

DANIEL OLIVEIRA JORDÃO DO AMARAL

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM
TOMATEIRO INDUZIDOS POR ÁCIDO SALICÍLICO E POR *Fusarium oxysporum*
f. sp. *lycopersici***

RECIFE

2007

DANIEL OLIVEIRA JORDÃO DO AMARAL

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM
TOMATEIRO INDUZIDOS POR ÁCIDO SALICÍLICO E POR *Fusarium oxysporum*
f. sp. *lycopersici***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia “Melhoramento Genético de Plantas”, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Agronomia.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Luciane Vilela Resende – UFRPE

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva — UFPE

RECIFE

2007

Ficha catalográfica

A485i Amaral, Daniel Oliveira Jordão do
 Identificação de genes diferencialmente expressos em
tomateiro induzidos por ácido salicílico e por *Fusarium*
oxysporum f. sp. *lycopersici* / Daniel Oliveira Jordão do
Amaral. -- 2007.
 67 f. : il.

 Orientadora : Luciane Vilela Resende
 Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético de
Plantas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. De –
partamento de Agronomia.
 Inclui anexo e bibliografia

CDD 581.15

1. Genética vegetal
 2. Ácido salicílico
 3. Híbridaçã
 4. *Lycopersicum esculentum*
 5. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*
- I. Resende, Luciane Vilela
II. Título

DANIEL OLIVEIRA JORDÃO DO AMARAL

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM
TOMATEIRO INDUZIDOS POR ÁCIDO SALICÍLICO E POR *Fusarium oxysporum*
f. sp. *lycopersici***

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: ____/____/____.

ORIENTADOR:

Prof^a. Dr^a. Luciane Vilela Resende - UFRPE

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho - UFRPE

Dr^a. Ana Verônica Silva do Nascimento - CNPq/FACEPE/UFRPE

Prof. Dr^a. Luíza Suely Semen Martins - UFRPE

RECIFE

2007

A Deus

OFEREÇO

Aos meus pais Rogéria e Ednaldo, às minhas irmãs, Raquel e Isabel, que de alguma forma contribuíram me incentivando e estimulando em todas as etapas de minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus

À minha família, pela ajuda e pelo estímulo, que foi uma das maiores incentivadoras dessa etapa vencida.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a Luciane Vilela pela orientação, oportunidade, confiança, sugestões e amizade.

À grande amiga Prof^a. Dr^a Márcia Vanusa por compartilhar seu vasto conhecimento na área da biotecnologia, dedicação generosa do seu tempo, auxílio na análise dos resultados obtidos na metodologia, sugestões e paciência em todos os momentos.

À Dr^a Marleide Magalhães, Dr^a Virgínia Donato e Clébia Almeida pela atenção, disponibilidade e auxílio durante todo desenvolvimento deste estudo.

Aos Laboratório de Biotecnologia Vegetal (UFRPE) e Laboratório de genoma (IPA) por ceder a infra-estrutura dos laboratórios durante o transcorrer do trabalho.

Aos professores e funcionários da UFRPE que contribuíram direta ou indiretamente para o meu crescimento profissional.

Aos companheiros do curso de mestrado em melhoramento genético de plantas pela amizade e apoio durante todo o curso.

Quero fazer agradecimentos especiais à Amizadai Luna, Luiza Ribeiro, Adália Mergulhão, Álvaro Gonçalves, Adriana Guedes, Dimas Menezes, Júlio Mesquita, Roberto Melo, Fabiana, Ana Verônica, Rômulo Santos, Tathiana Alves, Gustavo Santos, Igor Lins e Luiz Gustavo.

RESUMO

Com o propósito de identificar genes no tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill), cv. BRH, que respondem ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e ao ácido salicílico, molécula mensageira na ativação de resposta de defesa em plantas, foi utilizada a técnica de hibridização subtrativa por supressão (HSS), a partir de cDNAs de folhas, 24h após o tratamento com ácido salicílico, biblioteca denominada (AS), e cDNAs de raízes, 72h após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, interação incompatível, biblioteca denominada (FO). Esse trabalho representa o primeiro relato da expressão gênica global no tomateiro induzido pelo ácido salicílico e pelo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, utilizando a técnica HSS. Foram identificados um total de 307 clones nas duas bibliotecas subtraídas, sendo 143 clones obtidos na biblioteca (AS) e 164 clones na biblioteca FO. As prováveis funções dos genes foram obtidas pelo seqüenciamento dos clones e subsequente pesquisa de homologia em bancos de dados. Os genes encontrados estão envolvidos em diversos processos relacionados à resistência contra fitopatógenos como: resposta de hipersensibilidade, morte celular programada, síntese e transporte de metabólitos antimicrobianos, percepção e transdução de sinal, síntese de proteínas relacionadas à patogênese, metabolismo de lipídeos e degradação controlada de proteínas. Foram identificados na biblioteca FO um número maior de genes implicados em mecanismos de defesa (26%), do que na biblioteca AS (24%). Em relação ao número de genes codificadores de proteínas antimicrobianas foram encontrados apenas na biblioteca FO (7%). Entretanto, os genes envolvidos no metabolismo de compostos secundários foi maior na biblioteca AS (13%) em relação a biblioteca FO (4%). Os genes relacionados a degradação controlada de proteínas também foi maior na biblioteca AS (3%) do que na biblioteca FO (1%). Os resultados obtidos sugerem que a resistência no tomateiro induzido pelo ácido salicílico e pelo patógeno ocorre por mecanismos distintos.

Palavras-chave: ácido salicílico, hibridização subtrativa por supressão, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Lycopersicon esculentum*.

ABSTRACT

To identify tomato plant (*Lycopersicon esculentum* Mill), cv. BRH, genes which answer to plant pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and salicylic acid, the carrier molecule for activation of responses of plant defense, it was used the suppression subtractive hybridization (SSH) technique, from leaf cDNAs, 24h after salicylic acid, library denominated AS, and root cDNA, 72h after inoculation with *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, incompatible interaction, library denominated FO. This work represents the first report of global gene expression of tomato plant induced by salicylic acid and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, using SSH technique; it was identified a total of 307 clones in the two subtractive libraries, being 143 obtained in the AS library and 164 in the FO library. Probable functions for genes were obtained by sequencing of clones and subsequent homology research at datas. These isolated genes are involved in several processes related to resistance against plant pathogen such as: hypersensitive response, programmed cell death, synthesis and transport of antimicrobial metabolites, signal perception and transduction, synthesis of pathogenesis-related proteins, lipid metabolism and selective degradation of proteins. It was identified in FO library a higher number of defense-related genes (26%) than in AS library (24%). In relation to the number of genes encoding antimicrobial proteins, they were only found in FO library (7%). However, genes involved in secondary compound metabolism were higher in AS library (13%) in relation to FO library (4%). These genes related to controlled degradation of proteins were also higher in AS library (3%) than in FO library (1%). The results suggest that the resistance of tomato plant induced by salicylic acid and by plant pathogen occur by distinct mechanisms.

Key words: salicylic acid, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Lycopersicon esculentum*, suppression subtractive hybridization.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II. Identificação de genes diferencialmente expressos em tomateiro induzidos por ácido salicílico e pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

	Página
Figura 1. Análise da eficiência da subtração usando PCR. O cDNA tester foi preparado de RNA total de plantas tratadas com fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> e o cDNA driver foi de plantas tratado com água (controle). O pool de cDNA subtraído e não subtraído foram amplificados usando primer que amplifica o gene <i>Chi-3</i> , induzida pela infecção do patógeno ou que amplifica o gene <i>EF-1α</i> expresso constitutivamente. Alíquotas das amostras foram retiradas após 15, 20, 25 e 30 ciclos de PCR. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1,5%.....	50
Figura 2. Genes ativados em tomateiro, cv. BRH tratado com ácido salicílico (AS). Genes isolados por hibridização subtrativa por supressão (HSS), a partir de mRNAs de folhas de tomateiro, 24 h após o tratamento com AS.....	51
Figura 3. Genes em tomateiro, cv. BRH inoculado com <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> . Genes isolados por HSS, a partir de mRNAs de raízes de tomateiro, 72 h após a inoculação com o patógeno 1×10^7 esporos/mL.....	51
Figura 4. Comparação de ESTs classificados pela função predita entre as duas bibliotecas de cDNA de tomateiro, induzidas pelo ácido salicílico (AS) e <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (FO).....	52

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II. Identificação de genes diferencialmente expressos em tomateiro induzidos por ácido salicílico e pelo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

	Página
Tabela 1. Tratamentos utilizados para obtenção das bibliotecas subtraídas de cDNA de tomateiro e número de clones.....	53
Tabela 2. Identificação de genes induzidos por ácido salicílico em tomateiro (<i>Lycopersicum esculentum</i>) que apresentam homologia com genes de plantas de função conhecidas.....	54
Tabela 3. Identificação de genes induzidos por <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> em tomateiro (<i>Lycopersicum esculentum</i>) que apresentam homologia com genes de plantas de função conhecida.....	55

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

	Páginas
INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1. Considerações gerais	
2.1.1. Tomaticultura.....	16
2.1.2. Murcha de fusarium.....	17
2.2. Ativação da expressão de genes de resistência.....	19
2.3. Hibridização subtrativa por supressão (HSS).....	22
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	27

CAPÍTULO II

	Páginas
RESUMO.....	36
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS	
Material vegetal e condições de crescimento.....	39
Tratamento com ácido salicílico.....	39
Inoculação com <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	39
Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	40
Hibridização subtrativa por supressão (HSS) e clonagem dos produtos de PCR.....	40
Sequenciamento e análise das seqüências	42
RESULTADOS.....	43
DISCUSSÕES.....	46
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	56
ANEXOS.....	60

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A tomaticultura ocupa lugar de destaque na economia brasileira, não somente pelo seu valor econômico, mas também por ser uma atividade geradora de grande número de empregos. Nos últimos quatro anos, houve um incremento de cerca de 22% da área cultivada no Brasil, sendo os principais Estados produtores: Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia e Pernambuco, responsáveis por mais de 70% da produção nacional (IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2004). Apesar do aumento da área cultivada no Brasil com essa hortaliça, vários fatores têm contribuído para reduzir a sua produtividade devido à ocorrência de problemas fitossanitários, dentre os quais destaca-se a murcha-de-fusário ou fusariose, causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. É uma doença que ocorre em todas as regiões onde o tomate é cultivado, podendo se manifestar em quaisquer estádios de desenvolvimento, sendo mais comum em plantas no início de florescimento e frutificação, com destruição quase total das plantas, ou reduzindo drasticamente o período de colheita (MELO, 2001).

A classificação deste fungo em raças é baseada na reação diferencial de germoplasmas de tomateiro, sendo conhecidas atualmente três raças: 1, 2 e 3. No Brasil, a raça 1 é a mais prevalente sendo controlada com a utilização de cultivares resistentes. Entretanto, a raça 2 vem crescendo de importância nos principais Estados produtores devido à suscetibilidade dos cultivares comerciais. A raça 3 foi verificada recentemente no Brasil. O surgimento de raças mais virulentas do fungo requer um estudo constante de genes de resistência em genótipos resistentes e a introdução destes em cultivares comerciais (REIS et al., 2005).

A resistência de plantas contra doenças está associada a um conjunto de respostas de defesa ativadas pelo hospedeiro após o contato com agentes patogênicos. A ativação dessas respostas em plantas depende da eficiência do hospedeiro em reconhecer a presença de patógenos pelo mecanismo de percepção e transdução de sinais, que envolvem alterações transitórias no fluxo de íons através da membrana plasmática e mudanças no estado de fosforilação de várias proteínas. Como consequência desse processo, ocorre a ativação de fatores de transcrição no núcleo da célula vegetal, com a expressão subsequente de genes de defesa (THATCHER et al., 2005). A resistência é frequentemente manifestada como uma resposta de hipersensibilidade, que resulta na morte celular localizada no sítio de penetração do patógeno. Outras respostas de resistência podem incluir alterações estruturais, o acúmulo de espécies de oxigênio reativas, a síntese de metabólitos secundários e a produção de uma ampla variedade de moléculas de defesa, tais como proteínas antimicrobianas (SCHENK et al., 2000; ROS et al., 2004).

Tem sido demonstrado, em diferentes interações hospedeiro-patógeno estudadas a ativação de diversos mecanismos bioquímicos de resistência. Entre esses, estão a alteração da parede celular vegetal pelo depósito de calose e lignina, o aumento na atividade de enzimas, tais como, fenilalanina amônia-liase, chalcona isomerase e peroxidases ou, ainda, o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese ("pathogenesisrelated proteins", proteínas-PR) e fitoalexinas (BENHAMOU e BÉLANGER, 1998; LATUNDE-DADA e LUCAS, 2001; BOKSHI et al., 2003; IRITI e FAORO, 2003). Uma das estratégias que tem sido utilizada para elucidar as bases moleculares da resistência induzida envolve o estudo da expressão de genes em plantas, após o tratamento com patógenos, elicitores ou indutores químicos (SCHENK et al., 2000; XIONG et al., 2001; ROS et al., 2004).

Estudos sobre a expressão e identificação de genes ativados em plantas resistentes em resposta a microrganismos permitem elucidar os mecanismos de defesa que restringem ou impossibilitam o desenvolvimento de fitopatógenos em combinações hospedeiro-patógeno incompatíveis.

Existem diversas metodologias para identificação de transcritos de genes expressos e que estejam envolvidos no mecanismo de defesa a patógenos, que incluem diferentes técnicas, tais como: diferencial display (DD); análise representacional diferencial (RDA); análise serial de expressão de genes (SAGE) e hibridização subtrativa e PCR supressivo (HSS) (DIATCHENKO et al., 1996; SOARES, 1997). Sendo a HSS uma das mais promissoras para isolamento de genes preferencialmente expressos em plantas submetidas a estresse biótico e abiótico, a qual visa aumentar a abundância relativa de determinadas espécies de cDNA. Esta etapa consiste em realizar uma hibridização entre a população de mRNAs dos tecidos alvo “tester” e controle “driver”, aliado à ligação de oligonucleotídeos que permitem a amplificação final por PCR apenas das espécies presentes no tecido alvo (Clontech Laboratories). Dada à sua eficiência, a HSS vem sendo amplamente empregada para a identificação de genes envolvidos em diferentes tipos de câncer e em processos de diferenciação celular. Ainda são poucos os trabalhos na área vegetal que fizeram uso da HSS, entretanto, estes já confirmaram a eficiência desta técnica (BIRCH et al., 1999; XIONG et al., 2001; ROS et al., 2004).

A identificação de genes diferencialmente expressos tem sido usada como uma importante abordagem experimental para conhecer não somente a função gênica, mas também para compreender como os mecanismos moleculares estão relacionados com processos biológicos (VEDOY et al., 1999).

No presente trabalho, a técnica da HSS foi utilizada para isolar genes diferencialmente expressos no tomateiro envolvidos em duas condições distintas, na resposta de resistência ao *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e tratados com ácido salicílico (AS) com o objetivo de identificar genes codificadores de proteínas-PR, de enzimas de vias metabólicas envolvidas na produção de compostos antimicrobianos e de proteínas envolvidas na transdução do sinal que leva à ativação do estado de resistência.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações gerais

2.1.1. Tomaticultura

Espécie de origem andina, o tomate é denominado botanicamente de *Lycopersicon esculentum* Mill, sendo uma solanácea herbácea de ampla capacidade adaptativa (TRANI, 1999). Apesar da sua origem andina, o tomateiro recebeu melhoramento genético intensivo sendo, atualmente, de cultivo cosmopolita. Entretanto, condição de clima ameno e seco com boa luminosidade é ideal para o desenvolvimento da cultura (MARTINS et al., 1994).

No Brasil, foi introduzida por imigrantes europeus no final do século XIX e tornou-se a segunda hortaliça em importância socioeconômica, sendo cultivada na maioria dos estados brasileiros (SILVA, 1993). Anualmente são cultivados 60,3 mil hectares de tomate com uma produção média anual de aproximadamente 3,5 milhões de toneladas, apresentando uma produtividade média de 58,44 toneladas por hectare. A cultura é explorada em quase todos os Estados brasileiros, principalmente em Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia e Pernambuco (IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2004).

O Estado de Pernambuco é responsável por 6% da produção nacional de tomate área produtora de tomate para consumo "in natura" está concentrada na região do agreste, mais particularmente na microrregião do Brejo de Pernambuco. Essa região apresenta temperaturas moderadas, com médias variando de 15 a 19°C e precipitações não muito intensas, em torno de 800 mm, cujas condições se adequam ao desenvolvimento da cultura. Essa atividade é de importância econômica e social para o Estado, pois gera uma receita estimada em R\$ 19 milhões pela venda da produção de 48 mil toneladas do produto por ano e absorve um grande contingente de mão-de-obra, envolvida direta ou indiretamente no cultivo, da ordem de 2.500 empregos diretos e 1.300 empregos indiretos (MELO, 2001).

A cultura do tomate exige cuidados constantes, pois está sujeita ao ataque de grande número de doenças, pragas e desordens fisiológicas. O produtor que paga, atualmente, entre R\$ 24 mil e R\$ 33 mil por 500 g de sementes de um híbrido "longa vida" para implantar uma lavoura de 150 mil pés de tomate, mesmo lançando mão de todo arsenal de agroquímicos à sua disposição, o manejo inadequado da cultura e, sobretudo o ataque de pragas e doenças, ameaças para o agronegócio, que

atacam a cultura durante todo o seu ciclo e vem causando reduções da ordem de 45% na produtividade da cultura. É importante destacar que o uso indiscriminado de defensivos agrícolas respondem hoje por mais de 35% do custo total de uma lavoura de um hectare de tomate estaqueado, comprometendo a qualidade de vida do trabalhador rural e do consumidor. A geração e a difusão de novas tecnologias, portanto, são fundamentais para o fortalecimento desta cultura (SILVA e GIORDANO, 2000; MELO, 2001; MELO, 2003).

2.1.2. Murcha de fusarium

O fungo *Fusarium* spp. é amplamente distribuído no mundo, encontrado em todos os tipos de solo ou associados a inúmeras espécies vegetais. Este fungo pode sobreviver por longos períodos de forma saprofítica sobre a matéria orgânica do solo e quando possível pode causar inúmeras doenças em diferentes espécies vegetais, sobretudo em culturas de importância econômica, causando grandes prejuízos (REIS et al., 2005).

O *Fusarium* pertence a classe *Hyphomycetes* da subdivisão *Deuteromycotina*, sendo o gênero *Fusarium* caracterizado pelo seu crescimento rápido, colônias com coloração pálida ou colorida (violeta à púrpura escuro ou do creme à laranja), com micélio aéreo e difuso (DOMSCH et al., 1980). A maioria das espécies de *Fusarium* é composta por fungos de solo com distribuição cosmopolita e ativo na decomposição de substratos celulósicos, sendo que alguns isolados são parasitas de plantas. A patogenicidade ao homem é rara, mas muitas espécies causam o apodrecimento de estoques e são importantes produtoras de toxinas (DESJARDINS et al., 2000; LESLIE et al., 2001; ZEMANKOVA e LEBEDA, 2001; GODOY e COLOMBO, 2004).

Puhalla, (1981) as duas principais formas de esporos de *Fusarium* são os microconídios e os macroconídios. Os microconídios são unicelulares e uninucleados; os macroconídios mais comuns são multicelulares, mas cada célula tem somente um núcleo. Todos os núcleos de um macroconídio, contudo, são descendentes mitóticos de um mesmo núcleo progenitor e são, portanto geneticamente idênticos. Os estágios sexuais de *Fusarium* são ascomicetos; o esporo sexual é o ascósporo. Alguns estados perfeitos têm ascósporos bicelulares e são alocados ao gênero *Nectria*. Cada célula de um ascósporo bicelular é

uninucleada e ambos núcleos são geneticamente idênticos. Outros estados perfeitos, como é o caso em *Gibberella* sp., formam ascósporos multicelulares.

Dentro do gênero *Fusarium*, há uma série de variações nas características morfológicas e patogênicas, resultando em uma classificação complexa dividida em seções, *formae speciales* e raças (OLIVEIRA e COSTA, 2002).

O conceito *formae speciales* foi aplicado por Snyder e Hansen (1953) para reconhecer isolados patogênicos que foram morfológicamente semelhantes a isolados saprofíticos de mesma espécie, mas que diferenciam em sua habilidade para parasitar hospedeiros específicos. Isolados patogênicos de *F. oxysporum* estão classificados dentro de mais de 120 *formae speciales* e raças.

A "murcha de fusarium", causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Snyder e Hansen), é uma doença que ocorre em todas as regiões onde o tomate é cultivado, podendo se manifestar em quaisquer estádios de desenvolvimento da planta, embora mais comum no início do florescimento e frutificação, sendo o tomate o único hospedeiro deste fungo de solo. Este patógeno penetra na planta pela raiz, através dos pêlos absorventes ou por ferimentos, colonizando o sistema vascular das plantas suscetíveis no sentido ascendente, podendo atingir frutos e sementes. A doença ocasiona o amarelecimento geral da planta, iniciando-se pelas folhas inferiores e progredindo para o terço superior. Segue-se uma murcha generalizada e as folhas secam. Cortando-se o caule longitudinalmente, constata-se uma coloração marrom típica acompanhando os vasos lenhosos (AGRIOS, 2005).

O fungo é disseminado a longas distâncias por sementes contaminadas sendo o vento, a água e os implementos agrícolas são os principais responsáveis pela disseminação à curta distância. O desenvolvimento da doença é favorecido por temperaturas entre 21 a 33°C, sendo 28°C o ótimo. Plantas cultivadas em solos ácidos, pobres, com pouca água e deficientes em cálcio tendem a ser mais afetadas (AGRIOS, 2005). Como em todas as doenças vasculares de plantas, o controle químico não é eficiente. O uso de variedades resistentes ao fungo constitui o melhor meio de controle da doença, já que o fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pode permanecer no solo por algumas décadas (BRAYFORD, 1992).

Já foram constatadas, pelo menos, três raças fisiológicas do fungo. Existe a predominância da raça 1, mas, em muitas regiões do mundo, a raça 2 tem aumentado de importância, a raça 3 apresenta uma distribuição geográfica mais

limitada e foi registrada no Brasil no Estado do Espírito Santo. Esta doença pode se tornar importante no Brasil, devido ao fato de cultivares adaptados e com resistência à raça 3 ainda não estarem amplamente disponíveis, daí a preocupação dos melhoristas em incorporar genes de resistência a estas raças em novos híbridos e variedades (AGRIOS, 2005; REIS et al., 2005). Raças de interação gene-a-gene foi proposta entre *F. oxysporum* e cultivares hospedeiros, sendo a resistência monogênica e dominante. No caso do tomate, o gene I-2 confere resistência para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2 (ORI et al., 1997).

2.2. Ativação da expressão de genes de resistência

Além de toda sua importância socioeconômica o tomateiro é um organismo modelo já bem estabelecido para estudo de muitos processos biológicos, apresentando diversos fatores que facilitam estudos de desenvolvimento de planta e maturação dos frutos, bem como interação planta-patógeno (MATHEWS, et al., 2003). Possui um genoma de tamanho médio (950 Mb), facilidade na transformação genética, diversidade de metabólitos secundários resultando assim em um excelente modelo de plantas cultivadas para pesquisa genética e moleculares (FRARY et al., 2000). Comparadas com outras plantas comerciais, um número relativamente grande de características determinada por um único gene já foram descritas em tomate, estima-se que 1200 características monogênicas foram identificadas (STEVENS e RICK, 1986; HILLE et al., 1989). Clonagem baseadas em mapas no tomateiro resultaram na primeira clonagem de loci de características quantitativas (FRARY et al., 2000; FRIDMAN et al., 2000). Existe uma estimativa de que o genoma do tomate codifica aproximadamente 35.000 genes, que na sua maioria presentes nas regiões eucromáticas, correspondendo a um quarto do DNA total nuclear (VAN DER HOEVEN et al., 2002).

Admite-se que maior resposta de defesa seja aquela que acarreta a biossíntese e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-PR). Essas proteínas são, portanto, induzidas em situações patológicas ou relacionadas. As situações patológicas referem-se a todos os tipos de estádios da infecção, incluindo a resposta de resistência de hipersensibilidade e o ataque parasítico por nematóides, insetos fitófagos, e herbívoros (VAN LOON e VAN STRIEN, 1999). As situações relacionadas podem ocorrer após a aplicação de substâncias químicas

que simulam o efeito da infecção do patógeno, como é o caso do ácido salicílico (AS), cujas respostas desencadeadas levam ao surgimento das proteínas PR (VAN LOON, 2004), as quais requerem a produção de um sinal da molécula de AS durante a resposta de resistência (HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996; RYALS et al., 1996; KLESSIG e MALAMY, 1998; PARK et al., 2003).

Uma série de estudos constatou que o AS desempenha um papel chave na sinalização da resistência sistêmica adquirida (RSA). A partir de relatos de Malamy et al. (1990), Métraux et al. (1990) e Rasmussen et al. (1991), os quais constataram que o nível de AS aumentou expressivamente em tabaco ou pepino após a infecção do patógeno, um considerável número de dados tem estabelecido correlação entre a concentração de AS e o estabelecimento do aumento da resistência à doença em diversas plantas (DEMPSEY et al., 1993; UKNES et al., 1993; YALPANI et al., 1999; CAMERON et al., 2004). Foi verificado também que a aplicação de AS exógeno é efetiva na indução de genes de defesa, resultando no aumento da resistência, podendo, por sua vez, converter uma resposta de susceptibilidade em resistência (DELANEY et al., 1998).

Em plantas superiores, o AS é sintetizado a partir do ácido trans-cinâmico, via ácido cumárico ou ácido benzóico (RYALS et al., 1994). O benzaldeído é, portanto, um intermediário desse caminho que promove o acúmulo de AS e a expressão de resposta de defesa em plantas, como o tabaco (RIBNICKY et al., 1998). Dessa forma, como discutido por Ward et al. (1991), tal caminho fornece um elo entre a indução da biossíntese de fenilpropanóide pelo patógeno e a produção do sinal de RSA.

Assim, o AS desempenha um importante papel no caminho da transdução (WARD et al., 1991, YALPANI et al., 1991, HENNIG et al., 1999; VERNOOIJ et al., 2004) e na ativação de várias respostas de defesa da planta seguida ao ataque do patógeno. Os mecanismos por meio dos quais o AS media efeitos são variados e podem envolver alterações na atividade ou síntese de certas enzimas, aumentando a expressão do gene de defesa, potencializando várias respostas de defesa e/ou a geração de radicais livres (DEMPSEY et al., 1999).

As plantas não aceitam de modo passivo as agressões que sofrem de um grupo de patógenos potenciais tais como fungos, bactérias, vírus, nematóides, insetos ou agentes não-biológicos como radiação, temperaturas extremas, dentre outros. Para sobreviver, ao longo da evolução, elas desenvolveram mecanismos

sofisticados de resposta a danos e doenças que são acionados a partir do reconhecimento da agressão. As alterações que constituem a resposta de defesa das plantas, devido ao estresse causado por patógenos, têm sido intensamente estudadas com o objetivo do melhoramento vegetal (PRITSCH et al., 2000; FLUHR, 2001; DAVIS et al., 2002)

A interação entre planta e patógenos pode ser dividida em dois tipos básicos: a interação compatível e a interação incompatível. Na interação compatível, o patógeno invade o tecido vegetal, multiplica-se e provoca a doença na planta. Na interação incompatível, o patógeno, ao penetrar no tecido vegetal, ativa as defesas da planta e estas defesas ativadas impedem a multiplicação do patógeno levando à resistência. É de fundamental importância nesse processo uma interação gene-a-gene entre a planta e o patógeno (FLOR, 1971).

Tem sido demonstrado, em diferentes interações hospedeiro-patógeno, que a proteção de plantas contra uma ampla variedade de fitopatógenos e de pragas se dá devido à ativação de diversos mecanismos de resistência. Entre os mecanismos ativados têm sido observadas a resposta de hipersensibilidade (RH), resultando na morte localizada de células do hospedeiro no sítio de infecção do patógeno (ORBER et al., 2002; SILUÉ et al., 2002) e alterações estruturais, levando ao fortalecimento da parede celular vegetal pelo depósito de calose e de lignina (BENHAMOU e BÉLANGER, 1998; HE et al., 2002) ou pela formação de papila junto à parede celular no sítio de penetração do patógeno (BESSER et al., 2000). Foi detectado o acúmulo de peróxido de hidrogênio (IRITI e FAORO, 2003), de fitoalexinas (HWANG et al., 1997; LATUNDE-DADA e LUCAS, 2001), de proteínas-PR (BOKSHI et al., 2003; ZIADI et al., 2001) e também, um aumento na atividade de várias enzimas, tais como lipoxigenase (BUZI et al., 2004), fenil alanina liase (STADNIK e BUCHENAUER, 2000), chalcona isomerase (LATUNDE-DADA e LUCAS, 2001), peroxidases (BAYSAL et al., 2003) e polifenol oxidases (THALER et al., 2001).

A morte localizada de algumas células vegetais no sítio de penetração de patógenos pode constituir em um processo eficaz para a contenção de patógenos biotróficos, que necessitam de células vivas para obtenção de nutrientes durante seu desenvolvimento. No caso de organismos necrotróficos, a morte celular pode ser nociva, pois o colapso da célula vegetal acarreta a liberação de compostos pré-formados, estocados no vacúolo, tóxicos aos microrganismos, que se acumulam nos

sítios de infecção impossibilitando o estabelecimento desses patógenos (HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996).

2.3. Hibridização subtrativa por supressão (HSS)

A identificação de genes de hospedeiros envolvidos em respostas de defesa é importante para a elucidação dos mecanismos de resistência em plantas contra fitopatógenos. A seleção diferencial de bibliotecas de cDNA, produzidas a partir de mRNAs isolados de plantas inoculadas, tratadas com elicitores ou indutores de resistência e de cultura de células, tem sido utilizada para identificar genes relacionados à defesa em muitas interações hospedeiro-patógeno (CHEN, 2002).

Existem diversas estratégias para identificação de transcritos preferencialmente expressos, uma das mais promissoras é a hibridização por supressão subtrativa baseada em PCR (HSS). Essa metodologia para o isolamento de genes diferencialmente expressos foi desenvolvida por Diatchenko et al. (1996), e permite comparar duas populações de mRNA e obter clones de transcritos que estão sendo expressos diferencialmente em um determinado tecido ou órgão, sob influência de uma determinada condição do ambiente, num determinado momento, resultando em uma mini-biblioteca enriquecida de genes, fornecendo amplo material para a comparação de populações de mRNAs. A técnica HSS baseia-se em converter as populações de mRNA em cDNA, onde uma população de cDNA que contém os genes de interesse (normalmente obtido de tecido que sofreram o estresse) é chamado de "tester" e o cDNA da outra população (normalmente obtido de tecido que não sofre estresse) é chamado de "driver". As duas populações de cDNA "tester" e "driver" passam por um processo de hibridização subtrativa, ou seja, eliminação dos cDNA comuns as duas populações e, posteriormente são amplificados por PCR, apenas os cDNA que são expressos na população de interesse. Sua principal vantagem é a ausência de introns nas seqüências clonadas, o que facilita a identificação de seqüências expressas, pois somente a seqüência codificante "exons" é clonada (DIATCHENKO et al., 1996; MALONE et al., 2006).

As várias etapas da HSS e seu princípio estão representados de forma esquemática na Figura 1. A população de cDNA das plantas que sofreram o estresse, denominada de "tester", é ligada separadamente à dois tipos de adaptadores (adaptador 1 e 2R). A população de cDNA de planta controle,

denominada “driver”, não é ligada a qualquer adaptador. Após a desnaturação dos cDNAs “tester” e “driver”, os cDNAs da planta controle “driver” são adicionados em excesso a cada uma das duas amostras das plantas inoculadas, para a primeira reação de hibridização. Essa reação resulta na formação de diferentes produtos, como a molécula C que representa o híbrido formado entre seqüências de cDNA comuns à planta estressada e ao controle. Para a segunda reação de hibridização, as amostras são misturadas sem desnaturação prévia, juntamente com a adição de um excesso de cDNA desnaturado proveniente de planta controle. Ocorre então, a formação do híbrido E, que representa os cDNAs presentes apenas em plantas inoculadas, não comuns às plantas controle. Após o preenchimento das extremidades dos híbridos de cDNAs com os adaptadores, as amostras são submetidas à reação de PCR com *primer* específico para as seqüências dos adaptadores (PCR *primer* 1). Apenas os híbridos de cDNA do tipo E que contêm os dois tipos de adaptadores, apresentam os sítios de andamento para o *primer*. Esse processo permite, portanto, a amplificação exponencial por PCR apenas dos cDNAs que representam os genes expressos diferencialmente em plantas estressadas. Em seguida, os produtos da reação de PCR são submetidos a uma segunda reação de amplificação (*Nested* PCR) com os *primers* específicos *Nested* PCR *primer* 1 e *Nested* PCR *primer* 2R, correspondentes às regiões mais internas dos adaptadores 1 e 2R, respectivamente. Essa reação possibilita um enriquecimento das seqüências expressas diferencialmente (Clontech Laboratories).

Dada à sua eficiência, a HSS vem sendo amplamente empregada para identificar genes diferencialmente expressos na interação planta-patógeno, em diferentes tipos de câncer e em processos de diferenciação celular. Ainda são poucos os trabalhos na área vegetal que fizeram uso da HSS, entretanto, estes já confirmaram a eficiência desta técnica. Birch et al. (1999) isolaram genes de batata, induzidos nos primeiros estágios da resposta de hipersensibilidade (RH) à *P. infestans*, utilizando a técnica da HSS para gerar uma biblioteca de cDNA enriquecida de seqüências induzidas na RH. As seqüências de cDNA obtidas foram comparadas com aquelas depositadas em bancos de dados internacionais (“National Center for Biotechnology Information”, NCBI). Os produtos dos genes isolados apresentaram similaridade com moléculas sinalizadoras envolvidas na diferenciação celular, apoptose (morte celular programada) e na transdução de sinal da RH. Esta técnica foi utilizada, também, por Xiong et al. (2001), permitindo a identificação de

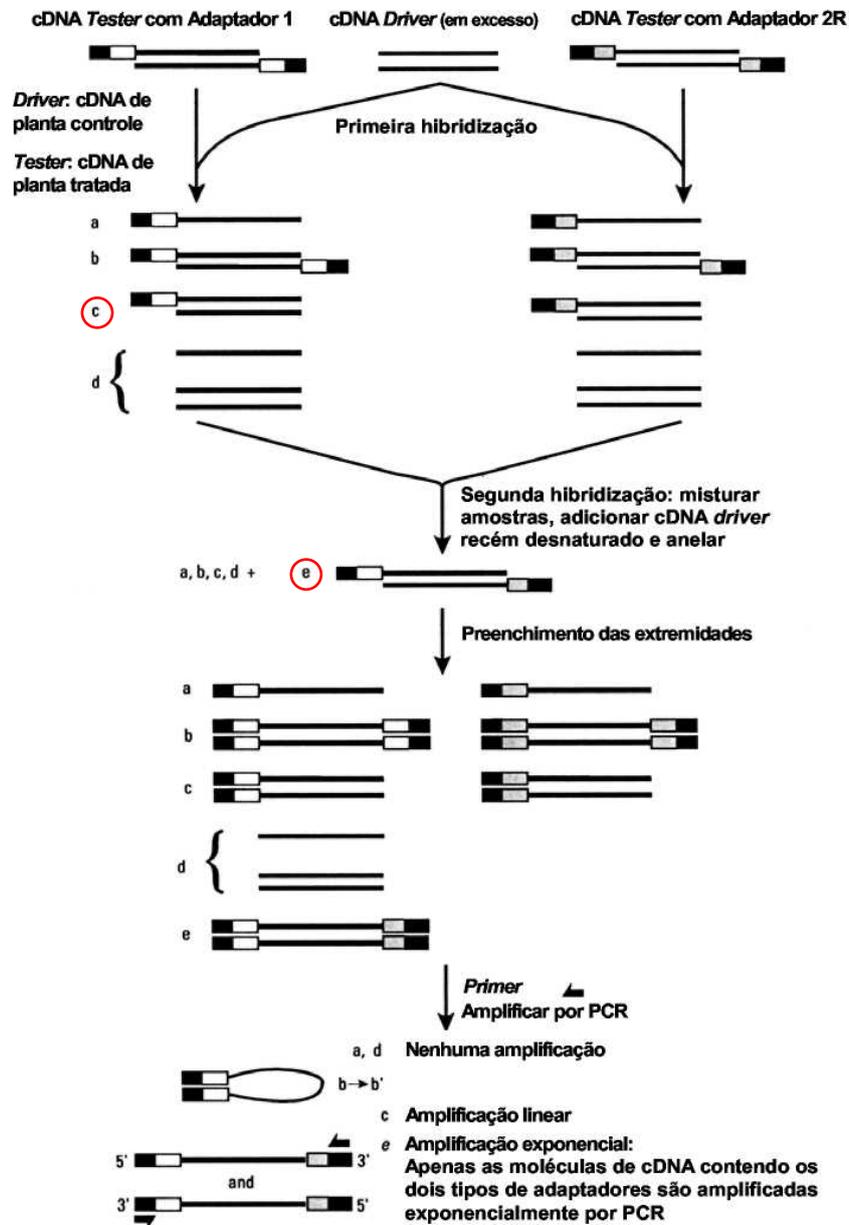


Figura 1: Representação diagramática da hibridização subtrativa por supressão. As linhas sólidas representam os cDNAs “tester” ou “driver”, as caixas sólidas representam a região externa dos adaptadores 1 e 2R que correspondem à seqüência do *primer* utilizado no PCR (*PCR primer* 1); as caixas claras representam a região interna do adaptador 1 e da seqüência do *Nested PCR primer* 1 correspondente; as caixas sombreadas representam a região interna do adaptador 2R e da seqüência do *Nested PCR primer* 2R correspondente (Adaptado de Clontech Laboratories).

genes envolvidos na resistência de plantas de arroz contra *Pyricularia grisea* e por Dellagi et al. (2000), para o isolamento de genes de batata, ativados na interação compatível com a bactéria patogênica *Erwinia carotovora*. Também foi identificado um importante fator de transcrição da família WRKY (domínio que possui os aminoácidos conservados: triptofano, arginina, lisina e tirosina), envolvido na indução de genes codificadores de proteínas-PR. A regulação desse gene foi investigada durante as interações compatíveis e incompatíveis de plantas de batata com *Phytophthora infestans* (DELLAGI et al., 2000).

Em tomateiro, o gene de resistência *Pto* confere resistência a bactéria patogênica *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, portadora do gene de avirulência *avrPto*. A superexpressão do gene *Pto* sob o controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor, ativa nas plantas de tomate, de forma constitutiva, respostas de defesa na ausência de infecção pelo patógeno e aumenta, também, a resistência inespecífica. Para elucidar os mecanismos de resistência, envolvidos nesta interação incompatível, Xiao et al. (2001), empregaram, também, a HSS. A técnica possibilitou o isolamento de 82 clones de cDNAs em plantas de tomate 35S::*Pto* correspondendo a genes envolvidos em diversos mecanismos de defesa, como transdução de sinal, resposta de hipersensibilidade, estresse oxidativo e proteólise.

A interação planta-patógeno foi também estudada em batata inoculada com *P. infestans* utilizando a técnica de HSS em combinação com a hibridização com microarranjo em cultivares resistentes e susceptíveis. Dentro de 531 clones gerados e seqüenciados, foram achados 285 genes únicos dos quais foram selecionados 182 clones para análise adicional com a hibridização de microarranjo. Entre estes clones estavam principalmente genes associados com estresse e / ou mecanismos de defesa (ROS et al., 2004).

A técnica da hibridização subtrativa foi utilizada por Takemoto et al. (2003), para gerar uma biblioteca de cDNA enriquecida de genes induzidos em plantas de fumo, após o tratamento com o elicitor de respostas de defesa, constituído por componentes da parede celular de hifas de *P. infestans*. Foram isolados 19 genes, incluindo aqueles codificadores de proteínas-PR, como β -1,3-glucanase, ou de proteínas da parede celular vegetal, como a extensina e uma proteína rica em glicina. Os autores verificaram, também, o padrão de expressão desses genes, em resposta ao tratamento com ácido salicílico e metil jasmonato ou à inoculação com a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, não patogênica à *Nicotiana tabacum*.

Os resultados obtidos indicaram que a ativação da transcrição desses genes é regulada por diferentes moléculas sinalizadoras e que os respectivos produtos estão envolvidos em processos distintos relacionados à resistência.

Mahalingam et al. (2003) identificando em *Arabidopsis*, genes diferencialmente expressos em resposta ao ácido salicílico, utilizou tecido foliar após 24 horas de exposição para construção biblioteca HSS. Já a mudança da expressão gênica em plantas, em resposta a fitopatógeno de solo são geralmente estudas em tecido radicular, após período de germinação e penetração do fungo (DIVON et al., 2005; OLIVAIN et al., 2006).

Deve ser salientado, que além dos aspectos mencionados, a técnica de HSS permite o enriquecimento de seqüências raras cerca de 1000 vezes (DIATCHENKO et al., 1996). Os genes associados à resistência em plantas não são expressos de forma abundante após a respectiva ativação, ocorrendo a transcrição de um número pequeno de cópias, o que dificulta seu isolamento e caracterização. Portanto, a técnica de HSS poderá facilitar a caracterização de genes em tomateiro associados a respostas a resistência.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Academic. 2005. 922p.
- BAYSAL, Ö.; SOYLU, E.M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. **Plant Pathology**, Oxford, v.52, n.6, p.747-753, 2003.
- BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R.R. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**, Mineapoles, v.118, p.1203–1212, 1998.
- BENHAMOU, N.; JOOSTEN, M.H.A.J.; WIT, P.J.G.M. Subcellular localization of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissue infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Plant Physiol.** v.92, p.1108-1120, 1990.
- BESSER, K. et al. Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.1, n.5, p.277-286, 2000.
- BIRCH, P.R.J. et al. Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.12, n.4, p.356-361, 1999.
- BOKSHI, A.I.; MORRIS, S.C.; DEVERALL, B.J. Effects of benzothiadiazole and acetylsalicylic acid on β -1,3-glucanase activity and disease resistance in potato. **Plant Pathology**, Oxford, v.52, n.1, p.22-27, 2003.
- BRAYFORD, D. Description of fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Mycopathol.** v118, p.51-53, 1992.
- BUZI, A. et al. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v.152, n.1, p.34-42, 2004.
- CAMERON, R. K., DIXON, R., LAMB, C. Biologically induced systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v.5, p.715-25, 2004.
- CHEN et al. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. **Plant cell**. Rockville, v. 14, p 559-574, 2002.
- DAVIS, K. R. et al. Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. **Plant Journal**, v. 17, n.6, p. 603 –610, 2002.
- DELANEY, T. P. et al. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. **Science**, Washington, DC, v.266, p.1247-1250, 1998.

DELLAGI, A. et al. 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**, St. Paul, v.13, n.10, p.1092-1101, 2000.

DEMPSEY, D. M., WOBBE, K., KLESSIG, D. F. Resistance and susceptible responses of *Arabidopsis thaliana* to turnip crinkle virus. **Phytopathology**, v.83, p.1021-9, 1993

DEMPSEY, D. M. A., SHAH, J., KLESSIG, D. F. Salicylic acid and disease resistance in plants. **Critical Reviews Plant Sciences**, v.18, n.4, p.547-75, 1999.

DESJARDINS, A.E. et al. Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.1377-1383, 2000.

DIATCHENKO, L. et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v.93, p.6025-6030, 1996.

DIVON, H. H, et al. Nitrogen-responsive genes are differentially regulated in planta during *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infection. **Molecular plant pathology**, v.6, n.4, p.459-470, 2005.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. **Compendium of soil fungi**. New York: Academic Press, p. 859, 1980.

FLOR, H.H. Current status of gene-for-gene concept. **Annual Review Phytopathology**, Palo alto, v. 9, p. 275-296, 1971

FLUHR, R. Sentinels of Disease: Plant Resistance Genes. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1367-1374, 2001.

FRARY, A. et al. A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. **Science**, Washington, DC, v. 289, p.85-88. 2000.

FRIDMAN, E.; PLEBAN, T.; ZAMIR, D. A recombinant hotspot delimits a wild QTL for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. **Proceedings Natural Academy Science of Cultivaded Plants**. Kiew, v. 97 p.4718-4723, 2000.

GODOY, P.; COLOMBO, A.L. Biologia e relevância clínica do gênero *Fusarium* spp. **Prática Hospitalar**, v.34, p.136-140, 2004.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p.1773-1791, 1996.

HE, C.Y.; HSIANG, T.; WOLYN, D.J. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic

strains of *Fusarium oxysporum*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n.2, p. 225-230, 2002.

HENNIG, J., DEWEY, R. E., CUTT, J. R., KLESSIG, D. F. Pathogen, salicylic acid and developmental dependent expression of a β -1,3-glucanase/GUS gene fusion in transgenic tobacco plants. **Plant J.**, v.4, p. 481-93, 1999.

HILLE, J. et al. Tomato: A crop species amenable to improvement by cellular and molecular methods. **Euphytica**, Wageningen, v. 42, p.1–23, 1989

HWANG, B.K. et al. Accumulation of β -1,3- glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL- β -amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.51, n.5, p.305-322, 1997.

IBGE - Produção Agrícola Municipal, [S. l.], 2004. <<http://www.ibge.org.br/#>> acesso em: 11 de set de 2006

IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v.151, n.3, p.171-180, 2003.

KLESSIG, D. F., MALAMY, J. The salicylic acid signal in plants. **Plant Mol. Biol.**, v.26, p.1439-58, 1998.

LATUNDE-DADA, A.O.; LUCAS, J.A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.58, n.5, p.199-208, 2001.

LESLIE, J.F.; ZELLER, K.A.; SUMMERELL, B.A. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.59, p.107-117, 2001.

MAHALINGAM, R. et al., Characterization the stress / defense transcriptome of *Arabidopsis* genome biology. **Genome biology**. 4:R20, 2003.

MALAMY, J. CARR, J. P., KLESSIG, D. F., RASKIN, I. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. **Science**, Washington, DC, v.250, p.1002-4, 1990

MALONE, G. et al. Prospecção de genes em bibliotecas de cDNA. **Revista Brasileira Agrobiologia**, Pelotas, v. 12, n. 1, p. 07-13, jan-mar, 2006.

MARTINS, G.; CASTELLANE, P.D.; VOLPE, C.A. Influência da casa de vegetação nos aspectos climáticos e em época de verão chuvoso. **Horticultura brasileira**, Brasília, DF, v.12, n.2, p.131-135, 1994.

MATHEWS H. et al. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 1689–1703, August 2003.

MELO, P.C.T. A cadeia agroindustrial do tomate no Brasil: Retrospectiva da década de 90 e cenários para o futuro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v.19, jul, 2001. Suplemento.

MELO, P.C.T. A cadeia agroindustrial do tomate no Brasil: Retrospectiva da década de 90 e cenários para o futuro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v.19, Suplemento, palestras, julho (2003).

MÉTRAUX, J. P. et al. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. **Science**, Washington, DC, 250:1004-1006, 1990.

OLIVEIRA, V.C.; COSTA, J.L.S. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.27, p.631-634, 2002.

OLIVAIN et al. Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. **Applied and environmental microbiology**, v.72, n.2, p.1523-123, 2006.

ORI N., et al. The *12c* family from the wiit disease resistance locus *12* belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. **Plant Cell**, Rockville, V. 9, p.521-532, 1997.

OROBER, M.; SIEGRIST, J.; BUCHENAUER, H. Mechanisms of phosphate-induced disease resistance in cucumber. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.108, n.4, p.345-353, 2002.

PARK S. Y. et al. Characterization of salicylic acid-induced genes in Chinese cabbage. **Plant Cell Rep.**, v.21, p.1027–1034, 2003.

PRITSCH, C. et al. Fungal Development and Induction of Defense Response Genes During Early Infection of Wheat Spikes by *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 2, p.159–169, 2000.

PUHALLA, J.E. Genetic considerations of the genus *Fusarium*. In: Nelson, P.E.; Toussoun, T.A.; Cook, R.J. (Ed.). **Fusarium: diseases, biology, and taxonomy**. Pennsylvania: Pennsylvania State University, v.27, p.291-305, 1981.

RASMUSSEN, J. B., HAMMERSCHMIDT, R., ZOOK, M. N. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*. **Plant Physiology**, Oxford, v.97, p.1342-7, 1991.

REIS, A.; COSTA, H.; BOITEUX, L.S.; LOPES, C.A. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, p. 426-428, 2005.

RIBNICKY, D. M., SHULAEV, V. RASKIN, I. Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, Oxford, v.118, p.565-72, 1998.

ROS B.;TUMMLER F.; WENZEL G. Analysis of differentially expressed genes in a susceptible and moderately resistant potato cultivar upon *Phytophthora infestans* infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.5 n.3, p. 191–201, 2004.

RYALS, J.A. et al., Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, Rockville, v.8, n.10, p.1809-1819, 1996.

RYALS, J., UKNES, S., WARD, E. Systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, Oxford, v.104, p.1109-1112, 1994.

SCHENK, P.M. et al. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.97, n.21, p.11655-11660, 2000.

SILUÉ, D.; PAJOT, E.; COHEN, Y. Induction of resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) in cauliflower by DL- β -amino-n-butanoic acid (BABA). **Plant Pathology**, Oxford, v.51, n.1, p.97-102, 2002.

SILVA, F.A.A. Situação atual e perspectivas da tomaticultura nordestina. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, V.11, n.2, p. 183-187,1993.

SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B. Produção mundial e nacional. In: tomate para processamento industrial. Silva, J.B.C.; Giordano, L.B. **EMBRAPA Comunicação para transferência de tecnologia/ EMBRAPA Hortaliças**. p.8-11. 2000.

STADNIK, M.J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f.sp.*tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.57, p.25- 34, 2000.

STEVENS, M.A.; RICK, C.M. Genetics and breeding. In: ATHERTON J.G.; RUDICH J. (Ed.). **The Tomato Crop**, London: Chapman and Hall, 1986 p. 35–109.

SNYDER, W.C.; HANSEN, H.N. Species concept, genetics and pathogenicity in *hypomyces solani*. **Phytopathology**, v. 44, p.338-342, 1953.

SOARES M.B. Identification and cloning of differentially expressed genes. **Curr Opin Biotechnol**, v.8, p.542–546, 1997.

TAKEMOTO, D. et al. Disease tressinducible genes of tobacco: expression profile of elicitor-responsive genes isolated by subtractive hybridization. **Physiologia Plantarum**, Compenhagem, v.118, p. 545-53, 2003.

THALER, J.S. et al. Jasmonate-mediated induced plant resistance affects a community of herbivores. **Ecological Entomology**, College Park, v.26, n.3, p.312-324, 2001.

THATCHER L.F.; ANDERSON J.P.; SINGH K. B. Plant defence responses: what have we learnt from Arabidopsis?. **Functional Plant Biology**, v. 32, p. 1–19, 2005.

TRANI, P.E. Fertirrigação para hortaliças no Estado de São Paulo. In: WORKSHOP DE FERTIRRIGAÇÃO, 1, Piracicaba, 1999. Resumos. Piracicaba: DER/ESALQ/USP, 1999. p. 35-36.

UKNES, S. et al. Biological induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. **Molecular Plant-Microbe Interact.** V. 6, 692-698, 1993.

VAN DER HOEVEN, R, et al. Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. **Plant Cell**, Rockville, v.14, p.1441–1456, 2002.

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**, London v.55, p.85-97, 1999.

VAN LOON, L. C. Pathogenesis-related proteins. **Plant Mol. Biol.**, v.4, p.111-6, 2004.

VEDOY C.G; BENGTON M.H; SOGAYAR M.C. Hunting for differentially expressed genes. **Brazilian Journal of Medical and Biological**, v. 32, p.877-884, 1999.

VERNOOIJ, B., et al. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. **Plant Cell**, Rockville, v.6, p.959-65, 2004.

WARD, E. R. et al. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **Plant Cell**, Rockville, v.3, p.1085-94, 1991.

XIAO, F.; TANG, X.; ZHOU, J.-M. Expression of 35S::*Pto* globally activates defense-related genes in tomato plants. **Plant Physiology**, Oxford, v.126, p.1637-1645, 2001.

XIONG, L. et al. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.14, n.5, p.685-692, 2001.

YALPANI, N. et al. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. **Plant Cell**, Rockville, v.3, p.809-18, 1991.

YALPANI, N., SHULAEV, V., RASKIN, J. Endogenous salicylic acid levels correlate with accumulation of pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. **Phytopathology**, v. 83, p.702-708, 1999.

ZEMANKOVA, M. LEBEDA, A. *Fusarium* species, their taxonomy, variability and significance in plant pathology. Review. **Plant Protection Science UZPI**, v.37, p.25-42, 2001.

ZIADI, S. et al. Characterization in apple leaves of two subclasses of PR-10 transcripts inducible by acibenzolar-S-methyl, a functional analogue of salicylic acid. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.59, p.33-43, 2001.

CAPÍTULO II

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM TOMATEIRO INDUZIDOS POR ÁCIDO SALICÍLICO E POR *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Artigo submetido para publicação na
Revista "Biotechnology Letters".

ISSN: 0141-5492

**Identificação de genes diferencialmente expressos em tomateiro
induzidos por ácido salicílico e por *Fusarium oxysporum* f. sp.
*lycopersici***

Daniel Oliveira Jordão do Amaral¹, Luciane Vilela Resende¹, Marleide Magalhães de
Andrade Lima², Márcia Vanusa da Silva^{3*}

¹Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

²Núcleo de Biotecnologia, EMBRAPA Algodão, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

³Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

*autor para correspondência (Fax: + 55-81- 2126 8576; E-mail: marcia.vanusa@ufpe.br).

RESUMO

Para comparar o perfil de transcritos no tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) cultivar BRH, que são diferencialmente expressos durante a infecção do fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e pela aplicação exógena do ácido salicílico, molécula mensageira na ativação de resposta de defesa em plantas, foram construídas duas bibliotecas de cDNA utilizando o método da hibridização subtrativa por supressão (HSS). Para construção das bibliotecas subtrativas, foram utilizadas hibridizações entre cDNAs de folhas jovens tratadas e não tratadas com ácido salicílico denominada biblioteca tomate AS, e entre cDNAs de raízes inoculadas e não inoculadas, com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, interação incompatível, denominada biblioteca tomate FO. Foi identificado um total de 307 clones nas duas bibliotecas subtraídas, sendo 143 clones obtidos na biblioteca tomate AS e 164 clones na biblioteca tomate FO. As prováveis funções dos genes foram obtidas pelo seqüenciamento dos clones e subsequente pesquisa de homologia em bancos de dados disponíveis baseado na função de seus ortólogos. Foram encontrados genes com função em diferentes processos relacionados à resistência a fitopatógenos como: resposta de hipersensibilidade, morte celular programada, síntese e transporte de metabólitos antimicrobianos, percepção e transdução de sinal, síntese de proteínas relacionadas à patogênese, metabolismo de lipídeos e degradação controlada de proteínas. Aproximadamente 30% dos genes encontrados nas duas bibliotecas construídas são de genes de função desconhecida, o que pode representar a identificação de novos genes, uma vez que essas bibliotecas estão 64 vezes enriquecidas de genes diferencialmente expressos. Os resultados representam o primeiro relato da expressão gênica global no tomateiro induzido pelo ácido salicílico e pelo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, utilizando a técnica HSS.

Palavras-chave: ácido salicílico, bibliotecas hibridização subtrativa por supressão, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Lycopersicon esculentum*.

INTRODUÇÃO

A muita-de-fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, é uma das doenças mais importantes que ocorre em todas as regiões do mundo onde o tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) é cultivado. Só foram identificadas até então três raças fisiológicas do fungo: raça 1, 2 e 3. Entretanto, a raça 2 vem crescendo de importância nos principais Estados produtores do Brasil devido à suscetibilidade dos cultivares comerciais. O uso de cultivares resistentes constitui a melhor estratégia de controle da doença, já que o fungo pode permanecer no solo por algumas décadas e o controle químico não é eficiente (BRAYFORD, 1992).

As plantas respondem a invasão de patógenos com um arranjo de mudanças bioquímicas e genéticas, incluindo a produção de espécies de oxigênio reativo (EOR), componentes antimicrobianos e antioxidantes. As respostas também podem ser com a ativação da morte celular programada, designada de resposta de hipersensibilidade (RH) e pela ativação sistêmica de defesa moleculares e celulares, denominada de indução de resistência sistêmica ou resistência sistêmica adquirida (RSA) (RYALS, et al., 1994; DONG, 1998; GLAZEBROOK, 1999). Essas respostas são induzidas em situações patológicas ou relacionadas. As situações patológicas referem-se a todos os tipos de estádios da infecção do patógeno (VAN LOON e VAN STRIEN, 1999) enquanto que as situações relacionadas podem ocorrer após a aplicação de substâncias químicas que simulam o efeito da infecção do patógeno, como é o caso do AS, molécula mensageira na ativação de uma das vias da RSA, que é induzido localmente pelo ataque de patógenos e sistematicamente difundido, resultando na proteção de toda a planta (RYALS, et al., 1996; SHAH e KLESSIG, 1999; DEMPSEY, et al., 1999; SHAH, 2003; PARK, et al., 2003)

A identificação de genes de hospedeiros envolvidos em respostas de defesa é importante para a elucidação dos mecanismos de resistência em plantas contra fitopatógenos (THATCHER et al., 2005; DESENDER, et al., 2007). Uma das estratégias que tem sido utilizada para elucidar as bases moleculares da resistência induzida envolve o estudo da expressão de genes em plantas, após o tratamento com patógenos, elicitores ou indutores químicos (KOHLENER et al., 2002; SCHENK et al., 2000; XIONG et al., 2001). Estudos sobre a expressão e identificação de genes

ativados em plantas resistentes em resposta a fitopatógenos permitem elucidar os mecanismos de defesa que restringem ou impossibilitam o desenvolvimento de fitopatógenos em combinações hospedeiro-patógeno incompatíveis (MALECK et al., 2000; MARTINEZ DE ILARDUYA et al., 2003).

Existem diversas metodologias para identificação de transcritos de genes expressos e que estejam envolvidos no mecanismo de defesa a patógenos, que incluem diferentes técnicas, tais como: diferencial display (DD); análise representacional diferencial (RDA); análise serial de expressão de genes (SAGE) e hibridização subtrativa por supressão (HSS). A HSS é uma das técnicas mais promissoras para o isolamento de genes preferencialmente expressos em plantas submetidas a estresse biótico e abiótico, a qual visa aumentar a abundância relativa de determinadas espécies de cDNA (DIATCHENKO et al., 1996; SOARES, 1997). Combinando a técnica de PCR supressivo com as etapas de subtração e normalização numa única reação aumenta a possibilidade de identificação de genes pouco expressos (DIATCHENKO et al., 1999). As vantagens desta técnica incluem a detecção de transcritos de baixa abundância, diferencialmente expressos pela supressão da amplificação e a habilidade para isolar genes sem o conhecimento prévio da sua seqüência ou identidade (MOODY, 2001). Dada à sua eficiência, a HSS vem sendo amplamente empregada em várias espécies de plantas para isolar genes envolvidos em respostas a estresses bióticos e abióticos (BIRCH et al., 1999; BEYER et al., 2001; MONTESANO et al., 2001; KANG et al., 2003; LU et al., 2004).

Os genes associados à resistência em plantas não são expressos de forma abundante após a respectiva ativação, ocorrendo a transcrição de um número pequeno de cópias, o que dificulta seu isolamento e caracterização. Portanto, a técnica de HSS facilitar a caracterização de genes associados às respostas a resistência (DIATCHENKO et al., 1999).

No presente trabalho, a técnica da HSS foi utilizada para identificar genes diferencialmente expressos no tomateiro envolvidos em duas condições distintas, na resposta de resistência ao *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, e ao tratamento com ácido salicílico (AS) pela sua importância como molécula sinalizadora nas respostas das plantas a estresses.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de tomateiro BRH, cultivar resistente a *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2, foram desinfetadas superficialmente em etanol 70% (v/v), por um minuto, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio 2,5% (v/v), contendo tween-20 0,1% (v/v), por 15 minutos, seguidos de cinco lavagens abundantes em água destilada estéril. As sementes foram transferidas para tubos contendo meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), meia força, acrescido de complexo vitamínico B5 (GAMBORG, et al., 1968), 0,8% (p/v) de agar, com pH do meio ajustado em $5,8 \pm 0,2$. Em seguida foram colocadas para germinar em sala de crescimento tendo condições de irradiância em torno de $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas, temperatura em torno de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. As plântulas foram mantidas nessas condições por três semanas após a germinação e em seguida submetidas aos diferentes tratamentos.

Tratamento com ácido salicílico

Plantas com três semanas após a geminação foram pulverizadas com salicilato de sódio 5mM (Sigma, USA) dissolvidos em água destilada autoclavada. As plantas utilizadas para controle foram pulverizadas apenas com água destilada autoclavada. Em seguida, foram levadas para sala de crescimento e expostas à irradiância em torno de $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas, por 24 horas. Dois pares de folhas de cinco repetições foram coletadas, misturadas e utilizadas para extração de RNA total.

Inoculação com *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*

Conídios do fungo *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2, com sete dias de cultivo em meio de cultura BDA foram raspados com auxílio de uma alça de platina e água destilada, em seguida filtrados. A concentração foi aferida em câmara de Neubauer e ajustada para 1×10^7 conídios/mL. Plantas com três semanas após germinação foram utilizadas para inoculação com a solução de conídios do fungo,

utilizando-se o método do corte de raízes. As plantas ficaram imersas nesta solução por um período de 10 minutos. As plantas controles, foram tratadas com água destilada autoclavada, nas mesmas condições das plantas tratadas. Após a inoculação foram transferidas para um novo tubo contendo meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) líquido estéril e levadas para sala de crescimento em condições descritas anteriormente por um período de 72 horas. Em seguida, as raízes de cinco repetições foram coletadas, misturadas e utilizada para extração do RNA total.

Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA Total foi isolado utilizando o TRIZOL (Invitrogen), seguindo-se o procedimento descrito no manual do fabricante. As folhas das plantas que foram estimuladas com o AS, bem como as raízes que foram submetidas ao fusário, foram trituradas até a obtenção de um pó fino em nitrogênio líquido e homogenizado com TRIZOL (100 mg tecido foliar/1 mL de TRIZOL). O rendimento do RNA foi de 50µg/100mg de tecido radicular e foliar. O DNA complementar foi obtido a partir do RNA total extraído de raízes e de folhas de tomateiro, utilizando-se o "SMART PCR cDNA Synthesis Kit" (Clontech Laboratories). O "kit SMART" possibilita a síntese de cDNA de alta qualidade a partir de nanogramas de RNA total ou poli A⁺, necessário para a construção de biblioteca de cDNA (CHENCHIK et al., 1998). A síntese de cDNA foi feita segundo as instruções do manual fabricante.

Hibridização subtrativa por supressão (HSS) e clonagem dos produtos da PCR

A HSS foi realizada utilizando o kit "PCR-Select cDNA Subtraction" (Clontech). As amostras experimentais e controle de cada tratamento foram processadas simultaneamente para redução de falsos positivos. O cDNA preparado a partir das amostras experimentais foi utilizado como "tester" e o obtido da amostra controle como "driver" na construção da subtração *forward* a fim de isolar os fragmentos correspondentes aos genes que tiveram a expressão aumentada após o tratamento. A normalização das seqüências diferencialmente expressas, baseadas em PCR, depende do número de moléculas "tester" ligadas aos adaptadores nas suas extremidades. Se a fração de cDNA "tester" com os

adaptadores for menor que 25%, a ligação deve ser repetida. Foram utilizados oligonucleotídeos específicos de plantas que amplifica o fator 1 α de alongação da tradução (EF-1 α) para testar a eficiência de ligação dos adaptadores, como recomendado pelo fabricante. O fragmento do gene *EF-1 α* de aproximadamente 590 pb foi amplificado com oligonucleotídeo (*EF-1 α* R:5' GACAATCAAGCACTGGAGCA 3' e *EF-1 α* L:5' GATGCTACCACCCCAAGTA 3') utilizando o cDNA ligado ao adaptador como molde. O cDNA "tester" também foi amplificado com o oligonucleotídeo EF-1 α 3' e um oligonucleotídeo específico para um dos adaptadores, que amplifica um fragmento 200 pb, maior que o fragmento gerado com os oligonucleotídeos específicos. Amostras do "pool" de cDNA subtraído e não subtraído foram utilizadas para amplificação de fragmentos do gene EF-1 α e analisadas depois de 15, 20, 25 e 30 ciclos de PCR. Oligonucleotídeos que amplificam um gene PR-4 induzido por estresse biótico, (*Chi3* F:5' GTTTCCAGGTTTTGGTACTGCTGGT 3' e *Chi3* R:5' CCACAATACCTCCTGTAAAATCCAA 3') foram utilizados para testar a eficiência da subtração antes da clonagem dos fragmentos de cDNA. Os produtos purificados da segunda PCR proveniente da HSS *forward*, foram clonados no vetor T/A PCR2.1 TOPO (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. O vetor T/A PCR2.1 TOPO, adequado para clonagem de produtos de PCR, apresenta sítios de reconhecimento para várias enzimas de restrição.

Os produtos de PCR clonados foram transformados utilizando células quimicamente competentes DH5 α para formar a biblioteca subtraída HSS *forward*. As colônias foram transferidas para meio LB líquido suplementado com canamicina 100 μ g/mL e cultivadas por 16 h. o DNA plasmidial foi extraído pelo método de minipreparação por lise alcalina (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Os plasmídeos recombinantes foram identificados por análise de restrição e submetido ao sequenciamento de DNA.

Sequenciamento e análise das seqüências

As seqüências de nucleotídeos de cada inserto foram determinadas em seqüenciador automático de DNA (ABI PRISM 377 Applied Biosystems), utilizando o kit "Big Dye Terminator" (Applied Biosystems), pelo laboratório de sequenciamento de DNA do CENARGEN/Brasília, Brasil). Oligonucleotídeos convencionais M13-*Forward* e M13-*Reverse*, foram utilizados para determinar as seqüências de DNA. As seqüências obtidas foram comparadas, utilizando-se o programa BlastX (ALTSCHUL et al., 1997), com seqüências homólogas em bancos de dados "National Center for Biotechnology Information", NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), "The Institute for Genomic Research", TIGR (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/Blast/index.cgi>) e "DNA Data Bank of Japan" DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast>). O alinhamento de múltiplas seqüências foi realizado com o software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk>) (THOMPSON et al., 1994).

RESULTADOS

A técnica de hibridização subtrativa por supressão, HSS, permitiu isolar genes induzidos por ácido salicílico (AS) e pelo fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FO) em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) cv. BRH e a construção de diferentes bibliotecas de cDNA (Tabela 1).

A eficiência da subtração foi avaliada pela amplificação por PCR do gene do fator de alongação da tradução (*EF-1 α*). A Figura 1 mostra que o fragmento do gene *EF-1 α* foi somente detectado após 30 ciclos de amplificação nas amostras subtraídas e claramente detectável nas amostras não subtraídas depois de 20 ciclos. Já os resultados da eficiência da subtração utilizando um gene diferencialmente expresso, PR-4, relacionada à patogenicidade da classe 4, mostrou forte amplificação nas amostras das bibliotecas subtraídas depois de 20 ciclos de PCR, enquanto que nas amostras não subtraídas os produtos de PCR só foram amplificados a partir de 25 ciclos (Figura 1). A subtração foi eficiente devido aos transcritos do gene *EF-1 α* terem sua expressão reduzida, enquanto que o gene diferencialmente expresso foi substancialmente enriquecido na população de fragmentos de cDNA utilizado na construção da biblioteca. Com base no número de ciclos de PCR requeridos para amplificação equivalentes do produto de PCR correspondente nas amostras de cDNA subtraídos e não subtraídos, fez-se uma estimativa de que a biblioteca subtraída foi de 64 vezes enriquecida de genes diferencialmente expressos. O mesmo resultado foi obtido para a biblioteca tomate AS, dado não mostrado.

As seqüências de 307 clones de cDNAs geradas após a HSS (Tabela 1), sendo 143 clones da biblioteca tomate AS e 164 clones da biblioteca tomate FO. O comprimento dos insertos nas duas bibliotecas variou de 300 a 1100 pb. A homologia foi considerada com valores de E menores do que 10^{-5} (1e-05), sendo, portanto, considerando significativa. Na biblioteca de tomateiro AS, 39 clones codificam proteínas que não apresentam similaridade com seqüências presentes nos bancos de dados utilizados na análise, 46 clones foram similares a proteínas hipotéticas de função desconhecida, 34 clones representam genes implicados em mecanismos de resistência e 24 clones estão associados à manutenção celular e desenvolvimento vegetal. Por outro lado, foi constatado que de um total de 164 clones de cDNAs de genes ativados em tomateiro 72h após inoculação com *F.*

oxysporum f. sp. *lycopersici*, 29 não apresentaram similaridade com seqüências depositadas nos bancos de dados utilizados, 49 são análogos a proteínas hipotéticas presentes nesses bancos de dados, 42 correspondem a genes envolvidos em mecanismos de defesa e 44 associados à manutenção celular e desenvolvimento vegetal.

Como pode ser observado nas Figuras 2 e 3, na biblioteca tomate AS foi encontrado um número maior de genes que não apresentaram similaridade com seqüências dos bancos de dados utilizados na busca da identificação de homologia, bem como genes com função desconhecida (hipotéticos) quando comparados com a biblioteca tomate FO. Na biblioteca tomate FO foi identificado um número maior de genes implicados no mecanismos de defesa de plantas contra fitopatógenos, ativados após a inoculação com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, do que a mesma cultivar tratada com AS. Identificou-se também um grupo de genes, que ainda não foram previamente descritos nos bancos de dados disponíveis, que representam 32% da biblioteca AS e 29% da biblioteca FO (Figuras 2 e 3). Uma das mais interessantes características do HSS foi conseguida com a descrição de fragmentos de cDNA relativamente raros.

Na Figura 4 estão representados os percentuais de genes ativados em tomateiro cv. BRH pelo ácido salicílico biblioteca tomate AS e pela inoculação com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* biblioteca tomate FO, implicados em cada um dos diferentes processos associados à resistência de plantas contra fitopatógenos, detectados nas condições estudadas. Pode ser observado, que na interação cultivar - *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, foi detectado um maior número de genes associados à percepção e transdução de sinal, codificadores de proteínas antimicrobianas, de compostos associados ao estresse oxidativo e morte celular do que na mesma cultivar com resistência induzida pela aplicação do AS. Entretanto, o número de genes associados à síntese e transporte de compostos do metabolismo secundário e de degradação controlada de proteínas foi maior na cultivar BRH com resistência induzida pelo AS do que o inoculado com o patógeno. Ainda na mesma Figura 4, pode-se verificar que a biblioteca tomate FO apresentou um maior número de genes relacionados a manutenção celular do que na biblioteca tomate AS. Em relação à identificação de genes com função desconhecida constatou-se um maior número de genes tanto na biblioteca tomate AS quanto na biblioteca tomate FO, em relação as demais categorias de genes.

As seqüências de 104 clones da biblioteca tomate AS e de 135 clones da biblioteca tomate FO de cDNAs gerados após a HSS, comparadas com aquelas depositadas nos bancos de dados em busca de similaridade/homologia (NCBI, TIRG e DDBJ), permitiram identificar em tomateiro, 58 genes (56%) da biblioteca tomate AS e 86 genes (64%) da biblioteca tomate FO com homologia a genes de plantas de função conhecida. Essas funções estão relacionadas a estresses bióticos e abióticos e associados à manutenção celular e desenvolvimento vegetal. Alguns desses genes, como os da fenil alanina liase, quitinase, proteína abundante da embriogênese tardia, fator de transcrição da família bZip, proteína com domínio dedo de zinco, proteína de resistência à doença I-2 com repetição ricas em leucina estão relacionados a mecanismo de defesa e os genes do citocromo, ubiquitina, apoproteína do fotosistema II, proteína ribossomal 60S estão relacionadas com metabolismo celular (Tabelas 2 e 3).

DISCUSSÃO

A identificação de genes de hospedeiros envolvidos em respostas de defesa é importante para a elucidação dos mecanismos de resistência em plantas contra fitopatógenos. A hibridização subtrativa por supressão (HSS) combina a técnica de PCR supressivo com as etapas de subtração e normalização numa única reação aumentando assim, a possibilidade de identificação de gene pouco expresso (DIATCHENKO et al., 1999). Foram encontrados nas bibliotecas AS e FO genes com função desconhecida, o que pode representar a identificação de genes raros. Resultados semelhantes também foram encontrados em biblioteca de HSS em *Arabidopsis*, batata e tomate em condições de estresse biótico (MAHALINGAM et al., 2003; ROS et al., 2004; OUYANG et al., 2007).

A técnica de HSS utilizada foi útil para enriquecer e identificar genes relacionados à resistência ao fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, bem como genes sinalizados pela molécula do ácido salicílico, no tomateiro, cultivar BRH. Mahalingam et al. (2003) identificando em *Arabidopsis*, genes diferencialmente expressos em resposta ao ácido salicílico, utilizaram também tecido foliar após 24 horas de exposição para construção biblioteca HSS. Já a mudança da expressão gênica em plantas, em resposta a fitopatógeno de solo são geralmente estudas em tecido radicular, após período de germinação e penetração do fungo (BENHAMOU et al., 1990; DIVON et al., 2005; OLIVAIN et al., 2006).

Foi possível isolar no tomateiro com resistência induzida e interação incompatível com o *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, vários clones de cDNA que apresentaram a mesma função gênica, entre estes, podem ser mencionados aqueles codificadores genes envolvidos na síntese de fitoalexinas como a fenil alanina liase (PAL), genes de quinase tipo CIPK e serina / treonina quinases relacionadas à percepção e transdução de sinal, poliubiquitina e ubiquitina relacionados a degradação controlada de proteínas. Esses resultados indicam que alguns compostos relacionados à defesa e associados a diferentes processos são ativados tanto na resistência induzida como na resistência vertical. Mecanismos comuns de respostas foram encontrados por outros autores que utilizaram a técnica do HSS na construção de bibliotecas em diferentes culturas de importância

econômica comparando diferentes condições de estresses (MAHALINGAM et al., 2003; ROS et al., 2004; DEGENHARDT et al., 2005; DIVON et al., 2005).

Apesar de ter sido detectado um número maior de genes implicados em mecanismos de defesa na interação incompatível (26%) do que na resistência induzida (24%), foi possível observar que genes relacionados a síntese e transporte de compostos do metabolismo secundário (13%) na resistência induzida foi maior do que na interação incompatível (4%). Entretanto, a resistência vertical em tomateiro cv. BRH está especialmente relacionada com a expressão de genes codificadores de proteínas antimicrobianas (7%), quando comparada com a resistência induzida. Esses resultados indicam que vias de respostas distintas foram ativadas nas duas interações.

Quanto a identificação de genes exclusivos ao tipo de interação, foi detectado na biblioteca FO um clone de cDNA que apresentou similaridade altamente significativa com gene de *Oryza sativa*, codificador de uma proteína pertencente à uma família de genes de defesa denominada HIR (“hypersensitive induced reaction” - reação de hipersensibilidade induzida). Os membros dessa família estão associados com reações de hipersensibilidade envolvendo a morte celular e resistência contra fitopatógenos (NADIMPALLI et al., 2000). A indução desse gene foi também observada em plantas de tomate expressando constitutivamente o gene de resistência *Pto* (35S::*Pto*) (XIAO et al., 2001). A detecção de gene da família HIR no tomateiro, que pode estar envolvida na mediação da morte celular programada (SOLOMON et al., 1999), sugere que ocorreu ativação da resposta de hipersensibilidade no tomateiro resistente cv. BRH, 72 h após a inoculação com o patógeno.

Na interação entre cultivar resistente de batata ao fungo *Phytophthora infestans*, a expressão de proteínas antimicrobianas relacionada a mecanismo de defesa ocorreu na fase de formação dos primeiros haustórios na célula vegetal, entre 48 e 72 h após a inoculação (ROS et al., 2004). Na biblioteca tomate FO construída após 72 h da inoculação com o patógeno foi isolado um gene codificador de quitinase, representando provavelmente, uma proteína ácida, pertencentes às glicosil hidrolases da família 19, além de domínios adicionais de quitinases.

Foram identificados genes com função associada à manutenção celular e desenvolvimento vegetal, sendo 26% na biblioteca tomate FO e 24% na biblioteca tomate AS. Os resultados indicam que ocorre a ativação de vias do metabolismo

primário juntamente com a indução de vias sinalizadoras para a expressão de genes relacionados à defesa. A indução de vários genes de manutenção celular pode acompanhar as respostas de defesa para assegurar que concentrações adequadas de compostos precursores sejam mantidas na célula vegetal (HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996). A indução de alguns dos genes mencionados foi também observada em outras interações incompatíveis, como por exemplo, em cultivar resistente de batata inoculado com *P. infestans*, sendo detectada por HSS (BIRCH et al., 1999).

Os resultados obtidos no presente trabalho, além de representar o primeiro relato da expressão gênica global no tomateiro induzida pelo ácido salicílico e pelo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, utilizando a técnica HSS, corroboram com os resultados de outros autores na identificação de genes de resposta a patógenos e por indutores de resistência (BIRCH et al., 1999; XIONG et al., 2001; WERNE et al., 2001; MAHALINGAM et al., 2003; ROS et al., 2004; OUYANG et al., 2007).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1 - Estudos moleculares, utilizando duas bibliotecas subtraídas contendo 143 clones de cDNA na biblioteca AS e 164 clones na biblioteca FO, produzidos pela técnica de hibridização subtrativa por supressão (HSS), permitiram a identificação de genes associados à resistência sistêmica adquirida (SAR) ativada pelo AS e à resistência vertical induzida após a inoculação com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, no tomateiro cv. BRH.

2 - Foram isolados genes apresentando funções similares relacionadas à defesa de plantas contra fitopatógenos, na interação incompatível cv. BRH – *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, como na resistência induzida. Os genes detectados estão implicados em diferentes processos como: percepção e transdução de sinal, degradação controlada de proteínas e síntese e transporte de compostos antimicrobianos do metabolismo secundário.

3 - Os resultados obtidos indicaram diferenças no perfil dos genes isolados, sugerindo que, as resistências ativadas na cv. BRH por AS e em resposta ao *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ocorrem por mecanismos distintos como: síntese de proteínas antimicrobianas e síntese de proteínas relacionadas à patogênese.

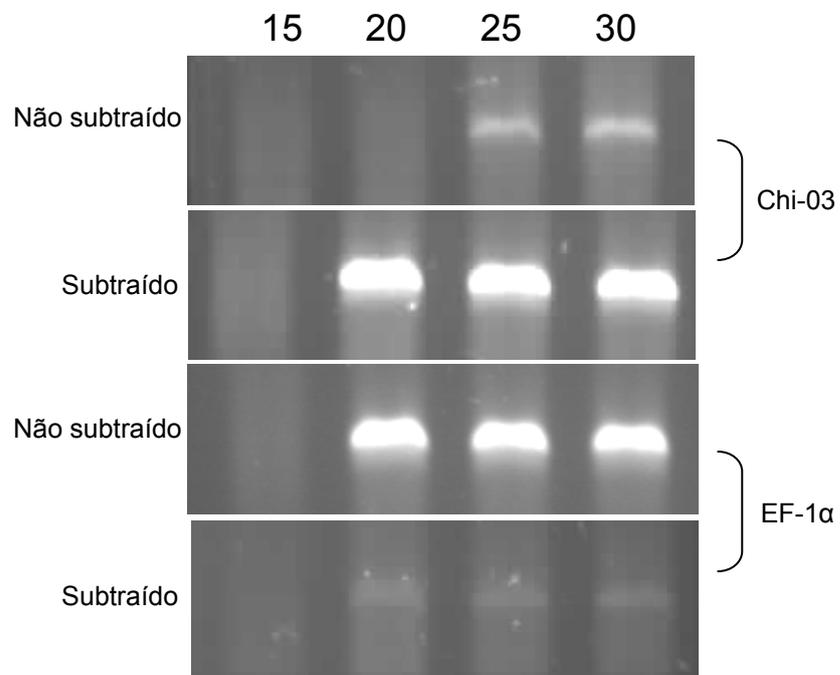


Figura1. Análise da eficiência da subtração usando PCR. O cDNA tester foi preparado de RNA total de plantas tratadas com fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e o cDNA driver foi de plantas tratado com água (controle). O pool de cDNA subtraído e não subtraído foram amplificados usando primer que amplifica o gene *Chi-3*, induzida pela infecção do patógeno ou que amplifica o gene *EF-1 α* expresso constitutivamente. Alíquotas das amostras foram retiradas após 15, 20, 25 e 30 ciclos de PCR. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1,5%.

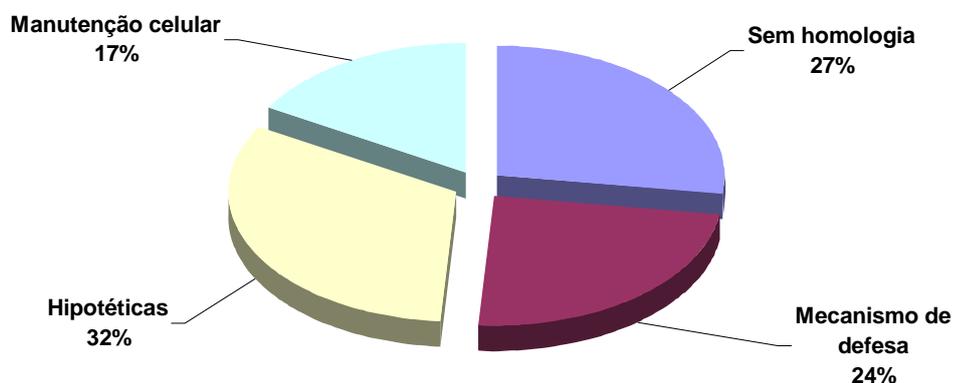


Figura 2- Genes ativados em tomateiro cv. BRH tratado com ácido salicílico (AS). Genes isolados por hibridização subtrativa por supressão (HSS), a partir de mRNAs de folhas de tomateiro, 24 h após o tratamento com AS.

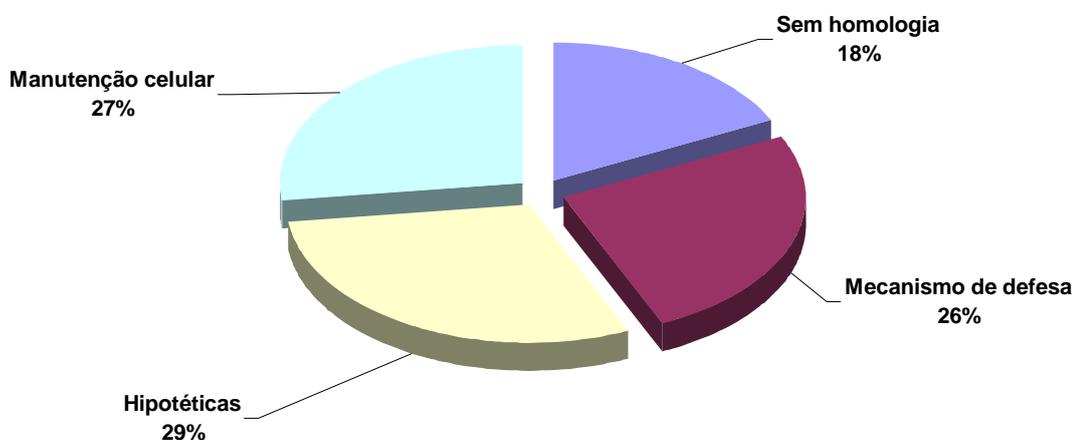


Figura 3 - Genes em tomateiro cv. BRH inoculado com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Genes isolados por HSS, a partir de mRNAs de raízes de tomateiro, 72 h após a inoculação com o patógeno 1×10^7 esporos/mL.

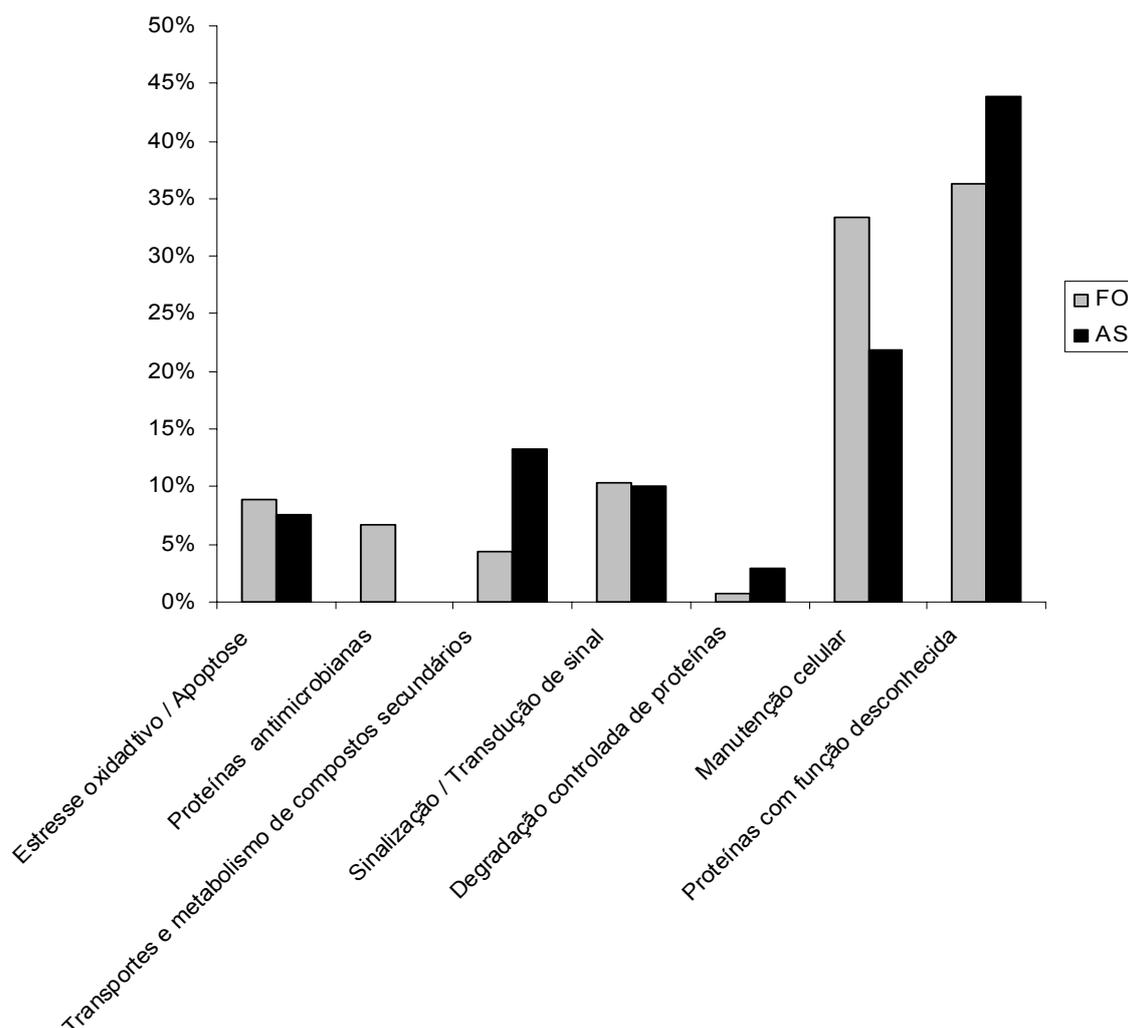


Figura 4. Comparação de ESTs classificados pela função predita entre as duas bibliotecas de cDNA de tomateiro, induzidas pelo ácido salicílico (AS) e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FO)

Tabela 1. Tratamentos utilizados para obtenção das bibliotecas subtraídas de cDNA de tomateiro e número de clones

Tratamento	Controle	Identificação das bibliotecas	Número de clones	
5mM de ácido salicílico	H ₂ O	Tomate – AS ¹	143	46 função desconhecida; 34 relacionados à defesa e/ou estresse; 24 metabolismo geral
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> 1x 10 ⁷ / ml	H ₂ O	Tomate – FO ²	164	49 função desconhecida; 42 relacionados à defesa e/ou estresse; 44 metabolismo geral

1- Biblioteca de tomate construída com ácido salicílico. 2- Biblioteca de tomate construída com *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Tabela 2. Identificação de genes induzidos por ácido salicílico em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) que apresentam homologia com genes de plantas de função conhecidas

Clone ¹	Descrição do gene (nº de acesso) ²	Valor de E ³
AS - 010	Acil - CoA sintetase [<i>Capsicum annuum</i>] (AAL29212)	1.4e-53
AS - 023	Proteína abundante da embriogênese tardia [<i>Nicotiana tabacum</i>] (TC174494)	8.5e-62
AS - 044	Ubiquitina [<i>Solanum tuberosum</i>] (TC170024)	9.9e-55
AS - 053	Citocromo b6 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (TC190079)	1.4e-21
AS - 061	Proteína de resistência a doença PR-10 [<i>Capsicum annuum</i>] (Q2VT55)	9.1e-49
AS - 067	Chalcona sintase 2 [<i>Camellia sinensis</i>] (P48387)	2.0e-91
AS - 072	Superóxido dismutase manganês [<i>Lycopersicon esculentum</i>] (TC18915)	8.3e-34
AS - 080	Proteína com domínio dedo de zinco [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (TC172334)	4.7e-43
AS - 095	Proteína ribossomal 60S [<i>Lycopersicon esculentum</i>] (TC172591)	4.5e-54
AS - 112	Caspase 1 [<i>Lycopersicon esculentum</i>] (TC188871)	1.8e-66
AS - 115	Fator de transcrição família bZIP [<i>Solanum tuberosum</i>] (TC180148)	6.7e-86
AS - 127	Apoproteína (47 kDa) do fotosistema II [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (TC182559)	1.9e-27
AS - 132	Fator de transcrição do tipo BHLH [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (Q8S3E0)	6.4e-46
AS - 142	Fenil alanina liase [<i>Lycopersicon esculentum</i>] (TC172772)	1.2e-79
AS-143	Proteína quinase tipo CIPK [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (NP566580)	9e-30

1- Genes isolados por hibridização subtrativa por supressão, a partir de mRNAs de tomateiro, cultivar BRH ácido salicílico. 2- A função de cada gene foi detectada por comparação com seqüências homólogas presentes no NCBI, TIRG e DDBJ, utilizando o programa BlastX. 3- O valor de E foi utilizado para indicar a significância da similaridade de seqüência encontrada para cada gene.

Tabela 3. Identificação de genes induzidos por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) que apresentam homologia com genes de plantas de função conhecidas

Clone ¹	Descrição do gene (nº de acesso) ²	Valor de E ³
FO - 007	Proteína transportadora ABC [<i>Oryza sativa</i>] (BAC55994)	7.4e-50
FO - 023	Proteína de resposta induzida por hipersensibilidade [<i>Oryza sativa</i>] (AAK54610)	1.3e-44
FO - 027	Fosfolipase [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (AAL87258)	2.8e-41
FO - 041	Quitinase [<i>Solanum lycopersicum</i>] (BAC76900)	1e-148
FO - 069	Citocromo P450 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (AI776695)	1.1e-31
FO - 084	Proteína lemir [<i>Lycopersicon esculentum</i>] (TC171566)	3.6e-45
FO - 089	Fenil alanina liase [<i>Lycopersicon esculentum</i>] (TC172772)	3.1e-78
FO - 093	Proteína de resistência à doença I-2 com repetições rica em leucina [<i>Oryza sativa</i>] (BAB89710)	6.0e-35
FO - 098	Proteína like osmotina [<i>Solanum commersonii</i>] (P50702)	1.0e-32
FO - 099	Inibidor de cisteína proteinase [<i>Lycopersicon esculentum</i>] (TC172677)	1.2e-56
FO - 103	Inibidor de endoglicanase específico de xiloglicano de fungo [<i>Lycopersicon esculentum</i>] (TC188664)	1.4e-63
FO - 115	Ubiquitina [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (Q45W78)	2.3e-32
FO - 130	Proteína serina / treonina quinases [<i>Nicotiana tabacum</i>] (Q1W0X1)	1.1e-25
FO - 145	Proteína tipo CGI-144 (induzida por patógeno) [<i>Lycopersicon esculentum</i>] (CAC81814)	1.3e-61
FO - 152	Catalase [<i>Gossypium hirsutum</i>] (S10395)	2.2e-55
FO - 155	Cisteína proteinase [<i>Ipomea batatas</i>] (AAQ81938)	3.7e-19

1- Genes isolados por hibridização subtrativa por supressão, a partir de mRNAs de tomateiro, cultivar BRH inoculado com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. 2- A função de cada gene foi detectada por comparação com seqüências homólogas presentes no NCBI, TIRG e DDBJ, utilizando o programa BlastX. 3- O valor de E foi utilizado para indicar a significância da similaridade de seqüência encontrada para cada gene.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.
- BENHAMOU, N.; JOOSTEN, M.H.A.J.; WIT, P.J.G.M. Subcellular localization of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissue infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Plant Physiol.** v.92, p.1108-1120, 1990.
- BEYER. K. et al. Identification of potato genes induced during colonization by *Phytophthora infestans*, **Molecular Plant Pathology**, v.2 n.3, p.125–134, 2001.
- BIRCH, P.R.J. et al. Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.12, n.4, p.356-361, 1999.
- BRAYFORD, D. Description of fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Mycopathol.** v118, p.51-53, 1992.
- CHENCHIK, A. et al. Generation and use of high quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. In: SIEBERT, P.; LARRICK, J.W. (Ed.) **Gene cloning and analysis by RT-PCR**. Westborough: BioTechniques Press, p.305-319, 1998.
- DEGENHARDT, J. et al. Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. **Molecular Genetics and Genomics**. V.273, n.4,p. 326-335 , 2005.
- DEMPSEY D.A.; SHAH J.; KLESSIIG D.F. Salicylic acid disease resistance in plants. **Crit Rev Plant Sci**. n.18, p.547-575, 1999.
- DESENDER S.; ANDRIVON D.; VAL F. Activation of defence reactions in *Solanaceae*: where is the specificity?. **Cellular Microbiology**. v.9, n.1, p.21–30, 2007.
- DIATCHENKO, L. et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v.93, p.6025-6030, 1996.
- DIATCHENKO, L. et al. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. **Methods Enzymol.** v.303, p.349–380, 1999.
- DIVON, H. H, et al. Nitrogen-responsive genes are differentially regulated in planta during *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infection. **Molecular plant pathology**, v.6, n.4, p.459–470, 2005.
- DONG, X. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.1, p.316-323,1998.

GAMBORG, O.L., MILLER, R., OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v.50, p.151-158, 1968.

GLAZEBROOK, J. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.280-286, 1999.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p.1773-1791, 1996.

KANG et al. Target genes for OBP3, a dof transcription factor, include novel basic helix-loop-helix domain proteins inducible by salicylic acid. **Plant Journal**, v.35, p.362-372, 2003.

KOHLER, A.; SCHWINDLING, S.; CONRATH, U. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the *NPR1/NIM1* gene in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.128, n.3, p.1046-1056, 2002.

LU et al., Isolation and characterization of novel defense response genes involved in compatible and incompatible interactions between rice and *Magnaporthe grisea*. **Theoretical and Applied Genetics**, V.108, N.3, p.525-534, 2004.

MAHALINGAM, R. et al., Characterization of the stress / defense transcriptome of *Arabidopsis* genome biology. **Genome biology**. 4:R20, 2003

MALECK et al. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. **Nat. Genet**, v.26, p.403-410, 2000.

MARTINEZ DE ILARDUYA O.; XIE Q.; KALOSHIAN I. Aphid-induced defense responses in Mi-1-mediated compatible and incompatible tomato interactions. **Mol Plant Microbe Interact**, v.16, p.699-708, 2003.

MONTESANO et al. Novel receptor-like protein kinase induced by *Erwinia carotovora* and shot oligogalacturonides in potato. **Molecular Plant Pathology**, London, v.2, p.339-346, 2001.

MOODY, D. E. Genomics techniques : an overview of methods for the study of gene expression. **J. Anim Sciences**, v.79, p.E128-E135, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.437-497, 1962.

NADIMPALLI, R. et al. Prohibitins, stomatins, and plant disease response genes compose a protein superfamily that controls cell proliferation, ion channel regulation, and death. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.38, p.29579-29586, 2000.

OLIVAIN et al. Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. **Applied and environmental microbiology**, v.72, n.2, p.1523-123, 2006.

OUYANG, B. et al. Identification of early salt stress response genes in tomato root by suppression subtractive hybridization and microarray analysis. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.3, p.507–520, 2007.

PARK S. Y. et al. Characterization of salicylic acid-induced genes in Chinese cabbage. **Plant Cell Rep.**, v.21, p.1027–1034, 2003.

ROS B., TUMMLER F.; WENZEL G. Analysis of differentially expressed genes in a susceptible and moderately resistant potato cultivar upon *Phytophthora infestans* infection. **Molecular Plant Pathology**, London, v.5 n.3, p. 191–201, 2004.

RYALS, J., UKNES, S., WARD, E. Systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, Oxford, v.104, p.1109-1112, 1994.

RYALS, J.A. et al., Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, Rockville, v.8, n.10, p.1809-1819, 1996.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.1, p.1.119-1.122, 2001.

SCHENK, P.M. et al. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.97, n.21, p.11655-11660, 2000.

SHAH J. The salicylic acid loop in plant defense. **Current Opinion in Plant Biology**. v.6, n.4, p.365-371, 2003.

SHAH J.; KLESSIIG D.F. Salicylic acid: signal perception and transduction. In **Biochemistry and molecular biology of plant hormones**. v.33. Edited by libbenga K, Hal M, Hooykaas P. J. J. London: Elsevier; p. 513-541, 1999.

SOARES M.B. Identification and cloning of differentially expressed genes. **Curr Opin Biotechnol**, v.8, p.542–546, 1997.

SOLOMON, M. et al. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **The Plant Cell**, v.11, p.431- 443, 1999.

THATCHER L.F.; ANDERSON J.P.; SINGH K.B. Plant defence responses: what have we learnt from arabidopsis?. **Functional plant biology**. v. 32, n1, p. 1-19, 2005.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, 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**, v.22, p.4673-4680, 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**, London v.55, p.85-97, 1999.

WERNE, M.;UEHLEIN, N.; PROKSCH P.; KALDENHOFF, R. Characterization of two tomato aquaporins and expression during the incompatible interaction of tomato with the plant parasite *Cuscuta reflexa*. **Planta**, v.213, p.550-555, 2001.

XIAO, F.; TANG, X.; ZHOU, J.-M. Expression of 35S::*Pto* globally activates defense-related genes in tomato plants. **Plant Physiology**, Oxford, v.126, p.1637-1645, 2001.

XIONG, L. et al. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.14, n.5, p.685-692, 2001.

Anexos

Aims and Scope

Biotechnology Letters is the world's leading rapid-publication primary journal dedicated to biotechnology as a whole - that is to topics relating to actual or potential applications of biological reactions carried out by microbial, plant or animal cells and biocatalysts derived from them. All relevant aspects of genetics, molecular biology and cell biochemistry, of process and reactor design, of pre- and post-treatment steps, and of manufacturing or service operations are therefore included. Contributions from industrial and academic laboratories are equally welcome. Criteria for the acceptance of papers relate to our aim of publishing useful and informative results that will be of value to other workers in related fields. The emphasis is very much on novelty and immediacy in order to justify rapid publication of authors' results.

Manuscript Submission

There are no page charges or charges for the publication of colour illustrations for papers published in *Biotechnology Letters*. It is essential that all co-authors of a paper have seen and have agreed to the submission of the paper. A statement to this effect should accompany the submission. Papers must be submitted electronically (see below) . As *Biotechnology Letters* is a rapid publication journal, we print directly from the electronic files submitted by authors. No proofs are issued to authors. It is therefore imperative that authors ensure their papers are accurate and comply with the following instructions as closely as possible. It is a condition of submission of a paper that it is not under consideration in whole or in part by another journal nor has it already appeared in print, in whole or in part, in any language, in any other journal. 1. Prepare your error-free manuscript as an e-mail attachment in Word or Wordperfect (not Mac), as well as a covering letter indicating the novelty, urgency or timeliness of your communication. Include copies of any papers referred to as 'in press' or which may have appeared recently and are relevant to the paper under consideration.

2. Email the files to:

Mrs E.J. Sparke

Editorial Assistant for Biotechnology Letters

Department of Biological Sciences

University of Hull

Hull HU6 7RX

U.K.

E-mail: E.J.Sparke@hull.ac.uk

Sections of the Journal

As the Journal now publishes papers in the following sections, it is *imperative* that authors declare to which section their paper is being submitted. The sections are:

Animal Cell Technology

Biofuels and Environmental Biotechnology

Bioprocessing and Bioengineering

Microbial and Enzyme Technology

Plant Cell Technology

Reviews

Short reviews, or mini-reviews, are also published. These should be prepared according to the general instructions given below. Authors should contact either the Reviews Editor or Editor in Chief before submitting a review to ensure that the subject will be considered appropriate for inclusion.

Language

The journal's language is English. British English or American English spelling and terminology may be used, but either one should be followed consistently throughout the article. The Editor and members of the Editorial Board are, however, unable to undertake extensive rewriting of poorly written papers. If English is not your first language, we would urge you to have your paper thoroughly checked, preferably by a native English speaker, before it is submitted. Papers not reaching a satisfactory standard will not be assessed for publication.

Manuscript Presentation

The maximum printed length of a paper or review in the Journal is normally six pages. There is, however, no limit as to the number of tables or figures that may be used; as long as they will all fit within the limit of six printed pages authors are free to use as many or as few as they consider to be appropriate. Manuscripts should be formatted so that there are adequate margins on all sides to allow reviewers' remarks. Please ensure double-spaced typing of all material, including tables, legends to figures, notes to tables and references. Quotations of more than 40

words should be set off clearly, either by indenting the left-hand margin or by using a smaller typeface. Use double quotation marks for direct quotations and single quotation marks for quotations within quotations and for words or phrases used in a special sense. Number all the pages (including tables and figures) consecutively with the first page containing:

- title
- author(s)
- affiliation(s)
- the author to whom correspondence is to be addressed should be indicated by an asterisk (*) together with his/her fax number and e-mail address but NOT telephone number. Only one author should be listed.
- Section (see above) Please indicate for which section the paper is being submitted.
- key words (please give up to five words (**not** phrases) in alphabetical order.
- then leave a space of 4 cm for insertion (by Editor) of handling dates

Title

This must be informative and give key details of the work described. Do not use phrases such as “The effect of...” or “Study of ...”. Please give an explicit clear title and include mention of the biological system being used.

Abstract

Please provide a short abstract that will occupy not more than 5 printed lines (80-100 words) in the final printed paper. The abstract should not contain any undefined non-standard abbreviations or unspecified references. Imprecise or qualitative statements should be avoided as should redundant words and phrases. Quantitative values of key data should always be given. Please avoid beginning with a phrase such as “This study shows...”, or “We show in this paper...”.

Symbols and Units

Mathematical units should be set out economically but unambiguously. A solidus (/) can be used for simple fractions or units – for example ml/h – but the double solidus is to be avoided – for example g/l.h is correct but g//h is not. Units can also be given as g l⁻¹ etc. but the style must be consistent. Terms such as ppm are not encouraged; use mg l⁻¹ etc. as appropriate. Concentrations should be given, for example, as g ethanol l⁻¹ not g l⁻¹ ethanol. Uncommon units, symbols and all non-standard abbreviations must be defined at their first appearance but the minimum number of abbreviations is preferred. A list of mathematical terms, if needed, should be provided before the Introduction.

Section Headings

First-, second-, third-, and fourth-order headings should be clearly distinguishable but not numbered.

Appendices

Any supplementary material should be collected in an Appendix and placed before the Reference section. Notes (footnotes for indicating essential information about the work or origins of the paper should either be placed on the title page or in a final Acknowledgement section.

Please use footnotes rather than endnotes. Notes should be indicated by consecutive superscript numbers in the text. A source reference note should be indicated by means of an asterisk after the title. This note should be placed at the bottom of the first typed page.

Introduction

Please keep this as short as possible (usually no more than one typed page~300-350 words); do not give a mini-review of the literature; give key references to recent, relevant publications; historical references are rarely useful. Space is precious - keep it for your results.

Materials and methods

Give information concerning the key protocols only. Avoid describing routine or trivial matters such as how the micro-organisms are maintained, how and when the cultures were sampled. Suppliers of chemicals and manufacturers of equipment should only be given if these are not generally available or are in some way unusual or are crucial for success. Suppliers such as Sigma, Aldrich etc. are given without addresses. There is no need to give references to standard procedures, e.g. Lowry or Bradford methods etc. We encourage authors to place as much relevant information in the footnotes and legends of their tables and figures to increase understanding of these illustrations rather than place such information in this section.

Results

Results given in tables and figures do not need to be described again at length in the text. Focus the reader's attention on your key results. Avoid repetition of the data that is given clearly in the tables and figures. The Results and Discussion sections may be combined. An ideal Results section would simply say: "The results are given in Tables 1 and 2 and further details are shown in Figures 1 and 2."

Discussion

Put your key results into the context of current information, avoid unwarranted or unsupported speculations. Keep your discussion short and focused on explaining the significance of your results.

Tables

Tables should be carefully selected to illustrate key points or data that cannot be easily described in the text. Each table should be numbered consecutively (1, 2, etc.). In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, a, b, c etc., should be placed immediately below the table. Please place the title (without abbreviations) at the top on the table itself. Please use a separate page for each table. If tables take up more than one page, please ensure each page of the table is clearly labelled with the table number. The lay-out of a table should be suitable for printing as either single column (7.5 cm) or double column (16 cm) width. Do not use vertical rulings (lines) and keep horizontal rulings to a minimum. Please ensure 100% relative values are also given in absolute values in a footnote. Do not quote values beyond the inherent accuracy (or inaccuracy) of the methods; this is a very common error. State clearly how many times each complete experiment was done and how many times each individual determination was done. Data given in Tables and Figures should be understandable without recourse to the text: you can add key information regarding experimental procedures in footnotes and omit such details from the Methods section. It is essential that all non-standard abbreviations used in the Table be re-defined.

Indicate the approximate position of the Table by a note in the text.

Figures

Figures should be carefully selected to illustrate key points or data that cannot be easily stated in the text. For example, it is rarely necessary to give a Lineweaver-Burk plot of an enzyme's activity; its K_m and V_{max} values can be easily stated in the text. Similarly with pH and temperature optima for reactions, these can usually be stated within the text. If it is thought useful to display such details graphically, then these may be done so that two figures can both fit into a single column (7.5 cm width) of the Journal. All photographs, graphs, diagrams and schemes should be referred to as a 'Figure' and they should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Multi-part figures should be labelled with upper case letters (A, B, etc.). Scale bars are inserted directly in any photographs or photomicrographs. Variation in text sizes within figures should be avoided as figures are often reduced in size when printed. Figures will normally be sized to fit a single column width of the Journal; i.e. 7.5 cm width. Exceptionally, figures may be made to fit a double column width, e.g. 16 cm. Authors must take these sizes into account when designing their figures. All lines on a figure must be of equal thickness and of equal blackness. A detailed legend (without abbreviations) should be provided for each figure. It is preferable to give a full explanation of the protocol being used in the experiment being described in the figure. This information need not then be given in the Methods section. All figures must be referred to in the text; its approximate location should be indicated in the text. Please group the legends together and put these on a separate page placed after the references and tables but before the figures. Computer-generated printouts should be flawless.

Photographs

These must be high-contrast, black and white prints that will show the key details when printed. Colour photographs may be printed without charge. For gels, a line drawing can be placed alongside the actual photograph. Do not copy print-outs from recorders or computers attached to instruments - these are rarely of publishable quality. Do not scan-in material. Avoid making black and white photographs from coloured ones - these do not have sufficient contrast. For photomicrographs, scale bars must be added on the photograph itself and the scale given in the legend.

You should also supply the electronic versions of your figures. We prefer figures in TIFF, EPS, PS, PDF and Microsoft Office format. Be aware that we may not be able to use other file formats and that the hard copy may be scanned instead. For vector graphics, EPS is the

preferred format. For bitmapped graphics, TIFF is the preferred format. The following resolutions are optimal: line figures - 600 - 1200 dpi; photographs – 300 dpi; screen dumps - leave as is. Colour figures can be submitted in the RGB colour system. Font-related problems can be avoided by using standard fonts such as Times Roman, Courier and Helvetica. Figures should be saved in separate files. The figure legends should be included in the text file.

Acknowledgements

Acknowledgements of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the

References.

References

References should be given at the end of the typescript arranged alphabetically in order by the last name of the first author and in the form and style indicated below.

1. Journal article:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

2. Journal issue with issue editor:

Smith J (ed) (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J* 14:126–233

3. Journal issue with no issue editor:

Mod Genomics J (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J* 14:126–233

4. Book chapter:

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn.

Wiley, New York

5. Book, authored:

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

6. Book, edited:

Smith J, Brown B (eds) (2001) *The demise of modern genomics*. Blackwell, London

7. Chapter in a book in a series without volume titles:

Schmidt H (1989) Testing results. In: Hutzinger O (ed) *Handbook of environmental chemistry*, vol 2E.

Springer, Berlin Heidelberg New York, p 111

8. Chapter in a book in a series with volume title:

Smith SE (1976) Neuromuscular blocking drugs in man. In: Zaimis E (ed) *Neuromuscular junction*.

Handbook of experimental pharmacology, vol 42. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp593–660

9. Proceedings as a book (in a series and subseries):

Zowghi D et al (1996) A framework for reasoning about requirements in evolution. In: Foo N, Goebel R (eds)

PRICAI'96: topics in artificial intelligence. 4th Pacific Rim conference on artificial intelligence, Cairns, August 1996. *Lecture notes in computer science (Lecture notes in artificial intelligence)*, vol 1114. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 157

10. Proceedings with an editor (without a publisher):

Aaron M (1999) The future of genomics. In: Williams H (ed) *Proceedings of the genomic researchers*, Boston, 1999

11. Proceedings without an editor (without a publisher):

Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from

Streptomyces fradiae. In: *Abstracts of the 3rd international symposium on the genetics of industrial*

microorganisms, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978

12. Paper presented at a conference:

Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from

Streptomyces fradiae. Paper presented at the 3rd international symposium on the genetics of industrial microorganisms, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978

13. Patent:

Norman LO (1998) Lightning rods. US Patent 4,379,752, 9 Sept 1998

14. Institutional author (book):

International Anatomical Nomenclature Committee (1966) *Nomina anatomica*. Excerpta Medica, Amsterdam

15. Non-English publication cited in an English publication:

Wolf GH, Lehman P-F (1976) *Atlas der Anatomie*, vol 4/3, 4th edn. Fischer, Berlin. [NB: Use the language of the primary document, not that of the reference for "vol" etc.!]

16. Non-Latin alphabet publication:

The English translation is optional.

Marikhin VY, Myasnikova LP (1977) *Nadmolekulyarnaya struktura polimerov* (The supramolecular structure of polymers). Khimiya, Leningrad

17. Published and In press articles with or without DOI:

17.1 In press

Wilson M et al (2006) *References*. In: Wilson M (ed) *Style manual*. Springer, Berlin Heidelberg New

York (in press)

17.2. Article by DOI (with page numbers)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*

78:74–80. DOI 10.1007/s001090000086

17.3. Article by DOI (before issue publication with page numbers)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* (in press). DOI 10.1007/s001090000086

17.4. Article in electronic journal by DOI (no paginated version)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med*. DOI 10.1007/s801090000086

18. Internet publication/Online document

Doe J (1999) Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society

of Chemistry. Available via DIALOG. http://www.rsc.org/dose/title_of_subordinate_document. Cited 15 Jan 1999

19.1. Online database

Healthwise Knowledgebase (1998) *US Pharmacopeia*, Rockville. <http://www.healthwise.org>. Cited 21 Sept 1998

Supplementary material/private homepage

Doe J (2000) Title of supplementary material. <http://www.privatehomepage.com>. Cited 22 Feb 2000

University site

Doe J (1999) Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html>. Cited 25 Dec 1999

FTP site

Doe J (1999) Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt>. Cited 12 Nov 1999

Organization site

ISSN International Centre (1999) *Global ISSN database*. <http://www.issn.org>. Cited 20 Feb 2000

General Points

Reproducibility of results:

The number of times a complete experiment has been carried out, together with the number of samples analysed on each occasion, should be indicated either in the Methods or in the Tables or Figures. The range of values should be indicated by \pm in a table, or by an error-bar in a figure. Standard deviations (S.D.) should be given when appropriate.

Accuracy: All values should be quoted within the experimental accuracy of the protocol being used, taking into account the type of analysis and instrumentation being used.

Please avoid using 'reduce' when you mean 'decrease' or 'lower' particularly in the context where there may be (bio)chemical reductions.

Units: please always leave a space between the number and the unit; e.g. 37 °C not 37°C.

Avoid 'ppm' and where possible '%' but give as mg/l or g/l etc. SI units and permitted alternatives are to be used. Use correct abbreviations for standard units: h not hr, g not gr etc. If you use % always state if v/v, w/v, v/w or w/w. Abbreviations are never made plural. Do not use normalities for solutions; molarities (M) should be given instead.

Avoid redundant words or phrases such as 'a blue colour', 'at a temperature of 30°C', 'at a wavelength of 340 nm', 'at a concentration of 2 g/l etc.' (Blue is a colour and does not need stating!) Also phrases such as 'It was observed that...' are also redundant and may, without exception, be deleted. Concentrations are given as 10 g ethanol/l not 10 g/l ethanol; 5 mg

kanamycin/ml etc. Mixtures of solvents are given as chloroform/methanol (2:1, v/v) or methanol/water/acetic acid (60:35:5, by vol.). For presentation of cell growth, please give as dry weight values for both microbes and plant cell cultures. Optical densities (or turbidities) must be converted to the corresponding cell dry wt values. Wet weight values for biomass are not acceptable. Please do not say "exponential (or logarithmic) growth" unless you have clear data to support that such rates were achieved. Arithmetic growth rates are usually attained in most cell growth systems.

*Please use non-standard abbreviations sparingly: these confuse more often than not and are unlikely to save more than 1 or 2 lines of space in the whole paper. Only use if they are replacing lengthy phrases or chemical names.

Checklist

A Checklist for authors is now provided in each issue of the Journal. This should be completed by the submitting author and included with the paper.

Proofs

No proofs are issued to authors. It is therefore imperative that the text of a submitted paper be thoroughly checked before submission. Proofs are, however, checked by the publisher (not the editor).

Off-prints

Fifty offprints of each article will be provided free of charge. An order form for additional offprints will be sent to the corresponding author.

Copyright

Authors will be asked, upon acceptance of an article, to transfer copyright of the article to the Publisher. This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws.

Permissions

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or 500 words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures, tables or other material from unpublished or copyrighted material.

Springer Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article but, in addition, it is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please visit www.springer.com/openchoice to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

Additional Information

Peter Butler

Springer, Publishing Editor

P.O. Box 17

3300 AA Dordrecht

The Netherlands

Phone: +31(0) 78 6576-312

Fax: +31(0) 786576-388

peter.butler@springer.com



<http://www.springer.com/journal/10529>

Biotechnology Letters

Managing editor: C. Ratledge

ISSN: 0141-5492 (print version)

ISSN: 1573-6776 (electronic version)

Journal no. 10529

Springer Netherlands

Mensagem Original

Assunto: BL 8761

De: "Elizabeth J. Sparke" <E.J.Sparke@hull.ac.uk>

Data: Fri, Junho 29, 2007 7:37 am

Para: danieljornal@yahoo.com.br

"Differential gene expression in tomato induced by salicylic acid and Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici"

Dear Amaral

Your paper will be dealt with by the Executive Editor for: Plant Cell Technology.

You should expect to hear from him directly with a decision on your paper within about four weeks of today's date, BUT please do not contact him directly about the decision of your paper.

Yours sincerely

Elizabeth Sparke
Secretary to Professor Ratledge

Elizabeth J. Sparke
Secretary to Professor Ratledge
Department of Biological Sciences
University of Hull
Hull, HU6 7RX, UK
Tel: +44 (0)1482 465511 (Direct Line)
Fax: +44 (0)1482 465822
Email: E.J.Sparke@hull.ac.uk

To view the terms under which this email is distributed, please go to
http://www.hull.ac.uk/legal/email_disclaimer.html

**Differential gene expression in tomato induced by salicylic acid
and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***

Daniel Oliveira Jordão do Amaral¹, Luciane Vilela Resende¹, Marleide Magalhães de Andrade Lima², Márcia Vanusa da Silva^{3, *}.

¹Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Núcleo de Biotecnologia, EMBRAPA Algodão, Campina Grande, Paraíba, Brazil.

³Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

* To whom correspondence should be addressed (Fax: + 55 81 2126-8576; E-mail: marcia.vanusa@ufpe.br).

ABSTRACT

Two cDNA libraries were constructed through suppression subtractive hybridization (SSH) to compare the transcript profile in the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) cultivar 'BHR' during *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infection and exogenous salicylic acid application. A total of 307 clones was identified in two subtractive libraries, which allowed the isolation of several defense-related genes that play roles in different mechanisms of plant resistance to phytopathogens. Genes with unknown roles were also isolated from the two libraries, which indicates the possibility of identifying new genes. These results are the first report of global gene expression in tomato induced by salicylic acid and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* through the SSH technique.

Key words: salicylic acid, suppression subtractive hybridization libraries, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Lycopersicon esculentum*.

INTRODUCTION

Fusarium wilt, which is caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, is one of the major diseases of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Three physiological races have so far been identified: races 1, 2 and 3. Using resistant cultivars is the best wilt control strategy, because the pathogen remains in the soil for some decades and chemical control is inefficient (Brayford 1992, Reis *et al.* 2004).

Plant resistance to diseases is associated to a number of defense responses activated by the host after contact with pathogens. Resistance is often expressed as a hypersensitivity reaction that results in localized cell death at the pathogen penetration site. Other resistance responses may include structural alterations, the accumulation of reactive oxygen species, synthesis of secondary metabolites and the production of a wide variety of defense molecules, e.g. antimicrobial proteins (Shah 2003, Park *et al.* 2003, Ros *et al.* 2004). Such defense responses are induced in pathological or pathogenesis-related situations, the latter observed after the application of chemical substances that simulate the effect of pathogen infection, e.g. salicylic acid (SA), which responses are triggered to produce PR proteins (Van Loon 2004).

The identification of host genes involved in defense responses is important to understand plant resistance mechanisms against phytopathogens (Thatcher *et al.* 2005, Desender *et al.* 2007). Suppression subtractive hybridization (SSH) is a promising technique for the isolation of genes expressed in plants subjected to biotic and abiotic stress, because it increases the relative abundance of some cDNA species (Diatchenko *et al.* 1996, Soares 1997). The advantages of this technique include the detection of low-abundance transcripts and differentially expressed transcripts by the suppression of abundant transcripts, and its capacity of isolating genes with no previous knowledge of their sequence or identity (Diatchenko *et al.* 1999, Moody 2001).

In this work, SSH was used to identify differentially expressed genes in tomato in two distinct conditions: the resistance response to *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, and salicylic acid (SA) treatment, for its importance as signaling molecule in plant stress responses.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and growth conditions

Tomato seeds of the cultivar 'BHR', which is resistant to *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, were placed in tubes containing MS (Murashige & Skoog 1962) culture medium (0.8% w/v agar), with the pH adjusted to 5.8±0.2. Tubes were then placed in a grow room with the photoperiod set to 16h and temperature of 25 ± 2 °C for seed germination. Seedlings were kept in these conditions for three weeks after germination and then subjected to experiment treatments.

Salicylic acid treatment

Three-week-old seedlings were sprayed with 5mM sodium salicylate (Sigma, USA) dissolved in autoclaved distilled water. Untreated control seedlings were sprayed with autoclaved distilled water. Plants were kept in a grow room for 24 h. Leaves were then collected, mixed and used for total RNA extraction.

***F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* Inoculation**

F. oxysporum f.sp. *lycopersici* (race 2) conidia, grown in potato dextrose agar medium, were used to inoculate three-week-old seedlings at a concentration of 1×10^7 ml, through the root cut method (Santos 1997) for 10 minutes. Control seedlings were treated with autoclaved distilled water. After inoculation, plants were transferred to new tubes containing MS (Murashige & Skoog 1962) liquid medium and kept in a grow room for 72 h. Roots were collected, mixed and used for total RNA extraction.

Total RNA extraction and cDNA synthesis

The leaves from AS treated plants and roots from *Fusarium* inoculated plants were used for total RNA extraction using TRIzol (100 mg plant tissue/ mL TRIzol, invitrogen), as described in the manufacturer's manual. RNA yield was 50 µg per 100 mg of plant tissue. Complementary DNA was obtained through the "SMART PCR cDNA Synthesis Kit" (Clontech) following the manufacturer's recommendations.

Suppression subtractive hybridization (SSH) and PCR product cloning

SSH was performed with the PCR-Select cDNA Subtraction kit (Clontech). Experiment and control samples were processed simultaneously to reduce false positives. cDNA from experiment samples was used as tester and control cDNA was used as driver in the construction of the forward subtraction. Subtracted and non-subtracted cDNA pool samples were used to amplify fragments of the gene EF-1 α , which amplifies the translation elongation factor 1 α (*EF-1 α* R:5' GACAATCAAGCACTGGAGCA 3' and *EF-1 α* L:5' GATGCTACCACCCCAAGTA 3') as well as the biotic stress induced gene PR-4 (*Chi3* F:5' GTTTCCAGGTTTTGGTACTGCTGGT 3' and *Chi3* R:5' CCACAATACCTCCTGTAAAATCCAA 3') to test adapter ligation efficiency, as recommended by Clontech, then 15, 20, 25 and 30 PCR amplification cycles. Purified products of the second PCR from forward SSS were cloned in the vector T/A PCR2.1 TOPO (Invitrogen), following manufacturer's recommendations.

Cloned PCR products were transformed with DH5 α competent cells to produce the subtracted library (forward SSH). Cell colonies were transferred to LB liquid medium containing 100 µg/mL kanamycin and cultured for 16 h. Plasmidial DNA was extracted by the alkaline lysis mini-preparation method (Sambrook & Russell 2001). Recombinant plasmids were identified by restriction analysis and subjected to DNA sequencing.

Sequencing and analysis

Nucleotide sequences of each insert were determined in an automatic DNA sequencer (ABI PRISM 377 Applied Biosystems), with the Big Dye Terminator kit (Applied Biosystems). Conventional M13-*Forward* and M13-*Reverse* primers were used to determine DNA sequences. Obtained sequences were compared through the program BlastX (Altschul *et al.* 1997) with homologous sequences in the databanks of the National Center for Biotechnology Information, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), The Institute for Genomic Research, TIGR (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/Blast/index.cgi>), and DNA Data Bank of Japan, DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast>). Multiple sequences were aligned with the software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk>) (Thompson *et al.* 1994).

RESULTS

To isolate tomato genes induced by salicylic acid and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, different cDNA libraries were constructed by suppression subtractive hybridization, as shown in Table 1.

The subtraction efficiency was evaluated by the PCR amplification of the translation elongation factor (*EF-1 α*) and the differentially expressed gene PR-4, which is related to class-4 pathogenicity. Figure 1 shows the *EF-1 α* fragment was only detected after 30 amplification cycles in subtracted samples, but it was clearly detectable after 20 cycles in non-subtracted samples. Subtraction efficiency results using the gene PR-4 showed amplification in samples from subtracted samples after 20 PCR cycles, while in non-subtracted samples PCR products were only amplified after 25 cycles. Extraction was efficient because the expression of *EF-1 α* transcripts was reduced, while the differentially expressed gene was substantially enriched in the cDNA fragment population used in the library construction. Considering the number of PCR cycles required for equivalent amplification of PCR products from subtracted and non-subtracted cDNA samples, it was estimated that the subtracted library was enriched 64 times with differentially expressed genes.

After SSH, 307 cDNA clones were obtained, being 143 clones from the SA library and 164 from the FO library (Table 1). Insert length ranged from 300 to 1100 bp in the two libraries. Clone homology was considered at E-values lower than 10^{-5} in the different data banks analyzed, being, thus, significant. In the AS library, 39 clones encode proteins with no similarity, 46 were similar to putative proteins with unknown roles, 34 clones represented genes involved in defense mechanisms and 24 clones are associated to cell maintenance and plant development. From the 164 clones identified in the FO library, 29 showed no similarity with data bank sequences, 49 were analogous to hypothetical proteins, 42 corresponded to genes involved in defense mechanisms and 44 are related to cell maintenance and plant development. Results are summarized in Table 1.

Figures 2 and 3 show that a higher number of genes involved in defense mechanisms were found in the library 'FO'. A group of unknown genes was also identified, representing 32% of the SA library and 29% of the FO library. One of

the most interesting characteristics of SSH was achieved with the description of relatively rare cDNA fragments.

The amounts of genes involved in each process related to plant resistance, activated in both SSH libraries, are shown in Figure 4. A higher number of genes related to signal perception and transduction, encoding antimicrobial proteins, related to oxidative stress and cell death was observed in the FO library. However, the number of genes related to the synthesis and transport of secondary metabolism compounds and controlled protein breakdown was higher in the SA library. Figure 4 also shows a higher amount of genes related to cell maintenance in the FO library. The amount of genes with unknown roles was higher than any other gene category in both libraries.

Plant genes with known roles, involved in biotic and abiotic stress response, and associated to cell maintenance and plant development were identified in both AS and FO libraries. Some of these genes, as those encoding phenylalanine ammonia lyase, chitinase, late embryogenesis abundant protein, bZip transcription factor, zinc finger domain protein and I-2 disease resistance protein with leucine-rich repeat are related to defense mechanisms, while genes encoding cytochrome, ubiquitin, photosystem II apoprotein and ribosomal 60S protein are related to cell metabolism (Tables 2 and 3).

DISCUSSION

The identification of host genes involved in defense responses is important to unravel mechanisms of plant resistance against phytopathogens. Suppression subtractive hybridization (SSH) combines suppression PCR with subtraction and normalization steps in a single reaction, therefore increasing the possibility of identifying low expression genes (Diatchenko *et al.* 1999). Genes with unknown roles were identified in AS and FO libraries, which may result in the identification of rare genes. Similar results were observed in SSH libraries from *Arabidopsis*, potato and tomato in biotic stress conditions (Mahalingam *et al.* 2003, Ros *et al.* 2004, Ouyang *et al.* 2007).

Mahalingam *et al.* (2003) identified differentially expressed genes in *Arabidopsis* using leaf tissue exposed to 24h of exposure to salicylic acid to build the SSH library. Tomato gene response was studied in leaf tissues 24h after salicylic acid exposure. But gene expression alterations in response to soil pathogens are usually studied in root tissues, after a pathogen germination and penetration period (Benhamou *et al.* 1990, Divon *et al.* 2005, Olivain *et al.* 2006). The FO library was built from root tissues 72 hours after *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* inoculation.

In SA and FO libraries, several cDNA clones showed the same roles, e.g. genes involved in phytoalexin synthesis, as the gene encoding phenylalanine ammonia lyase (PAL), CIPK-like kinase genes and serine / threonine kinases related to signal perception and transduction, polyubiquitin and ubiquitin related to controlled protein breakdown. These results indicate that some defense-related compounds and some associated to different processes are activated in both induced resistance and vertical resistance. Common response mechanisms were found in previous works using SSH to construct libraries in many economically important crops, comparing different stress conditions (Mahalingam *et al.* 2003, Ros *et al.* 2004, Divon *et al.* 2005, Degenhardt *et al.* 2005).

A gene that is exclusive to the interaction type was identified in the FO library. It is a cDNA clone that showed highly significant similarity to an *Oryza sativa* gene encoding a protein from the hypersensitive induced reaction (HIR)

family. Members of this family are related to hypersensitivity reaction, involving cell death and resistance to pathogens (Nadimpalli *et al.* 2000). This gene was also induced in tomato plants with constitutive expression of the resistance gene *Pto* (35S::*Pto*) (Xiao *et al.* 2001). The detection of a gene from the HIR family in tomato, which may be involved in the mediation of programmed cell death (Solomon *et al.* 1999), suggests the activation of a hypersensitivity response in the resistant tomato cultivar BHR, 72 h after inoculation.

Genes encoding antimicrobial proteins were only detected in the FO library. A chitinase-encoding gene, probably representing an acidic protein, is likely to belong to a group of glycosyl hydrolases from family 19. In the interaction between a resistant potato cultivar and *Phytophthora infestans*, the expression of antimicrobial proteins related to defense mechanisms was observed at the formation of the first haustoria in the plant cell, from 48 to 72 h after inoculation (Ros *et al.* 2004).

Genes with cell maintenance and plant development roles were identified in both libraries. Results indicate there is the activation of primary metabolism pathways together with the induction of several signaling pathways for the expression of defense-related genes. The induction of several cell maintenance genes may follow defense responses to assure adequate concentrations of precursor compounds (Hammond-Kosack & Jones 1996, Birch *et al.* 1999, Mahalingam *et al.* 2003).

This is the first report of global gene expression in tomato induced by salicylic acid and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* using the SSH technique. Our results corroborate with previous works in the identification of pathogen response genes and resistance inducers (Birch *et al.* 1999, Xiong *et al.* 2001, Werne *et al.* 2001, Mahalingam *et al.* 2003, Ros *et al.* 2004, Ouyang *et al.* 2007).

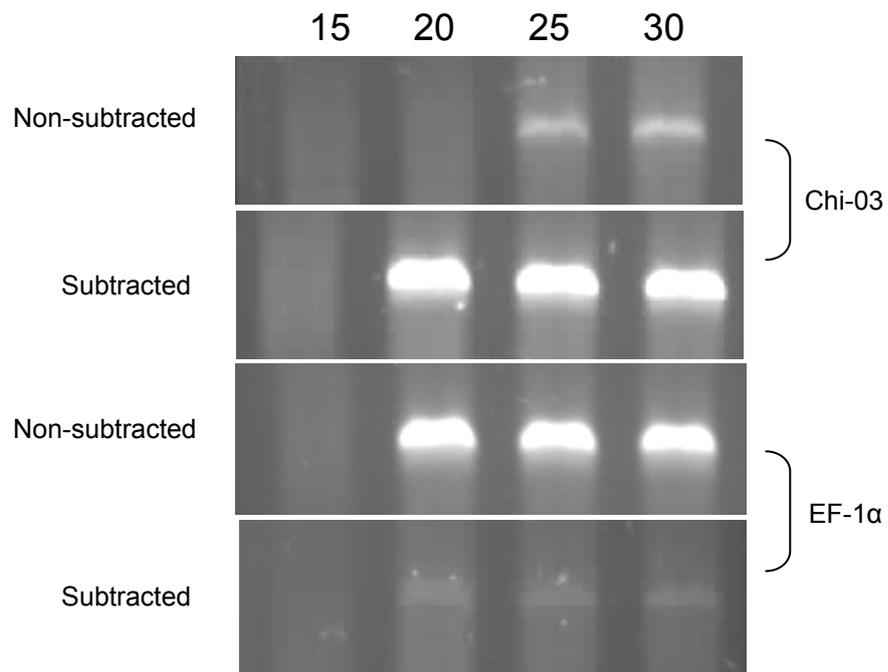


Figure1. Subtraction efficiency analysis using PCR. Tester cDNA was prepared from total RNA from plants inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and driver cDNA was prepared from water-treated controls. Subtracted and non-subtracted cDNA pools were amplified with the primer that amplifies *Chi-3* induced by pathogen infection or amplifies the gene *EF-1α* expressed constitutively. Aliquots were taken after 15, 20, 25 and 30 PCR cycles. Amplified products were analyzed in 1.5% agarose gel.

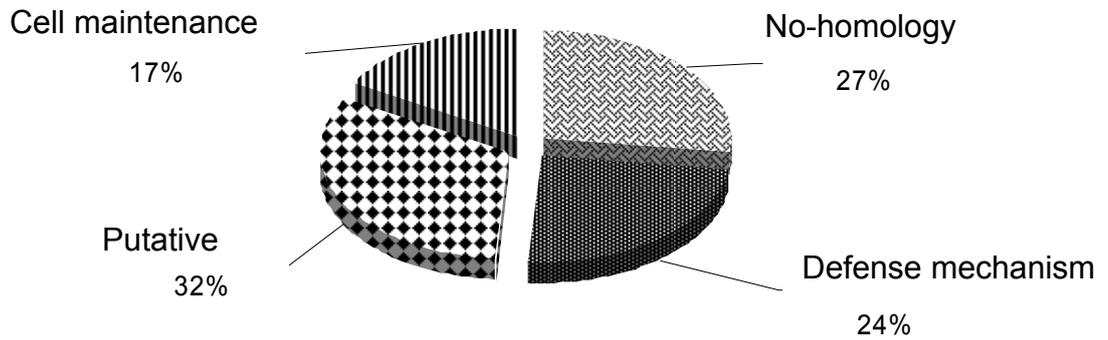


Figure 2 - Genes activated in the tomato cultivar BHR treated with salicylic acid (SA). Genes were isolated by suppression subtractive hybridization (SSH), from tomato mRNAs, 24 h after SA treatment.

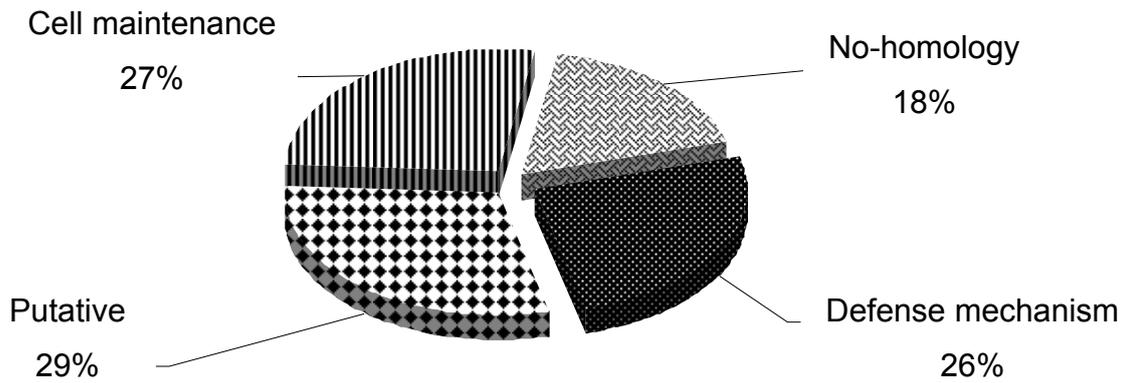


Figure 3 - Genes expressed in the tomato cultivar BHR after *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* inoculation. Genes were isolated by SSH, from tomato mRNAs, 72 h after the inoculation of 1×10^7 spores/mL.

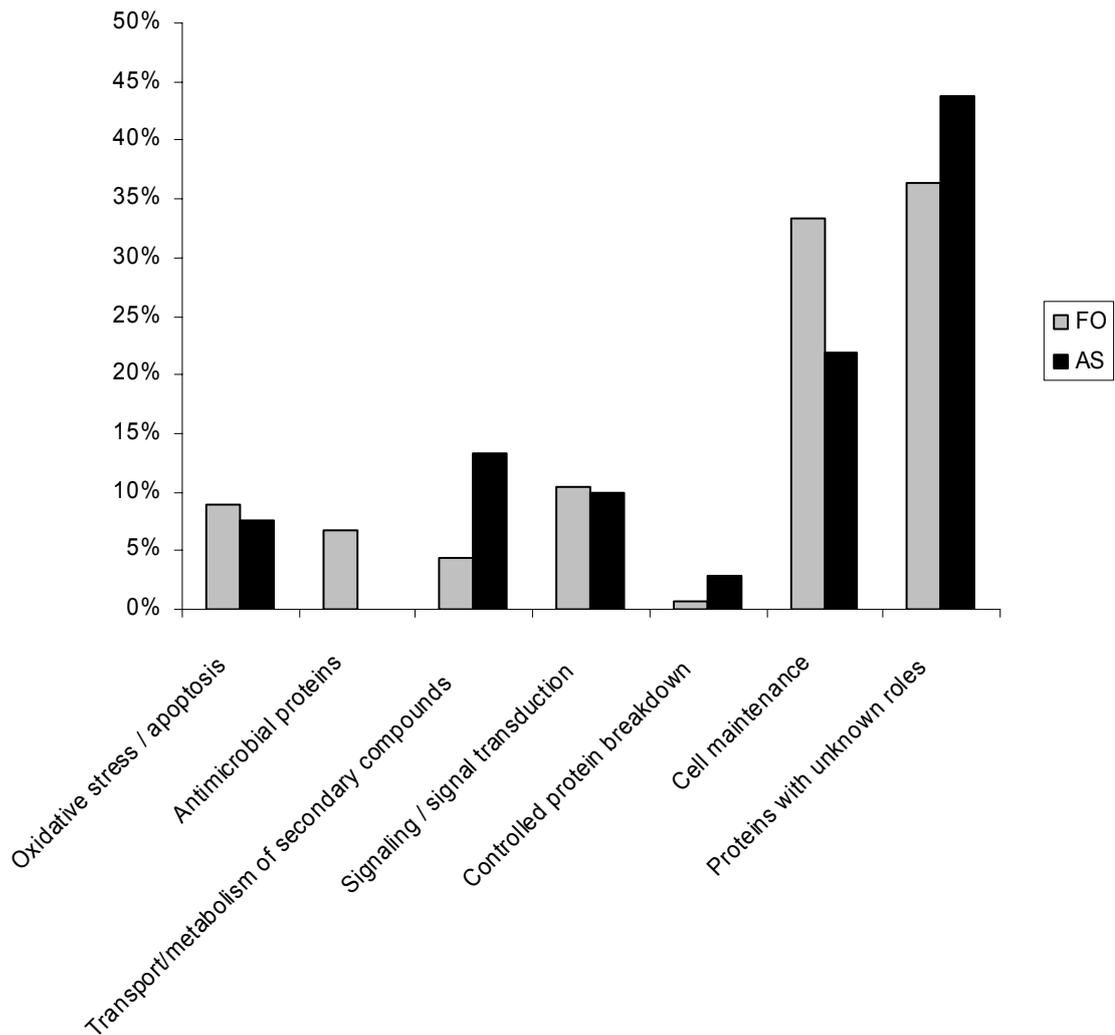


Figure 4. Comparison of ESTs classified by the predicted role between two tomato cDNA libraries, induced by salicylic acid (SA) and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FO)

Table 1. Treatments used to obtain SSH cDNA libraries.

Treatment	Control	Library identification	Number of clones	
5mM salicylic acid	H ₂ O	Tomato – SA	143	46 unknown role; 34 defense/stress related; 24 general metabolism
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> 1x 10 ⁷ / ml	H ₂ O	Tomato – FO	164	49 unknown role; 42 defense/stress related; 44 general metabolism

Table 2. Identification of salicylic acid-induced genes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) with homology to known genes from other plant species.

Clone ¹	Gene description (access no.) ²	E-value ³
AS - 010	Acil - CoA synthase [<i>Capsicum annuum</i>] (AAL29212)	1.4e-53
AS - 023	Late embryogenesis abundant protein [<i>Nicotiana tabacum</i>] (TC174494)	8.5e-62
AS - 044	Ubiquitin [<i>Solanum tuberosum</i>] (TC170024)	9.9e-55
AS - 053	Cytochrome b6 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (TC190079)	1.4e-21
AS - 061	Disease resistance protein PR-10 [<i>Capsicum annuum</i>] (Q2VT55)	9.1e-49
AS - 067	Chalcone synthase 2 [<i>Camellia sinensis</i>] (P48387)	2.0e-91
AS - 072	Manganese superoxide dismutase [<i>Lycopersicon esculentum</i>] (TC18915)	8.3e-34
AS - 080	Zinc finger domain protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (TC172334)	4.7e-43
AS - 095	60S ribosomal protein [<i>Lycopersicon esculentum</i>] (TC172591)	4.5e-54
AS - 112	Caspase 1 [<i>Lycopersicon esculentum</i>] (TC188871)	1.8e-66
AS - 115	bZIP family transcription factor [<i>Solanum tuberosum</i>] (TC180148)	6.7e-86
AS - 127	Photosystem II apoprotein (47 kDa) [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (TC182559)	1.9e-27
AS - 132	BHLH-like transcription factor [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (Q8S3E0)	6.4e-46
AS - 142	Phenylalanine ammonia lyase [<i>Lycopersicon esculentum</i>] (TC172772)	1.2e-79
AS-143	CIPK-like protein kinase [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (NP566580)	9e-30

1- Genes isolated by suppression subtractive hybridization, from salicylic acid-treated tomato mRNAs. 2- Gene roles were identified with homologue sequences from NCBI, TIRG and DDBJ, using the program BlastX. 3- E-value was used to indicate the significance of the similarity for each gene.

Table 3. Identification of tomato (*Lycopersicon esculentum*) genes induced by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* with homology to known genes from other plant species.

Clone ¹	Gene description (access no.) ²	E-value ³
FO - 007	ABC transporter protein [<i>Oryza sativa</i>] (BAC55994)	7.4e-50
FO - 023	Hypersensitivity-induced response protein [<i>Oryza sativa</i>] (AAK54610)	1.3e-44
FO - 027	Phospholipase [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (AAL87258)	2.8e-41
FO - 041	Chitinase [<i>Solanum lycopersicum</i>] (BAC76900)	1e-148
FO - 069	Cytochrome P450 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (AI776695)	1.1e-31
FO - 084	LeMir protein [<i>Lycopersicon esculentum</i>] (TC171566)	3.6e-45
FO - 089	Phenylalanine ammonia lyase [<i>Lycopersicon esculentum</i>] (TC172772)	3.1e-78
FO - 093	I-2 disease resistance protein with leucine-rich repeat [<i>Oryza sativa</i>] (BAB89710)	6.0e-35
FO - 098	Osmotin-like protein [<i>Solanum commersonii</i>] (P50702)	1.0e-32
FO - 099	Cysteine proteinase inhibitor [<i>Lycopersicon esculentum</i>] (TC172677)	1.2e-56
FO - 103	Xyloglucan-specific fungal endoglucanase inhibitor protein [<i>Lycopersicon esculentum</i>] (TC188664)	1.4e-63
FO - 115	Ubiquitin [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (Q45W78)	2.3e-32
FO - 130	Serine / threonine protein kinase [<i>Nicotiana tabacum</i>] (Q1W0X1)	1.1e-25
FO - 145	CGI-144-like protein (pathogen-induced) [<i>Lycopersicon esculentum</i>] (CAC81814)	1.3e-61
FO - 152	Catalase [<i>Gossypium hirsutum</i>] (S10395)	2.2e-55
FO - 155	Cysteine proteinase [<i>Ipomea batatas</i>] (AAQ81938)	3.7e-19

1- Genes isolated by suppression subtractive hybridization, from mRNAs of tomato plants inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

2- Gene roles were identified with homologue sequences from NCBI, TIRG and DDBJ, using the program BlastX. 3- E-value was used to indicate the significance of the similarity for each gene.

REFERENCES

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25: 3389-3402.
- Benhamou N, Joosten MHAJ, Wit PJGM (1990) Subcellular localization of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissue infected by (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*). *Plant Physiol*. 92: 1108-1120.
- Birch PRJ, Avrova AO, Duncan JM, Lyon GD, Toth RL (1999) Isolation of potato genes which are induced during an early stage of the hypersensitive response to (*Phytophthora infestans*). *Mol. Plant–Microbe Interact*. 12: 356–361.
- Brayford D (1992) Description of fungi (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*). *Mycopathol*. 118: 51-53.
- Degenhardt J, Al-Masri AN, Kurkcuoglu S, Szankowski I, Gau AE (2005) Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of (*Malus domestica*). *Molecular Genetics and Genomics*. 273(4): 326-335.
- Desender S, Andrivon D, Val F (2007) Activation of defence reactions in *Solanaceae*: where is the specificity?. *Cellular Microbiology*. 9(1): 21–30.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 93: 6025-6030.
- Diatchenko L, Lukyanov S, Lau YF, Siebert PD (1999) Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol*. 303: 349–380.
- Divon HH, Rothan-Denoyes B, Davydov O, Di Pietro A, Fluhr R (2005) Nitrogen-responsive genes are differentially regulated in planta during (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) infection. *Molecular plant pathology*. 6(4): 459–470.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*. 8: 1773-1791.
- Mahalingam R, Gomez-Buitrago AM, Eckardt N, Shah N, Guevara-Garcia A, Day P, Raina R, Fedoroff NV (2003) Characterization the stress / defense transcriptome of Arabidopsis genome biology. *Genome biology*. 4: R20,1-R20,14.
- Moody DE (2001) Genomics techniques: an overview of methods for the study of gene expression. *J. Anim Sci*. 79: E128-E135.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 437-497.

Nadimpalli R, Yalpani N, Gurmukh SJ, Simmons CR (2000) Prohibitins, stomatins, and plant disease response genes compose a protein superfamily that controls cell proliferation, ion channel regulation, and death. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(38): 29579-29586.

Olivain C, Humbert C, Nahalkova J, Fatehi J, L'Haridon F, Alabouvette C (2006) Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic (*Fusarium oxysporum*) strains inoculated together and separately into the soil. *Applied and environmental microbiology*. 72(2): 1523-123.

Ouyang B, Yang T, Li H, Zhang L, Zhang Y, Zhang J, Fei Z, Ye Z (2007) Identification of early salt stress response genes in tomato root by suppression subtractive hybridization and microarray analysis. *Journal of Experimental Botany*. 58(3): 507-520.

Park SY, Min HJ, Ryang SH, Oh KJ, Cha JS, Kim HY, Cho TJ (2003) Characterization of salicylic acid-induced genes in (*Chinese cabbage*). *Plant Cell Rep*. 21: 1027-1034.

Reis A, Giordano LB, Lopes CA, Boiteux LS (2004) Novel sources of multiple resistance to three races of (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) in *Lycopersicon* germplasm. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 4: 495-502.

Ros B, Tummler F, Wenzel G (2004) Analysis of differentially expressed genes in a susceptible and moderately resistant potato cultivar upon (*Phytophthora infestans*) infection. *Molecular Plant Pathology*. 5(3): 191-201.

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1: 1119-1122.

Santos JRM (1997) Methodology for screening Tomato for *Fusarium* wilt, *Verticillium* wilt, Gray leaf spot, Early blight, and *Septoria* leaf spot. In: Proceedings of the First International Symposium on Tropical Tomato Diseases. ASHS Press, p 164-166.

SHAH J (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*. 6(4): 365-371.

Soares MB (1997) Identification and cloning of differentially expressed genes. *Curr Opin Biotechnol*. 8: 542-546.

Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E, Levine A (1999) The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell*. 11: 431- 443.

Thatcher LF, Anderson JP, Singh KB (2005) Plant defence responses: what have we learnt from arabidopsis?. *Functional plant biology*. 32(1): 1-19.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 22: 4673-4680.

Van Loon LC (2004) Pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* 4: 111-116.

Werne M, Uehlein N, Proksch P, Kaldenhoff R (2001) Characterization of two tomato aquaporins and expression during the incompatible interaction of tomato with the plant parasite (*Cuscuta reflexa*). *Planta*. 213: 550-555.

Xiao F, Tang X, Zhou JM (2001) Expression of 35S::*Pto* globally activates defense-related genes in tomato plants. *Plant Physiology*. 126: 1637-1645.

Xiong L, Lee MW, Qi M, Yang Y (2001) Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14(5): 685-692.