

IDENTIFICAÇÃO DE GENES EXPRESSOS DURANTE A INTERACÇÃO CV. FLORINA – *V. INAEQUALIS* POR DIFFERENTIAL DISPLAY-RT-PCR

IDENTIFICATION OF GENES EXPRESSED DURING THE INTERACTION BETWEEN CV. FLORINA AND *V. INAEQUALIS* BY DIFFERENTIAL DISPLAY-RT-PCR

MARIANA MOTA¹, CRISTINA MONIZ OLIVEIRA¹

RESUMO

Para identificar genes especificamente regulados durante a expressão do mecanismo de resistência ao pedrado na macieira cv. Florina, comparou-se o padrão de expressão genética em plantas após inoculação com uma suspensão conidial do fungo *Venturia inaequalis*, com o padrão em plantas inoculadas com água, por “differential display RT-PCR”. Os produtos das reacções de amplificação resultantes da combinação de um oligodT (dT_{VG}) com 20 iniciadores decameiros de sequência arbitrária foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida e detectados com nitrato de prata. 14 fragmentos de cDNA visíveis apenas na amostra derivada de folhas inoculadas com a suspensão, ou em maior abundância nesta amostra, foram extraídos do gel para purificação, reamplificação e clonagem. Três fragmentos foram já sequenciados, revelando uma sequência forte homologia com uma fitoquelatina sintetase vegetal, potencialmente envolvida em respostas a factores de “stress”. A acumulação diferencial deste cDNA em resposta à inocu-

ção será verificada por transcrição-reversa-PCR com iniciadores específicos.

Palavras-chave: differential-display RT-PCR, expressão diferencial, Florina, pedrado, fitoquelatina sintetase

ABSTRACT

In order to identify genes that are specifically regulated during the expression of the resistance mechanism of the apple cv. Florina towards the apple scab fungus, the genetic expression pattern in plants inoculated with a conidial suspension of *Venturia inaequalis* was compared with the expression pattern in plants inoculated with water, by differential display RT-PCR. Amplified products derived from the combination of one oligodT (dT_{VG}) with 20 10-mer primers were separated in polyacrylamide denaturing gel and detected with silver nitrate. 14 cDNA fragments that were only visible in the sample inoculated with fungal suspension, or more abundant in this one, were purified from the gel for reamplification and cloning. Three fragments were already sequenced and one sequence showed very strong homology with a plant phytochelatin synthetase, that might be involved in stress responses. Differential accumulation of this cDNA upon fungal inoculation shall be verified by reverse-transcription PCR with specific primers.

Key-words: apple scab, differential-display RT-PCR, differential expression, Florina, phytochelatin synthetase

¹ Secção de Horticultura, Departamento de Produção Agrícola e Animal, Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, 1349-017, Lisboa, Portugal. mariana@isa.utl.pt, crismoniz@isa.utl.pt

Comunicação apresentada no 5º Congresso da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia, Coimbra 2007

INTRODUÇÃO

O pedrado da macieira, doença causada pelo fungo *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., é a principal micose que afecta os pomares de macieiras, influenciando decisivamente o rendimento e a qualidade dos frutos. Esta doença ataca várias espécies do género *Malus*, mas principalmente a macieira cultivada *Malus x domestica* Borkh., sendo quase todas as macieiras cultivadas para fins comerciais susceptíveis. O combate a esta doença é feito normalmente através de pulverizações com fungicidas. No entanto, esta estratégia apresenta desvantagens ao nível do encargo económico, e também ao nível da saúde pública e preservação do meio ambiente, pela carga poluente associada aos produtos químicos usualmente aplicados para o seu combate, e ao nível da protecção agrícola no futuro, pelo desenvolvimento de raças resistentes promovido pela sua aplicação continuada. Neste contexto, os programas de investigação em diversos países têm tentado criar alternativas, através da obtenção de diversas cultivares resistentes ao pedrado. Apesar de não dominarem ainda a produção de macieira em termos comerciais, existem já perto de 100 cultivares resistentes (Fischer *et al.*, 2005). Tem sido colocado grande ênfase no estudo da interacção planta-patogénio nestas cultivares essencialmente ao nível histológico (Chevalier *et al.*, 1991, Chevalier & Lespinasse, 1994) mas também, mais recentemente, ao nível molecular (Degenhardt *et al.*, 2005, Gao & Weg, 2006). Os vários estudos histológicos revelaram que tanto nas cultivares resistentes como nas susceptíveis há penetração do fungo através da cutícula e desenvolvimento no espaço subcuticular, de onde consegue retirar os nutrientes necessários sem penetrar nas células do tecido hospedeiro. É aqui que se manifesta o comportamento de resistência ou susceptibilidade por parte do hospedeiro. Nos hospedeiros susceptíveis, há uma degradação da parede celular nos locais de contacto entre o fungo e as células do hospedeiro, e o fungo vai-se

desenvolvendo, ocupando o espaço subcuticular. Nas células do tecido hospedeiro, inicialmente não há grandes variações histológicas aparentes mas após alguns dias, as estruturas do fungo produzem conidióforos na sua camada superior, que vão dar origem a conídios, surgindo as lesões de aspecto aveludado. Ocorre depleção do citoplasma das células imediatamente abaixo das lesões esporulantes, podendo ocorrer morte da célula. Acompanhando este efeito, há depleção dos plastídeos, vacuolização das células do mesófilo e, com o avançar da doença, pode ocorrer necrose dos tecidos. Em cultivares resistentes, o desenvolvimento micelial no espaço subcuticular é muito menor e não se observa degradação da parede celular do hospedeiro. Há deposição de substâncias nas paredes celulares em redor do local de penetração do fungo e as células em redor colapsam em pouco tempo, usualmente 20-72 h. O processo infeccioso é interrompido devido à morte dos tecidos em redor do fungo, ficando este confinado no espaço e acabando por morrer. Não há formação de lesões esporulantes, ao contrário do que acontece nas cultivares susceptíveis.

O comportamento diferencial entre genótipos resistentes e susceptíveis revelado por estes estudos microscópicos evidenciou o interesse de estudar as bases moleculares dos mecanismos que determinam o comportamento específico nos genótipos resistentes. A análise molecular dos processos que ocorrem durante a interacção entre o fungo e o hospedeiro resistente pode contribuir para identificar vias metabólicas activadas durante o mecanismo de defesa e hipotéticos genes de resistência.

A metodologia de “differential-display RT-PCR” (DDRT-PCR) tem sido usada para identificar genes diferencialmente expressos, em termos qualitativos e quantitativos, entre duas ou mais populações. Este método, que analisa a expressão diferencial do RNA mensageiro entre diferentes amostras (Liang & Pardee, 1992), tem sido utilizado num contexto de interacção planta-fungo para identificar interacções simbióticas (La-

popin *et al.*, 1999) e parasíticas. Num contexto de fitopatologia, foi usada pela primeira vez para isolar genes que participam na interacção entre tomate e o fungo *Botrytis cinerea* (Benito *et al.*, 1996). Mais recentemente, outras interacções planta-fungo têm sido investigadas por DDRT-PCR (Collinge & Boller, 2001; Basse, 2005; Benitez *et al.*, 2005, Yi *et al.*, 2005), indicando a adequação e o potencial desta metodologia para a análise da expressão genética subjacente à interacção estabelecida entre uma cultivar resistente ao pedrado e o fungo.

A cultivar 'Florina' é uma cultivar resistente obtida em França em 1977, que possui o gene de resistência Vf, derivado do genótipo *Malus floribunda* 821, mas também o gene Vg, derivado da 'Golden Delicious' (Bénaouf & Parisi, 1997). Esta cultivar não apresenta uma resposta clara de hipersensibilidade (Komjanc *et al.*, 1999), variando os sintomas nesta cultivar desde a clorose até à necrose sem esporulação (Ivanicka *et al.*, 1996) e tem sido muito utilizada em estudos de resistência ao pedrado.

Este trabalho visou a identificação de genes que participam nas vias metabólicas activadas no hospedeiro resistente após inoculação com o fungo, que podem estar relacionados com mecanismos de defesa.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e cultura do fungo

Venturia inaequalis

Árvores envasadas da cultivar Florina enxertadas em EMLA 9 foram mantidas em estufa, sob baixa pressão fitopatogénica, abdicando de pulverizações com fungicidas.

O isolado de *Venturia inaequalis* utilizado pertence à colecção da Estação Nacional de Fruticultura Vieira Natividade (ENFVN), tendo sido gentilmente cedido pelo Eng. Teixeira de Sousa. O isolado foi mantido em meio de malte suplementado com 0,24% MgSO₄ e 0,86% KH₂PO₄ (Palmiter, 1934) a 20 °C com 16 h de fotoperíodo.

Inoculação artificial

Para a inoculação das plantas envasadas, preparou-se uma suspensão conidial a partir de colónias em esporulação tendo o seu título sido estimado ao microscópio e ajustado para 1,5 x 10⁵ conídio/ml antes da aplicação às quatro folhas apicais recém-desenroladas. A inoculação-controlo foi realizada em paralelo, com água destilada apenas. As plantas inoculadas foram mantidas em dois túneis de plástico numa câmara de crescimento a 22-24 °C com elevada humidade relativa e 16 h de fotoperíodo. A germinação e a viabilidade do inóculo em placas de 0,6% água de agar foram acompanhadas ao microscópio.

O material foliar de plantas inoculadas com água e com suspensão conidial foi colhido 4 dias após a inoculação, submetido a um choque com azoto líquido e conservado a -80 °C até à extracção de RNA.

Extracção de RNA, tratamento com DNase I e quantificação

O RNA total de folhas inoculadas com suspensão ou com água foi purificado de acordo com Chang *et al.* (1993) usando 10 ml de tampão de extracção com 2% β-ME/grama de material fresco. O RNA foi dissolvido em 40 µl dH₂O tratada com DEPC e quantificado por espectrofotometria de UV. Para cada amostra, fez-se um tratamento com 40 U de DNase I livre de RNase (Pharmacia) a 40 µg de RNA total, num volume final de 100 µl contendo 10 mM Tris pH 7,5, 2,5 mM MgCl₂ and 0,5 mM CaCl₂ e 80 U Inibidor de RNase (Roche). A reacção foi incubada à temperatura ambiente durante 30 min e terminada com 5 mM EDTA. O RNA foi seguidamente purificado com recurso ao RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), seguindo o protocolo descrito para RNA Cleanup. O RNA foi recuperado em 60 µl de dH₂O livre de RNase, quantificado por espectrofotometria de UV e controlado num gel desnaturante (Fourney *et al.*, 1988).

DDRT-PCR e separação dos produtos amplificados em gel de poli-acrilamida

A síntese da primeira cadeia de cDNA foi realizada com 3 µg de RNA total, 2,5 µM do iniciador dT_{VG} (5' TTTTTTTTTTTT(A/C/G)G 3'), 50mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 5 mM DTT (Gibco BRL), 0,5 mM de cada dNTP, 40 U Inibidor de RNase (Roche) e 200 U transcriptase reversa SuperscriptTMMRT (Gibco BRL) num volume total de 20 µl. A reacção foi incubada a 50 °C durante 1 h e inactivada a 75 °C durante 15 min. Para análise da expressão genética em cada subpopulação de cDNAs, a síntese da cadeia complementar e a amplificação foram realizadas num termociclador Biometra UNO com 1,5 µl cDNA, 10mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 200 µM cada dNTP, 1 µM do iniciador dT_{VG}, 1 µM do iniciador arbitrário decamero e 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (*AmpliTaq*^RDNA polymerase, Perkin Elmer Cetus) num volume total de 25 µl. A enzima foi adicionada depois de um período a 95 °C durante 3 min, seguindo-se 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 42 °C e 1 min a 72°C, e um passo final de extensão de 10 min a 72°C. Os iniciadores decameros de sequência arbitrária usados foram OPA8 (5' GTGACGTAGG 3'), OPA10 (5' GTGATCGCAG 3'), OPA11 (5' CAATCGCCGT 3'), OPA12 (5' TCGCGATAG 3'), OPA14 (5' TCTGTGCTGG 3'), OPA16 (5' AGCCAGCGAA 3'), OPA17 (5' GACCGCTTGT 3'), OPA18 (5' AGGTGACCGT 3'), OPA19 (5' CAAACGTCGG 3'), OPE2 (5' GGTGCGGGAA 3'), OPE5 (5' TCAGGGAGGT 3'), OPE9 (5' CTTCAACCGA 3'), OPE10 (5' CACCAGGTGA 3'), OPE11 (5' GAGTCTCAGG 3'), OPE12 (5' TTATCGCCCC 3'), OPE14 (5' TGCGGCTGAG 3'), OPE15 (5' ACGCACAACC 3') e OPE18 (5' GGACTGCAGA 3') da Operon Technologies.

Os produtos de PCR foram misturados 2:1 com corante (98% formamida desionizada, 0.098% azul de bromofenol, 0.098% xileno cianol FF, 10 mM EDTA), desnaturados a 100 °C durante 5 min e separados por electrofo-

rese num gel desnaturante de 4,5% de poli-acrilamida (38% acrilamida:2% metilbisacrilamida Rotiphorese^RGel 40, da Roth) em 0,5 x TBE. O gel foi corado com nitrato de prata segundo o protocolo de Bassam *et al.* (1991). As bandas que apresentavam expressão diferencial na amostra correspondente às folhas inoculadas com suspensão conidial (apenas presentes nesta amostra, ou com maior intensidade nesta amostra) foram cortadas do gel e incubadas em 100 µl tampão de eluição (0,5 M NH₄CH₃COO, 10 mM Mg(CH₃COO)₂, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,1%SDS) durante 15 min a 100°C e seguidamente a 37 °C 12 h -16 h. O DNA eluído foi usado directamente em reacções de amplificação ou precipitado com etanol absoluto, lavado em etanol 70% e dissolvido em 10µl dH₂O, usando-se 2-4 µl para a reacção de amplificação.

Reamplificação, clonagem e sequenciação dos fragmentos diferencialmente expressos

A reamplificação dos fragmentos foi realizada usando a mesma combinação de iniciadores que lhes dera origem, e condições de amplificação semelhantes, apenas com 2,5 mM MgCl₂. Os produtos amplificados foram analisados por electroforese em gel de 2% agarose em 1 x TAE (Sambrook *et al.*, 1989) e visualizados sob luz ultravioleta após marcação com brometo de etídio (0,5 µg/ml). Os produtos amplificados foram clonados no vector pCRII (Invitrogen), seguindo as normas do fabricante. O DNA plasmídico foi purificado por lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) e utilizado em reacções de amplificação com iniciadores específicos para o vector pCRII (M13-48 (rev) 5' AGCGGATAACAATTTACACAGGA 3' e T7SEQ 5' CGTAATACGACTCACTAGTAGG 3'). As reacções de amplificação de 25 µl incluíram 0,2 µl de DNA plasmídico, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris HCl (pH 8,8 a 25°C), 0,01% Tween-20, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM cada dNTP, 0,2 µM de cada um dos iniciadores e 0,5 U de *Taq* polimerase (Bio-line). A reacção de PCR foi incubada num

termociclador Biometra UNO, programado para um passo inicial de desnaturação de 3 min a 94 °C, 35 ciclos de 45 seg a 94 °C, 1 min a 58 °C e 1 min 30 a 72 °C, e um passo final de extensão de 10 min a 72 °C. Os produtos amplificados foram analisados como anteriormente descrito, purificados através do QIAGEN PCR Purification Kit (QIAGEN) e sequenciados automaticamente. As reacções de sequenciação foram conduzidas pela empresa STAB Vida, utilizando iniciadores específicos do vector (T7 fwd e M13 rev).

Análise das sequências

As sequências obtidas foram processadas com recurso ao software Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) e alinhadas recorrendo ao software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Análises de homologia foram feitas utilizando o software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

RESULTADOS

Das várias combinações de iniciadores efectuadas resultaram 14 fragmentos de cDNA visíveis apenas na amostra derivada de folhas inoculadas com suspensão, ou em maior abundância nesta amostra (Quadro 1). Estes fragmentos foram extraídos do gel, para subsequente purificação, reamplificação e clonagem. Até ao momento, a reamplificação dos fragmentos de cDNA foi bem sucedida apenas para cinco dos 14 fragmentos, respectivamente o N5, N6, N7, N8, N9. Estes cinco fragmentos foram clonados e três fragmentos (N5, N8, N9) foram já sequenciados, tendo sido feita uma análise de homologia da sequência nucleotídica com recurso ao BLAST. As homologias obtidas ao nível dos nucleótidos (Quadro 2) apontam para que os fragmentos analisados pertençam a tecidos do hospedeiro, na medida em que apresentam maior semelhança com sequências de espécies de plantas.

Uma das sequências analisadas (N5) revela forte homologia com o gene codificador de uma fitoquelatina sintetase vegetal. As outras duas sequências (N8, N9) apontam para sequências genéticas de plantas, mas de função desconhecida. Uma das sequências (N9) apresenta homologia com a sequência codificadora de uma proteína de *Arabidopsis thaliana* de função desconhecida, mas que poderá estar relacionada com uma “Rhomboid”-proteína.

DISCUSSÃO

No âmbito da fitopatologia, diferentes interações parasita-hospedeiro têm sido analisadas por DDRT-PCR. Este método permite a análise comparativa do padrão de genes expressos entre diferentes populações, e apesar de gerar falsos positivos e apenas analisar subpopulações parcelares do transcrito total (Lievens *et al.*, 2001), apresenta grandes vantagens, pois não implica a construção de bibliotecas, baseia-se em métodos comuns de biologia molecular e permite a identificação de transcritos pouco abundantes. A aplicação desta metodologia à análise da interacção pedrado-hospedeiro resistente, apesar do reduzido número de combinações de iniciadores testadas, e consequente reduzida proporção de produtos transcritos analisados, permitiu a identificação de diferentes cDNAs expressos durante o processo de interacção. O facto de o mecanismo de resistência se manifestar no início da infecção levou-nos a analisar a expressão genética 96 h após a inoculação, muito antes do momento de aparecimento de sintomas. Uma vez que o parasita se desenvolve sob a cutícula, não é possível acompanhar de forma expedita ao microscópio o seu desenvolvimento, pelo que se optou por fazer o controlo da germinação e viabilidade da suspensão numa placa de água de agar. Considerou-se que às 96 h já se estaria a estabelecer a interacção genética entre parasita e hospedeiro, tendo em atenção o desenvolvimento do fungo na placa controlo.

A exclusão do cDNA do fungo cultivado em meio artificial na análise comparativa foi uma limitação de todo o dispositivo experimental, pois exclui a possibilidade de identificação de fragmentos resultantes da expressão constitutiva do fungo. No entanto, dado que não seria possível identificar o momento em que o fungo estaria no mesmo estágio de desenvolvimento no meio artificial e no hospedeiro, optou-se por não incluir uma terceira amostra, correspondente ao fungo a crescer em meio de cultura. A origem dos fragmentos identificados poderia ser posteriormente verificada por análise de Southern, e mesmo a própria análise BLAST e as homologias que ela revela dão já uma indicação se os fragmentos identificados pertencem ao fungo ou ao hospedeiro. Num trabalho posterior, será necessário, para os fragmentos pertencentes ao fungo, fazer essa análise de verificação de expressão constitutiva ou diferencial (específica do desenvolvimento do processo infeccioso). É no entanto expectável que a maioria dos fragmentos analisados pertença ao hospedeiro, na medida em que a quantidade de suspensão conidial nas folhas é relativamente reduzida e, portanto, a abundância de genes expressos do fungo na população de RNA total deverá ser reduzida. Em conformidade, a análise BLAST para os fragmentos já sequenciados deu maior homologia com sequências provenientes de plantas.

Grande parte dos fragmentos isolados não foi reamplificada. Uma das razões para este insucesso poderá ser a reduzida quantidade de DNA ou a inibição da reacção de amplificação pela presença de vestígios de ácido acético utilizado na detecção com nitrato de prata. Tentou-se a precipitação do DNA para ultrapassar este inconveniente, mas sem grande sucesso. Provavelmente essa precipitação levou também à perda de algum DNA, ficando a quantidade da amostra ainda mais reduzida. Outro problema encontrado durante a reamplificação foi o tamanho inesperado de alguns fragmentos (ex N6). Estes fragmentos, provavelmente artefactos de ampli-

ficação, deverão ter resultado das condições pouco específicas do PCR.

A sequência N5 apresenta uma homologia muito significativa com o gene codificador de uma fitoquelatina sintetase. Estas enzimas participam no metabolismo do enxofre, estando a sua actividade relacionada com a resposta a “stresses” de origem abiótica, nomeadamente contaminações com metais pesados, em particular com cádmio (Clemens, 2006). No entanto, são já vários os estudos que apontam para uma sobre-regulação de genes desta família em resposta a “stresses” bióticos, nomeadamente a ataques de fungos como o *Blumeria graminis* em cevada (Eckey, 2002) ou *Peronospora tabacina* em tabaco (Lawrence *et al.*, 2001) ou bactérias do género *Pseudomonas* em soja (Kang *et al.*, 2003), à semelhança do que foi por nós observado. É, no entanto, necessário confirmar esta expressão diferencial observada no DDRT-PCR por transcrição-reversa-PCR com iniciadores específicos, se possível de forma quantitativa, ou através de outras metodologias, como análise de Northern, “Ribonuclease Protection Assay” ou “reverse-Northern”.

É também necessário continuar a caracterizar o fragmento com hipotéticas características de transcrito de “Rhomboid”-proteína. Estas proteínas, identificadas inicialmente em *Drosophila* (Kanaoka *et al.*, 2005), não têm uma função muito clara nas plantas, mas estudos recentes apontam para que sejam proteínas membranares ligadas à transdução de sinal e mecanismos de senescência (Garcia-Lorenzo *et al.*, 2006), podendo contribuir para explicar o mecanismo de resposta de hipersensibilidade, mais ou menos clara, que se observa na reacção de resistência ao *Venturia inaequalis* descrita para os hospedeiros resistentes.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo programa POCTI (BPD14531/2003), FCT, MCES, Portugal.

Quadro 1 – Caracterização dos fragmentos isolados no DDRT-PCR (combinação de iniciadores correspondente, expressão diferencial no gel e tamanho do fragmento).

Fragmento	Combinação de iniciadores (pb)	Expressão diferencial no gel de acrilamida	Tamanho do fragmento no gel de acrilamida (pb)	Tamanho do produto reamplificado (pb)
N5	dT _{VG} x OPA17	*	900	800
N6	dT _{VG} x OPA17	*	800	800/500
N7	dT _{VG} x OPA17	*	700-800	700
N8	dT _{VG} x OPA17	*	600-700	700
N9	dT _{VG} x OPA17	*	400-500	500
N20	dT _{VG} x OPA17	+	900-1000	-
N22	dT _{VG} x OPE10	+	900-1000	-
N23	dT _{VG} x OPE10	*	600	-
N26	dT _{VG} x OPE10	*	500-600	-
N28	dT _{VG} x OPE9	+	800	-
N29	dT _{VG} x OPE9	*	700	-
N36	dT _{VG} x OPE2	+	800	-
N40	dT _{VG} x OPE10	*	500	-
N45	dT _{VG} x OPE14	+	700	-

* banda visível só na amostra resultante das folhas inoculadas com suspensão. + banda visível em ambas as amostras mas com maior intensidade na amostra resultante das folhas inoculadas com suspensão.

Quadro 2 – ao nível nucleotídico e probabilidade após análise BLAST.

Fragmento	Tamanho do fragmento sequenciado (pb)	Homologia BLAST	Acessão	Probabilidade
N5	773	<i>Fragaria x ananassa</i> probable phytochelatin synthetase mRNA, partial cds	AY642687	2e-121
N8	675	<i>Vitis vinifera</i> , whole genome shotgun sequence, contig VV78X066969.8, clone ENTAV 115	AM479254	2e-94
N9	573	<i>Arabidopsis thaliana</i> rhomboid family protein / ubiquitin-associated (UBA)/TS-N domain-containing protein (AT3G58460) mRNA, complete cds	NM_115708	2e-76

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bassam, B.J.; Caetano-Anolles, G. & Greshoff, P.M. (1991) - Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196: 80-83.
- Basse, C.W. (2005) - Dissecting defense-related and developmental transcriptional responses of maize during *Ustilago maydis* infection and subsequent tumor formation. *Plant Physiology* 138: 1774-1784.
- Bénaouf, G. & Parisi, L. (1997) - Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains from *Malus floribunda* 821: comparison with race 6 on apple clones. *IOBC/WPRS Bulletin* 20: 8-11.
- Benitez, Y.; Botella, M.A.; Trapero, A.; Alsalimiya, M.; Caballero, J.L.; Dorado, G. & Munoz-Blanco, J. (2005) - Molecular analysis of the interaction between *Olea europaea* and the biotrophic fungus *Spilocaea oleagina*. *Molecular Plant Pathology* 6: 425-438.
- Benito, E.P.; Prins, T. & van Kan, J.A.L. (1996) - Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a plant-fungus interaction. *Plant Mol. Biol.* 32: 947-957.
- Chang, S.; Puryear, J. & Cairney, J. (1993) - A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 113-116.
- Chevalier, M.; Lespinasse, Y. & Renaudin, S. (1991) - A microscopic study of the different classes of symptoms coded by the Vf gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). *Plant Pathol.* 40: 249-256.
- Chevalier, M. & Lespinasse, Y. (1994) - Ultrastructural study of host-parasite interaction: Early phases of *Venturia inaequalis* installation on susceptible and resistant apple leaves. *Bulletin de l'Association des Anatomistes* 78: 33-37.
- Clemens, S. (2006) - Evolution and function of phytochelatin synthases. *Journal Plant Physiology* 163: 319-332.
- Collinge, M. & Boller, T. (2001) - Differential induction of two potato genes, Stprx2 and StNAC, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant. Mol. Biol.* 46: 521-529.
- Degenhardt, J.; Al-Mari, A.N.; Kurkcuoglu, S.; Szankowski, I. & Gau, A.E. (2005) - Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. *Mol. Genet. Genomics* 273:326-335.
- Eckey C. (2002) - *Isolierung und Charakterisierung Pathogen-induzierter Gene der Gerste (Hordeum vulgare L.) und Marktentwicklung für den Mlg Resistenzgenlocus mittels cDNA-AFLP*. Dissertação de doutoramento, Universidade Justus Liebig, Giessen, 151 pp.
- Fischer, M.; Fischer, C. & Dierend, W. (2005) - Evaluation of the stability of scab resistance in apple: a co-operation between gene bank curator, breeder and fruit grower. *PGR Newsletter* 142: 36-42.
- Fourney, M.R.; Miyakoshi, J.; Day III, R.S.; Paterson, M.C. (1988) - Northern blotting: efficient RNA staining and transfer. *Focus* 10: 5-7.
- Gao, Z.S. & Weg, W.E. (2006) - The Vf gene for scab resistance in apple is linked to sub-lethal genes. *Euphytica* 151:123-132.
- Garcia-Lorenzo, M.; Sjodin A.; Jansson, S. & Funk, C. (2006) - Protease gene families in *Populus* and *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 6 doi:10.1186/1471-2229-6-30
- Ivanicka, J.; Kellerhals, M. & Theiler, R. (1996) - Evaluation of scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wint.) on shoots and detached leaves from in vitro and greenhouse grown plants of the apple (*Malus domestica* Mill.) cultivars Golden Delicious and Florina. *Gartenbauwissenschaft* 61: 242-248.
- Kanaoka, M.; Urban, S.; Freeman M. & Okada, K. (2005) - An *Arabidopsis* Rhomboid homolog is an intramembrane protease in plants. *FEBS Letters* 579: 5723-5728.
- Kang, S.; Cha H.W.; Chang, M.U. & Park, E. (2003) - Identification of differentially dis-

- played genes of a *Pseudomonas* resistant soybean (*Glycine max*). *Plant Pathology Journal* 19: 10.
- Komjanc, M.; Festi, S.; Rizzotti, L.; Cattivelli, L.; Cervone, F. & De Lorenzo, G. (1999) - A leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRPKm1) gene is induced in *Malus x domestica* by *Venturia inaequalis* infection and salicylic acid treatment. *Plant Mol. Biol.* 40: 945-957.
- Lapopin, L.; Gianinazzi-Pearson, V. & Franken, P. (1999) - Comparative differential RNA display analysis of arbuscular mycorrhiza in *Pisum sativum* wild type and a mutant defective in late stage development. *Plant Mol. Biol.* 41: 669-677.
- Liang, P. & Pardee, A.B. (1992) - Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971.
- Lievens, S.; Goormachtig, S. & Holsters, M. (2001) - A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: looking back and looking forward. *Nucleic Acids Research* 29: 3459-3468.
- Lawrence, C.B.; Bass, W.T.; Kovar, J. & Qiu, J. (2006) - *Profiling of Gene Expression During Early Stages of A Compatible Plant-Oomycete Interaction via cDNA-AFLP®* Technology. Disponível em <<http://www.licor.com/bio/Posters/536/pdf/536Poster.pdf>> (acesso a 19/11/07).
- Palmiter, D.H. (1934) - Variability in mononidial cultures of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 24: 22-47.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis T. (1989) - *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor. Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Yi, T.Y.; Zhang, B.X.; Xie, B.Y. & Gao, B.D. (2005) - Application of differential display techniques to the cloning of resistant gene to phytophthora blight. *Journal of Hunan Agricultural University* 31: 258-261.