR-SNECSEVSQILKSTED-SSGSCKTSSLKDRRGHYKRRKTLETTINETSTLVDD 118
LeWRKY2      TLSVINNSDVVVATAVEVKSPEDYSSGCKSS---DRRGYKRRKTSESDIKESSDLVDD 111
              ***:.: * : : :*. ** *****:* ** * ** * * * : **:* * **
              *

tWRKY4      GHAWRKYGQKHILNAKYPRNYFRCTNKFQDQCEANKVQRIQENPPLFRVTTYGHHTCKT 178
LeWRKY2      GHAWRKYGQKQILNSTYPRHYFRCTHKYDQKQASKVQKIQDNPQRFRTTTYGHHTCKA 171
              *****:***:***:*****:*** ** * **:* **:* **:* **:* **
              *

tWRKY4      FPKVSMICDSPTDEDS-----SVLLNFN-----STSNHHHFL 211
LeWRKY2      FPRVSIILDSQIDGNSNYISFDQNHFTFPSIKQETKEEVVFRFPKIEDQIQSSSDYFL 231
              **:* **:* * * :* .*:.* .:*. ::*
              *

tWRKY4      -----DLMEGTVDVFDLSFEF--- 227
LeWRKY2      PNDHHDHDLTPATFEASGRMTPDVISSGVYSSCTTNSNDNLEIDIDFEEGLWNFDQV 291
              * : * : * * : : *
              *

tWRKY4      -
LeWRKY2      -


```

Figura 6. Alinhamento pelo programa Clustal W (1.82) das seqüências deduzidas de aminoácidos do produto da tradução dos genes *LeWRKY1* (a) e *LeWRKY2* (b), quando comparadas com as seqüências de aminoácidos das proteínas NtWRKY3 e tWRKY4, respectivamente que apresentaram similaridade de seqüência quando comparadas pelo algoritmo *BlastX*. A região conservada WRKYGQK do domínio WRKY está destacada no retângulo.

A análise da região promotora do gene *LeWRKY1*, revelou a presença de um motivo *TATATAT*, encontrado no elemento promotor *TATA box* a -55pb do códon de iniciação ATG e duas regiões *W box*, descritas como principais elementos de resposta a patógenos e elicitores (Rushton *et al.*, 1998). O primeiro motivo *W box* denominado  $W_A$  (TGACT) se encontra a -89pb do sítio de início da transcrição. Em seguida, a -76pb do início da transcrição, encontra-se o segundo *W box* denominado  $W_B$  (GTCAA) (Figura 7). Analisando a seqüência de  $W_A$  e  $W_B$  pode-se constatar que elas possuem orientação antiparalela. Não foi possível analisar nenhum elemento promotor em *LeWRKY2* provavelmente pelo fato de não ter obtido seqüência suficiente para análise da região promotora desse gene.

O produto da tradução de *LeWRKY1* é uma proteína de 328 aminoácidos com massa molecular de 35,7Kda. A seqüência de aminoácidos de *LeWRKY1* possui um domínio WRKY que contém uma seqüência WRKYGQK de ligação ao DNA altamente conservada entre os membros da família (Eulgem *et al.*, 2000) e um motivo dedo de zinco do tipo  $Cys_2His_2$ , com cinco resíduos de aminoácido separando dois resíduos conservados de cisteína e adicionalmente após os 23 aminoácidos do segundo resíduo de cisteína, encontram-se dois resíduos conservados de histidina separados por um resíduo de aminoácido (Figura 8). *LeWRKY1* apresentou características que o classificam como um membro do grupo II subgrupo d dos fatores de transcrição WRKY, onde se destaca um motivo conservado denominado domínio 1 (KKRKx[K/R]xK[R/K]TV[R/I][V/K]PA) que constitui um sinal de localização nuclear (Eulgem *et al.*, 2000) (Figura 9), e um domínio conservado no qual inclui a região C, que segundo Park *et al.* (2005) possui atividade de ligação a calmodulina (proteína envolvida na sinalização celular) encontrada em todos os membros do grupo IId dos fatores de transcrição WRKY (Figura 10).

Um outro domínio conservado foi identificado na região N-terminal da proteína *LeWRKY1*, mediante o uso dos programas MEME e MAST 3.0. Esse domínio constituído por 41 aminoácidos também está presente na região N-terminal das proteínas codificadas pelos genes de *A. thaliana AtWRKY11* (AAK96194) e *AtWRKY17* (AAL13049), *N. tabacum NtWRKY3* (BAA77358), *Petroselinum crispum PcWRKY3* (AAD27591) e *Capsella rubella CrWRKY11* (AAS66778). Provavelmente, essa região tem uma função biológica de grande

importância, em função da identidade desse domínio em proteínas codificadas por genes de espécies diferentes, como no caso de *AtWRKY11* e *CrWRKY11* (Figura 11).

```

          WA           WB
          →           ←
CAAAGATTTGACTCTTACCCGGTCAACCGGTGATCATTT...-68
TCCACCTATATATAGCCTTCATCTTCATCTTCTTCATCTC...-28
ATCATCTCTGCAAATCAAACAACAAAAATGGCTGTAG.....10

```

Figura 7. Seqüência da região promotora de *LeWRKY1*. Sublinhado duplo destaca-se a seqüência do putativo elemento promotor *TATA box* identificado com o auxílio do programa *GENSCAN*, localizado a -55pb do códon de início da transcrição ATG, que está indicado em sublinhado simples. Em negrito itálico destaca os dois motivos *W Box*,  $W_A$  (TTGAC) e  $W_B$  (GTCAA). Setas indicam a orientação de cada *W box*.





Figura 9. Seqüência de aminoácidos do domínio conservado 1 codificado pelo gene *LeWRKY1* alinhado com outros membros do grupo IId pelo programa *Clustal X* (1.83). O retângulo destaca a seqüência conservada desse domínio (KKRKx[K/R]xK[R/K]TV[R/I][V/K]PA) que, segundo Eulgem (2002), constitui um sinal de localização nuclear. Acessos: NtWRKY3 (BAA77358), PcWRKY3 (AAD27591) AtWRKY7 (AAK28440), AtWRKY15 (AAK44009/AAK28314), AtWRKY21 (AAK28441), AtWRKY39 (AAK96198).

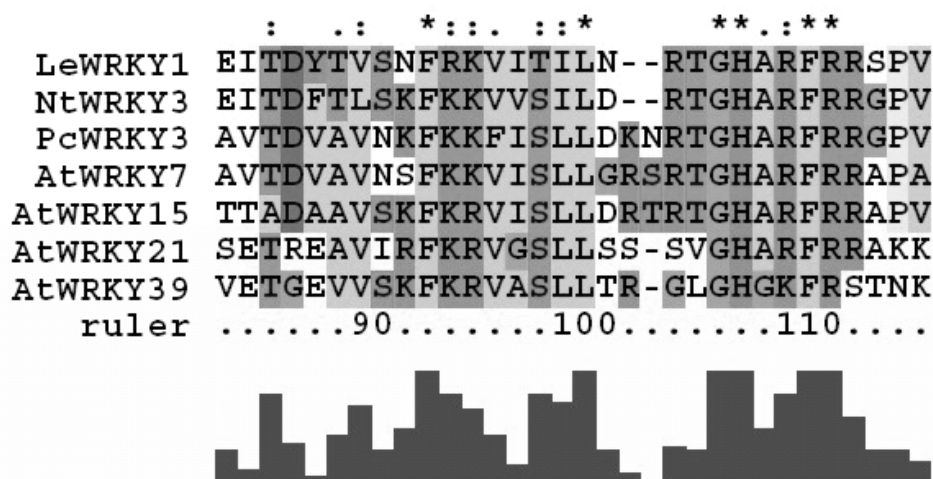


Figura 10. Seqüência de aminoácidos da região conservada C codificada pelo gene *LeWRKY1* comparada com a mesma região de outros genes WRKY do grupo IId alinhados pelo programa *Clustal X* (1.83). Acessos: NtWRKY3 (BAA77358), PcWRKY3 (AAD27591) AtWRKY7 (AAK28440), AtWRKY15 (AAK44009/AAK28314), AtWRKY21 (AAK28441), AtWRKY39 (AAK96198).

```

      *   :   .   ::  *:*:*:*:  **:*:::*:  :*   .:
NtWRKY3 MAVDFIGFSKMNEQLALQEAAASAGLKSMEHLIRLVSHQQQQ
LeWRKY1 MAVDLLNYSNLNEQLALQEAAATAGLKSMDNLI RFVVSFQQQQ
CrWRKY11 MAVDLMRFPKIDDQTAIQEAASQGLQSM EHLIRVLSNRPEQ
AtWRKY11 MAVDLMRFPKIDDQTAIQEAASQGLQSM EHLIRVLSNRPEQ
AtWRKY17 MTVDIMRLPKMEDQTAIQEAASQGLKSM EHLIRVLSNRPEE
PcWRKY3 MNNNSYKFRSKMEETAVQEAAAAGLQSV ENLIKAIQS NHQ
ruler  1.....10.....20.....30.....40.

```



Figura 11. Região conservada N-terminal da proteína LeWRKY1, de 41 aminoácidos identificados mediante o uso do programa *MEME* e *MAST* versão 3.0. Essa região encontra-se também presente nas proteínas NtWRKY3 (BAA77358), PcWRKY3 (AAD27591), AtWRKY17 (AAL13049), CrWRKY11 (AAS66778) e AtWRKY11 (AAK96194).

O produto da tradução de *LeWRKY2*, é uma proteína de 291 aminoácidos com uma massa molecular de 33,3KDa, possui em sua seqüência um domínio conservado WRKY, que contém a seqüência de aminoácidos WRKYGQK de ligação ao DNA altamente conservada entre os membros da família (Eulgem *et. al.*, 2000). *LeWRKY2* apresenta um motivo dedo de zinco do tipo Cys<sub>2</sub>HisCys, com sete resíduos de aminoácidos separando dois resíduos conservados de cisteína, e adicionalmente após 23 aminoácidos, uma característica que o inclui no grupo III dos fatores de transcrição WRKY, que é um único resíduo de aminoácido separado por um resíduo conservado de histidina e cisteína (Eulgem *et. al.*, 2000) (Figura 12). Foi também encontrado próximo à região N-terminal do domínio WRKY um domínio conservado constituído de 26 aminoácidos, sendo que nenhuma função putativa pôde ser designada a esse domínio.



A classificação dos genes *LeWRKY1* e *LeWRKY2* como membros dos grupos IId e III, respectivamente, de fatores de transcrição WRKY, foi confirmada por meio da árvore de similaridade de seqüência, desenvolvida pelo programa *Clustal X* (versão 1.83) (Figura 13). Para a elaboração da árvore, as putativas ORFs dos genes *LeWRKY1* e *LeWRKY2* foram alinhadas com seqüências de aminoácidos de genes WRKY de arábidoopsis, tabaco e salsa, obtidas no NCBI, sendo cada gene previamente classificado em determinado grupo dos fatores de transcrição WRKY (Eulgem *et al.*, 1999, Eulgem *et al.*, 2000, Chen & Chen, 2000).

Baseado na similaridade de seqüência de aminoácidos, os genes WRKY foram separados em agrupamentos distintos, representando cada um seu grupo e subgrupo. A árvore gerada foi consistente com árvores anteriormente analisadas por Dellagi *et al.* (2000), Borrone *et al.* (2004) e Park *et al.* (2005). Os grupos I e III, no qual são classificados com base no número de domínios WRKY e na estrutura do motivo dedo de zinco, estão localizados em dois distintos agrupamentos, entretanto, proteínas WRKY do grupo II, foram divididas em vários agrupamentos, sendo dessa forma classificadas em cinco distintos subgrupos.

O gene *LeWRKY1* agrupou com genes WRKY que pertencem ao grupo II subgrupo d, confirmando a sua identidade de seqüência em nível de aminoácidos (52%) com a proteína NtWRKY3 (acesso: BAA77358) de tabaco. Além disso, o subgrupo d foi dividido em dois agrupamentos, estando o gene *LeWRKY1* no mesmo agrupamento que os genes *NtWRKY3* e *PcWRKY3*, nos quais se pode constatar, por meio do programa *MEME* e *MAST* versão 3.0, um domínio conservado de 42 aminoácidos presente na região N-terminal de cada gene (Figura 11). O gene *LeWRKY2* foi classificado no grupo III, juntamente com genes WRKY previamente caracterizados a fazer parte desse grupo, sendo também confirmada a sua identidade de seqüência de aminoácidos de 53% com a proteína tWRKY4 (acesso AAF61864) de tabaco (Figura 13).

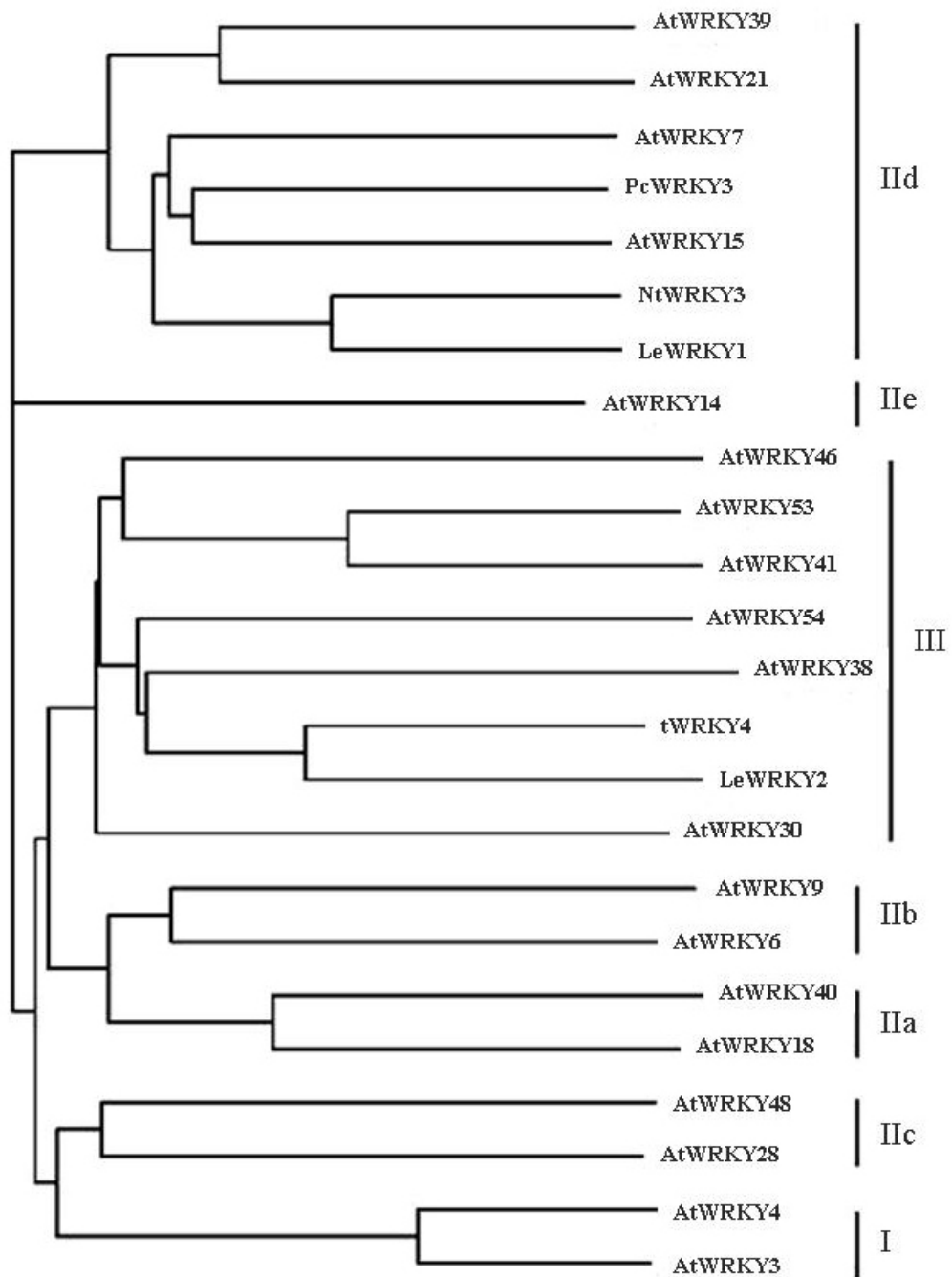


Figura 13. Árvore de similaridade de seqüência de aminoácidos codificada pelos genes *LeWRKY1* e *LeWRKY2*, destacado em retângulo vermelho, com seqüência de aminoácidos dos genes WRKY de arábidoopsis, tabaco e salsa. As 24 seqüências foram alinhadas pelo programa *Clustal X* e a elaboração da árvore foi realizada por meio desse mesmo programa. Os nomes das proteínas WRKY são indicados juntamente com o grupo no qual pertencem (indicado pela barra), sendo classificadas com base no número de domínios WRKY e nas características do motivo dedo de zinco (Eulgem *et al.*, 2000). Acessos: *AtWRKY9* (AAL11006), *AtWRKY6*

(AAK01127), AtWRKY40 (AAL85879), AtWRKY18 (AAK28380),  
*AtWRKY48* (AAL35290), AtWRKY28 (AAL35286), AtWRKY54 (AAL29430),  
AtWRKY38 (AAL35288), AtWRKY46 (AAK96020), AtWRKY30  
(AAK96196), AtWRKY53 (AAK28442), AtWRKY41 (AAL35289),  
AtWRKY14 (AAL11007), AtWRKY39 (AAK96198), AtWRKY21  
(AAK28441), AtWRKY7 (AAK28440), AtWRKY15 (AAK28314), AtWRKY4  
(AAL13048), AtWRKY3 (AAK28311), tWRKY4 (AAF61864), NtWRKY3  
(BAA77358), PcWRKY3 (AAD27591).

#### 4. Discussão

Os fatores de transcrição do tipo WRKY, em resposta à infecção por patógeno reconhecem a seqüência conservada de nucleotídeos (T)(T)TGAC(C/T), denominada *W box*, que está presente em promotores de um grande número de genes de defesa relatados em plantas, possuindo dessa forma função na regulação transcricional da expressão desses genes (Rushton & Somssich, 1998). Nesse trabalho foram caracterizados dois genes WRKY supostamente envolvidos na resistência do tomateiro a infecção *Alternaria solani*, aqui denominados *LeWRKY1* e *LeWRKY2*.

O fator *LeWRKY1* codifica uma proteína de 328 aminoácidos apresentando um domínio WRKY de ligação ao DNA, um sinal de localização nuclear, um motivo dedo de zinco do tipo Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> e um domínio conservado no qual inclui a região C, envolvida na ligação à calmodulina. Esses domínios são característicos de genes WRKY classificados no grupo II subgrupo d dos fatores de transcrição WRKY, no qual vários membros têm sido encontrados em diversas espécies de plantas. *LeWRKY1* apresenta em sua região N-terminal um domínio conservado de 41 aminoácidos cuja função até o momento não foi definida. Futuros estudos de mutação na região N-terminal de *LeWRKY1* poderão revelar a função desse domínio conservado na resposta de defesa a *A. solani* e a outros fitopatógenos.

Os membros do grupo II, subgrupo d, têm sido consistentemente associados com resposta de defesa. Dong *et al.* (2003) relataram que todos os fatores de transcrição WRKY de *Arabidopsis* pertencentes ao grupo IId são induzidos por *P. syringae* pv. *tomato* e ácido salicílico. Dentre eles, destaca-se o gene *AtWRKY11* (acesso: AAK96194), fator de transcrição WRKY de

arabidopsis de maior similaridade de seqüência em nível de aminoácidos com o gene *LeWRKY1* (*e-value*:  $2.e^{-66}$ ) que apresentou indução a partir de 2 h após inoculação com *P. syringae* pv. *tomato*. Rushton *et al.* (1996) identificaram 3 proteínas WRKY, denominadas PcWRKY1, PcWRKY2 e PcWRKY3 que participavam da regulação do gene *PR1* em salsa (*Petroselinum crispum*). Dessas proteínas, PcWRKY3 (acesso: AAD27591) apresentou similaridade com a seqüência de aminoácidos de *LeWRKY1* (*e-value*:  $1.e^{-47}$ ). Segundo os autores, a indução desses genes em salsa ocorreu de forma rápida e transitória, precedendo a indução do gene *PR1* em 2 h após a inoculação com o elicitor *Pmg* de *Phytophthora sojae*. Eulgem *et al.* (1999) analisando a organização genômica dos genes *PcWRKY1* e *PcWRKY3*, verificaram que esses genes estão em cópia única no genoma de salsa. Resultado diferente ocorreu em *LeWRKY1* que está organizado em mais de uma cópia no genoma do tomateiro. A significância biológica dessa diferença é desconhecida.

A proteína *LeWRKY2* possui em sua seqüência de 291 aminoácidos, um domínio WRKY de ligação ao DNA e um motivo dedo de zinco Cys<sub>2</sub>HisCys. Essas características o classificam como membro do grupo III dos fatores de transcrição WRKY. Em arabidopsis, a maioria dos membros do grupo III, respondem a diferentes estresses bióticos e abióticos. As proteínas *tWRKY4* e *tWRKY3*, possuem similaridade com a seqüência de aminoácidos de *LeWRKY2* (*e value*:  $1.e^{-56}$  e  $2.e^{-34}$ , respectivamente) e quando avaliados por meio de *Northern blot*, foram rapidamente induzidos a partir de 3 h após infecção com TMV em plantas de tabaco (Chen & Chen, 2000). Kalde *et al.* (2003), analisando a expressão dos 13 membros que constituem o grupo III das proteínas WRKY em arabidopsis, constatou que a ativação transcricional na presença do oomiceto *Peronospora parasitica* e de ácido salicílico é uma característica comum na maioria dos membros do grupo III testados. Dentre eles, o fator de transcrição *AtWRKY70* (acesso: AAL13046), homólogo aos genes *tWRKY4* e *tWRKY3*, que é o fator de transcrição WRKY de arabidopsis com maior similaridade de seqüência em nível de aminoácidos com o gene *LeWRKY2* (*e value*:  $1.e^{-31}$ ), foi diferencialmente expresso a partir de 4 h após a inoculação com *P. parasitica*. Recentemente, Li *et al.* (2004) demonstraram que esse mesmo gene é fortemente induzido 2 h após a inoculação com o elicitor *CF* de *Erwinia carotovora*, e que a sua superexpressão em arabidopsis, leva

ao aumento da resistência a infecção por *E. carotovora* e *P. syringae* pv. *tomato* (Li *et al.*, 2004).

Na região promotora de *LeWRKY1* foram identificadas duas regiões *W box* a -89pb ( $W_A$ ) e a -76pb ( $W_B$ ) do sítio de início da transcrição com orientação antiparalela, uma organização similar àquela constatada por Eulgem *et al.* (1999) para o gene *PcWRKY3* (acesso: S72445) em salsa (*Petroselinum crispum*). Estudos de mutação em cada *W box*, realizados por esses autores, revelaram redução na capacidade do promotor de *PcWRKY1* em mediar resposta ao elicitor *Pmg* de *Phytophthora sojae*.

Dong *et al.* (2003) analisando a região promotora de vários genes *WRKY* de arábida pode constatar um possível envolvimento das proteínas *WRKY* na regulação de outros genes *WRKY*. A maior ocorrência de motivos *W box* na região promotora se deu somente em genes *WRKY* que eram diferencialmente regulados em resposta ao tratamento com *P. syringae*. Desses genes, 86% apresentavam duas ou mais cópias do domínio de ligação *W box* em sua seqüência promotora quando comparados com genes *WRKY* que não foram diferencialmente regulados, sugerindo dessa forma que proteínas *WRKY* possuem uma função crucial na regulação diferencial de genes membros de sua família. Segundo os autores, esse mecanismo de autoregulação entre membros de uma mesma família de fatores de transcrição pode explicar, durante os primeiros estágios de infecção do patógeno, a ampla capacidade de ativação transcricional das proteínas *WRKY* através da indução de genes *WRKY* que codificam ativadores transcricionais. Durante os últimos estágios da resposta de defesa, essa autoregulação também serve para explicar o impedimento da indução prolongada de genes *WRKY* por meio da indução de genes *WRKY* que funcionam como repressores transcricionais.

Assim, é provável que tanto *LeWRKY1* quanto *LeWRKY2* estejam envolvidos na resposta de defesa do tomateiro a *A. solani*. A caracterização completa dos genes *LeWRKY1* e *LeWRKY2* abre a oportunidade para a sua análise funcional na resposta do tomateiro a *A. solani*. A expressão diferencial de *LeWRKY1* e *LeWRKY2* em resposta à infecção por *A. solani* poderá inicialmente ser comprovada por meio de PCR em tempo real, atentando para a possibilidade de a indução ser rápida e transitória como já demonstrada para genes homólogos em outras espécies de plantas (Dong *et al.*, 2003; Rushton *et al.*, 1996; Chen & Chen, 2000; Kalde *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004). No caso de os

genes mostrarem expressão diferencial, estes poderão ser submetidos a estudos funcionais utilizando as técnicas de silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) ou superexpressão sob o controle do promotor 35S mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, visando também à quantificação da contribuição de cada gene na resposta de defesa. Essas duas abordagens têm sido utilizadas com sucesso na análise funcional de diversos genes WRKY (Liu *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Chen & Chen, 2002; Asai *et al.*, 2002).

## 5. Referências Bibliográficas

ASAI, T., TENA, G., PLOTNIKOVA, J., WILLMANN, M.R., CHIU, W.L., GOMEZ-GOMEZ, L., BOLLER, T., AUSUBEL, F.M., SHEEN, J. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. **Nature** 415:977-983. 2002.

BORRONE, J.W., KUHN, D.N., SCHNELL, R.J. Isolation, characterization, and development of WRKY genes as useful genetic markers in *Theobroma cacao*. **Theory Apply Genetics** 109:495-507. 2004.

BUDIMAN, M.A., MAO, L., WOOD, T.C., WING, R. A. A deep-coverage tomato BAC library and prospects toward development of an STC framework for genomic sequencing. **Genomic Research** 10:129-136. 2000.

CHEN, C., CHEN, Z. Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid- induced genes encoding WRKY DNA- binding proteins from tobacco. **Plant Molecular Biology** 42:387-396. 2000.

CHEN, C., CHEN, Z. Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. **Plant Physiology** 129:706-716. 2002.

DELLAGI, A., HELIBRONN, J., AVROVA, A.O., MONTESANO, M., PALVA, E.T., STEWART, H.E., TOTH, I.K., COOKE, D.E., LYON, G.D., BIRCH, P.R. A potato gene encoding a WRKY- like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* and *Phytophthora infestans* and is coregulated with class I endochitinase expression. **Molecular Plant Microbe Interactions** 13:1092-1101. 2000.

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

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

EULGEM, T., RUSHTON, P.J., SCHMELZER, E., HAHLBROCK, K., SOMSSICH, I.E. Early nuclear events in plant defense signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. **EMBO Journal** 18:4689-4699. 1999.

EULGEM, T., RUSHTON, P.J., ROBATZEK, S., SOMSSICH, I.E. The WRKY superfamily of plant transcription factors. **Trends in Plant Sciences** 5:199-206. 2000.

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

HARA, K., YAGI, M., KUSANO, T., SANO, H. Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding. **Molecular Genetics and Genomics** 263:30-37. 2000.

KALDE, M., BARTH, M., SOMSSICH, I.E., LIPPOK, B. Members of the *Arabidopsis* WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways. **Molecular Plant Microbe Interactions** 16:295-305. 2003.

KEATS, S.E., KOSTMAN, T.A., ANDERSON, J.D., BAILEY, B.A. Altered gene expression in three plant species in response to treatment with Nep1, a fungal protein that causes necrosis. **Plant Physiology** 132:1610-1622. 2003.

KIM, C.Y., LEE, S-H., PARK, H.C., BAE, C.G., CHEONG, Y.H., CHOI, Y.J., HAN, C-D., LEE, S.Y., LIM, C.O., CHO, M.J. Identification of rice blast fungal elicitor-responsive genes by differential display analysis. **Molecular Plant Microbe Interactions** 13:470-474. 2000.

KIM, C.Y., ZHANG, S. Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. **Plant Journal** 38:142-151. 2004.

LALOI, C., MESTRES-ORTEGA, D., MARCO, Y., MEYER, Y., REICHHELD, J.P. The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin L5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. **Plant Physiology** 134:1006-1016. 2004.

LI, J., BRANDER, 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** 16:319-331. 2004.

LIU, Y., SCHIFF, M., DINESH-KUMAR, S.P. Involvement of MEK1, MAPK, NTF6, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. **Plant Journal** 38:800-809. 2004.

MAEO, K., HAYASHI, S., KOJIMA-SUZUKI, H., MORIKAMI, A., NAKAMURA, K. Role of conserved residues of WRKY domain in the DNA-binding of tobacco WRKY family proteins. **Bioscience Biotechnology Biochemist** 65:2428-2436. 2001.

MALECK, K., LEVINE, A., EULGEM, T., MORGAN, A., SCHMID, J., LAWTON, K.A., DANGL, G.L., DIETRICH, R.A. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. **Nature Genetics** 26:403-410. 2000.

PARK, Y.P., LEE, J.H., YOO, J.H., MOON, B.C., CHOI, M.S., KANG, Y.H., LEE, S.M., KIM, H.S., KANG, K.Y., CHUNG, W.S., LIM, C.O., CHO, M.J. WRKY group IId transcription factors interact with calmodulin. **FEBS Letters** 579:1545-1550. 2005.

ROBATZEK, S., SOMSSICH, I.E. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. **Genes and Development** 16:1139-1149. 2002.

RUSHTON, P.J., SOMSSICH, I.E. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. **Current Opinion in Plant Biology** 1:311-315. 1998.

RUSHTON, P.J., TORRES, J.Y., PARNISKE, M., WERNWERT, P., HAHNBROCK, K., SOMSSICH, I.E. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. **EMBO Journal** 15:5690-5700. 1996.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SCHEUERMANN, K.K.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; ZERBINI, F.M.; MAIA, I.G. Identificação de genes diferencialmente expressos na interação tomateiro - *Alternaria solani*. In: **XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia** 2004, Gramado. Fitopatologia Brasileira, 2004. v. 29. p.S182.

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

THOMPSON, J.D., HIGGENS, D.G., GIBSON, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** 22:4673-4680. 1994.

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGENS, D.G. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** 25:4876-4882. 1997.

ÜLKER, B., SOMSSICH, I.E. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. **Current Opinion in Plant Biology** 7:491-498. 2004.

YANG, P., WANG, Z., FAN, B., CHEN, C., CHEN, Z. A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. **Plant Journal** 18:141-149. 1999.

YU, D., CHEN, C., CHEN, Z. Evidence for a important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. **The Plant Cell** 13:1527-1539. 2001.