

MARIA ELISA PAVIN

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
DUAS β -1,3 GLUCANASES EM *Carica papaya***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Católica de Brasília como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientador: Guy de Capdeville

**Brasília – DF
2005**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

TERMO DE APROVAÇÃO

Dissertação defendida e aprovada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, defendida e aprovada em 08 de setembro de 2005, pela banca examinadora constituída por:

Prof. Dr. Guy de Capdeville
(Orientador)

Prof. Dr. Manoel Teixeira Souza Júnior
(Co-Orientador)

Profa. Dra. Betânia Quirino
(Membro da banca)

Profa. Dra. Natália Florêncio Martins
(Membro Convidado)

Brasília
UCB

Ao Dr. Francisco Aires Corrêa, médico reumatologista, cujo carinho e dedicação à minha saúde permitiram a finalização deste trabalho.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela presença e apoio constantes.

Ao meu irmão, Carlos Eduardo, pela compreensão das horas em que o silêncio era necessário e pela manutenção do computador, que muitas vezes parou em momentos inoportunos.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por ter-me permitido a utilização de seus recursos humanos e materiais durante a realização do curso de mestrado.

Ao Dr. Guy de Capdeville, por sua confiança e por aceitar-me em seu laboratório como estudante de Mestrado, dividindo comigo seu conhecimento em Microbiologia e Microscopia, orientando-me com dedicação e precisão.

Ao Dr. Manoel Teixeira Souza Júnior, pelo carinho demonstrado ao receber-me em seu laboratório, disponibilizando recursos, tempo e seu profundo conhecimento em Biologia Molecular.

À Dra. Betânia Ferraz Quirino, pelo apoio e tempo a mim dedicados.

Aos estagiários, Jansen, Simone e Marília e à bolsista, Lisângela Cassiano, pelo apoio técnico, companheirismo e amizade.

À Dra. Natália Martins, por sua grande ajuda no que disse respeito à Bioinformática, além do carinho demonstrado.

À Mestre Marli Coelho, por sua presença constante em todos os momentos desta caminhada.

Aos Doutores Eugen Gander e Lucília Marcelino, aos quais me faltam palavras para expressar minha profunda gratidão por terem me acolhido em seu laboratório durante toda a graduação, pela amizade, pelo carinho, pelos conselhos, inclusive durante o Mestrado e pela

transmissão de conhecimentos básicos e técnicas da Biologia Molecular, que despertaram em mim o amor pela pesquisa.

A todos os professores e funcionários da Universidade Católica de Brasília e em especial ao Prof. Dr. Ruy Caldas, Diretor do Curso de Ciências Genômicas e Biotecnologia, por ter-me incentivado a ingressar neste Curso.

A todos os colegas do Curso, pelos momentos compartilhados, dos quais surgiram novos laços de amizade.

Aos meus amigos, pela força oferecida e pelos momentos de diversão, tão necessários para a conclusão desta empreitada.

E, acima de tudo, a Deus, por ter colocado ao meu lado todas essas pessoas e ter-me permitido a conclusão desta etapa da minha vida.

“ Em todos os casos, os transgênicos têm o mesmo efeito alimentar e de saúde humana ou animal que seus correspondentes não transgênicos”.
(Engenheiro agrônomo – Wilhelmus Vitdewilligen).

“A agricultura tradicional tem-se mostrado eficiente, mas em alguns casos, houve abuso no uso de insumos agrícolas. É possível que a engenharia genética crie plantas que necessitem de menor quantidade desses produtos ou que permitam o uso de herbicidas menos danosos.”
(Representante do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos – Quentin B. Kubicek.)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema geral de modelagem de proteínas por homologia.....	18
Figura 2. Gel de eletroforese mostrando duas bandas (círculos brancos) de DNA de aproximadamente 1100 e 650 pb. A menor destas bandas foi eluída para obter o DNA a ser inserido no plasmídeo a ser utilizado na transformação de células de <i>E. coli</i>	20
Figura 3: Alinhamento da primeira seqüência consenso de nucleotídeos com sua respectiva proteína. Observa-se que a seqüência de DNA está invertida.....	21
Figura 4: Alinhamento da segunda seqüência consenso de nucleotídeos com sua respectiva proteína. Observa-se que a seqüência de DNA está invertida.....	21
Figura 5: Alinhamento de β glupapaya 1 e β glupapaya 2.....	22
Figura 6: Alinhamento de β glupapaya 1 e β glupapaya 2 com as 21 seqüências selecionadas para a análise filogenética.....	25
Figura 7: Árvore filogenética da β -1,3-glucanase.. β glupapaya 1 e β glupapaya 2 e são as seqüências de β -1,3-glucanase de <i>Carica papaya</i> (Referências conforme tabela 1).	27
Figura 8: Apresentação da predição da estrutura secundária da glucanase do grupo 1 (β glupapaya 1) onde a seta amarela representa as folhas β , o cilindro verde corresponde às α hélices e a linha contínua indica uma estrutura não definida (coil) , como indicado na legenda..	29
Figura 9: Apresentação da predição da estrutura secundária da glucanase do grupo 2 (β glupapaya 2) onde a seta amarela representa as folhas β , o cilindro verde corresponde às α hélices e a linha contínua indica uma estrutura não definida (coil) , como indicado na legenda..	30
Figura 10: Apresentação da predição da estrutura terciária da β -1,3 glucanase de <i>Carica papaya</i>	31
Figura 11: Estrutura terciária da glucanase indicando os sítios ativos onde o ácido glutâmico exerce a função principal.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seqüências selecionadas para a análise no Clustal W com suas respectivas referências obtidas a partir do Blast X.....	26
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Graus Centígrados

DNA –Ácido desoxirribonucléico

PCR- “Polimerase Chain Reaction” – Reação de Polimerização em Cadeia

Pb – Pares de Base

μL – Microlitro

min – Minuto

mL – Mililitro

t/ano – Toneladas por ano

% - Por Cento

cm – Centímetro

UV – Irradiação Ultra Violeta

ISR – “Induced Systemic Resistance” – Resistência Sistêmica Induzida

SAR – “Systemic Acquired Resistance” – Resistência Sistêmica Adquirida

BTH – Benzothiadiazole

PR – “Pathogenesis Related” – Relacionado à Patogenicidade

AS – Ácido Salicílico

rpm – Rotações por minuto

RNAse – Enzima de Degradação do Ácido Ribonucléico

H₂O – Água

M – Molar

ETOH – Etanol

mM – Milimolar

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

Na – Sódio

NCBI – “National Center for Biotechnology Information”

EBI – “European Bioinformatics Institute”

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – O hospedeiro e sua importância social	1
1.2 – Perdas na pós-colheita por fitopatógenos	2
1.3 – A doença	2
1.4 – O patógeno.....	3
1.5 – Controle de doenças de pós-colheita do mamão	3
1.6 – Resistência adquirida e resistência induzida	5
1.7 – As proteínas PR	6
1.8 – Quitinases e β -1,3-Glucanases	8
1.8.1 – As quitinases.....	10
1.8.2 – As β - 1,3 glucanases.....	11
1.9 – Objetivos.....	13
1.9.1 – Geral	13
1.9.2 – Específicos.....	13
2 – MATERIAS E MÉTODOS	15
2.1 – Amplificação e Clonagem	15
2.2 – Eluição da banda obtida da PCR	15
2.3 – Clonagem do produto da PCR e transformação	15
2.4 – Miniprep e Seqüenciamento	16
2.5 - Análise filogenética.....	17
2.6. Predição da estrutura secundária e terciária da proteína.....	17
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
3.1 – Produto da PCR	20
3.2 – Análise do seqüenciamento	20
3.3 – Análise Filogenética	23
3.4. Predição das estruturas secundária e terciária da proteína	28
3.4.1 – Predição da estrutura secundária	29
3.4.2 – Predição da estrutura terciária	30
4 – CONCLUSÃO.....	33
5 – PERSPECTIVAS FUTURAS	35
6 – REFERÊNCIAS	36

RESUMO

O Brasil é o primeiro produtor mundial de *Carica papaya* que é cultivado em quase todo território brasileiro. Além de sua importância econômica deve ser ressaltada sua função social, pois o mamoeiro produz durante o ano todo, necessitando de renovação periódica das lavouras, o que gera empregos e absorve mão-de-obra continuamente. A discreta posição do mamão na pauta das exportações de frutas frescas deve-se, entre outras razões, à sua fragilidade na fase de pós-colheita que dificulta seu transporte e exportação. O controle de doenças de pós-colheita do mamão tem sido feito quase que exclusivamente por meio do uso de fungicidas protetores, entretanto, tais produtos estão se tornando menos efetivos porque os patógenos estão desenvolvendo resistência. Nessa busca por qualidade associada ao menor custo têm sido usados tratamentos com calor, irradiação (gama e UV) e compostos naturais. Em geral, as plantas respondem ao ataque de microorganismos patogênicos com a indução de expressão de um grande número de genes que codificam diversas proteínas, entre as quais estão as quitinases e β -glucanases. O objetivo do presente estudo foi, portanto, determinar se o gene de β - 1,3 glucanase está presente em *Carica papaya*. Tal estudo poderá subsidiar futuros estudos de transformação em mamão, visando à produção de plantas transgênicas superexpressando essa proteína com o objetivo de controlar doenças de pré e pós-colheita. Para isto foi realizada uma PCR (Polimerase Chain Reaction), a partir da qual foi possível a amplificação, a identificação e a clonagem de dois tipos de β - 1,3 glucanases. Com base na análise da seqüência protéica foi possível construir uma árvore filogenética além de permitir a realização da predição das estruturas secundária e terciária da proteína. A identificação destes dois tipos de β -1,3 glucanases distintas sugere que estas sejam produto de alelos diferentes do mesmo gene, ou que as mesmas sejam produto de genes diferentes, ou ambas as situações. Outros fatores podem contribuir para o aparecimento desses dois tipos de uma mesma enzima

em uma única espécie, como a necessidade de um nível de expressão elevado ou a localização distinta da expressão nos tecidos da planta.

De posse destes resultados será possível produzir plantas com elevada expressão desta proteína o que poderia garantir elevada resistência a fungos. Desta forma, os produtos teriam a vida de prateleira aumentada, a perda de produtos seria menor, assim como o prejuízo para os agricultores, pois os frutos estariam mais protegidos durante o transporte e o armazenamento.

Palavras-chave: β -1,3-glucanases; *Carica papaya*; *Estrutura protéica*; *PCR*; *Resistência*.

ABSTRACT

Brazil is the largest producer of *Carica papaya* in the world. Besides the economical importance of this crop it has a very important social role since it is produced all year long, generating new jobs annually. The discrete position of papaya fruit on the exportation market of fresh fruit in Brazil is due to fruit fragility and diseases after harvest, which makes the fruit inappropriate for exportation.

The control of postharvest diseases of papaya fruit has been accomplished almost exclusively by mean of fungicides dip or drench after harvest. Due to increasing concerns with fungicide toxicity and development of resistance by pathogens most chemicals used for the control of papaya postharvest diseases have been withdrawn from the market. The search for quality associated to lower costs and environment safety concerns have directed efforts to search for new control alternatives such as the use of hot bath, irradiation (gama and UV) and natural compounds. In general, plants respond to attack of pathogenic microorganisms by the induction of expression of a large number of genes, which controls the expression of many proteins among which are the chitinases and the β -1,3-glucanases.

The objective of the present study was, therefore, to determine if the gene of β -1,3-glucanase is present in the genome of *C. papaya*. Using Polymerase Chain Reactions, it was possible to amplify, identify and clone two different types of β -1,3-glucanases. Based on the sequence analysis of the protein, it was possible to construct a phylogenetic tree and to predict the secondary and tertiary structure of these proteins. The identification of these two distinct types of β -1,3-glucanases is, probably, explained by the fact that either these could be different alleles of the same gene, be different genes or it could be both. Other facts may contribute for the existence of these distinct types of the same enzyme in *C. papaya*. First, the necessity of a high expression level of the enzyme in the plant or differential localization of the expression in the plant.

Considering that in many plant pathogen systems β -1,3-glucanases are involved in resistance to diseases, knowing the gene sequence of these enzymes could help to produce transformed papaya with high level of resistance against fungi. This could increase fruit quality and shelf life, reducing losses and increasing growers profit.

Key words: β -1,2 glucanases; *Carica papaya*; Protein structure; PCR; Resistance.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – O hospedeiro e sua importância social

O Brasil é o primeiro produtor mundial de *Carica papaya*, com uma produção anual de 1.650.000 t/ano, situando-se entre os principais países exportadores, principalmente para O mercado europeu (Farias et al, 1998).

Essa espécie é cultivada em quase todo o território brasileiro, merecendo destaque os estados da Bahia, Espírito Santo e Pará, responsáveis por cerca de 89,71% da produção nacional. Nos últimos dez anos ocorreu um crescimento da produção na região que envolve os estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco, tornando-a a segunda maior região produtora do Brasil (Farias et al, 1998).

O mamoeiro, *Carica papaya* L., é uma planta herbácea de grande importância econômica devido, principalmente, ao aproveitamento de seus frutos, que podem ser consumidos maduros, ao natural ou verdes, sob a forma de produtos industrializados e à extração da papaína ou pectina (Peres et al, 2000).

Além de sua importância econômica, deve ser ressaltada sua função social. O mamoeiro produz durante o ano todo, necessitando, para isso, de renovação periódica das lavouras, o que gera empregos continuamente (Farias et al, 1998). Entretanto, mesmo com tamanha produção e importância, essa cultura apresenta uma discreta posição na pauta das exportações de frutas frescas e isto se deve, entre outras razões, à sua fragilidade na fase de pós colheita, demonstrada pela curta vida de prateleira, o que dificulta seu transporte e exportação (Mendes et al, 1996).

1.2 – Perdas na pós-colheita por fitopatógenos

As perdas pós-colheita podem ter diversas causas, dentre as quais se destacam as doenças ocasionadas por fungos, responsáveis por 80 a 90 % do total das perdas por fitopatógenos. (Dantas et al, 2003).

As doenças pós-colheita podem iniciar no campo e ficarem latentes, manifestando-se somente após a colheita, em condições ambientais favoráveis. A penetração do hospedeiro por patógenos pode ocorrer diretamente via epiderme, pela cutícula intacta, bem como por ferimentos ou aberturas naturais na superfície dos frutos, como as lenticelas. As infecções latentes têm início em qualquer estágio do fruto na planta. A inibição do desenvolvimento do patógeno através de condições fisiológicas impostas pelo hospedeiro se dá até que o estágio de maturação do fruto tenha sido alcançado e/ou iniciada a respiração climatérica (Dantas et al, 2003).

As perdas são, geralmente, conseqüências de danos ocorridos durante a colheita, o transporte para o “packing house” ou durante o processamento dos frutos para o mercado ou para o armazenamento. Tais danos, muitas vezes, funcionam como porta de entrada para patógenos que, conseqüentemente, causarão doenças ou levarão ao aparecimento de desordens fisiológicas que tornam os frutos impróprios para o consumo (Paull et al., 1997).

Em países em desenvolvimento, onde saneamento e refrigeração não são satisfatórios, perdas na pós-colheita são comuns, muitas vezes superiores a 50% da produção (El-Ghaouth et al, 1994).

1.3 – A doença

De acordo com Dantas et al (2003), a antracnose é uma das doenças fúngicas de maior incidência em *Carica papaya*, no Brasil, assim como a podridão peduncular e a mancha de chocolate.

A antracnose, doença causada pelo fungo *Colletotrichum gloesporioides*, é caracterizada por sintomas evidenciados por lesões iniciadas por pontos negros que aumentam de tamanho até transformarem-se em lesões deprimidas, com até cinco centímetros de diâmetro. Em geral, forma-se um colo aquoso em torno das lesões que se unem e aprofundam na polpa. Lesões velhas produzem esporulação intensa, geralmente de coloração rósea. Uma lesão mais rara, causada por outros isolados do patógeno, é a mancha marrom, que se apresenta menor e mais deprimida no início. Ambas as lesões manifestam-se nos frutos durante a maturação (Farias et al, 1998).

1.4 – O patógeno

Colletotrichum gloesporioides (Penz.) Sacc, agente causal da antracnose do mamão, é um fungo cujo ciclo de vida pode apresentar os dois estágios reprodutivos, o sexual e o assexual, embora este último seja predominante (Snowdon, 1990). Durante o ciclo assexual, o fungo desenvolve conídios em acérvulos produzidos sobre os pecíolos das folhas inferiores que estão em processo de senescência. Esses conídios são dispersos na atmosfera devido ao impacto de gotas de chuva sobre o acérvulo, atingindo outras partes da planta e plantas próximas. Se as condições ambientes continuarem favoráveis por algumas horas após a chegada do conídio a um fruto em desenvolvimento, o esporo germinará e produzirá um apressório pelo qual um peg irá penetrar a cutícula e a epiderme. O fungo permanecerá quiescente até que o fruto amadureça e seus tecidos se tornem mais tenros e suculentos, quando, então, ocorre uma colonização extensa dos tecidos (Snowdon, 1990).

1.5 – Controle de doenças de pós-colheita do mamão

O controle de doenças de pós-colheita do mamão tem sido feito quase que exclusivamente por meio do uso de fungicidas protetores, entretanto, tais produtos estão se tornando menos efetivos, já que os patógenos estão desenvolvendo resistência. Também, a recente preocupação com a contaminação de alimentos por resíduos de pesticidas tem

precipitado a completa retirada de um número expressivo de fungicidas-chave do mercado. Esses procedimentos têm diminuído a efetividade do controle de doenças de pós-colheita e estimulado a busca por novas tecnologias alternativas de controle (El-Ghaouth *et al*, 1994).

Em suma, as restrições quanto ao uso de fungicidas estão relacionadas ao custo, à possibilidade de aquisição de resistência pelo patógeno e às possíveis conseqüências negativas para o ambiente. Assim sendo, o controle biológico de doenças no sistema de manejo tem se mostrado como um novo padrão tecnológico na agricultura, aliando a busca por qualidade à redução de custos, ao aumento da produção e à segurança ambiental. (Linhares *et al*, 1995)

Tratamentos com calor, irradiação (gama e UV) e compostos naturais são algumas das estratégias que vêm sendo testadas como alternativas ao uso de fungicidas para o controle de doenças em pós-colheita. Dentre os modos de ação destes agentes de controle pode-se citar a ação direta do agente sobre o patógeno e a indução de resistência nas plantas pela ativação de enzimas e barreiras ultraestruturais nas células do hospedeiro (Castoria *et al*, 2001).

A combinação de agentes de controle para a obtenção de efeitos sinérgicos ou aditivos, como os procedimentos que combinam irradiação UV com métodos de controle biológico, é uma alternativa promissora, assim como a combinação destes com compostos naturais como o quitosân e a proteína harpin. (Capdeville *et al*, 2002; El-Ghaouth *et al*, 1994).

Diferentes agentes de controle possuem diferentes modos de ação, como pode ser exemplificado pelo quitosân que mostrou ser efetivo por criar uma película em torno do fruto e regular a troca de umidade e gases, além de induzir respostas de resistência em tecidos de frutos e hortaliças (Capdeville *et al*, 2002; El-Ghaouth *et al*, 1994). Outro exemplo é a proteína Harpin, um composto químico natural, isolado da bactéria *Erwinia amylovora*, importante patógeno da macieira. Tal proteína mostrou ser capaz de induzir resistência em frutos de maçã contra *Penicillium expansum*, outro patógeno de pós-colheita desta cultura (Capdeville *et al*, 2003).

A resistência em frutos colhidos está fortemente ligada ao seu estágio de maturidade e seu grau de senescência (El-Ghaouth *et al*, 1994). Entretanto, frutos colhidos estão senescendo antes que se desenvolvendo e o processo de senescência, em geral, reduz as respostas de resistência pelo hospedeiro (El-Ghaouth *et al*, 1994).

Plantas resistentes respondem ao ataque de patógenos com a produção de compostos que reduzem ou inibem futuros ataques. As respostas podem ocorrer tanto no sítio de infecção, pela produção de espécies de oxigênio reativo ou pela reação de hipersensibilidade. Em partes mais distantes, ainda não infectadas, pode ocorrer o desencadeamento de respostas sistêmicas induzidas como é o caso da resistência sistêmica induzida (ISR) ou da resistência sistêmica adquirida (SAR) (Heil & Bostock, 2002).

1.6 – Resistência adquirida e resistência induzida

A resistência sistêmica adquirida (SAR) está ligada ao aumento do ácido salicílico e à expressão de proteínas relacionadas à patogenicidade (proteínas PR), enquanto a resistência sistêmica induzida (ISR) é desencadeada pela ação do gás etileno e do ácido jasmônico (Walling, 2001).

Tanto ISR quanto SAR podem ser induzidas simultaneamente e seus efeitos são aditivos. Os genes que regulam o ácido jasmônico e o ácido salicílico são expressos conjuntamente em respostas a muitos patógenos (Walling, 2001).

Zhu *et al* (2003) foram capazes de introduzir SAR em *Carica papaya* usando o benzothiadiazole (BTH). Neste trabalho a resposta foi manifestada pelo aumento de tolerância contra infecção por *Phytophthora palmivora* devido ao aumento da atividade de β - 1,3 glucanase e quitinase, mas em baixos níveis.

O mamão tem uma resposta de SAR que é similar à que acontece em *Arabidopsis*. É sabido que o BTH (benzothiadiazole) induz SAR e pode ser usado como uma conveniente ferramenta de pesquisa, além de fornecer uma opção viável de proteção da colheita. O

tratamento com BTH induz o aumento da atividade da quitinase e da β -1,3-glucanase, além de aumentar o acúmulo de mRNA de dois genes de PR-1 (Zhu *et al*, 2003).

1.7 – As proteínas PR

Proteínas PR começaram a ser investigadas na década de 70, por Van Loon e Van Kammen. Foram primeiro identificadas em folhas de tabaco pela reação de hipersensibilidade à infecção pelo vírus do mosaico do tabaco (TMV, de *tobacco mosaic virus*). Tais proteínas foram depois descritas em plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas e descobriu-se que podiam ser induzidas por vários microorganismos (Pinheiro *et al*, 1999).

Ainda em tabaco e em *A. thaliana* foi demonstrado que o surgimento da resistência está ligado à expressão coordenada de uma classe de genes que codificam proteínas de defesa. Muitas dessas proteínas foram, de início, identificadas durante a resposta a apenas um agente patogênico, mas, posteriormente, foi constatada sua presença em plantas submetidas a outros tipos de estresse podendo inibir diretamente o patógeno ou levar a alterações estruturais como o espessamento da parede celular, que além de dificultar a entrada do agressor também limita o reconhecimento entre este e a planta (Pinheiro *et al*, 1999).

Das alterações decorrentes da interação planta-patógeno, a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PR) talvez seja a mais evidente. (Pinheiro *et al*, 1999).

As proteínas PR são classificadas em cinco grupos, mas todas são solúveis em meio ácido, têm baixo peso molecular e resistem a proteases, enzimas que decompõem proteínas (Pinheiro *et al*, 1999).

O primeiro grupo (PR-1), sem atividade biológica conhecida, não induz resistência a vírus, mas sim ao fungo *Peronospora tabacina*, quando superexpressas em plantas transgênicas de tabaco. Já as proteínas PR-2 e PR-3 têm ação enzimática: as PR-2 como glucanases (decompõem glucanas) e as PR-3 como quitinases (decompõem a quitina).

Como glucanas e quitina são os principais componentes da parede celular de fungos e do esqueleto externo de insetos, acredita-se que as PR-2 e PR-3 protegem as plantas contra a infecção por fungos. Supõe-se ainda que as quitinases liberem indutores a partir da parede celular do patógeno, permitindo à planta detectá-lo e acionar as defesas (Pinheiro *et al*, 1999).

Ainda não é conhecida a atividade biológica das proteínas do quarto grupo (PR-4), mas as PR-5 têm grande semelhança com outra proteína que inibe a ação de enzimas, como alfa-amilase e tripsina. Isso sugere que as PR-5 podem inibir enzimas digestivas que decompõem proteínas (caso da tripsina) portanto, elas protegeriam as plantas contra insetos, fungos e bactérias que usam essas enzimas para atacar os tecidos vegetais (Pinheiro *et al*, 1999).

As proteínas PR foram muito estudadas em tabaco, mas seu papel na resistência às agressões ainda não está totalmente claro. Em alguns casos, é difícil interpretar a falta de harmonia entre o surgimento de SAR ou reação de hipersensibilidade e a síntese dessas proteínas. O tratamento de tabaco com glucanas da parede do fungo *Phytophthora megasperma*, por exemplo, pode induzir resistência adquirida ao TMV sem estimular a produção de PRs. Ao contrário, resultados de pesquisas revelam acúmulo de tais proteínas tanto no local da infecção quanto em tecidos distantes, não-infectados, sugerindo a transmissão de um sinal a outras partes do vegetal e a existência de uma relação entre as proteínas PR e o estabelecimento da SAR (Pinheiro *et al*, 1999).

As proteínas PR podem ser induzidas não só em invasões bióticas, mas também em estresses abióticos. Por causa desse padrão pouco específico, tem sido sugerido que a indução de tais proteínas faz parte de alguma etapa comum a todas as respostas de defesa (Pinheiro *et al*, 1999).

O ataque de patógenos, os ferimentos, assim como o desenvolvimento e o amadurecimento da fruta podem estar envolvidos na produção dessas proteínas (Pocock *et al*,

2000). Estudos com feijoeiro permitiram detectar a expressão de duas quitinases (PvChi-3 e PvChi-4) em resposta à infecção viral, à ação de um metal pesado (HgCl_2) e à radiação ultravioleta (Pinheiro *et al*, 1999)

Estas proteínas também têm sido apontadas como a causa de respostas alérgicas em humanos, no abacate e na cereja (Pocock *et al*, 2000).

Seca e estresses salinos também têm sido implicadas na indução de PR proteínas em outras plantas, e este potencial indutor de genes PR são de relevância para as condições comerciais da uva de vinho (Pocock *et al*, 2000).

Como já sabido, na interação entre planta e patógeno pode haver o sucesso da infecção (resposta compatível) ou a resistência (resposta incompatível). Nas interações incompatíveis, ou seja, naquelas em que a doença não ocorre, infecções por vírus, bactérias ou fungos irão elicitar respostas localizadas em torno das células infectadas do hospedeiro. Estas respostas incluem a produção de espécies reativas de oxigênio, que podem levar à morte da célula. Futuras respostas nas células ao redor incluem alterações na parede celular que podem inibir a penetração do patógeno e a síntese de compostos antimicrobianos, tais como fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogenicidade (PR-pathogenesis-related) (Heil *et al.*, 2002).

Em geral, as plantas respondem ao ataque de microorganismos patogênicos com a indução de expressão de um grande número de genes que codificam diversas proteínas, entre as quais estão as quitinases e β -glucanases (Azarkan *et al*, 1997).

Muitas publicações têm focado a produção de glucanases e quitinases pelos agentes de biocontrole, os quais, supostamente, agem como depolimerases na parede celular de fungos fitopatogênicos (Castoria *et al*, 2001).

1.8 – Quitinases e β -1,3-Glucanases

Recentemente, a ação de enzimas secretadas por leveduras e que agem como depolimerases na parede celular de fungos, como as quitinases e glucanases, tem sido alvo de

grande interesse. Estas enzimas parecem ter atividade antifúngica e estar ativamente envolvidas no fenômeno de micoparasitismo. O nível de atividade de β -1,3 glucanases, em particular, tem sido correlacionado com a atividade antagonística de um isolado de *Pichia guillermondii* Wicker. contra *Botrytis cinerea* Pers. Fr. (Castoria *et al.* 1997).

As β -glucanases e as quitinases são enzimas hidrolíticas produzidas pelos microorganismos ou pelos hospedeiros e atuam sobre a parede celular do patógeno, promovendo sua degradação e lise. Como consequência de sua ação, uma série de eventos degenerativos ocorre na célula hospedeira, incluindo desorganização da parede celular (pela ação das enzimas), desequilíbrio osmótico, agregação e retração do citoplasma e, conseqüentemente, da membrana plasmática (Castoria *et al.*, 2001).

Quitinases e β -1,3-glucanases produzidas por algumas espécies de *Trichoderma* são as enzimas-chave na quebra da parede celular durante sua ação micoparasita contra fungos fitopatogênicos (El-Katany *et al.*, 2001).

A co-transferência de genes de glucanases e quitinases é realizada com sucesso em muitas espécies. Plantas transgênicas de fumo, expressando tanto a quitinase quanto a β -1,3-glucanase, têm significativo aumento de resistência em relação àquelas plantas que expressam somente quitinase ou glucanase. Este resultado sugere que a expressão combinada destas enzimas poderia dar uma proteção mais efetiva contra infecção de fungos (Wang *et al.*, 2003).

A eficiência da quitinase e da glucanase em defender plantas da infecção por fungos depende da espécie da planta, do tipo de proteína PR expressa, sua localização nas células e as características do fungo testado (Wang *et al.*, 2003).

Alguns pesquisadores têm desenvolvido plantas transgênicas com elevados níveis de expressão de genes de quitinase e/ou glucanase, produzindo variedades resistentes a doenças causadas por fungos. Plantas transgênicas de fumo (*Nicotina tabacum* L.) com aumentada resistência para o fungo *Rhizoctonia solani* foram produzidas com o uso de um gene de

quitinase 35S-CH5B. Plantas de cenoura (*Daucus carota L.*) expressando tanto a quitinase quanto a glucanase mostraram resistência a *Alternaria rasicina* e *Cercospora carotae* (Wang *et al.*, 2003).

1.8.1 – As quitinases

As quitinases são enzimas que catalisam a hidrólise de quitina, um resíduo linear insolúvel de N-acetil-glucosaminas unidas através de ligações β -1,4 (GlcNAc) e possuem vários papéis biológicos. Em microorganismos, as quitinases estão envolvidas na morfogênese da parede celular e nos processos nutritivos. Em plantas, elas parecem estar envolvidas na defesa contra patógenos e a estresses abióticos. Evidências que suportam o papel das quitinases em plantas se confirmam pelo fato de que durante a infecção por patógenos e sob o efeito de várias formas de estresses do meio ambiente elas são induzidas. As quitinases têm sido usadas na agricultura como agente de controle efetivo contra fungos fitopatogênicos e insetos (El-Katany *et al.*, 2001).

Cinco classes de quitinases de plantas têm sido propostas com base na similaridade das suas seqüências de aminoácidos. A classe I de quitinases contém um domínio rico de cisteína na região do N-terminal envolvido na ligação da quitina e um peptídeo no C-terminal altamente conservado. Este tipo de quitinase é conhecido por existir em grande quantidade nas monocotiledôneas e dicotiledôneas. As quitinases da classe II têm alta similaridade de seqüência com as da classe I e são secretadas no apoplasto. A classe III não mostra identidade de seqüência com outras classes, mas parece estar mais próxima de enzimas de fungo envolvidas na morfogênese. Tipicamente, elas são proteínas extracelulares e têm atividade de lisoenzima. As da classe IV têm significativa similaridade com as da classe I, pois contêm um domínio rico em cisteína e mostram o principal domínio catalítico da classe I, embora com duas deleções características. Quitinases desta classe são extracelulares e têm sido identificadas principalmente em dicotiledôneas. A classe V compreende um grupo de

endoquitinases não relacionadas às outras quitinases de plantas. Estas possuem uma estrutura de seqüência primária que parece ter sido derivada durante a evolução de bactérias (El-Katany *et al*, 2001).

Muitas glycosyl hydrolases ocorrem na natureza. Com base nas similaridades de seqüências, elas têm sido classificadas em número de famílias com propriedades enzimáticas bem definidas. As quitinases pertencem às famílias 18 e 19, nas quais se incluem predominantemente as enzimas identificadas em plantas. Outra classificação discerne cinco classes de quitinases de plantas. Destas, as classes I, II e IV têm seqüências homólogas e constituem a família 19 de glycosyl hydrolases, enquanto as representantes das classes III e V não são homólogas com enzimas das outras três classes e pertencem à família 18 (Subroto *et al*, 1999).

Quitinases estão altamente ligadas com o sistema de defesa das plantas contra fitopatógenos, por isso tem sido demonstrado que quitinases de plantas são induzidas pelo ataque de fungos ou pelo contato com algum elicitor, inibindo diretamente o crescimento do fungo *in vitro*. Ano *et al* (2003) investigaram a atividade de uma quitinase ácida (atividade máxima em pH 4.0) em *Vitis vinifera* e observaram que esta espécie teve sua concentração aumentada após o início do amadurecimento da uva. Assim também, a indução pelo tratamento com um elicitor (glycol chitin) foi observada após o início do amadurecimento.

1.8.2 – As β - 1,3 glucanases

As β -1,3-glucanases são proteínas abundantes distribuídas amplamente nas espécies vegetais e possuem, dentre outras, a função de defesa contra patógenos invasores, particularmente em sinergismo com quitinases, que degradam o homopolímero linear β -1,4-N-acetilglucosamina, componente abundante da parede celular de muitos patógenos (El-Katany *et al*, 2001).

Como com quitinases, algumas plantas têm desenvolvido um sistema de defesa com β -1,3-glucanase contra fungos, apesar de que o envolvimento destas enzimas na diferenciação tenha sido sugerido. Em bactérias, que geralmente não possuem β -1,3-glucana, observa-se um papel nutricional (El-Katany *et al*, 2001).

Endo β -1,3 glucanases catalisam a hidrólise da união de β -1,3-D-glucosil em calose, laminarina e em vários outros carboidratos encontrados em parede celular de fungos e plantas. As diversas funções biológicas de glucanases têm sido relatadas por Simmons (1994). As β -1,3 glucanases estão incluídas na família de proteínas PR porque muitas formas são rapidamente induzidas durante a invasão de fungos. Geralmente, as glucanases desempenham um papel importante na defesa da planta, pois digerem componentes da parede do fungo patogênico. Estas enzimas são também induzidas por uma variedade de fatores abióticos, mais notavelmente o gás etileno e ácido salicílico.

Em fungos, β -1,3-glucanases parecem ter diferentes funções. Primeiro, um papel fisiológico no processo morfogênético/morfolítico durante o desenvolvimento e diferenciação do fungo. Segundo, relata-se que β -1,3-glucanases têm sido utilizadas para a mobilização de β -1,3-glucanas sob condições de exaustão de fonte de carbono e energia, funcionando como enzimas autolíticas. Finalmente, um papel nutricional em saprófitos e em micoparasitas tem sido sugerido (El-Katany *et al*, 2001).

De acordo com Wang *et al* (2003), as enzimas β -1,3-glucanases são abundantes, altamente reguladas e com um possível papel na resposta de plantas aos patógenos microbianos, exceto àqueles que também estão envolvidos em processos fisiológicos de plantas não infectadas.

Rivera *et al* (2002) descreveram os padrões de expressão de β -1,3-glucanases em folhas de cultivares de melão suscetíveis e resistentes ao fungo *Sphaerotheca fusca*, agente

causal do oídio da abóbora. Após a inoculação, a atividade de β -1,3 glucanase aumentou mais rapidamente no cultivar resistente “PMR-6” do que no cultivar suscetível “Rochet”.

A enzima β -1,3-glucanase produzida por alguns antagonistas tem sido identificada como uma das responsáveis pelo controle de patógenos, como é o caso, por exemplo, da levedura *Pichia guillermondii* contra *Botrytis cinerea* (Castoria *et al.*, 2001).

O estudo proposto neste trabalho de dissertação é parte integrante de um estudo amplo de controle biológico onde foram isolados, relacionados e testados microorganismos epifíticos de frutos de *Carica papaya* para controle da antracnose no mamão em pós-colheita. Estudos de microscopia eletrônica, bioquímica e biologia molecular foram conduzidos para tentar identificar possíveis modos de ação de leveduras que possam levar ao controle da doença em pós-colheita. Resultados preliminares indicaram que a indução de resistência poderia ser um dos modos de ação envolvido na efetividade do agente de controle. Assim, surgiu o interesse na descoberta de algum gene PR em plantas de *Carica papaya*, que possa estar envolvido em uma resistência induzida.

1.9 – Objetivos

1.9.1 – Geral

O objetivo do presente estudo foi, portanto, identificar e caracterizar em *Carica papaya* genes de β - 1,3 glucanase de forma a se poder subsidiar futuros estudos de transformação em mamão, visando à produção de plantas transgênicas superexpressando essa enzima com o objetivo de controlar doenças de pré e pós-colheita.

1.9.2 – Específicos

- Identificar e caracterizar gene(s) de β - 1,3 glucanase em *Carica papaya*.
- Sequenciar possíveis genes candidatos.

- Confrontar os dados do sequenciamento com os dados existentes nos bancos de dados disponíveis.
- Realizar a predição das estruturas secundária e terciária da(s) proteína(s) expressa(s) pelo(s) gene(s).
- Realizar análise filogenética dos resultados obtidos.

2 – MATERIAS E MÉTODOS

2.1 – Amplificação e Clonagem

Para a PCR foi utilizado o DNA genômico extraído pelo método descrito por Brasileiro e Carneiro (1998). Os primers degenerados utilizados foram o PR2-S, (senso primer 5'-RYIGGWGTWTGYTAYGG-3') e PR2-AS (anti-senso primer 5'-CADCCRCTYTCIGAYAC-3') como descrito por Pflieger *et al* (2001). As reações foram conduzidas para um volume total de 50µL: 2µL de DNA (15ng/µL), 0,40µL dNTPs (25mM), 5,0 µL de tampão 10x *Taq* DNA polimerase, 1,5 µL MgCl₂ (50mM), 1 µL de cada primer (10µM), 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase recombinante (5u/µL) (Invitrogen Life Technologies) e 38,6 µL de água destilada autoclavada. O ciclo de reações foi iniciado com a desnaturação do DNA a 94°C por 5 minutos e meio, seguindo o anelamento dos primers a 45°C por 1 minuto e extensão das cadeias a 72°C durante 2 minutos. Um total de 35 ciclos foram repetidos, sendo que no último ciclo a extensão foi realizada a 72°C por 10 minutos.

2.2 – Eluição da banda obtida da PCR

A eluição da banda obtida na PCR foi feita pelo Kit Gene clean II (bio101, Inc., cat. #1001-400). Cinco microlitros de amostra foram corridos em gel de agarose 1% para se determinar se a eluição da banda foi adequada.

2.3 – Clonagem do produto da PCR e transformação

As seqüências amplificadas foram inseridas no plasmídeo pCR[®] 2.1-TOPO[®] seguindo a metodologia do Kit TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) (http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2_1topo_map.pdf). A transformação das células competentes foi feita por eletroporação segundo a metodologia de Brasileiro e Carneiro (1998). Cinquenta microlitros da suspensão de células transformadas com as

seqüências foram plaqueados em meio LB sólido contendo ampicilina com concentração final de 100 µg/mL, kanamicina com concentração final de µg/mL, X-Gal e IPTG (Brasileiro e Carneiro, 1998). De muitas colônias que se desenvolveram na placa, foram colocadas quinze para crescer em meio LB líquido a uma temperatura de 37°C sob agitação “overnight”. A célula competente utilizada foi a *Escherichia coli Top10* (Top10 Electrocomp™Cells , 44-0035).

2.4 – Miniprep e Seqüenciamento

A extração do DNA das bactérias transformadas foi feita utilizando o kit Wizard®Plus SV minipreps DNA purification System (Promega, Cat.# A1460). O DNA obtido foi enviado para seqüenciamento.

Os clones foram seqüenciados na plataforma de seqüenciamento de DNA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia usando o primer forward M13 (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3') em um seqüenciador automático.

As seqüências que correspondiam ao gene (seqüências “core”) foram obtidas através do “software” DNAMAN descartando tanto a parte correspondente ao vetor quanto a parte do primer. Em algumas seqüências, devido à sua má qualidade, não foi possível a identificação de seqüência do vetor e dos primers. Assim, foi descartada toda parte que continha muitos “Ns”. Com a obtenção das seqüências core foi possível obter os dois grupos diferentes de seqüências consensos de nucleotídeos. Ainda no “software” DNAMAN foi feita a transcrição e, em seguida, foi realizada uma busca no Blast X (Altschul *et al*, 1997), permitindo a comparação destas seqüências com todas as seqüências depositadas no “gene bank” do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Após a análise pelo Blast X, o programa Clustal W (Higgins *et al*, 1994) (EBI) foi utilizado para fazer o alinhamento das seqüências obtidas com algumas outras seqüências

selecionadas de espécies distintas. Foram escolhidas 21 seqüências sendo cada uma de uma espécie conforme o resultado do Blast X.

2.5 - Análise filogenética

Com o auxílio da bioinformática, foi construída uma árvore filogenética com as 23 seqüências em estudo e, para isto, utilizou-se o MEGA software pelo método “maximum parsimony” com “bootstrap” de 1000 repetições. Este número indica a freqüência relativa das seqüências observadas (Sudhir *et. al.*, 2001).

2.6. Predição da estrutura secundária e terciária da proteína

A predição da estrutura secundária e terciária de proteínas é uma abordagem que se baseia no conhecimento extraído do banco de dados de estruturas existentes para avaliar e otimizar estruturas e prever a estrutura com base na seqüência primária de aminoácidos. De posse de uma seqüência protéica e do desejo de conhecer sua estrutura, é necessário identificar uma estrutura homóloga para usar como referência para a construção do modelo como o esquema da figura 1.

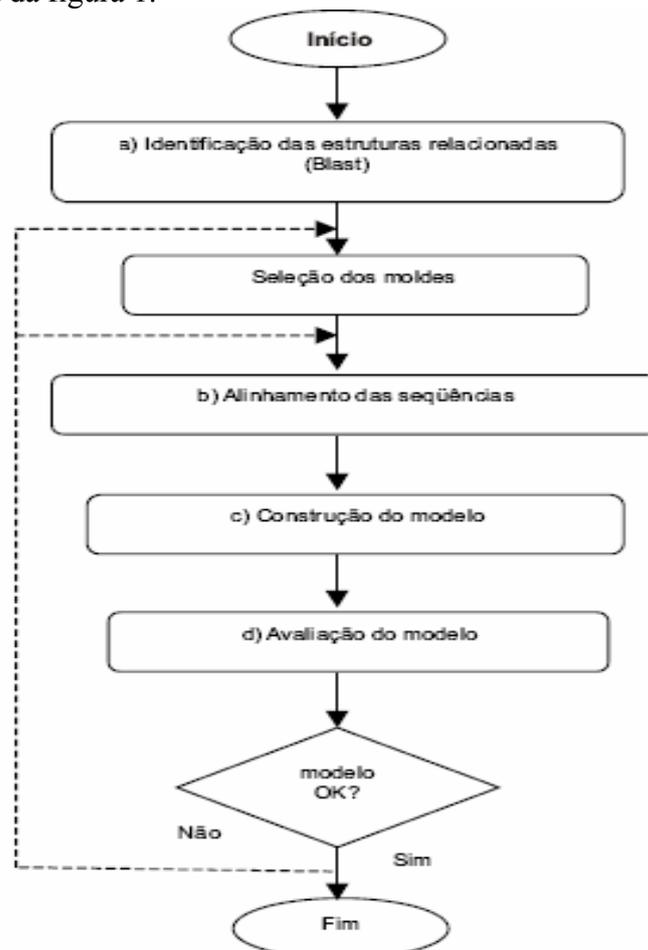


Figura1: Esquema geral de modelagem de proteínas por homologia

Para a determinação da estrutura foi necessário realizar a predição da estrutura secundária. Para a predição da estrutura secundária foi utilizado o método “PSIPRED”, que é o conjunto de predições com acurácia superior a 80% em média. A predição indica H para hélices, E para segmentos estendidos e C para voltas (random coil). A confiança foi calculada de 0 a 9 sendo 9 superior. O servidor “PSIPRED” está disponível no site: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html> (McGuffin *et al.*, 2000). Para a predição da estrutura terciária da proteína, foi utilizado o programa 3D-PSSM (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/servers/3dpssm/>) que realiza o “fold recognition” – uma predição de estruturas secundárias baseado na seqüência de aminoácidos e que reconhece similaridades estruturais importantes para a modelagem de proteínas parálogas. Com o resultado dessa análise o molde escolhido foi o 1AQO (Glucan 1,3-beta-glucosidase.), que possui uma

similaridade de 42% e uma identidade de 37%, a partir do qual foi construído o modelo hipotético de estrutura tridimensional.

Em seguida, foram identificadas as similaridades por alinhamento entre as regiões conservadas na seqüência primária da proteína e foi realizado o posicionamento dos grupos em alças e hélices. Uma vez determinado este posicionamento, as coordenadas tridimensionais do molde foram transferidas para a proteína alvo. Em seguida, foram realizadas as análises de contatos estéricos e a minimização da estrutura para corrigir as posições das cadeias laterais. O protocolo utilizado foi 1000 interações pelo procedimento “steep descent” e 10000 interações pelo método “conjugate gradient” até um mínimo de energia potencial ser atingido. A minimização foi realizada pelo módulo “Discover” do programa “Insight II”. Nesta etapa foi corrigida a geometria espacial do modelo e eliminados os eventuais contatos estéricos, além de corrigir a distância entre as ligações e os ângulos de torção.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Produto da PCR

O resultado da reação de PCR permitiu a identificação de duas bandas, uma de aproximadamente 1100 pb e outra de aproximadamente 650 pb (Figura 2). Esta última banda apresentou o tamanho esperado que era de aproximadamente 650 pares de base como descrito por Pflieger *et al* (2001) e, por isso, foi utilizada como banda alvo para eluição e uso na clonagem.

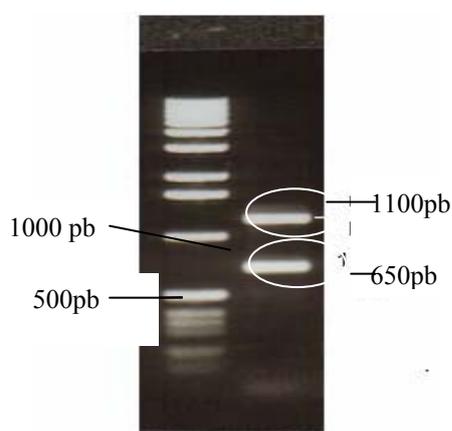


Figura 2. Gel de eletroforese mostrando duas bandas (círculos brancos) de DNA de aproximadamente 1100 e 650 pb. A menor destas bandas foi eluída para obter o DNA a ser inserido no plasmídeo a ser utilizado na transformação de células de *E. coli*.

3.2 – Análise do seqüenciamento

Com a limpeza das seqüências (retirada das seqüências dos vetores e dos primers) e com posterior montagem dos contigs – feitos no software DNAMAN – foi possível obter duas seqüências consenso tanto de nucleotídeo quanto de proteínas (β glupapaya 1 e β glupapaya 2).

As duas seqüências de nucleotídeos foram submetidas ao programa “ORF FINDER” que gerou duas figuras relacionando a seqüência do DNA com a seqüência da proteína (figuras 3 e 4).

```

620 atgatggcgcataacgatccaaatgaagcaacccttcacgcctc
  H H R I Y D P N E A T L H A L
575 atgggaacaaatatacaactcactccttggtgtgccaatgaagac
  H G T N I Q L I L G V P N E D
530 ettgcacccttggtagcccttggctgcaagttggtggataagc
  L A S L V D P L A A S C W I S
485 caaaatgtaatagcttttccaccaggttaagttcaagtacatt
  Q N V I A F S P Q V K F K Y I
440 gctggtgaaaacgaagtgaagcctcttgatgcaaatgccagttt
  A V G N E V K P L D A N A Q F
395 gtcttgccggcaatgcaaaatatacaatgcattagtagtcagct
  V L P A H Q N I Y N A L V S A
350 aatttacaaccagattaaggtctcaacagcagttgatgcaaca
  N L Q T Q I K V S T A V D A T
305 cttttagggtcactctttctccatcaagtggtgcatttagtgaa
  L L G S S F P P S S G A F S E
260 agttctagctcatatataacccaattgtccaattctctagcaaat
  S S S S Y I T P I V Q F L A N
215 gttaaagctccattcttgccaatggtttatccttacttttagttac
  V K A P F L A N V Y P Y F S Y
170 gtgggtgaccagtaaacatcagactcgactacaccttatttact
  V G D P V N I R L D Y T L F T
125 gtaccagatggcgaagtggtgtaaatggttcattatcttat
  V P D G E S V V K D G S L S Y
80 tataacatggttggatgcaatggttagatgcttttactctgctctt
  Y N H F D A H L D A F Y S A L
35 gacaaggttgaggatcttcagtggaattgttgt 1
  D K V G G S S V E I V

```

Figura 3: Alinhamento da primeira seqüência consenso de nucleotídeos com sua respectiva proteína. Observa-se que a seqüência de DNA está invertida.

```

639 atgagaatctatgatcctgaccatggagtccttcaagctctaaga
  M R I Y D P D H G V L Q A L R
594 ggttccaatattgaagtcatgctcggctctcccaatcctgatctt
  G S N I E V M L G L P N P D L
549 caaagaatcgctccagccaagctgctgccgatgctggatccaa
  Q R I A S S Q A A A D A W I Q
504 actaatgtcagaaaatttcccgatgttcggttccgatacatcgct
  T N V R N F P D V R F R Y I A
459 gtccgcaatgaagtcagccttctaatttcttcgcacagttcctt
  V G N E V Q P S N F F A Q F L
414 gtcctgcaatggagaatattcagcgtgcacttacaatgccgggt
  V P A M E N I Q R A L T N A G
369 ctgctaaccaaatcaaagtcctcctccgcccattgacaccggaacg
  L A N Q I K V S S A I D T G T
324 ctgcccactcttccccacttcaaagggttcattcaaggaaaat
  L A T S S P P S K G S F K E N
279 ttcattgccaattcttaacccctcggttcggttttcttgtaacaac
  F M P I L N P L V R F L V N N
234 cgatcaccgttgggttaaatatcttactttagtttcttatt
  R S P L L V N I Y P Y F S F I
189 aacaacatgagagatatccatcttgatttcgcaactcttcacggcc
  N N M R D I H L D F A L F T A
144 ccgaatgtagtctttagcgaccaccggttgaactaccagagtctc
  P N V V F S D P P L N Y Q S L
99 tttgatgcgattcatgactctgtggtggccgcaacttgaaaagatt
  F D A I H D S V V A A L E K I
54 ggtggagggtcactggagatcgtggtgctccgaaagcggatga 13
  G G G S L E I V V S E S G *

```

Figura 4: Alinhamento da segunda seqüência consenso de nucleotídeos com sua respectiva proteína. Observa-se que a seqüência de DNA está invertida.

função, quantas cópias estão presentes e em termos, também, de estrutura podem estar diferenciadas.

3.3 – Análise Filogenética

Para a análise filogenética foram escolhidas β -1,3 glucanases de 21 espécies diferentes, todas sugeridas no resultado do Blast X. Todas estas enzimas apresentavam um “score” superior a 200 bits, “e-value” superior a 50 e alto grau de similaridade e identidade.

Uma árvore filogenética foi construída para auxiliar no entendimento da relação existente entre as enzimas encontradas com a presença destas mesmas enzimas em outras plantas. A árvore filogenética é um diagrama que expressa uma hipótese sobre relações entre grupos. Portanto, mostra as relações de origem e parentesco com as espécies atuais e seus ancestrais. Observa-se na figura 7 que as seqüências foram agrupadas em diferentes famílias. O grupo2 se aproxima mais de *Populus canescens* e *Citrus sinensis*, enquanto o grupo1 está mais relacionado a *Vitis riparia*, *Beta vulgaris* e *Fragaria x ananassa*. Provavelmente são enzimas de função similar, homólogas, mas deverão ter uma expressão diferencial em tecidos da planta.

A tabela 1 mostra as seqüências selecionadas para o alinhamento com β glupapaya 1 e β glupapaya 2 (figura 6), para análise filogenética e suas respectivas referências.

Vitis_riparia -----MALTERKPLAVMLLGFVIMSTLTIG-AQS IGVYGTNGDMLP SAS QGIML 50
 Beta_vulgaris -----MRLI STTSAGSTLLFLVWI LPS I QLT-EAQ IGVYGTNGDMLP SAS QGIML 50
 G_latrobeana -----NGMMLPTKQAVVDL 14
 G_tabacina -----NGMMLPTKQAVVDL 14
 G_max -----MIFSGNTAMSAILLLLGLS STGVETGAS VGVYGGGNGMLPTKQAVVDL 53
 G_ranescens -----NGMMLPTKQAVVDL 14
 Glycine -----GVYGGGNDMLPTKQAVVDL 20
 Cicerarietinum -----MSIILMLVGLLS STAFETGAS VGVYGGGNGMLPTKQAVVDL 45
 Fragaria -----MFTSYTLLMNTFMTPIILLLLVLPALQITGGQS AGVYGGGNGMLP SDTEVIDL 55
 Bglupapayal -----FGANMLP SEEEVQF 15
 Bglupapayal -----FALAGVYGRIGMLPPELEVIDL 24
 Citrus_sinensis -----MAPVULFLGLLMS TLDT---TSAQ IGVYGMMLGMLPSKRDGIAL 43
 Prunus_persica -----MANS NS3-VGRGSPMSI SIVFLLG-LIAMS SPET---TGAQ IGVYGMMLGMLPPEPEVIDL 55
 Prunuspersica -----MTNS NS33VGRLLSLI SIVLLLGQLVVG SLATKQHTGAP IGVYGMMLGMLPPEPEVIDL 60
 MARS NIA--GKSPSMV SIVLLLG-LIAMS SPET---TGAQ IGVYGMMLGMLPPEPEVIDL 53
 Populus -----MSTLHKMTPQAAITLLGLLVA SS IDIA-GAQS IGVYGMMLGMLPPEPEVIDL 55
 Nicotiana -----MSTLHKMTPQAAITLLGLLVA SS IDIA-GAQS IGVYGMMLGMLPPEPEVIDL 55
 N_plumbaginifolia -----MATS QI AIVLLG-LIAMS TLDT---TGAQ IGVYGMMLGMLPPEPEVIDL 47
 tomato -----MHSLYAMTHQFSLA SPFLLLG-LFTI MLI--PTADAQ IGVYGMMLGMLPPEPEVIDL 55
 Cicer_arietinum -----MP SFPAPTRFSLA SPFLLLG-LFTI MLI--PTADAQ IGVYGMMLGMLPPEPEVIDL 55
 Medicago -----MTLFLLLA-LFTITLIL-PTS GES VGVYGMMLGMLP S QSDTIAL 44
 Arabidopsis_thaliana -----MAPVULFLGLLMS TLDT---TSAQ IGVYGMMLGMLPPEPEVIDL 43
 Vitisvinifera -----MAGAEPOFKATMILLGLLVA TLDF---TGAQ IGVYGMMLGMLPPEPEVIDL 50
 Coffea -----

Vitis_riparia YKSNIGSMRIYDPMS DTLQALNGSGI ELILDPMTSLQS LASDASDSTOV QMNVNFA 11.0
 Beta_vulgaris YKSNRIGTIRIYDPNQKTLQAVGSGMI GLIVDPKMDLR SLGSDAGAS360V QMNVNFA 11.0
 G_latrobeana YKSNRIGKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 73
 G_tabacina YKSNRIGKIRLYYYPDE AILQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 73
 G_max YKSNRIGKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 11.2
 G_ranescens YKSNRIDKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 73
 Glycine YKSNRIDKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 79
 Cicerarietinum YKSNRIGKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 10.4
 Fragaria YKSNRIGKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 11.4
 Bglupapayal YKSNRIGKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 74
 Bglupapayal YKSNRIGKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 84
 Citrus_sinensis YKSNRIGKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 10.3
 Prunus_persica YKSNRIGKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 11.5
 Prunuspersica YKSNRIGKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 12.0
 Populus YKSNRIGKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 11.2
 Nicotiana YKSNRIGKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 11.5
 N_plumbaginifolia YKSNRIGKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 11.5
 tomato YKSNRIGKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 10.7
 Cicer_arietinum YKSNRIGKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 11.5
 Medicago YKSNRIGKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 11.5
 Arabidopsis_thaliana YKSNRIGKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 10.3
 Vitisvinifera YKSNRIGKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 10.3
 Coffea YKSNRIGKIRLYYYPDE GVLQALGSGMIEVILGVPMDLQS LT-NAGAAATMVMNMYKAYS 11.0

Vitis_riparia SDVNFYIAAGNEVLPFGS-NAQFAQVLPAMNQQSAI TSAQLQGQINVESTATYS SVLG 16.9
 Beta_vulgaris 3--NIRKIAVGNIEHPDAS-EAG---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 16.4
 G_latrobeana QMVKFKYIAVGNIEHPGDS-LAG---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 12.9
 G_tabacina QMVKFKYIAVGNIEHPGDS-LAG---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 12.9
 G_max QMVKFKYIAVGNIEHPGDS-LAG---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 16.8
 G_ranescens QMVKFKYIAVGNIEHPGDS-LAG---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 12.9
 Glycine QMVKFKYIAVGNIEHPGDS-LAG---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 12.5
 Cicerarietinum PMVKIKYIAVGNIEHPDSP-EAN---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 15.9
 Fragaria ADVKFKYIAVGNIEHPDAS-EAG---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 17.0
 Bglupapayal PQVKFKYIAVGNIEHPDAS-EAG---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 12.0
 Bglupapayal -DVKFKYIAVGNIEHPGDS-LAG---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 12.9
 Citrus_sinensis PMVKIKYIAVGNIEHPDSP-EAN---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 15.9
 Prunus_persica -MVKFKYIAVGNIEHPDSP-EAN---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 16.8
 Prunuspersica -MVKFKYIAVGNIEHPDSP-EAN---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 17.5
 Populus -MVKFKYIAVGNIEHPDSP-EAN---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 16.7
 Nicotiana PMVKIKYIAVGNIEHPDSP-EAN---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 17.4
 N_plumbaginifolia PMVKIKYIAVGNIEHPDSP-EAN---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 17.4
 tomato PMVKIKYIAVGNIEHPDSP-EAN---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 16.6
 Cicer_arietinum PMVKIKYIAVGNIEHPDSP-EAN---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 17.4
 Medicago PMVKIKYIAVGNIEHPDSP-EAN---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 17.4
 Arabidopsis_thaliana PAVKFKYIAVGNIEHPDSP-EAN---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 15.8
 Vitisvinifera PGVSKYIAVGNIEHPDSP-EAN---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 16.3
 Coffea -MVKFKYIAVGNIEHPDSP-EAN---SVLPALQNI QMAI SAANLQGQINVESTATYS SVLG 16.8

Vitis_riparia -TSYPPSAGSFS SDGS SFINPII SFLAENGSPILLANI YPYSSTGTQSI QLDGALFTSP 22.8
 Beta_vulgaris -N-FPPSKGUTFS--S SYMPTIUMFLQNMMS PLLANI YPYSSTGTQSI QLDGALFTSP 21.9
 G_latrobeana -NSYPPNDGUTFSMSAS SYIGPIV SFLAGNGAPLLANYPYFAYVGNQNI QLDGALFTSP 18.8
 G_tabacina -NSYPPNDGUTFSMSAS SYIGPIV SFLAGNGAPLLANYPYFAYVGNQNI QLDGALFTSP 18.8
 G_max -NSYPPNDGUTFSMSAS SYIGPIV SFLAGNGAPLLANYPYFAYVGNQNI QLDGALFTSP 22.7
 G_ranescens -NSYPPNDGUTFSMSAS SYIGPIV SFLAGNGAPLLANYPYFAYVGNQNI QLDGALFTSP 18.8
 Glycine -NSYPPNDGUTFSMSAS SYIGPIV SFLAGNGAPLLANYPYFAYVGNQNI QLDGALFTSP 19.4
 Cicerarietinum -NSYPPNDGUTFSMSAS SYIGPIV SFLAGNGAPLLANYPYFAYVGNQNI QLDGALFTSP 21.8
 Fragaria -PSFPPSDGAFS SAANSPITPIITLGNNGAPLLANYPYFAYVGNQNI QLDGALFTSP 22.9
 Bglupapayal -SFPSPSAGSFS S3AS SYIRPIV SFLAGNGAPLLANYPYFAYVGNQNI QLDGALFTSP 18.9
 Bglupapayal -SFPSPSAGSFS S3AS SYIRPIV SFLAGNGAPLLANYPYFAYVGNQNI QLDGALFTSP 19.8
 Citrus_sinensis -ESFPPSAGSFS S3AS SYIRPIV SFLAGNGAPLLANYPYFAYVGNQNI QLDGALFTSP 21.7
 Prunus_persica -NSFPPSAGSFS S3AS SYIRPIV SFLAGNGAPLLANYPYFAYVGNQNI QLDGALFTSP 22.7
 Prunuspersica -ETFPSPSAGSFS S3AS SYIRPIV SFLAGNGAPLLANYPYFAYVGNQNI QLDGALFTSP 22.4
 Populus DSSS PPSKGSFPGDHPFLDPIIIFLLNMQAPLLANYPYFAYVGNQNI QLDGALFTSP 22.7
 Nicotiana -NSYPPSAGSFS S3AS SYIRPIV SFLAGNGAPLLANYPYFAYVGNQNI QLDGALFTSP 22.3

Tabela 1. Sequências selecionadas para a análise no Clustal W com suas respectivas referências obtidas a partir do Blast X.

ESPÉCIE	NOME DA ENZIMA	REFERÊNCIA
<i>Prunus persica</i>	beta-1,3-glucanase	gi 16903144 gb AAL30426.1 AF435089_1
<i>Citrus sinensis</i>	beta-1,3-glucanase	gi 2274915 ^a CAA03908.1
<i>Fragaria x ananassa</i>	beta-1,3-glucanase	gi 29243202 dbj BAC66186.1
<i>Vitis riparia</i>	beta-1,3-glucanase	gi 37992763 gb AAR06588.1
<i>Prunus persica</i>	beta-1,3-glucanase	gi 1222556 gb AAA92013.1
<i>Vitis vinifera</i>	beta-1,3-glucanase	gi 22550395 gb AAF44667.2 AF239617_1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	beta-1,3-glucanase class I precursor	gi 21592715 gb AAM64664.1
<i>Glycine soja</i>	beta-1,3-endoglucanase	gi 48869555 gb AAT47434.1
<i>Glycine latrobeana</i>	endo-beta-1,3-glucanase	gi 41584404 gb AAS09871.1
<i>Glycine tabacina</i>	endo-beta-1,3-glucanase	gi 41584416 gb AAS09877.1
<i>Coffea arabica Coffea canephora</i>	beta-1,3-glucanase, basic	gi 37223498 gb AAQ90286.1
<i>Cicer arietinum</i>	glucan-endo-1,3-beta-glucosidase	gi 4883425 ^a CAA10287.2
<i>Populus x canescens</i>	beta-1,3 glucanase	gi 6960214 gb AAF33405.1 AF230109_1
<i>Beta vulgaris subsp. Vulgaris</i>	glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	gi 4584556 ^a CAA53545.1
<i>Glycine max</i>	endo-1,3-beta-glucanase	gi 38640795 gb AAR26001.1
<i>Cicer arietinum</i>	glucan endo-1,3-beta-d-glucosidase	gi 3900936 ^a CAA10167.1
<i>tomato</i>	1,3beta-glucanase	gi 282945 pir S26241
<i>Medicago sativa</i>	acid glucanase	gi 55818553 gb AAV66071.1
<i>Glycine canescens</i>	endo-beta-1,3-glucanase	gi 41584418 gb AAS09878.1
<i>Nicotiana tabacum</i>	glucan endo-1,3-beta-glucosidase	gi 19869 ^a CAA37669.1
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	precursor b-1,3-glucanase	gi 19687 ^a CAA38540.1

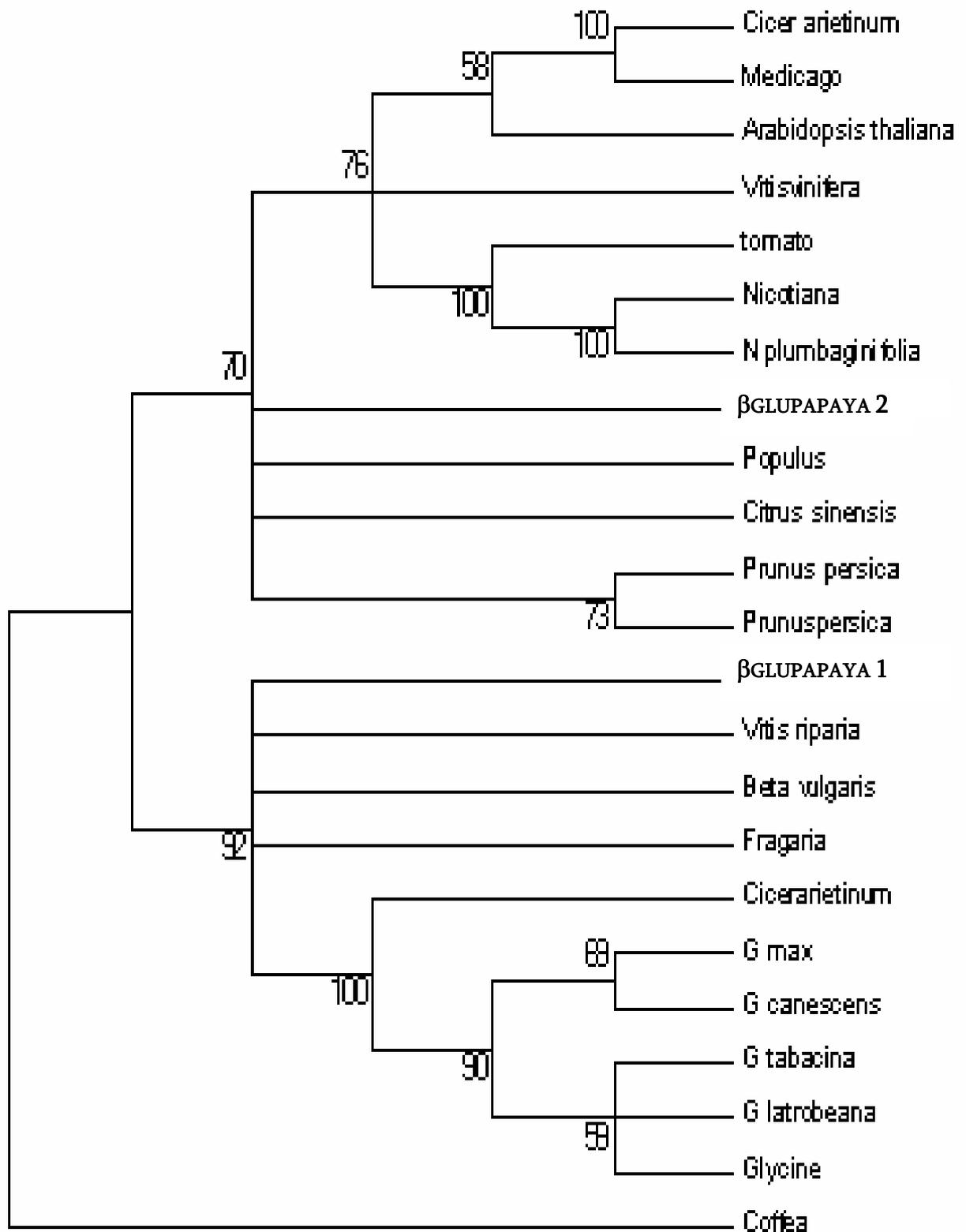


Figura 7: Árvore filogenética da β -1,3-glucanase.. β glupapaya 1 e β glupapaya 2 e são as seqüências de β -1,3-glucanase de *Carica papaya* (Referências conforme tabela 1).

3.4. Predição das estruturas secundária e terciária da proteína

O conhecimento da estrutura terciária de uma proteína constitui uma informação valiosa para determinação de sua função, pois pode permitir a identificação de domínios conhecidos, como sítios catalíticos, sítios de modificação alostérica e outros. A modelagem molecular é um método alternativo, não experimental, que permite, com base nos conhecimentos da estereoquímica dos aminoácidos e nas informações adquiridas das estruturas terciárias já resolvidas, prever a conformação de proteínas a partir da seqüência primária dos aminoácidos. Uma das formas de se realizar a modelagem de proteínas é utilizar como referência uma ou mais proteínas homólogas e de estrutura terciária já conhecida. Este tipo de modelagem é conhecido como modelagem por homologia ou modelagem comparativa, e, por enquanto, é a abordagem que obtém melhores resultados.

O método de modelagem por homologia de seqüências permite o desenho estrutural de proteínas tendo como ponto de partida as estruturas reais determinadas experimentalmente por difração de raios-X ou por Ressonância Nuclear Magnética (RNM). A transferência de coordenadas, entre o molde e a seqüência modelo, fundamenta-se na conservação de aminoácidos na seqüência primária que conservam entre si um enovelamento tridimensional. Faz-se então um alinhamento entre possíveis moldes e a seqüência da proteína de interesse. Quanto maior for o percentual de identidade entre as seqüências, mais fácil e segura é a transferência das coordenadas. O percentual de identidade limite gira em torno de 40%, onde abaixo desse valor a construção do modelo por homologia perde a confiabilidade. Para casos onde a identidade está entre 20% e 40% pode-se aplicar a metodologia de reconhecimento por enovelamento (fold recognition).

consideradas homólogas e, possivelmente, exercem a mesma função, porém provavelmente, com localização funcional distinta (Figura 10). A análise dos dados das estruturas primárias e secundárias das duas glucanases isoladas do mamão foi possível fazer a predição de uma única estrutura terciária. As diferenças existentes se dão em aminoácidos que não se localizam no sítio ativo da enzima. A figura 11 mostra uma estrutura sem as α -hélices para facilitar a visualização do sítio ativo da β -1,3 glucanase.

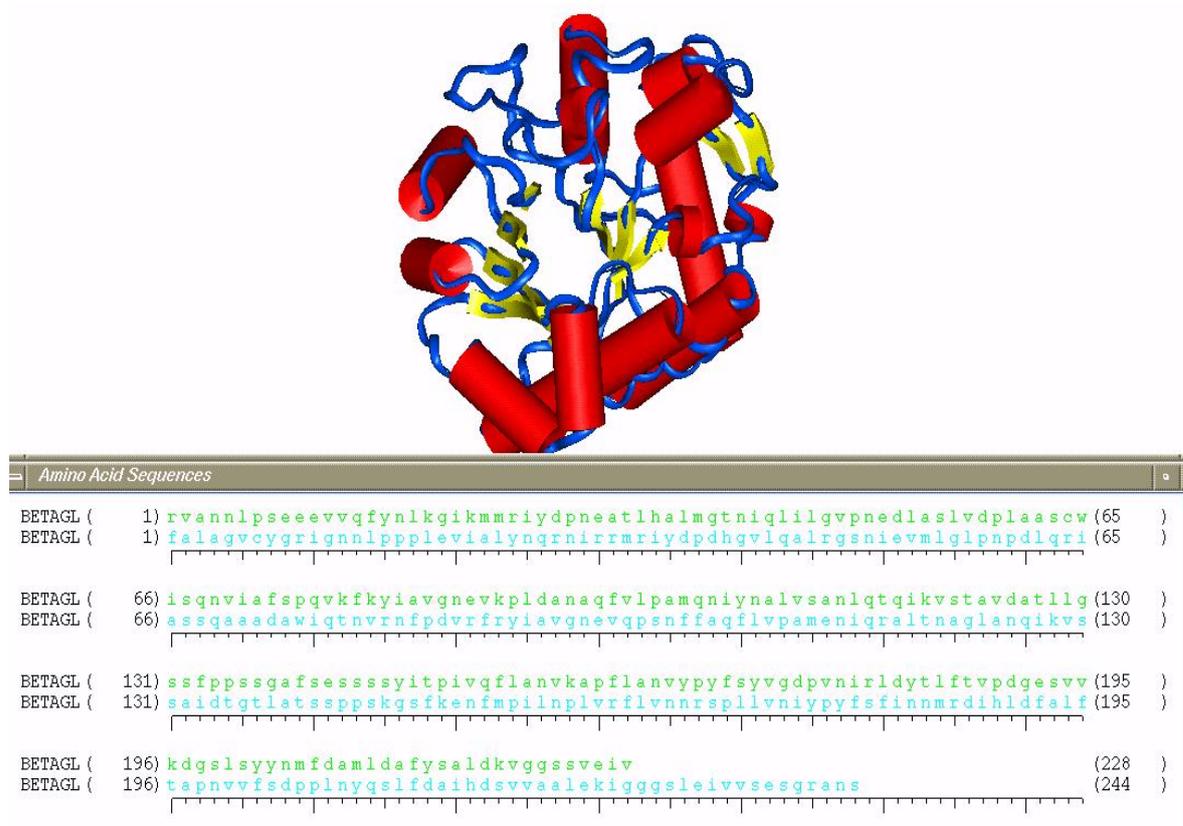


Figura 10: Apresentação da predição da estrutura terciária da β -1,3 glucanase de *Carica papaya*.

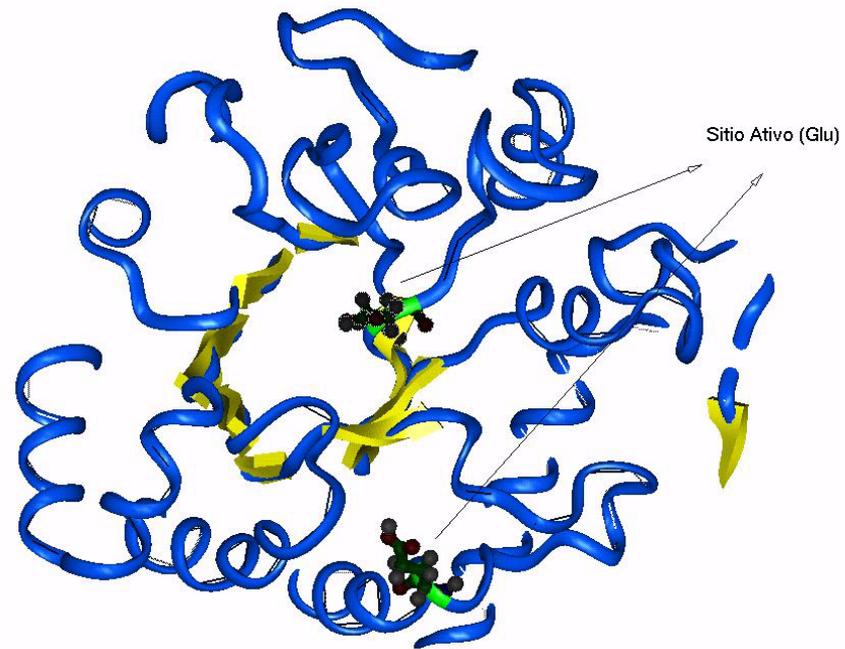


Figura 11: Estrutura terciária da glucanase indicando os sítios ativos onde o ácido glutâmico exerce a função principal.

4 – CONCLUSÃO

Pflieger *et al* (2001), utilizando primers degenerados, identificaram, amplificaram e clonaram β -1,3-glucanase em *Capsicum sp.* por meio de uma reação de PCR.

No presente estudo, o mesmo par de primers degenerados foi utilizado na PCR para a identificação e análise molecular de β -1,3-glucanases em *Carica papaya*, resultando, de forma inédita, na obtenção de dois tipos distintos desta enzima.

O fato de a análise filogenética mostrar que a glucanase do grupo 1 está mais relacionada a *Vitis riparia*, *Beta vulgaris* e *Fragaria x ananassa* e que a do grupo 2 se aproxima mais de *Populus canescens* e *Citrus sinensis* é um importante indicativo de que são β -1,3-glucanases distintas.

Devido ao fato de estas enzimas serem oriundas de uma mesma espécie, portanto pertencentes à mesma família, elas são consideradas homólogas e, possivelmente, exercem a mesma função, talvez com localização funcional distinta. A análise dos dados das estruturas primárias e secundárias das duas glucanases isoladas de mamão permitiu fazer a predição de uma única estrutura terciária, o que é explicado pelo fato de as diferenças existentes se darem em aminoácidos que não se localizam no sítio ativo da enzima.

A identificação de dois tipos de β -1,3 glucanases diferentes pode ser explicada se considerarmos que estas podem ser oriundas de alelos diferentes do mesmo gene, ou por genes diferentes, ou ambas as situações, isto é, sendo tanto genes quanto alelos diferentes. Há vários fatores que podem contribuir para o aparecimento de dois tipos distintos de uma mesma enzima em uma única espécie, como por exemplo, a necessidade de um nível de expressão elevado ou a localização distinta da expressão nos tecidos da planta.

O fato de essas enzimas estarem, provavelmente, envolvidas no processo de defesa de plantas, as torna um alvo para futuros estudos associados à plantas transgênicas. Os resultados desta pesquisa poderão servir de base para a produção de plantas com alta expressão desta

proteína, o que poderia garantir uma maior resistência a patógenos. Desta forma, os produtos teriam a vida de prateleira aumentada, a perda de produtos seria menor, assim como o prejuízo para os agricultores, pois os frutos estariam mais protegidos durante o transporte e o armazenamento.

5 – PERSPECTIVAS FUTURAS

Visto que as β -1,3 glucanases estão envolvidas em diferentes processos, não é possível afirmar neste momento que elas estão relacionadas ao processo de resistência em *Carica papaya*. Para tal comprovação, faz-se necessária uma análise bioquímica experimental, pois este trabalho foi baseado na literatura, ou seja, não experimental no que se refere ao envolvimento destas enzimas no processo de defesa da planta.

No caso de se confirmar que as β - 1,3 glucanases obtidas neste trabalho estão envolvidas no processo de resistência da planta contra patógenos, elas podem ser utilizadas como sonda em “Northern Blot”, o que permitiria revelar se são expressas em frutos sadios, em frutos feridos, em ferimentos tratados com microorganismos antagonistas, entre outras situações.

Devido ao fato de nenhuma β -1,3 glucanase ter sido identificada anteriormente em *Carica papaya*, a obtenção do gene inteiro permitiria uma análise filogenética mais apurada e serviria também para futuros estudos desta mesma proteína em outras espécies. Uma estratégia para tal obtenção seria a utilização do método “5’ forward 3’ reverse”.

Com o mapeamento genético, permitiria a localização do gene no genoma do mamão possibilitando saber se estas duas seqüências distintas da mesma proteína são genes diferentes, são alelos diferentes do mesmo gene ou ambas as situações.

Se estas seqüências corresponderem às proteínas PR, será possível a produção de plantas transgênicas superexpressando o gene. Isto, possivelmente, tornaria a planta mais resistente sem que houvesse a necessidade da aplicação de fungicidas, que prejudicam o meio ambiente e a saúde humana. E ainda seria possível a transferência deste ou destes genes para outras plantas, tornado-as também mais resistentes.

6 – REFERÊNCIAS

ANO A, TAKAYANAGI T, UCHIBORI T, OKUDA T, YOKOTSUKA K.. Characterization of a class III chitinase from *Vitis vinifera* cv. Koshu. **Journal of bioscience and bioengineering**. 95, 6: 645-647. 200.

ALTSCHUL SF, MADDEN L, SCHÄFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W E LIPIPMAN DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res*. 25:3389-3402. 1997.

AZARKAN M, AMRANI A, NUS M, VANDERMEERS A, ZERHOUNI A, SMOLDERS N, LOOZET Y. *Carica papaya* latex is a rich source of class II chitinase. **Phytochemistry** 46, 8: 1319-1325.1997.

BRASILEIRO ACM E CARNEIRO VT DE C. Manual de transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998.

CAPDEVILLE G DE, WILSON CL, BEER SV, AIST JR. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'Red Delicious' apples fruit. **Phytopathology**. 92: 900-908. 2002.

CAPDEVILLE G DE, BEER SV, WATKINS CB, WILSON CL, TEDESCHI LO, AIST JR. Pre- and post-harvest harpin treatments of apples induce resistance to blue mold. **Plant Disease**. 85: 39-44. 2003.

CASTORIA R, DE CURTIS F, LIMA G, DE CICO V. β -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents postharvest disease. **Postharvest biology and technology**. 12: 293-300. 1997.

CASTORIA R, CURTIS F DE, LIMA G, CAPUTO L, PACIFICO S, CICCIO V DE.. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. **Postharvest Biology and Technology**. 22, 7-17. 2001.

DANTAS SAF, OLIVEIRA SMA, MICHEREFF SJ, NASCIMENTO LC, GURGEL LMS E PESSOA WRLS. Doenças fúngicas de pós colheita em mamões e laranjas comercializados na Centra de Abastecimento do Recife. **Fitopatologia Brasileira** 28:528-533. 2003.

ECHEVERRI F, TORRES F, QUIÑONES W, CARDONA G, ARCHBOLD R, ROLDAN J, BRITO I, LUIS JG, LAHLOU E. Danielone, a phytoalexin from papaya fruit. **Phytochemistry** ,44 2: 255-256. 1997.

EL-GHAOUTH A, ARUL J, ASSELIN A, WILSON CL, BENHAMOU N. Ultrastructural and cytochemical aspects of the effect of chitosan on decay of bell pepper fruit. **Physiol Mol. Plant Pathology**. 44: 417 – 432. 1994.

EL-KATANY MH, GUEDEJ M, ROBRA KH, ELNAGHY MA, GÜBITZ GM. Characterization of quitinase and an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. **Applied Microbiological Biotechnology**. 56: 137-143.2001.

FARIAS ARN, OLIVEIRA AMG, FILHO HPS, OLIVEIRA JRP, DANTAS JLL, OLIVEIRA MA, SANCHES NF, MEDINA VM, CORDEIRO ZJM. A cultura do mamão. In: Coleção Plantar, 2ª ed. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 92p. 1998.

GAMAGAE SU, SIVAKUMAR D, WIJERATNAM RSW, WIJESUNDERA RLC. Use of bicarbonate and *Cândida oleophila* to control anthracnose in papaya during storage. **Crop protection** . 46: 1-5. 2003.

HEIL M, BOSTOCK RM. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of Botany**. 89, 503-512. 2002.

HIGGINS D, THOMPSON J, GIBSON T, THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**. 22:4673-4680. 1994.

- KUMAR S, TANURA K, JACKOBSEN IB E NEI M. Mega2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software **Bioinformatics**, 17(12): 1244-5. 2001.
- LINHARES A, MATSUMURA ATS, LUZ VC. Avaliação da amplitude de ação antagonística de microrganismos epífitas do trigo sobre crescimento radial de *Drechslera tritici-repentis*. **Revista Brasileira de Agrociência** .1,º3: 119-126.1995.
- MCGUFFIN LJ, BRYSON K, JONES DT. The PSIPRED protein structure prediction server. **Bioinformatics**. 16, 404-405. 2000.
- MENDES, L.G., DANTAS J. L. L., MORALES C.F.G. MAMÃO NO BRASIL. Cruz das Almas, BA. EUFBA/EMBRAPA-CNPMF. 1996.
- NAWRATH C, METRAUS JP. Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogens inoculation. **Plant Cell**. 11 1393-14004. 1999.
- PAULL RE, NISHIJIMA W, REYES M, CAVALETTO C. Postharvest handling and losses during of papaya (*Carica papaya L.*) .**Postharvest Biology an Technology**. 11, 165-179. 1997.
- PERES AP, MACHADO J DA C, CHITARRA AB E LIMAS LC DE O. Perfil enzimático de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Cienc. Agrotec.**,24, 1, 295-299. 2000.
- PINHEIRO MM, SANDRONI M, LUMMERZHEIM M, OLIVEIRA DE DE. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciências Hoje** 147. 1999.
- PFLIEGER S, PALLOIX A, CARANTA C, BLATTES A, LEFEBVRE V. Defense response genes co-localize with quantitative disease resistance loci in pepper. **Theoretical Applied Genetics**. 103:920-929. 2001.
- POCOCK K F, HAYASAKA Y, MCCARTHY MG, WATERS EJ. Thaumatin-like proteins and quitinases, the haze-forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis*

vinifera) berries and drought stress does not affect the final levels per berry and maturity. *J. Agricultural Food Chemistry*. 48 1637-1643. 2000.

RIVERA ME, CODINA JC, OLEA F, VICENTE A DE, PÉRES-GARCIA A. Differential isolation of β -1,3-glucanase insusceptible and resistant melon cultivars in response to infection by *Sphaerotheca fusca*. **Physiological and molecular plant pathology**. 61, 257-265. 2002.

SIMMONS, CR. The physiology and molecular biology of plant 1,3-beta-D-glucanases and 1,3;1,4-beta-D-glucanases. **Crit Rev Plant Science** 13: 325-387. 1994.

SNOWDON, AL Color atlas of post-harvest diseases and disorders of fruit and vegetables. Vol. 1. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL.1990.

SUBROTO T, SUFIATI S, BEINTEMA JJ. Papaya (*Carica papaya*) lysozyme is a member of family 19 (basic, class II) chitinases. **Journal of molecular evolution**. 49: 819-821. 1999.

HIBAUD M, GINESTE S, NUSSAUME L, ROBAGLIA C. Sucrose increases pathogenesis-related PR-2 gene expression in *Arabidopsis thaliana* through an SA-dependent but NPR1-independent signaling pathway. **Plant physiology and biochemistry**. 42, 81-88. 2004.

WALLING L.L. Induced resistance: from the basic to the applied. **Trends in Plant Science** 6, 10: 445-447. 2000

WANG Y, KAUSCH AP, CHANDLEE JM, LUO H, RUEMMELE BA, BROWNING M, JACKSON N, GOLDSMITH MR. Co-transfer and expression of chitinase, glucanase, and bar genes in creeping bentgrass for conferring fungal disease resistance. **Plant science**. 165: 497- 506. 2003.

ZHU YJ, QIU X, MOORE PH, BORTH W, HU J, FERREIRA S, ALBERT HH. Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya. **Physiological and molecular plant pathology**. 63; 237-248. 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)