

**Identificação de proteases cisteínicas envolvidas em
processos de sinalização e defesa em
Ricinus communis L.**

FÁBIO MENEZES MACIEL

**Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF
Campos dos Goytacazes - RJ
Março – 2007**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**Identificação de proteases cisteínicas envolvidas em
processos de sinalização e defesa em
Ricinus communis L.**

FÁBIO MENEZES MACIEL

Orientadora: Prof^a. Olga Lima Tavares Machado

**Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF
Campos dos Goytacazes - RJ
Março – 2007**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), no Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, sob a orientação da Professora Olga Lima Tavares Machado.

Financiamento: CAPES, CNPq e FAPERJ.

**Identificação de proteases cisteínicas envolvidas em
processos de sinalização e defesa em
Ricinus communis L.**

FÁBIO MENEZES MACIEL

Dissertação apresentada no dia 30 de março de 2007 ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, na área de concentração de Biologia Celular.

Banca examinadora:

**Prof^a. Ângela Pierre Vitória
LCA – CBB – UENF**

**Prof^a. Antônia Elenir Amâncio de Oliveira
LQFPP– CBB - UENF**

**Prof. Rodrigo Volcan Almeida
Departamento de Bioquímica - IQ - UFRJ**

Prof^a. Olga Lima Tavares Machado (Orientadora)

**Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF
Campos dos Goytacazes - RJ
Março – 2007**

Aos meus pais Marilene e Francisco e irmãos
Ana Laura e Anderson, dedico.

AGRADECIMENTOS

À professora Olga Machado pela oportunidade a mim concedida, pela amizade, pelos momentos de grande aprendizado e profissionalismo, por seu incentivo e dedicação à pesquisa que jamais esquecerei.

À professora Cristiane Salles pela co-orientação, pelo apoio, amizade e contribuições constantes sem as quais esse trabalho não seria concluído.

Ao professor Claudio Andrés Retamal pelas análises densitométricas e por suas contribuições neste trabalho.

Aos amigos e companheiros do laboratório: Viviane, Alexandra, Jucélia, Shayany, Natália, Camila, Karolina, Patrícia, Elane, André (Pink), João, Thiago, Hélio, Keysson e Renato pelos momentos engraçados e de trabalho cooperativo que vivenciamos nos dois últimos anos.

Aos funcionários do LQFPP: Isabela, Cristóvão, Rogério, Sheila pela amizade e ajuda na rotina do laboratório.

Às professoras Kátia Valevski Sales Fernandes e Tânia Jacinto pela ajuda, dicas e ensinamentos sempre bem-vindos.

À professora Valdirene Moreira Gomes pela gentileza de revisar esta dissertação e por toda atenção dispensada a este projeto.

Às professores Antônia Elenir Amâncio de Oliveira e Ângela Pierre Vitória, e ao professor Rodrigo Volcan Almeida pela disponibilização em contribuir com a análise deste projeto.

ÍNDICE	
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELA.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
ABSTRACT.....	XIV
RESUMO.....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Mecanismos de defesa das plantas.....	01
1.2. A sistemina e a resposta de defesa contra herbívoros.....	02
1.3. Fito-oxilipinas.....	03
1.3.1. Os jasmonatos e a via octadecanóide.....	04
1.4. Proteases e a resposta de defesa vegetal.....	07
1.5. Proteases cisteínicas e a morte celular programada (PCD) em plantas....	07
1.6. A senescência foliar e o processo proteolítico.....	09
1.7. A mamona (<i>Ricinus communis</i> L.).....	10
2. OBJETIVO.....	13
3. MATERIAIS.....	14
3.1. Sementes de mamona (<i>Ricinus communis</i> L.).....	14
3.2. Anticorpo.....	14
3.3. Material para tratamento das plantas.....	14
3.4. Material para eletroforese e “western blotting”.....	14
3.5. Material para revelação de proteínas.....	14
3.6. Inibidores de proteases e ativadores de proteases cisteínicas.....	14
3.7. Equipamentos.....	15
4. METODOLOGIA.....	16
4.1. Cultivo de <i>Ricinus communis</i> L.....	16
4.2. Tratamentos empregados.....	16
4.2.1. Injúria mecânica.....	16
4.2.2. Tratamento com metil jasmonato.....	17

4.3. Extração de proteínas foliares.....	17
4.4. Dosagem de proteínas.....	17
4.5. Tricina-SDS-PAGE.....	18
4.6. Revelação de proteínas no gel.....	18
4.7. Detecção da cadeia pesada da Rubisco (LSU) por “western blotting”.....	18
4.8. Zimografia em gel contendo gelatina.....	19
4.9. Efeito do pH sobre a atividade proteolítica.....	20
4.10. Efeito de inibidores de proteases.....	20
4.11. Análise densitométrica.....	21
5. RESULTADOS	22
5.1. Mudanças no padrão de proteínas foliares.....	22
5.2. Proteases foliares da mamona.....	25
5.3. Efeito do pH sobre a atividade proteolítica.....	29
5.4. Ensaio de inibição e ativação proteolítica em gel.....	31
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÕES	41
8. REFERÊNCIAS	42

LISTA DE FIGURAS	
Figura 1. Estrutura química do metil jasmonato (MJ) e do ácido jasmônico (JA).....	04
Figura 2. Esquema de ativação de genes de defesa através da via octadecanóide em plantas de tomate. PLA ₂ - fosfolipase A ₂ , 12-OPDA - ácido 12-oxo-fitodienoico (Adaptado de Farmer e Ryan, 1992; Bergey <i>et al.</i> , 1996; Mueller, 1997).....	06
Figura 3. A mamona.....	11
Figura 4. Estágio trifoliar, no qual a planta é composta por dois cotilédones, duas folhas primárias e uma folha terciária bem pequena.....	16
Figura 5. Análise eletroforéticas por Tricine-SDS-PAGE do extrato bruto de proteínas de folhas de <i>Ricinus communis</i> . Raias: M, marcador de massa molecular; C, folhas controle; F, folhas feridas; NF, folhas não feridas de plantas injuriadas; MJ, folhas tratadas com metil jasmonato. Foram aplicados 125 µg de proteína por poço. O gel foi corado com azul de coomassie. LSU -subunidade pesada da Rubisco, SSU - subunidade leve da Rubisco. As setas pretas indicam as proteínas induzidas por MJ e as setas cinza indicam proteínas reduzidas.....	23
Figura 6. Gel de tricina e “Western blotting” de folhas de plantas controle e tratadas com MJ. Em 1 é representado o gel espelho das amostras que foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo anticadeia pesada da Rubisco (LSU), como representado em 2. C, folhas controle; MJ, folhas tratadas com metil jasmonato por 72 h. Foram aplicados 200 µg de proteína por poço. O gel foi corado com azul de coomassie.....	24

<p>Figura 7. Zimografia em gelatina (SDS-PAGE 12% com gelatina bovina 0,1%) do extrato bruto de proteínas de folhas de <i>Ricinus communis</i>. Raias: M, marcador de massa molecular; C, folhas controle; F, folhas feridas; NF, folhas não feridas de plantas injuriadas; MJ, folhas tratadas com metil jasmonato. Foram aplicados 125 µg de proteína por raia do gel. O gel foi incubado por 16 h a 37 °C em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 4,5) e corado com azul de coomassie.....</p>	26
<p>Figura 8. Zimografia em gelatina (SDS-PAGE 12% com gelatina bovina 0,1%) do extrato bruto de proteínas de folhas de <i>Ricinus communis</i>. Raias: M, marcador de massa molecular; C, folhas controle; F, folhas feridas; NF, folhas não feridas de plantas injuriadas; MJ, folhas tratadas com metil jasmonato. Foram aplicados 125 µg de proteína por raia do gel. O gel foi incubado por 16 h a 37 °C em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,5) e corado com azul de coomassie. RCp, protease de <i>Ricinus communis</i>.....</p>	27
<p>Figura 9. Zimografia em gelatina (SDS-PAGE 12% com gelatina bovina 0,1%) do extrato bruto de proteínas de folhas de <i>Ricinus communis</i>. Raias: M, marcador de massa molecular; C, folhas controle; F, folhas feridas; NF, folhas não feridas de plantas injuriadas; MJ, folhas tratadas com metil jasmonato. Foram aplicados 125 µg de proteína por raia do gel. O gel foi incubado por 16 h a 37 °C em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5) e corado com azul de coomassie. RCp, protease de <i>Ricinus communis</i>.....</p>	28
<p>Figura 10. Efeito do pH sobre as atividades de proteases presentes em folhas de <i>R. communis</i> tratadas com MJ. Foram carregados 125 µg de proteína por poço de gel. Cada raia de gel foi incubada em 30 mL do tampão apropriado como descrito na metodologia. As amostras foram incubadas por 16 h a 37 °C e a seguir o gel foi corado com azul de coomassie. RCp, protease de <i>Ricinus communis</i>.....</p>	30
<p>Figura 11. Zimografia em gel de gelatina de proteases de folhas de <i>R.</i></p>	

<p><i>communis</i> tratadas com MJ (72 h). Todas as raias dos géis foram incubadas com 30 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,5) na presença ou ausência (controle) de inibidores de proteases. Foram aplicados 125 µg de proteína por raia do gel. A, raias incubadas com benzamidina 1 mM, bestatina 10 µM, EDTA 10 mM, pepstatina 1 µM, PMSF 1 mM; B, raias incubadas com os inibidores E-64 1 µM, cistatina µM, e com os ativadores de proteases cisteínicas: DTT 100 µM e com β-mercaptoetanol (β-MeOH)100 µM. Cada gel foi incubado por 16 h a 37 °C e foi a seguir corado com azul de coomassie. RCp, protease de <i>Ricinus communis</i>.....</p>	32
<p>Figura 12. Análise densitométrica dos géis da figura 11 utilizando o programa “Gel Perfect”. Cada gráfico expressa a atividade proteolítica como área da banda contra a mobilidade relativa (Rf) de cada isoforma de protease. A, representa a análise das raias de gel incubadas com benzamidina 1 mM, bestatina 10 µM, EDTA 10 mM, pepstatina 1 µM, PMSF 1 mM; B, representa a análise das raias de gel incubadas com os inibidores E-64 1 µM, cistatina µM, e com os ativadores de proteases cisteínicas: DTT 100 µM e com β-mercaptoetanol (β-MeOH)100 µM. Os asteriscos representam: RCp1 (*), RCp2 (*), protease de 44 kDa (*), protease de 38 kDa (*) e a protease de 29 kDa (*), respectivamente.....</p>	33
<p>LISTA DE TABELA</p>	
<p>Tabela 1. Sumário da caracterização de proteases.....</p>	35

LISTA DE ABREVIATURAS	
Caspases.....	“cysteine-dependent <u>as</u> partate-specific protein <u>ases</u> ”
CysEP.....	Endopeptidase cisteínica
DAB.....	Diaminobenzidina
DTT.....	1,4-ditiotreitól
E-64.....	<i>trans</i> -epoxisuccinil-l-leucilamido (4-guanidino) butano
EDTA.....	Ácido etilenodiaminotetracético
HR.....	Resposta de hipersensibilidade
JA.....	Ácido jasmônico
JIPs.....	Proteínas induzidas por jasmonatos
kDa.....	QuiloDalton
LAP.....	Leucina aminopeptidase
LOX.....	Lipoxigenase
LSU.....	Subunidade pesada da Rubisco
MJ.....	Metil jasmonato
OAC.....	Aleno óxido ciclase
OAS.....	Aleno óxido sintase
OPDA.....	Ácido 12-oxo-fitodienóico
OVA.....	Ovalbumina
PCD.....	Morte celular programada
PMSF.....	Fluoreto de fenilmetanosulfonil
PPVs.....	Vesículas de precursores de proteases
PVPP.....	Polivinilpolipirrolidona
RCp.....	Protease de <i>Ricinus communis</i>
ROS.....	Espécies reativas de oxigênio
Rubisco.....	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase
SAGs.....	Genes associados à senescência
SDGs.....	Genes regulados negativamente na senescência
SDS.....	Dodecil sulfato de sódio
SSU.....	Subunidade leve da Rubisco
TEMED.....	N, N, N', N'-tetrametiletilenoamina

PAGE.....	Eletroforese em gel de poliacrilamida
Tris.....	Hidroximetilaminometano
VPE.....	Enzima de processamento vacuolar
β -MeOH.....	β -mercaptoetanol

ABSTRACT

Plants produce a wide variety of defense proteins in response to biotic and abiotic stress. Jasmonates are signaling molecules that play a key role in wound response and regulate the biosynthesis of many defensive proteins including proteases. These enzymes are also involved in the regulation of the senescence leaf and are induced by jasmonate treatment. We, herein, investigate the effects of wounding and methyl jasmonate (MJ) on the protein pattern of castor bean leaves (*Ricinus communis* L.) and on proteolytic activity. Gelatin zymography demonstrated that MJ and mechanical wounding induce alterations in the proteolytic pattern of castor bean leaves. Two cysteine proteases (38 and 29 kDa) were induced by the treatments employed; however, MJ induced a higher protease level than mechanical wounding during the stress period (24, 48 and 72 h). The increase in protease activity mirrors a decline in soluble protein content and Rubisco degradation that may be an indicator of the initiation of senescence in castor plants. The 29 kDa protease has an acidic optimal pH, while the 38 kDa protease has a neutral optimum activity; both were inhibited by E-64 and cystatin. The induction of these proteins by MJ suggests a possible role of cysteine proteases in leaf senescence and their involvement in the regulation of wound response in castor bean plants.

RESUMO

As plantas produzem uma variedade de proteínas de defesa em resposta a estresses bióticos e abióticos. Os jasmonatos são moléculas sinalizadoras que desempenham uma função crucial na resposta à injúria e que regula a síntese de muitas proteínas de defesa, incluindo as proteases. Estas enzimas estão também envolvidas na regulação da senescência foliar e são induzidas pelo tratamento com jasmonatos. Neste trabalho, nós investigamos os efeitos do ferimento mecânico e do tratamento com metil jasmonato (MJ) sobre o padrão de proteínas foliares de mamona (*Ricinus communis* L.) e sobre a atividade de enzimas proteolíticas. Foi demonstrado, por zimografia em gelatina, que o MJ e o ferimento mecânico induzem alterações no padrão proteolítico de folhas de mamona. Duas proteases cisteínicas (38 e 29 kDa) foram induzidas pelos tratamentos empregados; entretanto, MJ induziu níveis mais altos de proteases que o ferimento mecânico durante o período de estresse (24, 48 e 72 h). O aumento na atividade proteolítica espelha um declínio no conteúdo de proteínas solúveis e degradação da Rubisco, o que pode ser um bom indicador do início da senescência em plantas de mamona. A protease de 29 kDa tem um pH ótimo ácido enquanto a protease de 38 kDa tem uma atividade ótima em pH neutro; ambas as protease foram inibidas por E-64 e cistatina. A indução dessas proteínas por MJ sugere uma possível função de proteases cisteínicas na senescência foliar e o seu envolvimento na regulação da resposta à injúria em plantas de mamona.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mecanismos de defesa das plantas

As plantas são organismos sésseis e autotróficos e, portanto, requerem uma série de defesas sofisticadas para sobreviver em um mundo repleto de organismos heterotróficos. Os ataques de agressores ocorrem em escalas espaciais que variam desde microrganismos até herbívoros de grande porte. Desta forma, as plantas necessitam de defesas que possam ser efetivas em diferentes níveis (Kessler e Baldwin, 2002).

As defesas empregadas pelas plantas na sua proteção contra diversos agentes patogênicos e herbívoros que as atacam são de diversos tipos. As defesas podem ser classificadas como físicas ou químicas, e induzidas ou constitutivas, segundo o seu modo de expressão (Xavier-Filho, 1993).

As defesas físicas incluem estruturas como pêlos, espinhos, tricomas, ceras, ou tegumento resistente nas sementes, que impedem ou dificultam o ataque do organismo agressor. Já as defesas químicas, envolvem a participação de substâncias químicas como, por exemplo, a presença de alcalóides, aminoácidos não protéicos, compostos fenólicos, terpenóides ou ainda a presença de proteínas tóxicas como lectinas, inibidores de proteinases e α -amilases, proteínas inativadoras de ribossomos, alérgenos, entre outras (Xavier-Filho, 1993).

As plantas podem ser constitutivamente resistentes como um resultado de traços de resistência pré-formados, ou elas tornam-se resistentes após um ataque como um resultado de mudanças induzidas por um herbívoro ou patógeno, que são localizadas em tecidos adjacentes ao local de ataque ou são sistemicamente expressas através da planta (Kessler e Baldwin, 2002).

As defesas contra microrganismos

quando o sistema de sobrevivência da planta reconhece várias moléculas eliciadoras a partir do patógeno agressor (proteínas, peptídeos, lipídeos e polissacarídeos), podendo disparar o processo de morte celular programada (Lam *et al.*, 2001). Embora a HR possa ser efetiva contra patógenos, ela não o é contra insetos de vida livre que evitam uma HR simplesmente se movendo de um local de alimentação para outro (Kessler e Baldwin, 2002).

Diferente da agressão causada por patógenos, o ataque de herbívoros está associado com ferimento mecânico, e seu reconhecimento normalmente envolve respostas específicas da planta (Korth e Dixon, 1997; Walling, 2000). Além disso, aspectos anatômicos, comportamentais e fisiológicos de herbívoros também permitem às plantas usarem defesas que seriam ineficientes contra patógenos. Por exemplo, as plantas utilizam metabólitos secundários que são especificamente direcionados contra sistemas de órgãos exclusivos de herbívoros (nervoso, digestivo, endócrino, etc) (Kessler e Baldwin, 2002) e usam interações de níveis tróficos superiores como meio de defesa indireta fornecendo informações que atraem predadores e parasitóides (Dicke *et al.*, 1999).

1.2. A sistemina e a resposta de defesa contra herbívoros

Todas as plantas são capazes de se adaptar a mudanças causadas por estímulos bióticos e abióticos de seu ambiente através de alterações morfológicas e fisiológicas. Por meio de uma série de mecanismos de sinalização intracelular, a planta informa a todas as suas partes que modificações ocorreram no ambiente externo e se prepara para responder a estas mudanças (Wasternack e Parthier, 1997).

Durante os últimos 60 anos, cinco hormônios vegetais clássicos foram identificados e caracterizados: auxinas, giberelinas, etileno, ácido abscísico, e citocininas (Kende e Zeevart, 1997). As diferenças estruturais entre hormônios vegetais e animais trouxeram a idéia de que as plantas, ao longo de sua evolução, desenvolveram um arranjo de moléculas reguladoras que era totalmente diferente daquele encontrado em animais (Ryan e Pearce, 1998). No entanto, com a descoberta da sistemina em 1991, um peptídeo que induz a síntese de inibidores de

proteínases de forma sistêmica em folhas de tomate, o entendimento da sinalização peptídica em plantas começou a mudar (Pearce *et al.*, 1991).

A descoberta na década de 70 de que plantas de tomate acumulavam um inibidor de proteínases serínicas (inibidor I) em folhas feridas pelo ataque de insetos e em folhas sistêmicas não feridas levou a busca por um fator indutor da síntese de inibidores de proteínases em plantas de tomate (Green e Ryan 1972; Ryan 1974). Este esforço coletivo culminou com o isolamento de um peptídeo de 18 aminoácidos chamado sistemina que era ativo em concentrações extremamente baixas por planta (Pearce *et al.*, 1991).

A sistemina é processada a partir de uma proteína precursora dotada de 200 aminoácidos conhecida como pró-sistemina (McGurl *et al.*, 1992). A pró-sistemina é sintetizada nos feixes vasculares (Jacinto *et al.*, 1997), sendo liberada próxima ao floema após ferimento, de onde pode ser transportada para outras partes da planta.

Plantas de tomate superexpressando o cDNA da pró-sistemina na orientação “sense” exibem uma síntese constitutiva de inibidores de proteínases, como se elas estivessem sendo constantemente feridas, mesmo na ausência de qualquer injúria (McGurl *et al.*, 1994). Quando o cDNA da pró-sistemina é expresso na posição “antisense”, a resposta de defesa sistêmica fica bastante deteriorada, entretanto, a síntese de inibidores é restabelecida se a sistemina ou a pró-sistemina forem fornecidas através das feridas frescas (Dombrowski *et al.*, 1999).

As características da sistemina, incluindo sua potência, mobilidade no floema, indução do gene de pró-sistemina após ferimento, o efeito da orientação “antisense” desse gene no bloqueio da sinalização após ferimento e, o restabelecimento da resposta sistêmica de defesa em plantas “anti-sense” levaram à conclusão de que a sistemina é um hormônio sistêmico de ferimento que desempenha uma função central na regulação da expressão de genes de defesa em resposta ao ataque de pestes (Ryan, 2000).

1.3. Fito-oxilipinas

Diferentemente dos animais, as plantas não possuem os mecanismos de defesas fornecidos pela presença do sistema imune. Dessa forma, elas desenvolveram um arsenal eficiente de mecanismos de defesa contra o ataque de

patógenos e predadores. As respostas de defesa levam à produção de fito-oxilipinas, que são metabólitos produzidos através da transformação oxidativa de ácidos graxos insaturados, via uma série de caminhos metabólicos divergentes. As fito-oxilipinas desempenham uma função pivotal na defesa vegetal, uma vez que elas atuam como compostos sinalizadores (ácido jasmônico e metil-jasmonato) e protetores tais como compostos antimicrobianos, agentes protetores em resposta à injúria, ou como constituintes da cutícula (Bleé, 2002).

1.3.1. Os jasmonatos e a via octadecanóide

Dentre as várias classes de fito-oxilipinas, as mais bem estudadas atualmente são aquelas pertencentes à família dos jasmonatos, da qual fazem parte o ácido jasmônico e seu metil éster, o metil jasmonato.

Em 1962, o metil jasmonato foi identificado por Demole *et al.* como um componente da fragrância do óleo essencial de jasmim (*Jasminum grandiflorum*). Já o ácido jasmônico puro, foi isolado de filtrados de culturas do fungo *Botryodiplodia theobromaei* no início da década de setenta (Aldridge *et al.*, 1971 *apud* Mueller, 1997). Desde então, os jasmonatos têm sido identificados em diversas fontes vegetais (Hamberg e Gardner, 1992) (Figura 1).

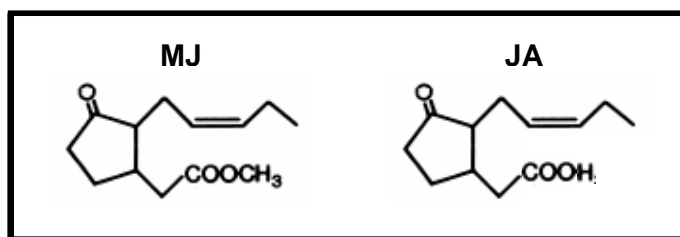


Figura 1. Estrutura química do metil jasmonato (MJ) e do ácido jasmônico (JA).

Em 1990 Farmer e Ryan descobriram que metil jasmonato ativa a expressão de genes de defesa, levando à acumulação de inibidores de proteinases em três diferentes espécies de plantas de forma similar à resposta contra a injúria ou a fragmentos de oligossacarídeos derivados da parede celular de plantas e patógenos. Foi postulado então, que o ácido jasmônico é parte central de um sistema de

transdução intracelular que regula a indução de genes defensivos (Farmer e Ryan, 1990). O metil jasmonato aplicado exogenamente, pode ser rapidamente transportado pelas células vegetais, sendo hidrolisado por esterases ao ácido jasmônico, que pode assim participar da via de sinalização. A aplicação de precursores do jasmonato, tais como ácido linolênico, ácido hidroperoxi-linolênico e ácido 12-oxo-fitodienólico (OPDA), também resulta na acumulação de inibidores de proteinases (Farmer e Ryan, 1992).

Os jasmonatos são sintetizados através da via octadecanóide (Farmer e Ryan, 1992; Creelman e Mullet, 1997; Beale e Ward, 1998). Resumidamente, o ácido linolênico liberado por uma lipase é oxigenado por uma lipoxigenase (LOX), e então convertido ao ácido 12-oxo-fitodienólico (OPDA) pela ação seguida da aleno óxido sintase (OAS) e da aleno óxido ciclase (OAC), respectivamente. Os passos iniciais da biossíntese do ácido jasmônico que são catalisados pela LOX, AOS e OAC ocorrem nos cloroplastos, onde estão localizadas as enzimas citadas. No entanto, os passos finais da biossíntese do ácido jasmônico, que incluem a redução do ácido 12-oxofitodienólico e três ciclos de β -oxidação da cadeia lateral de ácido carboxílico ocorrem nos peroxissomos (Strassner *et al.*, 2002) (Figura 2).

Os jasmonatos são importantes reguladores celulares que medeiam diversos processos de desenvolvimento, tais como germinação de sementes, desenvolvimento de flores, frutos e o processo de senescência (Creelman e Mullet, 1995). Além disso, os jasmonatos induzem respostas de defesa contra diversos patógenos (Reymond e Farmer, 1998), ferimento mecânico ou injúria causada por insetos herbívoros (Ryan, 2000). Particularmente, o metil jasmonato (MJ) tem se tornado um forte candidato a sinalizador de defesa entre plantas devido a sua volatilidade (Farmer e Ryan, 1990).

Evidências de um mutante de *Arabidopsis*, que é deficiente na OPDA redutase, sugerem que a parte final da via de biossíntese do ácido jasmônico não é necessária para que uma resposta normal à injúria seja exibida, de forma que, o OPDA pode substituir o ácido jasmônico como uma molécula sinalizadora de defesa (Stintzi *et al.*, 2001). Entretanto, OPDA parece ser incapaz de substituir o ácido jasmônico em outros processos como o controle do desenvolvimento da antera e do pólen (Stintzi e Browse, 2000).

As enzimas envolvidas na biossíntese de ácido jasmônico, geralmente, são reguladas positivamente após fermento ou tratamento com metil jasmonato (Mueller, 1997; Leon e Sanchez-Serrano, 1999), resultando num sistema de sinalização de “feedback” positivo, que amplifica o sinal inicial e a resposta de defesa.

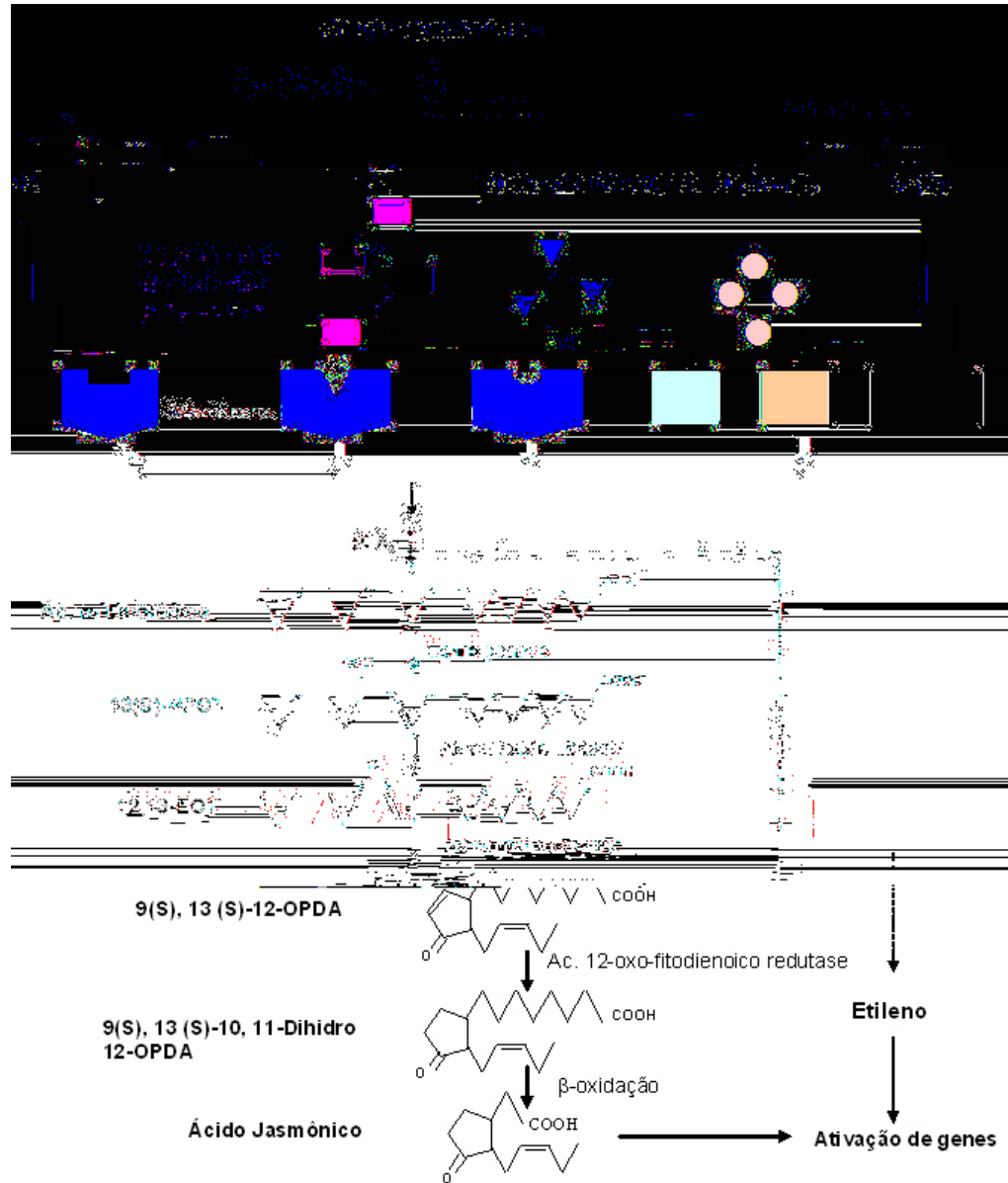


Figura 2. Esquema de ativação de genes de defesa através da via octadecanóide em plantas de tomate. PLA₂- fosfolipase A₂, 12-OPDA - ácido 12-oxo-fitodienoico (Adaptado de Farmer e Ryan, 1992; Bergey *et al.*, 1996; Mueller, 1997).

1.4. Proteases e a resposta de defesa vegetal

A proteólise em plantas desempenha funções fundamentais durante o desenvolvimento e em processos fisiológicos (Schaller e Ryan, 1996). Dentre os genes que são induzidos por ferimento, tratamento com sistemina e por jasmonatos estão os genes de proteases de diferentes classes: serínicas, cisteínicas, aspárticas e metaloproteinases (Ryan 2000).

A degradação de proteínas é vital para ad

2006). Em geral as proteases do tipo papaína são sintetizadas como pré-pró-enzimas no retículo endoplasmático, contendo um pró-domínio (38-150 aa) que bloqueia a atividade da enzima e que é importante para o enovelamento da proteína. Posteriormente esse domínio é removido autocataliticamente e a enzima se torna ativa (Vernet *et al.*, 1995). O Clã CD compreende as famílias C13, C11, C14 (caspases), C25 e a enzima legumaína pertencente à família C13. A legumaína é uma endoprotease com especificidade C-terminal para resíduos de asparagina. Enquanto as proteases do Clã CD possuem especificidade seletiva de substrato sobre asparagina e aspartato no sub-sítio S1, as proteases do clã CA têm preferência por resíduos hidrofóbicos ou volumosos no sub-sítio S2, mas exibem baixa seletividade no sub-sítio S1 (Bah *et al.*, 2006).

Em animais, as proteases cisteínicas desempenham um importante papel na
degr

incompatíveis a estresses bióticos causados pela invasão de patógenos (Krueger *et al.*, 2002).

1.6. A senescência foliar e o processo proteolítico

A senescência em plantas refere-se à morte de um órgão inteiro, uma folha por exemplo, ou no caso de muitas espécies herbáceas, a morte da planta inteira após o término do seu ciclo reprodutivo. O maior propósito da senescência foliar em plantas herbáceas é reciclar nutrientes das células que estão morrendo e distribuí-los para a planta, enquanto que a senescência do vegetal inteiro visa fornecer nutrientes para a síntese de reservas nas sementes (Trobacher *et al.*, 2006).

A senescência está associada a um decréscimo no conteúdo de proteína e de clorofila, como é evidenciado pelo amarelecimento da folha (Feller e Fisher, 1994). Mudanças na estrutura de organelas, degradação de DNA e RNA, rompimento de membranas e extravasamento de íons são também característicos da senescência (Nooden, 1988).

Em folhas, a proteólise aumenta durante a senescência, quando a degradação de proteínas libera aminoácidos que podem ser usados no crescimento de tecidos novos (Huffaker, 1990). Estudos em folhas de feijão mostram o papel de proteases na degradação de ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), a maior fonte de nitrogênio durante a senescência de feijão, que é mediada por duas proteases vacuolares, uma tiol-protease (SH-EP) (Mitsuhashi *et al.*, 1986) e uma protease serínica (Yoshida e Minamikawa, 1996). A Rubisco é uma proteína composta por oito cadeias pesadas codificadas no cloroplasto (50-55 kDa) e oito cadeias leves codificadas no núcleo (12-18 kDa) (Yoshida e Minamikawa, 1996). Vários estudos têm demonstrado que o ácido jasmônico e o metil jasmonato podem induzir a senescência, como demonstrado pela degradação das clorofilas e da Rubisco (Weidhase *et al.*, 1987; Desimone *et al.*, 1996; Yoshida e Minamikawa, 1996; Cavalcante *et al.*, 1999; Giuli, 2006). A proteólise no cloroplasto começa durante a fase precoce de senescência e as vias de degradação das clorofilas e proteínas cloroplastídicas são parcialmente interconectadas (Hortensteiner e Feller, 2002).

Genes expressos em folhas maduras que são regulados negativamente quando a folha se torna senescente são designados “senescence downregulated genes” (SDGs), enquanto outros, que são regulados positivamente são conhecidos como “senescence associated genes” (SAGs) (Lohman *et al.*, 1994). Muitos dos SAGs codificam proteinases cisteínicas. Estas enzimas são presumivelmente responsáveis pela degradação de proteínas celulares, inicialmente via autofagia e após a morte através do colapso vacuolar. Em *Arabidopsis*, oito genes de proteinases cisteínicas são expressos na senescência, sendo digno de nota o gene *SAG12*, que codifica uma proteinase do tipo papaína, utilizada como marcador de senescência nesta espécie (Lohman *et al.*, 1994; Guo *et al.*, 2004).

A senescência é influenciada por diversos hormônios incluindo etileno, ácido abscísico, ácido jasmônico, brassinosteróides, e ácido salicílico (Morris *et al.*, 2000; Gepstein *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2004). SAGs codificando proteinases cisteínicas são também regulados positivamente por estes hormônios (Drake *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003). Auxinas e citocininas tendem a inibir a senescência, embora a aplicação de citocininas não retarde a indução de todos os SAGs (Nooden *et al.*, 1979).

Proteases cisteínicas da família da legumina, conhecidas como enzimas de processamento vacuolar (VPEs), também parecem estar envolvidas na senescência foliar em plantas de *Arabidopsis*. γ -VPEs são expressas em folhas maduras e têm seus níveis aumentados quando a folha começa a senescer. α -VPEs não são detectadas nas folhas até que as mesmas apresentem sinais visíveis de senescência. A expressão de γ -VPEs é induzida por ferimento, etileno, ácido salicílico e por metil jasmonato (Kinoshita *et al.*, 1999).

1.7. A mamona (*Ricinus communis* L.)

O nosso modelo de estudo, a mamona (*Ricinus communis* L.), é uma planta de grande interesse econômico. A importância da cultura da mamona reside nas diversas aplicações do óleo extraído de suas sementes. Após desidratação, o óleo é utilizado na fabricação de tintas, vernizes e óleos de freio. Ele também é usado como lubrificante na aeronáutica e como base para a manufatura de diversos cosméticos e fármacos. O óleo de mamona é útil em vários processos industriais

como a fabricação de náilon, corantes, óleos lubrificantes de baixa temperatura, manufatura de tintas de impressão, espumas plásticas, colas e aderentes em geral (Fornazieri-Júnior, 1986).

A mamona (Figura 3) se classifica da seguinte forma (disponível em: <<http://www.ncbi.nih.gov/>> Acesso em: 25/09/05).

Super Reino: Eucaryota
Reino: Viridiplantae
Filo: Streptophyta
Superdivisão: Spermatophyta
Divisão: Magnoliophyta
Classe: Magnoliopsidae
Subclasse: Rosidae
Ordem: Malpighiales
Família: Euphorbiaceae
Subfamília: Acalyphoideae
Tribo: Acalypheae
Gênero: Ricinus
Espécie: *Ricinus communis*



Figura 3. A mamona (*Ricinus communis* L.).

A sua extraordinária capacidade de adaptação, a multiplicidade de aplicações industriais de seu óleo e o valor de sua torta como fertilizante, situam a mamona entre as oleaginosas tropicais mais importantes (Fornazieri-Júnior, 1986).

O óleo da semente de mamona diferencia-se dos similares vegetais por apresentar grandes quantidades de hidroxiácidos, especialmente, o ácido ricinoléico que confere características singulares ao óleo da mamona, como alta resistência ao escoamento e forte viscosidade, o que o torna indicado para lubrificação de engrenagens sujeitas a esfriamento e água, ao contrário dos outros óleos (Fornazieri-Júnior, 1986).

O óleo de mamona também é empregado na produção de biodiesel, a principal experiência com combustíveis alternativos do governo brasileiro. O biodiesel, quimicamente chamado éster, resulta da reação de qualquer ácido graxo com álcool etílico ou metílico. Proveniente da biomassa, o "diesel natural", como

também é chamado, é considerado um combustível de queima limpa e pode ser usado como impulsionador para motores ou com a finalidade de geração de energia elétrica (bioeletricidade) (Azevedo e Lima, 2001).

O óleo de mamona é recomendado para produzir biodiesel, por ser o único solúvel em álcool e não necessitar de calor e do conseqüente gasto de energia que requerem outros óleos vegetais durante a sua transformação em combustível (Azevedo e Lima, 2001).

A mamoneira é cultivada principalmente na região semi-árida do Brasil (Região Nordeste) graças a sua resistência à seca. Esta cultura é, portanto, de extrema importância para o desenvolvimento sustentável de populações de pequenos agricultores do Nordeste brasileiro.

O controle das pragas da mamoneira é realizado basicamente através da aplicação de inseticidas, sem um conhecimento adequado dos mecanismos de defesa que governam a resistência natural das plantas de *Ricinus communis* aos seus predadores, o que pode contribuir para a seleção de populações de insetos resistentes e para o aumento do desequilíbrio ecológico.

Portanto, faz-se necessária a compreensão dos mecanismos de defesa induzidos que regulam e colaboram para a proteção da mamona contra espécies de insetos predadores, uma vez que, diversas são as espécies que predam as folhas desta planta, o que prejudica a produção de sementes, e conseqüentemente, proporciona uma queda na produção do óleo de mamona.

Neste estudo, foi avaliado o efeito do ferimento mecânico e do metil jasmonato sobre plantas de mamona, visto que pouco se conhece sobre os mecanismos de defesa que regem o processo de defesa em plantas pertencentes à família Euphorbiaceae.

2. OBJETIVO

O objetivo deste projeto foi investigar o efeito do ferimento mecânico e do tratamento com metil jasmonato em plantas de *Ricinus communis* através da análise do padrão de proteínas foliares e do comportamento de proteases.

3. MATERIAIS

3.1. Sementes de mamona (*Ricinus communis* L.)

As sementes de mamona (cultivar IAC-80) foram compradas no Instituto Agronômico de Campinas - São Paulo.

3.2. Anticorpo

Um anticorpo policlonal contra a cadeia pesada da Rubisco (LSU) de *Ricinus communis* foi produzido em camundongos em colaboração com o professor Milton Masahiko Kanashiro do Laboratório de Biologia do Reconhecer desta universidade.

3.3. Material para tratamento das plantas

Pinça cirúrgica – Professional Stainless CE

Metil jasmonato – Aldrich

Triton X-100 – Calbiochem

3.4. Material para eletroforese e “western blotting”

Glicina, acrilamida, bis-acrilamida, dodecil sulfato de sódio (SDS), persulfato de amônio, Tris-base, TEMED (N, N, N', N' – Tetrametiletilenoamina) e tricina foram obtidos da SIGMA, PlusOne e MERCK. A membrana de nitrocelulose (0,45 µm) foi obtida da Sigma e o DAB da Gibco BRL.

3.5. Material para revelação de proteínas

Azul de Coomassie R 250 – Aldrich

Metanol - VETEC

Ácido acético glacial - VETEC

3.6. Inibidores de proteases e ativadores de proteases cisteínicas

Bestatina – Sigma

Benzamidina - Sigma

Cistatina - Sigma

E-64 - *trans*-epoxisuccinil-l-leucilamido (4-guanidino) butano - Sigma

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético - Vetec

Pepstatina A – Fluka

PMSF – Fluoreto de fenilmetanosulfonil - Sigma

DTT – 1,4-dithiothreitol - Sigma

β-Mercaptoetanol – Sigma

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e adquiridos comercialmente.

3.7. Equipamentos

Agitador magnético com aquecimento NT 103 – Nova Técnica

Balança BP210-S – Sartorius

Centrífuga Refrigerada Himac CR21 - HITACHI

Espectrofotômetro UV-mini 1240 – Shimadzu

ImageScanner PLIII – GE Healthcare

Liofilizador Freeze Drysystem Frezone 4.5 - Laconco

Medidor de pH Q-400A - Quimis

Microcentrífuga S407R – Eppendorf

Sistema de eletroforese vertical Mini Protean II – BioRad

Sistema de eletrotransferência Nova Blot Kit - GE Healthcare

Speed Vac Plus SC110A – Savant

4. METODOLOGIA

4.1. Cultivo de *Ricinus communis* L.

As sementes de *Ricinus communis* cultivar IAC-80 foram desinfectadas em solução de hipoclorito de sódio 1% durante 1 minuto e então lavadas com água destilada. A seguir, as sementes foram semeadas em potes plásticos contendo uma mistura de solo e vermiculita na proporção 3:1 (v/v) previamente autoclavados. Os potes semeados foram irrigados diariamente e mantidos em casa de vegetação por cerca de quinze dias, tempo necessário para que as plantas atinjam o estágio trifoliar, que foi usado como padrão.



Figura 4. Estágio trifoliar, no qual a planta é composta por dois cotilédones, duas folhas secundárias e uma folha terciária bem pequena.

4.2. Tratamentos empregados

4.2.1. Injúria mecânica

As plantas de *Ricinus communis* em estágio trifoliar tiveram suas folhas primárias danificadas marginalmente (5 mm) com o auxílio de uma pinça cirúrgica, e suas folhas foram coletadas após diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 horas). As plantas controle foram mantidas sob as mesmas condições ambientais de crescimento que as plantas feridas, permanecendo em câmaras fechadas sob iluminação constante de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 14 h a 28 °C e em condições de escuro por 10 h a 18 °C. As plantas feridas foram também avaliadas quando à indução de proteínas de defesa sistemicamente, ferindo-se apenas uma das suas duas folhas e a folha não ferida foi utilizada para avaliar a resposta de defesa sistêmica.

4.2.2. Tratamento com metil jasmonato

Plantas de mamona, em mesmo estágio de desenvolvimento (trifoliar), foram submetidas ao tratamento com metil jasmonato através da utilização de câmaras fechadas. Uma solução de metil jasmonato 1 mM (125 µL para 500 mL de solução de Triton X-100 0,125%) (Pearce *et al.*, 2001) foi borrifada sobre as folhas das plantas até que estas ficassem completamente umedecidas, e as plantas permaneceram expostas aos vapores de metil jasmonato por 24, 48 e 72 horas, sendo que a cada 24 horas as plantas eram novamente borrifadas com solução de metil jasmonato, portanto, as plantas de 48 h foram borrifadas no tempo zero horas e depois no tempo de 24 horas, enquanto que as plantas de 72 h foram borrifadas também no tempo de 48 horas (Pearce *et al.*, 2001).

Para todos os tratamentos (controle, ferimento mecânico e metil jasmonato), as plantas foram acondicionadas em câmaras fechadas sob iluminação constante de 200 µmol m⁻² s⁻¹ por 14 h a 28 °C e em condições de escuro por 10 h a 18 °C durante todo período de estresse. Foram utilizadas três plantas por tratamento e para cada experimento foram feitas três repetições.

4.3. Extração de proteínas foliares

Para a análise eletroforética, as folhas coletadas em todos os tempos dos tratamentos empregados foram maceradas com o auxílio de grau e pistilo em presença de nitrogênio líquido. Após a maceração, cada amostra foi extraída com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, PVPP 2% com PMSF 1 mM numa proporção de massa/volume de 1:5 por 20 min a 4 °C sob agitação. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 15.000 x g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e analisado por tricina-SDS-PAGE (item 4.5). Para os ensaios de atividade proteolítica, as folhas foram extraídas sob as mesmas condições, entretanto, o inibidor de proteases PMSF não foi adicionado ao tampão de extração.

4.4. Dosagem de proteínas

As determinações de proteínas foram feitas pelo método descrito por Bradford (1976). A curva-padrão foi feita utilizando-se ovalbumina (OVA).

4.5. Tricina-SDS-PAGE

As amostras de folhas controle, feridas, não feridas e tratadas com metil jasmonato obtidas após a extração com Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, na presença de PMSF tiveram seu conteúdo de proteínas dosado e foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (16,5% T e 3% C) na presença de SDS e tricina, segundo o método descrito por Schägger e von Jagow (1987). O gel foi composto por um gel separador (15 cm x 9 cm x 0,1 cm; L x A x E), um gel espaçador (15 cm x 1 cm x 0,1 cm) e um gel concentrador (15 cm x 2,5 cm x 0,1 cm). Após a diluição das amostras no tampão de amostra (glicerol 12 %, SDS 4 %, β -mercaptoetanol 2 %, Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, e azul de Coomassie G 0,001 %), cerca de 125 μ g de proteínas foram aplicados em cada raia do gel e a corrida eletroforética foi realizada a 150 V por aproximadamente 8 horas a 4 °C. A corrida foi interrompida antes que o corante do tampão de amostra saísse do gel.

4.6. Revelação de proteínas no gel

O gel foi corado com solução de azul de Coomassie R 250 0,1 % em metanol 40 % e ácido acético 10 %. Posteriormente, o gel foi descorado com uma solução de metanol 40 % contendo ácido acético 10 %.

4.7. Detecção da cadeia pesada da Rubisco (LSU) por “Western blotting”

A transferência de proteínas do gel para membrana de nitrocelulose foi realizada como descrito por Sittenfeld e Moreno (1987). Neste procedimento, pedaços de papel de filtro e de membrana foram embebidos com tampão de transferência (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, metanol 20 % pH 8,3) e em seguida foi montado um sanduíche seguindo-se a ordem: três pedaços de papel de filtro, a membrana de nitrocelulose, o gel, e por último, mais três pedaços de papel de filtro, tomando-se o cuidado de evitar bolhas. A corrente utilizada foi proporcional à área do gel transferido (1 mA por centímetro quadrado de gel) e a transferência teve uma duração de 1 hora. As amostras utilizadas nesta análise foram de plantas controle e de plantas tratadas com metil jasmonato.

Após a transferência das proteínas, a membrana de nitocelulose foi incubada por 2 h em tampão bloqueador (leite desnatado molico 2% em tampão fosfato sódio 0,1 M contendo NaCl 0,5 M, pH 7,6). Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-LSU diluído em tampão bloqueador (1:2000) durante o período de 2 horas. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS por 1h, a cada 10 min. Incubou-se a membrana com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo complexado à peroxidase diluído 1:2000 em tampão bloqueador por 2 h. E a membrana foi novamente lavada com PBS por 1h, a cada 10 min.

A revelação foi feita utilizando uma mistura contendo 5 mg de DAB dissolvidos em 4,9 mL de água ultrapura, 300 µL de imidazol 0,1 M, 100 µL de tampão Tris-HCl 2 M (pH 7,5) e 5 µL de peróxido de hidrogênio 30%.

4.8. Zimografia em gel contendo gelatina

Durante esta análise foram utilizados géis de poliacrilamida 12 % copolimerizados com gelatina bovina 0,1 % sob condições não redutoras, segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970). Albumina sérica bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), tripsinogênio (24 kDa) foram usados como marcadores de massa molecular.

Antes da eletroforese (150 V por 6 h) cada amostra (folhas controle, feridas, não feridas e tratadas com MJ) foi incubada com o tampão de amostra não redutor 4 x concentrado (glicerol 10 %, SDS 2 %, Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, e azul de bromofenol 0,005 %) e aplicada no gel. O gel foi composto por um gel separador (15 cm x 9 cm x 0,1 cm; L x A x E) e um gel concentrador (15 cm x 3,5 cm x 0,1 cm). O tampão de corrida utilizado foi composto de Tris 25 mM e glicina 192 mM, pH 8,3. Após a corrida, o gel foi lavado duas vezes por 30 min com 100 mL de solução de Triton X-100 2.5% para remoção do SDS e incubado em 100 mL dos tampões de atividade proteolítica (tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,5; tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5; tampão Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5) durante 16 h sob a temperatura de 37 °C. Ao término desse período o gel foi corado com azul de Coomassie R250 0,1 % em solução de metanol/ácido acético/água destilada (4:1:5) por 1 h e descorado usando solução de metanol/ácido acético/água destilada (4:1:5) por mais 1 h. Os géis corados foram armazenados em solução de ácido acético 2 %. As áreas

de proteólise aparecem no gel como zonas claras em contraste com o plano de fundo azulado.

4.9. Efeito do pH sobre a atividade proteolítica

Para este ensaio foram utilizadas apenas amostras de plantas tratadas com metil jasmonato por 72 h pois nelas eram observados níveis mais elevados de atividade proteinásica. Após o processo de eletroforese e as duas lavagens com 30 mL de solução de Triton X-100 por 30 min, cada raia do gel foi incubada em 15 mL dos seguintes tampões: acetato de sódio 0,1 M, pH 3,0, 4,0 e 5,0; tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0 e 7,0; tampão Tris-HCl 0.1 M, pH 8,0, 9,0 e 10,0. Após 16 horas no tampão de atividade a 37 °C, as raias dos géis foram coradas com 30 mL de corante por 2 h e descoradas com 30 mL de descorante por 1 hora.

4.10. Efeito de inibidores e ativadores de proteases

As classes de proteases presentes em folhas de *Ricinus communis* foram determinadas empregando inibidores específicos no tampão de ati

descolorante por 1 hora. A inibição foi expressa como porcentagem do controle (atividade total) após a análise densitométrica das raias dos géis.

4.11. Análise densitométrica

A massa molecular aparente das proteínas de interesse foi calculada por comparação de suas mobilidades eletroforéticas com aquelas de proteínas padrão aplicadas no mesmo gel. A quantidade relativa de proteína e de atividade proteolítica foi determinada por densitometria, utilizando o programa “Gel-Perfect” (Bozzo e Retamal, 1991; Retamal *et al.*, 1999) e imagens no formato TIFF obtidas a partir de um “scanner” comercial em 400 dpi. O programa “Gel-Perfect” calcula a mobilidade relativa de cada banda corada e a área ocupada por ela, fornecendo também uma apresentação diagramática das bandas de proteínas e suas concentrações em relação à proteína total (ou atividade proteolítica total) de cada raia do gel.

5. RESULTADOS

5.1. Mudanças no padrão de proteínas foliares

O padrão de proteínas de folhas feridas, não feridas e tratadas com MJ foi investigado a fim de compreender as possíveis funções biológicas das proteínas induzidas por injúria e MJ em plantas de *Ricinus communis*. Poucas diferenças foram notadas entre o padrão de proteínas de folhas controle, feridas e não feridas durante os intervalos de 24, 48 e 72 horas (Figura 5). As folhas feridas apresentaram uma redução na banda de 48 kDa, correspondente à subunidade pesada da Rubisco (LSU) a partir de 24 horas de tratamento (figura 5) e na banda de 14 kDa, provavelmente a subunidade leve da Rubisco (SSU). Nas folhas não feridas vizinhas às folhas injuriadas foram observados níveis destas proteínas semelhantes aqueles das plantas controle nos três intervalos de tempo analisados.

As principais modificações observadas nas folhas tratadas com MJ foram as reduções das subunidades da Rubisco (LSU e SSU) (Figuras 5 e 6) e o aumento de proteínas com 62 kDa, 32 kDa, 25 kDa e 20kDa. Estas modificações só foram mais evidentes após 72 horas de tratamento (setas pretas na figura 5) mas já começaram a ser observadas desde o início do tratamento (24 horas). Além da redução dos níveis da LSU (48 kDa) e da SSU (14 kDa), as proteínas 40 kDa, 36 kDa, 23 kDa, 21 kDa, 13 kDa e 10 kDa também foram consumidas, e estão evidenciadas por setas em cinza na figura 5, ilustrando o final do tratamento com metil jasmonato (72 horas).

Nos ensaios de “Western blotting”, observamos ainda que as proteínas de 32 kDa e 25 kDa foram reconhecidas pelo anticorpo anti-LSU (Figura 6). Estas proteínas são provavelmente fragmentos da cadeia pesada da Rubisco produzidos durante o estresse causado pelo hormônio MJ. Algumas bandas com massas moleculares superiores a 48 kDa que aparecem tanto nas plantas controle como nas tratadas com MJ são também reconhecidas pelo anticorpo anti-LSU, no entanto, a quantidade dessas proteínas parece aumentar nas plantas tratadas com MJ (Figura 6). Isso mostra que pode haver formação de ligação cruzada entre a LSU e outras moléculas presentes no extrato foliar.

Figura 5. Análise eletroforéticas por Tricina-SDS-PAGE do extrato bruto de proteínas de folhas de *Ricinus communis*. Raias: M, marcador de massa molecular; C, folhas controle; F, folhas feridas; NF, folhas não feridas de plantas injuriadas; MJ, folhas tratadas com metil jasmonato. Foram aplicados 125 µg de proteína por poço. O gel foi corado com azul de coomassie. LSU -subunidade pesada da Rubisco, SSU - subunidade leve da Rubisco. As setas pretas indicam as proteínas induzidas por MJ e as setas cinza indicam proteínas reduzidas.

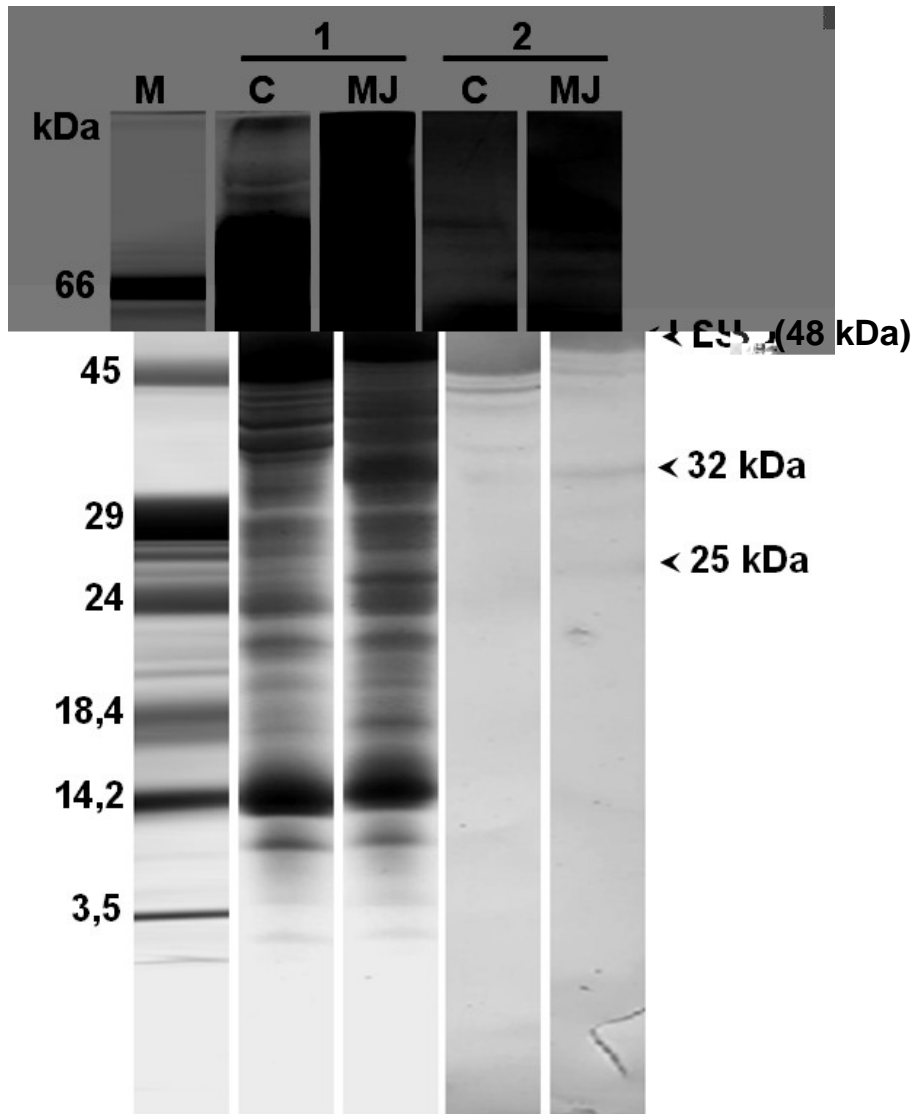


Figura 6. Gel de tricina e “Western blotting” de folhas de plantas controle e tratadas com MJ. Em 1 é representado o gel espelho das amostras que foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo anticadeia pesada da Rubisco (LSU), como representado em 2. C, folhas controle; MJ, folhas tratadas com metil jasmonato por 72 h. Foram aplicados 200 µg de proteína por poço. O gel foi corado com azul de coomassie.

5.2. Proteases foliares da mamona

Para investigar o efeito do ferimento e do MJ sobre as proteases foliares da mamona, plantas em estágio trifoliar (15 dias) foram estressadas e a atividade proteolítica durante a resposta de defesa foi avaliada usando zimografia em gel contendo gelatina. Cada raia do gel foi carregada com a mesma quantidade de proteína (125 µg).

Inicialmente foi realizado um ensaio preliminar no qual utilizamos três pHs diferentes para incubação dos géis para atividade de proteases. A figura 7 mostra os efeitos do ferimento e do tratamento com metil jasmonato sobre a atividade proteolítica utilizando tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,5. As mudanças no padrão de proteínas (Figura 5) foram acompanhadas por um aumento gradual na atividade proteolítica em folhas de plantas tratadas com MJ, e as maiores diferenças foram observadas após 72 h de tratamento (Figura 7). A proteólise foi também aumentada levemente nas folhas feridas quando comparadas com as plantas controle. Quatro isoformas de proteases foram detectadas em 44, 40, 38 e 29 kDa (Figura 7). Apenas a protease de 29 kDa aumentou durante a injúria e o tratamento com MJ, no entanto, nenhuma alteração foi observada nas folhas não feridas durante os intervalos de tempo analisados.

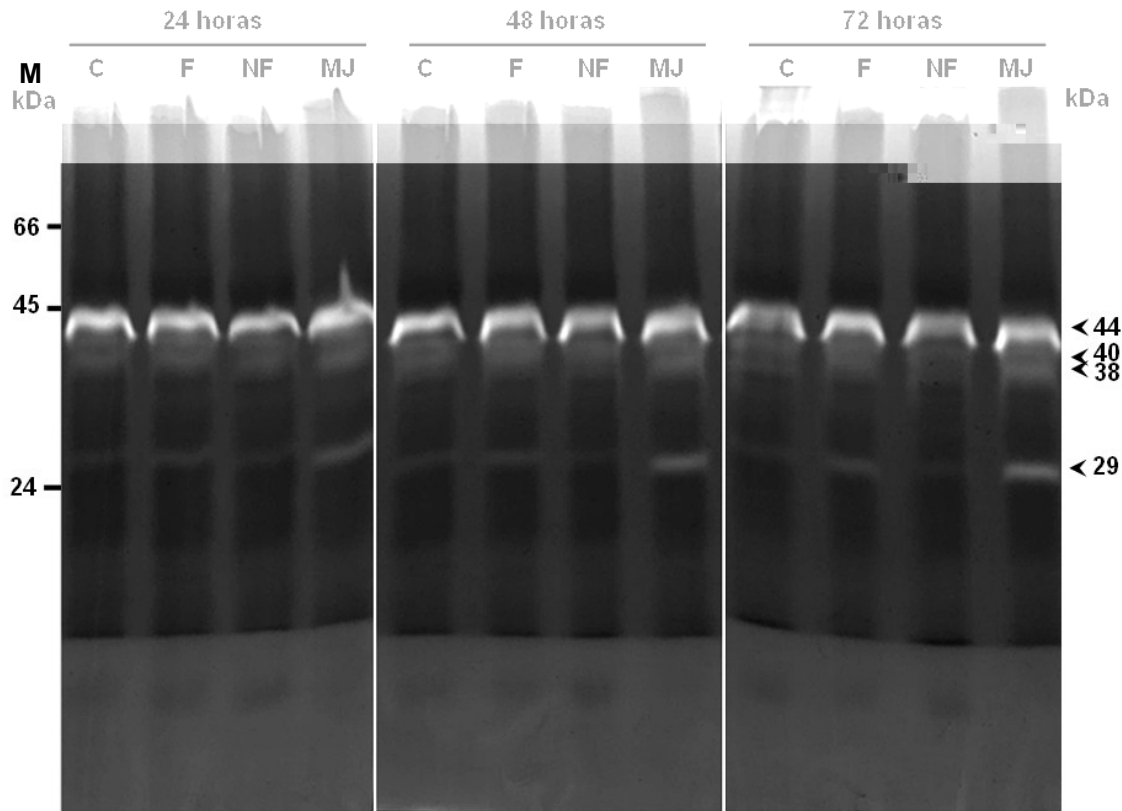


Figura 7. Zimografia em gelatina (SDS-PAGE 12% com gelatina bovina 0,1%) do extrato bruto de proteínas de folhas de *Ricinus communis*. Raias: M, marcador de massa molecular; C, folhas controle; F, folhas feridas; NF, folhas não feridas de plantas injuriadas; MJ, folhas tratadas com metil jasmonato. Foram aplicados 125 µg de proteína por raia do gel. O gel foi incubado por 16 h a 37 °C em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 4,5) e corado com azul de coomassie.

Quando o gel foi incubado em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,5), foi detectada a presença de pelo menos seis isoformas de proteases nos extratos foliares (Figura 8). A isoforma mais abundante foi denominada RCp1 (74% da atividade proteolítica por densitometria) e está presente nas plantas controle e estressadas. Três isoformas foram ativadas por MJ e são levemente induzidas por ferimento neste tampão de incubação, elas foram designadas RCp2, 38 kDa e 29 kDa . A indução dessas enzimas se elevou durante o período de estresse analisado (24, 48 e 72 h), sendo maior no tempo final de tratamento. Nas folhas sistêmicas (não feridas) os níveis de proteases se mantiveram semelhantes às plantas controle (Figura 8).

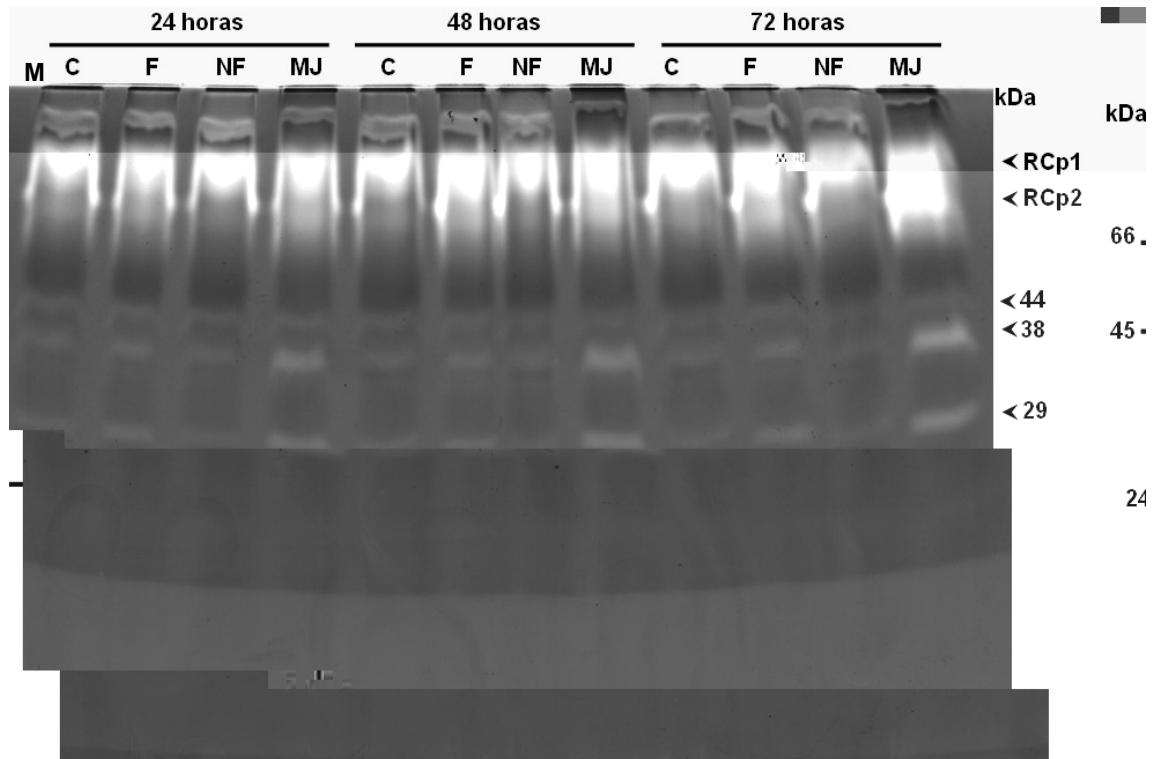


Figura 8. Zimografia em gelatina (SDS-PAGE 12% com gelatina bovina 0,1%) do extrato bruto de proteínas de folhas de *Ricinus communis*. Raias: M, marcador de massa molecular; C, folhas controle; F, folhas feridas; NF, folhas não feridas de plantas injuriadas; MJ, folhas tratadas com metil jasmonato. Foram aplicados 125 µg de proteína por raia do gel. O gel foi incubado por 16 h a 37 °C em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,5) e corado com azul de coomassie. RCp, protease de *Ricinus communis*.

A determinação da atividade proteolítica em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5 foi bastante similar àquela em tampão fosfato de sódio (pH 6.5), onde a isoforma RCp 2 e a isoforma de 38 kDa foram levemente induzidas por ferimento mecânico e mais fortemente induzidas por MJ (Figura 9). A isoforma de 29 kDa não foi detectada sob tais condições de pH, indicando que esta isoforma é uma protease ácida. As folhas não injuriadas apresentaram níveis de atividade proteolítica similar às plantas controle (Figura 9).

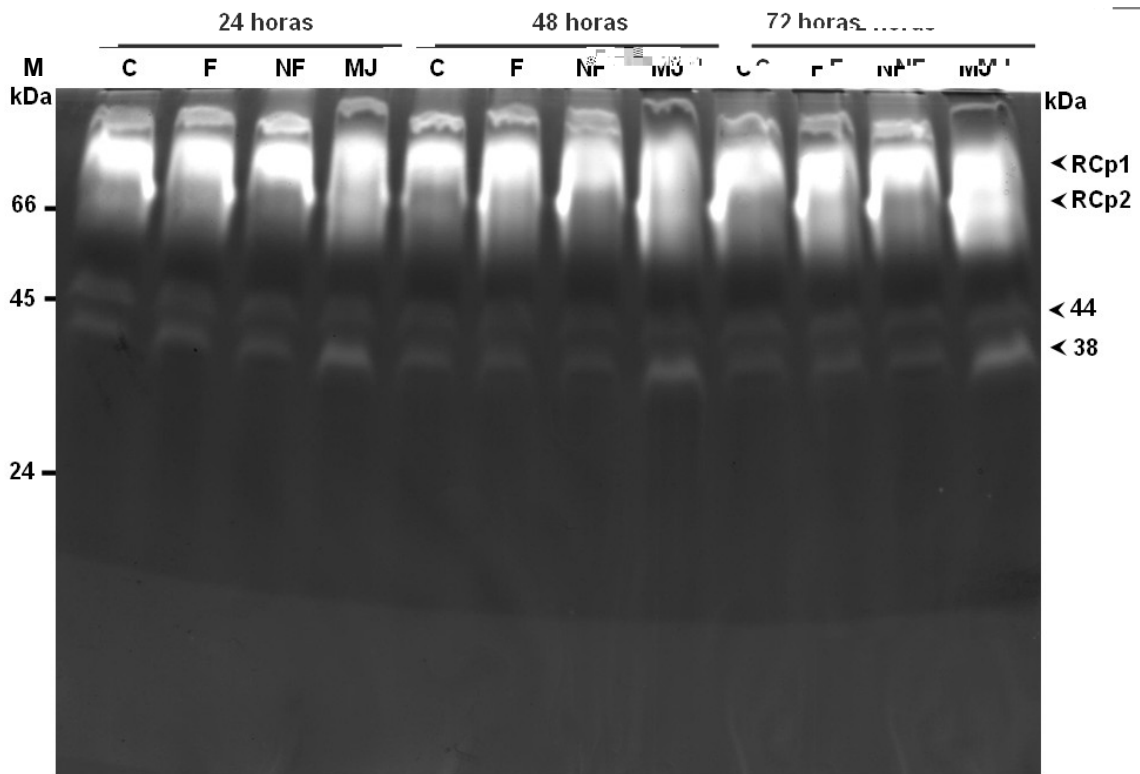


Figura 9. Zimografia em gelatina (SDS-PAGE 12% com gelatina bovina 0,1%) do extrato bruto de proteínas de folhas de *Ricinus communis*. Raias: M, marcador de massa molecular; C, folhas controle; F, folhas feridas; NF, folhas não feridas de plantas injuriadas; MJ, folhas tratadas com metil jasmonato. Foram aplicados 125 µg de proteína por raia do gel. O gel foi incubado por 16 h a 37 °C em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5) e corado com azul de coomassie. RCp, protease de *Ricinus communis*.

5.3. Efeito do pH sobre a atividade proteolítica

Com o intuito de determinar a faixa de pH de melhor atividade das proteases induzidas por injúria e tratamento com MJ foi utilizado um ensaio de atividade em gel de gelatina dos extratos foliares de plantas submetidas ao tratamento com MJ por 72 horas. Após a eletroforese, cada raia de gel foi incubada no tampão apropriado variando numa faixa de pH de 3,0 a 10,0, por um período de 16 h a 37 °C. Após corar e descorar as raias do gel, as bandas proteolíticas foram visualizadas como mostrado na Figura 10.

Vale ressaltar que as duas proteases induzidas (29 kDa e 38 kDa) por ferimento e MJ são ativas em diferentes faixas de pH. A isoforma de 29 kDa é uma protease ácida com um pH ótimo de atividade próximo de 6,0. Além disso, a sua atividade é inibida em pHs menores que 4,0 e maiores que 7,0, sugerindo que esta enzima pode estar compartimentalizada em organelas ácidas tais como vacúolos. A outra protease (38 kDa) apresentou uma ampla faixa de atividade (de pH 5,0 a 10,0), mas a sua maior atividade foi observada em pH próximo de 7,0 (Figura 10).

A banda de 44 kDa, que permanece inalterada durante os estresses analisados, demonstrou uma faixa de atividade entre os pHs 4,0 e 10,0, porém, seu pH ótimo de atividade não pôde ser determinado. Já as proteases RCp1 e RCp2, que apresentaram massas moleculares superiores a 66 kDa, foram ativas entre pH levemente acidificado até o pH 10,0, com atividade ótima entre os pHs 8,0 e 9,0 (Figura 10).

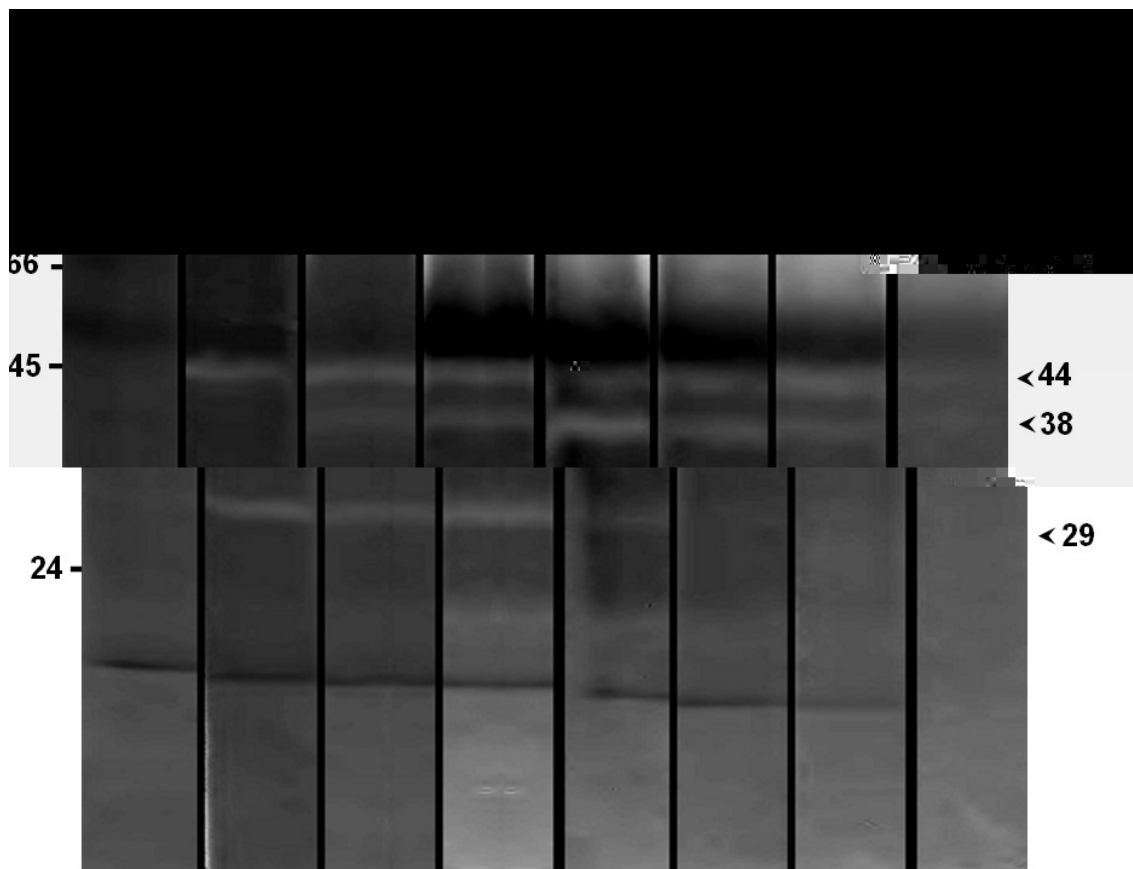


Figura 10. Efeito do pH sobre as atividades de proteases presentes em folhas de *R. communis* tratadas com MJ. Foram carregados 125 μg de proteína por poço de gel. Cada raia de gel foi incubada em 30 mL do tampão apropriado como descrito na metodologia. As amostras foram incubadas por 16 h a 37 °C e a seguir o gel foi corado com azul de coomassie. RCp, protease de *Ricinus communis*.

5.4. Ensaio de inibição e ativação proteolítica em gel

Várias bandas de proteases foram observadas em extratos de folhas de mamona, variando entre as massas de 29 kDa até mais de 66 kDa (Figura 8). A atividade de duas proteases (38 e 29 kDa) aumenta durante o estágio final de tratamento (72 h) tanto no estresse causado pela injúria como por MJ. O aumento na atividade proteolítica pode refletir um declínio no conteúdo de proteínas solúveis e a degradação da Rubisco pode ser um bom indicador do começo da senescência em plantas de mamona, conforme verificado na figura 5.

A fim de determinar as classes de proteases induzidas pelos estresses empregados, ensaios de inibição em gel de gelatina foram realizados utilizando apenas extratos foliares de plantas tratadas com MJ, visto que estas apresentavam níveis elevados das proteases de 38 e 29 kDa. Após a eletroforese os géis foram incubados em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5 com os inibidores correspondentes na concentração apropriada. Este tampão foi escolhido para o ensaio de inibição porque a isoforma de 29 kDa apresentou forte atividade em pH 6,0 e a isoforma de 38 kDa apresentou maior atividade em pH neutro (Figura 10). A inibição foi visualizada pela ausência ou decréscimo na intensidade das bandas proteolíticas em comparação com os géis controle revelados na ausência de inibidores (Figura 11).

As substâncias usadas neste ensaio de inibição são conhecidas inibir especificamente proteases cisteínicas (cistatina e E-64), proteases serínicas (PMSF e benzamidina), proteases aspárticas (pepstatina A) e metaloproteases (bestatina e EDTA). A Figura 11A mostra o efeito dos inibidores das classes serínicas, aspárticas e de metaloproteases sobre as proteases de folhas de mamona. RCp1 e RCp2 podem ser serino- ou metalototeases porque a inibição destas bandas foi maior que 50 % após densitometria quando foram usados PMSF e EDTA. Pouca inibição foi detectada para os outros inibidores empregados (bestatina, benzamidina e pepstatina). A quantificação destas observações é apresentada nos gráficos da Figura 12 e resumida na Tabela 1. Os inibidores de proteases serínicas, aspárticas e de metaloproteases empregados não tiveram qualquer efeito sobre as bandas proteolíticas de 44, 38 e 29 kDa (Figura 11A), entretanto, os inibidores de proteases cisteínicas (cistatina e E-64) exibiram inibição total das bandas de 44 kDa

e 38 kDa e inibição quase completa sobre a protease de 29 kDa na concentração final de 1 μ M (Figura 11B, Figura 12 e Tabela 1). A Figura 11A também demonstra que a protease de 44 kDa foi ativada por EDTA e que a presença de íons divalentes pode influenciar negativamente a atividade desta protease. O efeito dos ativadores de proteases cisteínicas testados (DTT e β -MeOH) é mostrado na Figura 11B, onde as proteases de 44 e 38 kDa parecem ser ativadas (> 25%) por essas substâncias nas concentrações empregadas.

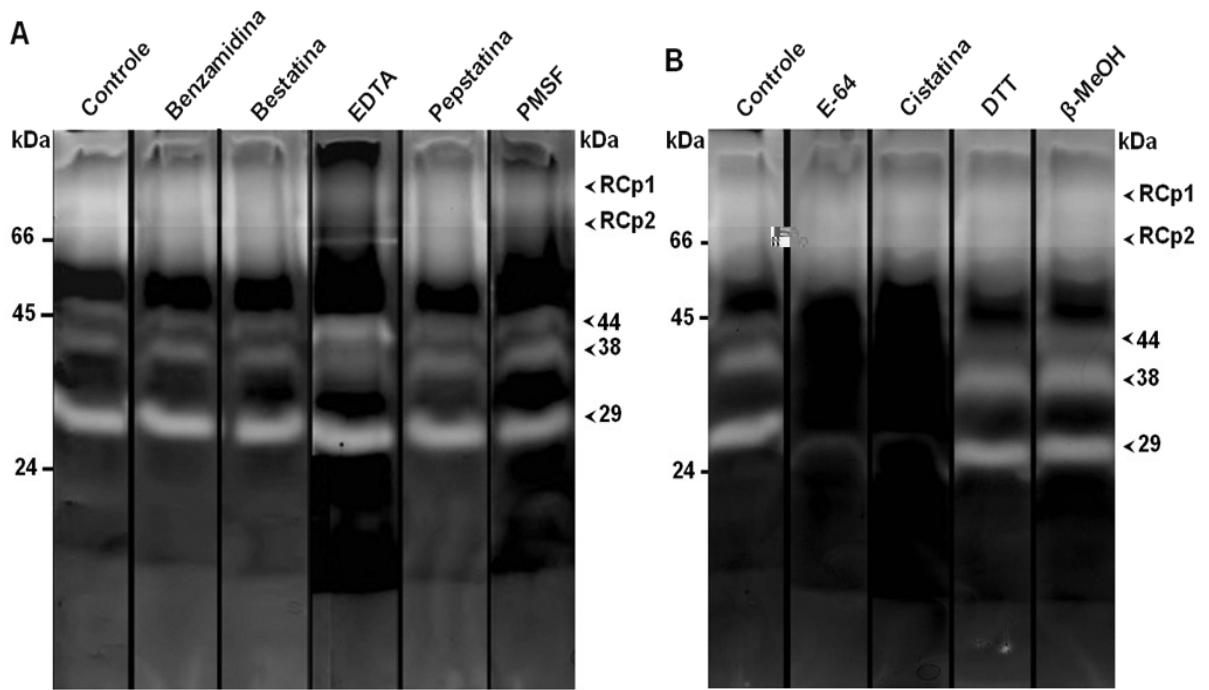


Figura 11. Zimografia em gel de gelatina de proteases de folhas de *R. communis* tratada com a.

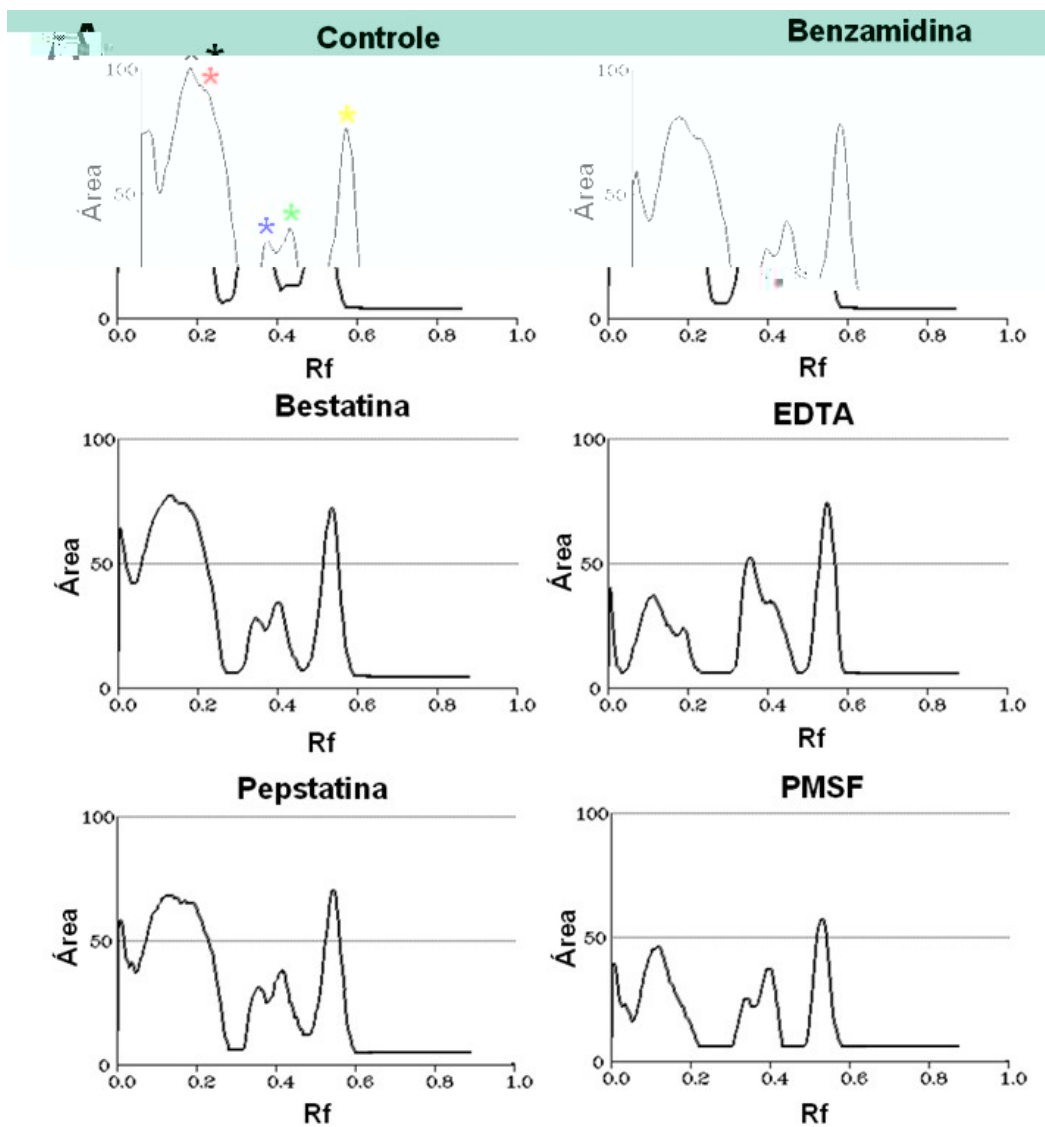


Figura 12. Análise densitométrica dos géis da figura 11 utilizando o programa “Gel Perfect”. Cada gráfico expressa a atividade proteolítica como área da banda contra a mobilidade relativa (Rf) de cada isoforma de protease. **A**, representa a análise das raias de gel incubadas com benzamidina 1 mM, bestatina 10 μ M, EDTA 10 mM, pepstatina 1 μ M, PMSF 1 mM; **B**, representa a análise das raias de gel incubadas com os inibidores E-64 1 μ M, cistatina μ M, e com os ativadores de proteases cisteínicas: DTT 100 μ M e com β -mercaptoetanol (β -MeOH)100 μ M. Os asteriscos representam: RCp1 (*), RCp2 (*), protease de 44 kDa (*), protease de 38 kDa (*) e a protease de 29 kDa (*), respectivamente.

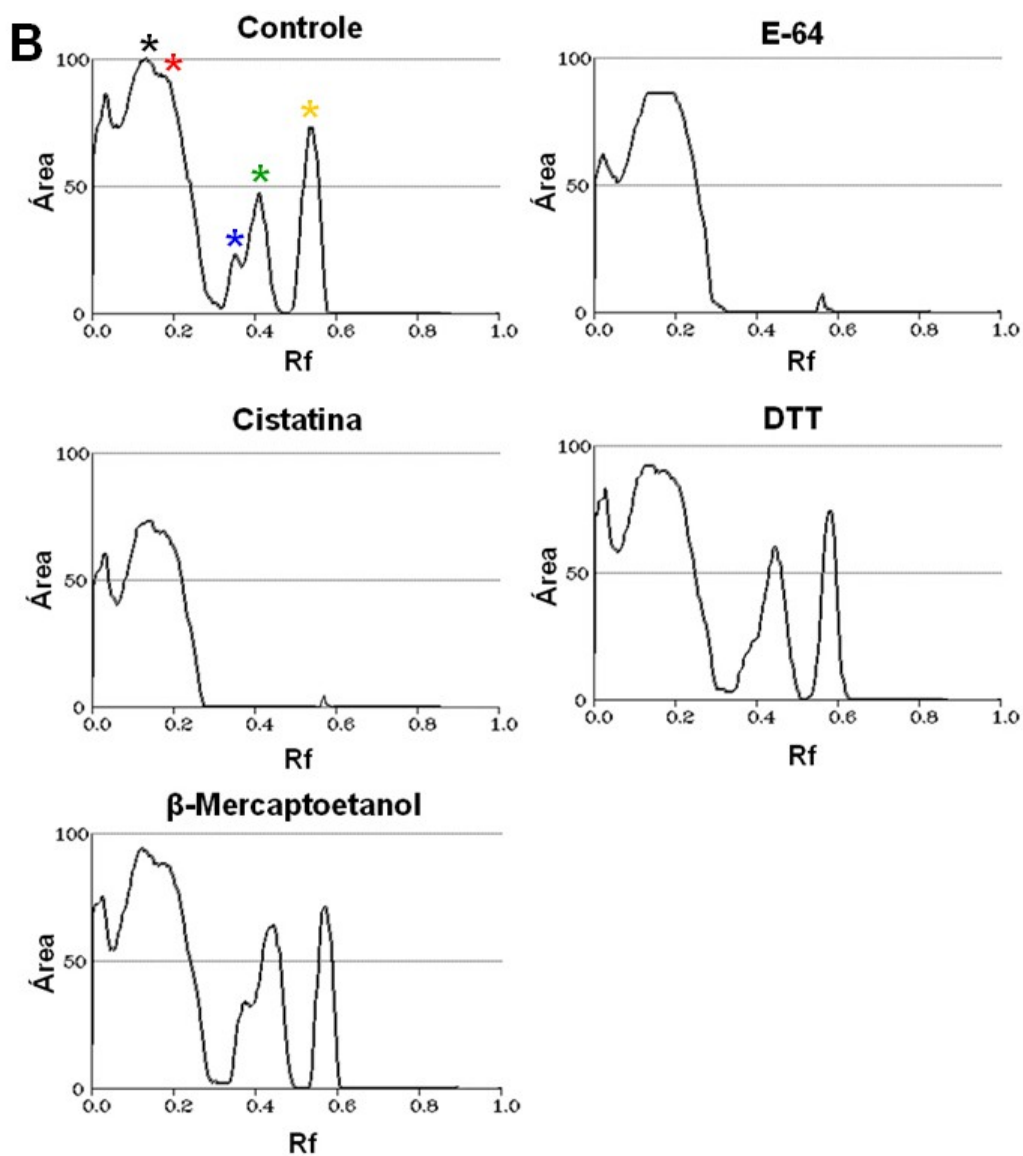


Figura 12. Análise densitométrica dos géis da figura 11 utilizando o programa “Gel Perfect”. Cada gráfico expressa a atividade proteolítica como área da banda contra a mobilidade relativa (Rf) de cada isoforma de protease. **A**, representa a análise das raias de gel incubadas c0.09187 4918 9143 Tm (s)Tj (35m9792 Tm (a)Tj ()Tj 0.09187 0 0 20.0918

Tabela 1. Sumário da caracterização de proteases

Protease ^a	Porcentagem de inibição ^b							Classe provável
	Benzamidina	Bestatina	EDTA	Pepstatina	PMSF	E-64	Cistatina	
RCp1								Serino/ metaloprotease
(>66 kDa)	19	22	64	32	54	14	28	
RCp2								Serino/ metaloprotease
(>66 kDa)	18	19	73	26	66	5	27	
44 kDa	10	9	0	0	20	100	100	Protease cisteínica
38 kDa	0	0	0	0	0	100	100	Protease cisteínica
29 kDa	0	0	0	0	25	96	98	Protease cisteínica

^aMassa molecular da banda proteolítica estimada a partir de padrões;

^bGrau de inibição por inibidores específicos para as classes de proteases. As concentrações usadas estão indicadas na metodologia. Inibidores de proteases serínicas: benzamidina e PMSF; inibidores de metaloproteinase: EDTA e bestatina; inibidores de proteases aspárticas: pepstatina A; inibidores de proteases cisteínicas: E-64 e cistatina.

RCp, Protease de *Ricinus communis*.

6. DISCUSSÃO

A Ribulose-1,5-bisphosphate carboxilase/oxigenase (Rubisco, EC 4.1.1.39) catalisa duas reações competidoras, a fixação fotossintética de CO₂ e a oxidação fotorespiratória de carbono, que ocorrem no estroma dos cloroplastos. Esta enzima é a proteína foliar mais abundante e é degradada durante o processo de senescência foliar e sob várias condições de estresse (Peoples *et al.*, 1980, Mae *et al.*, 1983, Mehta *et al.*, 1992, Ferreira e Teixeira, 1992; Eckardt e Pell, 1994). Neste estudo, foi demonstrado que o ferimento mecânico e metil jasmonato promovem a degradação da Rubisco (subunidades leve e pesada) (Figura 5) e isto ocorre em paralelo a mudanças no padrão de enzimas proteolíticas (Figuras 7, 8 e 9). A degradação da Rubisco foi coincidente com um aumento de proteínas foliares com 62 kDa, 32 kDa, 25 kDa e 20kDa dentro de 72 h após o tratamento com metil jasmonato. Algumas das proteínas reduzidas (LSU e SSU) pelo tratamento com MJ estão envolvidas no processo de assimilação fotossintética de carbono em plantas de mamona.

Para determinar se as proteínas induzidas menores que a Rubisco (48 kDa) eram ou não produtos de degradação da enzima foi feito um “western blotting” usando anticorpo anti-LSU. As proteínas de 32 kDa e 25 kDa parecem ser fragmentos da cadeia pesada da Rubisco como demonstrado por imunodeteção utilizando anticorpo contra a cadeia pesada da Rubisco (Figura 6). Ainda são necessários estudos adicionais de seqüenciamento para determinar se essa fragmentação ocorre na porção N- ou C-terminal, o que pode ser de grande valia para compreensão da via de degradação da Rubisco durante o estresse causado pelo MJ. Cavalcante *et al.* (1999) mostraram anteriormente que o estresse causado por MJ promove a indução de um produto de degradação C-terminal da subunidade pesada da Rubisco com cerca de 15 kDa em folhas de mamona. A soma das massas moleculares do fragmento de 32 kDa encontrado nesse trabalho com o fragmento encontrado por Cavalcante *et al.* (1999) é proporcional a massa da LSU determinada por eletroforese.

Alguns estudos mostram que a Rubisco é diretamente fragmentada por espécies reativas de oxigênio (ROS) em um fragmento N-terminal de 37 kDa e um C-terminal de 16 kDa (Ishida *et al.*, 1997; Ishida *et al.*, 1998) ou degradada por protease(s) após a modificação da molécula por ROS em lisatos de cloroplastos

iluminados (Desimone *et al.*, 1996, Desimone *et al.*, 1998). Soares *et al.* (2004) demonstraram que MJ promove a redução dos níveis de atividade da 2-Cis peroxidase e guaiacol peroxidase. Estas enzimas podem estar envolvidas na remoção do peróxido de hidrogênio em folhas de *Ricinus communis*. É possível que as ROS produzidas possam disparar a proteólise por modificação do substrato ou por ativação de um sistema proteolítico específico nessa espécie.

Durante a busca por proteases em folhas de mamona usando zimografia em gel de gelatina foi possível identificar duas proteases cisteínicas (38 kDa e 29 kDa) que são ativadas por MJ e, mais fracamente, pela injúria (Figura 8). A protease cisteínica de 29 kDa tem um pH ótimo ácido, enquanto a protease de 38 kDa tem uma atividade ótima perto da neutralidade (Figura 10). Outra protease também foi detectada (RCp2), esta enzima também parece participar da resposta ao MJ, no entanto, sua massa molecular e classe proteolítica ainda não foram determinadas. RCp2 pode ser uma serino- ou metaloprotease visto que ela foi fortemente inibida por EDTA e PMSF (Tabela 1). Estes resultados sugerem que MJ está envolvido na sinalização disparada pelo ferimento mecânico, levando assim ao aumento na atividade proteolítica. As proteases podem desempenhar sua função na degradação de polipeptídeos foliares que estão danificados ou desnaturados após a exposição às condições de estresse.

Os jasmonatos podem influenciar a expressão gênica em uma ampla gama de processos, tais como ferimento mecânico, ataque por patógeno, estresse osmótico ou desidratação e senescência foliar (Wasternack e Parthier, 1997). Os jasmonatos estão geralmente associados com o declínio na expressão de genes envolvidos na fotossíntese e com a indução de genes codificando proteínas induzidas por jasmonatos (JIPs), que incluem enzimas associadas à proteólise (Reinbothe *et al.*, 1994; Forsthoefel *et al.*, 1998). Em folhas de cevada a senescência é promovida por MJ e foi monitorada pela degradação da Rubisco (Weidhase *et al.*, 1987). A indução de proteases cisteínicas em resposta ao ferimento mecânico e ao tratamento com MJ em *Ricinus communis* pode sugerir que essas enzimas aceleram a ciclagem de proteínas para aumentar o “pool” de aminoácidos livres para síntese de proteínas de defesa contra o ataque de herbívoros e/ou que proteases cisteínicas possuem alguma papel na sinalização por jasmonatos. Proteases induzidas por ferimento já

foram descritas e incluem uma carboxipeptidase vacuolar (Walker-Simmons and Ryan, 1977), uma leucina aminopeptidase (LAP) em folhas de batata e tomate (Hildmann *et al.*, 1992; Pautot *et al.*, 1993), uma protease aspártica em folhas de tomate (Schaller e Ryan, 1996), e uma proteinase cisteínica em folhas de fumo (Linthorst *et al.*, 1993).

Um estudo recente trouxe evidências diretas do envolvimento de proteases cisteínicas na defesa vegetal, especialmente em plantas que produzem látex (*Carica papaya* e *Ficus carica*). Foi demonstrado que dietas artificiais contendo papaína ou ficina, nas concentrações que elas ocorrem no látex, são tóxicas as larvas de bicho-da-seda. Além disso, as larvas morriam quando se alimentavam de folhas contendo látex, porém, isso não acontecia quando o látex era removido das folhas ou quando as proteases cisteínicas eram inativadas por E-64 (Kono *et al.*, 2004). Um outro exemplo de protease vegetal induzida no sítio de alimentação em linhagens de milho resistentes a herbivoria por *Spodoptera frugiperda* é Mir1-CP. Esta proteína é uma protease cisteínica de 33 kDa capaz de reduzir o crescimento larval e de permeabilizar a matrix peritrófica *in vitro*. Esta permeabilidade é maior do que a permeabilidade induzida por outras proteases cisteínicas tais como papaína, bromelaína e ficina, sugerindo a função defensiva de Mir1-CP em plantas de milho (Mohan *et al.*, 2006).

No presente estudo, nós realizamos a caracterização parcial de duas proteases cisteínicas em folhas de mamona pela primeira vez, que são ativadas em resposta ao ferimento mecânico e ao tratamento por metil jasmonato. Uma protease apresentou pH ótimo ácido (29 kDa) e a outra teve um pH ótimo neutro (38 kDa), embora a protease neutra ativada por grupamentos tióis tenha atividade tanto em pH ácido como em pH básico. Isso pode sugerir uma localização celular distinta para essas proteases e estudos adicionais são necessários para determinar os compartimentos subcelulares que contêm ambas as atividades. Proteases cisteínicas (EC 3.4.22.-) exibem pHs ótimos ácidos ou neutros, são ativadas pelo grupamento tiol, e estão localizadas tipicamente no vacúolo (Holwerda *et al.*, 1992) ou são secretadas (Koehler e Ho, 1990). Na maioria dos exemplos, estas proteínas são sintetizadas sob a forma de zimogênios que sofrem múltiplos passos de processamento pós-transducional até chegar as suas formas maduras ativadas de

forma autocatalítica ou com a ajuda de enzimas de processamento (Mitsuhashi e Minamikawa, 1989; Koehler e Ho, 1990; Okamoto e Minamikawa, 1995).

Hortensteiner e Feller (2002) revelaram que a proteólise de proteínas do cloroplasto começa durante a fase inicial da senescência. Em nível celular, a morte celular programada (PCD) relacionada à senescência inclui o processamento de componentes celular, fragmentação do DNA e degradação do cloroplasto, que são eventos que acontecem bem antes da ruptura do vacúolo (Trobacher *et al.*, 2006), evento este, que define a morte celular (Jones, 2001). Antes do extravazamento, o vacúolo torna-se acidificado, o que fornece um ambiente propício para a atividade de hidrolases. A liberação destas enzimas, que incluem proteinases cisteínicas, e acidificação do citosol após a ruptura do vacúolo iniciam o processamento da célula morta e os nutrientes liberados podem ser exportados para outras partes em crescimento do vegetal (Trobacher *et al.*, 2006). Proteases cisteínicas do tipo papaína têm sido implicadas na PCD devido ao fato de inibidores dessas proteases (cistatinas) serem capazes de suprimir a PCD em células de soja, em plantas de fumo transgênicas e em *Arabidopsis* (Solomon *et al.*, 1999; Belenghi *et al.*, 2003). As proteases de folhas de *Ricinus communis* foram quase totalmente inibidas por cistatina e por E-64 (Tabela 1), isso sugere que os sinais de senescência causados pelo metil jasmonato podem ser mediados por proteinases similares à papaína.

Compartimentos celulares derivados do retículo endoplasmático estão presentes em células da epiderme foliar de *Arabidopsis*. Eles contêm precursores de proteinases cisteínicas e são conhecidos como vesículas de precursores de proteases (PPVs). Após estresse, as PPVs fundem-se umas as outras e ao vacúolo entregando os precursores de proteases ao vacúolo, que então efetuam a maturação de outras proteases e participam da degradação de componentes celulares durante a senescência (Hayashi *et al.*, 2001). Uma protease cisteínica induzida por senescência encontrada em PPVs de *Arabidopsis* é a enzima de processamento vacuolar gama (γ -VPE). As VPEs são reguladas positivamente na senescência de folhas e cotilédones, por estresse (Kinoshita *et al.*, 1999), e durante a defesa contra patógeno (Rojo *et al.*, 2004).

Durante a senescência do endosperma de sementes de *Ricinus communis* organelas similares as PPVs, conhecidas como ricinossomos, entregam suas

proteases diretamente no citosol após a acidificação (Schmid *et al.*, 1999). Os ricinossomos contêm CysEP, um tipo de endoprotease cisteínica com uma seqüência C-terminal KDEL (Gietl *et al.*, 1997), que direciona a proteína para o lúmen do retículo endoplasmático. Proteases contendo KDEL foram identificadas em sementes (Schmid *et al.*, 1999) e em órgãos florais senescentes como pétalas (Valpuesta *et al.*, 1995). Os ricinossomos são contudo, claramente distintos das PPVs, de modo que se presume que eles atuem após o colapso vacuolar, entregando seu conteúdo no citosol ao invés de levá-lo ao vacúolo. As PPVs são encontradas em folhas, raízes e flores, enquanto os ricinossomos são achados em sementes e tecidos de pétalas (Rogers, 2006).

O número de proteinases cisteínicas isoladas de plantas tem aumentado substancialmente nos últimos anos. Os resultados apresentados neste trabalho ajudam a compreender a composição proteolítica de extratos foliares de mamona e fornecem algumas propriedades bioquímicas de duas proteases cisteínicas induzidas por ferimento mecânico e pelo tratamento com metil jasmonato. A indução dessas enzimas por metil jasmonato sugere uma possível função na senescência foliar e um envolvimento na regulação da resposta à injúria em plantas de *Ricinus communis*.

7. CONCLUSÕES

- O ferimento mecânico e o tratamento com metil jasmonato promovem a redução nas subunidades leve e pesada da Rubisco em folhas de *Ricinus communis* L.;
- A subunidade pesada da Rubisco (48 kDa) é degradada em fragmentos de 32 kDa e 25 kDa durante o estresse por metil jasmonato;
- Tanto a injúria como o hormônio metil jasmonato são indutores de proteases cisteínicas em folhas de mamona;
- As proteases induzidas apresentaram uma massa molecular aproximada de 38 kDa e 29 kDa como demonstrado por zimografia, e são fortemente inibidas por cistatina e E-64;
- A protease cisteínica de 38 kDa, ativada por DTT e 2-mercaptoetanol, apresentou um pH ótimo próximo de 7,0, enquanto a protease cisteínica de 29 kDa é uma enzima ácida com pH ótimo próximo de 6,0.

8. REFERÊNCIAS

- Alvarez-Fernandez, M., Barrett, A.J., Gerhartz, B., Dando, P. M., Ni, J., Abrahamson, M. 1999.** Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due to a novel second reactive site. *Journal of Biological Chemistry* 274, 19195–19203.
- Aldridge, D. C., Galt, S., Giles, D., Turner, W. B. 1971.** Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 1623-1627 *apud Mueller, M. J. 1997.* Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis, *Physiologia Plantarum* 100, 653–663.
- Azevedo, D. M. P. & Lima, E. F. 2001.** O agronegócio da mamona no Brasil, *EMBRAPA*, 1 ed, Brasília – DF, p. 213-227
- Bah S., Paulsen BS, Diallo D, Johansen HT. 2006.** Characterization of cysteine proteases in Malian medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology* 107, 189-198.
- Beale, M. H., Ward, J. L. 1998.** Jasmonates: key players in the plant. defence, *Natural Product Reports* 15, 533–548.
- Belenghi, B., Acconcia, F., Trovato, M., Perazzolli, M., Bocedi, A., Polticelli, F., Ascenzi, P., Delledonne, M. 2003.** AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death. *European Journal of Biochemistry* 270, 2593–2604.
- Bergey, D. R., Howe, G. A., Ryan, C. A. 1996.** Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93, 12053-12058.
- Bleé, E. 2002.** Impact of phyto-oxylipins in plant defense, *Trends in Plant Science* 7, 315-321.
- Bozzo, S., Retamal, C. 1991.** Geles unidimensionales. Un nuevo método densitométrico para computadores personales, *Archivos de Biología y Medicina Experimentales* 24, 181-182.
- Bradford, M. M. 1976.** A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

- Cavalcante, A. P. R., Jacinto, T., Machado, O. L. T. 1999.** Methyl jasmonate changes the levels of rubisco and other leaf proteins in *Ricinus communis*. *Acta Physiologiae Plantarum* 21, 161-166.
- Chen, G. H., Huang, L. T., Yap, M. N., Lee, R. H., Huang, Y. J., Cheng, M. C., Chen, S. C. G. 2002.** Molecular characterization of a senescence-associated gene encoding cysteine proteinase and its gene expression during leaf senescence in sweet potato. *Plant and Cell Physiology* 43, 984–991
- Creelman, R. A., Mullet, J. E. 1995.** Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 92, 4114–4119.
- Creelman, R. A., Mullet, J. E. 1997.** Biosynthesis and action of jasmonates in plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 355–381.
- Demole, E., Lederer, E., Mercier, D. 1962.** Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin, *Helvetica Chimica Acta* 45, 675–685.
- Desimone, M., Wagner, E., Johannigmeier, U. 1998.** Degradation of active-oxygen-modified ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by chloroplastic proteases requires ATP-hydrolysis. *Planta* 205, 459–466.
- Desimone, M., Henke, A., Wagner, E. 1996.** Oxidative stress induces partial degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in isolated chloroplasts of barley. *Plant Physiology* 111, 789–796.
- Dicke, M., Gols, R., Ludeking, D., Posthumus Maarten, A. 1999.** Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatiles in lima bean plants, *Journal of Chemical Ecology* 25, 1907–22.
- Dombrowski, J. E., Pearce, G., Ryan, C. A. 1999.** Proteinase inhibitor-inducing activity of the prohormone prosystemin resides exclusively in the C-terminal systemin domain, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96, 12947-12952.
- Drake, R., Jhon, I., Farrel, A., Cooper, W., Schuch, W., Grierson, D. 1996.** Isolation and analysis of cDNA encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant Molecular Biology* 30, 755-767.

- Eckardt, N. A., Pell, E. J. 1994.** O₃-induced degradation of Rubisco protein and loss of Rubisco mRNA in relation to leaf age in *Solanum tuberosum* L. *New Phytologist* 127, 741–748.
- Farmer, E. E., Ryan, C. A. 1990.** Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 87, 7713-7716.
- Farmer, E. E., Ryan, C. A. 1992.** Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors, *The Plant Cell* 4, 129-134.
- Feller, U., Fischer, A. 1994.** Nitrogen metabolism in senescing leaves, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13, 241-273.
- Ferreira, R. M. B., Teixeira, A. R. N. 1992.** Sulfur starvation in *Lemna* leads to degradation of ribulose-bisphosphate carboxylase without plant death. *Journal of Biological Chemistry* 267, 7253–7257.
- Fornazieri-Júnior, A. 1986.** Mamona: uma rica fonte de óleo e de divisas, Editora Ícone LTDA, Coleção Brasil Agrícola, SP – Brasil, 72 p.
- Forsthoefel, N. R., Cushman, M. A. F., Ostrem, J. A., Cushman, J. C. 1998.** Induction of a cysteine protease cDNA from *Mesembryanthemum crystallinum* leaves by environmental stress and plant growth regulators. *Plant Science* 136, 195–206.
- Gepstein, S., Sabehi, G., Carp, M. J., Hajouj, T., Nesher, M. F., Yariv, I., Dor, C., Bassani, M. 2003.** Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *The Plant Journal* 36, 629-642.
- Gietl, C., Wimmer, B., Adamec, J., Kalousek, F. 1997.** A cysteine endopeptidase isolated from castor bean endosperm microbodies processes the glyoxysomal malate dehydrogenase precursor protein. *Plant Physiology* 113, 863–871.
- Giuli, J. S. A. 2006.** Avaliação dos efeitos provocados pelo metil jasmonato em *Ricinus communis* através de análises do perfil protéico e rendimento fotossintético. Tese de mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ.
- Green, T. R., Ryan, C. A. 1972.** Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects, *Science* 175, 776–77, 1972.

- Guo, Y., Cai, Z., Gan, S. 2004.** Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant, Cell and Environment* 27, 521-549.
- Hamberg, M., Gardner, H. W. 1992.** Oxilipin pathway to jasmonates: Biochemistry and biological significance, *Biochimica et Biophysica Acta* 1165, 1-18, 1992.
- Hayashi, Y., Yamada, K., Shimada, T., Matsushima, R., Nishizawa, N. K., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. 2001.** A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 42, 894–899.
- Hieng, B., Ugrinovic, K., Sustar-Vozlic, J., Kidric, M. 2004.** Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. *Journal of Plant Physiology* 161, 519–530.
- Hildmann, T., Ebnet, M., Pefia-Cortez H., Sfinchez-Serrano, J. J., Willmitzer, L., Prat, S. 1992.** General roles for abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* 4, 1157-1170.
- Holwerda, B. C., Padgett, H. S., Rogers, J. C. 1992.** Proaleurain vacuolar targeting is mediated by short contiguous peptide interactions. *Plant Cell* 4, 307–318.
- Hortensteiner, S., Feller, U. 2002.** Nitrogen metabolism and remobilization during senescence, *Journal of Experimental Botany* 53, 927–937.
- Huffaker, R. C. 1990.** Proteolytic activity during senescence of plants, *New Phytology* 116, 199-231.
- Ishida, H., Nishimori, Y., Sugisawa, M., Makino, A., Mae, T. 1997.** The large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is fragmented into 37-kDa and 16-kDa polypeptides by active oxygen in the lysates of chloroplasts from primary leaves of wheat. *Plant and Cell Physiology* 38, 471–479.
- Ishida, H., Shimizu, S., Makino, A., Mae, T. 1998.** Light-dependent fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in chloroplasts isolated from wheat leaves. *Planta* 204, 305–309.
- Jacinto, T., McGurl, B., Franceschi, V., Delano-Freier, J., Ryan, C. A. 1997.** Tomato prosystemin confers wound-inducible, vascular bundlespecific expression of the β -glucuronidase gene in transgenic tomato and tobacco plants, *Planta* 203, 406–411.

- Jones, A. M. 2001.** Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiology* 125, 94-97.
- Kende, H., Zeevart, J. A. D. 1997.** The five "Classical" hormones, *Plant Cell* 9, 1197–1210.
- Kessler, A., Baldwin, I. T. 2002.** Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis, *Annual Review of Plant Biology* 53, 299-328.
- Kingston-Smith, A. H., Bollard, A. L., Minchin, F. R. 2005.** Stress-induced changes in protease composition are determined by nitrogen supply in non-nodulating white clover. *Journal of Experimental Botany* 56, 745-753.
- Kinoshita, T., Yamada, K., Hiraiwa, N., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. 1999.** Vacuolar processing enzyme is upregulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *The Plant Journal* 19, 43–53.
- Koehler, S. M., Ho, T. H. D. 1990.** Hormonal regulation, processing, and secretion of cysteine proteinases in barley aleurone layers, *Plant Cell* 2, 769–783.
- Kono, K., Hirayama, C., Nakamura, M., Tateishi, K., Tamura, Y., Hattori, M., Kohno, K. 2004.** Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *The Plant Journal* 37, 370–378
- Korth, K. L., Dixon, R. A. 1997.** Evidence for chewing insect-specific molecular events distinct from a general wound response in leaves, *Plant Physiology* 115, 1299–1305.
- Krueger, J. Thomas, C. M., Golstein, C., Dixon, M. S., Smoker, M., Tang, S., Mulder, L., Jones, J. D. G. 2002.** A tomato cysteine protease requires for cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. *Science* 296, 744-747.
- Kumar, P. V., Ramakrishna, Y. S., Ramana Rao, B. V., Victor, U. S., Srivastava, N. N., Subba Rao, A. V. M. 1997.** Influence of moisture, thermal and photoperiodic regimes on the productivity of castor beans (*Ricinus communis* L.). *Agricultural and Forest Meteorology* 88, 279-289.
- Kunakbaeva, Z., Carrasco, R., Rozas, I. 2003.** An approximation to the mechanism of inhibition of cysteine proteases: nucleophilic sulfur addition to Michael acceptors type compounds. *Journal of Molecular Structure* 626, 209–216.

- Laemmli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685
- Lam, E., Kato, N., Lawton, M. 2001.** Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response, *Nature* 411, 848–853.
- Leist, M., Jaathela, M. 2001.** Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 589-598.
- Leon, J., Sanchez-Serrano, J. J. 1999.** Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants, *Plant Physiology and Biochemistry* 37, 373–380.
- Linthorst, H. L. M., van der Does, C., Brederode, F. T., Bol, J. F. 1993.** Circadian expression and induction by wounding of tobacco genes for cysteine proteinase. *Plant Molecular Biology* 21, 685- 694.
- Lohman, K. N., Gan Susheng, J. M. C., Amasino, R. M. 1994.** Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 92, 322-328
- Mae, T., Makino, A., Ohira, K. 1983.** Changes in the amounts of ribulose biphosphate carboxylase synthesized and degraded during the life span of rice leaf (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology* 24, 1079–1086.
- Mazal, S., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E., Levine, A. 1999.** The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* 11, 431–444.
- McGurl, B., Orozco-Cardenas, M., Pearce, G., Ryan, C. A. 1994.** Overexpression of a CaMVprosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that induces proteinase inhibitor synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91, 9799–9802.
- McGurl, B., Pearce, G., Orozco-Cardenas, M., Ryan, C. A. 1992.** Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene, *Science* 255,1570–1573.
- McKeon, T. A., Lin, J. T., Goodrish-Tanrikulu, M., Stafford, A. E. 1997.** Ricinoleate biosynthesis in castor microsomes. *Industrial Crops and Products* 6, 383-389.
- Mehta, R. A., Fawcett, T. W., Porath, D., Mattoo, A. K. 1992.** Oxidative stress causes rapid membrane translocation and in vivo degradation of ribulose-1,5-

- bisphosphate carboxylase/oxygenase. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 2810–2816.
- Mitsubishi, W., Koshiba, T., Minamikawa, T. 1986.** Separation and characterization of two endopeptidases from cotyledons of germinating *Vigna mungo* seeds, *Plant Physiology* 80, 628-634.
- Mitsubishi, W., Minamikawa, T. 1989.** Synthesis and posttranslational activation of sulfhydryl-endopeptidase in cotyledons of germinating *Vigna mungo* seeds. *Plant Physiology* 89, 274–279.
- Mohan, S., Mab, P. W. K., Pechanc, T., Bassforda, E. R., Williamsd, W. P., Luthea, D. S. 2006.** Degradation of the *S. frugiperda* peritrophic matrix by an inducible maize cysteine protease. *Journal of Insect Physiology* 52, 21–28
- Morris, K., Mackerness, S., Page, T., John, C. F., Murphy, A. M., Carr, J. P., Buchanan-Wollaston, V. 2000.** Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *The Plant Journal* 23, 677-685
- Mueller, M. J. 1997.** Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis, *Physiologia Plantarum* 100, 653–663.
- Nooden, L. D. 1988.** Whole plant senescence. In *Senescence and aging in plants*. Edited by L. D. Nooden and A. C. Leopold. Academic Press, San Diego, Calif. pp. 391-439.
- Nooden, L. D., Kahanak, G. M., Okatan Y. 1979.** Prevention of monocarpic senescence in soybeans with auxin and cytokinin: an antidote for self-destruction. *Science* 206, 841-843.
- Okamoto, T., Minamikawa, T. 1995.** Purification of a processing enzyme (VmPE-1) that is involved in post-translational processing of a plant cysteine endopeptidase (SH-EP), *European Journal of Biochemistry* 231, 300–305.
- Pautot, V., Holzer, F. M., Reisch, B., Walling, L. L. 1993.** Leucine aminopeptidase: an inducible component of the defense response in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 90, 9906-9910.
- Pearce, G., Moura, D. S., Stratmann, J., Ryan, C. A. 2001.** Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98, 12843–12847.

- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., Ryan, C. A. 1991.** A polypeptide from tomato leaves activates the expression of proteinase inhibitor genes. *Science* 253, 895–898.
- Peoples, M. B., Beilharz, V. C., Waters, S. P., Simpson, R. J., Dalling, M. J. 1980.** Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.): II. Chloroplast senescence and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Planta* 149, 241–251.
- Reinbothe, S., Mollenhauer, B., Reinbothe, C. 1994.** JIPs and RIPs: The Regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *The Plant Cell* 6, 1197-1209.
- Retamal, C. A., Thiebaut, P., Alves, E. W. 1999.** Protein Purification from polyacrylamide gels by sonication extraction. *Analytical Biochemistry* 268, 15–20.
- Reymond, P., Farmer, E. E. 1998.** Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression, *Current Opinion in Plant Biology* 1, 404-411.
- Rogers, H. J. 2006.** Programmed Cell Death in Floral Organs: How and Why do Flowers Die? *Annals of Botany* 97, 309–315.
- Rojo, E., Martin, R., Carter, C., Zouhar, J., Pan, S., Plotnikova, J., Jin, H., Paneque, M., Sanchez-Serrano, J. J., Baker, B. 2004.** VPEy exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. *Current Biology* 14, 1897–1906.
- Ryan, C. A. 1974.** Assay and biochemical properties of the proteinase inhibitor inducing factor, a wound hormone, *Plant Physiology* 54, 328–332.
- Ryan, C. A. 2000.** The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes, *Biochimica et Biophysica Acta* 1477, 112-121.
- Ryan, C. A., Pearce, G. 1998.** Systemin: a polypeptide signal for plant defensive genes, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14, 1–17
- Schägger, H., von Jagow, G. 1987.** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166, 368-379.
- Schaller, A. 1998.** Action of proteolysis-resistant systemin analogues in wound signalling. *Phytochemistry* 47, 605–609.

- Schaller, A., Ryan, C. A. 1996.** Molecular cloning of a tomato leaf cDNA encoding an aspartic protease, a systemic wound response protein. *Plant Molecular Biology* 31, 1073-1077.
- Schmid, M., Simpson, D., Gietl, C. 1999.** Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96, 14159–14164.
- Sittenfeld, A., Moreno, E. 1988.** A sensitive blotting system for detection of a-fetoprotein variants with monoclonal and polyclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods* 106, 19-26.
- Soares, A. M. S., Souza, T. F., Domingues, S. J. S., Jacinto, T., Machado, O. L. T. 2004.** Methyl jasmonate promotes the transient reduction of the levels of 2-Cys peroxiredoxin in *Ricinus communis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 42, 543–547.
- Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E., Levine, A. 1999.** The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* 11, 431–443.
- Stintzi, A., Browse, J. 2000.** The *Arabidopsis* male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 97, 10625–10630.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., Farmer, E. E. 2001.** Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98, 12837–12842.
- Strassner, J., Schaller, F., Frick, U.B., Howe, G.A., Weiler, E.W., Amrhein, N., Macheroux, P. & Schaller, A. 2002.** Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response, *Plant Journal* 32, 585-601.
- Trobacher, C. P., Senatore, A., Greenwood, J. S. 2006.** Mastermind or minions? Cysteine proteinases in plant cell death. *The Canadian Journal of Botany* 84, 651-667.

- Valpuesta, V., Lange, N. E., Guerrero, C., Reid, M. S. 1995.** Up-regulation of a cysteine protease accompanies the ethylene-insensitive senescence of daylily (*Hemerocallis*) flowers. *Plant Molecular Biology* 28, 575–582.
- Van Breusegem, F., Vranova, E., Dat, J. F., Inze, D. 2001.** The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161, 405–414.
- Vercammen, D., Van De Cotte, B., De Jaeger, G., Eeckhout, D., Castells, P., Vandepoele, K., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., Inze, D., Van Breusegem, F. 2004.** Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *Journal of Biological Chemistry* 279, 45329-45336.
- Vernet, T., Berti, P.J., de Montigny, C., Musil, R., Tessier, D. C., Menard, R., Magny, M. C., Stores, A. C, Thomas, D. Y. 1995.** Processing of the papain precursor, the ionization state of a conserved amino acid motif within the pro region participates in the regulation of intramolecular processing. *Journal of Biological Chemistry* 270, 10838-10846.
- Vierstra, R. D. 1993.** Protein degradation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44, 385–410.
- Walker-Simmons, M., Ryan, C. A. 1977.** Wound-induced peptidase activity in tomato leaves. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 74, 411-416.
- Walling, L. L. 2000.** The myriad plant responses to herbivores, *Journal of Plant Growth Regulation* 19, 195–216.
- Wasternack, C., Parthier, B. 1997.** Jasmonate-signalled plant gene expression, *Trends in Plant Science* 2, 302–307.
- Weidhase, R. A., Lehmann, J., Kramelt, H., Sembdner, G., Parthier, B. 1987.** Degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and chlorophyll in senescing barley leaf segments triggered by jasmonic acid methylester, and counteraction by cytokinin. *Physiologia Plantarum* 69, 161-166.
- Xavier-Filho, J. 1993.** Sementes e suas defesas contra insetos. Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimentos, *Organizações dos Estados*

- Xu, Z. F., Chye, M. L., Li, H. Y., Xu, F. X., Yao, K. M. 2003.** G-box binding coincides with increased *Olanum melongenai* cysteine proteinase expression in senescent fruits and circadian-regulated leaves. *Plant Molecular Biology* 51, 9-19.
- Yoshida, T., Minamikawa, T. 1996.** Successive aminoterminal proteolysis of the large subunit of Ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase by vacuolar enzymes from French bean leaves. *European Journal of Biochemistry* 238, 317-324.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.

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](#)